

# Priprava i karakterizacija homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i citozina

---

**Novaković, Anja**

**Master's thesis / Diplomski 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:159:577417>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2017.

Anja Novaković/800MB

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA  
HOMO- I HETEROANULARNO  
SUPSTITUIRANIH DERIVATA  
FEROCENA I CITOZINA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Jasmine Lapić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Mateje Toma mag. appl. chem..

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

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

Diplomski rad

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Biotehnologija

### PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA HOMO- I HETEROANULARNO SUPSTITUIRANIH DERIVATA FEROCENA I CITOZINA

*Anja Novaković, 800/MB*

**Sažetak:** Pirimidini i purini s ferocenoilnim supstituentom predstavljaju zanimljive organometalne konjugate budući njihova struktura uključuje biološki te također i elektrokemijski aktivne komponente. U literaturi je opisana priprema niza nukleobaza supstituiranih ferocenom korištenjem različitih razmaknica. U prijašnjim studijama, pripravljene su N1-ferocenoilirane nukleobaze (uracil, timin i 5-florouracil). Karbonilna skupina kao razmaknica omogućuje konjugaciju ferocenoilne jedinice s aromatskim prstenom nukleobaza dok do delokalizacija elektrona može doći dodavanjem supstituenata na ferocenski prsten. Imajući ovo na umu, cilj ovog diplomskog rada bila je sinteza homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i citozina. Posebna pažnja posvećena je utjecaju otapala, temperature deprotoniranja i kopulacije na iskorištenje i regioselektivnost reakcija.

**Ključne riječi:** biološka aktivnost, citozin, ferocen, kopulati

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 20 slika, 18 shema, 1 tablicu, 35 literaturnih navoda, 0 priloga

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc.dr.sc. Jasmina Lapić*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Izv.prof.dr.sc. Senka Djaković
2. Doc.dr.sc. Jasmina Lapić
3. Izv.prof.dr.sc. Renata Teparić

**Datum obrane:** 07.12.2017

## BASIC DOCUMENTATION CARD

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

Graduate Thesis

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HOMO- AND HETEROANNULARLY SUBSTITUTED FERROCENOYL-CYTOSINE DERIVATIVES

*Anja Novaković, 800/MB*

**Abstract:** Pyrimidines and purines substituted by ferrocenyl moiety present interesting organometallic conjugates as their structures incorporate both biologically and electrochemically active components. A series of ferrocene-substituted nucleobases has been described incorporating a different set of linkers. In previous studies, N1-ferrocenoylated pyrimidine nucleobases (uracil, thymine and 5-fluorouracil) were prepared. Carbonyl spacer enables extended conjugation involving ferrocenyl and nucleobase aromatic moieties, and the electron delocalization can be tuned by inserting substituents at the ferrocene ring system. With having this in mind, the aim of this thesis was to show the preparation procedure of homo- and heteroannularly substituted ferrocenoyl-cytosine derivatives. Special attention is dedicated to the solvent, the temperature effect on the deprotonation and coupling steps on yield and the regioselectivity of the reaction.

**Key words:** biological activity, couples, cytosine, ferrocene

**Thesis contains:** 41 pages, 20 figures, 18 schemes, 35 references, 0 supplements

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD Jasmina Lapić, Assistant Professor*

**Reviewers:**

1. PhD/ Senka Djakovic, Associate Professor
2. PhD Jasmina Lapić, Assistant Professor
3. PhD/ Renata Teparić, Associate Professor

**Thesis defended:** 07.12.2017.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Ferocen .....	2
2.2. Pirimidinske baze .....	3
2.2.1. Citozin.....	5
2.3. Nukleozidi.....	7
2.4. Analози nukleozida .....	8
2.5. Kopulati ferocena i nukleobaza .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>17</b>
3.1. Materijali.....	17
3.2. Metode rada.....	17
3.3. Sheme priprave kopulata ferocenoil-klorida i citozina .....	18
3.4. Protokoli za pripravu spojeva.....	21
3.4.1. N,N-difenilferocенкарбоксамид (1).....	21
3.4.2. Ferocенкарбоксилна kiselina (2).....	21
3.4.3. Ferocenoil-klorid (3).....	21
3.4.4. 1,1'- Diacetilferocen (4).....	22
3.4.5. Ferocen- 1,1'- dikarboksilna kiselina (5).....	22
3.4.6. 1,1'- Ferocenoil-1,1'-diklorid (6).....	22
3.4.7. Tris-Boc-citozin (7).....	23
3.4.8. Bis-Boc-citozin (8).....	23
3.4.9. Ferocenoil-citozin (9).....	23
3.4.10. Ferocenoil-bis-Boc-citozin (10).....	24
3.4.11. Ferocenoil-1,1'-dicitozin (11).....	25
3.4.12. Ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozin (12).....	25
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. Uvod.....	26
4.2. Sinteza i spektroskopska analiza prekursora .....	27
4.2.1. Ferocенкарбоксилна kiselina (2).....	27
4.2.2. Ferocenoil-klorid (3).....	27

4.2.3. Ferocen- 1,1'- dikarboksilna kiselina (5).....	28
4.2.4. 1,1'- Ferocenoil-1,1'-diklorid (6).....	28
4.2.5. Bis-Boc-citozin (8).....	29
4.3. Sinteza i spektralna analiza homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocenoil-citozina (9) i ferocenoil-1,1'-dicitozina (11).....	30
4.3.1. Ferocenoil-citozin (9).....	31
4.3.2. Ferocenoil-1,1'-dicitozin (11).....	32
4.3.3. Spektralna analiza ferocenoil-citozina (9) i ferocenoil-1,1'-dicitozina (11).....	32
4.4. Sinteza i spektralna analiza homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocenoil-bis-Boc-citozina (10) i ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (12) .....	34
4.4.1. Ferocenoil-bis-Boc-citozin (10).....	35
4.4.2. Ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozin (12).....	35
4.4.3. Spektralna analiza ferocenoil-bis-Boc-citozina (10) i ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozin (12).....	36
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>

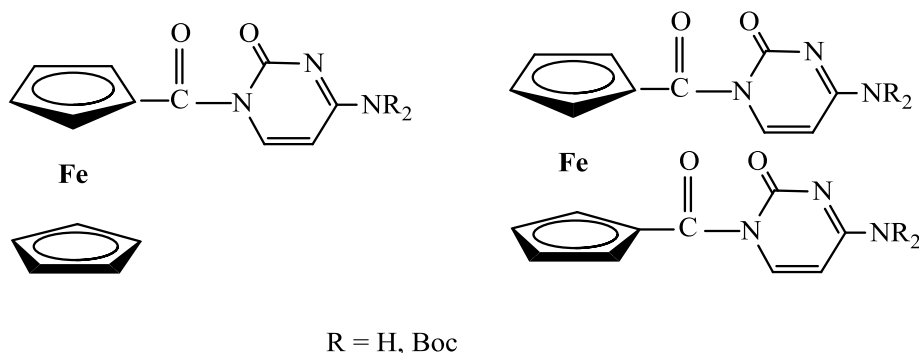


# 1.UVOD

Ovaj diplomski rad uklapa se u istraživanje na području metalocena pod naslovom: „Kvanto-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza” koje je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ - IP-201616-1137, a izvodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Krajem 20. stoljeća započeo je razvoj nove znanstvene discipline pod nazivom bioorganometalna kemija. Ona povezuje organometalne i biološke spojeve kao što su peptidi, proteini te nukleobaze pri čemu su od osobite važnosti spojevi metalocena s nukleobazama, aminokiselinama te peptidima. Ti kompleksi značajni su zbog moguće primjene u biokemiji, biologiji, biomedicini itd. [1]. Metaloceni se počinju detaljnije proučavati radi njihovog širokog spektra biološkog djelovanja. Prema IUPAC-ovoj definiciji, metaloceni se sastoje od prijelaznog metala i dva ciklopentandienilna aniona a provedena istraživanja pokazuju kako sadrže citostatičnu, antifugalnu te antimalarijsku aktivnost [2].

Mnogi supstituirani analozi prirodnih nukleozida pokazuju snažnu biološku aktivnost, odnosno pokazali su efikasno djelovanje u sprječavanju razmnožavanja malignih stanica. Mehanizam djelovanja temelji se na mogućnosti ugradnje u rastući polinukleotidni lanac, što uzrokuje prekid daljnje sinteze polinukleotida ili izmjenu funkcije novonastale nukleinske kiseline. Stoga je cilj ovog diplomskog rada priprava te spektroskopska karakterizacija modificiranih analoga nukleozida pirimidinske baze citozina i bis-Boc-citozina s ferocenom (Slika 1). Ferocen je potrebno selektivno supstituirati na N1 položaju citozina kako bi se oponašala prirodna struktura. U sklopu daljnjih istraživanja provodit će se biološka i elektrokemijska ispitivanja sintetiziranih ferocenoil-citozin kopulata.

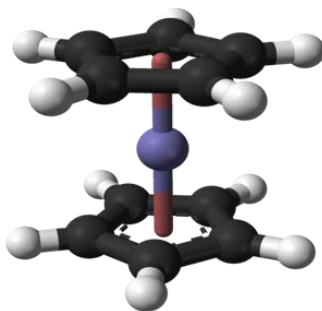


**Slika 1.** Homo i heteroanularno supstituirani derivati ferocenoil-citozina i ferocenoil-bis-Boc-citozina

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FEROCEN

Ferocen je kemijski stabilan i netoksičan spoj koji pripada skupini metalocena. Može difundirati kroz staničnu membranu te sudjeluje u reakcijama elektrofilne supstitucije. Građen je od dva ciklopentadienilna prstena (Slika 2) koji okružuju centralni atom željeza te takva građa rezultira njegovom izrazitom stabilnošću. Svaki se ciklopentadienilni prsten sastoji od  $6\pi$  elektrona, a centralni atom željeza se najčešće nalazi u +2 oksidacijskom stanju [3]. Dolazi u obliku narančastog praha, netopljivog u vodi, a topljivog u većini organskih otapala, te molekulske formule  $C_{10}H_{10}Fe$ . Molekulska masa ferocena iznosi 186.04 g/mol, ima gustoću  $1.11 \text{ g/cm}^3$ , temperatura vrelišta mu je  $249 \text{ }^\circ\text{C}$ , a temperatura tališta  $172.5 \text{ }^\circ\text{C}$  [4].



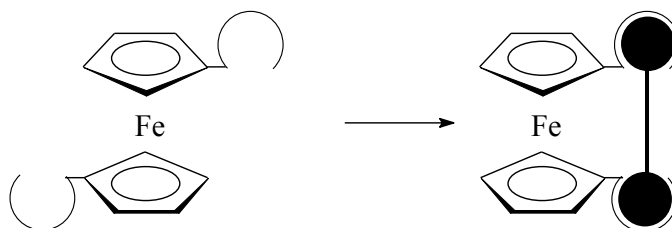
**Slika 2.** Struktura ferocena

Ferocen se može pripraviti na nekoliko načina kao npr: sinteza uz korištenje Grignardovog reagensa (ciklopentadienilnog magnezijeva bromida i željezova klorida) [5], reakcija željeza s plinovitim ciklopentadienom [6] te reakcija željezova pentakarbonila sa ciklopentadienilom [7].

U mnogim reakcijama ferocen pokazuje analogiju s benzenom. Rotacijska barijera ferocenilnih prstenova pri sobnoj temperaturi je niska što se koristi kod sinteze konjugata ferocenskih spojeva. Pomoću prostorne selektivne rotacije, supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula (Slika 3) [8].

Ferocenilna skupina je stabilna u vodenom i aerobnom mediju i ima povoljna elektrokemijska svojstva, a dostupnost velikog broja različitih biokonjugata ferocena i biomolekula (aminokiselina i peptida, DNA, RNA i PNA, ugljikohidrata i nukleozida) je

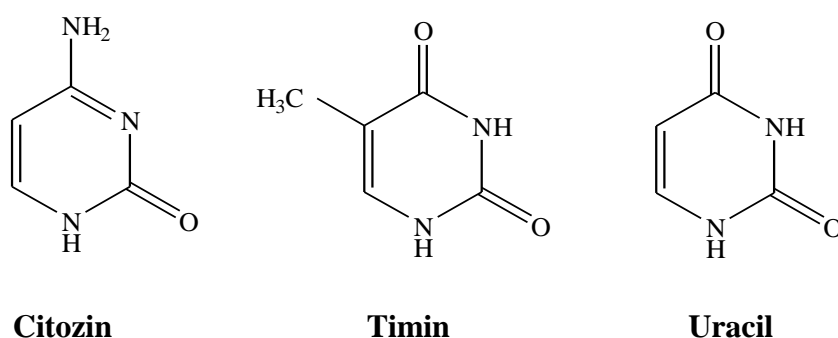
ključna za biološku primjenu tih spojeva. Velik broj tih biokonjugata pokazuje antitumorsku, antimalarijsku i antifungalnu aktivnost [9].



**Slika 3.** Vezivanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

## 2.2. PIRIMIDINSKE BAZE

Pirimidin je heterociklički aromatski spoj sličan benzenu, od kojeg ga razlikuju dva dušikova atoma na položajima 1 i 3 šesteročlanog prstena. Slabo je bazičan pa podliježe reakcijama nukleofilne aromatske supstitucije što je posljedica prisutnih dušikovih atoma koji utječu na smanjenje energije  $\pi$  elektrona u prstenu [10]. Pirimidin je osnovna gradivna jedinica nukleozidnih baza timina, citozina i uracila (Slika 4).

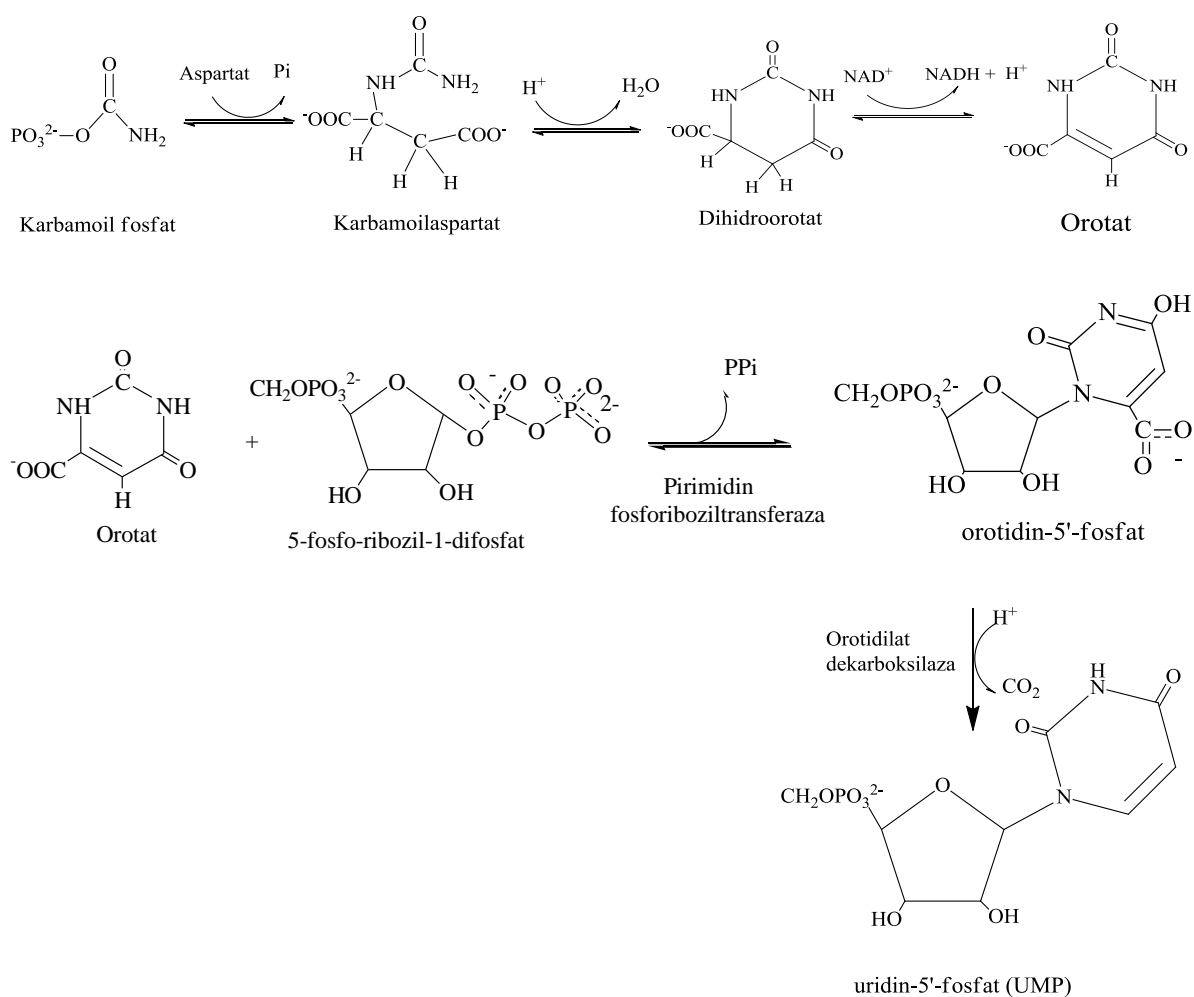


**Slika 4.** Pirimidinske baze

Pirimidin je vrlo raširen među prirodnim spojevima od kojih su najvažniji vitamini B1 (tiamin), B2 (riboflavin), B9 (folna kiselina), B12 [11]. Iako osnovna molekula pirimidina ne pokazuje nikakva farmakološka svojstva, pirimidinski derivati pokazali su se kao učinkoviti kemoterapijski agensi. Najpoznatiji je 5-fluorouracil koji je postao jedan od najraširenijih agensa u borbi protiv tumora. Također su njegovi derivati uspješni u borbi protiv različitih bolesti djelujući tako da inhibiraju enzime koji uzrokuju te bolesti. Tako je poznato da derivati

pirimidina inhibiraju enzim dihidrofolat reduktazu (DHFR) na čemu se temelji djelovanje lijeka protiv malarije. Osim toga oni pokazuju i protuupalno, analgetsko te antidijabetičko djelovanje [12].

