

Sinteza i strukturna karakterizacija konjugata metil 1 aminoferocen 1 karboksilata i alanina

Tuksar, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:937664>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

Petra Tuksar
7946/PT

**SINTEZA I STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA
KONJUGATA METIL 1'-AMINOFEROCEN-1-
KARBOKSILATA I ALANINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2022.



Ovaj rad izrađen je u sklopu HRZZ projekta IP-2020-02-9162 "*Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija*" čija je voditeljica prof. dr. sc. Lidija Barišić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Sinteza i strukturna karakterizacija konjugata metil 1'-aminoferocen-1-karboksilata i alanina
Petra Tuksar, 0058217024

Sažetak:

U ovom radu opisana je sinteza i strukturna karakterizacija ferocenskih dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**). Kopulacijom 1'-aminoferocen-1-karboksilata s Boc-L-Ala-OH odnosno Boc-D-Ala-OH dobiveni su prekursori Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**). Potom je provedena transformacija *tert*-butilkarbamatne skupine u acetamidnu pri čemu su rezultirali ciljni Ac-dipeptidi **4** i **5**. Kako bi se provela strukturna i konformacijska karakterizacija, dipeptidi **4** i **5** podvrgnuti su spektroskopiji nuklearne magnetske rezonancije (NMR) pri čemu su analizirani ¹H-, ¹³C-, COSY i NOESY NMR spektri. Detektirani NOE kontakti između NH_{F_n} i CH₃COOMe pripisuju se intramolekularnoj vodikovoj vezi (IHB) NH_{F_n}⋯OC_{COOMe} uslijed koje dolazi do tvorbe 6-članog interlančanog IHB-prstena.

Ključne riječi: ferocenski dipeptidi, peptidomimetici, strukturna karakterizacija, spektroskopija NMR, vodikove veze

Rad sadrži: 27 stranica, 14 slika, 1 shemu, 6 tablica, 27 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Lidija Barišić

Pomoć pri izradi: doc. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 18. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Synthesis and structural characterization of methyl 1'-aminoferrocene-1-carboxylate conjugates with alanine

Petra Tuksar, 0058217024

Abstract:

This work describes the synthesis and structural characterization of the ferrocene dipeptides Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) and Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**). 1'-Aminoferrocene-1-carboxylate was coupled with Boc-Ala-OH and Boc-D-Ala-OH to give precursors Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) and Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**), respectively. Then, the *tert*-butylcarbamate groups were transformed to acetamide groups of the enantiomeric dipeptides **4** and **5**. For structural and conformational analysis, the goal dipeptides **4** and **5** were subjected to NMR [nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H -, ^{13}C -, COSY and NOESY)]. The detected NOE contacts between NH_{Fn} and CH_3COOMe indicate the presence of intramolecular hydrogen bond (IHB) $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{COOMe}}$, *i.e.*, the presence of a 6-membered IHB-ring.

Keywords: ferrocene dipeptides, peptidomimetics, structural characterization, NMR spectroscopy, hydrogen bond,

Thesis contains: 27 pages, 14 figures, 1 scheme, 6 tables, 27 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Lidija Barišić, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Monika Kovačević, PhD, Assistant Professor

Thesis defended: July 18, 2022

Najljepša hvala dragoj mentorici prof. dr. sc. Lidiji Barišić na nesebičnoj pomoći, prenesenom znanju, savjetima i susretljivosti tijekom izrade završnog rada.

Puno hvala doc. dr. sc. Moniki Kovačević na velikoj pomoći i korisnim savjetima pri izvedbi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. GRAĐA I STRUKTURA PROTEINA.....	2
2.2. PEPTIDOMIMETICI.....	3
2.3. BIOORGANOMETALNA KEMIJA.....	4
2.3.1. FEROCEN.....	5
2.3.2. FEROCENSKI BIKONJUGATI S AMINOKISELINAMA.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJALI I METODE RADA.....	8
3.2. SINTEZA CILJNIH PEPTIDA 4 I 5	8
3.2.1. SINTEZA DIPEPTIDA BOC-L-ALA-NH-FN-CO-OME (2) I BOC-D-ALA-NH-FN-CO-OME (3).....	9
3.2.2. SINTEZA DIPEPTIDA AC-L-ALA-NH-FN-CO-OME (4) I AC-D-ALA-NH-FN-CO-OME (5).....	11
4. REZULTATI I RASPRAVA	13
4.1. UVOD.....	13
4.2. PRIPRAVA DIPEPTIDA BOC-L-ALA-NH-FN-CO-OME (2) I BOC-D-ALA-NH-FN-CO-OME (3).....	14
4.3. PRIPRAVA STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA CILJNIH ENANTIOMERNIH DIPEPTIDA AC-L-ALA-NH-FN-CO-OME (4) I AC-D-ALA-NH-FN-CO-OME (5).....	15
4.3.1. NMR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA DIPEPTIDA 4 I 5	17
5. ZAKLJUČCI	23
6. POPIS LITERATURE	24

1. UVOD

Proteini su biološke makromolekule prisutne u svim stanicama gdje imaju veliku važnost u održavanju strukture i funkcionalnosti svih oblika života. Zbog svoje velike strukturne raznolikosti, sudjeluju u enzimskoj katalizi, prijenosu i pohrani drugih molekula, kontroli rasta i diferencijaciji stanica te zaštiti imuniteta (Barišić, 2018a).

Unatoč brojnim poželjnim strukturnim karakteristikama te sudjelovanju u ključnim biološkim procesima, primjena proteina u medicinske svrhe ograničena je njihovom niskom proteolitičkom stabilnošću te niskom selektivnošću, što je dovelo do razvoja peptidomimetike kao interdisciplinarnog znanstvenog područja kojim su objedinjene organska kemija, biokemija, farmakologija i biotehnologija. Peptidomimetici su peptidni ili nepeptidni spojevi koji oponašaju ili inhibiraju biološko djelovanje prirodnih peptida i proteina oponašanjem njihove 3D-strukture čime zadržavaju sposobnost interakcije s biološkim metama, uz jednak ili čak unprijeđen biološki učinak (Barišić, 2018a; Kovačević i sur., 2021).

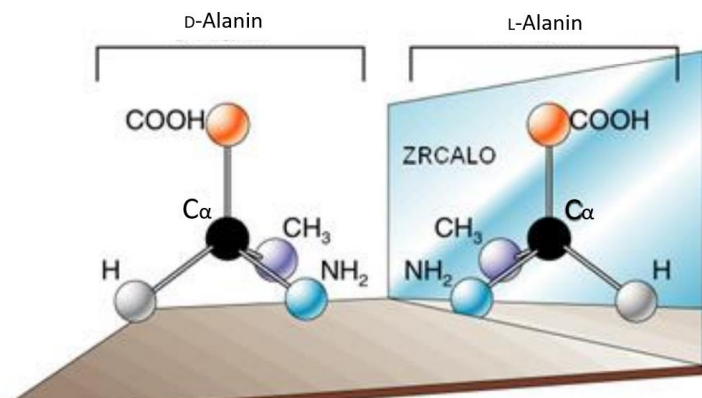
U Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta zadnjih se godina sintezi peptidomimetika pristupa umetanjem 1,1'-disupstituiranih ferocenskih kalupa u peptidnu sekvenciju s ciljem indukcije okreta, dok uspostava vodikovih veza između podandnih peptidnih lanaca vezanih na ferocenske prstenove inducira tvorbu strukture nalik β -nabranoj ploči (Barišić, 2018a).

U ovom radu opisana je sinteza i strukturna karakterizacija konjugata metil 1'-aminoferocen-1-karboksilata i alanina. Najprije je opisana sinteza dvaju enantiomernih dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**) koji su bili prekursori za sintezu Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) kao ciljnih spojeva. Potom je provedena spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) pri čemu su snimljeni ^1H -, ^{13}C -, COSY i NOESY NMR-spektri dipeptida **4** i **5** kako bi se provela njihova strukturna i konformacijska karakterizacija. U ^1H - i ^{13}C -NMR spektrima očekuje se gubitak signala protona iz Boc-skupine te pojava signala protona iz Ac-zaštitne skupine, dok se u NOESY NMR spektrima očekuje pojava kontakata između udaljenih donorskih i akceptorskih skupina čime bi se indicirala tvorba intramolekulskih vodikovih veza te uspostava okreta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Građa i struktura proteina

Proteini su važne biološke makromolekule, neophodne za odvijanje esencijalnih procesa u živim organizmima poput prijenosa živčanih impulsa, enzimske katalize, kontrole rasta i diferencijacije stanica. Izgrađeni su iz 20 različitih, proteinogenih aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. U aminokiselinama se između amino- i karboksilne skupine nalazi središnji ugljikov atom (C_{α} -atom) na koji je uz vodik vezan bočni ogranak R, što ih čini kiralnim i optički aktivnim molekulama (uz iznimku glicina na čiji su C_{α} -atom vezana dva vodikova atoma) (slika 1.). Javljaju se u dva enantiomerna oblika (L- i D-), a u prirodnim je proteinima utvrđeno prisustvo samo L-aminokiselina (Stryer i sur., 2013).



Slika 1. L- i D- enantiomeri alanina (Knežević, 2013).

Usljed nekovalentnih interakcija između dijelova peptidne okosnice kao i bočnih ograna dolazi do nabiranja proteina u uređene trodimenzijske strukture i tvorbe nativne konformacije, čime se omogućava njihovo biološko djelovanje. S obzirom na trodimenzijsku strukturu, definirane su četiri strukturne razine proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvatema struktura (Stryer i sur., 2013).

Primarna struktura definirana je slijedom aminokiselina povezanih amidnom vezom u polipeptidnom lancu.

