Utjecaj deprotonirajućeg agensa na tijek reakcije kopulacije ferocena na adenin

Svrze, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:931838

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Karlo Svrze

6824/PT

UTJECAJ DEPROTONIRAJUĆEG AGENSA NA TIJEK REAKCIJE KOPULACIJE FEROCENA NA ADENIN

ZAVRŠNI RAD

Modul: Organska kemija
Mentor: izv. prof. dr.sc. *Senka Djaković*

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

UTJECAJ DEPROTONIRAJUĆEG AGENSA NA TIJEK REAKCIJE KOPULACIJE FEROCENA NA ADENIN

Karlo Svrze, 6824/PT

Sažetak: Analozi nukleozida, među kojima i kopulati nukleobaza s ferocenskim derivatom, pokazuju značajno biološko djelovanje te su stoga važno područje istraživanja. Uz svoje biološko djelovanje, analozi također pokazuju i zanimljiva elektrokemijska svojstva. Cilj ovog završnog rada je ispitati reaktivnost NaH kao deprotonirajućeg agensa na regioselektivnost reakcija priprave kopulata ferocenskog derivata i nukleobaze adenina s karbonilnom podjedinicom kao poveznicom. Posebna pozornost posvećena je vremenu deproktecije, kao jednom od faktora koji može utjecati na usmjerenje reakcije prema nastajanju N9-ferocenoil-adenina. Struktura pripravljenih spojeva potvrđene je IR i NMR spektroskopijom.

Kljucne rijeci: ferocen, adenin, , kopulati, spektralna analiza

Rad sadrži: 24 stranica, 15 slika, 3 sheme, 17 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

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

Rad predan: lipnja, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

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

INFLUENCE OF DEPROTONATING AGENT ON THE COURSE OF COUPLING REACTION OF FERROCENE WITH ADENINE

Karlo Svrze, 6824/PT

Abstract: Ferrocene modified nucleobases are nucleoside analogues that represent an important scientific research field. They possess significant biological activity and electrochemical potential. The main goal of this final work was to test reactivity of deprotonating agent NaH on the regioselectivity of chemical reaction considering the time of deprotection as one of the factors that direct reaction towards N9-ferocenoyl formation. Chemical reaction includes preparation of adenine derivate of ferrocene linked with carbonyl subunit. Structure of prepared compounds was confirmed using IR- and NMR- spectroscopy.

Keywords: ferrocene, adenine, couples, spectral analysis

Thesis contains: 24 pages, 15 figures, 3 shemes, 17 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format**) version is deposited in:** Library of the

Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD Senka Djaković, Associate Professor*

Thesis delivered: June, 2016.

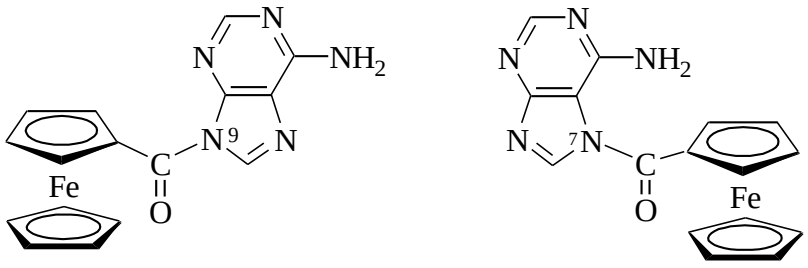
SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Uvod 2
2.2. Nukleozidi 3
2.2.1. Purinske baze 4
2.2.1.1. Adenin 5
2.3. Kopulati ferocena i nukleobaza 6
3. EKSPERIMENTALNI DIO 9
3.1. Materijali 9
3.2. Metode rada 9
3.3. *N*,*N*-difenilferocenkarboksamid (1) 11
3.4. Ferocenkarboksilna kiselina (2) 11
3.5. Ferocenoil-klorid (3) 11
3.6. Ferocenoil-adenin (4) 12
4. REZULTATI I RASPRAVA 15
4.1. Uvod 15
4.2. Sinteza i spektralna analiza prekursora ferocenoil adenina 15
4.3. Sinteza i spektralna analiza ferocenoil adenina 17
4.3.1. Sinteza 17
4.3.2. Spektralna analiza 19
5. ZAKLJUČAK 22

1. UVOD

Ovaj završni rad uklapa se u istraživanje na području metalocena koja su u okviru Potpore istraživanju pod naslovom: "Ferocenoilni derivati purinskih DNA-baza. Priprava, spektroskopska mjerenja i kvantno-kemijsko istraživanje". Sinteza i ispitivanje strukture ferocenskih derivata nukleozida provodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Nakon 19. stoljeća počinje se razvijati organometalna kemija, znanstvena disciplina na granici organske i anorganske kemije, a iz nje se razvija bioorganometalna kemija koja povezuje organometalne spojeve i biološke molekule poput peptida, proteina, ugljikohidrata, nukleobaza. Glavna istraživačka polja ove grane postaju terapija, molekulsko prepoznavanje i bioanaliza, a počinju se proučavati i metaloceni, organometalni spojevi sa širokim spektrom biološkog djelovanja. Provedena istraživanja metalocena su pokazala njihovu citostatičnu, antimalarijsku, antifugalnu te mnoge druge biološke aktivnosti [1]. Budući da veliki broj supstituiranih analoga prirodnih nukleozida pokazuje snažna biološka djelovanja, potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analozima je velika, te je cilj ovog završnog rada priprava i spektroskopska karakterizacija modificiranog analoga nukleozida purinske baze adenina i ferocena s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (slika 1). Svrha ovog rada je ispitati reaktivnost NaH kao deprotonirajućeg agensa na regioselektivnost reakcija pri čemu je vrijeme aktivacije reakcijske smjese 10 i 30 minuta. U nastavku istraživanja ispitat će se biološka i elektrokemijska svojstva pripravljenih kopulata.



