

# 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:* **2025-01-02**



*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 spektroskopijski nuklearne magnetske rezonancije (NMR) pri čemu su analizirani <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, COSY i NOESY NMR spektri. Detektirani NOE kontakti između NH<sub>F<sub>n</sub></sub> i CH<sub>3</sub>COOMe pripisuju se intramolekularnoj vodikovoj vezi (IHB) NH<sub>F<sub>n</sub></sub>⋯OC<sub>COOMe</sub> 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 ( $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY and NOESY)]. The detected NOE contacts between  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  and  $\text{CH}_3\text{COOMe}$  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

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
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
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>8</b>
3.1. MATERIJALI I METODE RADA.....	8
3.2. SINTEZA CILJNIH PEPTIDA <b>4 I 5</b> .....	8
3.2.1. SINTEZA DIPEPTIDA BOC-L-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>2</b> ) I BOC-D-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>3</b> ).....	9
3.2.2. SINTEZA DIPEPTIDA AC-L-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>4</b> ) I AC-D-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>5</b> ).....	11
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>13</b>
4.1. UVOD.....	13
4.2. PRIPRAVA DIPEPTIDA BOC-L-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>2</b> ) I BOC-D-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>3</b> ).....	14
4.3. PRIPRAVA STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA CILJNIH ENANTIOMERNIH DIPEPTIDA AC-L-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>4</b> ) I AC-D-ALA-NH-FN-CO-OME ( <b>5</b> ).....	15
4.3.1. NMR SPEKTROSKOPSKA ANALIZA DIPEPTIDA <b>4 I 5</b> .....	17
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>23</b>
<b>6. POPIS LITERATURE</b> .....	<b>24</b>

## 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 poddanih peptidnih lanaca vezanih na ferocenske prstenove inducira tvorbu strukture nalik  $\beta$ -nabranoj ploči (Barišić, 2018a).

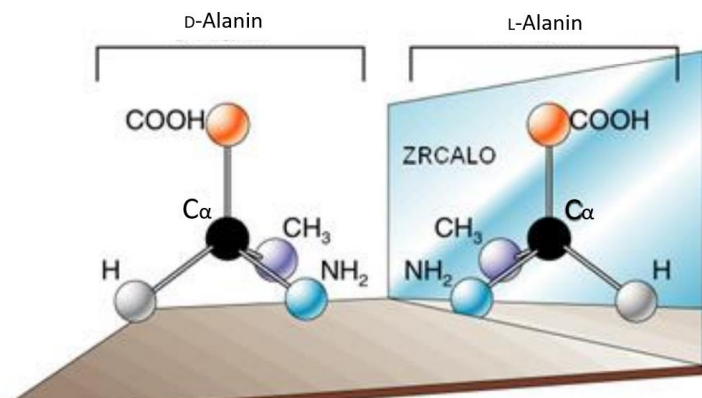
U ovom radu opisana je sinteza i strukturna karakterizacija konjugata metil 1'-aminoferocen-1-karboksilata i alanina. Najprije je opisana sinteza dvaju enantiomernih dipeptida Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**2**) i Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**3**) koji su bili prekursori za sintezu Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**) i Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) kao ciljnih spojeva. Potom je provedena spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) pri čemu su snimljeni  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY i NOESY NMR-spektri dipeptida **4** i **5** kako bi se provela njihova strukturna i konformacijska karakterizacija. U  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -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 ( $C_{\alpha}$ -atom) na koji je uz vodik vezan bočni ogranak R, što ih čini kiralnim i optički aktivnim molekulama (uz iznimku glicina na čiji su  $C_{\alpha}$ -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  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -nabrane ploče te raznih okreta, a koja od njih će se formirati ovisi o obrascu vodikove veze:

- $\alpha$ -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  $\alpha$ -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,
- $\beta$ -nabrana ploča nastaje povezivanjem dvaju ili više istegnutih polipeptidnih lanaca između kojih se uspostavljaju NH...OC vodikove veze. S obzirom na usmjerenje lanaca,  $\beta$ -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  $\gamma$ -okretu, zatvaranje 10-članog prstena rezultira nastajanjem  $\beta$ -okreta, 13-člani prsten odgovara  $\alpha$ -uzvojnici, dok zatvaranjem 16-članog prstena nastaje  $\pi$ -okret. Najčešći su  $\beta$ -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

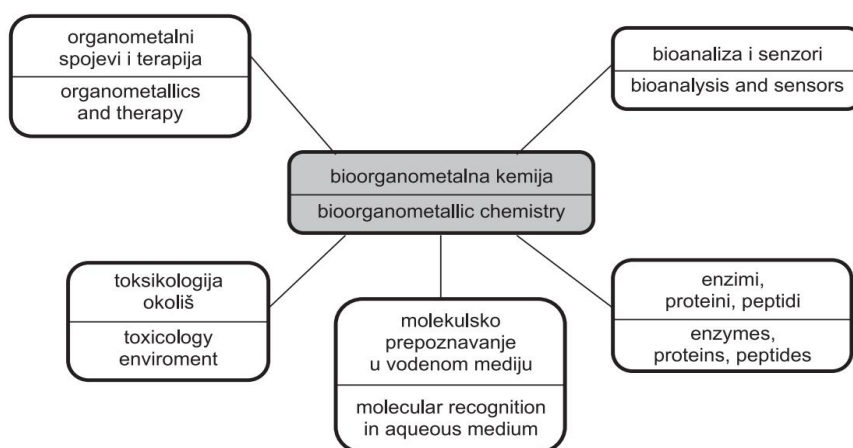
sur., 2021). Naime, zbog polarnog karaktera proteini nisu u mogućnosti prolaziti kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru te su nestabilni u fiziološkim uvjetima. Osim toga, mogućnost zauzimanja različitih energetski ekvivalentnih konformacija dovodi do interakcija s neželjenim receptorima te 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 ( $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -nabrana ploča te  $\beta$ - i  $\gamma$ -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 djelovanje 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  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Sn}^{4+}$  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  $6\pi$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -nabranoj ploči (Barišić i sur., 2012).