Do uspostave sekundarne strukture dolazi uslijed tvorbe vodikovih veza (eng. *Intramolecular Hydrogen Bond*, IHB) između donorske (N-H) i akceptorske (C=O) skupine iz aminokiselina, i to unutar istog ili između susjednih polipeptidnih lanaca što omogućuje njihovo nabiranje i zauzimanje pravilne strukture poput α -uzvojnice, β -nabrane ploče te raznih okreta, a koja od njih će se formirati ovisi o obrascu vodikove veze:

- α -uzvojnica je spiralna i čvrsta struktura čiju unutrašnjost čini u helično namotana okosnica peptidnog lanca, dok su aminokiselinski ogranci orijentirani prema van. Za čvrstoću i stabilnost α -uzvojnice zaslužne su vodikove veze nastale povezivanjem C=O skupine aminokiselinskog ostatka i te N-H skupine aminokiselinskog ostatka $i+4$ što uzrokuje zatvaranje 13-članih IHB-prstenova,
- β -nabrana ploča nastaje povezivanjem dvaju ili više istegnutih polipeptidnih lanaca između kojih se uspostavljaju NH...OC vodikove veze. S obzirom na usmjerenje lanaca, β -nabrana ploča može biti paralelna [pri čemu su lanci jednako usmjereni (gledano od N - prema C -terminusu), a vodikovim vezama zatvaraju se 12-člani prstenovi] te antiparalelna (susjedni peptidni lanci imaju suprotnu orijentaciju te dolazi do tvorbe 10- i 14-članih prstenova) (Kovačević, 2014),
- okreti su mjesta u polipeptidnoj okosnici na kojima dolazi do nagle promjene smjera okosnice, a odgovorni su za nabiranje okosnice i zauzimanje globularne strukture (Kovačević i sur., 2021). Stabiliziraju se intramolekulskim vodikovim vezama, pri čemu nastaju prstenovi različitih veličina. U slučaju uspostave 7-članog prstena govorimo o γ -okretu, zatvaranje 10-članog prstena rezultira nastajanjem β -okreta, 13-člani prsten odgovara α -uzvojnici, dok zatvaranjem 16-članog prstena nastaje π -okret. Najčešći su β -okreti, definirani tetrapeptidnom sekvencijom za koju je karakteristična udaljenost između ostataka $C_{\alpha}(i)$ i $C_{\alpha}(i+3)$ manja ili jednaka 7Å. Zahvaljujući svojoj hidrofilnosti, okreti se nalaze na površini proteinskih molekula što im omogućava sudjelovanje u molekulskom prepoznavanju te interakcijama s drugim molekulama zbog čega su često uključeni u imunološke, metaboličke, endokrine i hematološke reakcije u organizmu (Kovačević, 2014; Nair i sur., 2014).

Tercijarna struktura predočava prostorni odnos aminokiselinskih ostataka koji su u linearnom slijedu vrlo udaljeni, a u bliski kontakt dolaze savijanjem polipeptidnog lanca.

Proteini čija građa uključuje dva ili više polipeptidna lanaca zauzimaju kvatemu strukturu kojom je opisan njihov prostorni razmještaj te uspostavljene interakcije (Kovačević, 2014).

2.2. Peptidomimetici

Iako se proteini odlikuju brojnim biološkim i strukturnim karakteristikama koje upućuju na njihov golemi terapijski potencijal, primjena u medicinske svrhe im je ograničena uslijed mnogih neželjenih biokemijskih i farmaceutskih svojstava (Jerić, 2004; Kovačević i

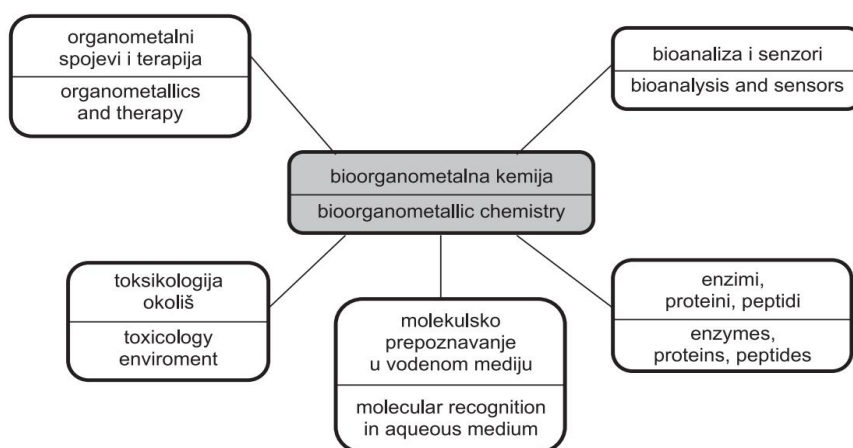
sur., 2021). Naime, zbog polarnog karaktera proteini nisu u mogućnosti prolaziti kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru te su nestabilni u fiziološkim uvjetima. Osim toga, mogućnost zauzimanja različitih energetski ekvivalentnih konformacija dovodi do interakcija s neželjenim receptorima te do otežanog vezanja na željene receptore. Također, zbog niske metaboličke stabilnosti u gastrointestinalnom traktu, podložni su djelovanju proteolitičkih enzima te se brzo se izlučuju kroz jetru i bubrege. Potreba za prevladavanjem opisanih nepovoljnih svojstava proteina dovela je do intenziviranja istraživanja mimetika prirodnih peptida i proteina kao heterogene skupine spojeva čija je glavna karakteristika oponašanje fizikalnih i biokemijskih svojstava peptida (Jerić, 2004; Kovačević i sur., 2014).

Peptidomimetici se definiraju kao peptidni ili nepeptidni spojevi koji kao ligandi imaju mogućnost oponašanja ili inhibicije biološkog djelovanja peptidnih receptora zahvaljujući zauzimanju sekundarnih strukturnih elemenata (α -uzvojnica, β -nabrana ploča te β - i γ -okreti) analognih sekundarnim strukturnim elementima prisutnima u bioaktivnim konformacijama prirodnih peptida, što im omogućava oponašanje njihovih bioloških funkcija (Giannis i Kolter, 1993; Kovačević i sur., 2021). U usporedbi s prirodnim peptidima, kod peptidomimetika je uočena veća metabolička stabilnost i selektivnost, bolja bioraspoloživost i neznatne nuspojave (Giannis i Kolter, 1993). Otkriće potencijalnih terapijskih peptida predstavlja prvi korak u razvoju njihove primjene, a modifikacija nepovoljnih svojstava prirodnih peptida čime se poboljšavaju njihova farmakološka svojstva omogućava upora bu peptidomimetika u terapijske svrhe (Wang i sur., 2022).

2.3. Bioorganometalna kemija

Bioorganometalna kemija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem konjugata biomolekula i organometalnih spojeva za koje je karakteristično prisustvo barem jedne metal-ugljik veze koja potječe iz organske molekule. Kontrola biološke aktivnosti bioorganometalnih spojeva omogućena je elektronskim i steričkim efektima između metalnog i ugljikovog atoma (Jaouen i sur., 2006; Popović, 2012). Na aktivnost bioorganometalnih spojeva, osim metala i njegovog oksidacijskog stanja, značajan utjecaj ima broj i položaj biomolekula u spoju te njegova geometrija u prostoru. Međutim, veliki je izazov razjasniti kemijsko dje lovanje bioorganometalnih spojeva direktno u stanicama (Zhang i Sadler, 2017). Od prirodnih bioorganometalnih spojeva, najviše se ističe vitamin B12 s $\text{CH}_3\text{-Co}$ vezom, a njegova glavna uloga jest biometiliranje ekološki važnih metalnih iona poput Hg^{2+} i Sn^{4+} koji mogu tvoriti komplekse toksične po zdravlje ljudi (Fish i Jaouen, 2003).

U jednu od najpoznatijih skupina bioorganometalnih spojeva ubrajaju se metalloceni, molekule izgrađene od dvaju ciklopentadienilnih prstenova vezanih na atom metala. Istraživanje metallocena doživjelo je propulzivni razvoj nakon otkrića ferocena koji u svojoj strukturi sadrži dva ciklopentadienilna prstena vezana na atom željeza i smatra se njihovim glavnim predstavnikom (Gasser i sur., 2011). Tijekom posljednjeg desetljeća, bioorganometalna kemija doživjela je snažan i brz razvoj uslijed čega je sintetizirano i proučeno mnoštvo bioorganometalnih spojeva koji su svoju primjenu našli u područjima biokemije, biomedicine, biotehnologije, farmacije, bioanalitike (biosonde, genosenzori, imunotestovi...), te u dijagnosticiranju i terapiji karcinoma (slika 2.) (Rapić i Čakić Semenčić, 2011; Zhang i Sadler, 2017).



Slika 2. Pet glavnih istraživačkih područja u bioorganometalnoj kemiji (Rapić i Čakić Semenčić, 2011).

2.3.1. Ferocen

Ferocen $[(C_5H_5)_2Fe]$ je bioorganometalni spoj u kojem se željezov kation (Fe^{2+}) nalazi vezan između dvaju 6π -elektronskih ciklopentadienilnih aniona (Cp^-) zbog čega je prepoznatljiv kao „sendvič-molekula“. S obzirom na to da je ferocen mala i lipofilna molekula s odličnim redoks-svojstima, dobre topljivosti u organskim otapalima i stabilnosti u zraku te se jednostavno kemijski modificira, najčešći je predmet proučavanja u bioorganometalnoj kemiji (Kovač i sur., 2016). U današnje vrijeme, njegovo je područje primjene široko te ga je osim u bioorganometalnoj kemiji moguće pronaći u bioanalitičkoj kemiji, optičkim i redoks-uređajima, sensorima, u brojnim katalitičkim procesima, te biomedicini i lijekovima (Astruc, 2017; Čakić Semenčić i sur., 2017).

2.3.2. Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama

Zbog svoje specifične strukture, ferocen se često koristi kao rigidni kalup koji umetanjem u peptidnu okosnicu inducira tvorbu okreta i struktura nalik β -pločama, ograničavajući pritom konformacijsku slobodu peptida čime se smanjuje njegova fleksibilnost (Kovačević i sur., 2021). Prilikom sinteze peptidomimetika, 1,1'-disupstituirani feroceni pokazali su se različnim kalupima za uvođenje okreta zahvaljujući specifičnoj udaljenosti od 3,3 Å između dvaju ciklopentadienilnih prstenova koja omogućava uspostavu IHB između dvaju peptidnih lanaca vezanih na ferocenske prstenove čime se postiže struktura nalik β -nabranoj ploči (Barišić i sur., 2012).