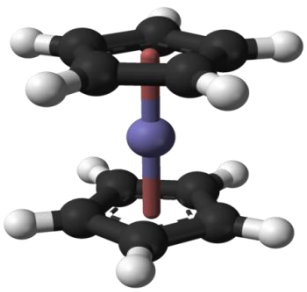
4a **4b**

Slika 1. Struktura kopulata ferocenoil-adenina

2. TEORIJSKI DIO

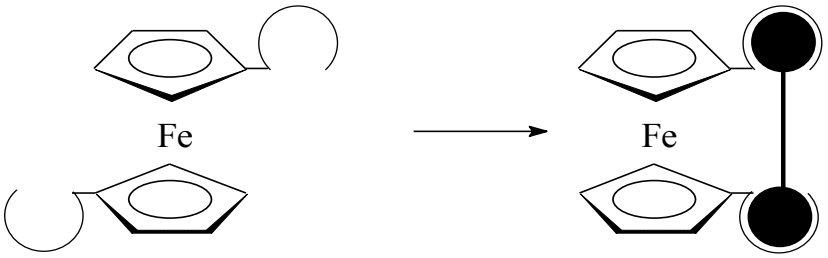
2.1. Uvod

Organometalni spojevi koji sadrže željezo, feroceni, iznimno su bitni u biološkim procesima gdje pokazuju obećavajuća antianemična [2], antiseptična i antitumorska [3] svojstva. Istraživanja interakcije ferocena i biomolekula, poput DNA i RNA, su značajna za razumijevanje kompleksnih mehanizama aktivnosti koji mogu poslužiti za sintezu novih lijekova [4] te se stoga u zadnjih desetak godina povećao interes za konjugate ferocena s nukleobazama, nukleozidima [5] i nukleotidima [6]. Purinske i pirimidinske baze predstavljaju zanimljivu grupu molekula koje mogu tvoriti konjugate s organometalnim derivatima za ispitivanje bioloških i elektrokemijskih svojstava [7] što dovodi do razvoja novih metoda kliničkog liječenja. Purinske baze posjeduju svojstvo povezivanja s metalima koje najčešće uključuje vezanje supstituenta na N7 poziciji, koje je dostupno i za interakciju s DNA [8]. Ferocenski biokonjugati poput 1-*N*-ferocenilmetiltimina pokazuju antitumorsko djelovanje na sarkom 180, melanom B16 te na Lewisov plućni karcinom, a ferocenilmetiltimidin fosfat također pokazuje citostatsku aktivnost. Ferocen nije toksičan, lako difundira kroz staničnu membranu, sudjeluje u reakcijama elektrofilne supstitucije te se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena koja okružuju centralni atom željeza (Slika 2.). Taj centralni atom željeza je najčešće u +2 oksidacijskom stanju, dok se svaki ciklopentadienilni prsten sastoji od 6π-elektrona. Molekulska formula ferocena je $C_{10}H_{10}Fe$, a molekulska masa iznosi 186,04 g/mol. Ferocen je narančasti prah koji je netopljiv u vodi, a topljiv u većini organskih otapala. Temperatura vrelišta ferocena je 249 °C (522,15 K), a temperatura tališta je 172,5 °C (445,65 K). Ferocen se može pripraviti primjenom različitih kemijskih reakcija, a neke od njih su: priprava korištenjem Grignardovog reagensa - ciklopentadienilnog magnezijeva bromida i željezova klorida [9], zatim reakcija željeza s plinovitim ciklopentadienom [10] ili željezova pentakarbonila s ciklopentadienilom [11].



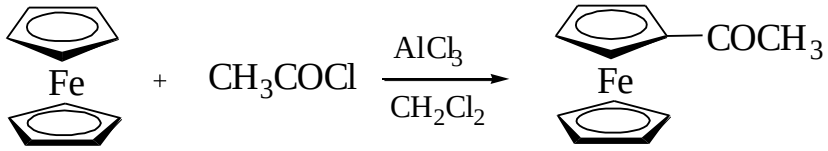
Slika 2. Struktura ferocena

Poznato je da prijelazni metali sudjeluju u redoks procesima iz čega proizlazi činjenica da i njihovi kompleksi ovisno o reakcijama, oksidacije ili redukcije, imaju različita fizikalno-kemijska svojstva. Širok spektar spojeva pojačava mogućnost rotacije ciklopentadienilnih prstenova. Uočeno je da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ferocenskih prstenova niska, što je bitno za sintezu konjugata ferocenskih derivata. Prostornom selektivnom rotacijom, supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula kako je prikazano na slici 3.



Slika 3. Vezivanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

Ferocen u mnogim reakcijama pokazuje analogiju s benzenom [12] zbog toga što obje molekule podliježu Friedel-Craftsovom acetiliranju, pri čemu je ta reakcija kod ferocena 10^6 puta brža nego acetiliranje benzena, a odvija se uz prisutnost $AlCl_3$ kao katalizatora (slika 4.).