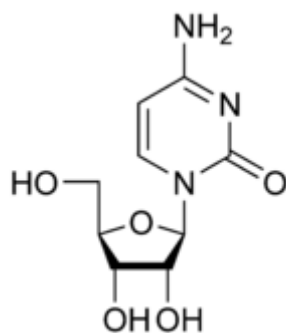
Biosinteza pirimidina počinje stvaranjem karbamoil-fosfata pomoću karbamoil-fosfat-sintetaze. Karbamoil-fosfat, spoj s visokim potencijalom za prijenos grupa, reagira s aspartatom i daje karbamoil-aspartat koji u ravnotežnoj reakciji ciklizira u dihidroorotat. Dihidroorotat dehidrogenira u orotat koji reagira s 5-fosfo-ribozil-1-difosfatom pa nastaje orotidin-5'-fosfat, koji dekarboksilacijom prelazi u UMP (uridin-5'-fosfat) (Shema 1). Daljnja fosforilacija do UTP provodi se specifičnim kinazama uz ATP kao donor fosfata. Ostali pirimidini dobivaju se iz derivata uridina. Postoji enzim koji može prevesti hidroksilnu skupinu na C-4 atomu uridin-trifosfata u amino grupu, u prisutnosti amonijaka ili glutamina, čime nastaje citidin-trifosfat. Derivati timidina sintetiziraju se metilacijom uridin-monofosfata odnosno deoksi-uridin-monofosfata s metilen-tetrahidrofolnom kiselinom [13].



**Shema 1.** Biosinteza UMP-a [13]

### 2.2.1.Citozin

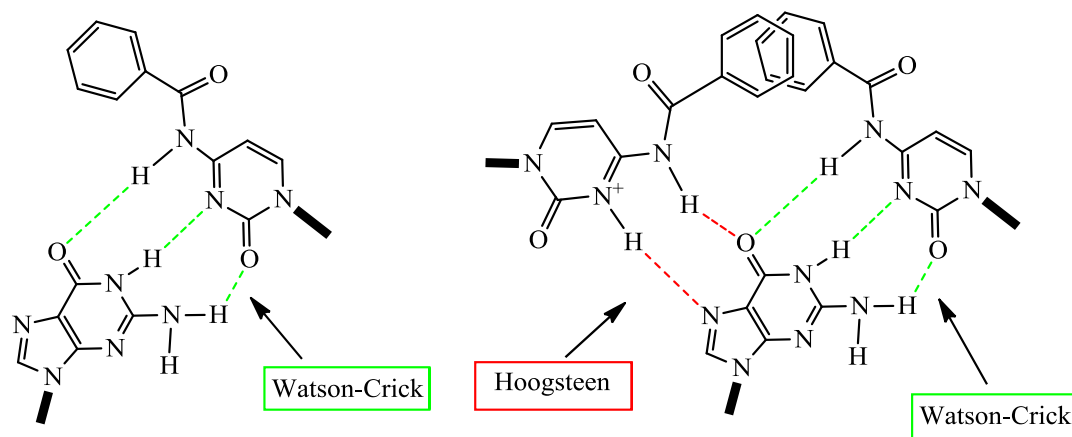
Citozin ( $M_r=111.1$  g/mol,  $\rho=1.55$  g/cm<sup>3</sup>) je pirimidinska dušična baza tj. pirimidinski derivat, a u svojoj strukturi sadrži heterociklički aromatski prsten s dva supstituenta, amino skupina na 4C atomu i keto skupina na 2C atomu. Citozin, također, reagira s tri fosfatne skupine pri čemu nastaju citidin monofosfat (CMP), citidin difosfat (CDP) i citidin trifosfat (CTP). Jedna je od pet glavnih nukleobaza koje se koriste za skladištenje i prijenos genetskih informacija u stanici unutar nukleinskih kiselina DNA i RNA. Citozin može prijeći u uracil spontanom deaminacijom, što dovodi do mutacija. U DNA citozin i timin stvaraju vodikove veze s komplementarnim purinskim derivatima gvaninom i adeninom dok je u RNA komplementarna baza adeninu uracil umjesto timina. Dva se nukleotida neće odvojiti ispod točke taljenja ( $t_f$ ), koju određuje dužina molekula, količina pogrešnih uparivanja (ako ih ima), i G-C udio. Veći udio G-C parova rezultira višim temperaturama topljenja pa ne iznenađuje da su genomi ekstremofilnih organizama, kao što je *Thermus thermophilus*, posebno bogati G-C parovima [14]. Nukleotid citozina naziva se citidin (Slika 5), a biomimetik citidina koji inhibira primarno DNA-polimerazu, te ribonukleotid-reduktazu (RNR) naziva se gemcitabin, te se primjenjuje u terapiji bolesnika oboljelih od metastatskog raka gušterače, raka jajnika, raka pluća, mjehura, glave i vrata [15].



**Slika 5.** Struktura citidina

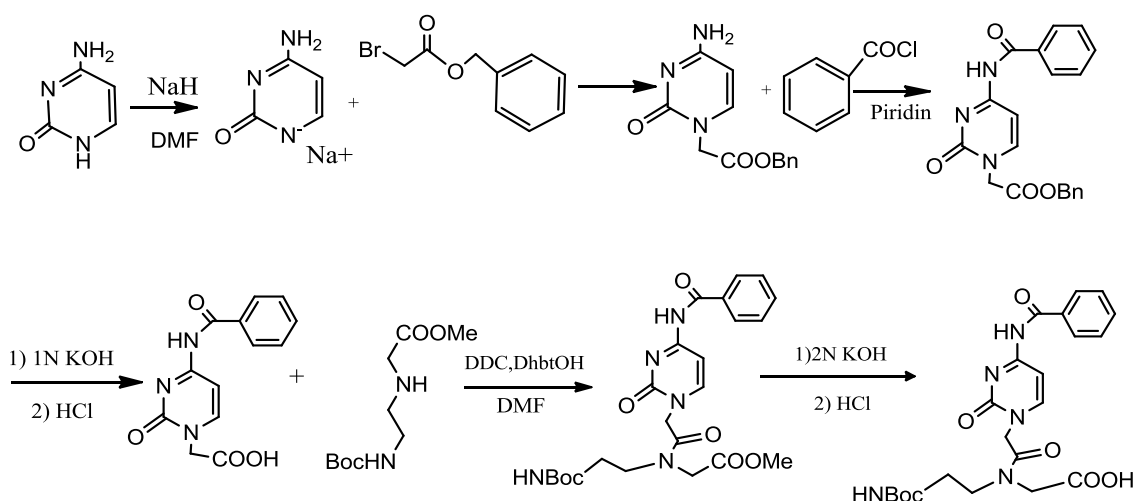
Molekula citozina može se modificirati na više načina te shodno tome i koristiti u razne svrhe. Christensen i suradnici [16] opisuju uporabu modificiranog N<sup>4</sup>-benzoiliranog citozina kao inhibitora stvaranja nepoželjnog tripleksa u PNA (peptid-nukleinskoj kiselini). PNA je prva sintetizirana nukleinska kiselina koja se ne pojavljuje u prirodi, ali je vrlo interesantna za uporabu u molekularnoj biologiji i medicinskoj dijagnostici. Strukturu PNA čini niz od ponavljajućih N-(2-aminoetil)-glicin jedinica povezanih peptidnim vezama na koje se veže nukleinska baza. Jedna od nepoželjnih karakteristika PNA monomera je mogućnost stvaranja tripleksa među bazama (Hoogsteenovo sparivanje) uz postojeće sparivanje gvanin s

citozinom (Watson-Crick sparivanje). Ključna razlika u odnosu na Watson-Crick sparivanje je što se Hoogsteenovim načinom sparivanja citozin i gvanin spajaju preko dvije umjesto tri vodikove veze (Slika 6). Ovakav Hoogsteenov model sparivanja baza omogućava trećem lancu da se obavi oko dupleksa upakiranog prema Watson-Crick modelu i formira trolančani heliks [17].



**Slika 6.** Strukture  $G-C^{Bz}$  baznog para te  $C^{Bz}-G-C^{Bz}$  tripleta uz indicaciju međusobnog steričkog ometanja benzenoilnih supstituenata na citozinu

Homopirimidinska PNA pripravljena je nizom reakcija iz derivata citozina  $C^{Bz}$  (Shema 2) koja ne može formirati triplekse ili su oni smanjene stabilnosti budući da dolazi do međusobnog steričkog ometanja benzenoilnih supstituenata na citozinu (Slika 6).

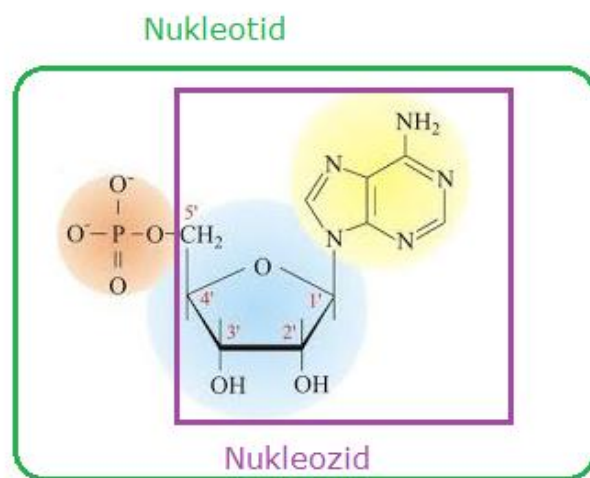


**Shema 2.** Sintaza  $C^{Bz}$  PNA monomera [16]

Rezultati pokazuju da inkorporiranje  $C^{Bz}$  ostatka u PNA smanjuje  $T_m$  vrijednost i stoga smanjuje toplinsku stabilnost PNA<sub>2</sub>-DNA tripleksa na razinu odgovarajućeg PNA-DNA dupleksa prilikom čega prisutnost benzoilne grupe ne utječe značajno na Watson-Crick prepoznavanje [16].

### 2.3. NUKLEOZIDI

Nukleozidi su glukozamini odnosno spojevi u kojima je šećer *N*-glikozidno povezan s heterocikličkom dušičnom bazom. Imena su im trivijalna, a izvode se iz imena baza: kod pirimidinskih derivata završavaju na –idin (citidin, uridin, timidin), a kod purin-nukleozida na –ozin (adenozin, gvanozin) (Slika 6). Nukleozidi se u stanici pomoću enzima prevode u fosfatne derivate, nukleotide koji predstavljaju osnovne gradivne jedinice molekula DNA i RNA. Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) ima kao šećernu komponentu 2-deoksiribozu, a ribonukleinske kiseline (RNA) imaju ribozu. Fosforilacija nukleozida pri čemu nastaje nukleotid, temeljena je na djelovanju enzima kinaza, pri čemu dolazi do fosforiliranja na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera nukleozida [13].



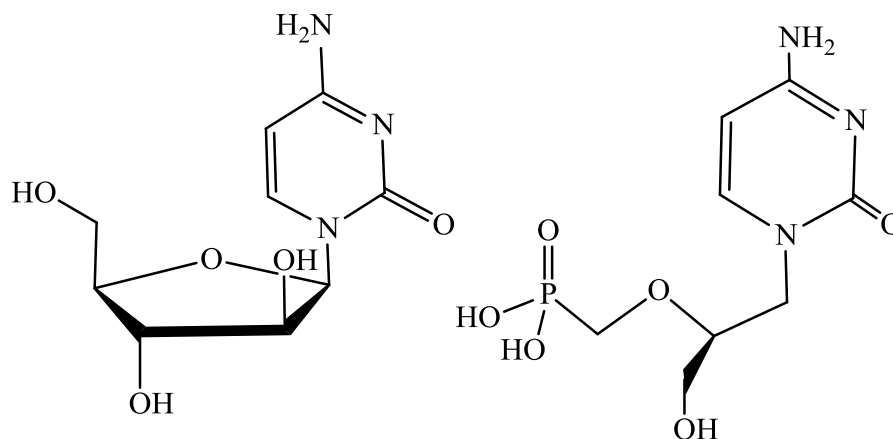
**Slika 7.** Struktura nukleozida i nukleotida nukleotida

Nukleotidi (Slika 7) su fosfatni esteri nukleozida, odnosno organski spojevi koji se sastoje od šećera (2-deoksiriboze u DNA i riboze u RNA) povezanog s fosfatnom grupom i dušičnom bazom (purinskom ili pirimidinskom) te su potrebni za mnoge životne procese. Predstavljaju aktivirane prekursore nukleinskih kiselina, koji su potrebni za replikaciju genoma i transkripciju genetičkih informacija u RNA. Adeninski nukleotid, ATP, je univerzalna energetska jedinica organizama. ATP, kao i gvaninski nukleotid GTP, djeluje i kao donor fosforilne grupe koju prenose protein kinaze. Nukleotidni derivati kao što je UDP-

glukoza sudjeluju u biosintetičkim procesima kao što je sinteza glikogena. Također su esencijalni dio staničnih signalnih puteva. Ciklički nukleotidi kao što su cAMP (ciklički AMP) i cGMP su drugi glasnici koji prenose signale i unutar stanica i između stanica [18].

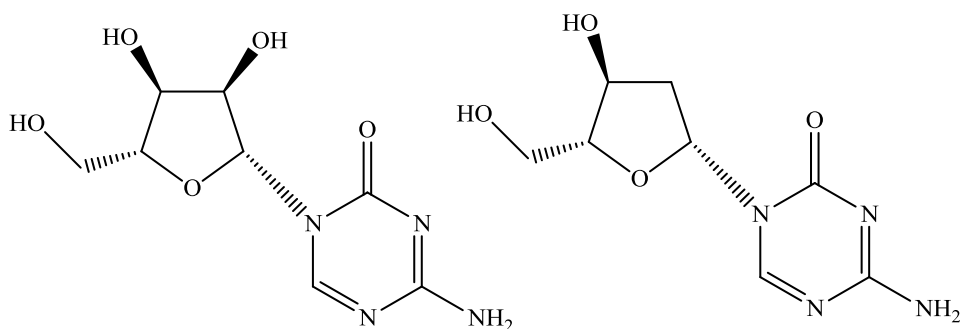
## 2.4. ANALOZI NUKLEOZIDA

Nukleozidni analozi su grupa spojeva čija je struktura temeljena na modifikaciji postojeće dušične baze ili šećerne skupine prirodnog nukleozida. S obzirom na strukturnu sličnost sa nukleozidima, nukleozidni analozi pokazuju razna biološka djelovanja što se pokazalo efikasnim u liječenju tumora i virusnih bolesti [19]. Također oponašaju ulogu fizioloških nukleozida u metabolizmu te se ugrađuju u rastući lanac DNA inhibirajući njegovu sintezu i uzrokujući terminaciju lanca. Skupina nukleozidnih analoga uključuje razne pirimidinske i purinske analoge od kojih su značajni pirimidinski analozi: citozinarabinozid, citarabin (Slika 8), 5-azacitidin i 5-azadeoksicitidin (decitabin) (Slika 9), koji se koriste za liječenje akutne leukemije te (*S*)-1-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)citozin (cidofovir) (Slika 8) čija je aktivnost vrlo visoka i slična adeninskom derivatu (*S*)-9-(3-hidroksi-2-fosfonilmetoksipropil)adeninu (HPMPA), a oba su pokazala vrlo niske koncentracije potrebne za inhibiciju virusa [20].