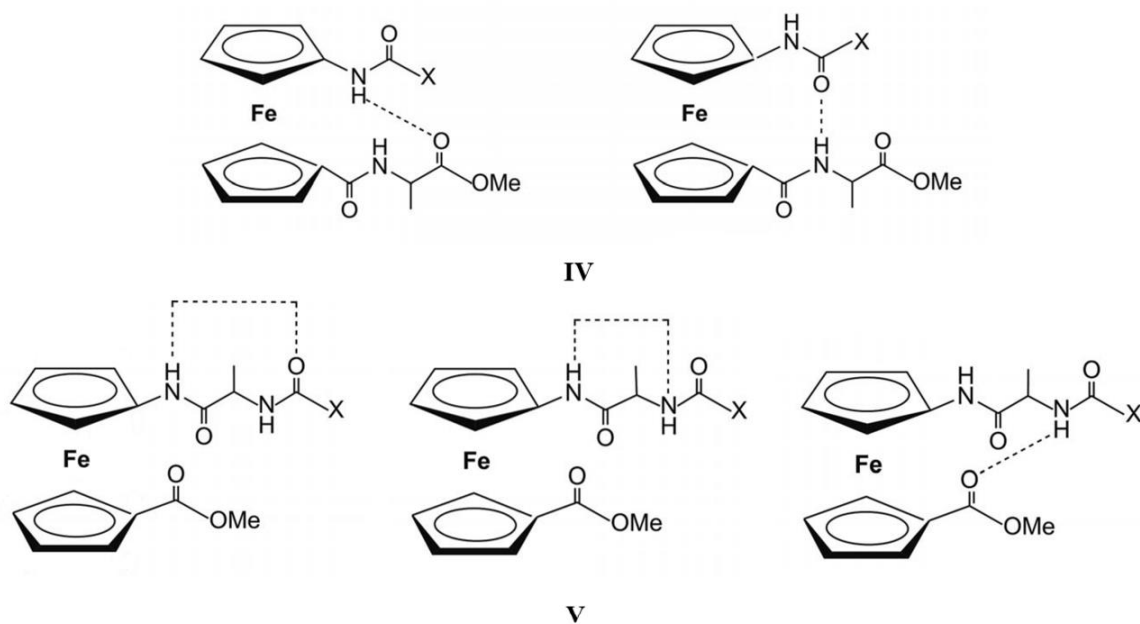
Prema strukturi ferocenskog prekursora, disupstituirani ferocenski peptidomimetici dijele se u tri skupine:

- **Fn-[CO-*AK*-OMe]₂ (I)** izvedeni iz ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline i prirodnih aminokiselina pri čemu se tvori 10-člani IHB-prsten,
- **Y-*AK*-NH-Fn-CO-*AK*-OMe (II)** izvedeni iz 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline i prirodnih aminokiselina, a karakterizira ih prisustvo 12-članog IHB-prstena, te
- **Fn-[NH-*AK*-Y]₂ (III)** izvedeni iz ferocen-1,1'-diamina i prirodnih aminokiselina, a uspostavlja se 14-člani IHB-prsten (2 simultana 10-člana IHB-prstena ili strukture nalik β -okretima) [Fn = ferocenilen, *AK* = aminokiselina, Y = Ac (acetil), Boc (*tert*-butoksikarbonil)] (Barišić, 2018a).

Naime, simetrično disupstituirani konjugati **I** stabilizirani su intramolekulskim vodikovim vezama odn. 10-članim IHB-prstenima što rezultira uspostavom β -okreta. Nadalje, kod simetrično disupstituiranih konjugata **III** također dolazi do tvorbe IHB koje u ovom slučaju omogućuju nastajanje dvaju β -okreta. Uz to, za konjugate **I** i **III** karakteristično je samo paralelno usmjerenje peptidnih lanaca. Za razliku od toga, konjugati **II** specifični su po tome što induciraju okrete pri čemu su peptidni lanci antiparalelni, odnosno imaju suprotno usmjerenje.

Rezultati prethodno provedenih istraživanja alaninskih konjugata **IV** (Y-NH-Fn-*AK*-CO-OMe) i **V** (Y-*AK*-NH-Fn-CO-OMe) (Y = Ac, Boc; *AK* = L-Ala, D-Ala), ukazuju na uspostavu elemenata sekundarne strukture, a konformacijska svojstva navedenih ferocenskih dipeptida ovisna su o broju i vrsti donora vodikove veze. Kod konjugata **IV** uočeno je isključivo prisustvo IHB, dok su konjugati **V** stabilizirani inter- i intramolekulskim vodikovim vezama. Osim toga, zamjena voluminozne Boc- s Ac-zaštitnom skupinom nije uzrokovala značajne konformacijske promjene, a kod enantiomernih konjugata s L- odn. D-Ala

također nije došlo do promjene konformacijskih svojstava (Barišić i sur., 2012). Na slici 3. prikazani su konjugati **IV** i **V**.



Slika 3. Uspostava vodikovih veza kod konjugata **IV** i **V** (IHB su označene isprekidanim crtama) (Barišić i sur., 2012).

U sklopu ovog završnog rada pripravljene su veće količine alaninskih konjugata **V**, koji će za potrebe realizacije ciljeva definiranih Radnim planom HRZZ-projekta biti derivatizirani u heteroanularno disupstituirane peptidomimetike.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode rada

Kemikalije korištene u sintezi bile su analitičke čistoće, dok su otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim postupcima (Armarego i Perrin, 1988).

Kontrola čistoće sintetiziranih spojeva i tijekom reakcija ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm). Produkti su pročišćeni tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uporabom etil-acetata kao eluensa.

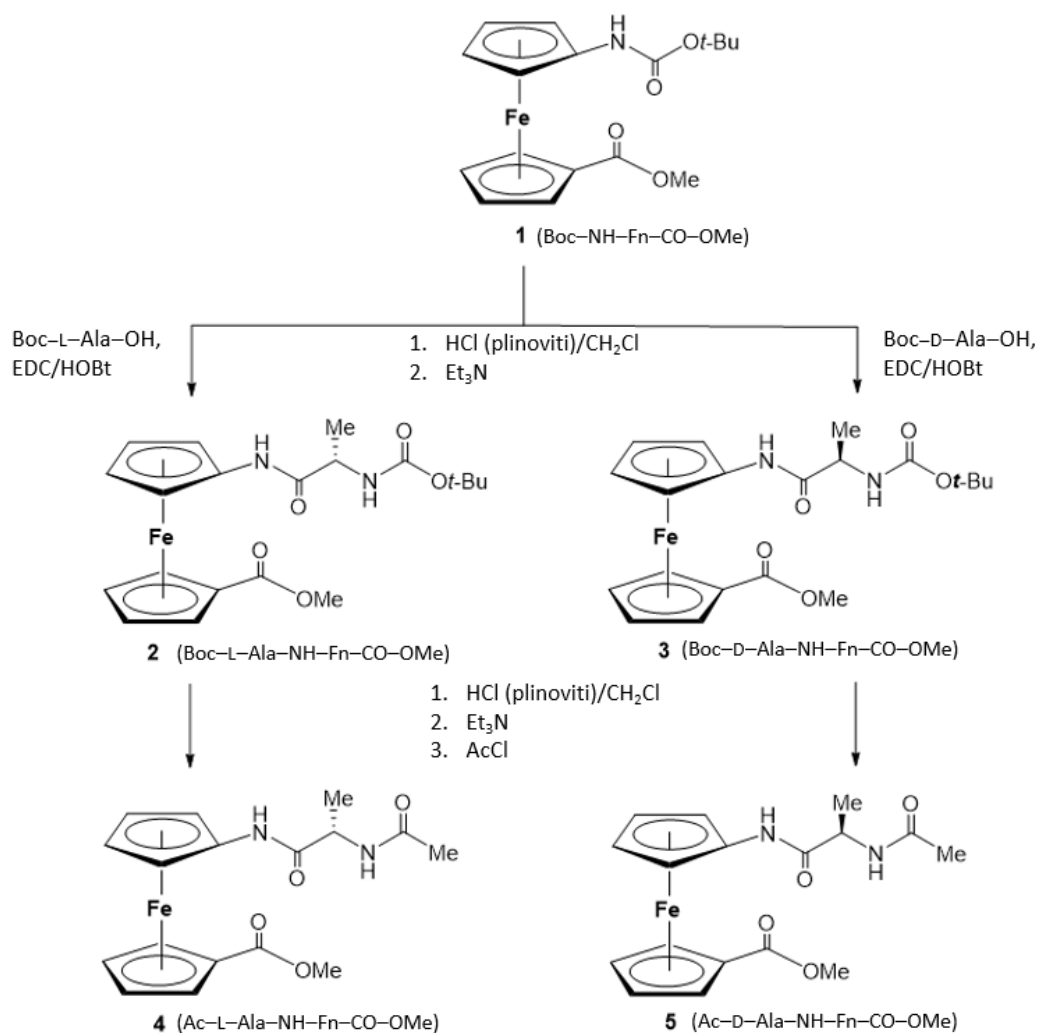
Strukturna karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR). ¹H- i ¹³C- NMR-spektri određeni su u CDCl₃ na spektrometru Bruker AV300 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. 2D NMR spektri (COSY; NOESY) izmjereni su kako bi se olakšala asignacija signala. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. Cijepanja signala u NMR-spektrima: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), pt (pseudotriplet).

Tališta su određena na Reichert Thermovar HT 1 BT 11 i nisu korigirana.

Sinteza Boc-NH-Fn-CO-OMe (**1**) opisana je u literaturi (Barišić i sur., 2002), a ovdje dobiveni spektroskopski podaci odgovaraju literaturnim navodima.

3.2. Sinteza ciljnih peptida **4** i **5**

Ciljni dipeptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) sintetizirani su prema ranije objavljenom postupku (Barišić i sur., 2012) prikazanim na shemi 1.