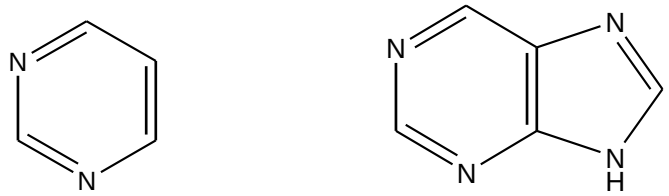
I

Slika 4. Mehanizam Friedel-Craftsova acetiliranja ferocena

2.2. Nukleozidi

Nukleozidi su glukozamini koji se sastoje od heterocikličke dušične baze koja je preko N-glikozidne veze vezana na šećer ribozu ili deoksiribozu. Nukleozidne baze dijele se na purinske i pirimidinske. Purinske baze sastoje se od pirimidinskog i imidazolnog prstena. (Slika 5). U purinske se baze ubrajaju: adenin i gvanin, a u pirimidinske: citozin, timin i uracil.

Fosfatni esteri nukleozida, poznati kao nukleotidi, nastaju fosforilacijom uz djelovanje kinaza na primarnoj hidroksilnoj skupini nukleozida. Nukleotidi su osnovne građevne jedinice molekula DNA i RNA i biološki su važne molekule. Adenozin trifosfat (ATP) je visokoenergetska molekula čijom hidrolizom nastaju adenozin-difosfat te ortofosfat [13]. Cijepanjem visokoenergetske anhidridne veze između atoma fosfora oslobađa se određena količina energije koja je dovoljna za pokretanje brojnih reakcija u organizmu. Adenozin čini osnovnu strukturu koenzima FADH, NADH te koenzima A (CoA), a funkcija koenzima je prijenos kemijske skupine između enzima.

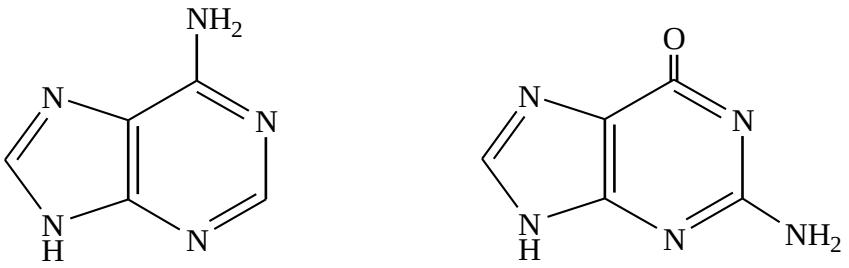


(a) (b)

Slika 5. Struktura: (a) pirimidinskog prstena, (b) purinskog prstena

2.2.1. Purinske baze

Purini su spojevi heterocikličke strukture, a imaju pet atoma ugljika i četiri atoma dušika. Purini i supstituirani purini čine jednu od najraširenijih skupina dušikovih heterocikala u prirodi [14]. Zahvaljujući svojoj strukturi, dušične se baze mogu ponašati i kao proton donori i kao proton akceptori. Aromatski karakter purina je posljedica prisutstva konjugiranih veza, što ih svrstava među nekoliko najstabilnijih spojeva u prirodi. Nastali su kondenzacijom pirimidina i imidazola koji može imati i bazna i kisela svojstva, ovisno o sredini u kojoj se nalazi, a klasificiran je kao alkaloid i diazol. Postoji u dva tautomerna oblika, jer proton može biti smješten na jednom od dušikovih atoma. Upravo stoga posjeduje amfoterna svojstva te u doticaju s kiselinom i/ili lužinom prelazi u odgovarajuću sol. Purin je osnovna građevna jedinica nukleobaza adenina i gvanina (Slika 6.).



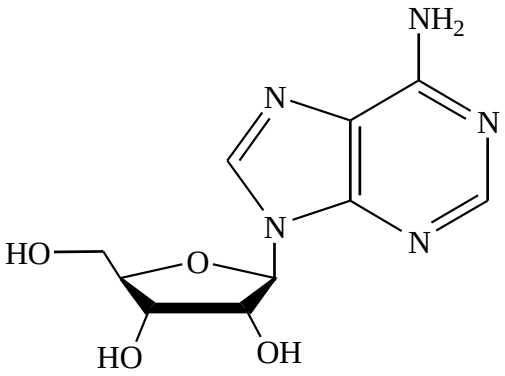
adenin gvanin

Slika 6. Struktura purinskih baza

Poput pirimidina, i purini imaju veliki biološki značaj. Sintezom 6-merkaptopurina počelo se raspravljati o antitumorskom djelovanju derivata purina jer djeluje inhibirajuće na enzime koji sudjeluju u sintezi adenina i gvanina te na taj način sprječavaju razmnožavanje tumorskih stanica. Također, otkriveno je da purini imaju važnu ulogu u prijenosu živčanih impulsa. Purini su i osnovne komponente biološki važnih molekula poput ATP-a, NADH, koenzima te GTP-a.

