

Biokonjugati ferocena i derivata purina: sinteza i spektralna karakterizacija

Tratnik, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:502246>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, ožujak 2019.

Marija Tratnik

898/MB

**BIOKONJUGATI FEROCENA I
DERIVATA PURINA: SINTEZA I
SPEKTRALNA
KARAKTERIZACIJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Senke Djaković te uz pomoć Mateje Tome mag. appl. chem., a u sklopu HRZZ-IP-2016-06-1137 projekta Hrvatske zaklade za znanost.

ZAHVALA

Želim iskreno zahvaliti svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Senki Djaković na strpljenju, razumijevanju, uloženom trudu, pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Zahvaljujem joj se na korisnim stručnim i životnim savjetima te što mi je omogućila stjecanje novih znanja dijeljenjem dugogodišnjeg iskustva.

Veliku zahvalnost dugujem i mag. appl. chem Mateji Tomi bez čijeg strpljenja, savjeta, znanja i pomoći, eksperimentalni dio kao ni završetak ovog rada ne bi bili mogući.

Hvala doc.dr.sc. Jasmini Lapić i svim ostalim djelatnicima Laboratorija na pruženoj pomoći te prekrasnoj radnoj atmosferi.

Najveće hvala mami Gogi jer mi je sve omogućila u životu te najboljem dečku Tomislavu na ljubavi i bezuvjetnoj podršci. Zahvaljujem im što su uvijek bili uz mene, puni razumijevanja i strpljenja te što su uvijek vjerovali u mene i moj uspjeh.

Puno se zahvaljujem sestričnima Ivi, Miji i Ivani te svim svojim prijateljicama i kolegama. Učinili su moje studiranje ljepšim i bezbrižnijim te su obilježili jedno vrlo važno, a možda i najljepše razdoblje moga života.

Hvala svima od srca!

Marija

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

BIOKONJUGATI FEROCENA I DERIVATA PURINA: SINTEZA I SPEKTRALNA KARAKTERIZACIJA

Marija Tratnik, 898/MB

Sažetak: Konjugati ferocena i nukleobaza novija su skupina bioorganometalnih spojeva čiju strukturu čine biološki i elektrokemijski aktivne komponente. Ferocen pokazuje dobru membransku permeabilnost, nisku toksičnost i antitumorsko djelovanje čime je omogućena primjena takvih kopulata u biologiji, farmaciji i drugim znanostima. Sinteza ferocenskih derivata nukleobaza temelji se na sintetskoj kopulaciji pri čemu razmak između ferocena i heterocikličkog dijela čine alkilni ili karbonilni lanci. Ovaj diplomski rad prikazuje sintezu i spektroskopsku karakterizaciju novih ferocenoil purinskih biokonjugata te praćenje regioselektivnosti reakcija aciliranja NMR spektroskopijom. Aciliranje se provodi s ferocenoil-kloridom/mješovitim ferocenskim anhidridom, a kao produkt većine reakcija nastaje smjesa N9- i N7-izomera čiji sadržaj ovisi o nukleobazi i njenim supstituentima. Omjeri nastalih izomera u reakcijskoj smjesi određeni su praćenjem reakcijske smjese NMR spektroskopijom i kvantitativnom integracijom pikova koji odgovaraju pojedinom izomeru.

Ključne riječi: purin, supstituirani derivati purina, ferocen, spektralna analiza

Rad sadrži: 54 stranice, 50 slika, 1 tablica, 43 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: *Mateja Toma mag. appl. chem.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Jasmina Lapić*
2. Izv.prof.dr.sc. *Senka Djaković*
3. Prof.dr.sc. *Valerije Vrček*
4. Izv.prof.dr.sc. *Renata Teparić*

Datum obrane: 28. ožujka 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

BIOCONJUGATES OF FERROCENE AND PURINE DERIVATIVES: SYNTHESIS AND SPECTRAL CHARACTERIZATION

Marija Tratnik, 898/MB

Abstract: *Ferrocene-nucleobase conjugates are a newer group of bioorganometallic compounds whose structure is made up of biologically and electrochemically active components. Ferrocene exhibits good membrane permeability, low toxicity and antitumor activity, enabling the use of such conjugates in biology, pharmacy and other sciences. The synthesis of ferrocene nucleobase derivatives is based on synthetic copulation where the spacer between ferrocene and heterocyclic moiety of the molecule are alkyl or carbonyl chains. This graduate thesis presents the synthesis and spectroscopic characterization of new ferrocenoyl purine conjugates and monitoring the regioselectivity of acylation reactions by NMR spectroscopy. The acylation is carried out with ferrocenoyl chloride/mixed ferrocene anhydride, and in most of reactions the product is a mixture of N9 and N7 isomers whose content depends on the nucleobase and its substituents. The ratios of isomers in reaction mixture are determined by monitoring of the reaction mixture by NMR spectroscopy and quantitative integration of peaks corresponding to each isomer.*

Keywords: purine, substituted purine derivatives, ferrocene, spectral analysis

Thesis contains: 54 pages, 50 figures, 1 table, 43 references

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. Senka Djaković, Associate professor*

Technical support and assistance: *Mateja Toma mag. appl. chem.*

Reviewers:

1. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor
2. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor
3. PhD. *Valerije Vrčec*, Full professor
4. PhD. *Renata Teparić*, Associate professor

Thesis defended: 28 March 2019

Sadržaj

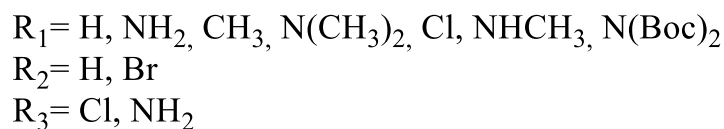
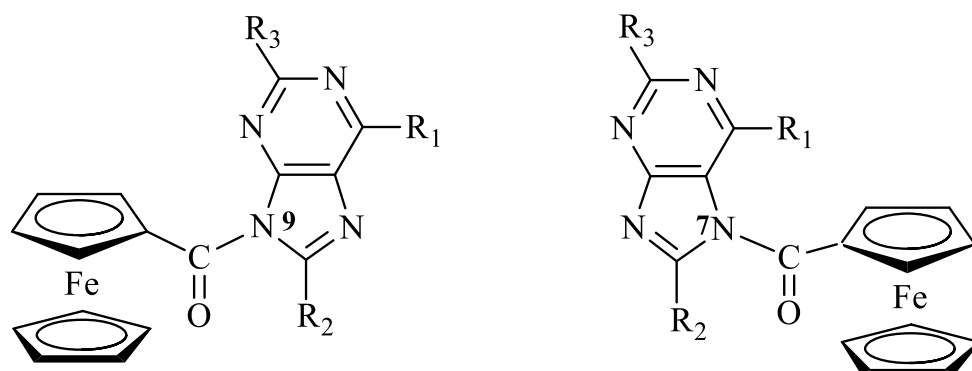
| | | |
|--------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 2. | TEORIJSKI DIO | 2 |
| 2.1 | Ferocen | 2 |
| 2.1.1 | Derivati ferocena s biološkom aktivnošću..... | 3 |
| 2.2 | Purinske baze..... | 4 |
| 2.2.1 | Adenin | 5 |
| 2.2.2 | Analozi purinskih baza | 6 |
| 2.3 | Nukleozidi i nukleotidi | 6 |
| 2.3.1 | Analozi nukleozida..... | 8 |
| 2.4 | Kopulati ferocena i nukleobaza | 10 |
| 3. | EKSPERIMENTALNI DIO..... | 17 |
| 3.1 | Materijali | 17 |
| 3.2 | Metode rada..... | 17 |
| 3.3 | Sheme pripreve kopulata ferocena i purinskih baza..... | 19 |
| 3.4 | <i>N,N</i> -difenilferocenkarboksamid (1)..... | 21 |
| 3.5 | Ferocenkarboksilna kiselina (2) | 21 |
| 3.6 | Ferocenoil-klorid (3) | 21 |
| 3.7 | Ferocenoil-etil-karbonat (mješoviti anhidrid) (4)..... | 22 |
| 3.8 | 8-Bromadenin (5) | 22 |
| 3.9 | Ferocenoil-8-bromadenin (6)..... | 23 |
| 3.10 | Tris-Boc-adenin (7) | 23 |
| 3.11 | Bis-Boc-adenin (8) | 23 |
| 3.12 | Ferocenoil-purin (9) | 23 |
| 3.13 | Kopulati ferocena i purinskih derivata (9a-9g)..... | 24 |
| 3.13.1 | Ferocenoil-adenin (9a)..... | 24 |
| 3.13.2 | Ferocenoil-6-metilpurin (9b) | 25 |
| 3.13.3 | Ferocenoil-6-dimetilaminopurin (9c) | 26 |
| 3.13.4 | Ferocenoil-2,6-diklorpurin (9d)..... | 26 |
| 3.13.5 | Ferocenoil-2-amino-6-klorpurin (9e) | 26 |
| 3.13.6 | Ferocenoil-6-metilaminopurin (9f)..... | 26 |
| 3.13.7 | N ⁹ -ferocenoil-bis-Boc-adenin (9g) | 27 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 28 |
| 4.1 | Uvod | 28 |
| 4.2 | Sinteza i spektroskopska analiza prekursora | 29 |
| 4.3 | Sinteza i spektralna analiza biokonjugata ferocena i derivata purina..... | 32 |
| 4.3.1 | Ferocenoil-8-bromadenin (6) | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.2 | Ferocenoil-purin (9)..... | 33 |
| 4.3.3 | Ferocenoil-adenin (9a)..... | 35 |
| 4.3.4 | Ferocenoil-6-metilpurin (9b)..... | 38 |
| 4.3.5 | Ferocenoil-6-dimetilaminopurin (9c)..... | 40 |
| 4.3.6 | Ferocenoil-2,6-diklorpurin (9d)..... | 41 |
| 4.3.7 | Ferocenoil-2-amino-6-klorpurin (9e)..... | 42 |
| 4.3.8 | Ferocenoil-6-metilaminopurin (9f)..... | 43 |
| 4.3.9 | Ferocenoil-bis-Boc-adenin (9g)..... | 44 |
| 4.4 | Regioselektivnost kopulacijskih reakcija..... | 46 |
| 5. | ZAKLJUČCI..... | 50 |
| 6. | LITERATURA..... | 51 |

1. UVOD

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

Konjugati ferocena i nukleobaza novija su skupina bioorganometalnih spojeva čiju strukturu čine biološki i elektrokemijski aktivne komponente. Veliki broj supstituiranih analoga prirodnih nukleozida pokazuje snažna biološka djelovanja te postoji značajna potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analogima. Cilj ovog diplomskog rada je sinteza i spektroskopska karakterizacija ferocenoil-purinskih konjugata (Slika 1). Kao produkti ovih kopulacijskih reakcija mogu nastati smjese *N9*- i *N7*-izomera ovisno o supstituentu vezanom na purinski prsten (C-2, C-6 ili C-8). Svrha ovog rada je ispitati utjecaj skupine/atoma vezanog na bazu na regioselektivnost reakcija kopulacije te praćenje tih reakcija NMR spektroskopijom.

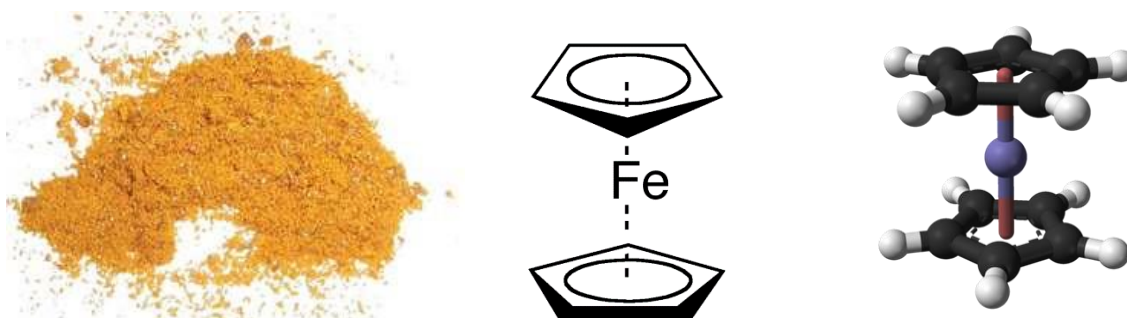


Slika 1. Struktura kopulata ferocena i derivata purinskih baza

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Ferocen

Ferocen [diciklopentadienil(željezo)] je najpoznatiji organometalni spoj čija je kemijska formula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, a pripada skupini metalocena i „sendvič“-spojeva pri čemu je centralni atom željeza u molekuli ferocena okružen s dva ciklopentadienilna prstena što pridonosi njegovoj izrazitoj stabilnosti u vodi i na zraku. Netopljiv je u vodi, netoksičan i zapaljiv te se javlja u obliku narančaste kristalne krutine ili narančato-žutog praha karakterističnog mirisa sličnog kamforu (Slika 2). Molekulska masa ferocena je $186,035 \text{ g mol}^{-1}$, gustoća $1,11 \text{ g cm}^{-3}$, temperatura vrelišta 249 °C i temperatura tališta $172,5 \text{ °C}$ (Togni, 2008).

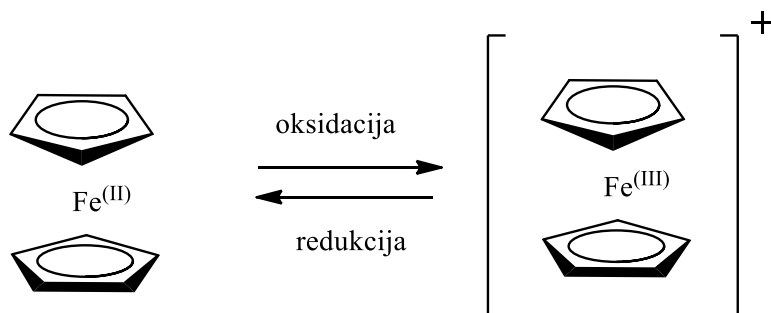


Slika 2. Ferocen (Wikipedia, 2001)

Ferocen je prvi put sintetiziran 1951. godine reakcijom natrijevog ciklopentadienida s željezovim (II) kloridom, a strukturno je okarakteriziran 1952. godine (Patra i sur., 2017). Ferocen se može pripremiti i na još nekoliko načina: reakcijom željezovog klorida s ciklopentadienilmagnezijevim bromidom, izravnom termičkom reakcijom ciklopentadiena s metalom željeza, izravnom interakcijom ciklopentadiena s željezovim karbonilom, reakcijom željezovog oksida i ciklopentadiena u prisutnosti kromovog oksida te iz ciklopentadienskog i željezovog acetalacetona-dipiridinskog kompleksa (Organic Syntheses, 2014).

Ferocen se kemijski ponaša kao benzen i drugi aromatski spojevi jer podliježe reakcijama supstitucije, ali u usporedbi s benzenom, kod ferocena je utvrđena veća reaktivnost, pri čemu su limitirajući faktori sklonost protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te reverzibilna oksidacija željeza. Uklanjanjem jednog elektrona iz molekule, atom željeza prelazi u sljedeće odnosno više oksidacijsko stanje (od +2 do +3), što dovodi do stvaranja soli koje sadrže plavi

fericinijev kation, $(C_5H_5)_2Fe^+$ tako da je ferocen idealan inertni standard u elektrokemiji (Slika 3) (Togni, 2008).



Slika 3. Reverzibilna oksidacija ferocena u fericinijev kation

Ferocen se može primijeniti u širokom rasponu područja (kataliza, znanost o materijalima itd.) zahvaljujući netoksičnom karakteru, kemijskoj stabilnosti, lipofilnosti i dobrim redoks svojstvima, a upravo njegovim otkrićem, dolazi do eksplozivnog razvoja organometalne kemije (Sokol i sur., 2018; Kealy i Pauson, 1951).

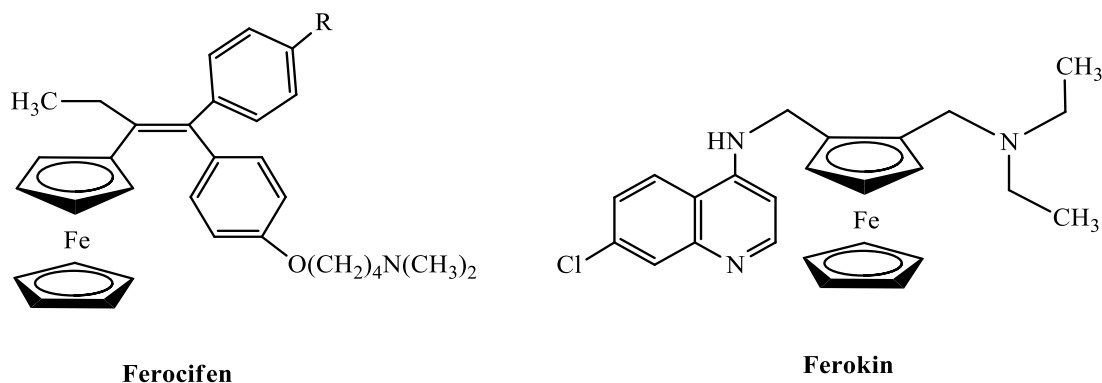
2.1.1 Derivati ferocena s biološkom aktivnošću

Dva najistaknutija derivata ferocena otkrivena 1990-ih godina, ferocifen i ferokin (Slika 4), od tada su opsežno proučavani za liječenje karcinoma dojke i malarije. Ferocenilna skupina u strukturi ferocifena i ferokina sudjeluje u važnim interakcijama koji utječu na ukupnu terapijsku učinkovitost molekula (Patra i sur., 2017).

Ferocifen ili 1-[4-(2-dimetilaminoetoksi)]-1-(fenil-2-ferocenilbut-1-en) razvijen je u potrazi za novim lijekom sličnom tamoksifenu. Biološke aktivnosti hidroksiferocifena su nakon njihove uspješne pripreve procijenjene u istraživanjima afiniteta relativnog vezanja (RBA) u kojima je proučavano vezanje ispitivanog spoja na estrogenski receptor u konkurenciji s estrogenom. Rezultati su pokazali da hidroksiferocifeni mogu inhibirati rast tumorskih stanica dojke iz linije MCF-7 jer dovode do inhibicije djelovanja hormona estrogena te da pokazuju antiproliferativno ponašanje na staničnoj liniji MDA-MB-231 (Braga i sur., 2013).

Ferokin je derivat klorokina koji posjeduje antimalarijska svojstva, a poznat je kao prvi organometalni lijek u kojem je ferocenilna skupina kovalentno povezana s 4-aminokinolinom i alkilaminom. Prvi put je dizajniran 1994. godine na Sveučilištu u Lille-u, a danas se uspješno sintetizira ugradnjom ferocena u osnovni kostur klorokina. Pokazuje iznimnu učinkovitost protiv uzročnika malarije *Plasmodium falciparum* otpornog na klorokin bez vidljivih

imunotoksičnih učinaka kod inficiranih štakora. Također je potvrđeno da proizvodi značajne količine hidroksilnih radikala u probavnim vakuolama malarijskih parazita (kiseli pH i prisutnost H₂O₂), a poznato je da slobodni hidroksilni radikali negativno djeluju na parazite. Mnoga istraživanja posvećena su razvoju derivata ferokina kao sigurne alternative antimalarijskoj kemoterapiji kako bi se povećala učinkovitost, smanjile nuspojave i premostio otpor malarijskih parazita (Wani i sur., 2015).

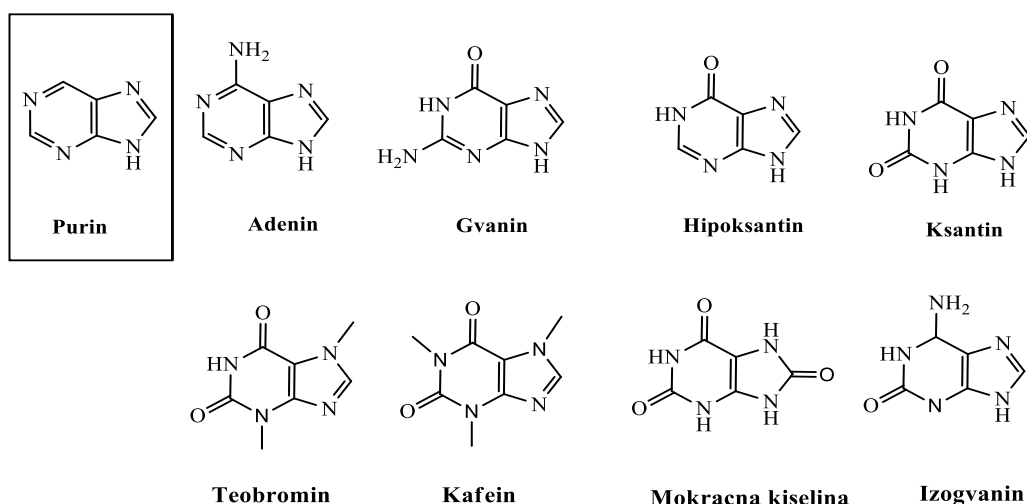


Slika 4. Kemijske strukture ferocifena i ferokina

Iako je ferokin trenutno u drugoj fazi kliničkih ispitivanja, a ferocifen tek u predkliničkoj procjeni, nijedan drugi derivat ferocena odnosno ni jedan drugi neradioaktivni organometalni spoj nije napredovao do kliničkih ispitivanja (Patra i sur., 2017).