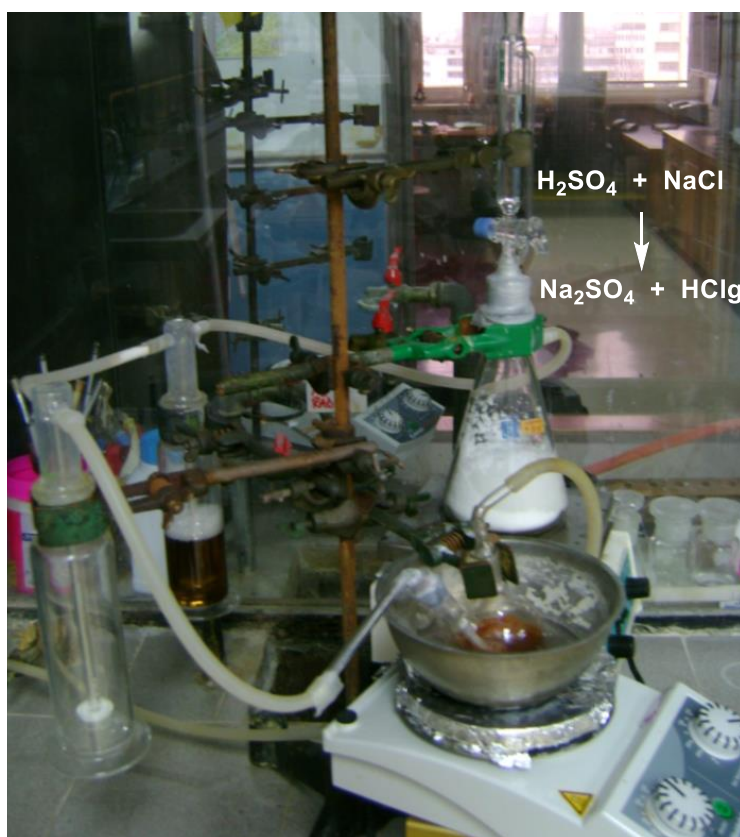


Shema 1. Sinteza dipeptida 4 i 5.

3.2.1. Sinteza dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (2) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (3)

Potpuno zaštićena ferocenska aminokiselina Boc-NH-Fn-CO-OMe (1) (1 g, 2,8 mmol) otopljena je u diklormetanu i podvrgnuta Boc-deprotekciji djelovanjem plinovitog HCl-a pri 0°C (slika 4.). Nakon ~30 minuta miješanja u ledenoj kupelji te otparavanja na rotacijskom vakuum-uparivaču, nastali se hidroklorid ferocenske aminokiseline suspendira u CH₂Cl₂ i obradi suviškom Et₃N (pH~9). Tako dobiveni slobodni amin kopulira se s Boc-L-Ala-OH, odnosno Boc-D-Ala-OH (0,8 g, 4,2 mmol) primjenom standardnog EDC/HOBt postupka. Tijek reakcije prati se TLC-metodom u sustavu CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1 uzimanjem uzorka iz reakcijske smjese. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃, 10%-tnom otopinom limunske kiseline

te ponovno zasićenom vodenom otopinom NaHCO_3 . Organski se sloj osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. U tablici 1. navedeni su supstrati i reagensi korišteni za sintezu dipeptida **2** i **3**.



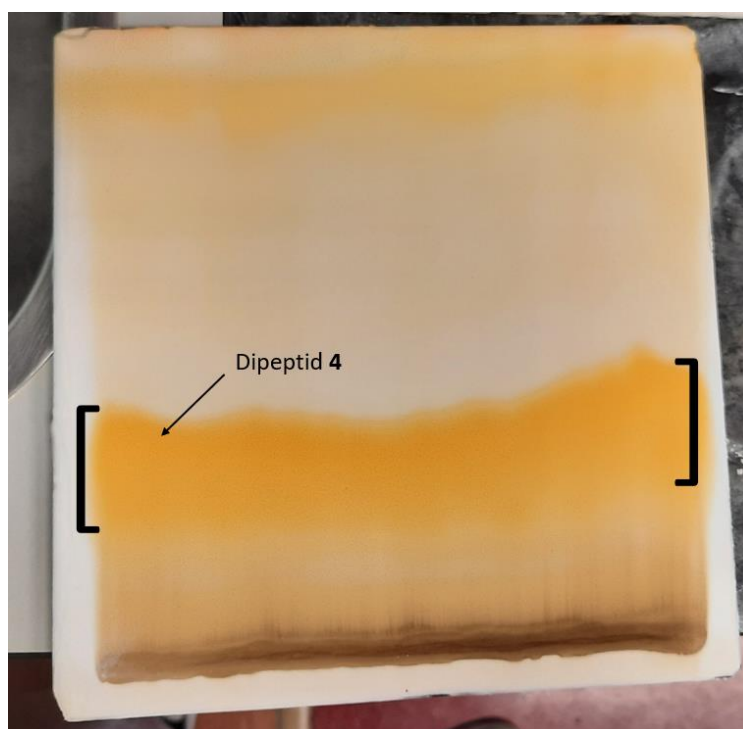
Slika 4. Boc-deprotekcija Boc-NH-Fn-CO-OMe (**1**) djelovanjem plinovitog HCl (Bebek, 2012).

Tablica 1. Supstrati i reagensi korišteni tijekom sinteze dipeptida **2** i **3**.

	Supstrat (g/mmol)	Aminokiselina (g/mmol)	Reagensi za kopulaciju (g/mmol)		Masa sirovog produkta (g)
			EDC	HOBt	
2	Boc-NH-Fn-CO-OMe (1) (1 g; 2,8 mmol)	Boc-L-Ala-OH (0,8 g; 4,2 mmol)	0,96 g; 5,04 mmol	0,68 g; 5,04 mmol	1,3 g
3	Boc-NH-Fn-CO-OMe (1) (1 g; 2,8 mmol)	Boc-D-Ala-OH (0,8 g; 4,2 mmol)	0,96 g; 5,04 mmol	0,68 g; 5,04 mmol	1,9 g

3.2.2. Sinteza dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (4) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (5)

Ciljni Ac-dipeptidi **4** i **5** sintetizirani su iz prekursora Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**). U suspenziju pojedinačnog Boc-peptida (**2** i **3**) u diklormetanu pri 0°C uvodi se plinoviti HCl. Nakon što se TLC-om utvrdi potpuno deprotektiranje peptida, otapalo se upari, a nastali se hidroklorid suspendira u suhom diklormetanu i otopi uz Et₃N do pH~7. Dobivena se otopina slobodnog amina ohladi na 0 °C te se uz miješanje oprezno se dokapa acetyl-klorid. Nakon 15' miješanja pri 0 °C, reakcijska se smjesa izlije u vodu i više puta ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom vodenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Sirovi produkt pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silikagelu uz EtOAc pri čemu se dobiva 700 mg (**4**) i 800 mg (**5**) narančastih kristala. Na slici 5. prikazan je postupak pročišćavanja sirovog produkta Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) tankoslojnom kromatografijom na silikagelu, dok je na slici 6. prikazano uparavanje diklormetanske otopine pročišćenog dipeptida **4**. U tablici 2. navedeni su supstrati i reagensi korišteni za sintezu dipeptida **4** i **5**.



Slika 5. Pročišćavanje sirovog produkta tankoslojnom preparativnom kromatografijom (vlastita fotografija).



Slika 6. Uparavanje diklormetanske otopine pročišćenog dipeptida **4**
(vlastita fotografija).

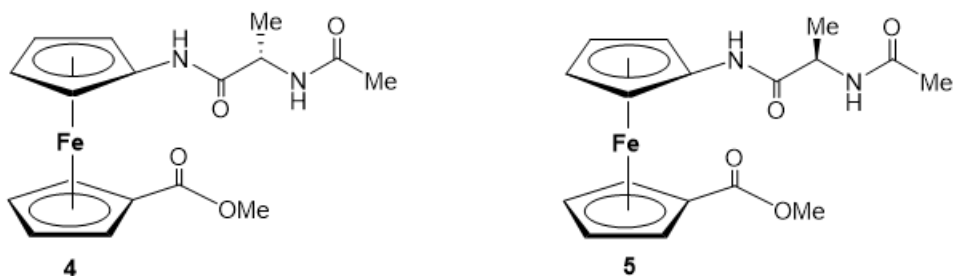
Tablica 2. Supstrati i reagensi korišteni tijekom sinteze dipeptida **4** i **5**.

	Supstrat (g/mmol)	AcCl (ml)	Iskorištenje (mg/%)	Opis produkta
4	Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (2) (1,3 g; 3,02 mmol)	1,22	700 mg (62,27%)	narančasti kristali
5	Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (3) (1,9 g; 4,42 mmol)	1,78	800 mg (48,63%)	narančasti kristali

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

U sklopu ovog završnog rada sintetizirani su enantiomerni ferocenski dipeptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) čije strukturne formule prikazuje slika 7.



Slika 7. Strukturna formula sintetiziranih ferocenskih dipeptida **4** i **5**.

Strukturna karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR), jedne od najvažnijih instrumentalnih metoda u organskoj kemiji za određivanje kemijske strukture molekula (Lazar, 2005). Kako bi se ispitala sekundarna struktura pripremljenih dipeptida **4** i **5**, u Centru za nuklearnu magnetsku rezonanciju na Institutu Ruđer Bošković snimljeni su jednodimenzijски (^1H ; ^{13}C) i dvodimenzijски (COSY; NOESY) NMR-spektari. Obrada snimljenih spektara izvršena je u programu SpinWorks 4.

Iz ^1H NMR-spektara moguće je dobiti četiri vrste informacija: (1) broj signala koji odgovara broju različitih vrsta vodikovih atoma u molekuli, (2) kemijski pomak koji govori o kojoj se vrsti vodikovih atoma radi, (3) površina ispod signala koja odgovara broju vodikovih atoma odgovarajuće vrste, (4) cijepanje signala koje ukazuje na broj susjednih vodikovih atoma (Barišić, 2018b).

^{13}C NMR-spektroskopija omogućava detekciju ugljikovih atoma, a s obzirom na to da je manje je osjetljiva od ^1H NMR-spektroskopije, signali ugljikovih atoma slabiji su od signala protona (Barišić, 2018b).