2.2.1.1. Adenin

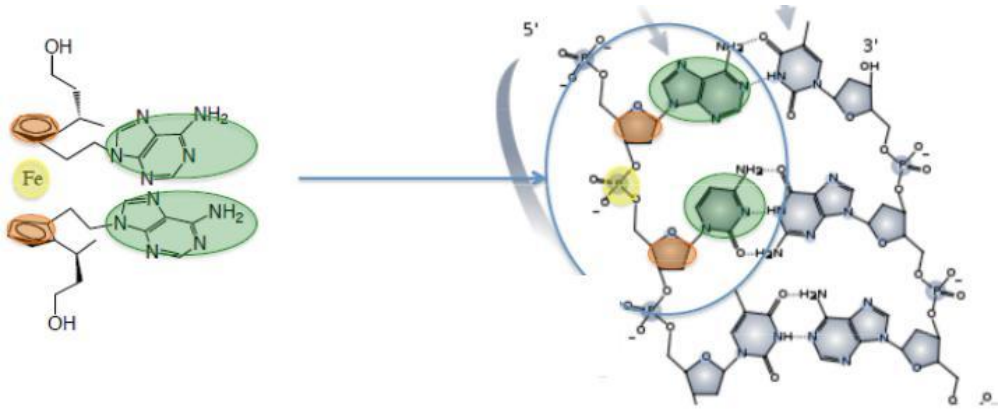
Adenin je jedna od dvije purinske nukleobaze koje se pojavljuju u formiranju nukleotida nukleinskih kiselina DNA i RNA. U DNA, adenin (A) se vezuje za timin (T) pomoću dvije vodikove veze kako bi pomogao u stabilizaciji strukture nukleinske kiseline dok se u RNA adenin veže na uracil (U). U tim vezama (A-T, U-A) se očituje komplementarnost baza jer se i adenin i timin te uracil i adenin povezuju sa po dvije vodikove veze od kojih se A-T veze pojavljuju u DNA i heterodupleksu prilikom transkripcije tj. prepisivanja, a uracil se pojavljuje u svim RNA (mRNA, tRNA, rRNA, microRNA, siRNA, snRNA, snoRNA). Upravo su vodikove veze iznimno bitne za povezivanje nukleotida i održavanje stabilnosti dvostruke uzvojnice DNA. O tome koliko je adenin bitan u živom svijetu govori činjenica da je jedna od pet nukleotidnih baza koja kodira za aminokiseline koje se prevode tj. translatiraju u proteine koji su neophodni za život organizma i genetsko nasljeđe. Adenin formira adenozin (slika 7.), koji se veže za ribozu, i deoksiadenozin koji se veže za deoksiribozu i gradi adenozin-trifosfat (ATP). Adenozin-trifosfat je iznimno značajan jer se u staničnom metabolizmu primjenjuje kao jedna od osnovnih metoda za prijenos kemijske energije između reakcija. U starijoj literaturi adenin se nekad naziva imenom vitamin B4 [15]. Međutim, više se ne smatra pravim vitaminom.



Slika 7. Adenozin

2.3. Kopulati ferocena i nukleobaza

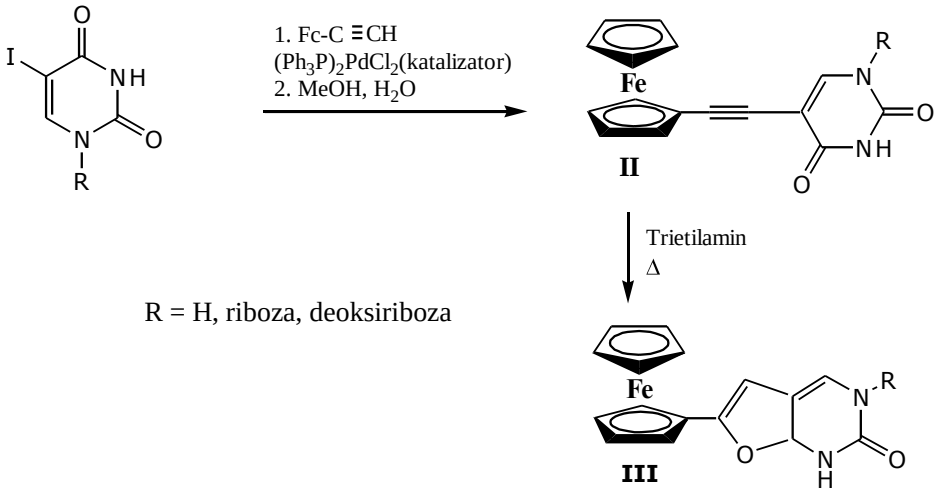
Vezanje supstituenata na molekulu ferocena omogućeno je rotacijom ciklopentadienilnih prstenova ferocena koji poprima biološke karakteristike kada se na njega veže neka biološka molekula poput nukleobaze. Ta biološka aktivnost je sve češća tema istraživanja u kojima je prvi korak upravo sinteza biokonjugata. Ferocen se veže na dušičnu bazu kao *N*-supstituent, a mjesto na kojem se veže određuje biološka svojstva samog spoja. Chen i suradnici su 1980. godine po prvi put pripravili ferocenske derivate nuklobaza, *N*-supstituirani ferocenilmetiladenin. Reakcije su provedene u vodi uz relativno niske prinose (30 %). Pripravljeni biokonjugati mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom preko vodikove veze što je potvrđeno voltametrijom (slika 8.).



Slika 8. Primjer inkorporacije polisupstituiranog ferocena u DNA

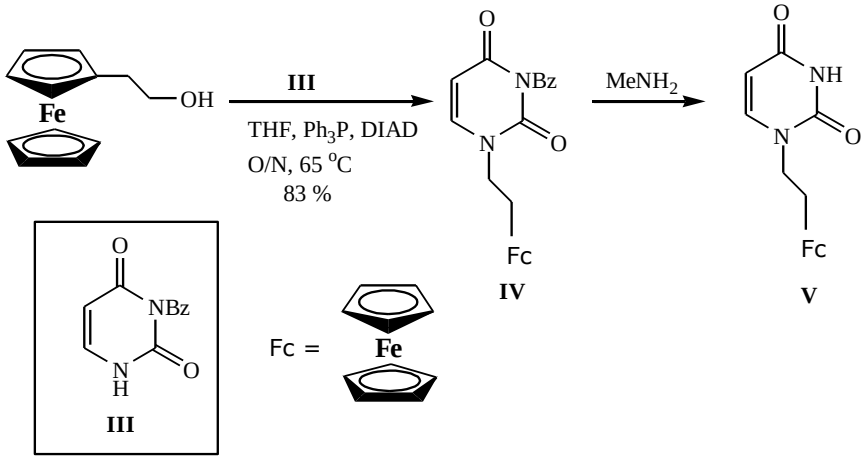
Dosadašnja istraživanja sintetskih postupaka su pokazala da trimetilamoniometilferocen jodid koji se refluksira s timinom, citozinom i uracilom može poslužiti kao izvor