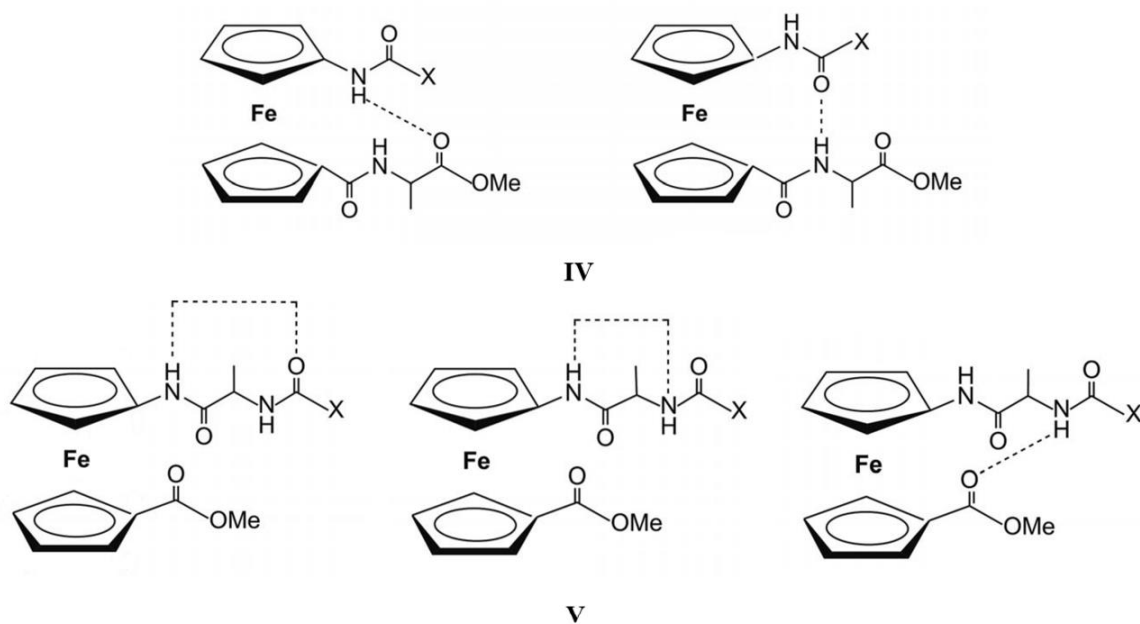
Prema strukturi ferocenskog prekursora, disupstituirani ferocenski peptidomimetici dijele se u tri skupine:

- **Fn–[CO–AK–OMe]<sub>2</sub> (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]<sub>2</sub> (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  $\beta$ -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  $\beta$ -okreta. Nadalje, kod simetrično disupstituiranih konjugata **III** također dolazi do tvorbe IHB koje u ovom slučaju omogućuju nastajanje dvaju  $\beta$ -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 HF<sub>254</sub>) uporabom etil-acetata kao eluensa.

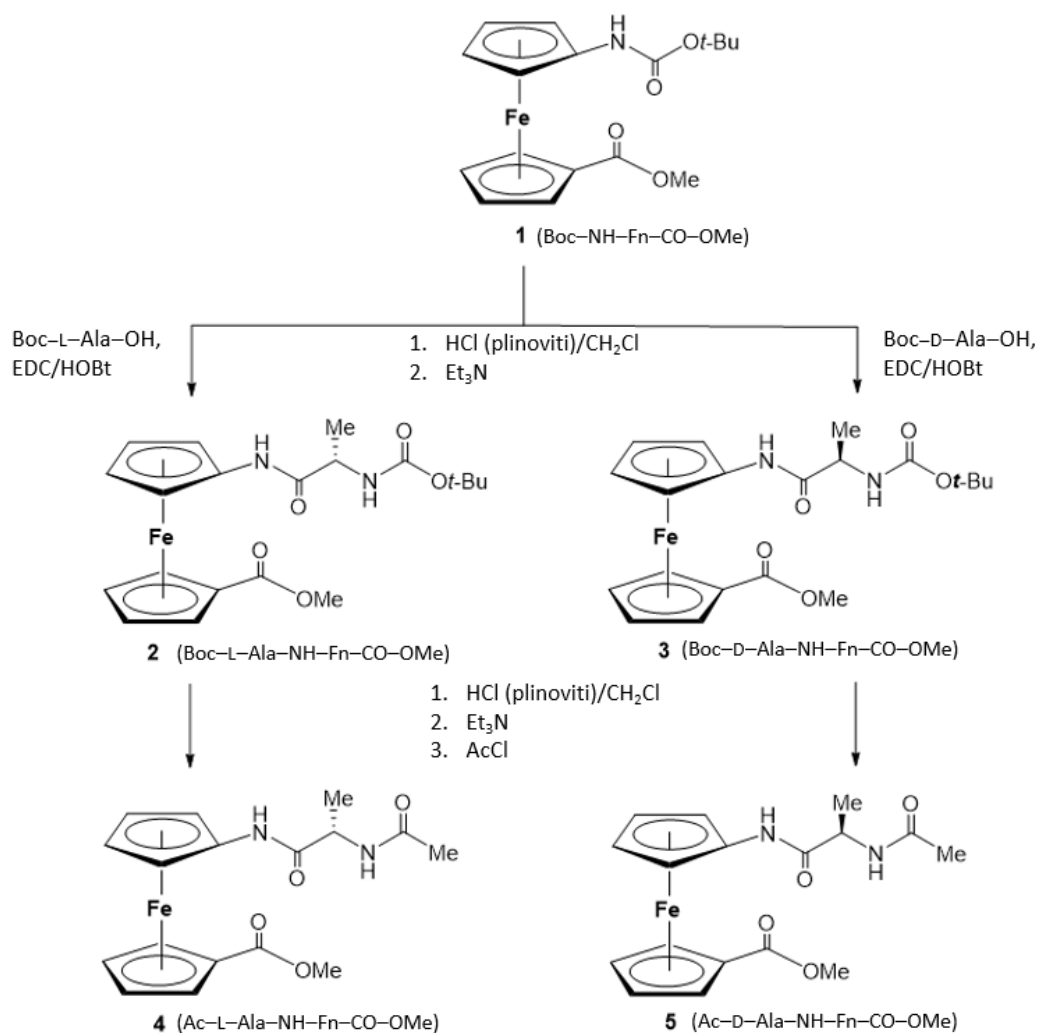
Strukturna karakterizacija sintetiziranih spojeva provedena je pomoću spektroskopije nuklearne magnetske rezonancije (NMR). <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C- NMR-spektri određeni su u CDCl<sub>3</sub> na spektrometru Bruker AV300 uz tetrametilsilan kao unutrašnji standard. 2D NMR spektri (COSY; NOESY) 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.