2.2 Purinske baze

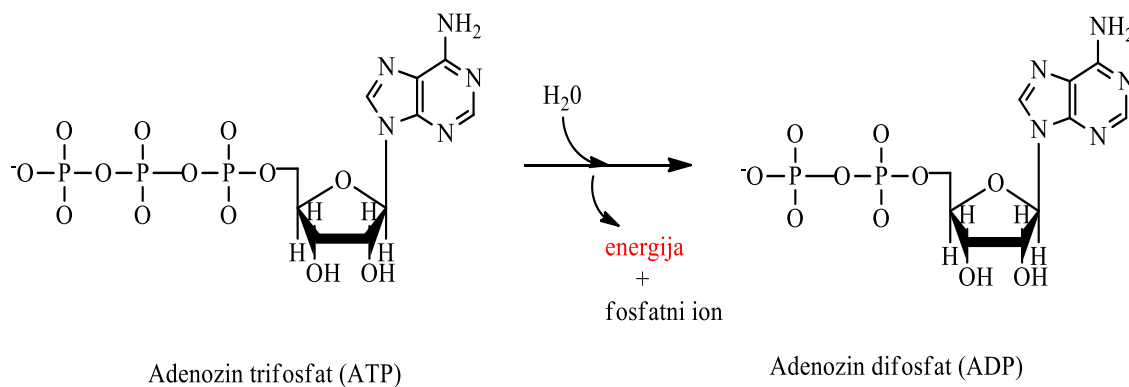
Purini i supstituirani purini čine jednu od najraširenijih skupina dušikovih heterocikala u prirodi, a njihova osnovna struktura sastoji se od pet atoma ugljika i četiri atoma dušika (Rosemeyer, 2004). Zahvaljujući svojoj strukturi, dušične se baze mogu ponašati i kao proton donori i kao proton akceptori, a aromatski karakter purina je posljedica prisustva konjugiranih veza, što ih svrstava među najstabilnije spojeve u prirodi. Purin se klasificira kao alkaloid i diazol, a s obzirom da proton može biti smješten na jednom od dvaju dušikovih atoma mogu postojati dva tautomerna oblika. Upravo zato posjeduje amfoterna svojstva te u doticaju s kiselinom i/ili lužinom prelazi u odgovarajuću sol. Najvažniji purini su adenin i gvanin, koji sudjeluju u stvaranju DNA i RNA, a ostali koji se mogu naći u prirodi su hipoksantin, ksantin, teobromin, kafein, mokraćna kiselina i izogvanin (Slika 5). Također su i sastojci drugih važnih biomolekula, kao što su ATP, GTP, ciklički AMP, NADH i koenzim A (Kumari, 2017).



Slika 5. Kemijske strukture purina

2.2.1 Adenin

Adenin je purinska nukleobaza s amino skupinom vezanom na C6 ugljikov atom. Adenin, ponekad poznat i kao vitamin B4, jedna je od četiri dušične baze koje se koriste u sintezi nukleinskih kiselina (DNA i RNA), sastavni je dio strukture mnogih koenzima te je temeljna komponenta adeninskih nukleotida. Tvori adenzin (nukleozid) kada je vezan na ribozu i deoksiadenozin kada je vezan na deoksiribozu. Adenzin se može povezati s jednom do tri jedinice fosforne kiseline, dajući AMP, ADP i ATP. Ti derivati adenina imaju važne funkcije u staničnom metabolizmu. Modificirani oblik adenzin monofosfata ciklički AMP je važan sekundarni glasnik u širenju mnogih hormonskih podražaja dok je adenzin trifosfat (ATP) prenosio fosfata u enzimskim reakcijama, pri čemu je pretvorba ATP-a u ADP glavni izvor energije u biološkim procesima (Slika 6) (Werner i sur., 1993).



Slika 6. ATP - ADP ciklus

2.2.2 Analizi purinskih baza

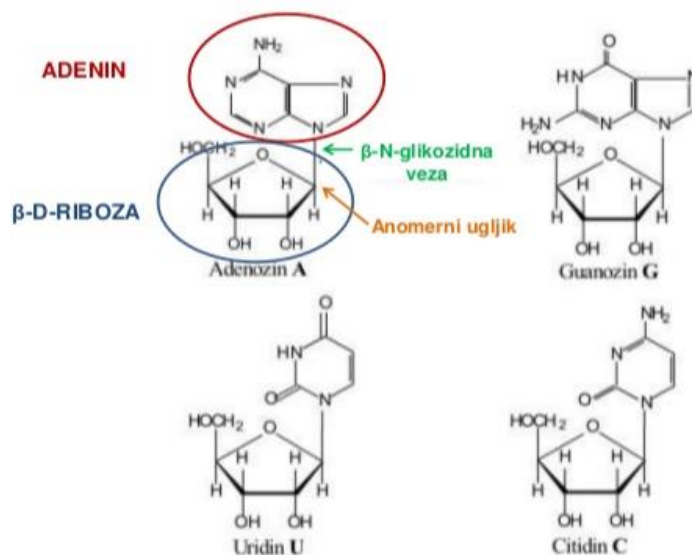
Purinski derivati pokazuju niz bioloških svojstava, uključujući antikonvulzantne, antibakterijske, antifungalne, antimalarijske, antitumorske i protuupalne karakteristike (Wang i sur., 2014). Oni su i snažni inhibitori serin/treonin kinaza, ciklin ovisne kinaze (CDK), receptora epidermalnog faktora rasta (EGFR) i receptora faktora rasta vaskularnog endotela (VEGFR) (Sharma i sur., 2016).

Terapeutici koji ciljaju metabolizam purina već se dugo koriste u medicini, a prvi takav bio je 6-merkaptopurin za liječenje akutne limfocitne leukemije. Purinski antimetaboliti (analizi tiopurina i deoksipurina) često se koriste kao prolijekovi, a nakon intracelularne konverzije u aktivnu molekulu lijeka, odgađaju replikaciju DNA putem inhibicije replikativnih enzima ili se integriraju u DNA/RNA uzrokujući oštećenje DNA, utišavanje gena i/ili indukciju apoptoze. Međutim, mnogi od tih terapeutika imaju neželjenu toksičnost tako da postoji potreba za identifikacijom novih razina regulacije unutar metabolizma purina te boljim razumijevanjem biokemijskih mehanizama s obzirom na njihovu važnost u staničnoj proliferaciji kako bi se otkrili novi načini inhibicije tumorigeneze (Pedley i Benkovic, 2017).

Niz prirodnih i sintetskih *N*6-supstituiranih adenina pokazuje fiziološke aktivnosti citokinina, skupine biljnih hormona koji reguliraju staničnu diobu. *N*6-benziladenin (BA) je najpoznatiji komercijalno dostupan sintetski citokinin koji se može relativno lako sintetizirati, a njegovo djelovanje je jednako učinkovito u usporedbi s prirodnim citokininom (Chen, 1980).

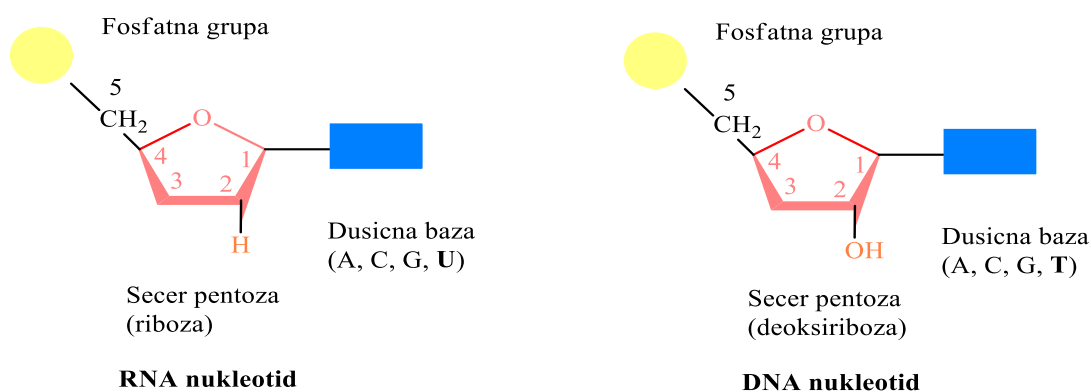
2.3 Nukleozidi i nukleotidi

Nukleozidi su purinski i pirimidinski glikozidi (glikozilamini) nukleinskih kiselina. Glavni nukleozidi su β -glikozidni derivati D-riboze ili D-2-deoksiriboze u kojima je aglikon (purinska ili pirimidinska nukleobaza) vezan *N*-glikozidnom vezom na šećer ribozu ili deoksiribozu preko jednog od heterocikličkih dušikovih atoma. Purinske baze su adenin i gvanin, a pirimidinske citozin i timin u 2-deoksiribozidima te citozin i uracil u ribozidima (Slika 7). Nukleozidi se mogu pripremiti različitim sintetskim metodama, a jedan od načina je kiselinom katalizirana supstitucija s dušikovim nukleofilom na monosaharidu pri čemu nastaje smjesa α -anomera i β -anomera (Pine, 1994). U stanicama se mogu fosforilirati specifičnim kinazama na primarnoj hidroksilnoj skupini šećera proizvodeći nukleotide (Wang i sur., 2011).



Slika 7. Najvažniji nukleozidi (Stryer, 2013)

Nukleotidi su fosfatni esteri nukleozida kojima hidroksilne skupine na fosfatnom dijelu daju kisela svojstva (Slika 8). Sudjeluju u većini biokemijskih procesa kao aktivni prekursori za biosintezu DNA i RNA, kao prenositelji određenih molekula u biosintezi (npr. uridin difosfat prilikom sinteze polisaharida glikogena) te djeluju kao međuprodukti u mnogim biosintezama (npr. CDP diacilglicerin za sintezu lipida). Jedan od najvažnijih nukleotida je ATP koji postoji kao sveprisutni izvor energije u stanicama dok je GTP važan za kretanje makromolekula, translokaciju novostvorenih peptida na ribosome i aktiviranje proteina za vezanje signala. Adeninski nukleotidi su elementi koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NAD), flavin adenin dinukleotida (FAD) i koenzima A (CoA) koji su odgovorni za prijenos elektrona u biološkim oksidacijsko-redukcijskim procesima. Ciklički nukleotid gvanozin monofosfat (cGMP) kao i adenozin monofosfat (cAMP) posreduje u djelovanju hormona (Pine, 2014; Werner i sur., 1993).



Slika 8. RNA i DNA nukleotidi

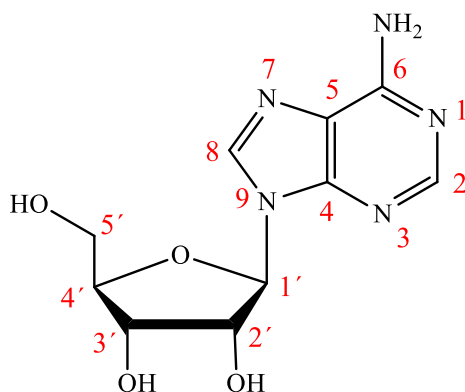
Nukleotidi i nukleozidi sudjeluju u mnoštvu različitih staničnih odgovora, među kojima su stimulacija (ili inhibicija) stanične smrti, proliferacije, migracije, diferencijacije, izlučivanja faktora rasta i upalnih medijatora (Giulani i sur., 2018). ATP i adenzin su važni endogeni metaboliti tumorskog i upalnog mikrokruženja jer igraju ključnu ulogu u procesima sinteze DNA i RNA, stanične signalizacije, enzimske regulacije i metabolizma. Oni su pod određenim uvjetima međusobno konvertibilni, a promjene u njihovim razinama mogu odražavati promjenu u metabolizmu nukleinskih kiselina. Prethodne studije su pokazale da pacijenti oboljeli od karcinoma imaju veliku brzinu degradacije RNA, povećanu aktivnost metiltransferaze te da su razine nukleozida i nukleotida (AMP-a i GMP-a) u serumu, urinu i kancerogenom tkivu drugačije u odnosu na normalne kontrole. Međutim, njihova prostorna raspodjela u mikrokruženju tumorskih stanica još uvijek nije u potpunosti poznata (Guo i sur., 2018).

Nukleotidi također pokazuju pozitivan učinak na imunološki sustav jer potiču proizvodnju limfocita B (prvenstveno IgM i IgA), a stimuliraju i proliferaciju, diferencijaciju te sazrijevanje neutrofila, povećavajući tako otpornost na patogene kao što su bakterije *Staphylococcus aureus* i *Cryptosporidiosis* te na gljivu iz roda *Candida* (Gutiérrez-Castrellón i sur., 2007).

Adenzin se koristi u liječenju paroksizmalnih supraventrikularnih tahikardija i akutnog infarkta miokarda. Hipoksantin ribonukleozid (inozin) se koristi u liječenju akutnog i kroničnog hepatitisa, reumatske bolesti srca, oligoleukocitemije, trombocitopenije, te u dodatnoj terapiji središnjeg retinitisa i atrofije optičkog sustava. Uridin se koristi u liječenju anemije crvenih krvnih zrnaca, jetre, cerebrovaskularnih i kardiovaskularnih bolesti (Wang i You, 2015).

2.3.1 Analizi nukleozida

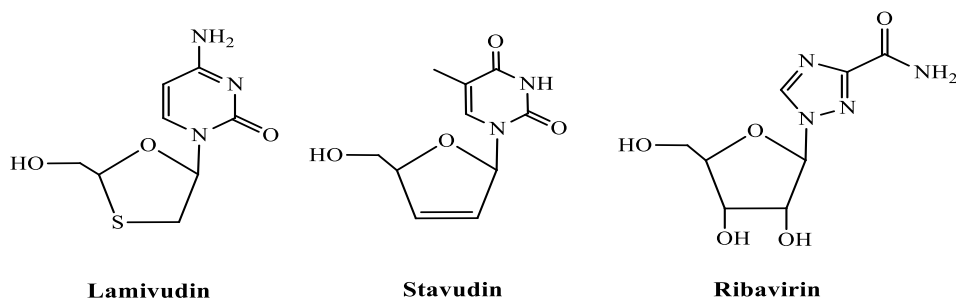
Nukleozidni analozi su skupina spojeva koji sadrže različite modificirane ugljikohidratne i/ili aglikonske fragmente te pripadaju raznovrsnoj obitelji nukleozidnih lijekova za nekoliko bolesti zbog višestrukih mehanizama djelovanja i potencijalnih indikacija. Različiti nukleozidni analozi se mogu pripremiti halogeniranjem, *N*-konjugacijom, metilacijom, zasićenjem, otvaranjem prstena, zaštitom polarnim skupinama, alkinilacijom i drugim modifikacijama šećera i/ili heterocikličke baze na položajima 2, 6 i 5' (Slika 9). Različiti C-supstituenti na položaju 6 purinske baze posjeduju široki spektar bioloških aktivnosti, a nukleozidi koji nose C-supstituente na položaju 5' šećerne skupine pokazuju potencijalnu antikancerogenu aktivnost (Malthum i sur., 2017).



Slika 9. Položaji u šećeru i/ili heterocikličkoj nukleobazi na kojima se javljaju modifikacije

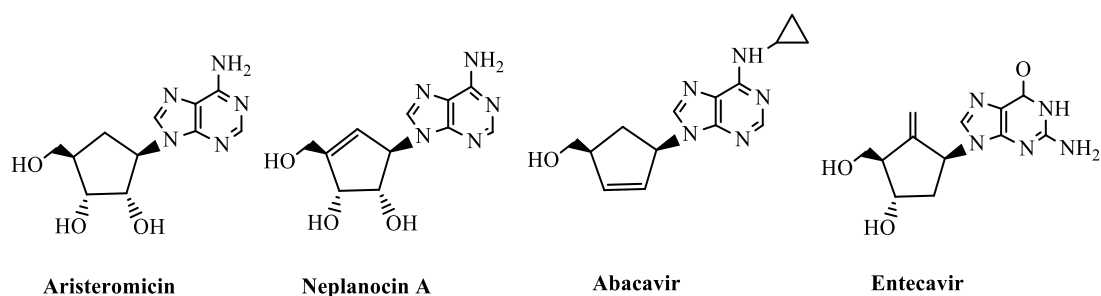
Učinkovitost nukleozidnih analoga ovisi o njihovoj sposobnosti oponašanja prirodnih nukleozida i reagiranja s virusnim i/ili staničnim enzimima (DNA-polimeraza, reverzna transkriptaza) kako bi inhibirali kritične procese u metabolizmu nukleinskih kiselina (Chang i sur., 2005). Djeluju tako da se inkorporiraju i inhibiraju sintezu DNA, specifično zaustavljaju stanični rast u S-fazi te dovode do smrti stanice induciranjem apoptoze (Wang i sur., 2011).

Nukleozidni analozi ribavirin, zidovudin (AZT), fludarabin i klofarabin su lijekovi protiv virusnih i tumorskih bolesti s modificiranim heterocikličkim bazama i/ili šećerima. Azidotimidin i gemcitabin posjeduju antibiotska svojstva i imaju sinergistički učinak djelovanja protiv visoko otporne bakterije *Staphylococcus aureus* (Malthum i sur., 2017). Stavudin (d4T) i didanozin (ddI) se koriste za liječenje AIDS-a, lamivudin (3TC) i telbivudin (LdT) za liječenje hepatitisa B, nelarabin za liječenje T-stanične akutne limfoblastične leukemije, 2-kloroadenozin za liječenje tumora prostate itd. (Slika 10) (Wang i sur., 2015). Kladrinin (2-klor-2-deoksiadenozin) je široko korišten za liječenje tumora limfe i limfnih žlijezda te ima vrlo povoljan profil toksičnosti u odnosu na druge limfocitotoksične lijekove, a njegov terapijski potencijal je nedavno proširen na autoimunoagresivne bolesti kao što je multipla skleroza (Bojarska i sur., 1999). Osim njihove klasične uporabe u onkologiji i virologiji, neki nukleozidni i nukleotidni analozi te srodni spojevi korišteni su za razne druge indikacije kao što su hiperurikemija, imunosupresija, neuroprotekcija i kardioprotekcija (Malthum i sur., 2017).



Slika 10. Lijekovi koji sadrže nukleozidne analoge Lamivudin, Stavudin i Ribavirin

Karbociklički nukleozidi su strukturno modificirani nukleozidni analozi u kojima je kisik furanoznog prstena prirodnih nukleozida zamijenjen metilenskom skupinom. Odsutnost glikozidne veze čini karbocikličke nukleozide kemijski i enzimski stabilnijima od prirodnih nukleozida. Aristeromicin i neplanocin A su analozi karbocikličkih adenzina i djeluju kao inhibitori *S*-adenozil-*L*-homocistein hidrolaze (SAH) te pokazuju antivirusnu aktivnost širokog spektra, ali s popratnom citotoksičnošću na stanici domaćina. Također, karbociklički nukleozidi koji se koriste kao selektivna antivirusna sredstva su Abacavir i Entecavir za liječenje bolesnika zaraženih HIV-om i HBV-om (Slika 11) (Wang i sur., 2018).



Slika 11. Biološki aktivni karbociklički nukleozidi

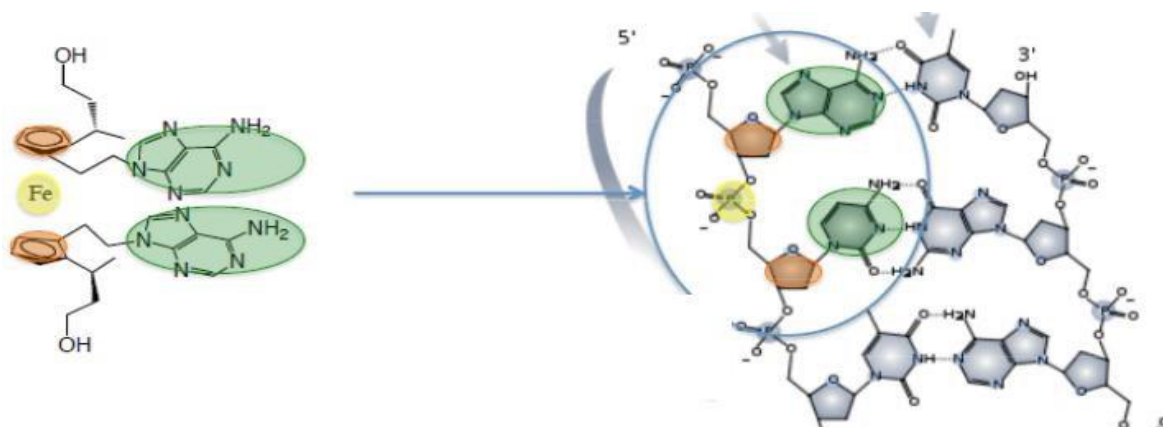
2.4 Kopulati ferocena i nukleobaza

Istraživanja interakcije ferocena s drugim biomolekulama značajna su za razumijevanje mehanizama biološke aktivnosti i za razvoj novih lijekova (Simenel i sur., 2009). Ferocen se pokazao kao odličan odabir u dizajnu novih lijekova zbog male veličine, aromatičnosti, hidrofobnosti, stabilnosti i redoks potencijala (Esparza-Ruiz i sur., 2012).

Ferocenske jedinice povezane s međusobno sparenim nukleobazama (DNA/RNA fragmenti), mogu biti korisni građevni blokovi u supramolekulskoj kemiji koja povezuje molekulsko prepoznavanje s elektrokemijom (Patwa i sur., 2008). Vežanje supstituenata na

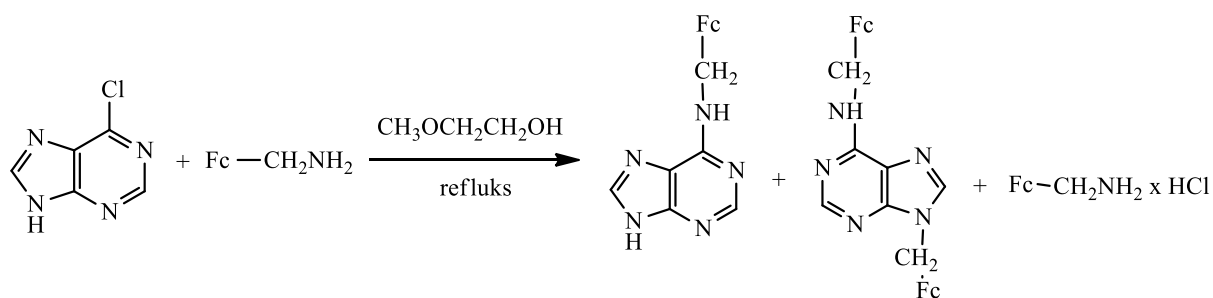
molekulu ferocena omogućeno je rotacijom ciklopentadienilnih prstenova ferocena koji poprima biološke karakteristike kada se na njega veže neka biološka molekula poput nukleobaze. Ta biološka aktivnost je sve češća tema istraživanja u kojima je prvi korak upravo sinteza biokonjugata. Ferocen se veže na dušičnu bazu kao *N*-supstituent, a mjesto na kojem se veže određuje biološka svojstva samog spoja. (Kowalski i sur., 2012)

Chen i suradnici su 1980. godine po prvi put pripravili ferocenske derivate nukleobaza odnosno pripravili su *N*-supstituirani ferocenilmetiladenin. Reakcije su provedene u vodi uz relativno niske prinose (30 %). Pripravljene biokonjugate mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom preko vodikove veze što je potvrđeno voltametrijom (Slika 12) (Chen, 1980).