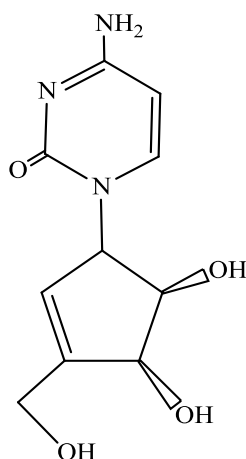
**Slika 8.** Strukture citarabina i cidofovira





**Slika 9.** Strukture 5-azacitidina i 5-aza-2'deoksicitidina

Također se ističe i cikloptenilcitozin (CPEC) (Slika 10) citotoksični spoj koji pokazuje aktivnost *in vitro* prema stanicama ljudskog raka crijeva. On inhibira sintezu citozin trifosfata (CTP) što za posljedicu ima pražnjenje citidilatnih spremnika, što je jaki mehanizam inhibicije tumorskog rast [21]. Ovo upućuje da su citozinski derivati tipovi spojeva koji mogu dati djelotvorna i sigurna rješenja u borbi protiv nekih od najtežih bolesti.

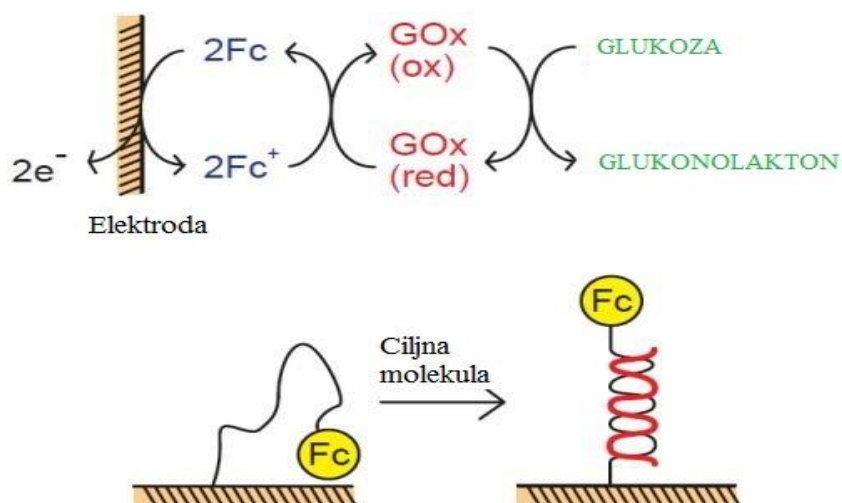


**Slika 10.** Struktura cikloptenilcitozina CPEC

## 2.5. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

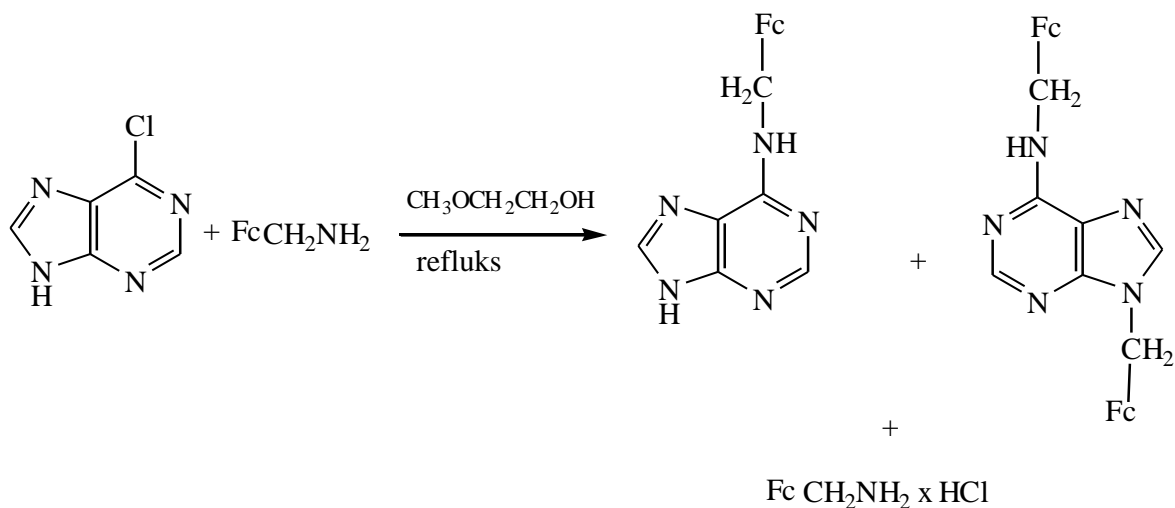
Spojevi nastali vezanjem ferocena i nukleobaza predstavljaju sve važniju skupinu kopolata s potencijalnom primjenom u biologiji, farmaciji i srodnim znanostima. Kowalski u svom radu [22] opisuje metode sinteze kopolata ferocena i nukleobaza te porast uporabe istih u sintezi antikancerogenih i antibakterijskih agensa. Kombinacija redoks aktivne, sintetske ferocenilne grupe s biogenim nukleobazama pogoduje razvoju mnogih terapijskih supstanci.

Osim što imaju negativno djelovanje na uzročnike raznih bolesti, u posljednje vrijeme se proučava njihova mogućnost uporabe kao biosenzora za glukozu. Za odvijanje selektivne reakcije mogu se koristiti kopolati ferocena i nukleobaza koji služe kao bioelementi uz pretvornik signala koji pretvara biokemijski signal u neki mjerljivi oblik signala (Slika 11). Jednostavnost modifikacije, biokompatibilnost, stabilnost, velika površina, električna vodljivost te dobra redoks svojstva samo su neka od svojstava zbog kojih se ovi spojevi koriste kao biosenzori [23]. Senzori na bazi DNA konstruiraju se modifikacijom površine elektrode jednolančanom DNA koja sadrži i vezan ferocen. Redoks reakcija ferocena ovisi o hibridizaciji jednolančanog DNA lanca što uzrokuje odašiljanje hibridizacijski ovisnog redoks signala ferocena.



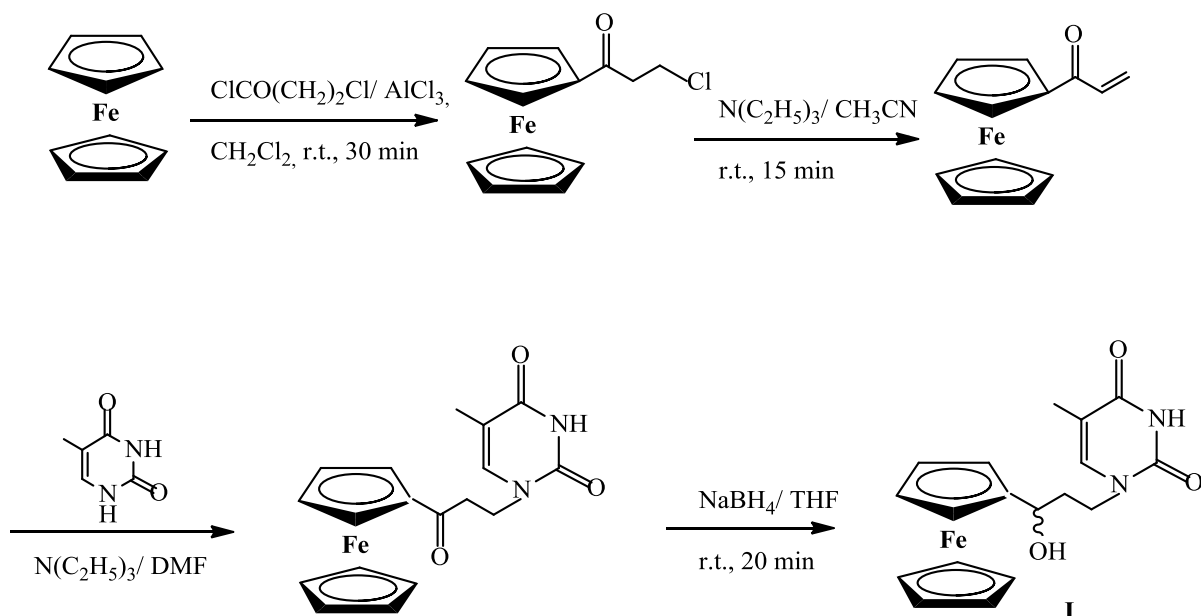
**Slika 11.** Mehanizam biosenzora za glukozu na bazi ferocena i ferocenski obilježen DNA biosenzor osjetljiv na hibridizaciju [23]

Prvu sintezu ferocena i nukleobaza proveli su Chen i suradnici 1980. godine i to kopolaciju ferocena s adeninom [24]. Reakcije su provedene u vodi uz relativno male prinose (oko 30%). (Shema 3). Reakcijom 6-kloroadenina i ferocenilmetilamina u prisutnosti metoksietanola pri temperaturi refluksa dobiveno je nekoliko različitih kopolata, *N*6-ferocenilmetiladenin u iskorištenju od 21%, male količine *N*6,9-bis(ferocenilmetil)adenina te ferocenilmetilamin-hidroklorida. Neočekivani nastanak dialkiliranog produkta *N*6,9-bis(ferocenilmetil)adenina objašnjen je kao rezultat nukleofilnog napada primarnog produkta *N*6-ferocenilmetiladenina na ferocenilmetilamin-hidroklorid.



**Shema 3.** Reakcija derivata ferocena i derivata adenina [24]

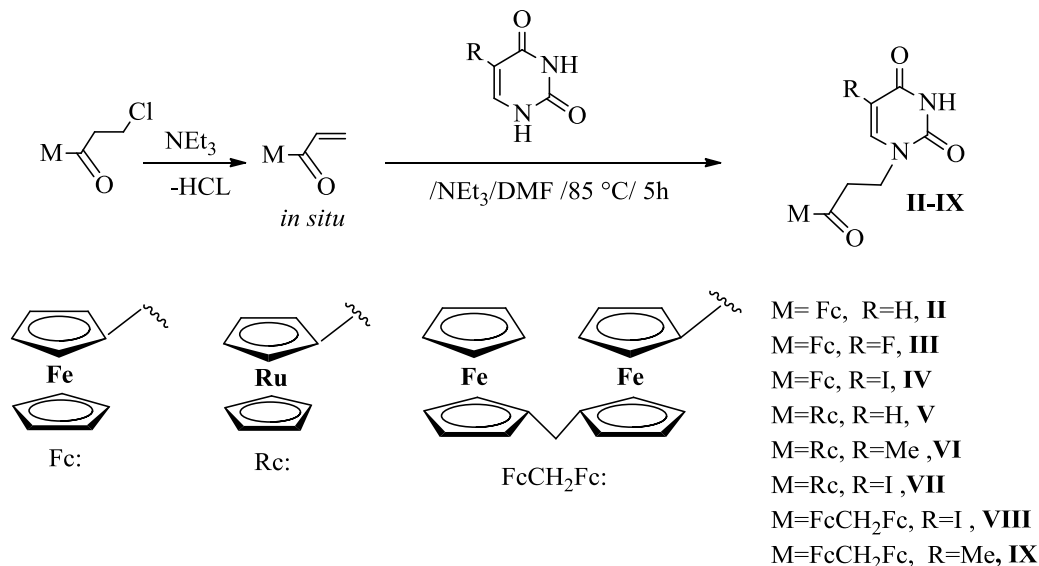
U literaturi je opisana sinteza ferocenil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (Shema 4). Ključni stupanj reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija je provedena u dimetilformamidu u prisutnosti trietilamina pri 70 °C kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s  $\text{NaBH}_4$ , dobiven je aciklonukleozid **I** u iskorištenju od 51%.



**Shema 4.** Priprema ferocenil-timinskog derivata [25]

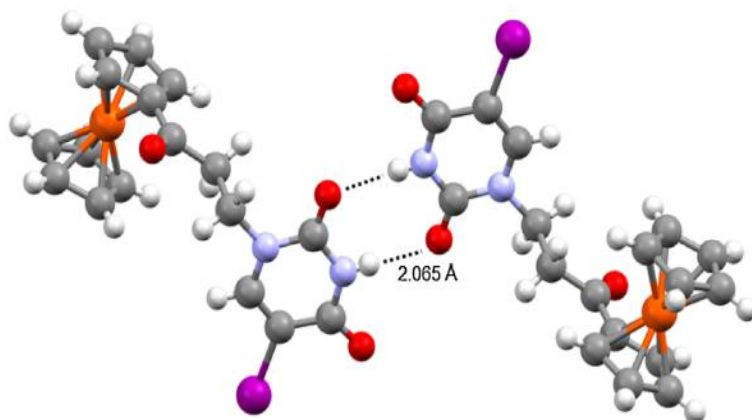
Elektrokemijska svojstva pripremljenih konjugata ispitana su cikličkom voltametrijom (CV) pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što je potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Također je ispitana i njihova antikancerogena aktivnost. Ferocetil-timinski derivat pokazao se kao aktivni agens prema staničnim linijama MCF-7 (stanična linija humanog adenokarcinoma dojke) i CCRF-CEM (stanična linija humanog T-limfoblastičnog limfoma, uzročnika leukemije), dok je aciklonukleozid neaktivan [25].

Ista grupa znanstvenika objavila je pojednostavljeni postupak sinteze kopulata metalocena i nuklobaza u dva koraka. U prvom koraku međuprodukt akrilolil-metalocena nastaje kao produkt dehidrohalogenacije 3-kloropropionil-metalocena dok u drugom koraku nastali međuprodukt reagira s pirimidinskim nukleobazama pri čemu nastaju željeni kopulati (**II-IX**) (Shema 5). Zbog jednostavnosti ovakve sinteze omogućeno je dobivanje raznolikih strukturno modificiranih kopulata metalocena i pirimidina uz nisku cijenu i prihvatljivo iskorištenje. Biološka ispitivanja Michaelovih adukta (**II-IX**) potvrdila su njihovu antikancerogenu i antibakterijsku aktivnost. Kopulati **I** i **III** pokazali su umjerenu citostatsku aktivnost prema MCF-7 humanim stanicama raka [26].



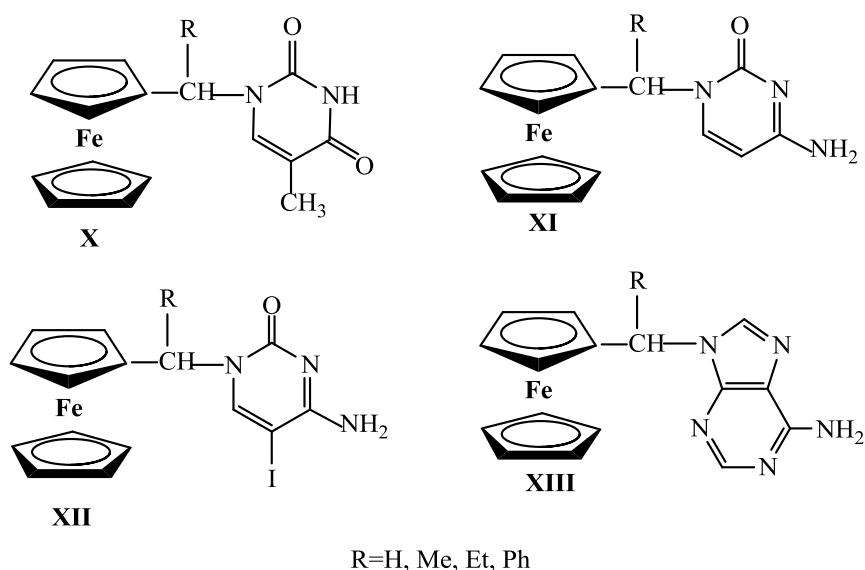
**Shema 5.** Sinteza kopulata metalocena i pirimidina [26]

Rendgenskom strukturnom analizom dokazano je da u čvrstom stanju svaka nezavisna molekula kopulata **III**, **IV**, **VII** formira dimer tvorbom vodikovih veza, odnosno intermolekulske interakcije ostvarene su reverznim Watson-Crick baznim sparivanjem (Slika 12) [27].