ferocenoilmetilkationa. Dobiveni se kopulati izoliraju filtriranjem reakcijske smjese, a potom se pročiste kolonskom kromatografijom uz eluens kloroform:metanol 98:2. Tijekom godina razvijeno je puno uspješnih načina priprave kopulata ferocena i nukleobaza, kao npr. Songoshirina kopulativna reakcija halogenirane nukleobaze sa etilferocenom uz pomoć paladija kao katalizatora (slika 9.) koja nije česta zbog previsoke cijene paladija [9].



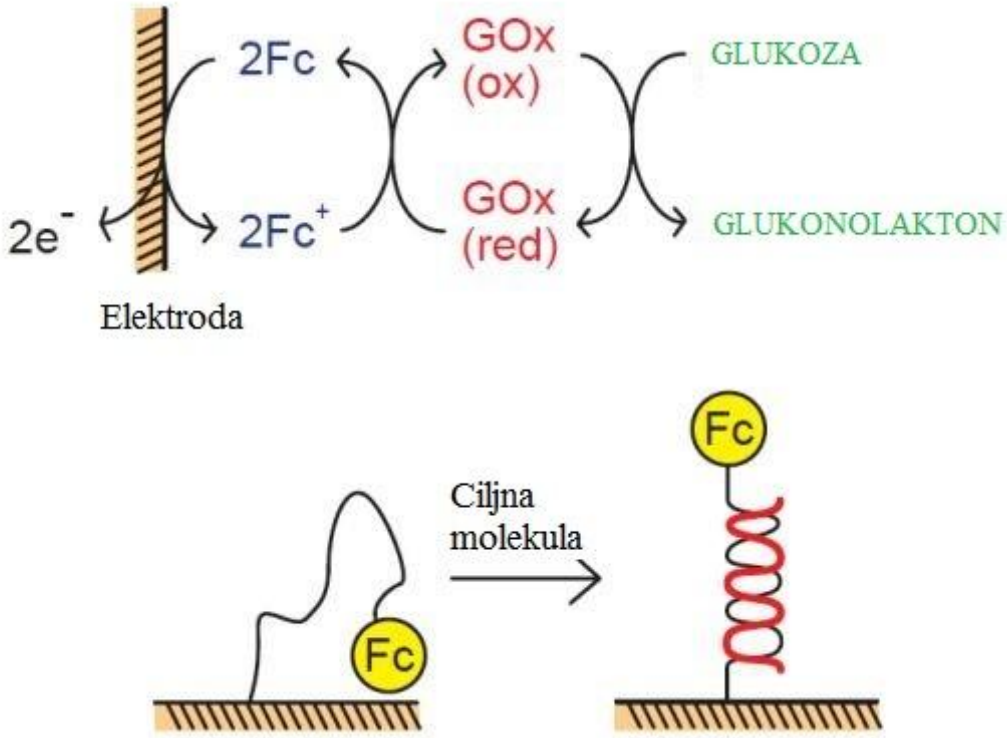
Slika 9. Songoshirina kopulativna reakcija halogenirane nukleobaze sa etilferocenom uz paladij kao katalizator

Također valja izdvojizi adiciju ferocenilmetilazida na nukleobaze uz bakar kao katalizator, Horner-Wadsworth-Emmons reakciju u kojoj se adeninski fosfonati adiraju na 1,1-dikarboksaldehid ferocen te Mitsunobu reakciju između ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze (slika 10.) [8]. Uloga tih sintetiziranih spojeva se dokazuje kroz razna istraživanja.



Slika 10. Mitsunobu reakcija ferocenil alkohola i *N*-benzilirane nukleobaze

Smatra se da kopulati ferocena i nukleobaza imaju različita biološka svojstva poput antioksidativnih i antitumorskih svojstava, citostatsku aktivnost, pozitivno djeluju prema stanicama sarkoma, melanoma i sl. Osim što imaju negativno djelovanje na uzročnike raznih bolesti, u posljednje vrijeme se proučava njihova mogućnost uporabe kao biosenzora za glukozu (slika 11.). Za odvijanje selektivne reakcije mogu se koristiti kopulati ferocena i nukleobaza koji služe kao bioelementi uz pretvornik signala koji pretvara biokemijski signal u neki mjerljivi oblik signala. Jednostavnost modifikacije, biokompatibilnost, stabilnost, velika površina, električna vodljivost te dobra redoks svojstva samo su neka od svojstava zbog kojih se ovi spojevi koriste kao biosenzori [16].



Slika 11. Mehanizam biosenzora za glukozu na bazi ferocena

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Dimetilformamid (DMF) (tv = 138 °C) se destilira pod vakuumom, a zatim prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4Å) do upotrebe. Ostali kupovni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja.