Dvodimenzijaska spektroskopija COSY (eng. *Correlation Spectroscopy*) metoda je za detekciju homonuklearnih korelacija kroz susjedne veze što omogućava identifikaciju susjednih vodikovih atoma međusobno povezanih kovalentnim kemijskim vezama (Elyashberg, 2015).

U peptidnoj kemiji značajnu ulogu ima 2D NOESY (eng. *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) spektroskopija kojom se ispituje prostorni odnos dviju vodikovih jezgri čija je udaljenost u prostoru manja od 5 Å (Elyashberg, 2015). Za određivanje elemenata sekundarne strukture u peptidima, upotrebljavaju se analize ^1H - ^1H NOE kontakata u njihovim NOESY NMR spektrima (Hasl, 2020).

4.2. Priprava dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (2) i

Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (3)

Deprotekcija amino-skupine iz prekursora Boc-NH-Fn-CO-OMe (1) provedena je u diklormetanu pomoću plinovitog HCl pri čemu nastaje nestabilni hidroklorid ferocenske aminokiseline koji se obradi sa suviškom Et_3N . Potom slijedi kopulacija rezultirajućeg slodobnog amina s Boc-L-Ala-OH i Boc-D-Ala-OH primjenom standardne EDC/HOBt metode. U tablicama 3. i 4. navedeni su rezultati provedenih spektroskopskih mjerenja za resintetizirane ferocenske dipeptide Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (2) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (3) koji su preuzeti iz prethodno objavljenog rada (Barišić i sur., 2012).

Tablica 3. Rezultati provedenih mjerenja za dipeptid 2 (Barišić i sur., 2012).

Dipeptid 2	
R_f-vrijednost	0,5 (CH ₂ Cl ₂ : EtOAc = 5 : 1)
Talište (t_t)	102-105 °C
^1H- i ^{13}C- NMR spektroskopija	
^1H -NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ /ppm: 7.64 [s, 1H, NH _{Fn}], 5.14 [d, J = 7.6 Hz, 1H, NH _{Ala}], 4.76 (m, 2H, 7-H, 10-H), 4.68 (s, 1H, 2-H), 4.57 (s, 1H, 5-H), 4.38 (m, 2H, 8-H, 9-H), 4.23 [m, 1H, CH _{Ala}], 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.02 (m, 1H, 3-H), 3.80 (s, 3H, CH ₃ COOMe), 1.48 [s, 9H, CH ₃ Boc], 1.42 [d, J = 7.07 Hz, 3H, CH ₃ Ala].	
^{13}C -NMR (APT, 75 MHz, CDCl ₃) δ /ppm: 171.89 [CO _{COOMe}], 171.19 [CO _{Ala}], 156,1 [CO _{Boc}], 95.30 (C-1), 80.6 [C _{qBoc}], 72.71 (2C, C-8, C-9), 72.14 (C-6), 71.40 (C-10), 71.26 (C-7), 66.64 (C-4), 66.38 (C-3), 63.31 (C-2), 62.99 (C-5), 51.81 [2C, CH ₃ COOMe, CH _{Ala}], 28.52 [CH ₃ Boc], 17.95 [CH ₃ Ala].	

Tablica 4. Rezultati provedenih mjerenja za dipeptid **3** (Barišić i sur., 2012).

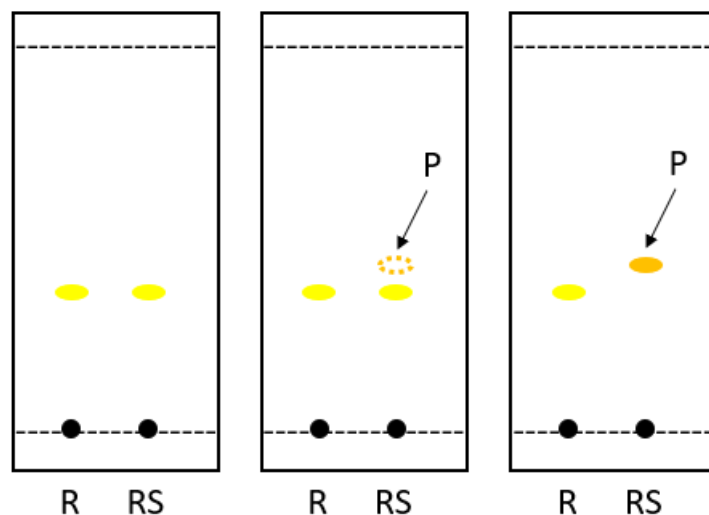
Dipeptid 3	
R_F-vrijednost	0,49 (CH ₂ Cl ₂ : EtOAc = 5 : 1)
Talište (t_t)	102-107 °C
¹H- i ¹³C- NMR spektroskopija dipeptida 3	
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 7.63 [s, 1H, NH _{F_n}], 5.14 [d, <i>J</i> = 6.93 Hz, 1H, NH _{Ala}], 4.76 (m, 2H, 7-H, 10-H), 4.68 (s, 1H, 2-H), 4.57 (s, 1H, 5-H), 4.38 (m, 2H, 8-H, 9-H), 4.22 [m, 1H, CH _{Ala}], 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.02 (m, 1H, 3-H), 3.80 (s, 3H, CH ₃ COOMe), 1.48 [s, 9H, CH ₃ Boc], 1.43 [d, <i>J</i> = 6.98 Hz, 3H, CH ₃ Ala].	
¹³ C-NMR, APT (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 171.88 [CO _{COOMe}], 171.17 [CO _{Ala}], 156.02 [CO _{Boc}], 95.28 (C-1), 80.61 [C _q Boc], 72.70 (2C, C-8, C-9), 72.13 (C-6), 71.39 (C-10), 71.25 (C-7), 66.64 (C-4), 66.38 (C-3), 63.30 (C-2), 62.99 (C-5), 51.80 [2C, CH ₃ COOMe, CH _{Ala}], 28.51 [CH ₃ Boc], 17.94 [CH ₃ Ala].	

4.3. Priprava strukturna karakterizacija ciljnih enantiomernih dipeptida

Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**)

Prethodno sintetizirani enantiomerni dipeptidi **2** i **3** podvrgnuti su Boc-deprotekciji nakon čega su rezultirajući hidrokloridi suspendirani u diklormetanu i tretirani s Et₃N, kako je to opisano pod 4.2. Nastali slobodni amini podvrgnuti su djelovanju acetil-klorida pri čemu su nastali ciljni peptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**).

Pretvorba dipeptida **2** i **3** u ciljne enantiomerne dipeptide **4** i **5** praćena je tankoslojnom kromatografijom u sustavu CH₂Cl₂ : EtOAc = 5 : 1. Na samom početku reakcije na startnu liniju kromatografske pločice staklenom se kapilarnom nanese reaktant (R), a u drugu točku reakcijska smjesa (RS) i razvije se početni kromatogram. Ukoliko su kao na prikazanoj slici 8. R_F-vrijednosti za R i RS jednake, reakcija još nije započela. Stoga se nakon određenog vremena (15') ponovno na kromatografsku pločicu nanesu R i RS pri čemu se uočava pojavljivanje nove mrlje slabijeg intenziteta i veće R_F-vrijednosti koja odgovara produktu (P). Reakcija se provodi pri istim uvjetima sve do nestanka mrlje RS i njene pretvorbe u P.



Slika 8. TLC-praćenje tijekom reakcije $2 \rightarrow 4$ i $3 \rightarrow 5$.

U tablicama 5. i 6. prikazani su rezultati provedenih spektroskopskih mjerenja za novosintetizirane ferocenske dipeptide **4** i **5**, kojima je nedvojbeno dokazana njihova kemijska struktura. S obzirom na to da se radi o enantiomernim spojevima, njihova su skalarna svojstva vrlo slična i odgovaraju onima opisanima u prethodno objavljenoj publikaciji (Barišić i sur., 2012).

Tablica 5. Rezultati provedenih mjerenja za dipeptid **4**.

Dipeptid 4	
R_F-vrijednost	0,4 (EtOAc)
Talište (t_f)	102-105 °C
¹H- i ¹³C- NMR spektroskopija	
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 8.29 [s, 1H, NH _{F_n}], 6.60 [d, <i>J</i> = 7.49 Hz, 1H, NH _{Ala}], 4.75 (m, 1H, 7-H), 4.73 (m, 1H, 10-H), 4.66 (m, 1H, 2-H), 4.61 [m, 2H, CH _{Ala}], 4.37 (m, 2H, 8-H, 9-H), 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.01 (m, 1H, 3-H), 3.78 (s, 3H, CH ₃ COOMe), 2.08 [s, 3H, CH ₃ Ac], 1.44 [d, <i>J</i> = 7.00 Hz, 3H, CH ₃ Ala].	
¹³ C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 171.91 [CO _{COOMe}], 170.9 [CO _{Ala}], 170.65 [CO _{Ac}], 95.36 (C-1), 72.62 (2C, C-8, C-9), 72.16 (C-6), 71.38 (C-10), 71.25 (C-7), 66.61 (C-4), 66.31 (C-3), 63.29 (C-2), 63.03 (C-5), 51.80 [CH ₃ COOMe], 49.43 [CH _{Ala}], 23.40 [CH ₃ Ac], 18.20 [CH ₃ Ala].	