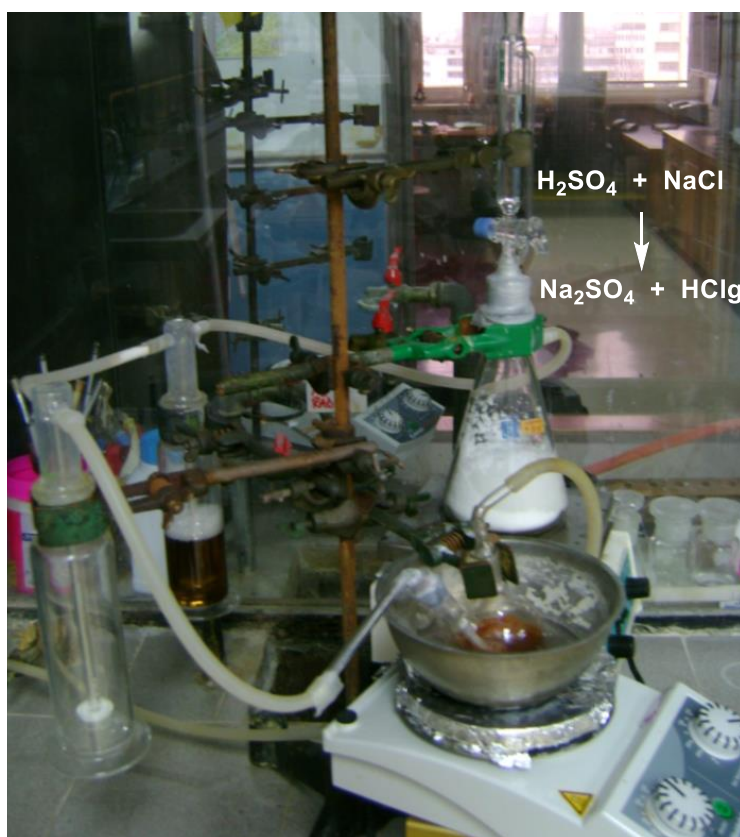
Shema 1. Sinteza dipeptida 4 i 5.

### 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i obradi suviškom Et<sub>3</sub>N (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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1 uzimanjem uzorka iz reakcijske smjese. Nakon 1 sat miješanja pri sobnoj temperaturi, rezultirajuća se reakcijska smjesa ispere zasićenom vodenom otopinom NaHCO<sub>3</sub>, 10%-tnom otopinom limunske kiseline



te ponovno zasićenom vodenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$ . Organski se sloj osuši bezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i upari do suha. U tablici 1. navedeni su supstrati i reagensi korišteni za sintezu dipeptida **2** i **3**.



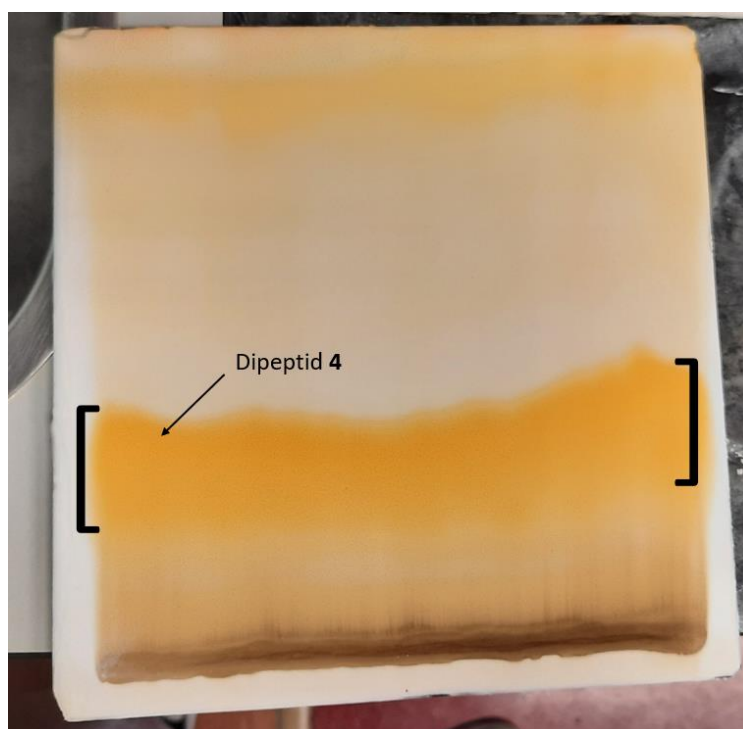
**Slika 4.** Boc-deprotekcija Boc-NH-Fn-CO-OMe (**1**) djelovanjem plinovitog HCl (Bebek, 2012).

**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	
<b>2</b>	Boc-NH-Fn-CO-OMe ( <b>1</b> ) (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
<b>3</b>	Boc-NH-Fn-CO-OMe ( <b>1</b> ) (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 Et<sub>3</sub>N 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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).

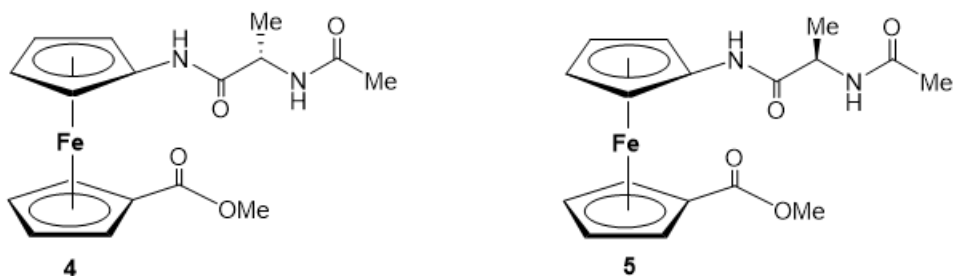
**Tablica 2.** Supstrati i reagensi korišteni tijekom sinteze dipeptida **4** i **5**.