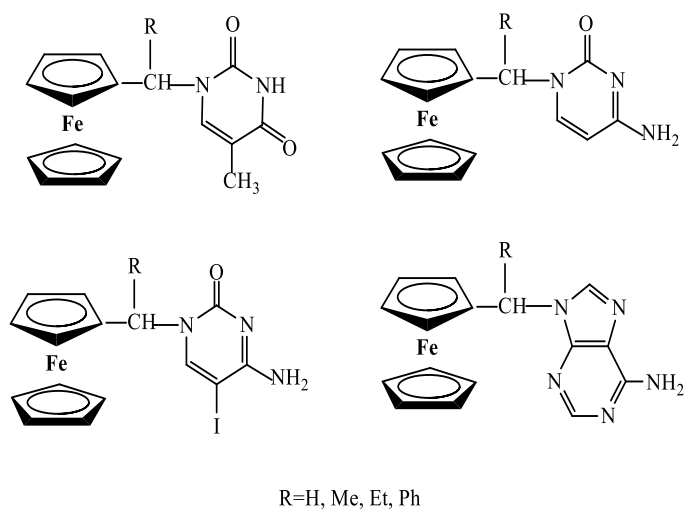
Slika 12. Primjer inkorporacije polisupstituiranog ferocena u DNA (Chen, 1980)

*N*6-ferocenilmetiladenin se može pripraviti alkilacijom adenina odgovarajućim derivatom ferocenilmetila, a također se može dobiti i reakcijom 6-kloropurina pomoću ferocenilmetilamina u metoksietanolu na temperaturi refluksa pri čemu nastaje smjesa složenih produkata. Smjesa se sastoji od očekivanog *N*6-ferocenilmetiladenina (21%), malih količina *N*6,9-bis-ferocenilmetiladenina i ferocenilmetilamin hidroklorida (Slika 13). Nastajanje sekundarnog dialkiliranog produkta *N*6,9-bisferocenilmetiladenina rezultat je nukleofilnog napada primarnog produkta *N*6-ferocenilmetiladenina na ferocenilmetilamin hidroklorid jer je poznato da je ferocenilmetilamonijeva sol reaktivni elektrofilni reagens. Reakcija adenina s (ferocenilmetil) trimetilamonijevim jodidom u vrućoj vodi daje *N*9- i *N*7-ferocenilmetiladenin (Chen, 1980).



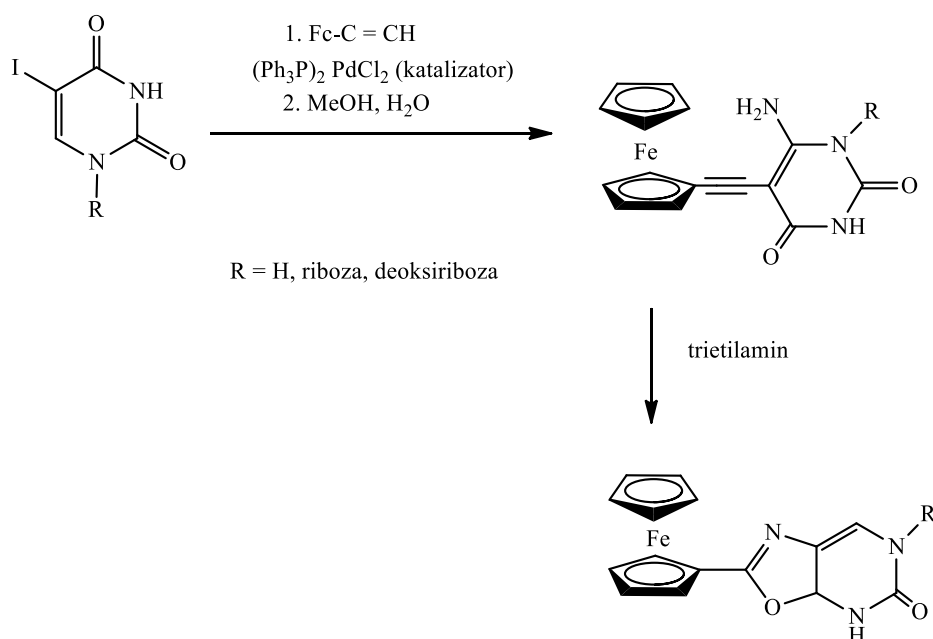
Slika 13. Reakcija derivata ferocena i derivata adenina pri čemu nastaje smjesa više produkata (*N*6-ferocenilmetiladenin, *N*6,9-bis(ferocenilmetil)adenin i ferocenilmetilamin-hidroklorid)

Ferocenilalkil nuklobaze pripravljene su reakcijom α -(hidroksi)alkil ferocena $\text{FcCHR}(\text{OH})$ (Fc = ferocenil; $\text{R} = \text{H, Me, Et, Ph}$) s različitim bazama: timinom, citozinom, 5-jod-citozinom i adeninom pri čemu se produkti dobivaju u vrlo dobrom iskorištenju od 50 do 82 % (Slika 14). Ferocenski alkoholi su slabiji u neutralnom mediju, pa su zbog toga ferocenil alkilirajući agensi više specifični od ferocenilamonijevih soli te se alkilacija ferocenil nukleobaza odvija regioselektivno (Simenel i sur., 2009).



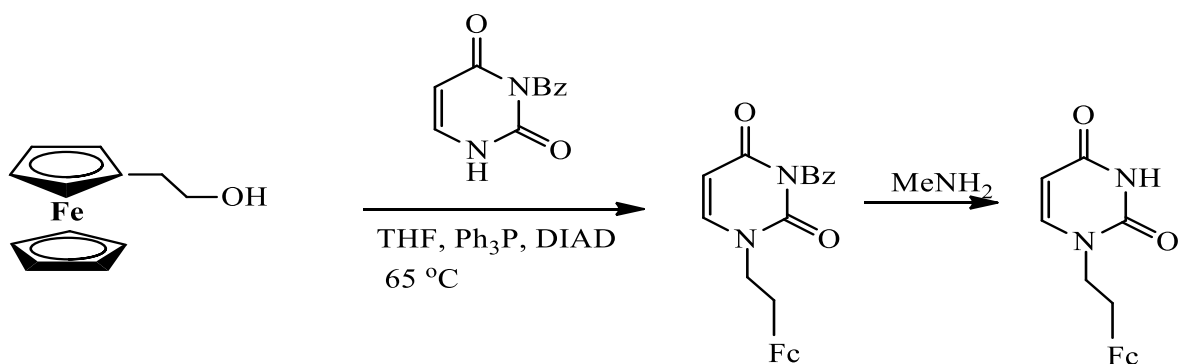
Slika 14. Strukture ferocenilalkil nukleobaza: timina, adenina, citozina i jodo-citozina

Tijekom godina je razvijeno puno uspješnih načina pripreme kopulata ferocena i nukleobaza. Jedan od njih je Songoshirina kopulativna reakcija halogenirane nukleobaze sa etilferocenom uz pomoć paladija kao katalizatora (Slika 15) (Tharamani, 2008).



Slika 15. Shematski prikaz Songoshirine kopulativne reakcije halogenirane nukleobaze s etilferocenom uz paladij kao katalizator

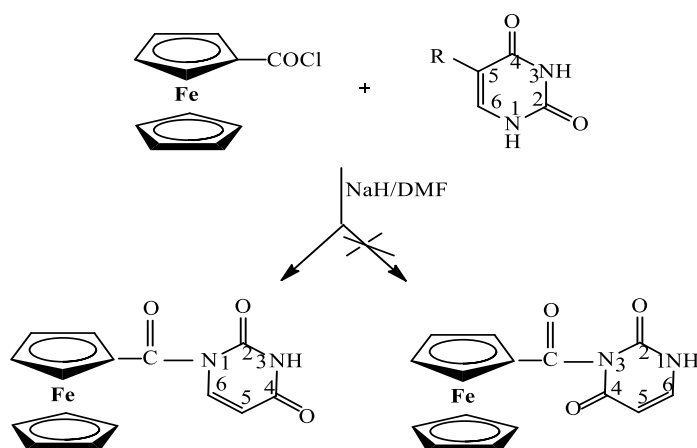
U Horner-Wadsworth-Emmons reakciji dolazi do adicije ferocenilmetilazida na nukleobaze uz bakar kao katalizator pri čemu se adeninski fosfonati adiraju na 1,1-dikarboksaldehid ferocen (Nguyen i sur., 2014). U Mitsunobu reakciji dolazi do adicije između ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze, a onda i do deprotekcije s metilaminom (Slika 16) (Patwa i sur., 2010).



Slika 16. Shematski prikaz Mitsunobu reakcije ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze

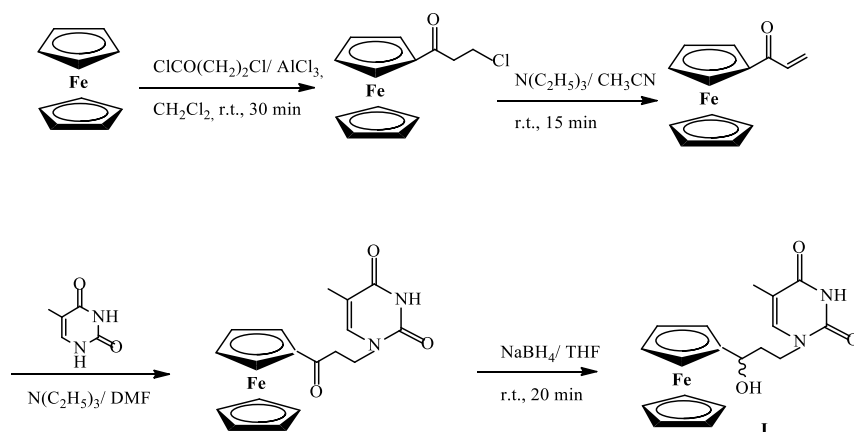
U našem laboratoriju su sintetizirani konjugati ferocena s timinom, uracilom i 5-fluoruracilom, pri čemu je kao razmaknica između ferocena i baze korištena karbonilna skupina. Kopulacijom nukleobaza i ferocenoil klorida (FcCOCl) ili ferocenoil-etil-karbonata

(FcCOOCOEt) uz deprotonirajući agens natrij hidrid (NaH) u dimetilformamidu (DMF), ferocen se regioselektivno vezao na N1-položaj pirimidinske nukleobaze bez zaštite na N3-položaju nukleobaze (Slika 17). NMR spektroskopijom i kvantno-kemijskim računima analizirana je regioselektivnost reakcije pri čemu je potvrđeno nastajanje isključivo N1-izomera. Nukleofilna supstitucija na karbonilnoj skupini ferocenoil klorida odvija se bez tetraedarskog međuprodukta prema S_N2 mehanizmu. Redoks potencijali ferocenoil nukleobaza određeni su cikličkom voltametrijom i kvantno-kemijskom metodom. Eksperimentalne (281-296 mV) i izračunate (271-293 mV) vrijednosti redoks potencijala pokazuju da su konjugati bolji oksidansi od roditeljskog ferocenskog sustava. Preliminarna ispitivanja pripremljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost (Lapić i sur., 2015; Havaić i sur. 2017).



Slika 17. Shematski prikaz regioselektivnog N1-aciliranja pirimidinskih nukleobaza (uracil, R = H; timin, R = Me; 5-fluorouracil, R = F)

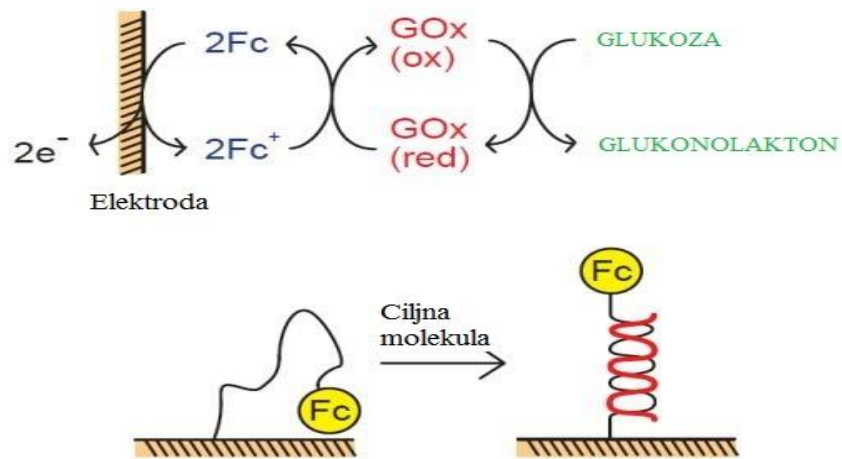
U literaturi je opisana sinteza feroceniil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (Slika 18). Ključni stupanj reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija se provodi u dimetilformamidu uz prisutnost trietilamina pri 70 °C kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH₄, dobije se aciklonukleozid uz iskorištenje od 51% (Sudhir i sur., 2009).



Slika 18. Shematski prikaz pripreve ferocenoil-timinskog derivata

Elektrokemijska svojstva pripremljenih konjugata ispitivana su cikličkom voltametrijom (CV) te je uočena reverzibilna elektronska oksidacija što je potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Zatim su ispitane antikancerogene aktivnosti pri čemu se ferocenil-timinski derivat pokazao kao aktivni agens prema staničnim linijama humanog adenokarcinoma dojke (MCF-7) i humanog T-limfoblastičnog limfoma (CCRF-CEM), dok je aciklonukleozid inaktivan (Sudhir i sur., 2009).

Osim primjene u liječenju različitih bolesti, ferocen i njegovi polimeri se mogu uspješno sastaviti u tanke filmove i nanočestice za razvoj enzimskih biosenzora visokih performansi gdje posreduju u prijenosu elektrona između elektrode i aktivnog mjesta enzima. Tipičan primjer biosenzora posredovanog ferocenom je amperometrijski senzor glukoze. Amperometrijski senzori glukoze konstruirani su imobilizacijom glukoza oksidaze (GOx) na površini metalnih ili ugljikovih elektroda, gdje je redoks reakcija ferocena povezana s oksidacijom glukoze kako bi se omogućio prijenos elektrona između aktivnog centra glukoza oksidaze i elektrode (Slika 19) (Takahashi i Anzai, 2013).



Slika 19. Prijenos elektrona na ferocen (Fc) u amperometrijskim sensorima glukoze (Takahashi i Anzai, 2013)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

Kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja, a otapalo dimetilformamid (DMF) ($t_v = 138\text{ }^\circ\text{C}$) se destilira pod vakuumom na bezvodnom magnezijevom sulfatu, te se prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4 \AA) do upotrebe. Popis nukleobaza prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih nukleobaza supstituiranih ferocenom

| Naziv | Proizvođač |
|---------------------|---------------------|
| Adenin | Alfa Aesar, SAD |
| Purin | TCI, Japan |
| 6-Metilpurin | Sigma, SAD |
| 6-Dimetilaminopurin | Sigma, SAD |
| 2,6-Diklorpurin | Acros organics, SAD |
| 2-Amino-6-klorpurin | TCI, Japan |
| 6-Metilaminopurin | Sigma, SAD |

3.2 Metode rada

Za praćenje tijeka reakcija korištena je metoda tankoslojne kromatografije. Tankoslojna kromatografija je provedena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silika gela (Merck) u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju reakcijskih smjesa i izoliranih komponenata, po potrebi je korištena UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni je provedena na silika gelu (Fluka, 0,063–0,2 nm), dok su staklene kolone punjene pod utjecajem gravitacijske sile uz eluens diklormetan/acetone. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučeni silika geloma (Merk, Kisagel 60 HF₂₅₄), dok je za mobilnu fazu korišten sustav otapala diklormetan/acetone.

Spektri ¹H-NMR i ¹³C-NMR su snimljeni na spektrometru Varian INOVA 400. Svi uzorci su otopljeni u CDCl₃ 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 su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

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

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

Najveći dio pokusa proveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini

Popis kratica:

DMAP – 4-*N,N*-dimetilaminopiridin

Boc – di-*tert*-butil-dikarbonat

DMF – dimetilformamid (*N,N*-dimetilmetanamid)

THF – tetrahidrofuran

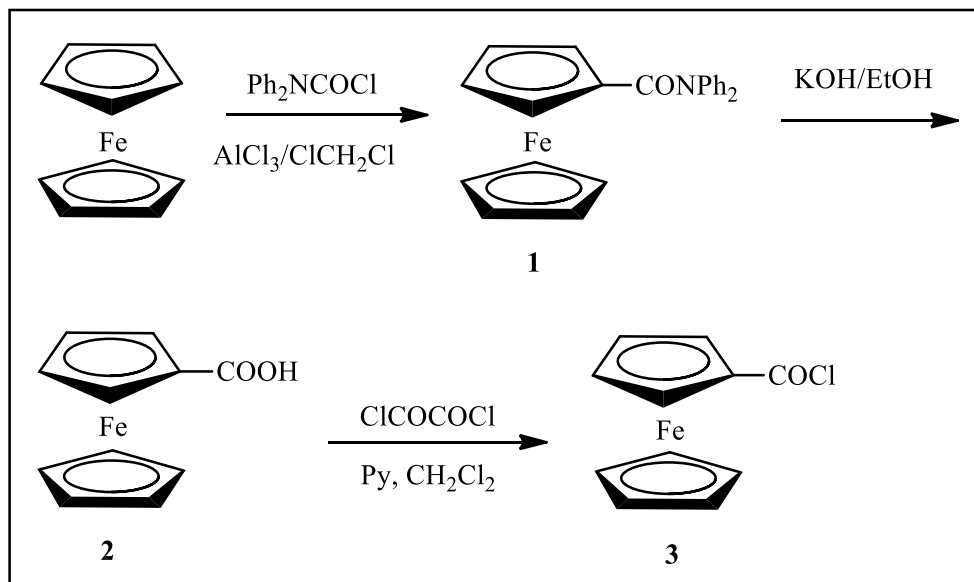
DMSO– dimetil sulfoksid

CDCl_3 – deuterirani kloroform

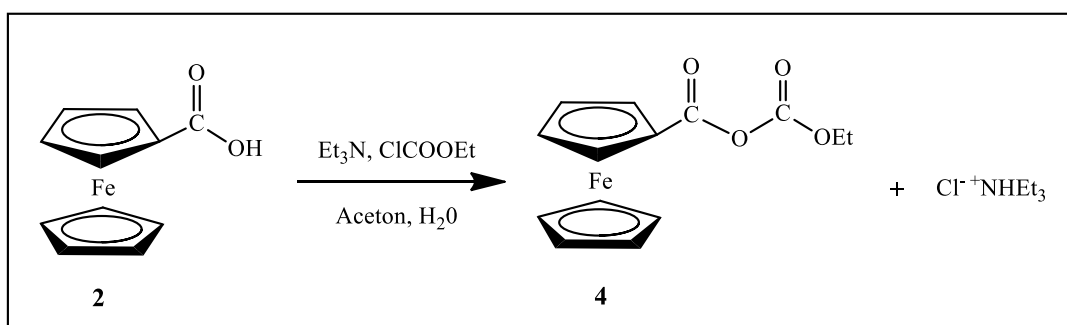
TLC – tankoslojna kromatografija

3.3 Sheme priprave kopulata ferocena i purinskih baza

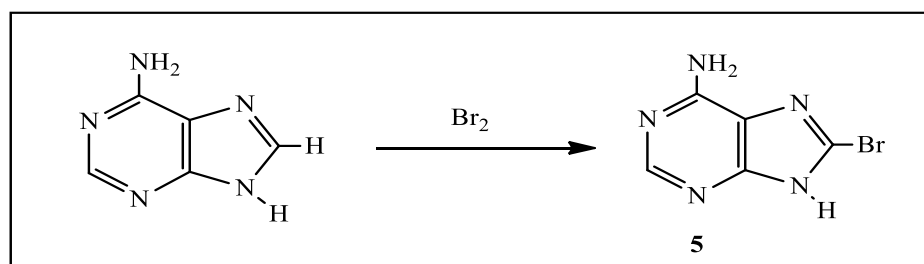
A. Priprava *N,N*-difenilferocenkarboksamida (1), ferocenkarboksilne kiseline (2) i ferocenoil-klorida (3)



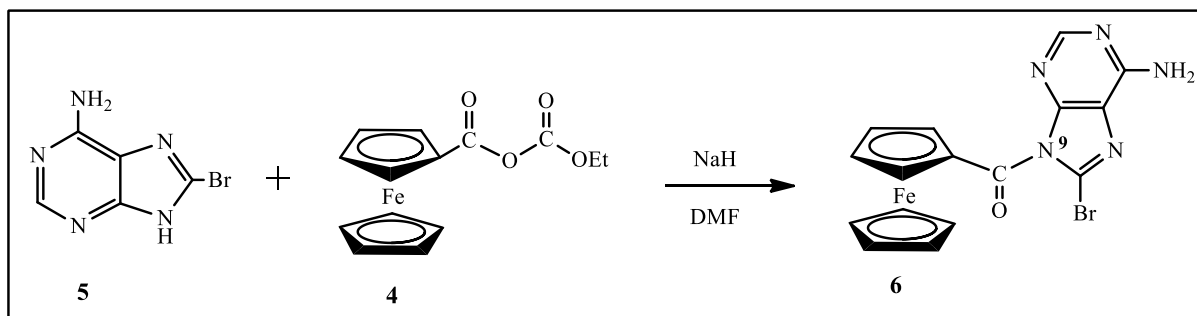
B. Priprava ferocenoil-etil-karbonata (mješoviti anhidrid) (4)



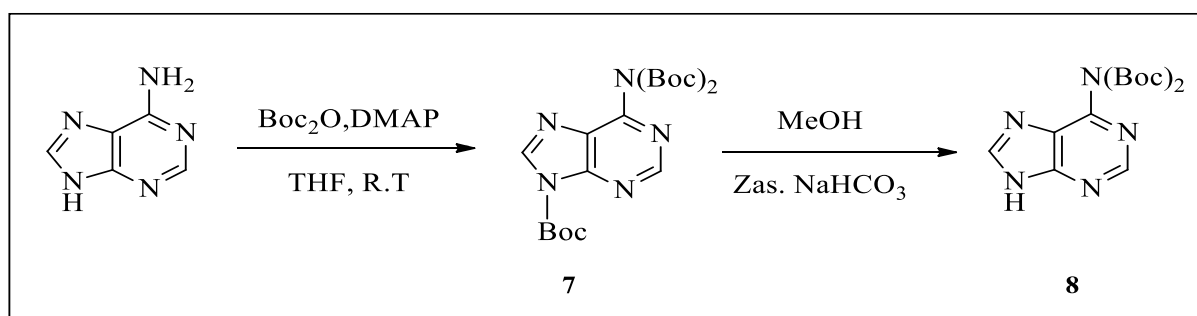
C. Priprava 8-bromadenina (5)