**Slika 12.** Dimerna struktura spoja **IV** [27]

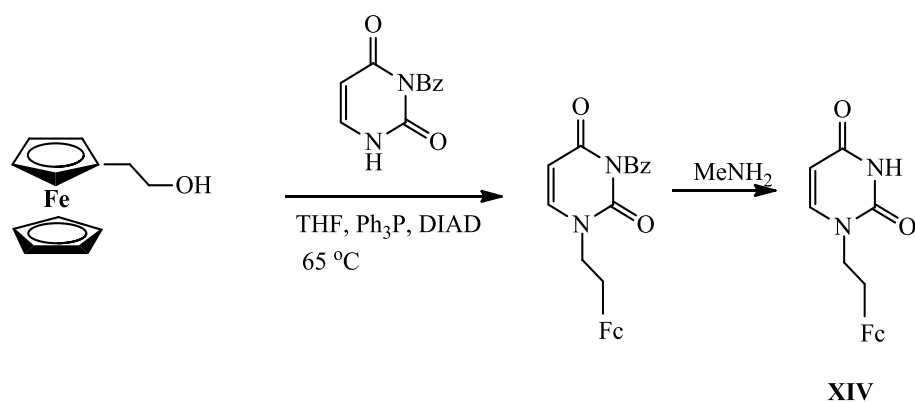
Ferocenilalkil nuklobaze (**X-XIV**) pripravljene su reakcijom  $\alpha$ -(hidroksi)alkil ferocena FcCHR(OH) (Fc = feroceni; R = H, Me, Et, Ph) s različitim bazama: timinom, citozinom, 5-jod-citozinom i adeninom (Slika 13). Reakcija se provodi u dimetil sulfoksidu (DMSO) na 100 °C tijekom 30 do 40 minuta. Nakon provedene ekstrakcije i pročišćavanja, produkti se dobivaju u iskorištenju od 50 do 82 %. Primjećeno je da ovaj postupak ne zahtjeva uvjete inertne atmosfere budući DMSO u eksperimentalnim uvjetima može služiti kao reducirajući agens. Ferocenski alkoholi u neutralnom mediju su slabiji i posljedično više specifični feroceni alkilirajući agensi od ferocenilamonijevih soli, stoga se ferocenilalkilacija nukleobaza odvija regioselektivno. Pripravljenom N1-ferocenilmetiltiminu ispitana je antitumorska aktivnost prema nekim animalnim tumorima kao što su karcinom 755, melanom B16 te Lewisov plućni karcinom u *in vivo* uvjetima. Provedeno ispitivanje pokazalo je jako antitumorsko djelovanje prema karcinomu 755 u kombinaciji s već otprije poznatim lijekom ciklofosfamidom spoja N1-ferocenilmetiltimina [28].



**Slika 13.** Strukture ferocenilalkil nukleobaza: timin, adenina, citozina i jodo-citozina [29]

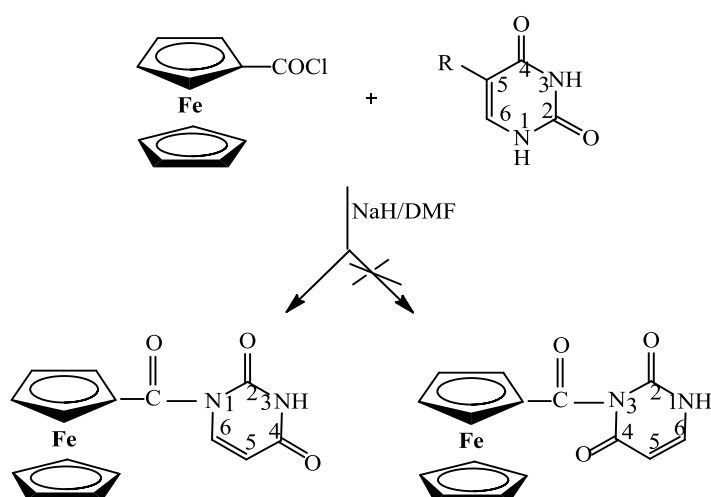
Redoks potencijali ferocenilalkil nukleobaza (**X-XIII**) određeni su cikličkom voltametrijom pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija. Kopulatima **X-XII** elektronski potencijali prebacili su se u pozitivnu regiju u odnosu na ferocen te su iznosili 0.60, 0.59, 0.59, 0.57 V dok su za kopulat **XIII** i ferocen elektronski potencijali iznosili 0.52 V. Ovi rezultati su potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice u kopulatima [29].

Također valja izdvojiti adiciju ferocenilmetilazida na nukleobaze uz bakar kao katalizator, Horner-Wadsworth-Emmons reakciju, u kojoj se adeninski fosfonati adiraju na 1,1-dikarboksaldehid ferocen. Mitsunobusovom reakcijom između ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze ,uz naknadnu deprotekciju metilaminom, nastaje spoj **XIV** (Shema 6) [25].



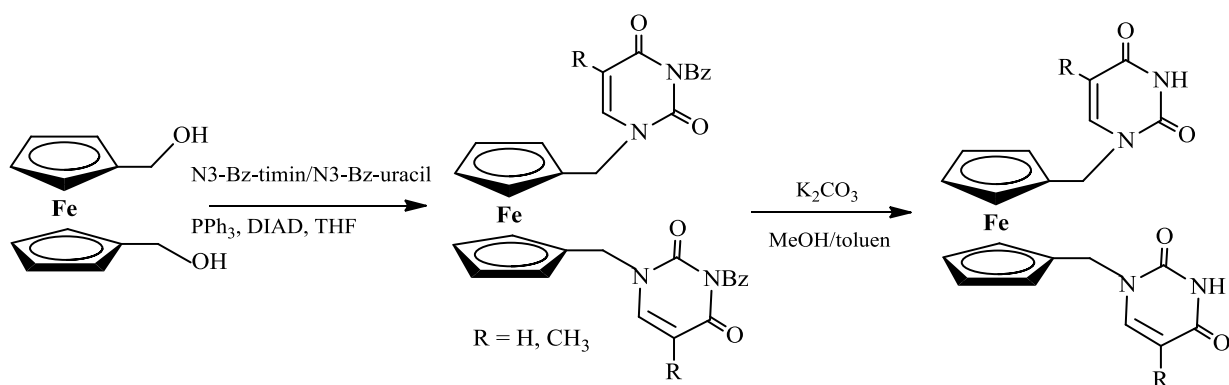
**Shema 6.** Mitsunobu reakcija ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze

Lapić i suradnici su prvi put sintetizirali biokonjugate ferocena s pirimidinskim nukleobazama timinom, uracilom i 5-fluoruracilom, pri čemu je razmaknica između ferocena i baze karbonilna skupina. Kopulacijom nukleobaza s ferocenoil kloridom (FcCOCl) ili ferocenoil-etil-karbonatom (FcCOOCOEt) uz deprotonirajući agens natrij hidrida (NaH) u dimetilformamidu (DMF), ferocen se regioselektivno vezao na *N1*-položaj pirimidinske nukleobaze bez zaštite na *N3*-položaj nukleobaze (Shema 7). NMR spektroskopijom te kvantno-kemijskim računima analizirana je regioselektivnost reakcije pri čemu su  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  NMR spektri reakcijskih smjesa te  $^{13}\text{C}$  NMR i 2D NOESY spektri produkata potvrdili stvaranje samo *N1*-izomera. Nukleofilna supstitucija na karbonilnoj skupini ferocenoil-klorida odvija se bez tetraedarskog međuprodukta prema  $\text{S}_{\text{N}}2$  mehanizmu. Preliminarna ispitivanja pripremljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost [30].



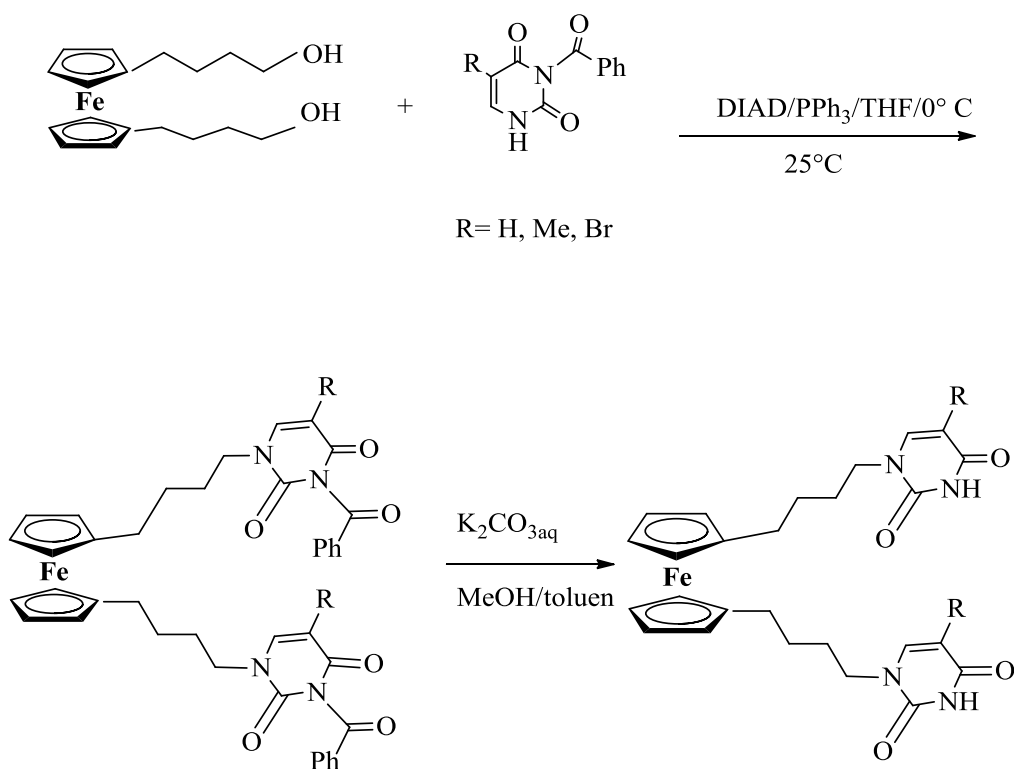
**Shema 7.** Regioselektivno *N1*-aciliranje pirimidinskih nukleobaza (uracil, R = H; timin, R = Me; 5-fluorouracil, R = F) [30]

S druge strane, autori Patwa i suradnici [31] su 2010. godine sintetizirali ferocen-bis konjugate s timinom i uracilom. Mitsunobusovom reakcijom 1,1-bishidroksimetilferocena s *N3*-benzoiltiminom/ *N3*-benzoiluracilom pri čemu su dobiveni derivati 1,1-bis(*N3*-benzoiltimin)ferocen odnosno 1,1-bis(*N3*-benzoiluracil)ferocen. *N*-debenzoilacija provodi se u vodenoj otopini  $\text{K}_2\text{CO}_3$  u smjesi metanola i toluena pri čemu su dobiveni *N1* supstituirani derivati (Shema 8). Ovisno o bazi odnosno supstituciji na položaju C-5 zabilježene su različite interakcije tih biokonjugata kroz vodikove veze kako unutar molekule tako i među molekulama, što je ključno za ispitivanje uporabe novosintetiziranih spojeva za građevne blokove u supramolekulama.



**Shema 8.** Sinteza ferocen-bis konjugata [31]

Također Mitsunobusovom reakcijom 1,1'-bis(4-hidroksibutil)ferocena i *N*3-benzoiliranih pirimidina uz naknadnu deprotekciju baze pripravljeni su 1,1'-ferocenoil-bis(pirimidini) (Shema 9) [31].



**Shema 9.** Priprava 1,1'-ferocenoil-bis(pirimidina) Mitsunobuovom reakcijom [31]



## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

Komercijalni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja, dok su otapala sušena i pročišćavana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3 Å. Od laboratorijskih uređaja, korišteni su analitička vaga, IR spektrometar,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, UV lampa.

### 3.2. METODE RADA

Za praćenje tijeka reakcije je korištena metoda 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 uz eluens diklormetan/etilacetat. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučanim silika geloma (Merk, Kisagel 60 HF<sub>254</sub>), dok je za mobilnu fazu korišten sustav otapala diklormetan/metanol.

Tališta su određena na uređaju Reichert Thermovar HT 1 BT 1 i nisu korigirana.

Spektri  $^1\text{H}$ -NMR i  $^{13}\text{C}$ -NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u  $\text{CDCl}_3$  DMSO-*d*<sub>6</sub> i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci ( $\delta$ ) u  $^1\text{H}$ -NMR i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS,  $\delta$  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:

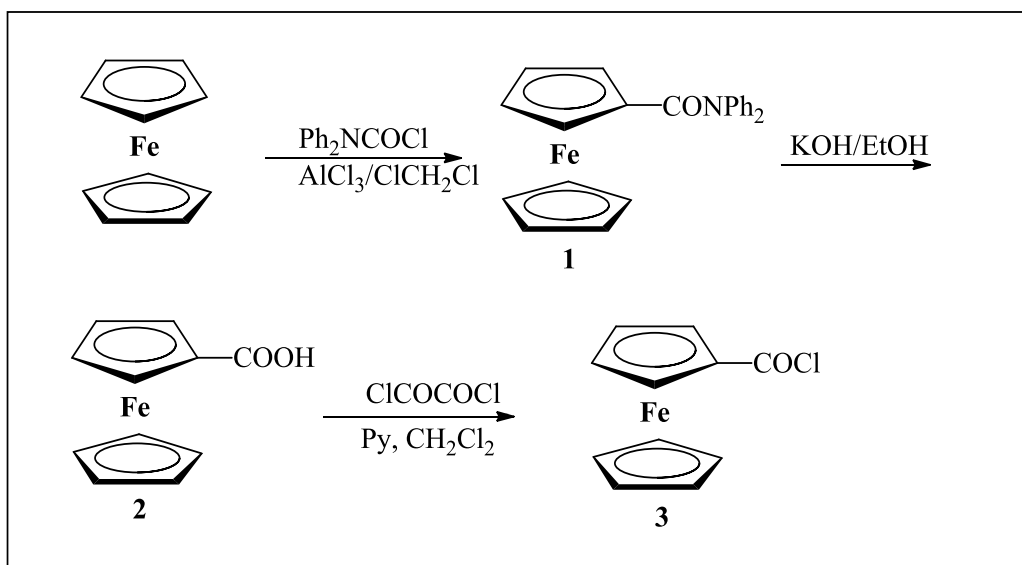
IR-spektri:  $\nu$  = rastezanje (stretching),  $\delta$  = deformacije (bending), *j* = jaka vrpca, *sr* = srednja vrpca,  $\checkmark$  = široka vrpca.

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

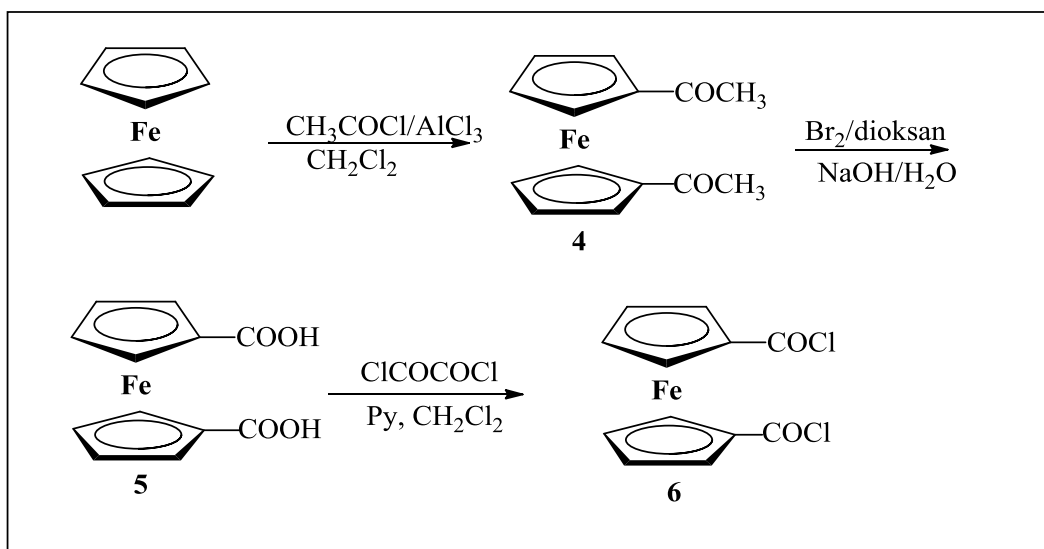
Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini.