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

3.2. Metode rada

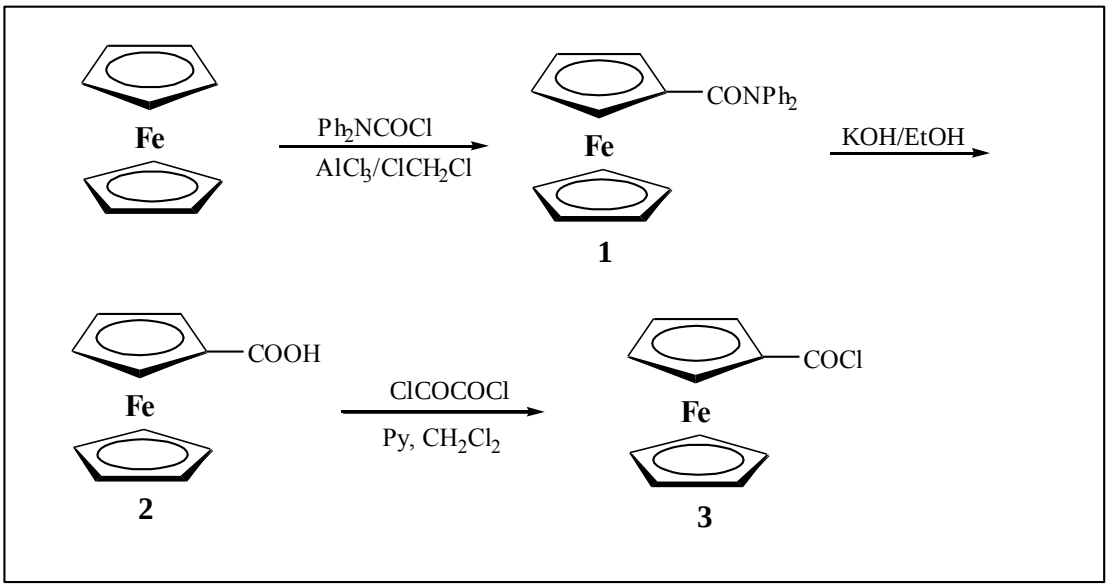
IR-spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u kalijevu bromidu, a uljasto-smolastih tvari kao otopine CH_2Cl_2 na IR-spektrofotometru Bomem MB 100 mid FT. Spektri ^{1}H-NMR i ^{13}C-NMR su snimljeni na spektrometru Varian INOVA 400. Svi uzorci su otopljeni u $CDCl_3$ ili DMSO-d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^{1}H-NMR i ^{13}C-NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm).

Intermedijeri i produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom na silikagelu („Merck“, veličine zrna zrna 0.063-0.20 mm) korištenjem etil-acetata, smjese diklormetana i etil acetata (10:1, 10:2) te diklormetana i acetona (10:1, 10:2) kao eluensa. Staklene su kolone punjene pod utjecajem gravitacije u navedenim omjerima.

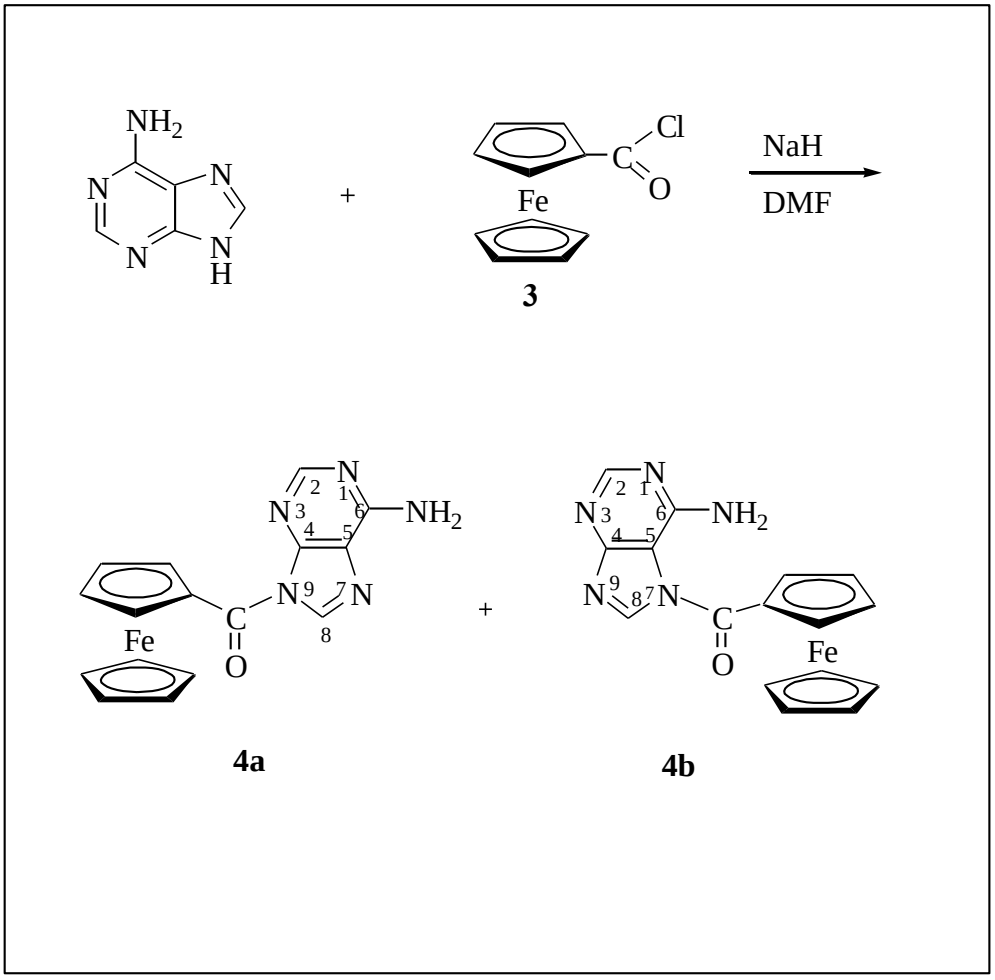
Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR spektri : ν = rastezanje , δ = deformacije (binding), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, š. = široka vrpca, r = rame (infkleksija), v = vrlo
H-NMR spketri : s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet