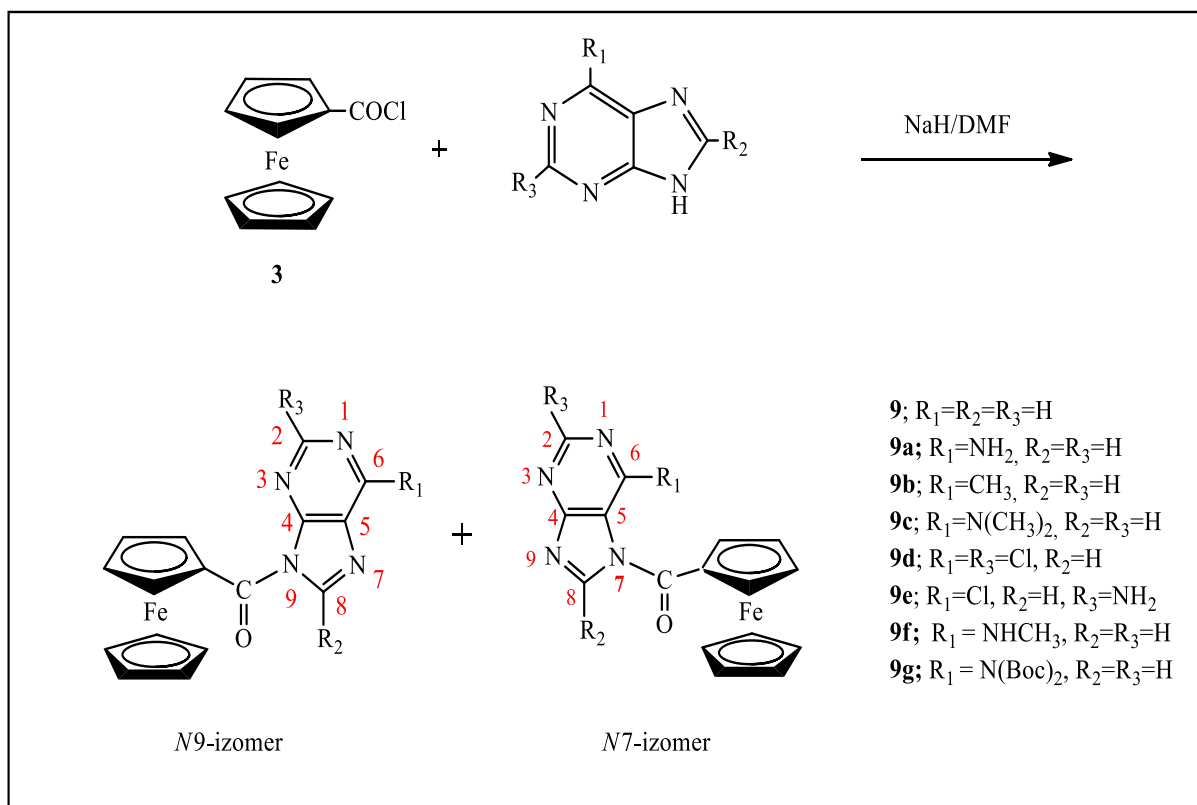
D. Priprava Ferocenoil-8-bromadenina (6)



D. Priprava tris-Boc-adenina (7) i bis-Boc-adenina (8)



F. Priprava ferocenoil-purin derivata (9 i 9a-9g)



3.4 *N,N*-difenilferocenkarboksamid (1)

Suspenciji aluminijeva klorida (AlCl_3) (3,58 g, 26,8 mmol) u suhom dikloretanu (CH_2CHCl_2) (27 mL) doda se otopina difenilkarbamoil-klorida (Ph_2NCOCl) (6,23 g, 26,8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26,8 mmol). Reakcijska smjesa refluksira se 24 sata, zatim prenese u čašu s ledom i ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom otopinom NaCl , osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **1** (8,5 g). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirova produkta pročišćeno je preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala *N,N*-difenil-ferocenkarboksamida **1**; $t_f = 179\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1642 j ($\text{C}=\text{O}$, CONPh_2), 1594 s, 1492 s.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , ppm): δ 7,39 (t, 4H, CH-Ph), 7,25 (t, 6H, CH-Ph), 4,26 (s, 5H, Fc Cp), 4,21 (d, 4H, CH-Fc).

$^{13}\text{C-NMR}$, APT (CDCl_3 , ppm): δ 171 (CONPh_2), 143,9 (2Cq, C-Ph), 129,1 (4C, CH-Ph), 127,59 (4C, CH-Ph), 126,37 (2C, CH-Ph), 76,1 (Cq-Fc), 70,1 (CH-Fc), 71,6 (CH-Fc), 69,8 (Fc-Cp).

3.5 Ferocencarboksilna kiselina (2)

Sirovi se amid **1** (8,3 g) otopi u 20 %-tnoj otopini kalijeva hidroksida (KOH) u etanolu (EtOH) (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5 %-tnoj vodenoj otopini natrijeva hidrogenkarbonata (NaHCO_3) i ekstrahira diklormetanom. Organska se faza ispere zasićenom otopinom NaCl , osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari, pri čemu je dobiveno 4,05 g neizreagiranog supstrata **1**. Zakiseljavanjem alkalne vodene faze koncentriranom klorovodičnom kiselinom (HCl) istaloži se 3,98 g (80 %) tamnožutih kristala ferocencarboksilne kiseline **2**. $t_f = 193\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$. (Sonoda i Moritani, 1971).

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

3.6 Ferocenoil-klorid (3)

Suspenciji ferocencarboksilne kiseline (**2**) (300 mg, 1,3 mmol) i svježe destiliranog oksalil klorida (0,45 mL, 3,13 mmol) u suhom CH_2Cl_2 (5 mL) doda se 1 kap piridina. Reakcijska se smjesa refluksira 2 sata te se ohladi i upari do suha. Dobiveni tamni ostatak se dva do tri puta zagrijava na $80\text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 min u petroleteru, profiltrira preko vate i upari do

suha te je dobiveno 275 mg (85 %) crvenih kristala ferocenoil-klorida (**3**) (Knobolch i Raucher, 1961).

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

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C, ppm): δ 4,9 (t, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, 2H, H ^{α}), 4,6 (t, ³J_{H,H} = 1.9 Hz, 2H, H ^{β}), 4,4 (s, 5H, Cp).

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

3.7 Ferocenoil-etil-karbonat (mješoviti anhidrid) (**4**)

Suspenzija ferocenkarkoboksilne kiseline (**2**) (400 mg, 1,75 mmol) u vodi (0,41 mL) je otopljena dodatkom acetona (7,4 mL) i ohlađena na 0 °C. Dokapavanjem je dodana otopina trietilamina (0,283 mL) u acetonu (3 mL), a zatim i otopina etil kloroformijata (0,210 mL) u acetonu (2 mL). Nakon miješanja 30 minuta, reakcijska smjesa je uparena te se pročišćavanje provodi preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz eluens diklormetan. Narančasta krutina ferocenoil-etil-karbonat **4** dobivene mase 123 mg korišten je za reakcije s purinskom bazom (Lapić i sur., 2015).

IR (CH₂Cl₂): $\tilde{\nu}$ = 2932 (w, C-H, Fc), 1770 (s, C=O), 1713 (s, C=O), 1675 (s, C=O), 1047 (s, C-O) cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C, ppm): δ 4,9 (2H, t, CH-Fc), 4,6 (2H, t, CH-Fc), 4,4 (5H, s, Fc-Cp), 4,3 (2H, q, CH₂), 1,4 (3H, t, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C, ppm): δ 167,7 (FcCO), 161,8 (CO), 72,7 (C₂), 70,8 (C₄), 70,2 (Cp), 69,3 (Ci), 61,2 (CH₂), 14,3 (CH₃).

3.8 8-Bromadenin (**5**)

Adenin (500 mg, 3,7 mmol) se pomiješa s 1,52 mL broma (4,73 g, 29,6 mmol) te se reakcijska smjesa ostavi u začepljenoj tikvici 5 sati. Višak broma se ukloni, a ostatak se suspendira u vodi te se prvo alkalizira vodenom otopinom amonijaka, a onda i neutralizira s octenom kiselinom. Preko Büchnerovog lijevka se provede odsisavanje te se istaložena čvrsta tvar odfiltrira i ispere vodom. Zatim se provede prekrizalizacija i sirova krutina se odfiltrira iz vruće suspenzije u vodi i ispere uzastopce s vodom, acetonom i eterom pri čemu je dobiveno 488,6 mg (61,75%) žutog produkta 8-bromadenina **5** (Janeba i sur., 2000).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 13,63 (1H, s, NH), 8,086 (1H, t, H2), 7,433 (2H, s, NH₂).

3.9 Ferocenoil-8-bromadenin (6)

8-Bromadenin se suspendira u DMF-u i deprotonira dodatkom NaH te se 30 minuta miješa na 80 °C. Reakcijskoj smjesi se dodaje mješoviti anhidrid (4) te se ostavi na miješanju tijekom noći na temperaturi 60 °C. Ekstrakcija reakcijske smjese se provodi s diklormetanom i vodom, a pročišćavanje na pločama od silikagela uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 5:1 pri čemu je dobiveno 2 mg (0,02 %, $R_f = 0.4579$) crvenog produkta ferocenoil-8-bromadenina 6.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 8,08 (2H, s, H2), 7,61 (2H, s, NH₂), 4,85 (2H, t, CH-Fc), 4,83 (2H, t, CH-Fc), 4,44 (5H, s, Fc-Cp).

3.10 Tris-Boc-adenin (7)

Adeninu (500 mg, 3,7 mmol) i DMAP-u (45,2 mg, 0,37 mmol) se dodaje 20-25 mL THF-a kroz lijevak za dopunjavanje tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi te se dodaje Boc₂O (3,2 g, 14,8 mmol). Reakcijska smjesa je bistra i žuta nakon 2,5 sata te se ostavi na miješanju na sobnoj temperaturi tijekom noći, a onda se 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 Na₂SO₄, profilira kroz filter papir te upari do suha pri čemu zaostaje žuto-narančasti uljasti spoj tris-Boc-adenin 7 (Dey i Garner, 2000).

3.11 Bis-Boc-adenin (8)

Bis-Boc-adenin 8 (1,62 g, 3,7 mmol) se resuspendira u 37 mL metanola i 17 mL zasićene otopine NaHCO₃. 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 vodi i ekstrahira tri puta s diklormetanom. Organski slojevi se spoje, osuše bezvodnim Na₂SO₄ te upare do suha pri čemu zaostaje bijelo-žuta krutina produkta bis-Boc-adenina 8 koja se pročišćava na pločama od silikagela u etil-acetatu kao mobilnoj fazi ($R_f = 0.48$) (Dey i Garner, 2000).

3.12 Ferocenoil-purin (9)

Purin (38 mg, 0,316 mmol) i NaH (11,38 mg, 0,474 mol) u DMF-u miješaju se na sobnoj temperaturi 60 minuta, pri čemu nastaje natrijeva sol purina. Ferocenoil-klorid (3) (100 mg, 0,405 mmol) se uz miješanje dodaje reakcijskoj smjesi koja se stavi u led. Nakon 20 minuta,

slijedi neutralizacija s 10 % otopinom limunske kiseline te ekstrakcija s diklormetanom. Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u sustavu otapala diklormetan/acetone 5:1, a za detekciju je izoliranih komponenata korištena UV lampa ($\lambda=254$ nm). Na TLC pločici vide se dvije mrlje: narančastocrvena mrlja *N7*-kopulata ($R_f=0,45$) te crvena mrlja *N9*-kopulata ($R_f=0,63$). Organski sloj se ispere vodom do neutralnog, profiltrira preko lijevka i vate te upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročišćava kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 10:1, a zatim 5:1. Praćenjem reakcije na pločici uočili smo dvije crvene mrlje, ali smo uspjeli izolirati samo 50,4 mg (48,17 %) crvenih kristala produkta *N9*-ferocenoil-purina **9**.

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 9,57 (1H, s, H2), 9,25 (1H, s, H6), 9,18 (1H, s, H8), 4,99 (2H, t, CH-Fc), 4,76 (2H, t, CH-Fc), 4,34 (5H, s, Fc-Cp).

^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 169,24 (C=O), 160,93 (C6), 154,71 (C4), 148,78 (C2), 144,75 (C8), 73,89 (CH-Fc), 72,11 (Cq, Fc), 71,28 (CH-Fc), 71,09 (Fc-Cp).

3.13 Kopulati ferocena i purinskih derivata (9a-9g)

Opći postupak: Suspenzija purinskih derivata (0,405 mmol) i NaH (0,607 mmol) u DMF-u (1,5 mL) se miješa pri čemu nastaje natrijeva sol purinskih baza. Ferocenoil-klorid (0,526 mmol) (**3**) se uz miješanje doda reakcijskoj smjesi. Nakon 20 minuta, reakcijska smjesa se neutralizira dodatkom 10 % otopine limunske kiseline ili natrijevog karbonata, te ekstrahira diklormetanom. Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (acetone, diklormetan/acetone, diklormetan/etil-acetat), a za detekciju izoliranih komponenata je korištena UV lampa ($\lambda=254$ nm). Sirovi produkt se pročišćava kromatografijom na koloni i/ili pločama silikagela uz odgovarajući eluens.

3.13.1 Ferocenoil-adenin (9a)

Reakcija deprotekcije adenina provodi se tijekom 30 minuta pri sobnoj temperaturi te slijedi kopulacija i obrada reakcijske smjese. Na TLC pločici (diklormetan/etil-acetat 10:1) nakon obrade reakcijske smjese su uočene tri mrlje: žuta mrlja raspada ($R_f=0,12$), narančastocrvena mrlja *N7*-kopulata ($R_f=0,36$) te crvena mrlja *N9*-kopulata ($R_f=0,65$). Pročišćavanje reakcijske smjese se provodi na koloni silikagela uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 1:3 i čisti acetone. Dobiveno je 9,71 mg (19 %) crvenonarančastih kristala *N7*-ferocenoil-adenina i izrazito crvenih

kristala 22,64 mg (42 %) *N*9-ferocenoil-adenina **9a** (Slika 20). Tijekom izolacije dolazi do pregradnje iz jednog u drugi izomer.

***N*9-ferocenoil-adenin**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, ppm): δ 8,65 (1H, s, H8), 8,19 (1H, s, H2), 7,52 (2H, s, NH₂), 5,01 (2H, s, CH-Fc), 4,76 (2H, s, CH-Fc), 4,31 (5H, s, Fc-Cp).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, ppm): δ 169,69 (CO), 156,78 (C6), 154,12 (C2), 149,65 (C4), 139,88 (C8), 119,22 (C5), 74,03 (CH-Fc), 72,71 (CH-Fc), 71,04 (Cq-Fc), 70,21 (Fc-Cp).

***N*7-ferocenoil-adenin**

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, ppm): δ 9,06 (1H, s, H8), 8,37 (1H, s, H2), 7,7 (2H, s, NH₂), 5,12 (2H, s, CH-Fc), 4,87 (2H, s, CH-Fc), 4,36 (5H, s, Fc-Cp).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, ppm): δ 171,11 (CO), 161,09 (C6), 155,06 (C2), 152,65 (C4), 146,67 (C8), 109,26 (C5), 74,37 (CH-Fc), 72,66 (CH-Fc), 71,59 (Cq-Fc), 71,59 (Fc-Cp).

3.13.2 Ferocenoil-6-metilpurin (*9b*)

Reakcija deprotekcije 6-metilpurina i NaH u DMF-u provodi se na temperaturi 50 °C. Nakon 90 minuta, slijedi kopulacija u ledenoj kupelji i obrada. Na TLC pločici vide se dvije mrlje: narančastocrvena mrlja *N*7-kopulata ($R_f = 0,44$) i crvena mrlja *N*9-kopulata ($R_f = 0,62$). Pročišćavanje se provodi kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/acetom u omjeru 10:1, a zatim 5:1 te na kraju samo acetonom pri čemu je dobiveno 16,2 mg (30,28 %) crvenih kristala produkata *N*9-ferocenoil-6-metilpurina i jako malo *N*7-ferocenoil-6-metilpurina **9b**. Tijekom izolacije dolazi do pregradnje iz jednog u drugi izomer (Slika 20).

***N*9-ferocenoil-6-metilpurin**

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 9,03 (1H, s, H2), 8,86 (1H, s, H8), 5,04 (2H, t, CH-Fc), 4,82 (2H, t, CH-Fc), 4,33 (5H, s, Fc-Cp), 2,77 (3H, s, CH₃).

***N*7-ferocenoil-6-metilpurin**

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 9,14 (1H, s, H2), 8,98 (1H, s, H8), 5,09 (2H, t, CH-Fc), 4,86 (2H, t, CH-Fc), 4,39 (5H, s, Fc-Cp), 2,73 (3H, s, CH₃).

3.13.3 Ferocenoil-6-dimetilaminopurin (9c)

6-dimetilaminopurin se deprotonira s NaH u DMF-u. Nakon 30 minuta miješanja na sobnoj temperaturi, ferocenoil-klorid (**3**) se dodaje u reakcijsku smjesu te se nakon 10 minuta ponovno dodaje u istoj količini uz 1/2 kapi piridina. Reakcijska smjesa se ekstrahira prema općem postupku. Pročišćavanje se provodi kolonskom kromatografijom, a zatim i na pločama uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 5:1 pri čemu je dobiveno 26,1 mg (49,7 %, $R_f = 0,43$) crvenih kristala produkta *N*9-ferocenoil-6-dimetilaminopurina **9c** (Slika 20). Na TLC pločici je uočeno nastajanje i *N*7-izomera, ali ga nismo uspjeli izolirati.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 8,66 (1H, s, H2), 8,26 (1H, s, H8), 4,98 (2H, t, CH-Fc), 4,79 (2H, t, CH-Fc), 4,32 (5H, s, Fc-Cp).

3.13.4 Ferocenoil-2,6-diklorpurin (9d)

2,6-diklorpurin i NaH u DMF-u se miješaju pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Kopulacija i obrada reakcijske smjese se provode prema općem postupku, a pročišćavanje na koloni od silikagela uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 70:1 pri čemu je dobiveno 120 mg (68,27 %, $R_f = 0,56$) crvenih kristala produkta *N*9-ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d** (Slika 20).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 9,19 (1H, s, H8), 5,06 (2H, t, CH-Fc), 4,87 (2H, t, CH-Fc), 4,36 (5H, s, Fc-Cp).

3.13.5 Ferocenoil-2-amino-6-klorpurin (9e)

2-amino-6-klorpurin i NaH u DMF-u se miješaju pri sobnoj temperaturi. Nakon 30 minuta, slijedi kopulacija i obrada prema općem postupku. Pročišćavanje se provodi kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 5:1 pri čemu je dobiveno 87,8 mg (34 %, $R_f = 0,46$) crvenih kristala produkta *N*9-ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e** (Slika 20).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 8,60 (1H, s, H8), 7,17 (2H, s, NH₂), 5,01 (2H, t, CH-Fc), 4,80 (2H, t, CH-Fc), 4,34 (5H, s, Fc-Cp).

3.13.6 Ferocenoil-6-metilaminopurin (9f)

6-metilaminopurin i NaH u DMF-u se miješaju pri sobnoj temperaturi 30 minuta. Kopulacija se provodi 15 minuta nakon koje slijedi obrada prema općem postupku. Tankoslojnom kromatografijom je utvrđeno da nastaju dva produkta koja su se raspala prilikom

pročišćavanja na pločama od silikagela uz eluens aceton, a zatim i uz diklormetan/aceton u omjeru 5:1 tako da nemamo iskorištenje ni NMR podatke čistih kopulata *N*9- i *N*7-ferocenoil-6-metilaminopurina **9f**.

3.13.7 *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenin (**9g**)

Bis-Boc-adenin i NaH u DMF-u se miješaju na temperaturi 50 °C tijekom 60 minuta. Kopulacija se provodi 2,5 sata na 0 °C te se ekstrahira prema općem postupku. Pročišćavanje se provodi kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/etil-acetat u omjeru 10:1 uz postepeno povećanje polarnije komponente pri čemu je izolirano 22 mg (72 %, $R_f = 0,56$) crvenog uljastog produkta *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenina **9g** (Slika 20).

^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz, 25 °C, ppm): δ 9,13 (1H, s, H2), 8,95 (1H, s, H8), 5,04 (2H, t, CH-Fc), 4,85 (2H, t, CH-Fc), 4,33 (5H, s, Fc-Cp), 1,4 (18H, s, 6xCH₃)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz, 25 °C, ppm): δ 168,75 (C=O), 153,05 (C6), 150,34 (C4), 145,48 (C2), 128,43 (C8), 84,15 (CH-Fc), 74,64 (Cq, Fc), 72,53 (CH-Fc), 71,13 (Fc-Cp), 27,73 (CH₃)

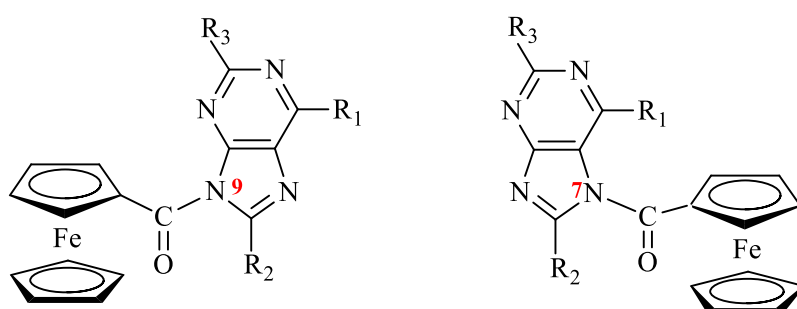


Slika 20. Kromatografska kolona na stupcu od silikagela pri pročišćavanju purinskih derivata

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Uvod

Nukleozidni analozi uključuju citotoksične spojeve, antivirusna sredstva i imunosupresivne molekule te pokazuju značajnu biološku aktivnost i elektrokemijska svojstva (Mikhailopulo i Miroshnikov, 2010). Ferocen pokazuje dobru membransku permeabilnost, nisku toksičnost i antitumorsko djelovanje čime je omogućena primjena kopulata ferocena i nukleozida/nukleobaza u biologiji, farmaciji te drugim znanostima (Kowalski, 2016). S obzirom na važna svojstva takvih kopulata, cilj ovog diplomskog rada je priprava i spektroskopska karakterizacija organometalnih derivata nukleobaza (OrDeN), biokonjugata ferocena i purina **9**, odnosno derivata purina **6** i **9a-9g** s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 21). Karbonilna skupina je uvedena kao poveznica dvaju fragmenata (organometalnog i heterocikličkog aromatskog sustava) te osim što definira prostornu relaciju, omogućuje i elektronsku komunikaciju tih fragmenata. To je zapravo najkraći molekularni most koji omogućuje produženu konjugaciju između dva funkcionalna dijela OrDeN-a.