### 3.3. SHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENOIL-KLORIDA I CITOZINA

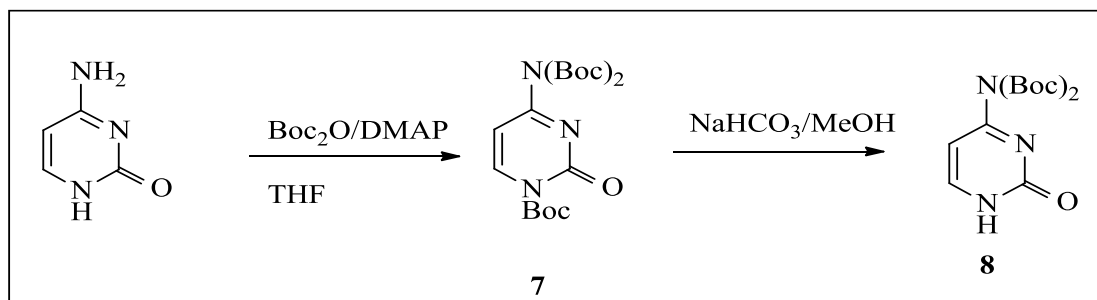
#### A. Priprava ferocenkarboksilne kiseline (2) i ferocenoil-klorida (3)



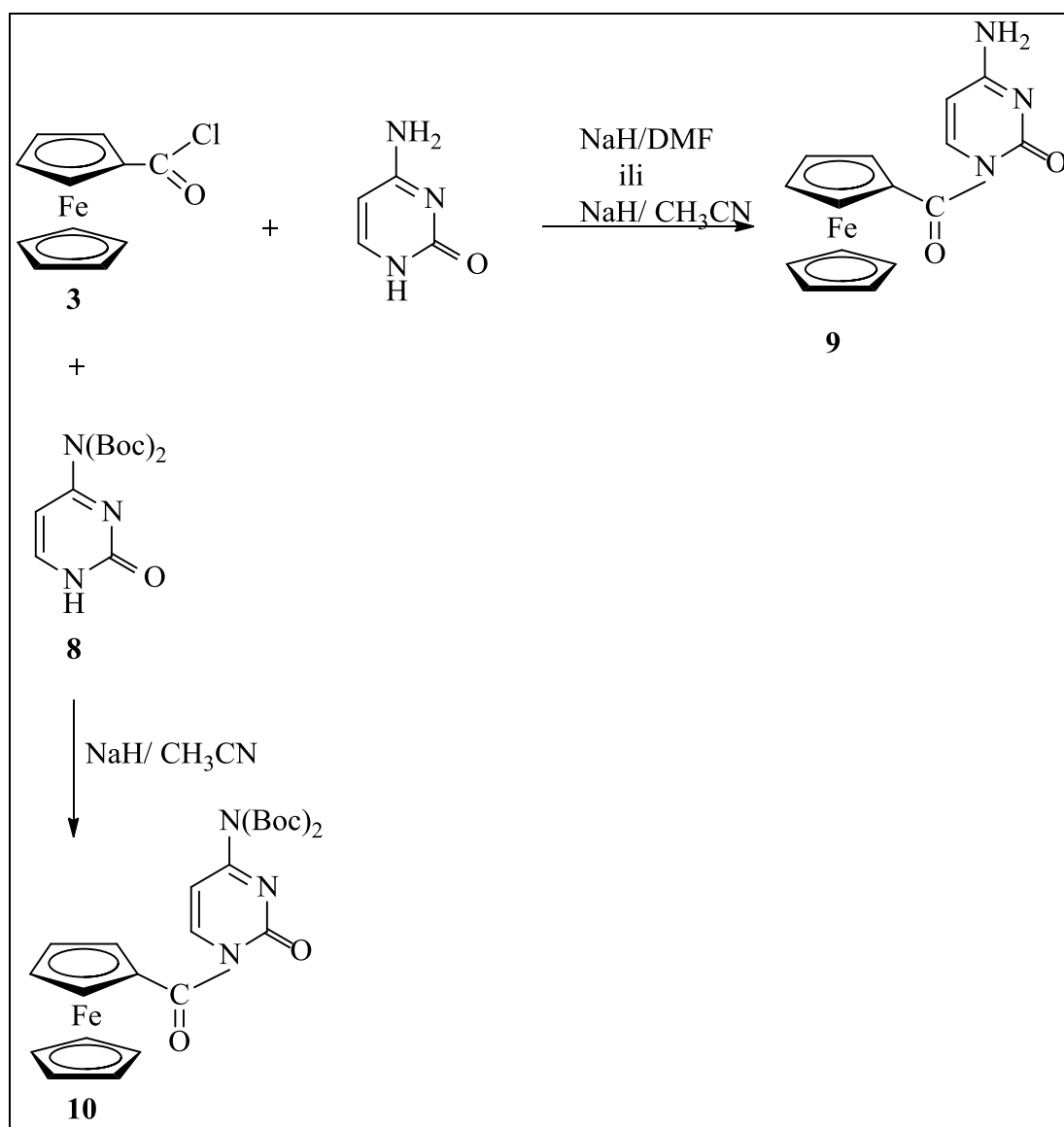
#### B. Priprava ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (5) i ferocenoil-diklorida (6)



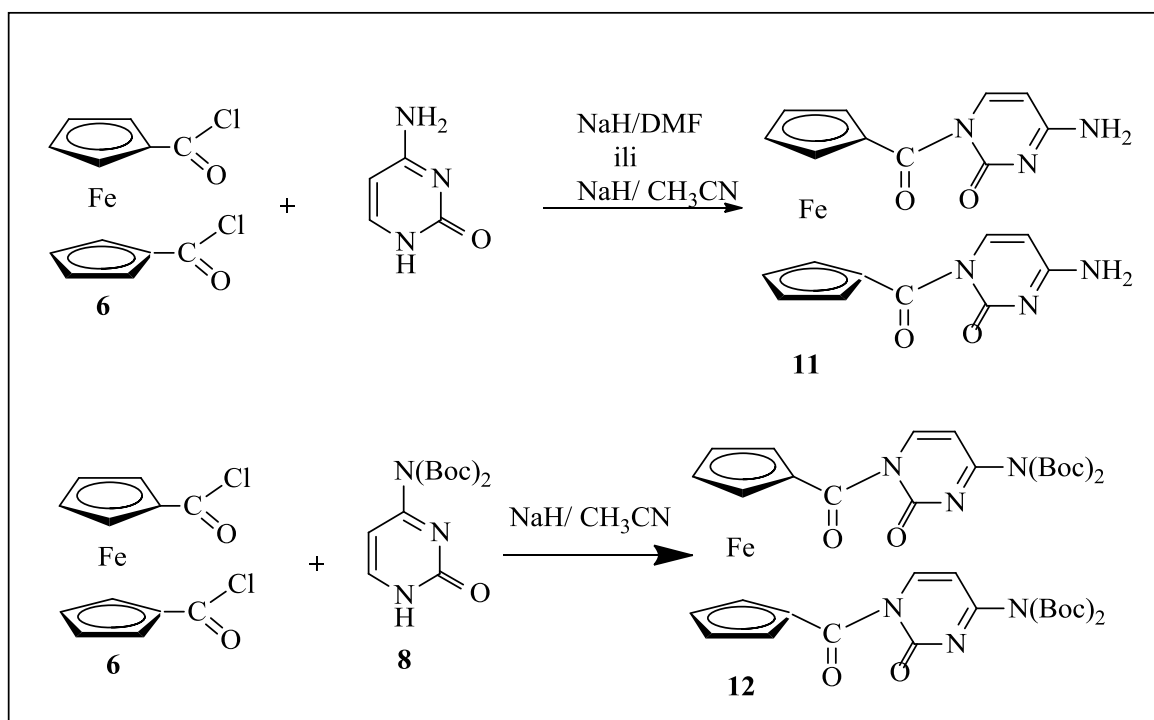
### C. Priprava bis-Boc-citozina (8)



### D. Priprava ferocenoil-citozinskih derivata (9) i (10)



### E. Pripava bis ferocenoil citozinskih derivata (11) i (12)



### 3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA

#### 3.4.1. *N,N*-difenilferocenkarkboksamid (1)

Suspenciji aluminijeva klorida (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu (27 mL) doda se otopina difenil-karbamoil-klorida ( $\text{Ph}_2\text{NCOCl}$  6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa se 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Provodi se refluks 24 sata te se potom reakcijska smjesa prenese u posudu s ledom te ekstahira diklormetanom. Organski sloj potrebno je isprati zasićenom otopinom NaCl, osušiti bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upariti do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **1** (8.5 g). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirova produkta pročišćeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (eluens:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala amida **1**;  $t_f = 179\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$ .

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 1642 j, 1594 s, 1492 s (C=O, CONPh<sub>2</sub>).

<sup>1</sup>H NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7.39 (4H, t, Ph), 7.25 (6H, t, Ph), 4.26 (s, 5H, Fc nesupst. prsten), 4.21 (d, 4H, H-2 H-3 H-4 H-5, Fc).

<sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  171 (CONPh<sub>2</sub>), 143.9 (2Cq, Ph<sub>2</sub>), 129.1 (4C, o, Ph<sub>2</sub>), 127.59 (4C, m, Ph<sub>2</sub>), 126.37 (2C, p, Ph<sub>2</sub>), 76.1 (C-1, Fc), 70.1 (C-2, C-5, Fc), 71.6 (C-3, C-4, Fc), 69.8 (Fc nesupst. prsten).

#### 3.4.2. Ferocenkarkboksilna kiselina (2)

Sirovi amid **1** (8.3 g) se otopi u 20%-tnoj otopini kalijeva hidroksida (KOH) u etanolu (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5%-tnoj vodenoj otopini  $\text{NaHCO}_3$  te se ekstahira diklormetanom. Organska faza ispere se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagirano supstrata **1**. Zakiseljavanjem vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3.98 g (80%) tamnožutih kristala ferocenkarkboksilne (mono) kiseline;  $t_f = 193\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$  [32].

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O).

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

Suspenciji ferocenkarkboksilne kiseline (300 mg, 1.3 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se oksalil klorid (274 mL, 3.13 mmol) i 2 kapi piridina. Smjesa se refluksira 2 sata te se upari do suha pri čemu je dobiven tamni ostatak. Sirovi produkt se zagrijava u petroleteru na 80 °C

tijekom 10 minuta. Organski se sloj filtrira preko vate i upari do suha, te se postupak ponovi još jednom pri čemu je dobiveno 275 mg (85 %) crvenih kristala ferocenoil-klorida [33].

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2958 (sl., C-H, Fc), 1755 (j., C=O).

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

Suspenziji aluminijeva klorida (17.2 g, 0.13 mol) u suhom diklormetanu (30 mL) dokapa se otopina acetil-klorida (10.7 mL, 0.15 mol) u istom otapalu (20 mL). Tako pripremljen Perrierov kompleks zagrije se do temperature vrenja te mu se preko lijevka za dokapavanje polako dokapa otopina ferocena (10 g, 0.054 mol) u suhom diklormetanu (40 mL). Nakon 5 sati refluksiranja reakcijska se smjesa prebaci u čašu s ledom i askorbinskom kiselinom te se ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj dobro ispere 5%-tnom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 5%-tnom otopinom KOH i zasićenom otopinom NaCl do neutralnog, a zatim osuši bezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i upari do suha pri čemu je dobiveno 12.9 g (88%) narančastih kristala  $t_f = 116-125\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t_f[34] = 130-131\text{ }^\circ\text{C}$ .

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

Otopini natrijeva hidroksida (49.05 g, 1.23 mol) u vodi (240 mL) ohlađenoj na 0°C doda se brom (18.3 mL, 0.35 mol) i dokapa se dioksan (148.2 mL, 1.73 mol), te se pri temperaturi 0-5 °C u obrocima dodaje 1,1'-diacetilferocen (4) (12 g, 0.044 mol). Nakon 30 minuta miješanja doda se vodena otopina Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (17 g) te se reakcijska smjesa profiltrira i filtrat se zakiseli koncentriranom HCl pri čemu se istaloži 11.8 g (90%) narančastih kristala ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (5);  $t_f > 250\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $t_f[32] = > 250\text{ }^\circ\text{C}$ .

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

Suspenziji ferocen-1,1'-dikarboksilne dikiseline (5) (300mg, 1.1mmol, Mr= 273g/mol) u 4mL diklormetana doda se jedna kap piridina i 0.5 mL oksalil-klorida (5.5 mmol, Mr=127 g/mol). Reakcijska se smjesa refluksira 4 h pri temperaturom od 60 °C. Nakon završetka refluksa reakcijska smjesa se ohladi i upari do suha. Tamno crveni ostatak se obrađuje na isti način kako je opisano u postupku pripreme ferocenoil-klorida (3) pri čemu je dobiveno 140 mg (41%) tamnocrvenih kristala 1,1'-ferocenoil-diklorida (6) [33].

IR (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 2958 (sl., C-H, Fc), 1755 (j., C=O).

### 3.4.7. Tris-Boc-citozin (7)

Citozinu (500 mg, 4.5mmol, Mr=111.1 g/mol) i DMAP (50 mg, 0.45 mmol) se dokapa suhi THF kroz lijevak za dokapavanje kroz 20 minuta te doda  $\text{BoC}_2\text{O}$  (3.92 g, 18mmol). Reakcijska smjesa miješa se preko noći na sobnoj temperaturi te upari do suha. Sirovi produkt otopi se u etil-acetatu i ekstrahira dva puta s 1N HCl te mlakom vodom. Organski sloj osuši se bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , profiltrira kroz filter papir te upari do suha pri čemu zaostaje žuto-narančasti uljasti spoj (7) (1.50 g, 96 %) [35].

### 3.4.8. Bis-Boc-citozin (8)

Tris-Boc-citozin (7) (3 g, 9.6mmol, Mr= 414. 47g/mol) resuspendira se u metanolu i doda se 33 mL zasićene otopine  $\text{NaHCO}_3$ . Reakcijska smjesa se miješa jedan sat na temperaturi od 50 °C te se upari na rotacijskom vakuum uparivaču do suha. Sirovi produkt se otopi u 5mL vode te se zatim ekstrahira tri puta s diklormetanom. Organski slojevi se spoje te osuše bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i zatim upare do suha pri čemu je dobiveno 662 mg bijelih kristala produkta (8). Na kraju se provodi čišćenje preparativnom tankoslojnom kromatografijom na pločama sa silikagelom u etilacetatu kao mobilnoj fazi ( $R_f = 0.6$ ) [35].

IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  3399, (sl., NH), 3072, 2937 (sl., CH-aromatski), 1774, 1738 (j., C=O), 1667, 1632 (j., C=O).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  11.72 (1H, s, NH), 7.88 (1H, d, C6-H), 6.69 (1H, d, C5-H), 1.46 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  163.54 (C4), 158.62 (C2), 149.98 (C6), 145.6 (C=O), 95.47 (C5), 84.9 (Cq), 27.6 ( $\text{CH}_3$ ).

### 3.4.9. Ferocenoil-citozin (9)

Citozin (22.4 mg, 0.202 mmol, Mr=111,1g/mol) se resuspendira u 3 mL otapala i deprotonira dodatkom natrij hidrida (7.27mg, 0.303 mmol, Mr=24g/mol) kroz 30 minuta na sobnoj temperaturi ili na temperaturi od 50°C pri čemu je dobivena natrijeva sol citozina. Uz miješanje reakcijskoj se smjesi dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil-klorid (3) (50 mg, 0.202mmol, Mr=247g/mol) te nakon 60 minuta miješanja na temperaturi od 0 °C ili sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa filtrira preko Hirschvog lijevka pri čemu su dobiveni crveni kristali. Pri određivanju temperature tališta dolazi do karbonizacije spoja odnosno raspada te do taljenja nije došlo ni pri temperaturi od 250 °C.

IR (KBr)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  3357, (sl., NH), 3094 (sl., CH, Fc), 1695 (j., CO), 1659, 1630 (j., CO).

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7.92 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C6-H), 7.60 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, NH $_2$ ), 5.86 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C5-H), 4.71 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, H-2, H-5, Fc), 4.66 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, H-3, H-4, Fc), 4.30 (5H, s, Fc nesupst. prsten).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  179.7 (FcCO), 166.54 (C4), 154.62 (C2), 141.98 (C6), 95.47 (C5), 73.38 (C-2, C-5, Fc), 71.8 (Cq, Fc), 71.9 (C-3, C-4, Fc), 71.1 (Cp, Fc nesupst. prsten).

### 3.4.10. Ferocenoil-bis-Boc-citozin (10)

Suspenzija bis-Boc-citozina (**8**) (63 mg, 0.202mmol, Mr = 313.35 g/mol) i NaH (10 mg, 0.303 mmol, Mr = 24 g/mol) u acetonitrilu miješa se 30 minuta na temperaturi od 50°C nakon čega se ohladi na 0 °C. Reakcijskoj se smjesi doda ferocenoil-klorid (**3**) (50 mg, 0.202 mmol) i nakon 60 minuta miješanja na 0 °C reakcijska se smjesa neutralizira dodatkom 10 % otopine limunske kiseline, te se ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog i upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silika gelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/etiacion 7/3), a za detekciju je izoliranih komponenata korištena je UV lampa ( $\lambda=254$  nm). Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silika gela uz eluens diklormetan/ aceton 7/ 2 pri čemu je dobiveno 67.22 mg (63 %) crvene smole ferocenoil-bis-Boc-citozina (**4**).

IR (CH $_2$ Cl $_2$ )  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3094 (sl., CH, Fc), 1770, 1730 (j., CO), 1693, 1658 (j., CO)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (CDCl $_3$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7.86 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C6-H), 7.18 (1H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, C5-H), 4.87 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, H-2, H-5, Fc), 4.64 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, H-3, H-4, Fc), 4.29 (5H, s, Fc nesupst. prsten), 1.57(18H, s, CH $_3$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 100 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  174.52 (FcCO), 163.01 (C4), 155.62 (C2), 149.13 (C=O), 143.34 (C6), 96.27 (C5), 85.46 (Cq, Fc), 73.76 (C-2, C-5, Fc), 70.98 (C-3, C-4, Fc), 27.7 (Cp, Fc nesupst. prsten), 27.7 (CH $_3$ ).