	<b>Supstrat</b> <b>(g/mmol)</b>	<b>AcCl</b> <b>(ml)</b>	<b>Iskorištenje</b> <b>(mg/%)</b>	<b>Opis produkta</b>
<b>4</b>	Boc-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe ( <b>2</b> )  (1,3 g; 3,02 mmol)	1,22	700 mg  (62,27%)	narančasti kristali
<b>5</b>	Boc-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe ( <b>3</b> )  (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 ( $^1\text{H}$ ;  $^{13}\text{C}$ ) i dvodimenzijски (COSY; NOESY) NMR-spekttri. Obrada snimljenih spektara izvršena je u programu SpinWorks 4.

Iz  $^1\text{H}$  NMR-spekttra 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).

$^{13}\text{C}$  NMR-spektroskopija omogućava detekciju ugljikovih atoma, a s obzirom na to da je manje je osjetljiva od  $^1\text{H}$  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  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  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  $\text{Et}_3\text{N}$ . 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).

<b>Dipeptid 2</b>	
<b>R<sub>f</sub>-vrijednost</b>	0,5 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1)
<b>Talište (t<sub>t</sub>)</b>	102-105 °C
<b><math>^1\text{H}</math>- i <math>^{13}\text{C}</math>- NMR spektroskopija</b>	
$^1\text{H}$ -NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ /ppm: 7.64 [s, 1H, NH <sub>Fn</sub> ], 5.14 [d, $J$ = 7.6 Hz, 1H, NH <sub>Ala</sub> ], 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 <sub>Ala</sub> ], 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.02 (m, 1H, 3-H), 3.80 (s, 3H, CH <sub>3</sub> COOMe), 1.48 [s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc], 1.42 [d, $J$ = 7.07 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> Ala].	
$^{13}\text{C}$ -NMR (APT, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) $\delta$ /ppm: 171.89 [CO <sub>COOMe</sub> ], 171.19 [CO <sub>Ala</sub> ], 156.1 [CO <sub>Boc</sub> ], 95.30 (C-1), 80.6 [C <sub>qBoc</sub> ], 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 <sub>3</sub> COOMe, CH <sub>Ala</sub> ], 28.52 [CH <sub>3</sub> Boc], 17.95 [CH <sub>3</sub> Ala].	

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

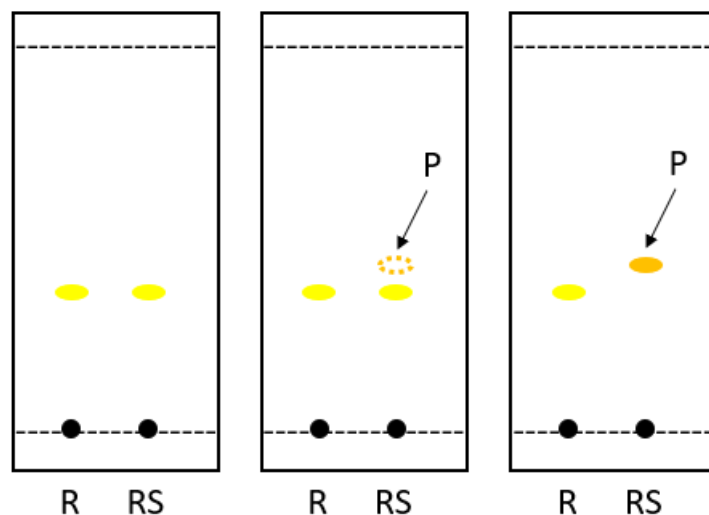
Dipeptid <b>3</b>	
<b>R<sub>F</sub>-vrijednost</b>	0,49 (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1)
<b>Talište (t<sub>t</sub>)</b>	102-107 °C
<b><sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C- NMR spektroskopija dipeptida <b>3</b></b>	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 7.63 [s, 1H, NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ], 5.14 [d, <i>J</i> = 6.93 Hz, 1H, NH <sub>Ala</sub> ], 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 <sub>Ala</sub> ], 4.04 (m, 1H, 4-H), 4.02 (m, 1H, 3-H), 3.80 (s, 3H, CH <sub>3</sub> COOMe), 1.48 [s, 9H, CH <sub>3</sub> Boc], 1.43 [d, <i>J</i> = 6.98 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> Ala].	
<sup>13</sup> C-NMR, APT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 171.88 [CO <sub>COOMe</sub> ], 171.17 [CO <sub>Ala</sub> ], 156.02 [CO <sub>Boc</sub> ], 95.28 (C-1), 80.61 [C <sub>q</sub> 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 <sub>3</sub> COOMe, CH <sub>Ala</sub> ], 28.51 [CH <sub>3</sub> Boc], 17.94 [CH <sub>3</sub> Ala].	

#### 4.3. Priprava strukturalna 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 Et<sub>3</sub>N, 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 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc = 5 : 1. Na samom početku reakcije na startnu liniju kromatografske pločice staklenom se kapilalom nanese reaktant (R), a u drugu točku reakcijska smjesa (RS) i razvije se početni kromatogram. Ukoliko su kao na prikazanoj slici 8. R<sub>F</sub>-vrijednosti za R i RS jednake, reakcija još nije započela. Stoga se nakon određenog vremena (15') ponovno na kromatografsku pločicu nanese R i RS pri čemu se uočava pojavljivanje nove mrlje slabijeg intenziteta i veće R<sub>F</sub>-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 tijeka 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 <b>4</b>	
<b>R<sub>F</sub>-vrijednost</b>	0,4 (EtOAc)
<b>Talište (t<sub>t</sub>)</b>	102-105 °C
<b><sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C- NMR spektroskopija</b>	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 8.29 [s, 1H, NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ], 6.60 [d, <i>J</i> = 7.49 Hz, 1H, NH <sub>Ala</sub> ], 4.75 (m, 1H, 7-H), 4.73 (m, 1H, 10-H), 4.66 (m, 1H, 2-H), 4.61 [m, 2H, CH <sub>Ala</sub> ], 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 <sub>3</sub> COOMe), 2.08 [s, 3H, CH <sub>3</sub> Ac], 1.44 [d, <i>J</i> = 7.00 Hz, 3H, CH <sub>3</sub> Ala].	
<sup>13</sup> C-NMR (APT, 75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 171.91 [CO <sub>COOMe</sub> ], 170.9 [CO <sub>Ala</sub> ], 170.65 [CO <sub>Ac</sub> ], 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 <sub>3</sub> COOMe], 49.43 [CH <sub>Ala</sub> ], 23.40 [CH <sub>3</sub> Ac], 18.20 [CH <sub>3</sub> Ala].	