6; $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = \text{Br}$, $R_3 = \text{H}$

9; $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$

9a; $R_1 = \text{NH}_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

9b; $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

9c; $R_1 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

9d; $R_1 = R_3 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{H}$

9e; $R_1 = \text{Cl}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NH}_2$

9f; $R_1 = \text{NHCH}_3$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

9g; $R_1 = \text{N}(\text{Boc})_2$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

Slika 21. Biokonjugati ferocena i derivata purina

Kako bi se oponašala prirodna struktura nukleozida i očuvala potencijalna biološka aktivnost pripremljenih spojeva, ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na N9 položaju purinske nukleobaze gdje se prirodno nalazi vezana šećerna komponenta. U nekim reakcijama

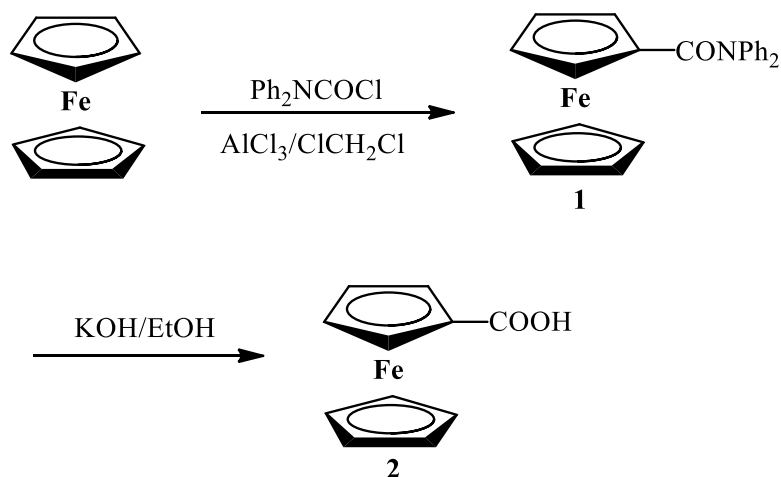
na nezaštićenom purinu sa supstratima za aciliranje nastaje smjesa *N*7- i *N*9- produkata. Svrha ovog rada je ispitati utjecaj skupine/atoma vezanog na purinsku bazu na regioselektivnost reakcija kopulacije te praćenje tih reakcija NMR spektroskopijom.

Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu intermedijera ferocenoil klorida (**3**)/mješovitog anhidrida (**4**) te kopulata ferocena i purinskih baza. S obzirom da purinske baze u svojoj strukturi sadrži dušikove atome različite kiselosti i reaktivnosti, očekivan je nastanak različitog udjela *N*7/*N*9 izomera s obzirom na supstituciju na položaju C6 i C2 purinske baze, te amino skupine adenina. U drugom je dijelu rada posebna pažnja usmjerena na praćenje regioselektivnosti kopulacije *in situ* tehnikom NMR spektroskopije s ciljem određivanja udjela *N*7/*N*9 izomera nastalih tijekom ovih reakcija.

4.2 Sinteza i spektroskopska analiza prekursora

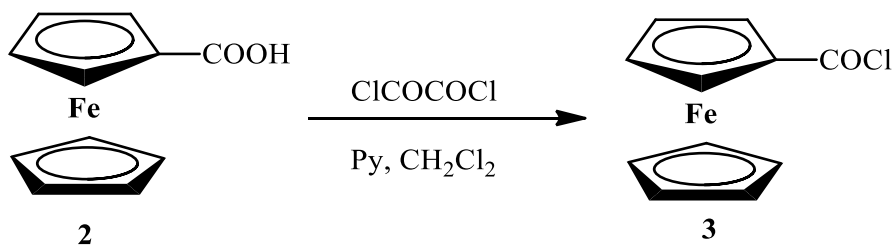
Sinteza ključnog intermedijara, ferocenoil-klorida (**3**), započinje karbamoiliranjem ferocena s difenilkarbomil kloridom (Ph₂NCOCl) u prisutnosti aluminijskog klorida (AlCl₃) pri čemu nastaje *N,N*-difenilferocencarboksamid (**1**) uz 60 %-tno iskorištenje nakon pročišćavanja tankoslojnom preparativnom kromatografijom. Hidrolizom spoja **1** u etanolnoj otopini kalijeva hidroksida nastaje kao tamnožuta kristalinična tvar ferocencarboksilna kiselina (**2**) u iskorištenju od 80 % (Slika 22) (Sonoda i Moritani, 1971).

Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru *N,N*-difenilferocencarboksamida (**1**) prisutni su signali pri 1642 i 1594 cm⁻¹ koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida, dok je u IR spektru spoja **2** vidljiva široka apsorpcijska vrpca pri 3089 cm⁻¹ koja odgovara frekvenciji istežanja hidroksilne skupine asocirane intermolekulskim vodikovim vezama. U spektrima spoja **2** također je prisutna vrpca karakteristična za karbonilnu skupinu pri 1657 cm⁻¹. ¹H-NMR spektar amida (**1**) snimljen u CDCl₃ sadrži kemijske pomake pri δ 7,39 i 7,25 ppm koji se pripisuju fenilnim protonima i kemijske pomake karakteristične za ferocenske protone.



Slika 22. Shematski prikaz priprave ferocenkarboksilne kiseline **2**

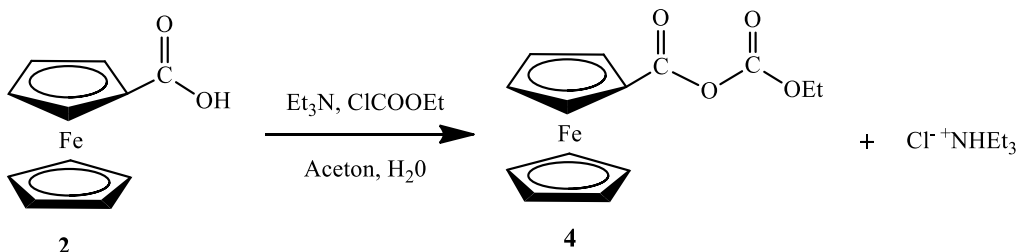
U nastavku je pripremljen ključni intermedijer ferocenoil-klorid (**3**) reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (**2**) i oksalil-klorida u suhom diklormetanu uz prisutnost piridina. Reakcija se završava višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta. Ferocenoil-klorid (**3**), crvena kruta tvar, dobiven je u iskorištenju od 85 % (Slika 23) (Knobolch i Raucher, 1961).



Slika 23. Shematski prikaz priprave ferocenoil-klorida **3**

U IR spektru klorida **3** assignirana je apsorpcijska vrpca karakteristična za kiselinske kloride pri 1755 cm^{-1} , a u ^1H NMR spektru prisutni su kemijski pomaci monosupstituiranog ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od δ 4,38 do 4,91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta. U ^{13}C NMR spektru uz ferocenske ugljikove atome prisutan je i kemijski pomak karakterističan za karbonilnu skupinu pri δ 178 ppm.

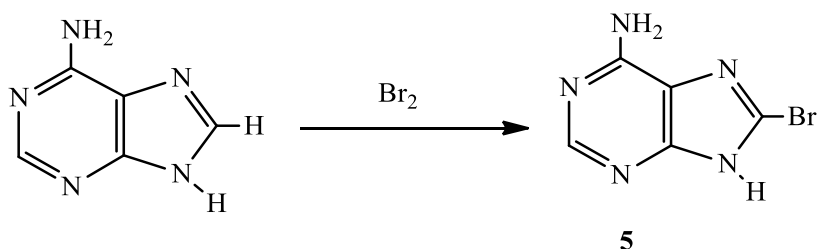
Intermedijer ferocenoil-etil-karbonat (mješoviti anhidrid, **4**) pripremljen je otapanjem ferocenkarkobosilne kiseline **2** u vodi i acetonu nakon čega su dodane acetonske otopine trietilamina i etil-kloroformijata (Slika 24) (Lapić i sur., 2015).



Slika 24. Shematski prikaz priprave mješovitog anhidrida **4**

U IR spektru mješovitog anhidrida **4**, signali pri 1770 i 1713 cm^{-1} odgovaraju karbonilnim skupinama anhidrida i estera. U ^1H NMR spektru snimljenom u CDCl_3 , vidljivi su kemijski pomaci ferocenskih protona pri δ 4,9 i 4,6 ppm, te pri δ 4,4 ppm CH protoni nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena. Etoksi skupina je potvrđena kemijskim pomakom metinskih protona pri δ 4,3 ppm te metilne skupine pri δ 1,4 ppm. U ^{13}C NMR spektru prisutni su kemijski pomaci karakteristični za karbonilne skupine pri δ 167,7 i 161,8 ppm, signali uz ferocenske ugljikove atome pri δ 72,7, 70,8, 70,2 i 69,3 ppm te etoksi skupine pri δ 61,2 i 14,3 ppm.

Prekursor 8-bromadenin (**5**) pripremljen je reakcijom adenina i broma. Višak broma se ukloni, a ostatak se suspendira u vodi te se prvo alkalizira vodenom otopinom amonijaka, a onda i neutralizira s octenom kiselinom. Nakon pročišćavanja sirovog produkta prekrizalizacijom u vrućoj vodi dobiveni su žuti kristali 8-bromadenina (**5**) u vrlo dobrom iskorištenju (Slika 25) (Janeba i sur., 2000).

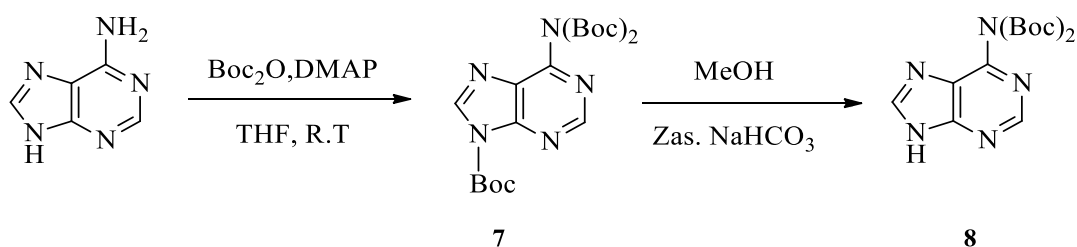


Slika 25. Shematski prikaz priprave 8-bromadenina **5**

Struktura 8-bromadenina (**5**) potvrđena je NMR spektroskopijom. ^1H -NMR spektar snimljen u $\text{DMSO}-d_6$ sadrži singlet pri δ 13,63 ppm pripisan protonu NH skupine adenina i

triplet pri δ 8,09 ppm koji odgovara protonu na položaju C2. Protoni amino skupine adenina su prisutni kao singlet pri δ 7,43 ppm.

Sinteza prekursora bis-Boc-adenina (**8**) provodi se u dva reakcijska stupnja. U prvom stupnju se uvodi Boc-zaštita na amino skupine adenina uz Boc_2O u prisutnosti DMAP-a i THF-a pri čemu je u kvantitativnom iskorištenju izoliran tris-Boc-adenin (**7**). U drugom stupnju provodi se deprotekcija Boc-zaštite s N1-položaja tris-Boc-adenina uz metanolnu otopinu natrijeva hidrogenkarbonata pri čemu je dobiven sirovi bis-Boc-adenin (**8**) koji je pročišćen preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz etil-acetat kao eluens (Slika 26) (Dey i Garner, 2000).



Slika 26. Shematski prikaz priprave bis-Boc-adenina **7**

4.3 Sinteza i spektralna analiza biokonjugata ferocena i derivata purina

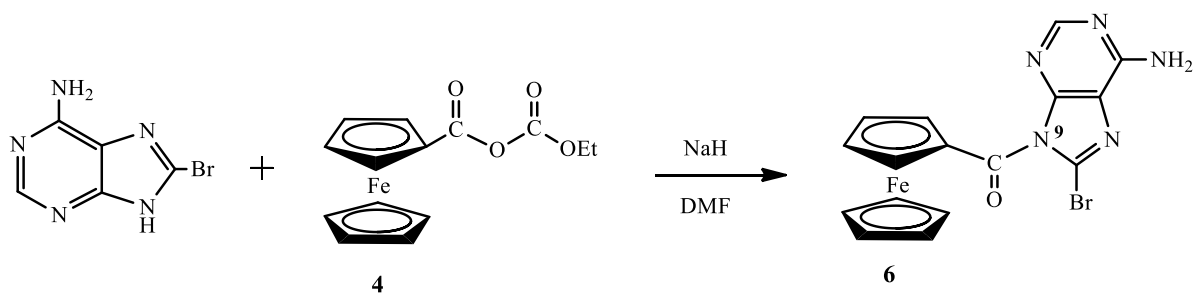
Nastavak istraživanja opisanih u ovom diplomskom radu posvećen je pripravi biokonjugata ferocena i purina, odnosno derivata purina. Dušikovi su atomi purinskih baza donori elektrona što omogućuje vezanje ferocena na molekulu purina te je posebna pozornost usmjerena na regioselektivnost provedenih reakcija.

U ovom diplomskom radu pozornost je usmjerena na regioselektivnost reakcija upotrebom natrijevog hidrida kao deprotonirajućeg agensa, a reakcije se provode u suhom dimetilformamidu (DMF) te ovisno o korištenoj nukleobazi razlikuje se vrijeme i temperatura deprotekcije kao i vrijeme i temperatura kopulacije. Deprotekcija baze provedena je natrijevim hidridom u DMF-u pri čemu nastaje natrijeva sol purinske baze, odnosno aktivirana nukleobaza. Slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ferocenoil-klorida (**3**) ili mješovitog anhidrida (**4**) koja se odvija prilično brzo uz jasnu promjenu boje reakcijske smjese iz crvene u narančasto žutu. Natrijeva sol baze, zbog pozitivnog naboja na natriju i negativnog na dušikovom atomu, jak je nukleofil u reakciji kopulacije s ferocenoil-kloridom (**3**) odnosno mješovitim anhidridom (**4**) što upućuje na $\text{S}_{\text{N}}\text{Ac}$ mehanizam. Produkti su pročišćeni kolonskom

kromatografijom ili na silikagel pločama uz eluense različite polarnosti pri čemu tijekom ovog postupka dolazi do velikih gubitaka radi vrlo slabe topljivosti sirovog produkta u ispitanim organskim otapalima.

4.3.1 Ferocenoil-8-bromadenin (6)

Ferocenoil-8-bromadenin (**6**) dobiva se aktivacijom 8-bromadenina (Slika 27), a zatim kopulacijom dobivene soli s mješovitim anhidridom (**4**). Čišćenje se provodi na kromatografskoj koloni uz eluens diklormetan/aceton u omjeru 5:1 pri čemu se dobije crveni produkt *N*9-ferocenoil-8 bromadenin (**6**) u vrlo niskom iskorištenju.

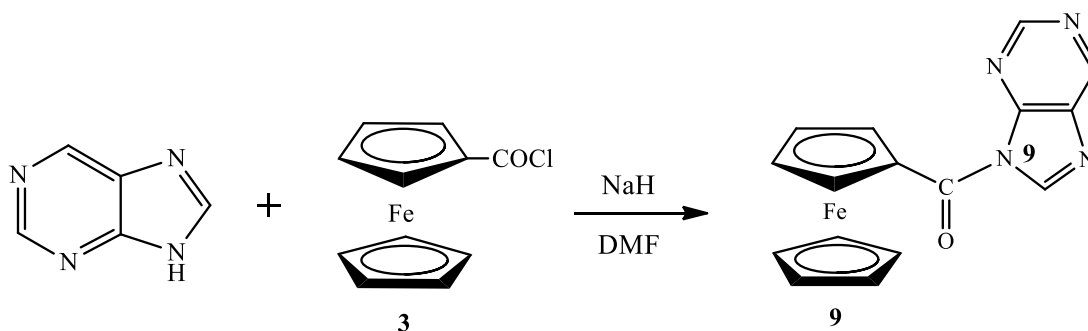


Slika 27. Shematski prikaz pripreve ferocenoil-8-bromadenina **6**

U ^1H NMR spektru kopulata *N*9-ferocenoil-8-bromadenina **6** snimljenom u $\text{DMSO-}d_6$, kemijski pomak pri δ 8,08 ppm odgovara protonima na C2 položaju purinskog prstena, dok kemijski pomak pri δ 7,61 ppm potvrđuje prisutnost dva protona amino skupine na položaju C6 purinskog prstena. U ^1H NMR spektru spoja **6** vidljivi su i kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen pri δ 4,85 i 4,83 ppm koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak pri δ 4,44 ppm potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.

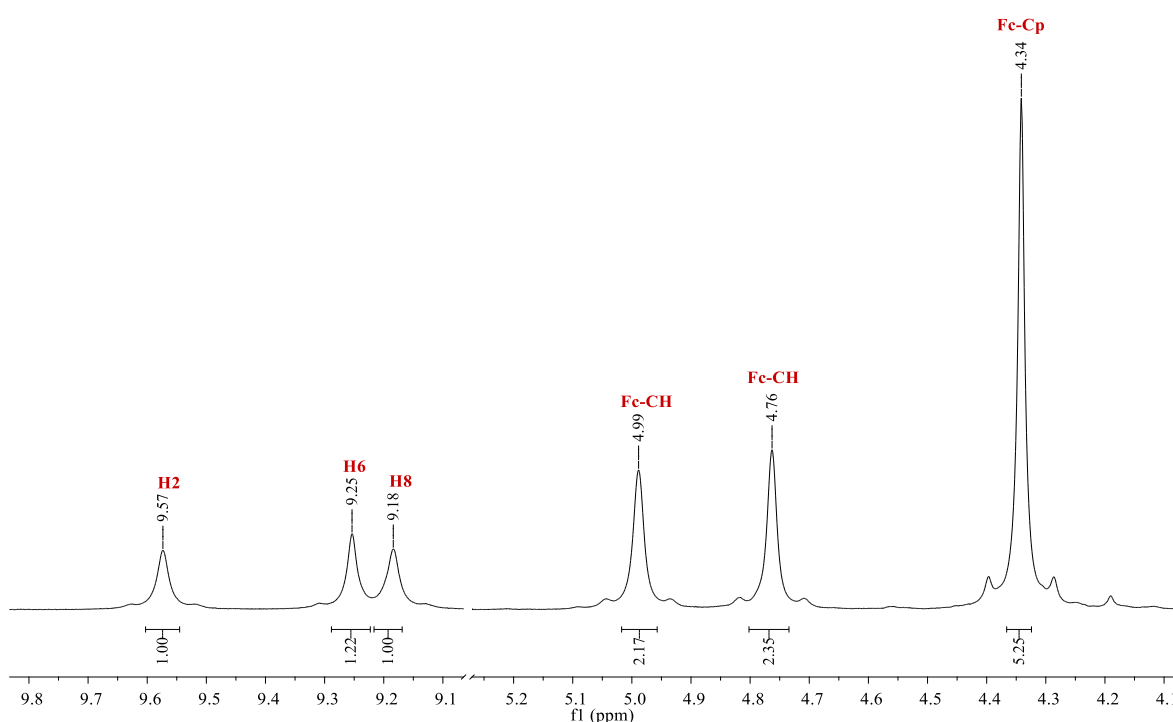
4.3.2 Ferocenoil-purin (9)

*N*9-ferocenoil-purin **9** priprema se kopulacijom purina i ferocenoil-klorida (**3**) (Slika 28). Dobiveni sirovi produkt se pročišćava na kromatografskoj koloni uz eluens diklormetan/aceton u omjeru 10:1, te promjenom polarnosti eluensa na 5:1 pri čemu je izoliran samo produkt *N*9-ferocenoil-purin **9** u dobrom iskorištenju.