### 3.4.11. Ferocenoil-1,1'-dicitozin (11)

Suspenziji citozina (44.9 mg, 404mmol ) u 2mL otapala doda se NaH (14.4mg, 0.606 mmol, Mr=24g/mol) te se reakcijska smjesa miješa 30 minuta na temperaturi od 50 °C nakon čega se ohladi na 0 °C i doda ferocenoil-1,1'-diklorid (**6**) (62.5mg, 0.202mmol, Mr = 309,46 g/mol). Nakon miješanja od 60 minuta dobiveni produkt se odsiše preko Hirschvog lijevka pri čemu je dobiveno 60 mg (65%) crveno narančastih kristala ferocenoil-1,1'-dicitozina (**11**). Pri određivanju temperature tališta dolazi do karbonizacije, kao i kod ferocenoil-citozina (**9**), odnosno raspada te do taljenja nije došlo ni pri temperaturi od 250 °C.

IR (KBr):  $\nu$  3380, (sl., NH), 3172, (sl., CH, aromatski), 2927 (sl., CH, alifatski), 1657, (j., CO) 1599 (j., CO)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  7.92 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C6-H), 7.40 (4H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz,  $\text{NH}_2$ ), 5.92 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C5-H), 4.72 (4H, s, Fc-H). 4.68 (4H, s, Fc-H).

### 3.4.12. Ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozin (12)

Na isti način kako je pripremljen spoj **11** iz bis-Boc-citozina (**8**) (60 mg, 0.191mmol, M = 313.35 g/mol) uz dodatak NaH (6,9 mg, 0.287mmol, Mr = 24 g/mol) i ferocenoil-1,1'-diklorida (**6**) (29.6mg, 0.096mmol, Mr = 309.45g/mol) dobiven je sirovi produkt **12**. Sirovi produkt je pročišćen na kromatografskoj koloni uz korištenje sustava eluensa diklormetan: etil-acetat/10: 1 pri čemu je dobiveno 82.85mg (47%) crvene smole ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (**12**).

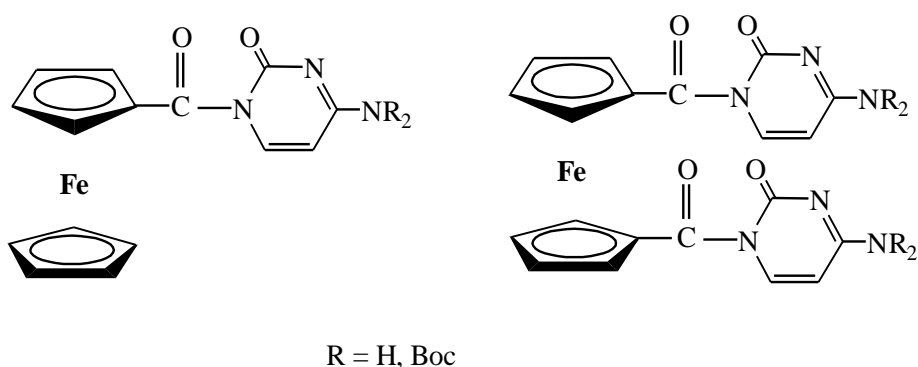
IR ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\nu$  3040 (sl., CH, Fc), 2930 (sl., CH, alifatski), 1766, 1744, (j., CO) 1625,1586 (j., CO)  $\text{cm}^{-1}$ .

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  8.40 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 1.3$  Hz, C6-H), 7.27 (2H, d,  $^3J_{\text{HH}} = 2.2$  Hz, C5-H), 4.64 (4H, Fc-H), 4.46 (4H, s, Fc-H), 1.57(36H, s,  $\text{CH}_3$ ).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. UVOD

Imajući u vidu zanimljiva svojstva analoga nukleozida, tj. njihovu značajnu biološku aktivnost i zanimljiva elektrokemijska svojstva, cilj ovog diplomskog rada je priprava te spektroskopska karakterizacija modificiranih analoga nukleozida, homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i pirimidinske baze citozina s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 14). Da bi se očuvala potencijalna biološka aktivnost pripremljenih spojeva potrebno je reakciju kopulacije ferocena i nukleobaza usmjeriti regioselektivno odnosno ferocenoilni supstituent vezati na *N1* poziciju nukleobaze gdje se prirodno nalazi vezana šećerna komponenta. Svrha ovog rada je ispitati reaktivnost NaH kao deprotonirajućeg agensa, utjecaj vremena i temperature deprotekcije te temperature pri kojoj je provedena kopulacija, na iskorištenje i regioselektivnost reakcija. Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu intermedijera ferocenoil-klorida i ferocenoil-1,1'-diklorida, koji se zatim kopuliraju s nezaštićenom i zaštićenom nukleobazom, citozinom. S obzirom da nezaštićena pirimidinska baza citozin u svojoj strukturi sadrži dva dušikova atoma različite kiselosti i reaktivnosti, u poziciji *N1* amidni i na poziciji *C4* amini *N*-atom, posebna pozornost pri sintezi je usmjerena na regioselektivnost provedenih reakcija. U drugom su dijelu rada prikazane strukture sintetiziranih spojeva koje su potvrđene korištenjem IR i NMR spektroskopije.

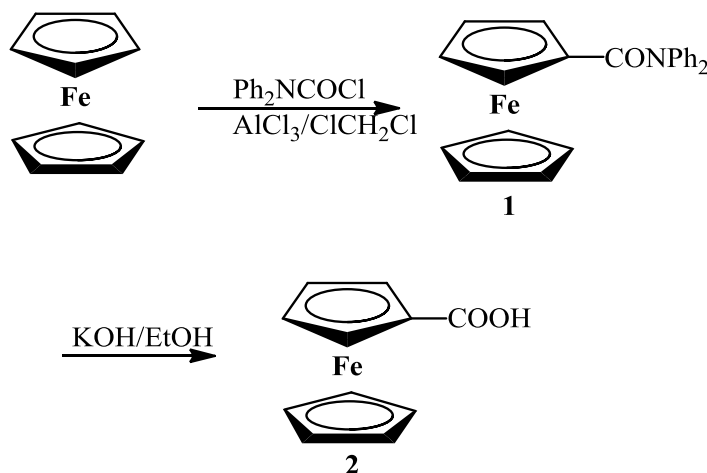


**Slika 14.** Homo i heteroanularno supstituirani derivati ferocenoil-citozina i ferocenoil-bis-Boc-citozina

## 4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA

### 4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

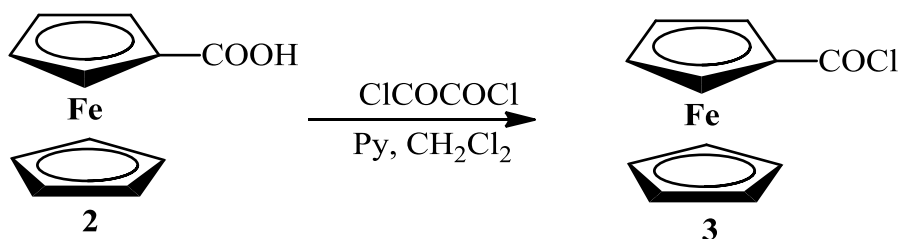
U reakciji ferocena s *N,N*-difenilkarbamoilkloridom u prisutnosti aluminijeva klorda nastaje *N,N*-difenilferocenkarboksamid (1) u iskorištenju od 60%. Za snimanje IR-i NMR spektra dio sirovog produkta pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom. Hidrolizom *N,N*-difenilferocenkarboksamida (1) u etanolnoj otopini kalijevu hidroksida nastaje ferocenkarboksilna kiselina (2) uz iskorištenje od 80% (Shema 10) [32]. IR-spektar *N,N*-difenilferocenkarboksamida sadrži signale pri 1642 i 1594  $\text{cm}^{-1}$  koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida. U IR-spektaru ferocenkarboksilne kiseline (2) vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3089  $\text{cm}^{-1}$  koja odgovara frekvenciji istezanja intermolekulskih vodikovih veza te vrpca pri 1676  $\text{cm}^{-1}$  koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Shema 10. Priprema ferocenkarboksilne kiseline

### 4.2.2. Ferocenoil-klorid (3)

Priprava ferocenoil-klorida (3) provodi se reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (2) s oksalil-kloridom i pirimidinom kao bazom u iskorištenju od 85 % (Shema 11).

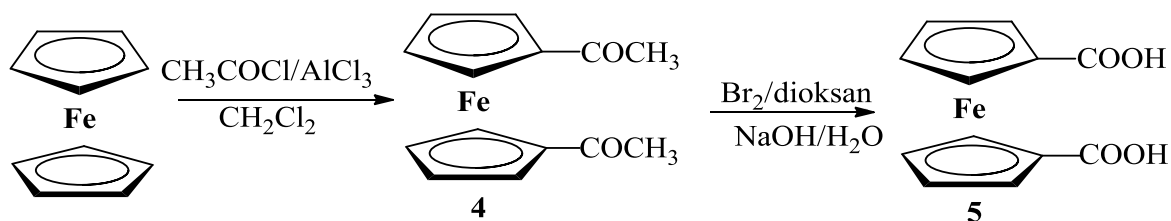


**Shema 11.** Priprema ferocenoil-klorida

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

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

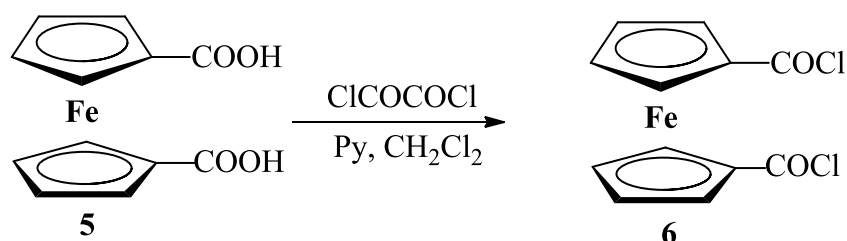
Prema postupcima opisanim u literaturi pripravljena je ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (5) oksidacijom 1,1'-diacetilferocena (4) s bromom, dok je 1,1'-diacetilferocen pripravljen reakcijom Perrierovog kompleksa s ferocenom u iskorištenju od 88% (Shema 12) [34,35].



**Shema 12.** Priprema ferocen 1,1'-dikarboksilne kiseline

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

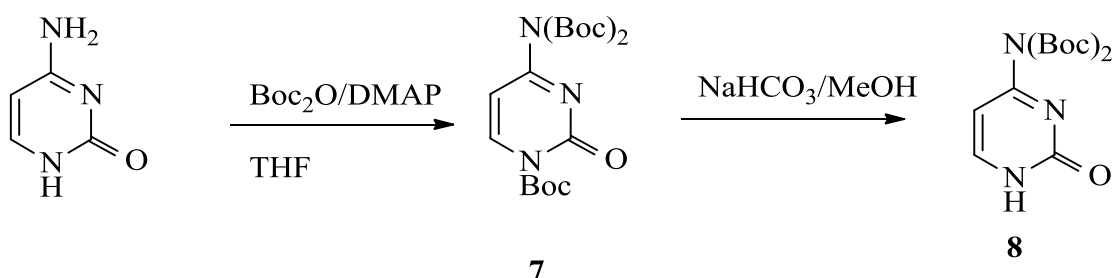
1,1'-Ferocenoil-diklorid (6) pripravljen je u reakciji ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (5) i oksalilklorida u piridinu uz iskorištenje od 41% (Shema 13). IR-spektar 1,1'-ferocenoil-diklorida snimljen u diklormetanu pokazuje jaku apsorpcijsku vrpcu pri  $1755\text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na prisutnost karbonilne skupine acil-klorida.



**Shema 13.** Priprema 1,1-ferocenoil diklorida

#### 4.2.5. Bis-Boc-citozin (8)

Uvođenje Boc-zaštite na citozinu provodi se u reakciji citozina s Boc<sub>2</sub>O u prisutnosti katalitičke količine 4-*N,N*-(dimetilamino)piridina (DMAP) u THF-u pri čemu je u kvantitativnom iskorištenju dobiven tris-Boc-citozin (7) (Shema 14). Deprotekcija Boc-zaštite s N1 položaja tris-Boc-citozina provodi se pomoću natrijevog hidrogenkarbonata u metanolu. Dobiveni sirovi bis-Boc-citozin pročišćen je preparativnom tankslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens.

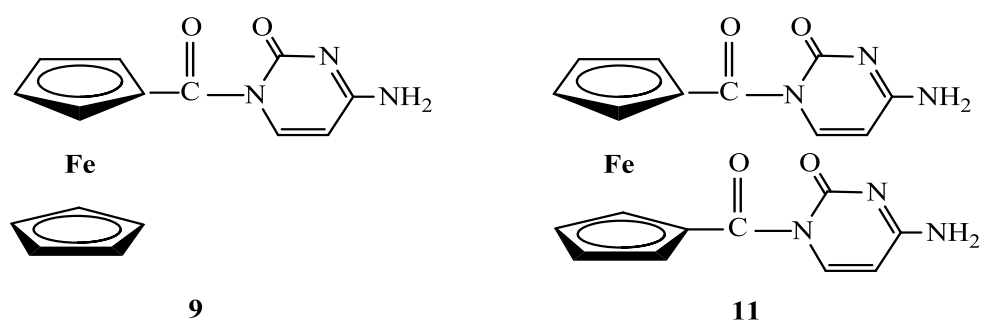


**Shema 14.** Priprema bis-Boc-citozina

U IR-spektru spoja **8** vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3399 cm<sup>-1</sup> koja pripisuje amidnoj skupini dok su apsorpcijske vrpce za amidne karbonilne skupine registrirane pri 1755 1774, 1738, 1667 i 1632 cm<sup>-1</sup>. U <sup>1</sup>H NMR spektru snimljenom u DMSO-d<sub>6</sub>, vidljiv je signal pri δ 11.76 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine, te su vidljivi signali za protone pirimidinskog prstena (H-5 i H-6) pri δ 7.88 i 6.69 ppm i signal pri δ 1.46 ppm za protone metilnih skupinu što ukazuje da je amino skupina zaštićena s Boc-zaštitom. <sup>13</sup>C NMR-spektar sadrži kemijske pomake pri δ 158.6 i 145.6 ppm koji se pripisuju karbonilnim ugljikovim atomima te signal pri δ 27.6 ppm koji potvrđuje prisutnost metilenskih skupina. U <sup>13</sup>C NMR spektru vidljivi su i kemijski pomaci za kvaterni atom ugljika pirimidinskog prstena (C-4) pri δ 163.54 ppm, kao i za kvaterni ugljikov atom iz Boc-zaštite pri δ 84.9 ppm.

### 4.3. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA HOMO- I HETEROANULARNO SUPSTITUIRANIH DERIVATA FEROCENOIL-CITIZINA (9) I FEROCENOIL-1,1'-DICITIZINA (11)

Sljedeći dio istraživanja u ovom diplomskom radu posvećen je pripravi homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i citozina **9** i **11** (Slika 15). Posebna pozornost pri sintezi je usmjerena na regioselektivnost, s obzirom da nezaštićena pirimidinska baza citozin u svojoj strukturi sadrži dva dušikova atoma različite kiselosti i reaktivnosti, u poziciji N1 amidni i na C-4 aminski N-atom.



**Slika 15.** Homo i heteroanularno supstituirani derivati ferocena i citozina **9** i **10**

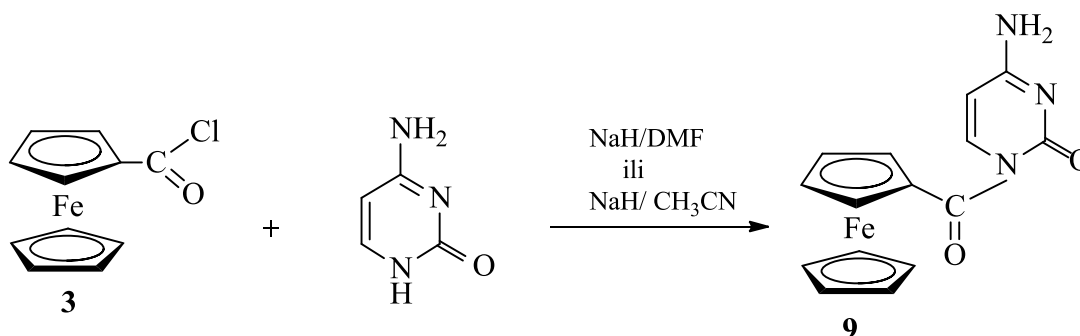
Regioselektivnost reakcija ispituje se primjenom različitog otapala dimetilformamida (DMF) ili acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), različite temperature deprotekcije nukleobaze uz natrij hidrid (NaH) kao deprotonirajući agens te različite temperature kopulacije klorida i citozina. Vrijeme deprotekcije je 30 minuta dok se deprotekcija provodi pri sobnoj temperaturi (rt) odnosno pri  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Reakcije kopulacije provedene su pri sobnoj temperaturi i pri  $0\text{ }^\circ\text{C}$  kroz 60 minuta (Tablica 1).

**Tablica 1.** Uvjeti i iskorištenja reakcija priprave homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocenoil-citozina **9** i **11**.