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

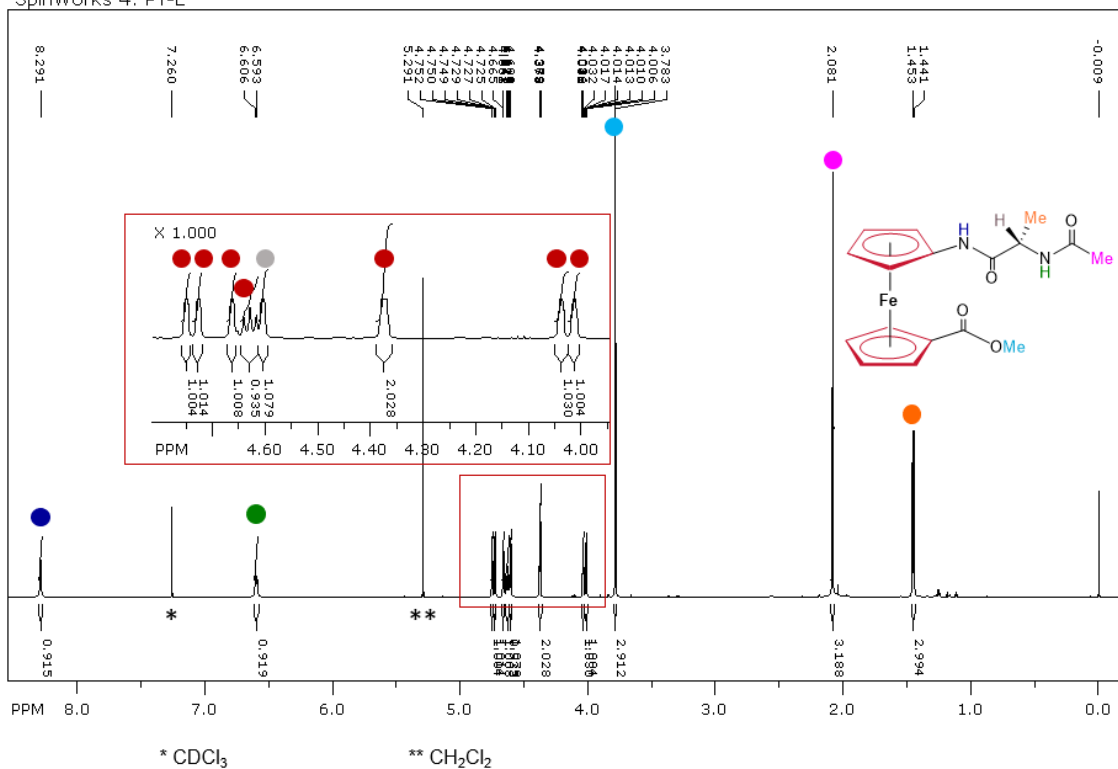
Dipeptid <b>5</b>	
<b>R<sub>F</sub>-vrijednost</b>	0,4 (EtOAc)
<b>Talište (t<sub>i</sub>)</b>	102-107 °C
<b><sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>C- NMR spektroskopija</b>	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 8.23 [s, 1H, NH <sub>F<sub>n</sub></sub> ], 6.54 [d, <i>J</i> = 7.29 Hz, 1H, NH <sub>Ala</sub> ], 4.75 (m, 1H, 7-H), 4.73 (m, 1H, 10-H), 4.67 (m, 1H, 2-H), 4.61 [m, 2H, CH <sub>Ala</sub> ], 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 <sub>3COOMe</sub> ), 2.09 [s, 3H, CH <sub>3Ac</sub> ], 1.45 [d, <i>J</i> = 6.96 Hz, 3H, CH <sub>3Ala</sub> ].	
<sup>13</sup> C-NMR, APT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ/ppm: 171.88 [CO <sub>COOMe</sub> ], 170.86 [CO <sub>Ala</sub> ], 170.63 [CO <sub>Ac</sub> ], 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 <sub>3COOMe</sub> ], 49.41 [CH <sub>Ala</sub> ], 23.43 [CH <sub>3Ac</sub> ], 18.13 [CH <sub>3Ala</sub> ].	

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

U <sup>1</sup>H NMR-spektrima dipeptida **4** i **5** (slike 9. i 10.) amidni protoni iz alaninske podjedinice (NH<sub>Ala</sub>) javljaju se u dubletima zahvaljujući svojoj sprezi sa susjednim metinskim protonima, dok su protoni iz NH<sub>F<sub>n</sub></sub> predstavljeni kao singleti. Protoni iz CH<sub>3Ala</sub> 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<sub>3Ala</sub> [δ= 1,44 ppm (**4**); δ= 1,45 ppm (**5**)]. Upravo visoki kemijski pomaci za NH<sub>F<sub>n</sub></sub> upućuju na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama, budući da vodikova veza odsjenjuje proton koji zbog toga rezonira pri jačem polju. Istovremeno, NH<sub>Ala</sub> protoni javljaju se pri jačem polju (δ < 7 ppm), što indicira njihovo nesudjelovanje u vodikovim vezama. U odnosu na <sup>1</sup>H NMR-spektre Boc-prekursora **2** i **3**, u <sup>1</sup>H 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.