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



B. Priprava ferocenoil-adenina



3.3. *N*,*N*-difenilferocenkarboksamid (1)

Suspenziji aluminijeva klorida ($AlCl_3$) (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu ($Cl_2CHCHCl_2$) (27 mL) doda se otopina difenilkarbamoil-klorida (Ph_2NCOCl) (6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Reakcijska smjesa refluksira se 24 sata, zatim prenese u čašu s ledom i ekstahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **1** (8.5 g). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirova produkta pročišćeno je preparativnom tankoslojnom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala *N*,*N*-difenil-ferocenkarboksamid (**1**); t_t = 179-182 °C.

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

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 7.39 (4H, t, *Ph*), 7.25 (6H, t, *Ph*), 4.26 (s, 5H, Fc nesupst. prsten), 4.21 (d, 4H, H^2 H^3 H^4 H^5, Fc).

^{13}C-NMR, APT ($CDCl_3$) δ/ppm: 171 (*C*$ONPh_2$), 143.9 (2Cq, *Ph*$_2$), 129.1 (4C, o, *Ph*$_2$), 127.59 (4C, m, *Ph*$_2$), 126.37 (2C, p, *Ph*$_2$), 76.1 (C^1, Fc), 70.1 (C^2, C^5, Fc), 71.6 (C^3, C^4, Fc), 69.8 (Fc nesupst. prsten).

3.4. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Sirovi se amid **1** (8.3 g) otopi u 20 %-tnoj otopini kalijeva hidroksida (KOH) u etanolu (EtOH) (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5 %-tnoj vodenoj otopini natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$) i ekstahira diklormetanom. Organska se faza ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagiranog supstrata **1**. Zakiseljavanjem alkalne vodene faze koncentriranom klorovodičnom kiselinom (HCl) istaloži se 3.98 g (80 %) tamnožutih kristala ferocenkarboksilne kiseline (**2**). t_t = 193-200 °C.

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

3.5. Ferocenoil-klorid (3)

Suspenziji ferocenkarboksilne kiseline (**2**) (300 mg, 1.3 mmol) i svježe destiliranog oksalil klorida (0.45 mL, 3.13 mmol) u suhom CH_2Cl_2 (5 mL) doda se 1 kap piridina. Reakcijska se smjesa refluksira 2 sata te se ohladi i upari do suha. Dobiveni tamni ostatak se

dva do tri puta zagrijava na 80 °C tijekom 10 min u petroleteru, profiltrira preko vate i upari do suha te je dobiveno 242 mg (75 %) crvenih kristala ferocenoil-klorida (**3**).

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 2958 sl (C-H, Fc), 1755 s (C=O).

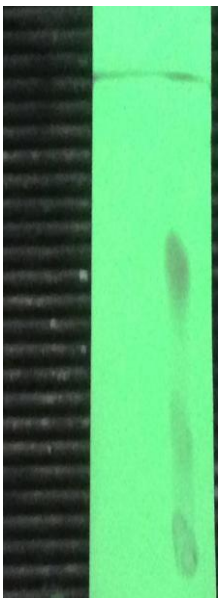
^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ/ppm: 4.9 (t, $^3J_{H,H}$ = 1.9 Hz, 2H, $H^{\alpha'}$), 4.6 (t, $^3J_{H,H}$ = 1.9 Hz, 2H, $H^{\beta'}$), 4.4 (s, 5H, Cp).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ/ppm: 178.3 (CO), 73.3 (Ci), 71.7 (Cp), 71.2 ($C^{\beta'}$), 70.4 ($C^{\alpha'}$).

3.6. Ferocenoil adenin (4)

Postupak A

Suspenzija adenina (132 mg, 0.976 mol) i NaH (26 mg, 1,07 mol) u DMF-u miješa se na sobnoj temperaturi 10 minuta, pri čemu nastaje natrijeva sol adenina. Ferocenoil-klorid **3** se otopi u DMF-u (1.5 mL) te se uz miješanje doda reakcijskoj smjesi. Nakon 15 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa neutralizira dodatkom 10 % otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/etil-acetat 10:1), a za detekciju je izoliranih komponenata korištena UV lampa (λ=254 nm) na kojoj su prisutne tri mrlje: žuta mrlja raspada (R_f= 0.1), narančasto crvena mrlja N7 (R_f= 0,3) te izrazito crvena mrlja N9 (R_f= 0.6) (slika 12.).



Slika 12. Tankoslojna kromatografija na silika gelu na pločici od aluminijeva oksida u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/ etil-acetat) pod UV svjetlom

Svjetlocrveni vodeni sloj se odbaci dok se organski sloj ispere vodom do neutralnog te upari na rotacijskom vakum-uparivaču do suha. Sirovi se produkt pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan/aceton 10:1, a potom se povećava polarnost eluensa te je omjer korištenih otapala 10:2 (slika 13). Ovim je postupkom dobiveno 120.4 mg (29 %) crvenonarančastih kristala N7-ferocenoil-adenina (**4b**) i izrazito crvenih kristala 11.6 mg (10 %) N9-ferocenoil-adenina (**4a**).