Slika 28. Shematski prikaz priprave ferocenoil-purina **9**

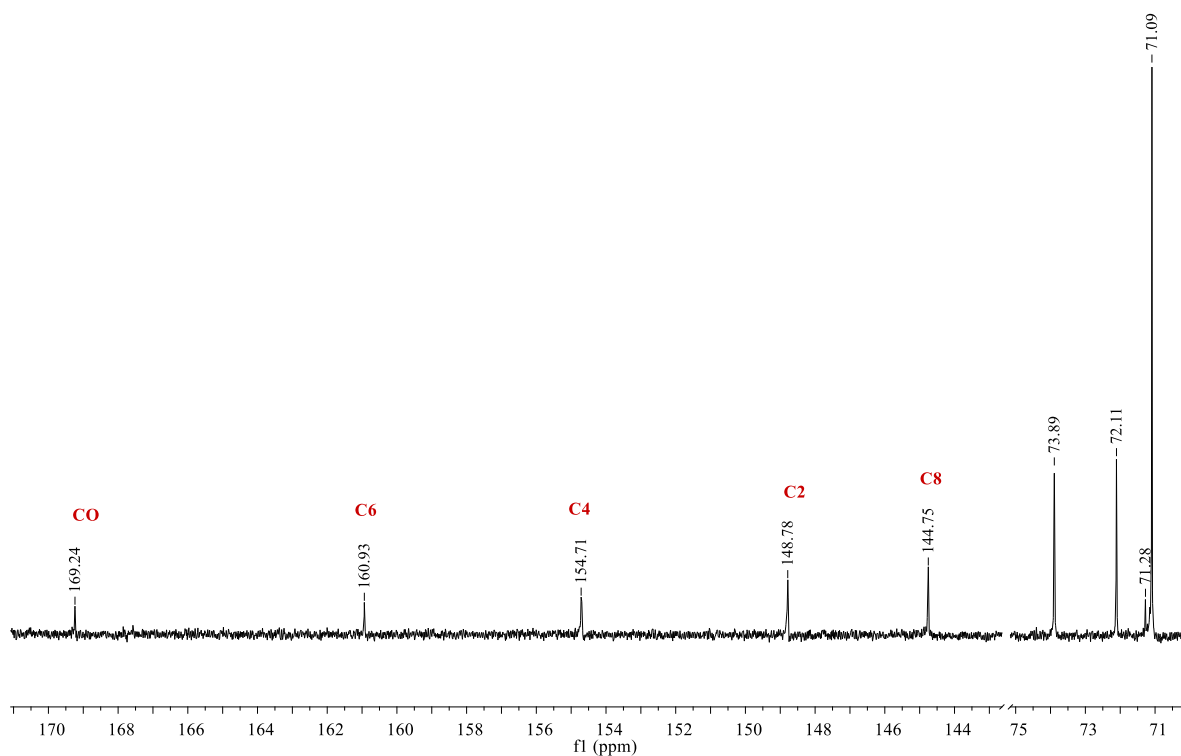
Struktura *N*9-ferocenoil-purina **9** potvrđena je NMR spektroskopijom. U ^1H NMR spektru kopulata **9** (Slika 29) snimljenom u CDCl_3 , vidljivi su kemijski pomaci pri δ 9,57, 9,25 i 9,18 ppm koji se pripisuju protonima na C2, C6 i C8 položajima purinskog prstena. U ^1H NMR spektru spoja **9** vidljivi su i kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen, kemijski pomaci pri δ 4,99 i 4,76 ppm koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak pri δ 4,34 ppm potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 29. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-purina **9** snimljen u CDCl_3

U ^{13}C NMR spektru *N*9-kopulata **9** vidljiv je kemijski pomak pri δ 169,24 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine premosnice ferocenske i purinske podjedinice. Signali pri δ 160,93, 154,71, 148,78 i 144,75 ppm pripisuju se ugljikovim atomima purinske

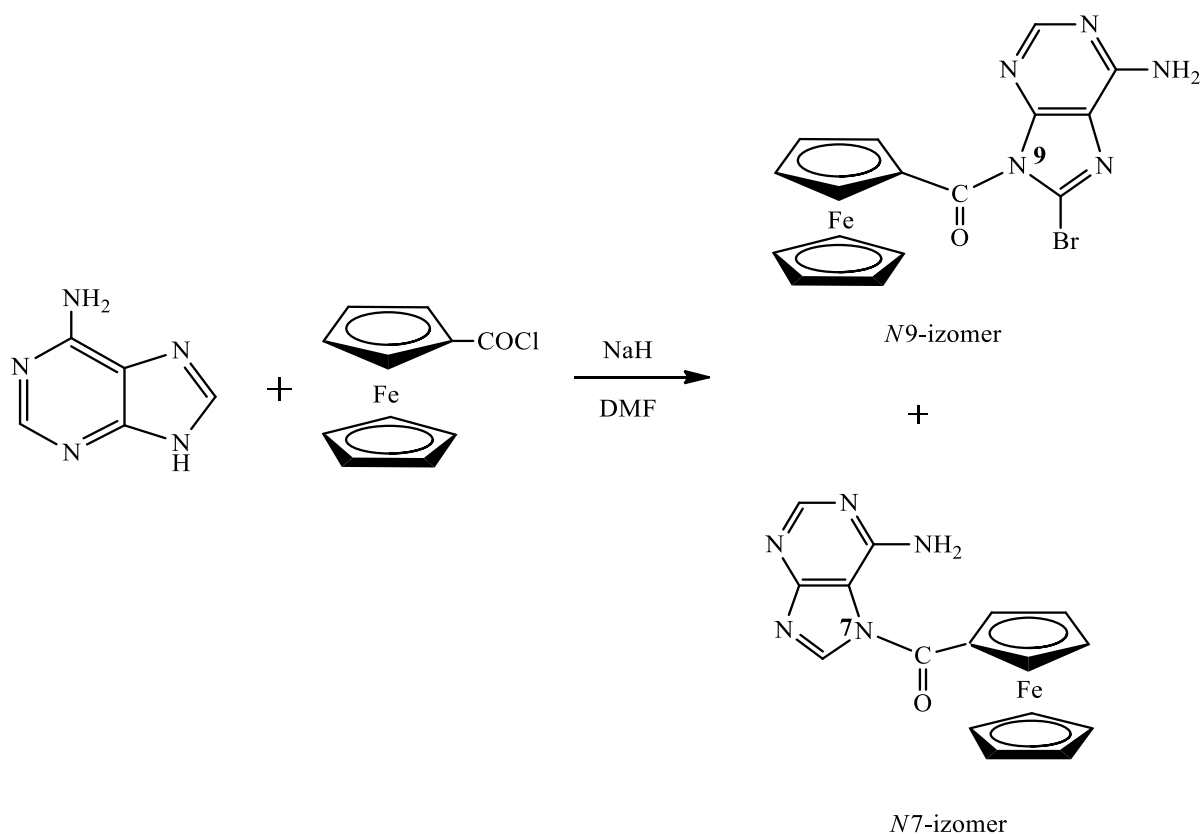
podjedinice (C6, C4, C2, C8). Kemijski pomaci pri δ 73,89 i 71,28 ppm odgovaraju ugljikovim atomima supstituiranog Cp-prstena ferocena, kemijski pomak pri δ 72,11 ppm odgovara kvaternom ugljikovom atomu ferocena dok se kemijski pomak pri δ 71,09 ppm pripisuje ugljikovim atomima nesupstituiranog Cp-prstena (Slika 30).



Slika 30. ^{13}C NMR spektar *N*9-ferocenoil-purina **9** snimljen u DMSO

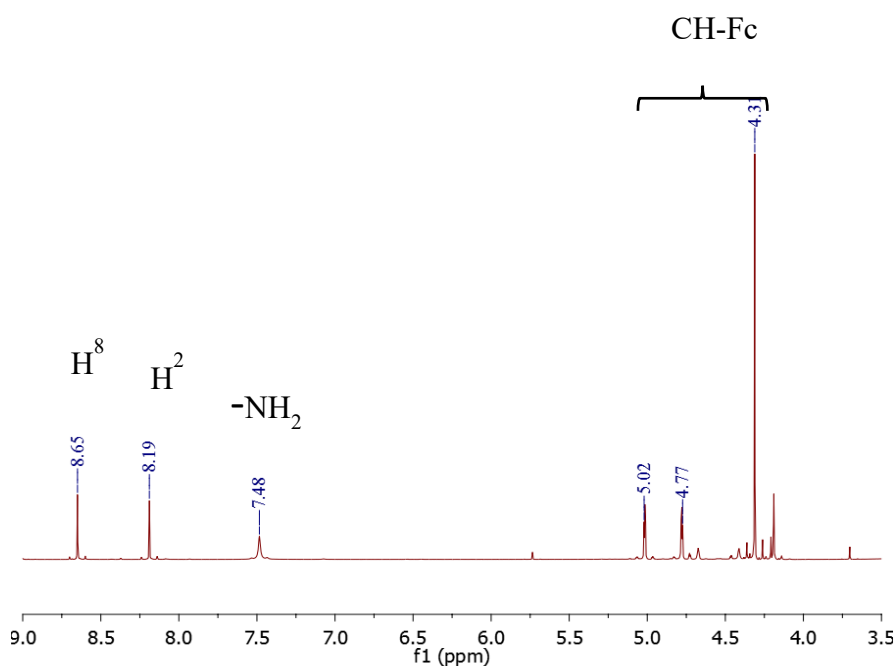
4.3.3 Ferocenoil-adenin (*9a*)

Ferocenoil-adenin **9a** nastaje u reakciji kopulacije adenina i ferocenoil-klorida (**3**) (Slika 31). Pročišćavanje sirovog produkta se provodi kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan/acetone u omjeru 1:3 i čisti acetone. Dobiveni su crvenonarančasti kristali *N*7-ferocenoil-adenina u malom iskorištenju i izrazito crveni kristali *N*9-ferocenoil-adenina u dobrom iskorištenju.



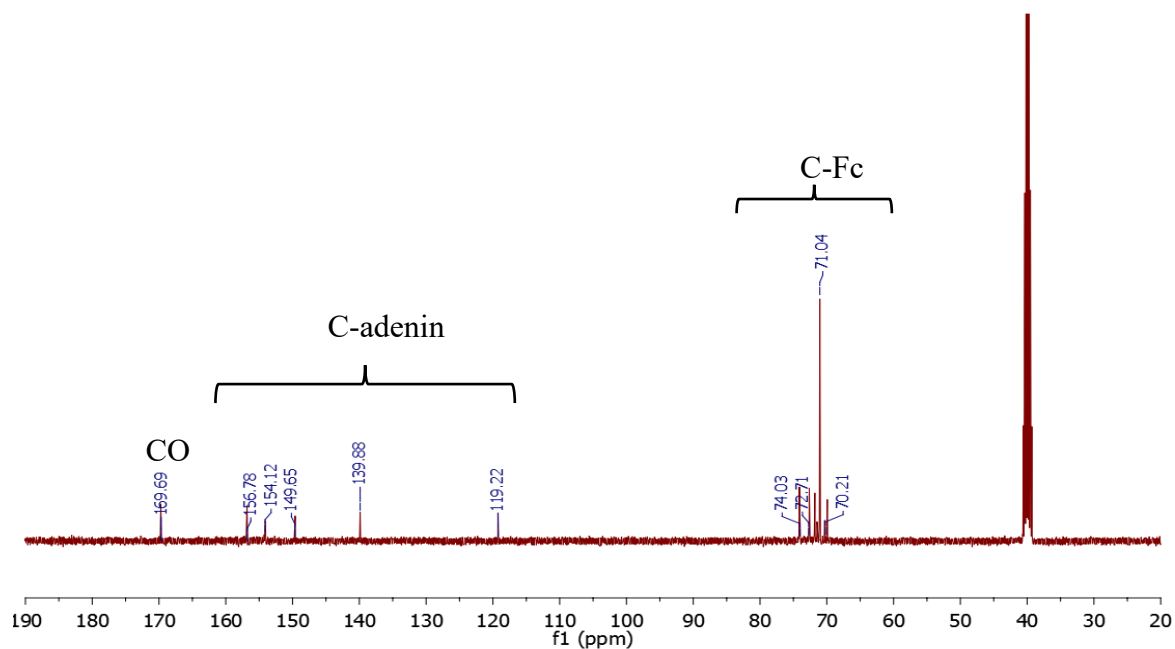
Slika 31. Shematski prikaz pripreve ferocenoil-adenina **9a**

Struktura *N9*-ferocenoil-adenina (Slika 32) i *N7*-ferocenoil-adenina **9a** potvrđena je NMR spektroskopijom. U ^1H NMR spektrima kopulata **9a** snimljenom u $\text{DMSO-}d_6$, vidljivi su karakteristični kemijski pomaci pri δ 8,65 ppm i 8,19 ppm za *N9*-izomer te δ 9,06 ppm i δ 8,37 ppm za *N7*-izomer koji se pripisuju protonima na C8 i C2 položajima purinskog prstena. Kemijski pomak pri δ 7,48 ppm *N9* izomera pripada protonima amino skupine purinskog prstena. Kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen vidljivi su pri δ 5,02 i 4,77 ppm za *N9*-izomer koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena. Pomaci pri δ 4,31 ppm za *N9*-izomer i potvrđuju prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 32. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-adenina **9a**

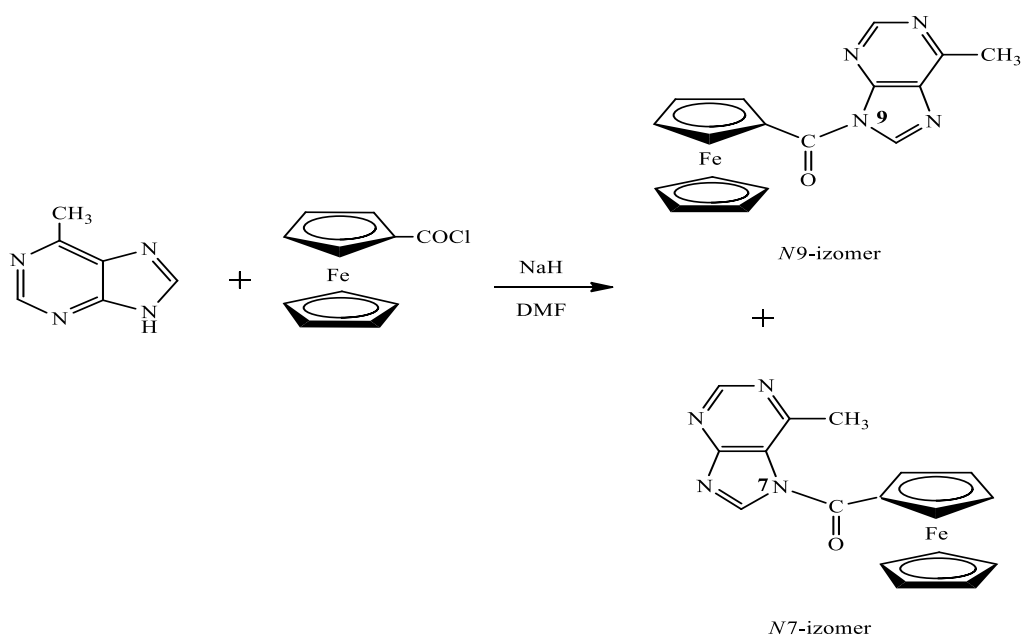
U ^{13}C NMR spektrima *N*9- kopulata **9a** vidljivi su kemijski pomaci pri δ 169,69 ppm za *N*9-izomer i koji se pripisuju ugljikovom atomu karbonilne skupine preosnice ferocenske i purinske podjedinice. Signali pri δ 156,78, 154,12, 149,65, 139,88 i 119,22 ppm za *N*9-izomer pripisuju se ugljikovim atomima purinske podjedinice (C6, C2, C4, C8, C5). Kemijski pomaci pri δ 74,03 i 72,71 ppm za *N*9-izomer odgovaraju ugljikovim atomima supstituiranog Cp-prstena ferocena, a kemijski pomak pri δ 71,04 ppm za *N*9-izomer odgovara kvaternom ugljikovom atomu ferocena. Pomak pri δ 70,21 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog Cp-prstena (Slika 33).



Slika 33. ^{13}C NMR spektar *N*9-ferocenoil-adenina **9a**

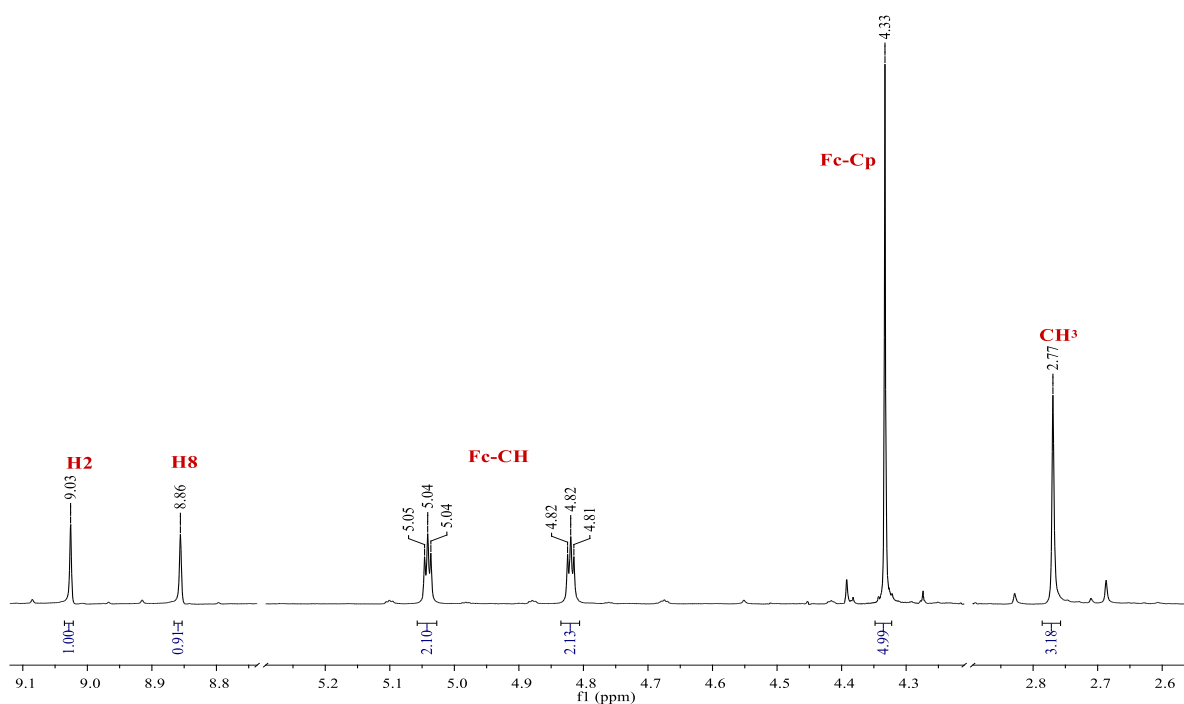
4.3.4 Ferocenoil-6-metilpurin (**9b**)

Sinteza ferocenoil-6-metilpurina **9b** provodi se na već opisani način, kopulacijom 6-metilpurina i ferocenoil-klorida (**3**) (Slika 34). Nakon pročišćavanja sirovog produkta izolirana su oba izomera: *N*9-ferocenoil-6-metilpurin u dobrom iskorištenju i *N*7-ferocenoil-6-metilpurin u nižem iskorištenju.

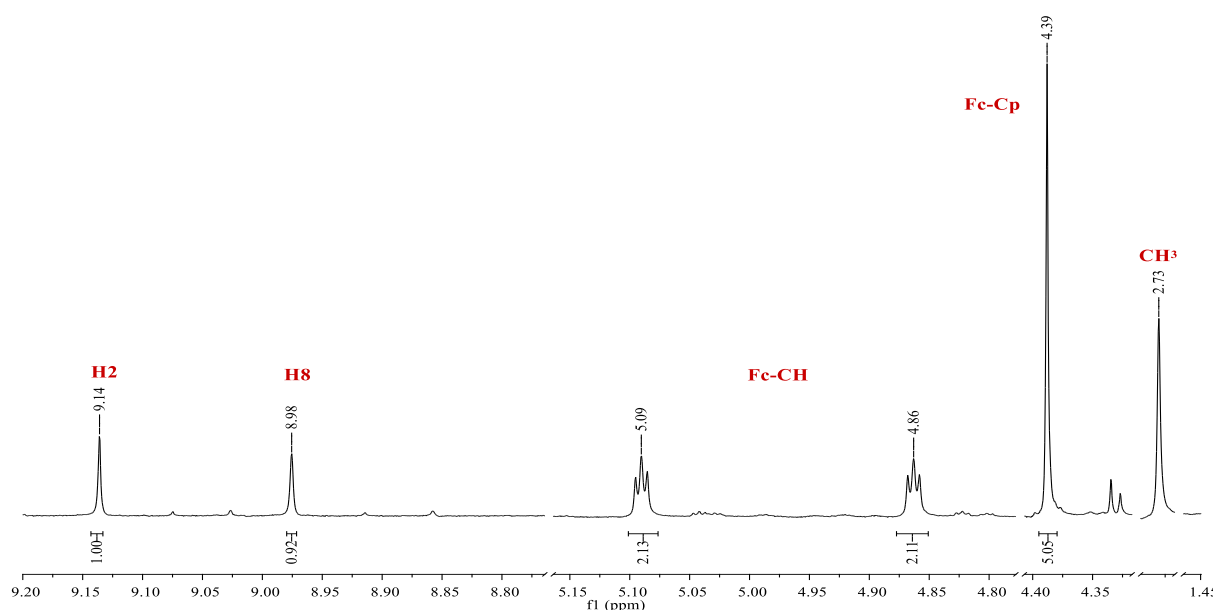


Slika 34. Shematski prikaz priprave *N*9- i *N*7- izomera ferocenoil-6-metilpurina **9b**

Struktura *N9*- i *N7*-izomera ferocenoil-6-metilpurina **9b** potvrđena je NMR spektroskopijom. U ^1H NMR spektrima kopulata **9b** (Slike 35 i 36) snimljenima u $\text{DMSO-}d_6$, vidljivi su kemijski pomaci pri δ 9,03 ppm i 8,86 ppm za *N9*-izomer te δ 9,14 ppm i δ 8,98 ppm za *N7*-izomer koji se pripisuju protonima na C2 i C8 položajima purinskog prstena. Kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen vidljivi su pri δ 5,04 i 4,82 ppm za *N9*-izomer te pri δ 5,09 i 4,86 ppm za *N7*-izomer koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak pri δ 4,33 ppm za *N9*-izomer i δ 4,39 ppm za *N7*-izomer potvrđuju prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena. Kemijski pomak pri δ 2,77 ppm *N-9* izomera odnosno δ 2,73 ppm *N-7* izomera pripadaju metilnoj skupini na položaju C6 purinskog prstena.



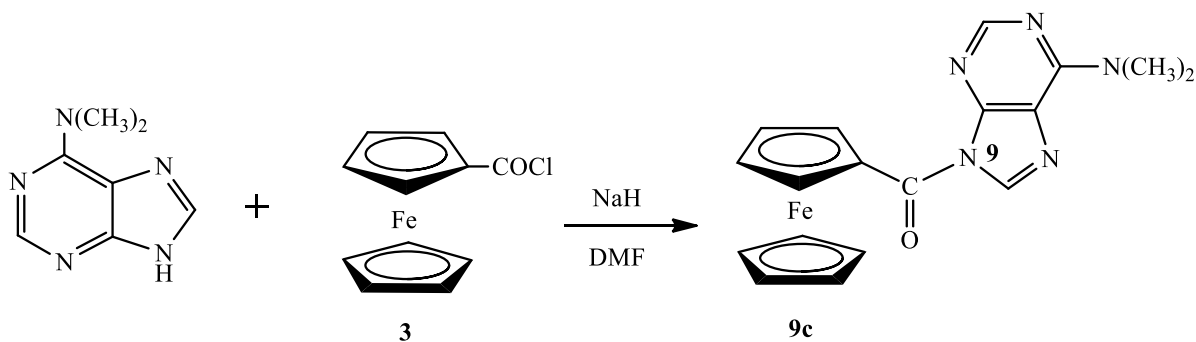
Slika 35. ^1H NMR spektar *N9*-ferocenoil-6-metilpurina **9b**



Slika 36. ^1H NMR spektar *N*7-ferocenoil-6-metilpurina **9b**

4.3.5 Ferocenoil-6-dimetilaminopurin (**9c**)

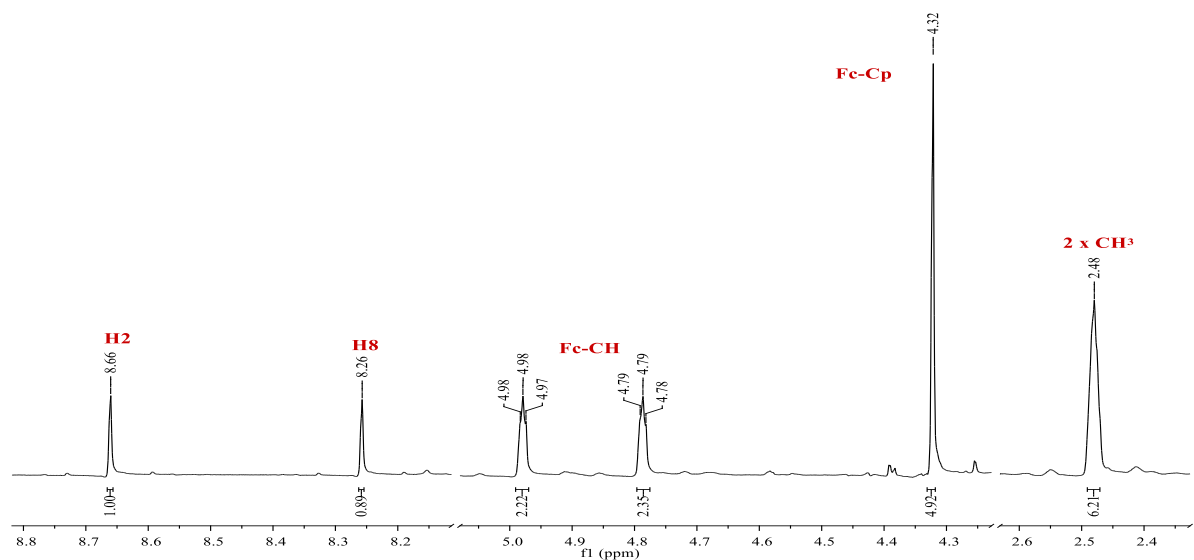
U reakciji kopulacije ferocena i 6-dimetilaminopurina (Slika 37) izoliran je samo *N*9-izomer ferocenoil-6-dimetilaminopurin **9c** u dobrom iskorištenju.