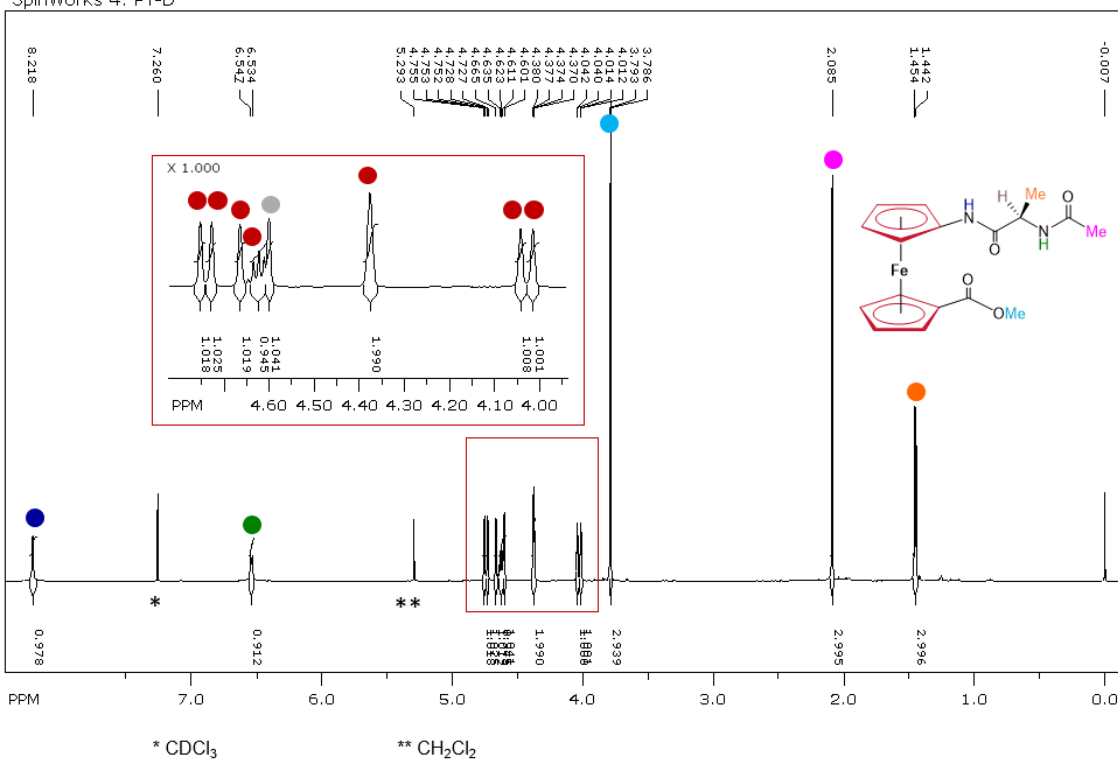


SpinWorks 4: PT-L



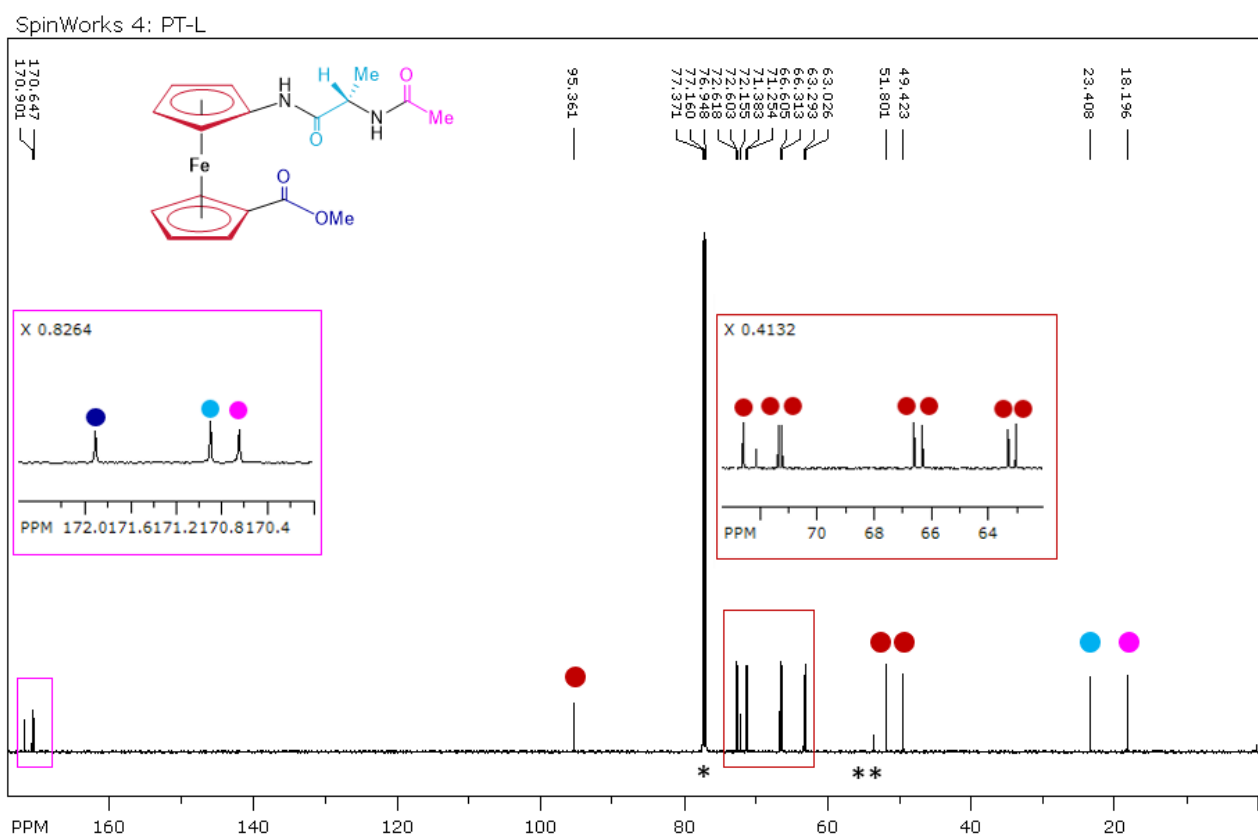
Slika 9. <sup>1</sup>H NMR-spektar dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (4).