Kopulat	Otapalo	Deprotekcija		Kopulacija	Iskorištenje
		Vrijeme/ min	Temperatura/( $^\circ\text{C}$ )	Temperatura/( $^\circ\text{C}$ )	
<b>9</b>	DMF	30	rt	rt	22 %
		30	50	rt	52 %
		30	50	0	<b>95 %</b>
	$\text{CH}_3\text{CN}$	30	rt	rt	34 %
		30	50	rt	65 %
		30	50	0	<b>92 %</b>
<b>11</b>	DMF	30	50	0	65 %
	$\text{CH}_3\text{CN}$	30	50	0	<b>73 %</b>

### 4.3.1. Ferocenoil-citozin (9)

Ovaj dio istraživanja posvećen je pripremi *N*1-ferocenoil citozina **9** (Shema 15.)



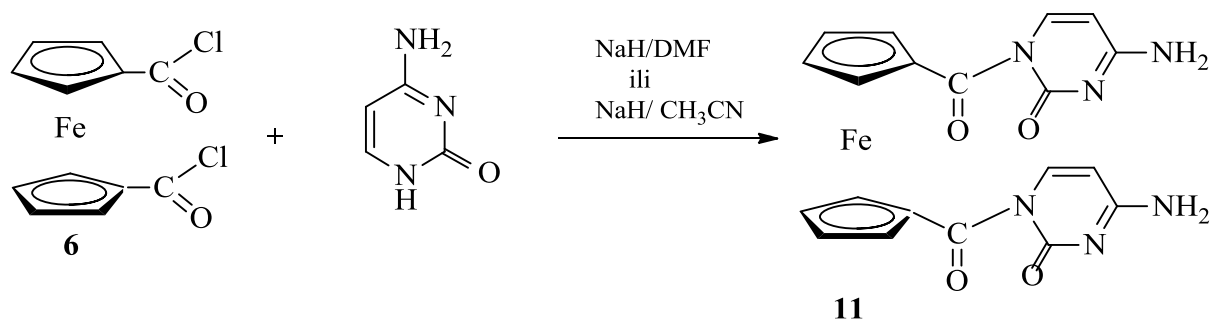
**Shema 15.** Priprema ferocenoil citozina (**9**)

Deprotekcija same pirimidinske baze provedena je s natrij hidridom u dimetilformamidu ili u acetonitrilu kroz 30 minuta pri čemu nastaje natrijeva sol baze. Reakcija deprotekcije provodila se pri sobnoj temperaturi, odnosno pri 50 °C. Pripravljenoj natrijevoj soli citozina dokapa se ferocenoil-klorid otopljen u dimetilformamidu ili acetonitrilu uz miješanje pri čemu dolazi do taloženja kristala konačnog produkta, a sami tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom. Reakcija kopulacije provodila se pri sobnoj temperaturi ili pri temperaturi od 0 °C. Sirovi produkt je odsisan i ispran organskim otapalima diklormetanom, etil-acetatom i acetonitrilom. Rezultati praćenja utjecaja svih navedenih faktora na iskorištenje reakcije pokazuje kako je bolje iskorištenje reakcije (92 i 95%) dobiveno kada je deprotekcije provedena pri povišenoj temperaturi (50 °C), a reakcija kopulacije pri sniženoj temperaturi (0 °C), dok odabir otapala nije znatno utjecao na samo iskorištenje reakcije.

Nakon provedenih postupaka jasno je vidljivo da je povišena temperatura deprotekcije pogodovala iskorištenju što se može pripisati boljoj topljivosti citozina pri toj temperaturi, kao i snižena temperature kopulacije što se možemo pripisati većoj stabilnosti ferocenoil-klorida pri toj temperaturi. Na temelju provedenih reakcija može se zaključiti da temperatura od 50 °C pri kojoj je provedena deprotekcije i temperatura od 0 °C pri kojoj je provedena reakcija kopulacije utječu na iskorištenje reakcije dobivanja ferocenoil-citozina **9**.

#### 4.3.2. Ferocenoil-1,1'-dicitozin (11)

Ferocenoil-1,1'-dicitozin (**11**) pripravljen je u reakciji citozina i ferocenoil-1,1'-dikloridom (**6**) (Shema 16). Reakcija se provodi u bezvodnim uvjetima u otapalu dimetilformamidu ili acetonitrilu *in situ* nakon deprotoniranja baze s natrij hidridom. Sirovi produkt je odsisan i ispran organskim otapalima diklormetanom, etil-acetatom i acetonitrilom.



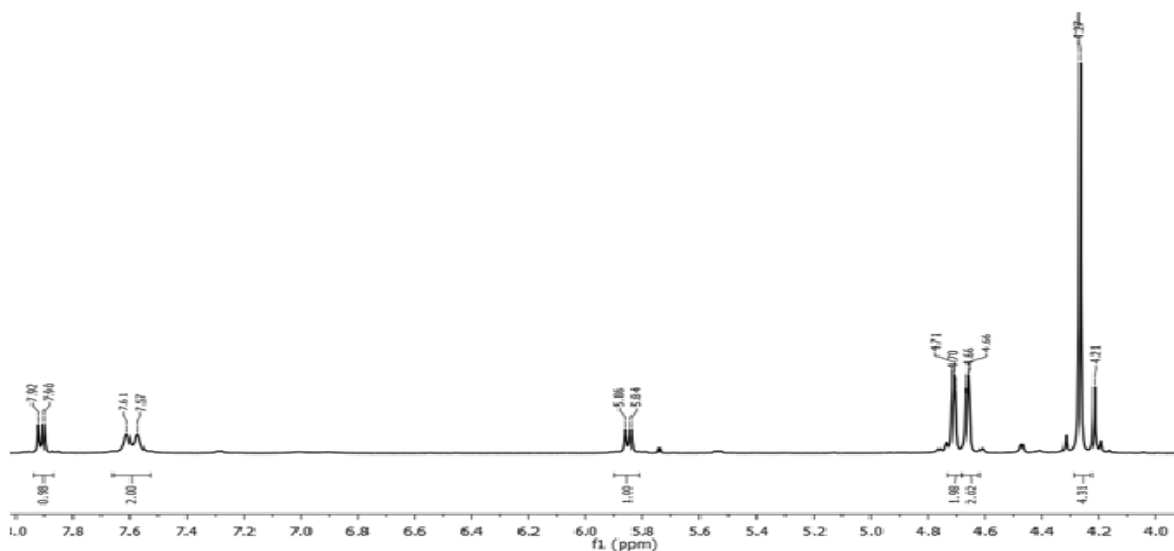
Shema 16. Priprema ferocenoil-1,1'-dicitozina (**11**)

Uvjeti pod kojima se provodila navedena reakcija su 50 °C za reakciju deprotekcije te 0 °C za reakciju kopulacije, budući da su pri tim uvjetima dobivena najbolja iskorištenja pripreme ferocenoil-citozina **9**. Iskorištenje reakcije je veće kada se kao otapalo koristi acetonitril (73%) u odnosu na reakciju provedenu u dimetilformamidu (65%).

#### 4.3.3. Spektralna analiza ferocenoil-citozina (**9**) i ferocenoil-1,1'-dicitozina (**11**)

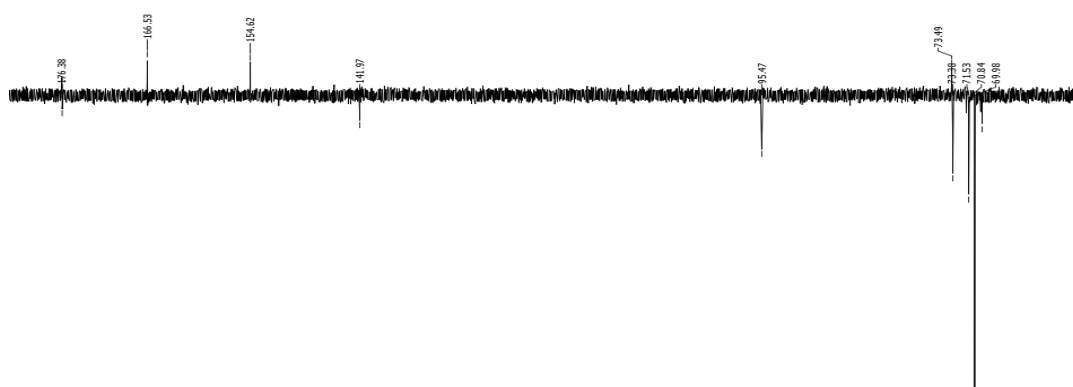
Struktura ferocenoil-citozina (**9**) i ferocenoil-1,1'-dicitozina (**11**) potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru kopulata **9**, snimljenom u KBr-u, vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3357 cm<sup>-1</sup> koja se pripisuje amino skupini na C4-poziciji, te su vidljive i apsorpcijske vrpce jakog intenziteta pri 1695, 1659 i 1630 cm<sup>-1</sup> koje odgovaraju karbonilnoj skupini premosnice ferocenske i citozinske podjedinice i amidnim karbonilnim skupinama citozina. U <sup>1</sup>H NMR spektru kopulata **9** (Slika 16) snimljenom u DMSO-d<sub>6</sub>, vidljivi su kemijski pomaci pri δ 7.91 ppm i 5.85 ppm koji se pripisuju protonima na C-5 i C-6 položaju pirimidinskog prstena te kemijski pomak pri 7.60 koji se pripisuje NH<sub>2</sub> skupini citozina. Kemijski pomak pri δ 10.7 ppm karakterističan za NH skupinu citozina nije prisutan, što ukazuje na vezanje ferocenske podjedinice u položaju N1-citozina. U <sup>1</sup>H NMR spektru vidljivi su i kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen pri δ 4.71 i 4.66 ppm koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak pri δ 4.36 ppm potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.





**Slika 16.**  $^1\text{H}$  NMR spektru kopulata **9**

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru spoja **9** (Slika 17) vidljivi su signali atoma ugljika pirimidinskog prstena (C-2, C-4, C-5, C-6) s time da se signal pri  $\delta$  154.62 ppm pripisuje karbonilnoj skupini baze, signal pri  $\delta$  141.98 i 95.47 ppm ugljikovom atom CH skupine, a signal pri  $\delta$  166.54 ppm kvaternom ugljikovom atomu. Kemijski pomak pri  $\delta$  179.7 ppm potvrđuje prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma koji se nalazi kao poveznica između ferocena i citozina, dok su signali atoma ugljika ciklopentadienilnih prsten ferocena zabilježeni u području od  $\delta$  71.1 do 73.38 ppm, i to kao 3 signala, što potvrđuje supstituciju na jednom prstenu ferocena.



**Slika 17.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **9**

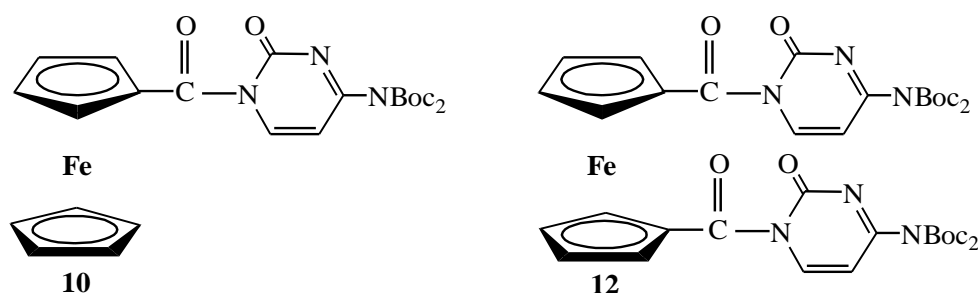
U IR spektru kopulata **11** vidljive su apsorpcijske vrpce pri  $3357\text{ cm}^{-1}$  i pri  $1659\text{ cm}^{-1}$  koje odgovaraju amino i karbonilnoj skupini. Zbog slabe topljivosti kopulata i nestabilnosti

kopulata **11**, što je uočeno naglom promjenom boje otapanjem u DMSO-d<sub>6</sub>, snimljen je samo <sup>1</sup>H NMR-spektar. U spektru su vidljivi kemijski pomaci pri δ 7.92 i 5.92 ppm koji se pripisuju protonima na C-5 i C-6 pirimidinskog prstena, a kemijski pomak pri δ 7.40 ppm koji se pripisuje NH<sub>2</sub> skupini citozina. Dva singleta pri δ 4.72 i 4.68 ppm pripisuju se protonima ciklopentadienilnih prstena ferocena, a dokaz su supstitucije citozina na oba ciklopentadienilna prstena ferocena.

Na osnovu kemijskih pomaka u <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C-NMR spektrima spoja **9** potvrđena je kopulacija pirimidinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena, dok u spoju **11** potvrđuje kopulaciju citozina na oba prstena ferocena. Kemijski pomak u <sup>13</sup>C spektru pri δ 179.7 ppm potvrđuje prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma koji je prenosnica između ferocenske i citozinske podjedinice. Kemijski pomak pri δ 7.60 ppm u kopulatu **9** odnosno pri δ 7.40 ppm u kopulatu **11** koji se pripisuje NH<sub>2</sub> skupini citozina dokazuje regioselektivnu supstituciju u položaju N1-baze u oba dobivena kopulata.

#### 4.4. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA HOMO- I HETEROANULARNO SUPSTITUIRANIH DERIVATA FEROCENOIL-BIS-BOC-CITIZINA(10) I FEROCENOIL-1,1'-BIS-BOC-DICITIZINA (12)

S obzirom na slabu topljivost kopulata **9** i **11** u nastavku istraživanja pripremljeni su derivata ferocena i -Boc-citozina **10** i **12** (Slika 18).

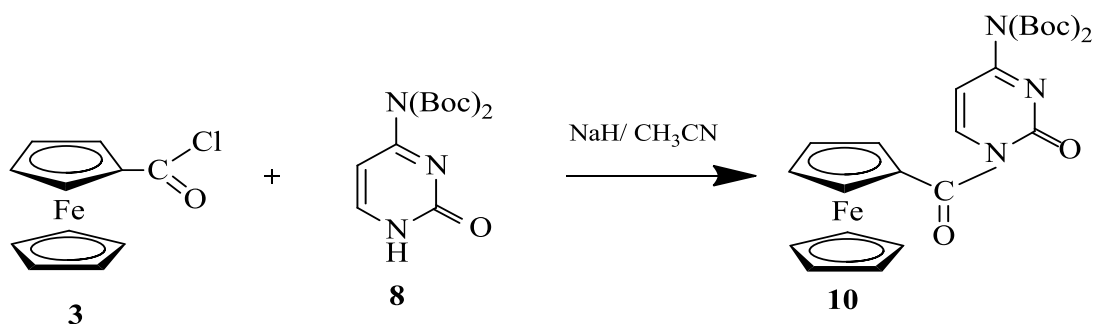


**Slika 18.** Homo i heteroanularno supstituirani derivati ferocena i -Boc-citozina **10** i **12**

Na osnovi rezultata za pripremu derivata **9** i **11**, opisanih u prethodnom poglavlju, sinteza ferocenoil-bis-Boc-citozina **10** i **12** provedena je u acetonitrilu uz NaH kao deprotonirajući agens. Deprotekcija je provedena na 50 °C tijekom 30 minuta, a kopulacija na 0 °C kroz 60 minuta.

#### 4.4.1. Ferocenoil-bis-Boc-citozin (10)

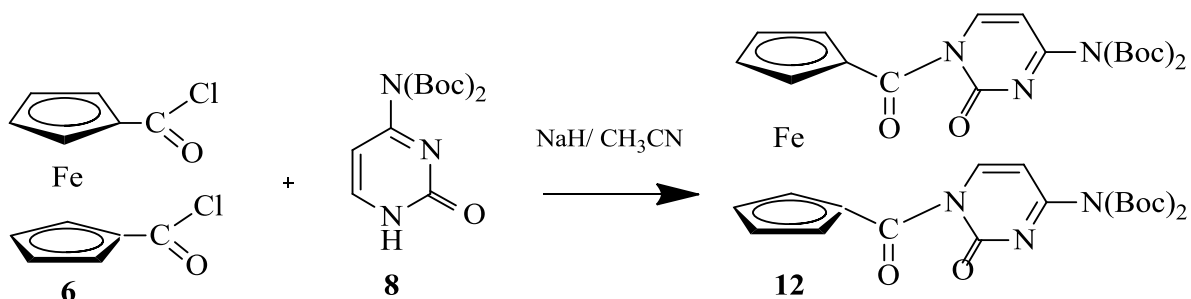
Reakcijom ferocenoil-klorida (**3**) s bazom bis-Boc-citozinom (**8**) koji je deprotoniran uporabom natrij hidrida u otapalo acetonitril ili dimetilformamid pripremljen je ferocenoil-bis-Boc-citozin (**10**) (Shema 17). Reakcijska smjesa obrađena je ekstrakcijom s 10-% limunskom kiselinom i diklormetanom, nakon čega se organski sloj osuši i upari do suha. Sirovi produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/aceton 10/2, pri čemu je izoliran ferocenoil-bis-Boc-citozin uz iskorištenje od 47 %.