Slika 37. Shematski prikaz pripreve ferocenoil-6-dimetilaminopurina **9c**

Struktura *N*9-ferocenoil-6-dimetilaminopurina **9c** potvrđena je NMR spektroskopijom. U ^1H NMR spektru *N*9-izomera **9c** (Slika 38), snimljenom u $\text{DMSO-}d_6$, vidljivi su kemijski pomaci pri δ 8,66 ppm i δ 8,26 ppm koji se pripisuju protonima na C2 i C8 položajima purinskog prstena. U spektru su također prisutni kemijski pomaci CH skupina supstituiranog Cp-prstena pri δ 4,98 i 4,79 ppm dok singlet pri δ 4,32 ppm potvrđuje prisutnost 5H

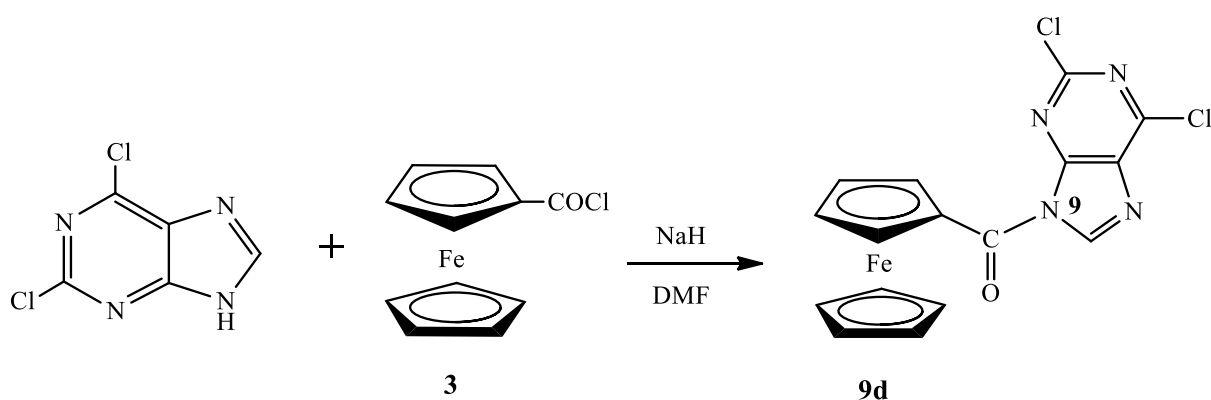
nesupstituiranog Cp-prstena. Pomak pri δ 2,48 pripada protonima dviju metilnih skupina na polažuju C6 purina.



Slika 38. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-6-dimetilaminopurina **9c**

4.3.6 Ferocenoil-2,6-diklorpurin (**9d**)

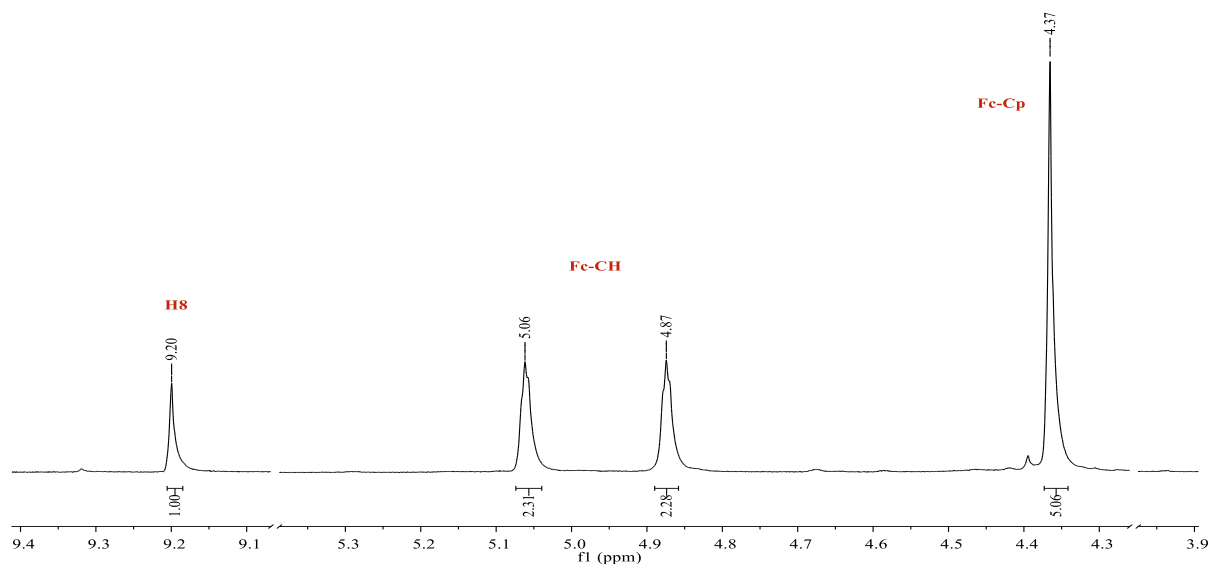
Reakcija sinteze spoja ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d** (Slika 39) odvija se na isti način kao i za prethodno opisane spojeve pri čemu je izoliran samo *N*9-izomer ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d** u vrlo dobrom iskorištenju.



Slika 39. Shematski prikaz priprave ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d**

U ^1H NMR spektru kopulata **9d** (Slika 40) snimljenom u $\text{DMSO-}d_6$, vidljiv je kemijski pomak pri δ 9,20 ppm koji se pripisuje protonu na C8 položaju purinskog prstena. ^1H NMR

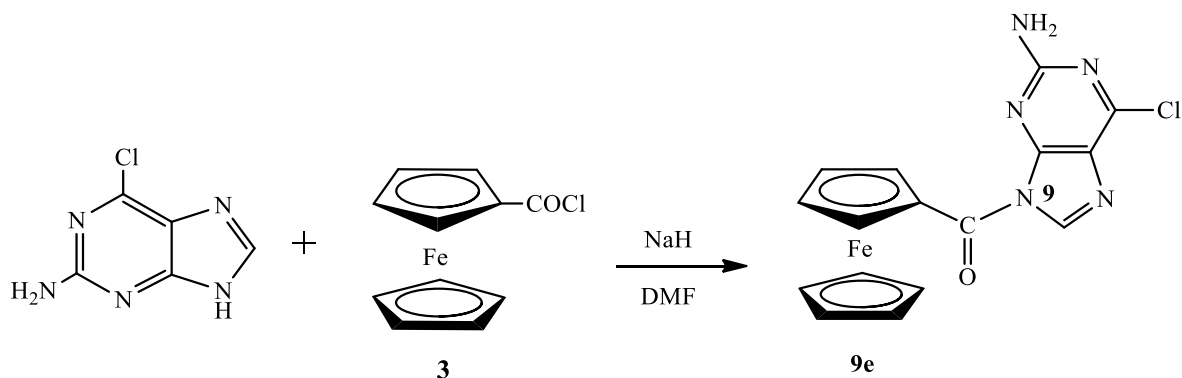
spektar sadrži i kemijske pomake CH skupina supstituiranog Cp-prstena pri δ 5,06 i 4,87 ppm te pomak pri δ 4,37 ppm koji potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 40. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d**

4.3.7 Ferocenoil-2-amino-6-klorpurin (**9e**)

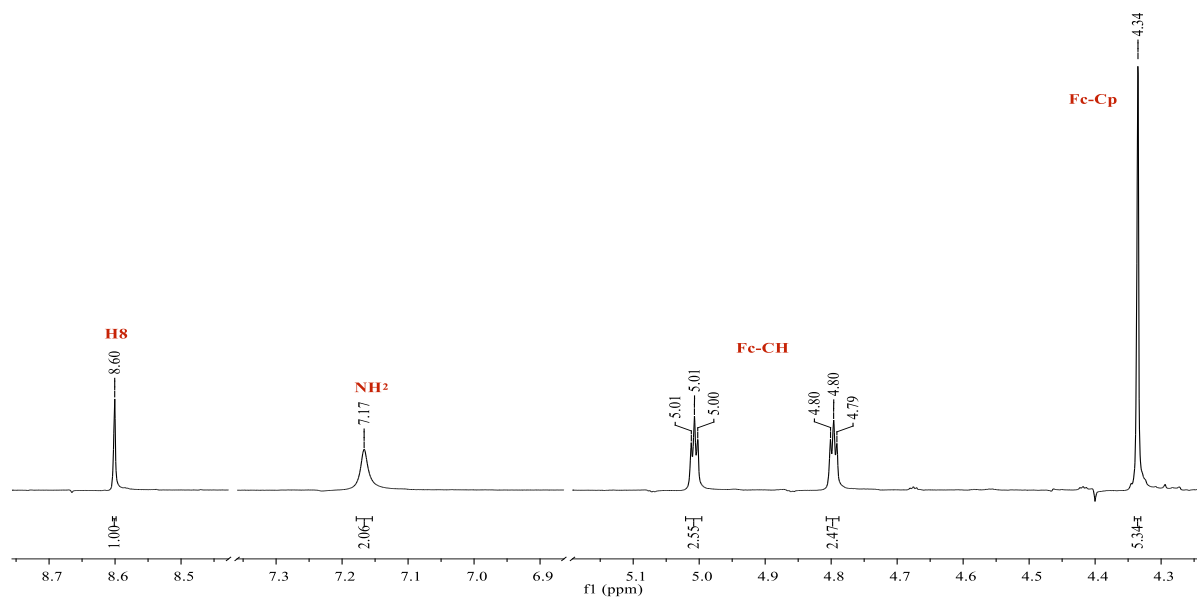
Kopulacijom ferocena i 2-amino-6-klorpurina (Slika 41) dobiven je samo *N*9-izomer ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e** u dobrom iskorištenju.



Slika 41. Shematski prikaz pripreve ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e**

^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e** (Slika 42) snimljen u $\text{DMSO-}d_6$ sadrži kemijski pomak protona na C8 položaju purinskog prstena pri δ 8,60 ppm te kemijski pomak pri δ 7,17 ppm koji potvrđuje prisutnost amino skupine na položaju C2 purinskog

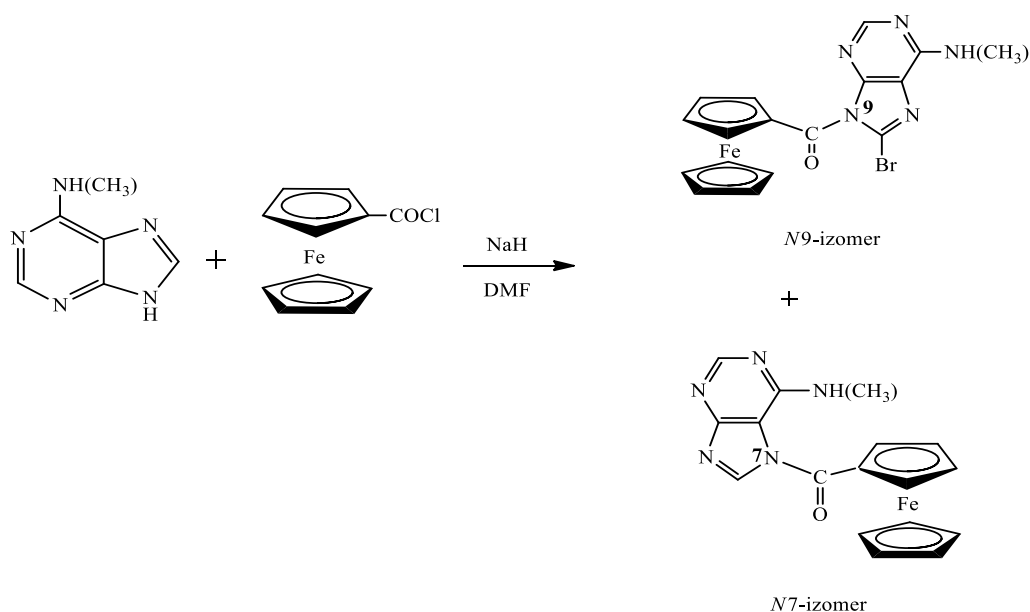
prstena. U spektru spoja **9e** prisutni su kemijski pomaci pri δ 5,01 i 4,80 ppm CH skupina supstituiranog Cp-prstena te singlet pri δ 4,34 ppm 5 protona nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 42. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e**

4.3.8 Ferocenoil-6-metilaminopurin (**9f**)

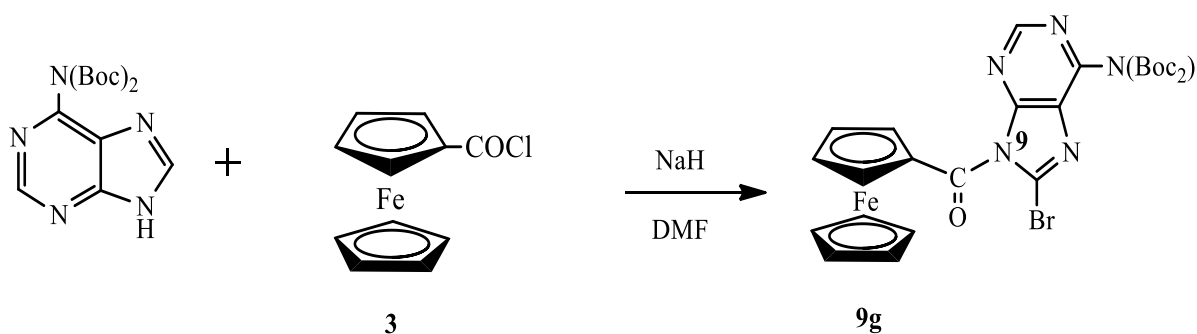
Reakcijom kopulacije ferocenoil-klorida (**3**) i 6-metilaminopurina (Slika 43) nastaju dva produkta na temelju TLC-a. Obradom reakcijske smjese i pročišćavanjem sirovog produkta dolazi do raspada ciljanih spojeva *N*9- i *N*7- ferocenoil-6-metilaminopurina. Udio pojedinih izomera utvrđen je ^1H NMR spektroskopijom reakcijske smjese, odnosno smjese dvaju izomera.



Slika 43. Shematski prikaz priprave ferocenoil-6-metilaminopurina **9f**

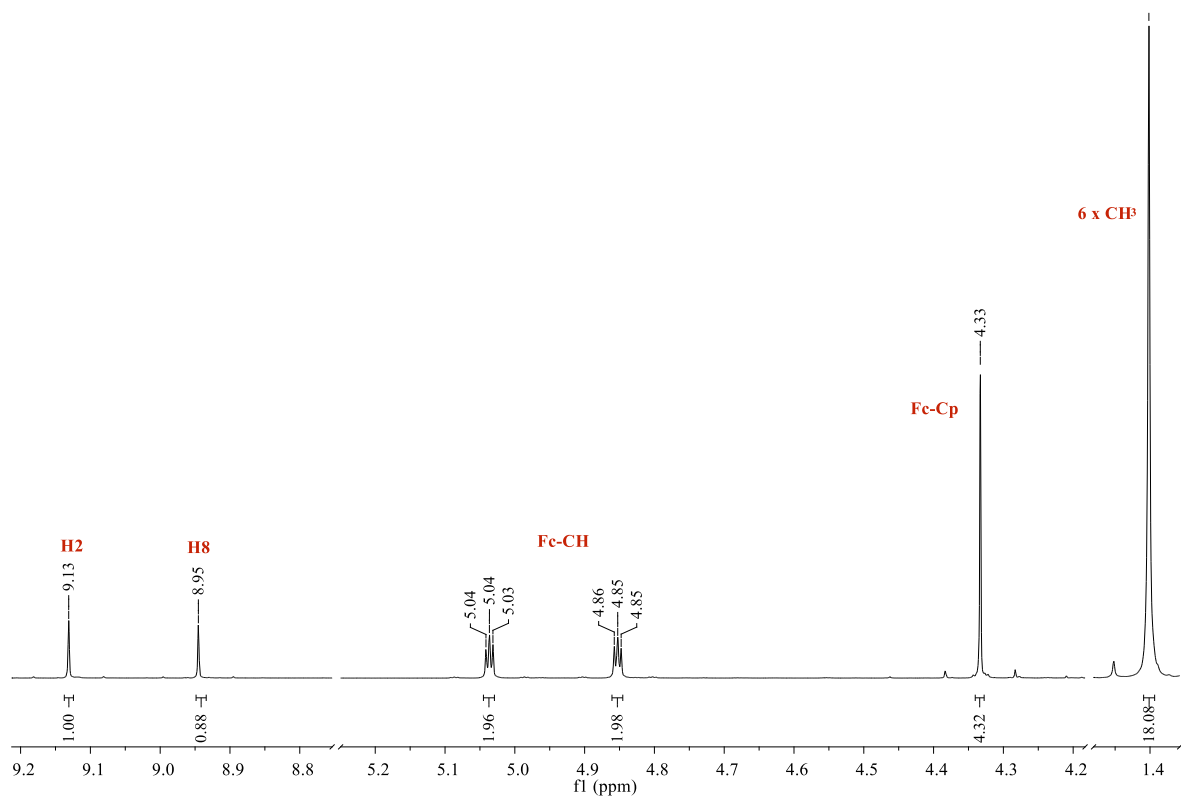
4.3.9 Ferocenoil-bis-Boc-adenin (**9g**)

Kopulacijom bis-Boc-adenina (**7**) i ferocenoil-klorida (**3**) (Slika 44) primijećeno je nastajanje isključivo samo jednog izomera *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenina **9g**. Nakon pročišćavanja sirovog produkta kolonskom kromatografijom izoliran je crveni uljasti produkt *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenin **9g** u jako dobrom iskorištenju.



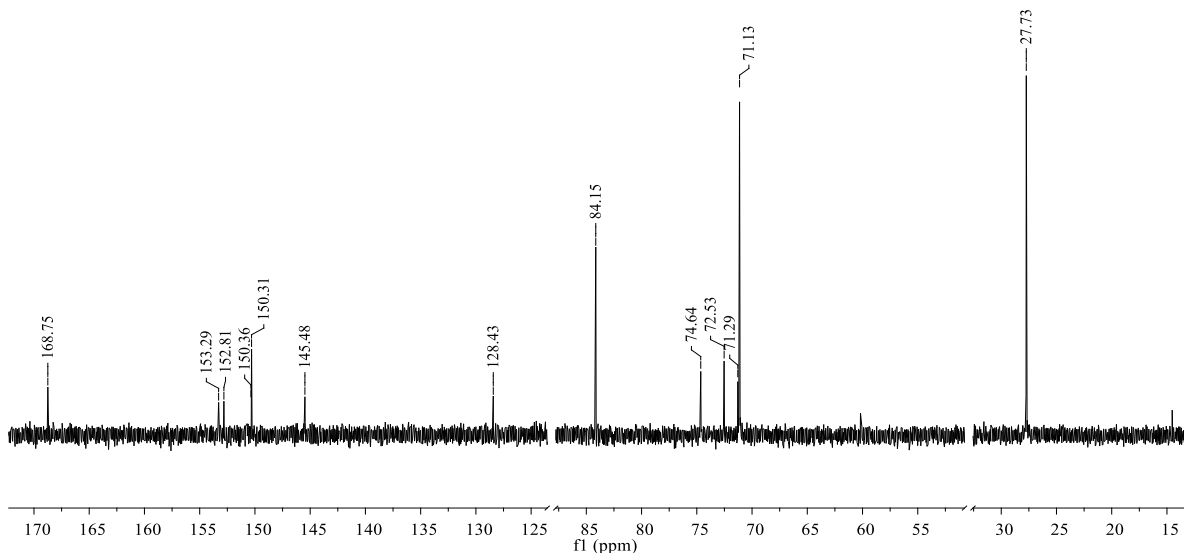
Slika 44. Shematski prikaz priprave ferocenoil-bis-Boc-adenina **9g**

Struktura *N*9-ferocenoil-bis-boc-adenina **9g** potvrđena je NMR spektroskopijom. U ¹H NMR spektru spoja **9g** (Slika 45) snimljenom u CDCl₃, vidljivi su kemijski pomaci pri δ 9,13 i 8,95 ppm koji se pripisuju protonima na C2 i C8 položajima purinskog prstena. U spektru spoja **9g** prisutni su i svi ferocenski protoni pri karakterističnim kemijskim pomacima, singlet pri δ 1,4 ppm koji odgovara 18 protonima dviju Boc skupina.



Slika 45. ¹H NMR spektar *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenina **9g**

U ¹³C NMR spektru *N*9-izomera **9g** (Slika 46) vidljiv je kemijski pomak pri δ 168,75 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine premosnice ferocenske i purinske podjedinice. Signali pri δ 153,05, 150,34, 145,48 i 128,43 ppm pripisuju se ugljikovim atomima purinske podjedinice (C6, C4, C2, C8), kemijski pomaci pri δ 84,15 i 72,53 ppm odgovaraju ugljikovim atomima supstituiranog Cp-prstena ferocena, δ 74,64 odgovara kvaternom ugljikovom atomu ferocena dok kemijski pomak pri δ 71,13 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog Cp-prstena, te pri δ 27,73 ppm metilnim ugljikovim atomima Boc-estera.