SpinWorks 4: PT-D

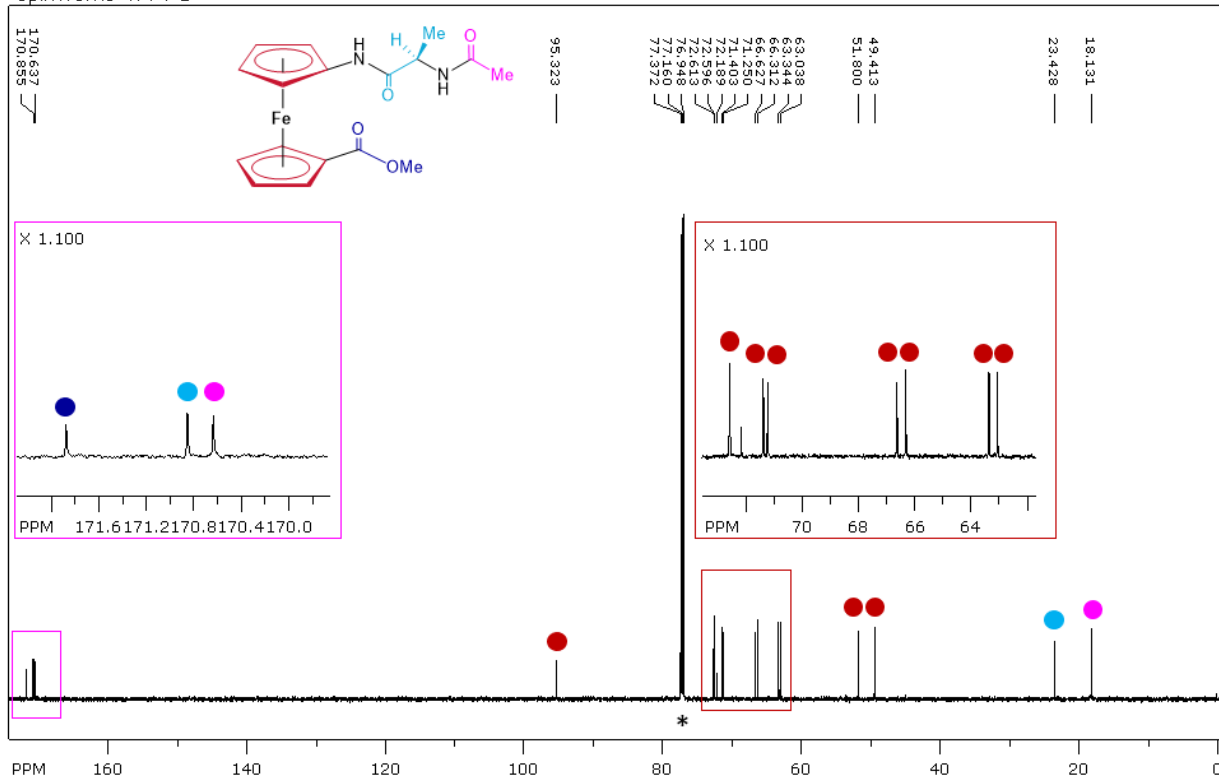


Slika 10. <sup>1</sup>H NMR-spektar dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (5).

U  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrima također se uočava izmjena zaštitnih skupina gubitkom signala iz  $\text{CH}_3\text{Boc}$  pri  $\delta = 28,52$  ppm (**2**) i  $\delta = 28,51$  ppm (**3**) i javljanjem novih  $\text{CH}_3\text{Ac}$  signala pri  $\delta = 23,40$  ppm (**4**) i  $\delta = 23,43$  ppm (**5**) te nestankom signala iz  $\text{CO}_{\text{Boc}}$  [ $\delta = 156,1$  ppm (**2**);  $\delta = 156,02$  ppm (**3**)] i pojavom novih  $\text{CO}_{\text{Ac}}$  signala pri  $\delta = 170,65$  ppm (**4**) i  $\delta = 170,63$  ppm (**5**) (slike 11. i 12.). Dobiveni rezultati  $^1\text{H}$ - i  $^{13}\text{C}$ -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**.