Shema 17. priprema ferocenoil-bis-Boc-citozina (**10**)

#### 4.4.2. Ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozin (12)

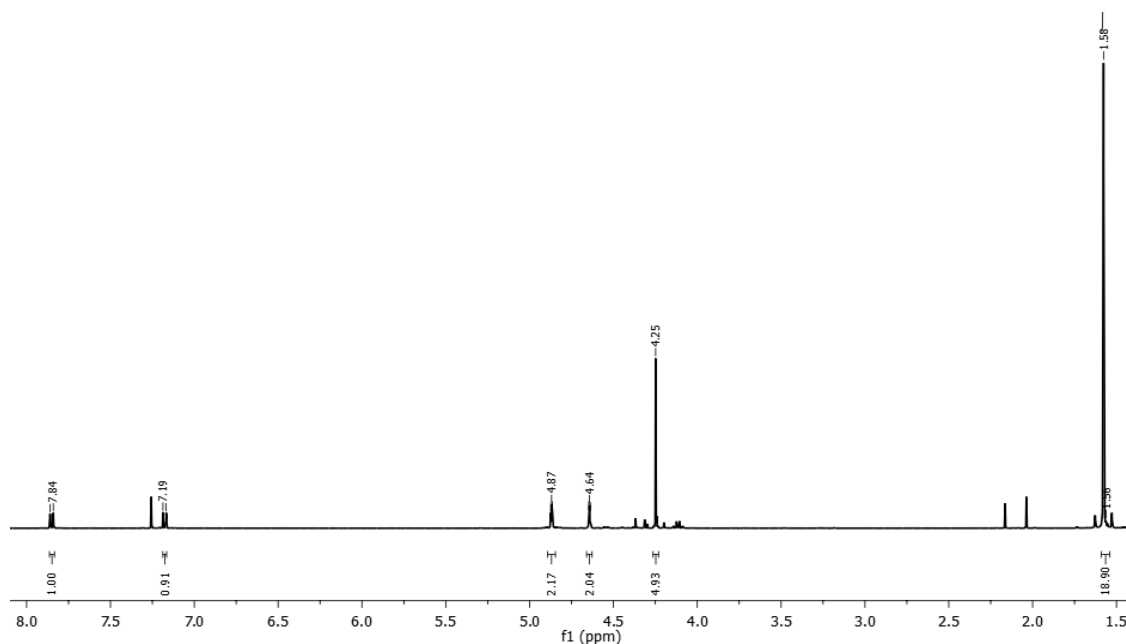
Sinteza ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (**12**) (Shema 18) provedena je kao i sinteza spoja **10** uz korištenje ferocenoil-1,1'-diklorida (**6**) umjesto ferocenoil-klorida (**3**) uz otapalo acetonitril. Postupak pročišćavanja proveden je na način da se nakon završene reakcije reakcijska smjesa neutralizira s 10 % limunskom kiselinom, ekstrahira s diklormetanom i upari do suha. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silika gela uz eluens diklormetan/aceton 10/3 pri čemu je izoliran ferocenoil-bis-Boc-citozin (**12**) uz iskorištenje od 33 %. Prilikom pročišćavanja na koloni uočena je razgradnja željenog spoja.



Shema 18. Priprema Ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (**12**)

#### 4.4.3. Spektralna analiza ferocenoil-bis-Boc-citozina (**10**) i ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (**12**)

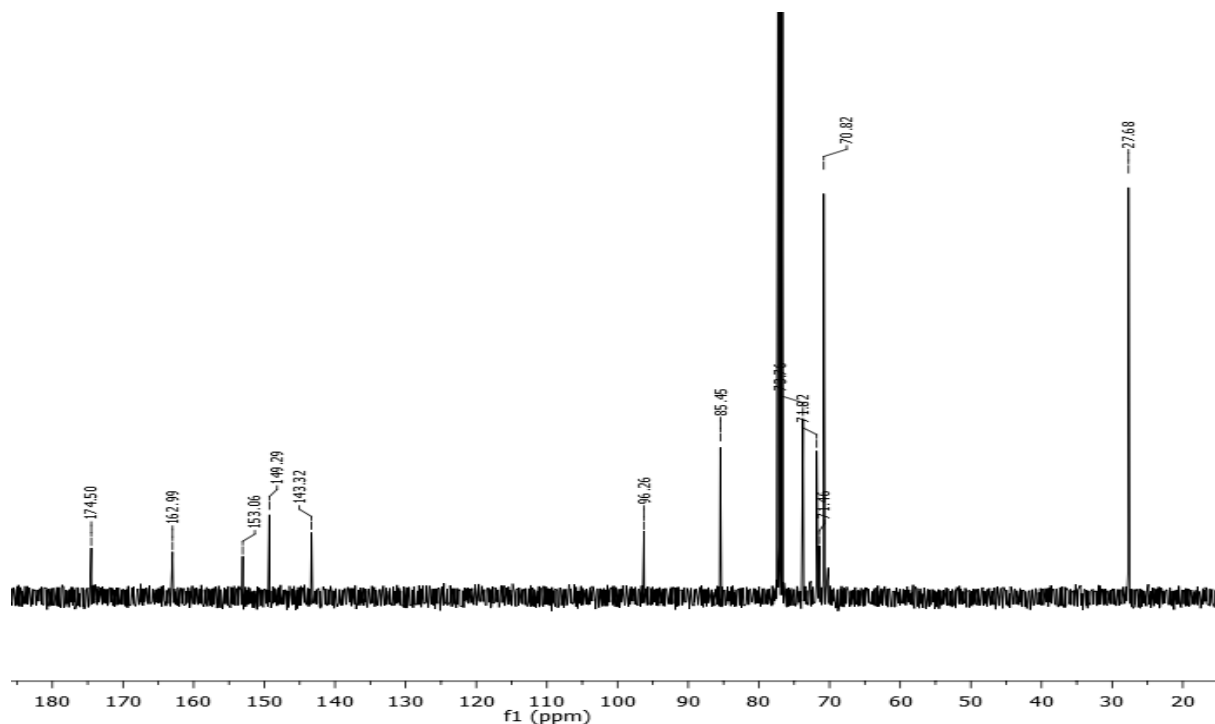
Struktura ferocenoil-bis-Boc-citozina (**10**) i ferocenoil-1,1'-bis-Boc-dicitozina (**12**) potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektrima kopulata **10** i **12**, snimljenim u diklormetanu, vidljive su apsorpcijske vrpce jakog intenziteta pri 1770, 1730 i 1660  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju karbonilnoj skupini Boc-zaštite te amidnoj karbonilnoj skupini pirimidinskog prstena. U  $^1\text{H}$  NMR spektru kopulata **10** (Slika 19), snimljenom u  $\text{CDCl}_3$ , vidljivi su kemijski pomaci pri  $\delta$  7.86 ppm i 7.18 ppm koji se pripisuju protonima na C-6 i C-5 položajima pirimidinskog prstena te kemijski pomak pri 1.57 ppm koji potvrđuje prisutnost protona metilnih skupina Boc-zaštite. U spektru su asignirana i 3 signala u području od  $\delta$  4.29 do 4.87 ppm, i to kao jedan singlet i dva tripleta, što potvrđuje supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena.



Slika 19.  $^1\text{H}$  NMR spektru kopulata **10**

U  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **10** (Slika 20) vidljiv je signal pri  $\delta$  174.52 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i citozinske podjedinice. Signal pri  $\delta$  155.62 ppm pripisan je karbonilnom ugljikovom atomu pirimidinskog prstena, a pri  $\delta$  143.3 i 96.27 ppm ugljikovim atomima citozinske podjedinice (C-6 i C-5). Kemijski pomak pri  $\delta$  149.31 ppm pripisuje se karbonilnom ugljikovom atomu, a signal pri  $\delta$  85.46 ppm kvaternom ugljikovom atomu zaštitne skupine, dok signal pri  $\delta$  27.7 ppm potvrđuje prisutnost metilnih skupina. Ferocenskim ugljikovim atomima, supstituiranog

ciklopentadienilnog prstena pripisani su kemijski pomaci pri  $\delta$  72.0 i 70.1 ppm, dok kemijski pomak pri  $\delta$  69.8 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena.



**Slika 20.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spektru spoja **10**

U  $^1\text{H}$ -NMR spektru spoja **12**, snimljenom u  $\text{CDCl}_3$ , vidljivi su signali pri  $\delta$  8.40 i 7.27 ppm koji odgovaraju kemijskim pomacima protona na položaju C-5 i C-6 pirimidinskog prstena te kemijski pomak pri 1.57 ppm koji potvrđuje prisutnost protona metilnih skupina Boc-zaštite. U  $^1\text{H}$ -NMR spektru, iz kemijskih pomaka, koji su vidljivi kao dva singleta pri  $\delta$  4.89 ppm i 4.6 ppm, potvrđena je prisutnost ferocenske podjedinice, odnosno vezivanja baze na oba ciklopentadienilna prstena.

Na osnovu kemijskih pomaka u  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrima spoja **10** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena dok je u kopolatu **12** potvrđena supstucija na oba prstena. Signal u  $^{13}\text{C}$  spektru pri  $\delta$  174.5 ppm ukazuje na prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma smještenog između ferocena i baze, dok kemijski pomaci za metilne skupine potvrđuju prisutnost Boc zaštite na citozinu.

## 5. ZAKLJUČCI

- Višestupanjskom sintezom pripremljeni su intermedijari ferocenoil-klorid (**3**) i ferocenoil-1,1'-diklorid (**6**) koji su reakcijom s citozinom/bic-Boc-citozinom prevedeni u homo- i heteroanularno supstituirane biokonjugata **9-12**.
- Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti da se povišenjem temperature reakcije deprotekcije sa sobne na 50 °C i snižavanjem temperature reakcije kopulacije sa sobne temperature na 0 °C povećava prinos kopulata **9** i **11**.
- Struktura svih dobivenih produkata potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektrima spojeva **9** i **10** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena dok je u spojevima **11** i **12** potvrđena supstitucija baze na oba prstena ferocena. Kemijski pomak u <sup>13</sup>C spektru oko δ 174 ppm potvrđuje prisutnost karbonilne skupine u prenosnici ferocenske i citozinske podjedinice.
- Povezivanje ferocenske podjedinice na *N*-atom pirimidinskog prstena u položaju *N1* u produktima **9** i **11**, potvrđeno je kemijskim pomakom oko δ 7.50 ppm, koji se pripisuje NH<sub>2</sub> skupini citozina te se može zaključiti da se ovim sintetskim postupkom dobiva samo *N1*-izomer.
- Na osnovu kemijskog pomaka u <sup>1</sup>H NMR spektrima pri δ 1.57 ppm koji je pripisan protonima metilnih skupina te dodatnih signala u <sup>13</sup>C NMR spektrima za karbonilni ugljikov atom pri δ 149.31 ppm i za ugljikove atome metilnih skupina pri δ 27.7 ppm potvrđena je kopulacijazaštićene pirimidinske baze na ferocenu u spojevima **10** i **12**.

## 6. LITERATURA

- [1] Moriuchi T., Hirao T. (2004) Highly ordered structures of peptides by using molecular scaffolds. *Chem. Soc. Rev.* **33**, 294.
- [2] 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.
- [3] Grdenić, D. (1987) Molekule i kristali, 3.dopunjeno izd. Školska knjiga, Zagreb.
- [4] Lide, D. R. (2005). CRC Handbook of Chemistry and Physics, 86.izd. CRC Press, 3.258.
- [5] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature.* **168**, 1039-1040.
- [6] Wilkinson, G., Pauson, P. L., Cotton, F. A. (1954) Bis-cyclopentadienyl compounds of nickel and cobalt. *J. Am. Chem. Soc.* **76** (7), 1970-1974.
- [7] Wilkinson, G., Cotton, F. A. (1959) Cyclopentadienyl and arene metal compounds. *Prog. Inorg. Chem.* **1**, 1–124.
- [8] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound, *Nature.* **168**, 4285-4289.
- [9] Metzler-Nolte, N. (2001) Labeling of biomolecules for medicinal applications, *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (6), 1040-1043.
- [10] Gilchrist, T. L. (1997) Heterocyclic chemistry, Longman, New York, 357.
- [11] Mishra, R., Tomar, I. (2011) Pyrimidine: The molecule of diverse biological and medicinal importance. *IJPSD.* **2**, 758.
- [12] Fathalla, O. A., Zeid, I. F., Haiba, M.E., Soliman, A. M. (2009) Synthesis, antibacterial and anticancer evaluation of some pyrimidine derivatives. *World J. Chem.* **4** (2), 127-132.
- [13] Karlson, P. (1999) Biokemija za studente kemije i medicine (preveli P. Mildner i B.Mildner). Školska knjiga, Zagreb.

- [14] Anonymous (2015) < [https://bs.wikipedia.org/wiki/Bazni\\_par](https://bs.wikipedia.org/wiki/Bazni_par) > Pristupljeno 15. studenog 2017.
- [15] Mintas, M. (2013) Medicinska kemija protutumorskih lijekova, Medicinska naklada, Zagreb.
- [16] Christensen, L., Hansen, H. F., Koch, T., Nielsen, P.E. (1998) Inhibition of PNA triplex formation by N4-benzoylated cytosine. *Nucleic Acids Research*. **26**, 2735–2739.
- [17] Frank-Kamenetskii, M.D., Mirkin, S.M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65-95.
- [18] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002) Biochemistry, W. H. Freeman and Company.
- [19] De Clercq, E., Field, H.J. (2006) The development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy. *Brit. J. Pharmacol.* **147**, 1–11.
- [20] Snoeck, R., Sakuma, T., De Clercq, E., Rosenberg, I., Holly, A. (1988) (S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)cytosine, a potent and selective inhibitor of human cytomegalovirus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1839.
- [21] Gharehbaghi, K., Zhen, W., Fritzer-Szekeres, M., Szekeres, T., Jayaram, H.N. (1998) Studies on the antitumor activity and biochemical actions of cyclopentenyl cytosine against human colon carcinoma HT-29 in vitro and *in vivo*. *Life Sci.* **64**, 112.
- [22] Kowalski, K. (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and Applications. *Coordin.Chem.Rev.* **317**, 132-156.
- [23] Shigehiro, T., Anzai, J. (2013) Recent progress in ferrocene-modified thin films and nanoparticles for biosensors. *Materials*, **6**(12), 5742-5762.
- [24] Chen, S. Ch. (1980) The syntheses and mass spectra of some IV-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J. Organomet. Chem.* **202**, 183-189.
- [25] Kowalski, K., Koceva-Chyla, A., Pieniazek, A., Bernasinska, J., Skiba, J., Rybarczyk-Pirek, A. J., Jozwiak, Z. (2012) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *J. Organomet. Chem.* **700**, 58-68.



- [26] Kowalski, K., Skiba, J., Oehninger, L., Ott, I., Solecka, J., Rajnisz, A., Therrien, B. (2013) Metallocene-modified uracils: Synthesis, structure, and biological activity. *Organometallics*. **32**, 5766-5773.
- [27] Skiba, J., Kowalski, K., Pręchnicka, A., Ott, I., Solecka, J., Rajnisz, A., Therrien, B. (2015) Metallocene-uracil conjugates: Synthesis and biological evaluation of novel mono-, di- and tri-nuclear systems. *J. Organomet. Chem.* **782**, 52-61.
- [28] Simenel, A. A., Morozova, E. A., Snegur, L. V., Zykova, S. I., Kachala, V. V., Ostrovskaya, L. A., Bluchterova, N. V. and Fomina, M. M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity *in vivo*. *Appl. Organometal. Chem.* **23**, 219–224.
- [29] Snegur, L.V., Zykova, S.I., Simenel, A.A. (2013) Antitumor activities of ferrocene compounds. *Russ Chem Bull.* **62**, 2056.
- [30] 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.
- [31] Patwa, A.N., Gupta, S., Gonnade, R.G., Kumar, V.A., Bhadbhade, M.M., Ganesh, K.N. (2008) Ferrocene-linked thymine/uracil conjugates: Base pairing directed self-assembly and supramolecular packing. *J. Org. Chem.* **73**, 1508-1515.
- [32] Sonoda, A., Moritani, I.J. (1971) The synthesis of [3]-ferrocenophan-2-one tosylhydrazone and the thermal decomposition of its sodium salt. *Organometal. Chem.* **26**, 133.
- [33] Knobolch, F.W., Raucher, W. H. (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *Sci.* **54**, 651.
- [34] Rosenblum, M., Woodward, R.W. (1958) The structure and chemistry of ferrocene. III. evidence pertaining to the ring rotational barrier. *J. Amer. Soc.* **80**, 5443.
- [35] Porcheddu, A., Giacomelli, G., Piredda, I., Carta, M., Nieddu, G. (2008) A practical and efficient approach to PNA monomers compatible with Fmoc-mediated solid-phase synthesis protocols. *Eur. J. Org. Chem.* **34**, 5786-5797.