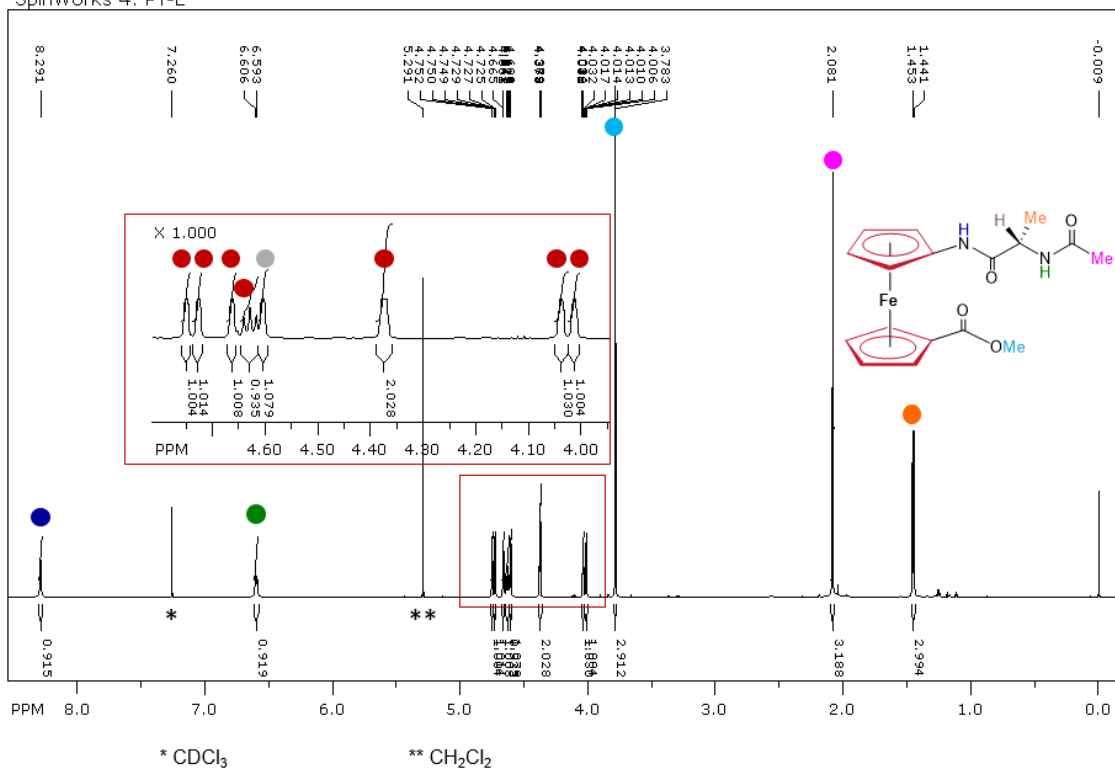
Tablica 6. Rezultati provedenih mjerenja za dipeptid **5**.

Dipeptid 5	
R_F-vrijednost	0,4 (EtOAc)
Talište (t_i)	102-107 °C
¹H- i ¹³C- NMR spektroskopija	
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 8.23 [s, 1H, NH _{F_n}], 6.54 [d, <i>J</i> = 7.29 Hz, 1H, NH _{Ala}], 4.75 (m, 1H, 7-H), 4.73 (m, 1H, 10-H), 4.67 (m, 1H, 2-H), 4.61 [m, 2H, CH _{Ala}], 4.38 (m, 2H, 8-H, 9-H), 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.01 (m, 1H, 3-H), 3.79 (s, 3H, CH _{3COOMe}), 2.09 [s, 3H, CH _{3Ac}], 1.45 [d, <i>J</i> = 6.96 Hz, 3H, CH _{3Ala}].	
¹³ C-NMR, APT (75 MHz, CDCl ₃) δ/ppm: 171.88 [CO _{COOMe}], 170.86 [CO _{Ala}], 170.63 [CO _{Ac}], 95.32 (C-1), 72.61 (2C, C-8, C-9), 72.19 (C-6), 71.40 (C-10), 71.25 (C-7), 66.63 (C-4), 66.31 (C-3), 63.34 (C-2), 63.04 (C-5), 51.80 [CH _{3COOMe}], 49.41 [CH _{Ala}], 23.43 [CH _{3Ac}], 18.13 [CH _{3Ala}].	

4.3.1. NMR spektroskopska analiza dipeptida **4** i **5**

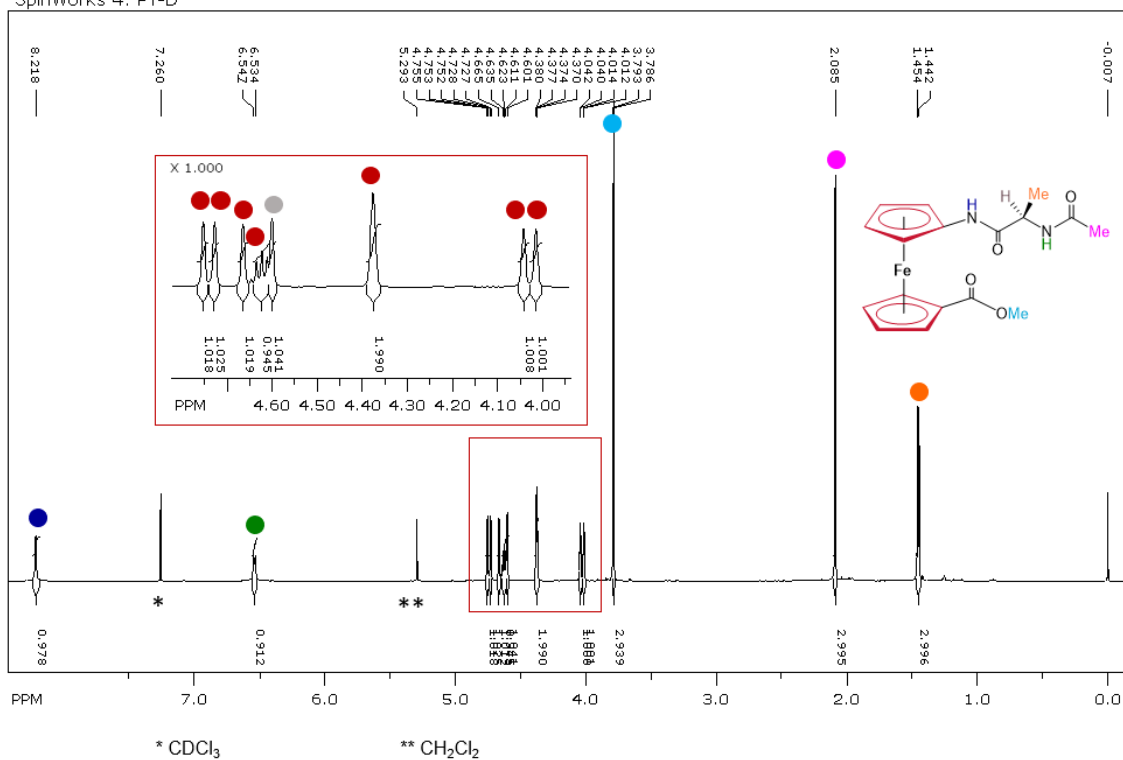
U ¹H NMR-spektrima dipeptida **4** i **5** (slike 9. i 10.) amidni protoni iz alaninske podjedinice (NH_{Ala}) javljaju se u dubletima zahvaljujući svojoj sprezi sa susjednim metinskim protonima, dok su protoni iz NH_{F_n} predstavljeni kao singleti. Protoni iz CH_{3Ala} također su registrirani kao dubleti zbog sprege s jednim vodikovim atomom iz susjedne metinske skupine. Najviši kemijski pomak pripisuje se odsjenjenim protonima iz NH-skupina vezanima na ferocenski prsten [δ=8,29 ppm (**4**); δ= 8,23 ppm (**5**)], dok je najniži kemijski pomak zabilježen kod protona iz CH_{3Ala} [δ= 1,44 ppm (**4**); δ= 1,45 ppm (**5**)]. Upravo visoki kemijski pomaci za NH_{F_n} upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, budući da vodikova veza odsjenjuje proton koji zbog toga rezonira pri jačem polju. Istovremeno, NH_{Ala} protoni javljaju se pri jačem polju (δ < 7 ppm), što indicira njihovo nesudjelovanje u vodikovim vezama. U odnosu na ¹H NMR-spektre Boc-prekursora **2** i **3**, u ¹H NMR-spektrima dipeptida **4** i **5** uočljiv je očekivani izostanak singleta protona iz Boc-zaštitne skupine [δ= 1,48 ppm (**2**, **3**)] te se javljaju novi signali pri δ= 2,08 ppm (**4**), odnosno δ= 2,09 ppm (**5**) koji pripadaju metilnim protonima iz acetilne skupine.

SpinWorks 4: PT-L



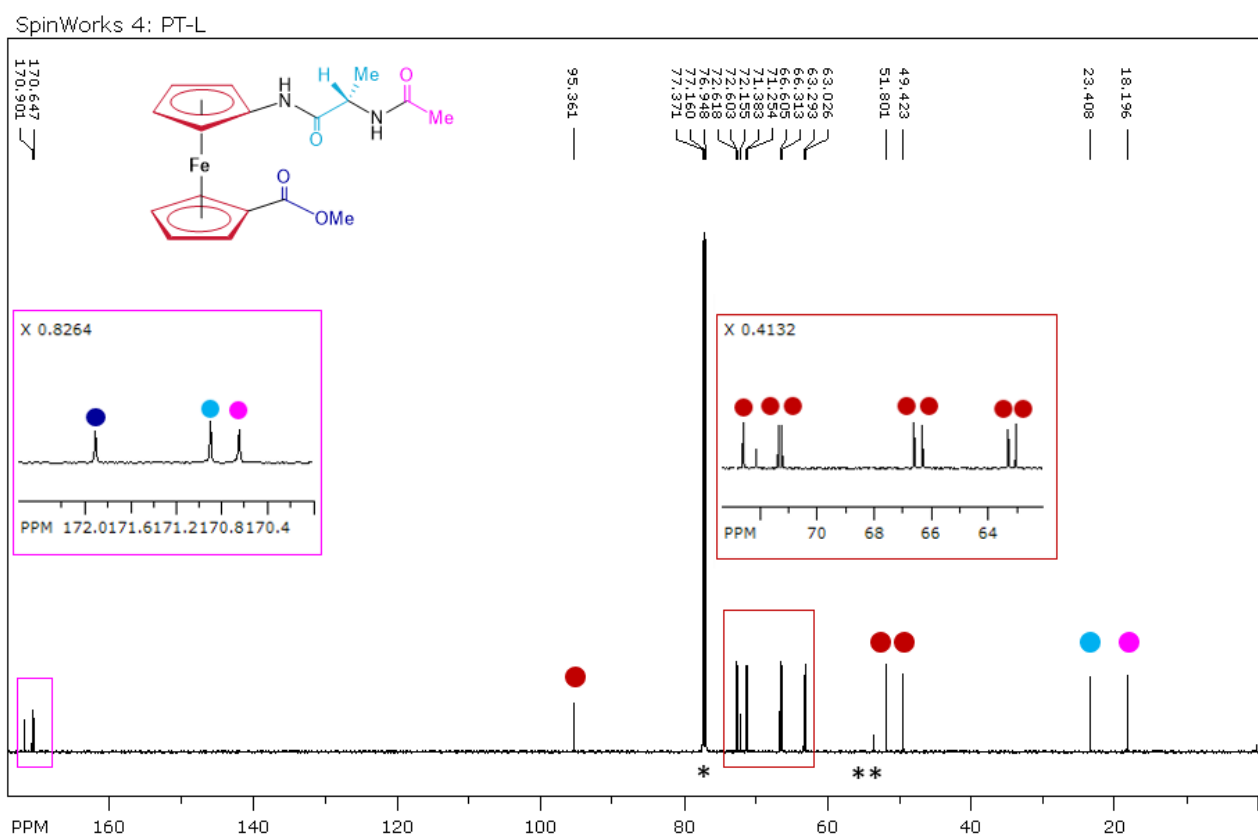
Slika 9. ¹H NMR-spektar dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (4).