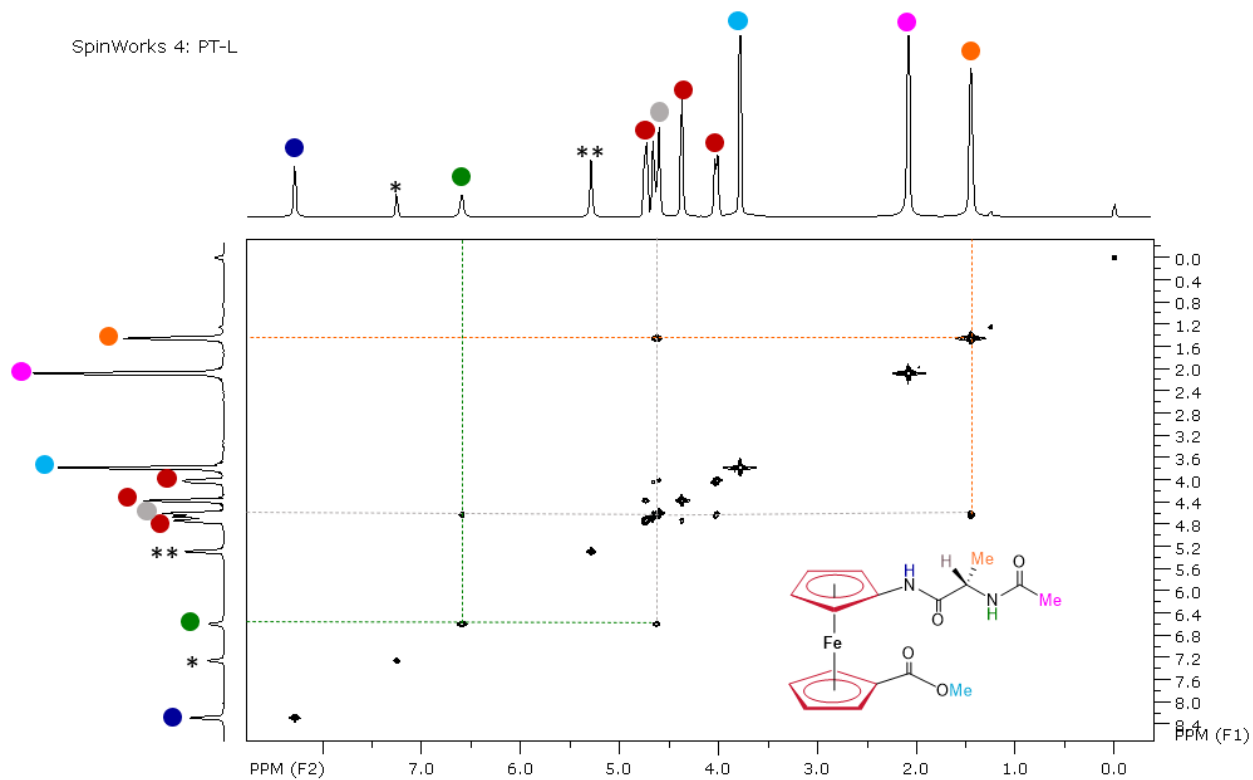


Slika 11.  $^{13}\text{C}$  NMR-spektar dipeptida Ac-L-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**4**).



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

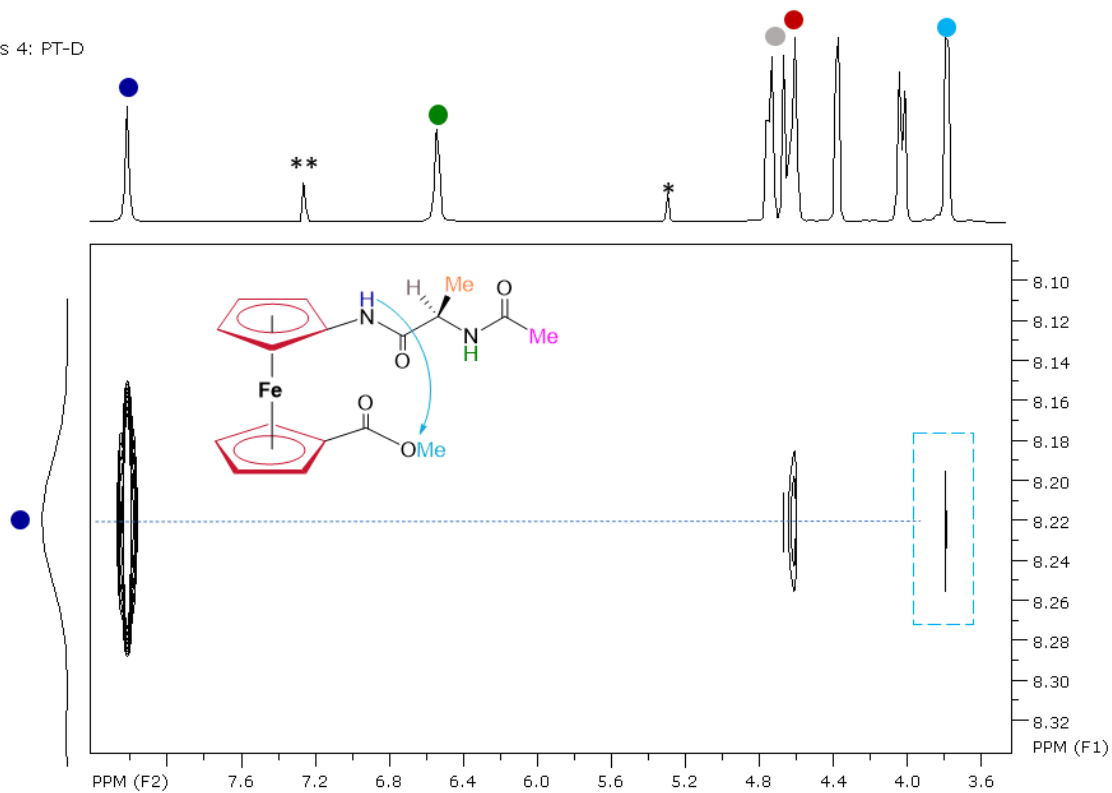
COSY spektroskopijom dipeptida **4** i **5**, odnosno odgovarajućim izvandijagonalnim pikovima ("cross peaks")  $\text{CH}_{3\text{Ala}} \rightarrow \text{CH}_{\text{Ala}}$  i  $\text{CH}_{\text{Ala}} \rightarrow \text{NH}_{\text{Ala}}$  potvrđeno je da su protoni iz metinske skupine iz alanina ( $\text{CH}_{\text{Ala}}$ ) na susjednom položaju u odnosu na amidne protone iz alaninske podjedinice ( $\text{NH}_{\text{Ala}}$ ) 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  $\text{NH}_{\text{Fn}}$  i  $\text{CH}_3\text{COOMe}$  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. <sup>1</sup>H- i <sup>13</sup>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 <sup>1</sup>H NMR-spektrima dipeptida **4** i **5** prisutna su dva dubleta koja pripadaju amidnim protonima iz alaninske podjedinice (NH<sub>Ala</sub>) koji su spregnuti sa susjednim metinskim protonima te protonima iz CH<sub>3Ala</sub> koji su u sprezi s vodikovim atomom iz metinske skupine.
5. Protoni iz NH<sub>Fn</sub> 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 CH<sub>3Ala</sub> na susjednom položaju u odnosu na amidne protone iz NH<sub>Ala</sub> i protone iz metilenske skupine alanina (CH<sub>3Ala</sub>).
7. U NOESY NMR-spektru dipeptida Ac-D-Ala-NH-Fn-CO-OMe (**5**) nađeni su NOE kontakti između NH<sub>Fn</sub> i CH<sub>3Ac</sub> koji se pripisuju intramolekularnoj vodikovoj vezi NH<sub>Fn</sub>...OC<sub>CO-OMe</sub> 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\\_organiku\\_kemiju/peptidni\\_mimetici\\_i\\_pseudopeptidi](http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organiku_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\\_organiku\\_kemiju/instrumentalna\\_analiza\\_n](http://www.pbf.unizg.hr/zavodi/zavod_za_kemiju_i_biokemiju/laboratorij_za_organiku_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 ferrocenski 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