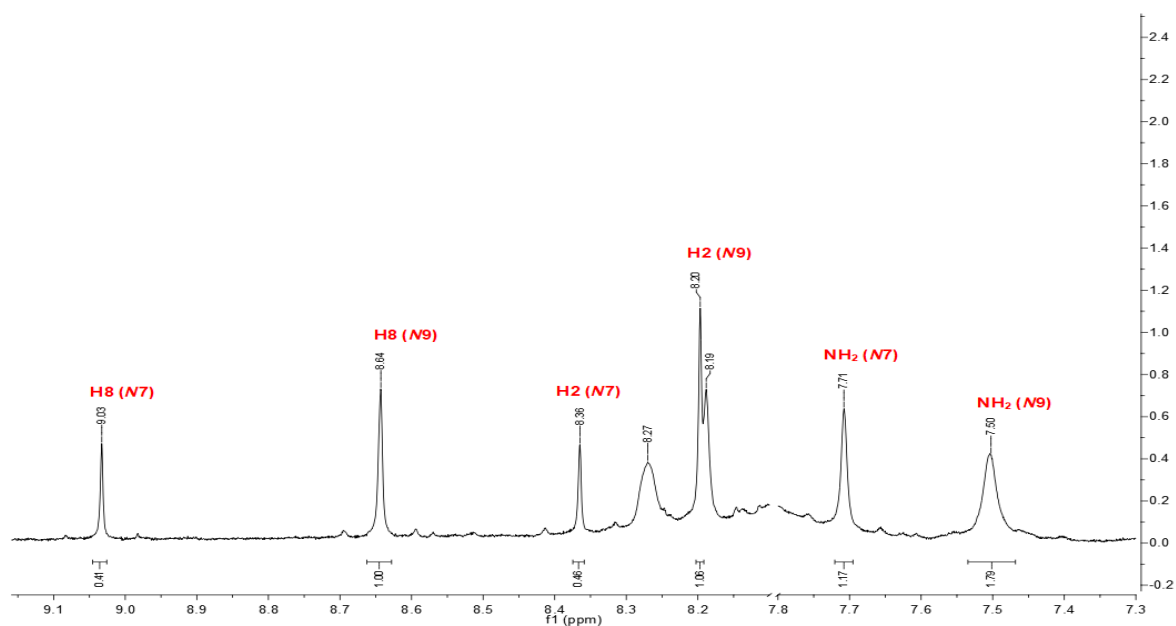


Slika 46. ^{13}C NMR spektar *N*9-ferocenoil-bis-Boc-adenina **9g**

4.4 Regioselektivnost kopulacijskih reakcija

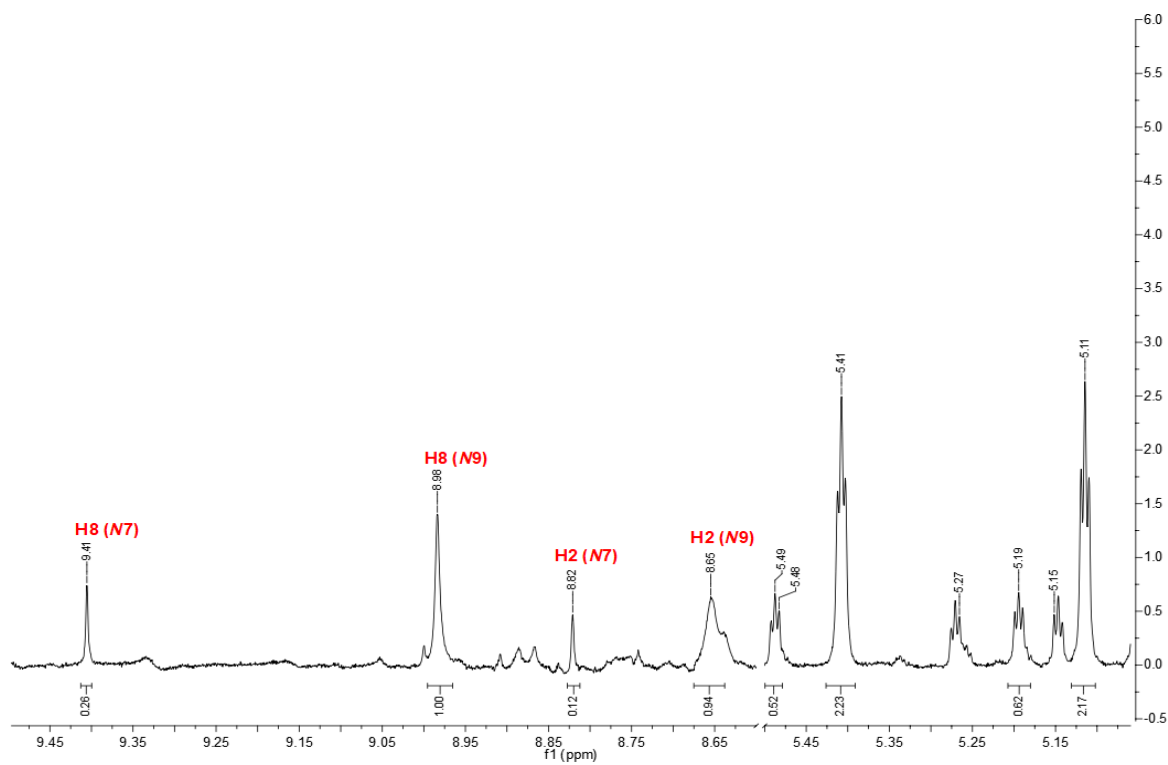
U nastavku istraživanja opisanih u ovom diplomskom radu pozornost je bila usmjerena na regioselektivnost reakcija kopulacije ferocena i adeninskih derivata. Tijek kopulacijskih reakcija prati se ^1H NMR spektroskopijom *in situ* kako bi se utvrdio udio pojedinih izomera. Eksperiment obuhvaća kontinuirano praćenje reakcije kopulacije od prve minute do konačne reakcije pri čemu se udio nastalih regioizomera dobiva iz odnosa integrala pikova pripisanih pojedinim izomerima. Sve reakcije su provedene pri sobnoj temperaturi, a spektri su snimani pri 25 °C. Reakcije su praćene pomoću kapilare u kojoj se nalazi deuterirani dimetilsulfoksid (DMSO- d_6) pri čemu se reakcijski uvjeti nisu promijenili. Parametar koji se u ovim istraživanjima promatrao je utjecaj supstituenta na položaju C6 adenina. Primijećeno je već prilikom eksperimentalnog dijela ovog rada nastajanje *N*7- i *N*9- izomera u različitim omjerima ovisno o supstituentu na C6 položaju purinskog prstena.

Za početak je praćen tijek reakcije kopulacije ferocenoil klorida (**3**) i adenina te je tijekom ove reakcije uočeno nastajanje oba izomera (Slika 47). Nakon provedene reakcije udio *N*7-izomera je 30%.



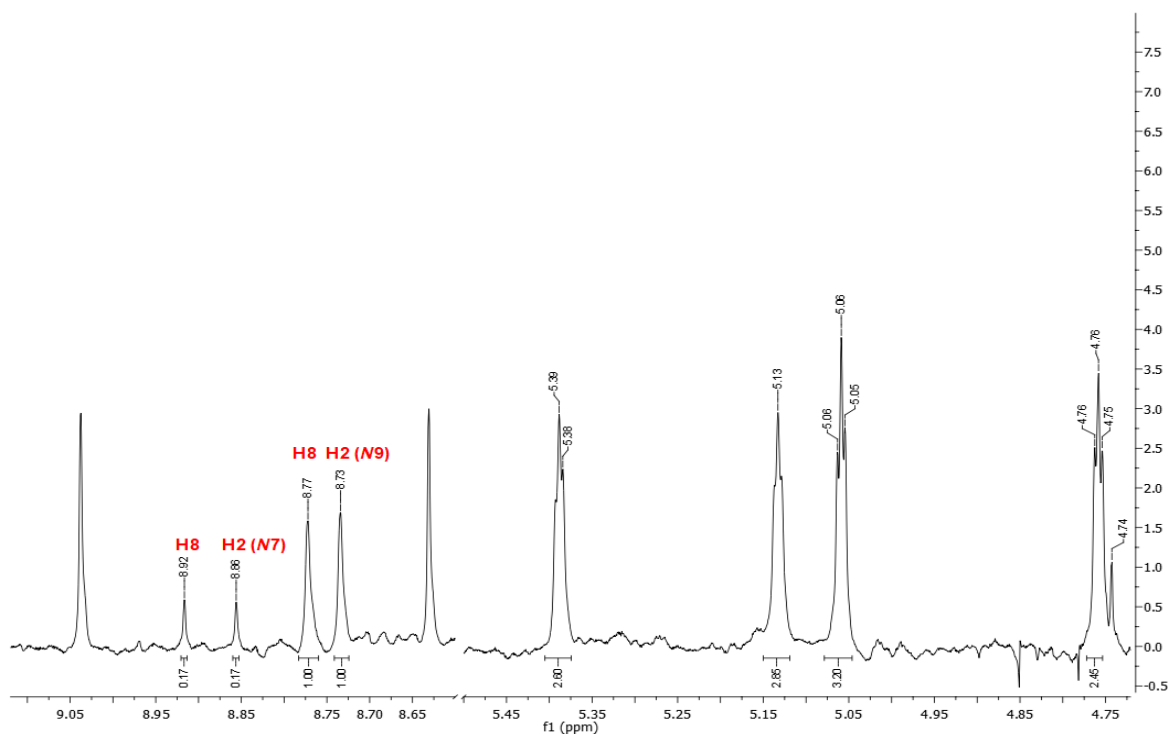
Slika 47. ^1H NMR spektar reakcije kopulacije ferocenoil-klorida (**3**) i adenina

Nakon toga provedena je reakcija u kojoj je jedan atom vodika amino skupine adenina zamijenjen s metilnom skupinom te je tada tijekom ove reakcije nastalo 20 % (Slika 48) N7-izomera ferocenoil-6-metilaminopurina **9f**.



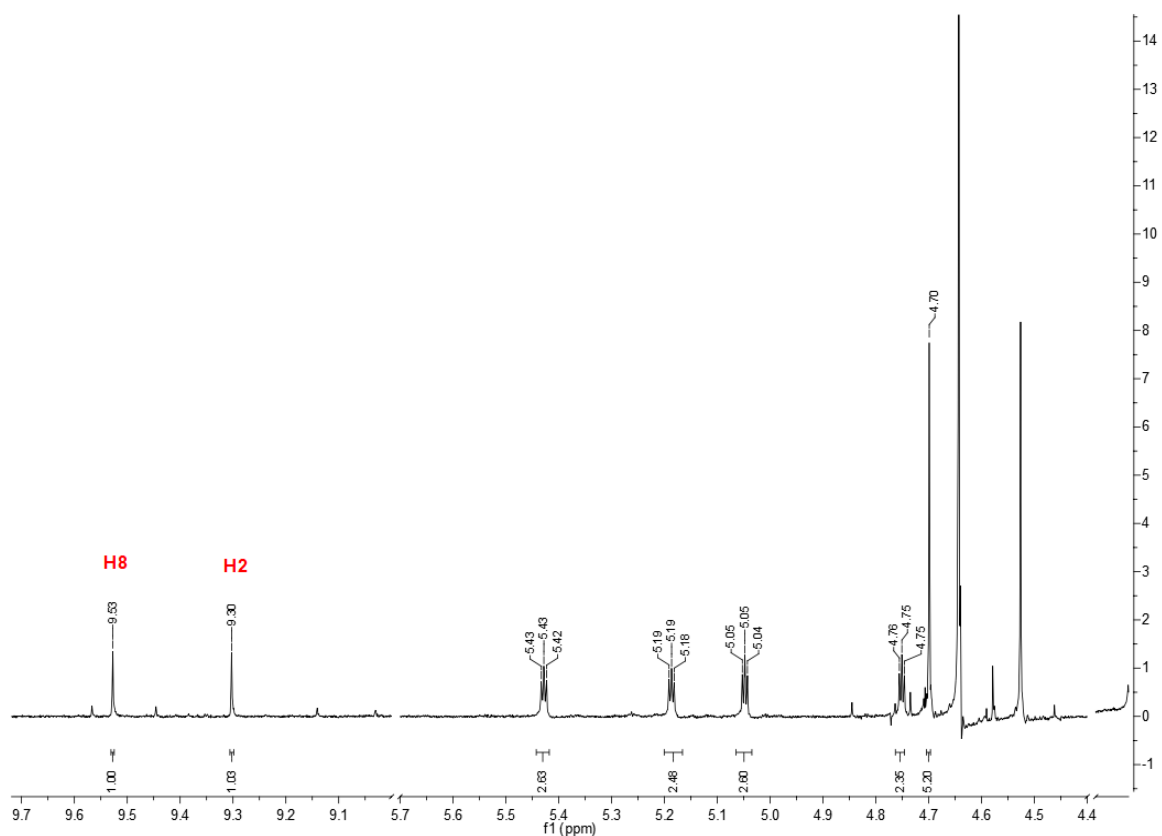
Slika 48. ^1H NMR spektar reakcije kopulacije ferocenoil-klorida (**3**) i 6-metiladenina

Zamjenom oba vodikova atoma metilnim skupinama, udio *N7*-izomera se smanjio na 10 % (Slika 49).



Slika 49. ^1H NMR spektar reakcije kopulacije ferocenoil-klorida (**3**) i 6-dimetiladenina

Kako bi se ovaj sterički utjecaj potvrdio amino skupina je zaštićena bis-Boc-skupinom, pri čemu nastaje isključivo jedan produkt. Reakcija je regiospecifična jer nastaje samo jedan izomer, *N9*-ferocenoil-bis-Boc-adenin **9g** (Slika 50).



Slika 50. ^1H NMR spektar reakcije kopulacije ferocenoil-klorida (**3**) i bis-Boc-adenina

Temeljem provedenih eksperimenata može se zaključiti kako povećanjem veličine supstituenta na C6 položaju adenina raste udio *N9*-izomera. Jedan od faktora koji utječu na regioselektivnost je sterički utjecaj supstituenta na položaju C6 što je potvrđeno ovim NMR *in situ* reakcijama.

U reakcijskim smjesama ostalih kopulata ferocena i purinskih nukleobaza isto smo odredili udio izomera NMR spektroskopijom. Sadržaj *N7*-ferocenoil-purina u reakcijskoj smjesi bio je 15% dok je praćenjem reakcijske smjese ferocenoil-klorida i 6-metilpurina sadržaj *N7*-ferocenoil-6-metilpurina 25%. NMR spektroskopijom je kod ferocenoil-8-bromadenina **6**, ferocenoil-2,6-diklorpurina **9d** i ferocenoil-2-amino-6-klorpurina **9e** uočeno nastajanje samo *N9*-izomera.

5. ZAKLJUČCI

1. Višestupanjskom sintezom pripremljeni su monosupstituirani ferocenski konjugati purinskih baza **6**, **9** i **9a-g**.
2. Struktura svih dobivenih produkata kao i regioselektivnost provedenih reakcija potvrđeni su NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u ^1H spektrima spojeva **6**, **9** te **9a-9g** potvrđena je supstitucija purinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena. Signal u ^{13}C spektru svih konjugata pri pomaku od δ 169,69 do 168,75 ppm ukazuje na prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma koji služi kao razmaknica između ferocena i nukleobaze.
3. Praćenjem tijekom kopulacijskih reakcija ferocenoil-adeninskih derivata zaključeno je da povećanjem supstituenta na C6 položaju adenina, raste udio *N*9-izomera. Velika skupina, poput Boc-skupine, blokira *N*7 položaj pri čemu nastaje isključivo *N*9-izomer te je reakcija regiospecifična. Manji supstituenti, poput metila i dimetila, smanjuju udio *N*7-izomera djelomičnim zaklanjanjem *N*7 položaja.

6. LITERATURA

- Bojarska, E., & Czocharlska, B. (1999) Electrooxidation of the antileukemic 2-chloro-2'-deoxyadenosine and related compounds. *J. Electroanal. Chem.* **477**(1), 89–96.
- Braga, S.S., Silva, A.M.S. (2013) A New Age for Iron: Antitumoral Ferrocenes. *Organometallics*. **32**, 5626–5639.
- Chang, J., Dong, C., Guo, X., Hu, W., Cheng, S., Wang, Q., & Chen, R. (2005) A solid-phase approach to novel purine and nucleoside analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **13**(15), 4760–4766.
- Chen, S. (1980) The syntheses and mass spectra of some N-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J. Organomet. Chem.* **202**, 183–189.
- Dey, S., Garnet, P. (2000) *J. Org. Chem.* **65**, 7697-7699.
- Esparza-Ruiz, A., Herrmann, C., Chen, J., Patrick, B.O., Polishchuk, E., Orvig, C. (2012) Synthesis and in vitro anticancer activity of ferrocenyl-aminoquinoline-carboxamide conjugates. *Inorganica Chim. Acta.* **393**, 276–283.
- Giuliani, A. L., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2018) Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol. Lett.* doi:10.1016/j.imlet.2018.11.006.
- Guo, S., Wang, Y., Zhou, D., Xu, Y., Chen, T., & Li, Z. (2018) Association of alteration of nucleosides and nucleotides with gastric cancer microenvironment. *Int. J. Mass. Spectrom.* doi:10.1016/j.ijms.2018.08.012.
- Gutiérrez-Castrellón, P., Mora-Magaña, I., Diaz-Garcia, L., Jiménez-Gutiérrez, C., Ramirez-Mayans, J., Solomon-Santibáñez, G.A. (2007) Immune response to nucleotide-supplemented infant formulae: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Nutr.* **98**, 64–67.
- Janeba, Z., Holy, A., Masojidkova, M. (2000) Synthesis of acyclic nucleoside and nucleotide analogs derived from 6-amino-7H-purin-8(9H)-one. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65** (11), 1698-1712. doi: 10.1135/cccc20001698.
- Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature*. **168**, 1039-1040.

Knobolch, F.W., Raucher, W. H. (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *J. Polym. Sci. A* **54**, 651–656.

Kowalski, K. (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications. *Coord. Chem. Rev.* **317**, 132–156.

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.

Kumari, A. (2017) Sweet Biochemistry: Remembering Structures, Cycles, and Pathways by Mnemonics. 89-91. doi.org/10.1016/C2017-0-01612-9.

Lapić, J., Havaić, V., Šakić, D., Sanković, K., Djaković, S., Vrček, V. (2015) Ferrocenyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An Experimental and Computational Study of Regioselective Acylation of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil. *Eur. J. Org. Chem.* **24**, 5424-5431.

Rosemeyer, H. (2004) *Chemistry & Biodiversity*. **1**, 361-401.

Malthum, S., Polkam, N., Allaka, T. R., Chepuri, K., Anireddy, J. S. (2017). Synthesis, characterization and biological evaluation of purine nucleoside analogues. *Tetrahedron Lett.* **58(44)**, 4166–4168.

Mikhailopulo, I.A., Miroshnikov, A.I. (2010) New Trends in Nucleoside Biotechnology. *Acta Naturae*. **2**, 36-58.

Nguyen, H.V., Sallustrau, A., Balzarini, J., Bedford, M.R., Eden, J.C., Georgousi, N., Hodges, N.J., Kedge, J., Mehellou, Y., Tselepis, C., Tucker, J.H.R. (2014) Organometallic Nucleoside Analogues with Ferrocenyl Linker Groups: Synthesis and Cancer Cell Line Studies. *J. Med. Chem.* **57**, 5817– 5822.

Organic Syntheses, Inc. (2014) Ferrocene,

<<http://www.orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV4P0473>>. Pristupljeno 11. siječnja 2019.

Patra, M., Gasser, G. (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **1**. doi: 10.1038/s41570-017-0066

- 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.
- 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.
- Pedley, A. M., Benkovic, S. J. (2017) A New View into the Regulation of Purine Metabolism: The Purinosome. *Trends Biochem. Sci.* **42(2)**, 141–154.
- Pine, S. H. (1994) *Organska kemija*, 3.izd., Školska knjiga, Zagreb, str. 796-799.
- Sharma, S., Singh, J., Ojha, R., Singh, H., Kaur, M., Bedi, P. M. S., Nepali, K. (2016) Design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for purines as kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **112**, 298–346.
- 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.
- Sonoda, A., Moritani, I.J. (1971) The synthesis of (3)-ferrocenophan-2-one tosylhydrazone and the thermal decomposition of its sodium salt. *Organometall. Chem.* **26**, 133.
- Sokol, I., Majić, M., Belovari, M., Gazivoda Kraljević, T. (2018) Sinteza i strukturna karakterizacija novih 1, 2, 3-triazolnih derivata kumarina i kinolina. XII. skup mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.
- Sudhir, V.S. Baig, N.B.R., Chandrasekaran S. (2009) Convenient Synthesis of Ferrocene Conjugates Mediated by Benzyltriethylammonium Tetrathiomolybdate in a Multi-Step Tandem Process. *Eur. J. Org. Chem.* 5365-5372.
- Stryer, L. (2013) *Biokemija*, 1.izd., Školska knjiga, Zagreb.
- Takahashi, S., Anzai, J. (2013) Recent Progress in Ferrocene-Modified Thin Films and Nanoparticles for Biosensors. *Materials.* **6**, 5742–5762.

Tharamani, C. N., Song, H., Ross, A. R. S., Hughes, R., Heinz-Bernhard, K. (2008) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *Inor. Chim. Acta* **361**, 393-399.

Togni, A. (2008) Ferrocenes: Homogeneous Catalysis, Organic Synthesis, Materials Science. Wiley, 219-270.

Wang, C., Song, Z., Yu, H., Liu, K., Ma, X. (2015) Adenine: an important drug scaffold for the design of antiviral agents. *Acta. Pharm. Sin. B.* **5(5)**, 431-441.

Wang, Q., Liu, X., Wang, Q., Zhang, Y., Jiang, J., Guo, X., Chang, J. (2011) FNC, a novel nucleoside analogue inhibits cell proliferation and tumor growth in a variety of human cancer cells. *Biochem. Pharmacol.* **81(7)**, 848-855.

Wang, M., Srivastava, P., Liu, C., Snoeck, R., Andrei, G., De Jonghe, S., & Herdewijn, P. (2018) Synthesis and antiviral evaluation of cyclopentyl nucleoside phosphonates. *Eur. J. Med. Chem.* **150**, 616-625.

Wang, S.-B., Jin, P., Li, F.-N., Quan, Z.-S. (2014) Synthesis and anticonvulsant activity of novel purine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **84**, 574-583.

Wang, X.-J., You, J.-Z. (2015) Study on the molecular structure and thermal stability of purine nucleoside analogs. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **111**, 1-14.

Wani, W. A., Jameel, E., Baig, U., Mumtazuddin, S., Hun, L. T. (2015) Ferroquine and its derivatives: New generation of antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **101**, 534-551.

Werner, A. (1993) Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **618(1-2)**, 3-14.

Wikipedia (2001), < <https://en.wikipedia.org/wiki/Ferrocene> > Pristupljeno 12. siječnja 2019.