SpinWorks 4: PT-D

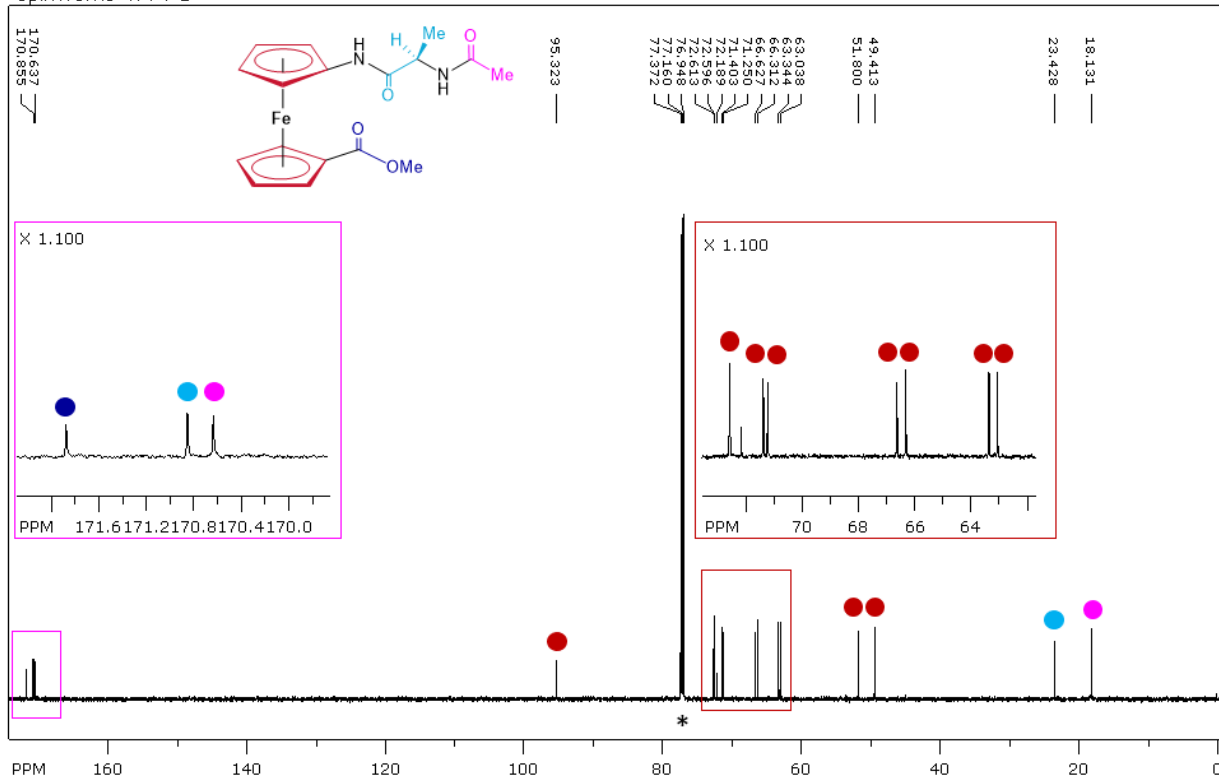


Slika 10. ¹H NMR-spektar dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (5).

U ^{13}C NMR-spektrima također se uočava izmjena zaštitnih skupina gubitkom signala iz CH_3Boc pri $\delta = 28,52$ ppm (**2**) i $\delta = 28,51$ ppm (**3**) i javljanjem novih CH_3Ac signala pri $\delta = 23,40$ ppm (**4**) i $\delta = 23,43$ ppm (**5**) te nestankom signala iz CO_{Boc} [$\delta = 156,1$ ppm (**2**); $\delta = 156,02$ ppm (**3**)] i pojavom novih CO_{Ac} signala pri $\delta = 170,65$ ppm (**4**) i $\delta = 170,63$ ppm (**5**) (slike 11. i 12.). Dobiveni rezultati ^1H - i ^{13}C -NMR spektroskopije u skladu su s rezultatima iz prethodno objavljenog rada (Barišić i sur., 2012) u kojem je provedena sinteza i konformacijska analiza dipeptida **2–5**.

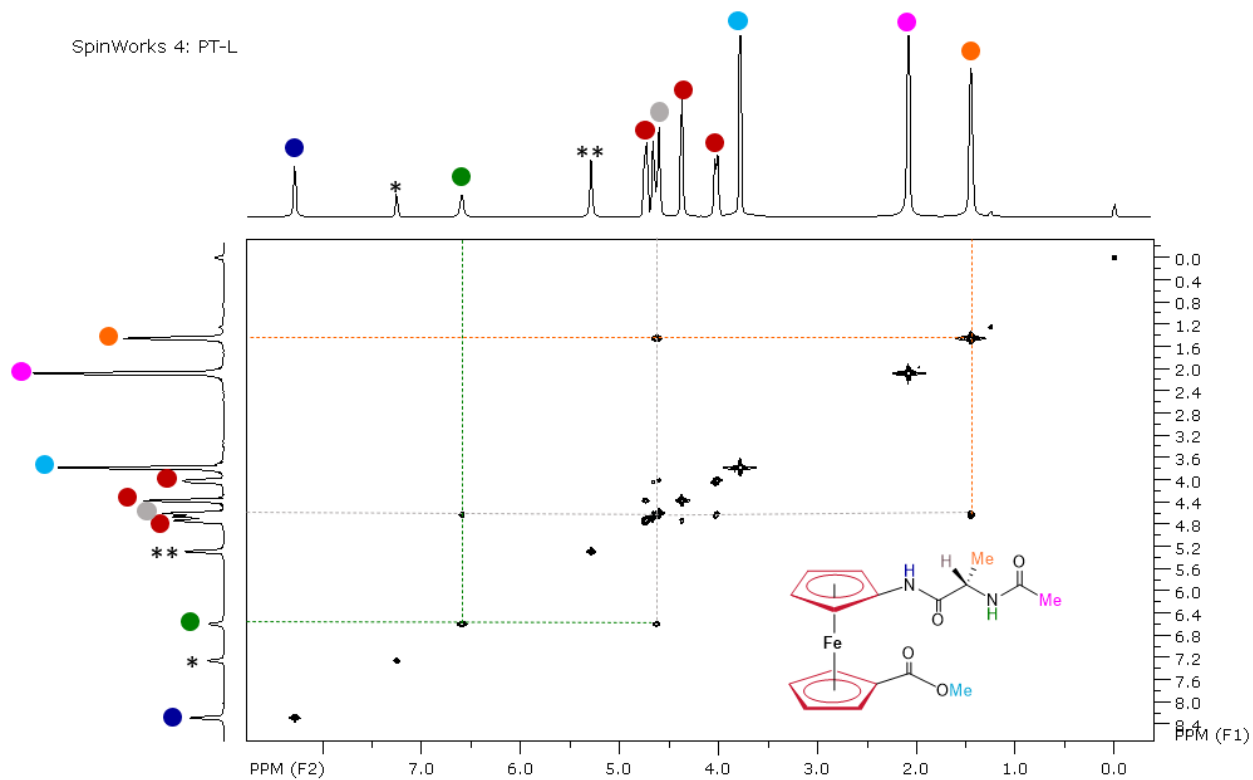


Slika 11. ^{13}C NMR-spektar dipeptida $\text{Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe}$ (**4**).



Slika 12. ^{13}C NMR-spektar dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**).

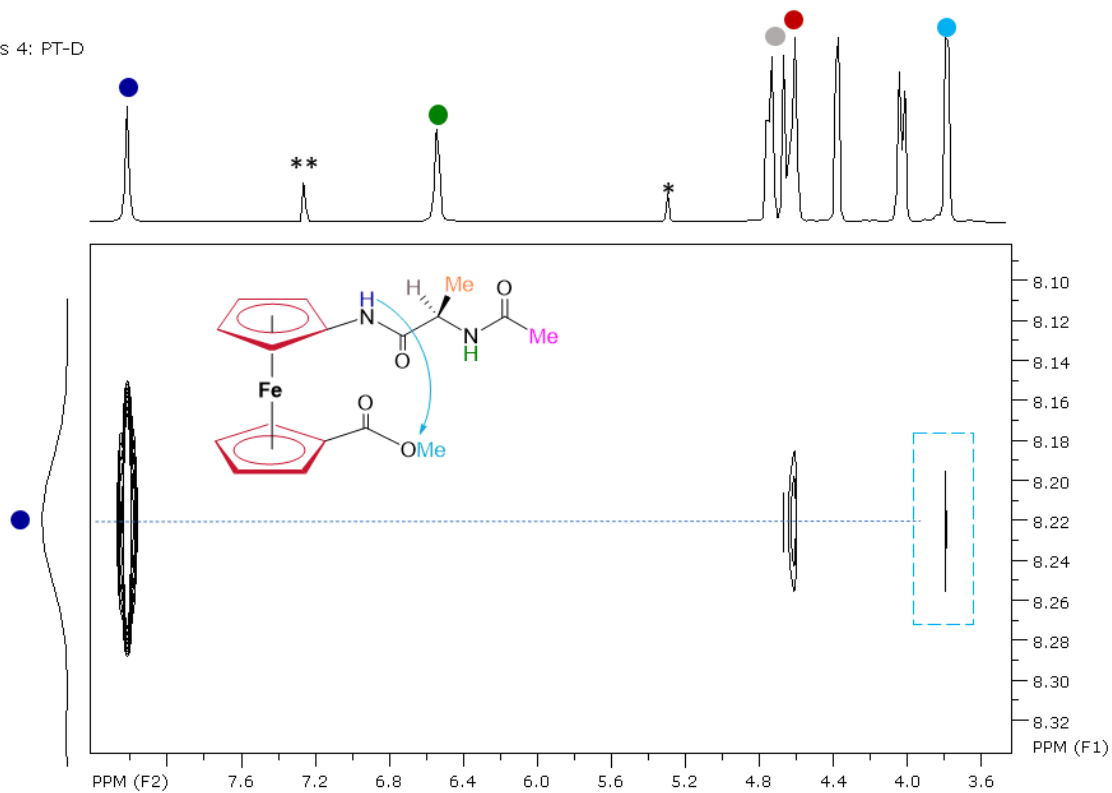
COSY spektroskopijom dipeptida **4** i **5**, odnosno odgovarajućim izvandijagonalnim pikovima ("cross peaks") $\text{CH}_{3\text{Ala}} \rightarrow \text{CH}_{\text{Ala}}$ i $\text{CH}_{\text{Ala}} \rightarrow \text{NH}_{\text{Ala}}$ potvrđeno je da su protoni iz metinske skupine iz alanina (CH_{Ala}) na susjednom položaju u odnosu na amidne protone iz alaninske podjedinice (NH_{Ala}) te protone iz metilenske skupine alanina ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$) što prikazuje COSY spektar na slici 13.



Slika 13. COSY NMR-spektar dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**).

Zbog mogućnosti tvorbe intramolekulskih vodikovih veza te uspostave okreta, ferocenski dipeptidi **4** i **5** podvrgnuti su analizi NOESY-spektroskopijom pri čemu su za dipeptid **5** nađeni NOE kontakti između NH_{Fn} i CH_3COOMe koji se pripisuju intramolekulskoj vodikovoj vezi $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{COOMe}}$ kojom se zatvara 6-člani interlančani IHB-prsten (slika 14). S obzirom na to da su dipeptidi **4** i **5** u enantiomernom odnosu, pretpostavlja se da je isti interlančani IHB-prsten uspostavljen i u dipeptidu **4**. U NOESY spektrima peptida objavljenih u prethodnoj publikaciji (Barišić i sur., 2012) opisani NOE kontakti nisu bili uočeni.

SpinWorks 4: PT-D



Slika 14. NOESY-spektar dipeptida $\text{Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe}$ (**5**).

5. ZAKLJUČCI

1. Ciljni dipeptidi Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) pripravljeni su iz prvotno sintetiziranih dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**) u iskorištenju od 62,27% (**4**) i 48,63% (**5**).
2. Enantiomerni dipeptidi **4** i **5** sintetizirani su u većim količinama i u nešto višim iskorištenjima u odnosu na prethodno istraživanje, te će poslužiti za potrebe realizacije ciljeva definiranih Radnim planom HRZZ-projekta gdje će biti kopulirani s hidrofobnim aminokiselinama u heteroanularno disupstituirane peptidomimetike.
3. ^1H - i ^{13}C -NMR spektrima dipeptida **4** i **5** potvrđen je očekivani izostanak signala koji pripadaju Boc-zaštitnoj skupini te su zapaženi novi signali koji pripadaju Ac-zaštitnoj skupini.
4. U ^1H NMR-spektrima dipeptida **4** i **5** prisutna su dva dubleta koja pripadaju amidnim protonima iz alaninske podjedinice (NH_{Ala}) koji su spregnuti sa susjednim metinskim protonima te protonima iz $\text{CH}_{3\text{Ala}}$ koji su u sprezi s vodikovim atomom iz metinske skupine.
5. Protoni iz NH_{Fn} javljaju se kao singleti te odlikuju najvišim kemijskim pomacima [$\delta = 8,29$ ppm (**4**); $\delta = 8,23$ ppm (**5**)] što indicira njihovo sudjelovanje u IHB.
6. COSY NMR-spektrima ferocenskih dipeptida **4** i **5** potvrđeno je da su protoni iz $\text{CH}_{3\text{Ala}}$ na susjednom položaju u odnosu na amidne protone iz NH_{Ala} i protone iz metilenske skupine alanina ($\text{CH}_{3\text{Ala}}$).
7. U NOESY NMR-spektru dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) nađeni su NOE kontakti između NH_{Fn} i $\text{CH}_{3\text{Ac}}$ koji se pripisuju intramolekularnoj vodikovoj vezi $\text{NH}_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{CO-OMe}}$ koja omogućuje tvorbu 6-članog interlančanog IHB-prstena. Zbog enantiomernog odnosa sintetiziranih dipeptida, pretpostavlja se da je spomenuti 6-člani interlančani prsten uspostavljen i u dipeptidu **4**.

6. POPIS LITERATURE

Armarego WLF, Perrin DD (1988) Purification of laboratory chemicals, 4. izd., Butterworth Heinemann, Oxford.

Astruc D (2017) Why is Ferrocene so Exceptional?. *European Journal of Inorganic Chemistry* **1**, 6-29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>.

Barišić L, Kovačević M, Mamić M, Kodrin I, Mihalić Z, Rapić V (2012) Synthesis and Conformational Analysis of Methyl N-Alanyl-1'-aminoferrocene-1-carboxylate. *European Journal of Inorganic Chemistry* **11**, 1810-1822. <https://doi.org/10.1002/ejic.201101270>.

Barišić L (2018a) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida., nastavni materijal iz kolegija Peptidni mimetici i pseudopeptidi, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb

http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_kemiju/peptidni_mimetici_i_pseudopeptidi (datum objave: 19. lipnja 2018.)

Barišić L (2018b) Predavanja (NMR, kromatografija, plinska kromatografija)., nastavni materijal za kolegij Instrumentalna analiza, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb

http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organsku_kemiju/instrumentalna_analiza_n (datum objave: 19. svibnja 2018.)

Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croatica chemica acta* **75**, 199-210.

Bebek A (2012) Oksalamidni ferocenski peptidomimetici (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Čakić Semenčić M, Kodrin I, Barišić L, Nuskol M, Meden A (2017) Synthesis and Conformational Study of Monosubstituted Aminoferrocene-Based Peptides Bearing Homo- and Heterochiral Pro-Ala Sequences. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2**, 306-317.

<https://doi.org/10.1002/ejic.201600648>.

Elyashberg M (2015) Identification and structure elucidation by NMR spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **69**, 88-97. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.014>.

Fish RH, Jaouen G (2003) Bioorganometallic chemistry: structural diversity of organometallic complexes with bioligands and molecular recognition studies of several supramolecular hosts with biomolecules, alkali-metal ions, and organometallic pharmaceuticals. *Organometallics* **22**, 2166-2177. <https://doi.org/10.1021/om0300777>.

Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N (2011) Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **54**, 3-25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>.

Giannis A, Kolter T (1993) Peptidomimetics for Receptor Ligands—Discovery, Development, and Medical Perspectives. *Angewandte Chemie International Edition in English* **32**, 1244-1267. <https://doi.org/10.1002/anie.199312441>.

Hasl K (2020) Spektroskopske metode (IR, NMR I CD) u konformacijskoj analizi ferocenskih peptida (završni rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:814092>.

Jaouen G, Beck W, McGlinchey MJ (2006) A Novel Field of Research: Bioorganometallic Chemistry, Origins, and Founding Principles. *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*. <https://doi.org/10.1002/3527607692.ch1>.

Jerić I (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako?. *Kem. Ind.* **53**, 495-504.

Knežević A (2013) Sinteza i evaluacija kiralnih nepokretnih faza temeljenih na N-(1-arilpropil)-3, 5-dinitrobenzamidnom selektoru (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kovač V, Ribić R, Petrović Peroković V, Tomić S, Barišić L (2016) Synthesis, spectral characterization and inhibitory potency of ferrocene-containing mannosides towards type 1

fimbriated *Escherichia coli*. *Applied Organometallic Chemistry* **30**, 524-530.
<https://doi.org/10.1002/aoc.3465>.

Kovačević M, Molčanov K, Radošević K, Gaurina Srček V, Roca S, Čače A i sur. (2014) Conjugates of 1'-aminoferrocene-1-carboxylic acid and proline: synthesis, conformational analysis and biological evaluation. *Molecules* **19**, 12852-12880.
<https://doi.org/10.3390/molecules190812852>.

Kovačević M (2014) Ferocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima (doktorski rad), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Kovačević M, Čakić Semenčić M, Radošević K, Molčanov K, Roca S, Šimunović L i sur. (2021) Conformational Preferences and Antiproliferative Activity of Peptidomimetics Containing Methyl 1'-Aminoferrocene-1-carboxylate and Turn-Forming Homo-and Heterochiral Pro-Ala Motifs. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 13532.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413532>.

Lazar T (2005) Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *Synthesis*, **06**, 1030-1030.

Nair RV, Baravkar SB, Ingole TS, Sanjayan G (2014) Synthetic turn mimetics and hairpin nucleators: Quo Vadimus?. *Chemical Communications* **50**, 13874-13884.
<https://doi.org/10.1039/c0xx00000x>.

Popović Z (2012) Osnove kemije organometalnih spojeva. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Rapić V, Čakić Semenčić M (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija - Ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **60**, 61-79.

Stryer L, Berg JM, Tymoczko JL (2013) Biokemija, 6. izd., (preveli Weygand Đurašević i sur.) Školska knjiga, Zagreb

Wang L, Wang N, Zhang W, Cheng X, Yan Z, Shao G i sur. (2022) Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 7, 1-27. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4>.

Zhang P, Sadler PJ (2017) Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **839**, 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.03.038>.

Izjava o izvornosti

Ja _____ (Petra Tuksar) _____ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Petra Tuksar

Vlastoručni potpis