Slika 13. Kromatografska kolona na stupcu od silika gela pri pročišćavanju smjese N7- i N9-ferocenoil-adenina

Postupak B

Suspenzija 70.54 mg (0.522 mol) adenina i 12.53 mg (0.574 mol) NaH u DMF-u miješana je tijekom 30 minuta te je dodana otopina ferocenoil-klorid **3** (129.68 mg, 0.52 mmol) u 1.5 mL DMF. Obrada reakcije kao i kod *postupka A*. Na TLC pločici uočene su četiri mrlje: dvije žute mrlje raspada (R_f= 0.1), narančastocrvena mrlja N7-kopulata (R_f= 0,3) te crvena mrlja N9-kopulata (R_f= 0.6). Sirovi se produkt (54,1 mg) pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz diklormetan kao eluens te je tijek eluacije pospješen promjenom polarnosti eluensa uz smjesu diklormetana/acetona 10:1. Ovim postupkom je izolirano 9,71 mg (19 %) N7-produkta (**4b**) i 22,64mg (42 %) N9-produkta (**4a**).

1. frakcija u oba postupka je žuta kruta tvar

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3104 sl. (CH, aromatski), 2927 sl. (CH, Fc), 1716 s. (C=O), 1677 s. (C=O).

^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ/ppm: 4.87 (2H, s, C*H*-Fc), 4.47 (2H, s, C*H*-Fc), 4.26 (5H, s, Cp).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ/ppm: 177.8 (CO), 71.9 (*C*H-Fc), 70.6 (*C*H-Fc), 70.1 (Cp) ppm.

N9-ferocenoil-adenin (*4a*)

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3403, 3302 sl. (NH_2), 3054 sl. (CH, aromatski), 2985 sl. (alifatski CH), 1680, j. (C=O, amid).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 25 °C) δ/ppm: 8.65 (1H, s, H^8), 8.19 (1H, s, H^2), 7.52 (2H, s, NH_2), 5.01 (2H, s, C*H*-Fc), 4.76 (s, 2H, C*H*-Fc), 4.31 (s, 5H, Cp).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, 25 °C) δ/ppm: 169.7 (CO), 156.8 (C^6), 154.09 (C^2), 149.62 (C^4), 139,9 (C^8), 119,26 (C^5), 74.1 (*C*H-Fc), 72,6 (*C*H-Fc), 79,1 (Cq-Fc), 71.65 (Cp).

***N7-ferocenoil-adenin* (4b)**

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1}: 3482, 3360 sl. (NH_2), 3180 sl. (CH, aromatski), 2923 sl. (alifatski CH), 1683, 1623 j. (C=O).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO, 25 °C) δ/ppm: 9.06 (1H, s, H^8), 8.37 (1H, s, H^2), 7.7 (2H, s, NH_2), 5.12 (2H, s, C*H*-Fc), 4.87 (2H, s, C*H*-Fc), 4.36 (5H, s, Cp).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, 25 °C) δ/ppm: 171,11 (CO), 161.09 (C^6), 155.06 (C^2), 152.65 (C^4), 146.67 (C^8), 109,26 (C^5), 74.37 (*C*H-Fc), 72,66 (*C*H-Fc), 71,59 (Cq-Fc), 71.59 (Cp).

4. REZULTATI I RASPRAVA

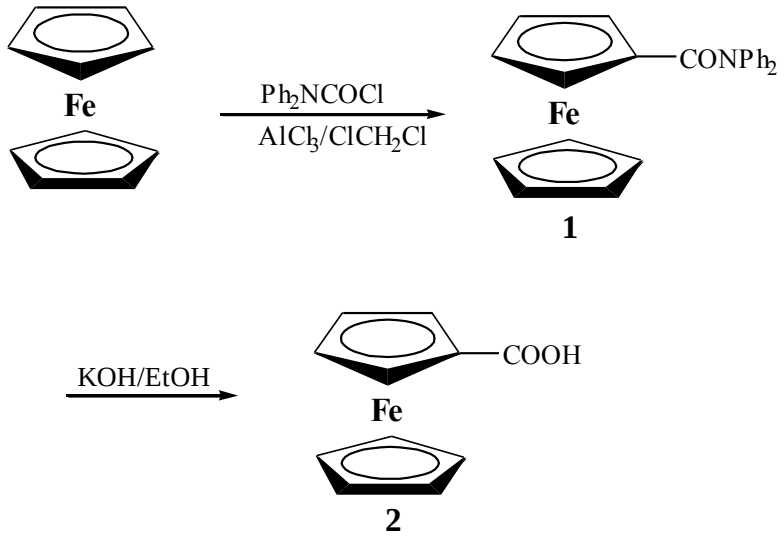
4.1. Uvod

Cilj ovog završnog rada je sinteza kopulata ferocenskog derivata i nukleobaze adenina s karbonilnom podjedinicom kao poveznicom. Svrha ovog rada je ispitati reaktivnost NaH kao deprotonirajućeg agensa na regioselektivnost reakcija pri čemu je vrijeme aktivacije reakcijske smjese 10 i 30 minuta. Analozi nukleozida, među kojima i kopulati nukleobaza s ferocenskim derivatom, pokazuju značajno biološko djelovanje te su stoga važno područje istraživanja. Uz svoje biološko djelovanje, analozi također pokazuju i zanimljiva elektrokemijska svojstva. Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu intermedijera ferocenoil klorida (**3**) koji je zatim kopuliran s nezaštićenom nukleobazom adeninom. S obzirom da nezaštićena pirimidinska baza adenin u svojoj strukturi sadrži dušikove atome različite kiselosti i reaktivnosti, u imidazolnom prstenu na poziciji N7 i N9 i na pirimidinskom prstenu na poziciji C6 primarnu amino skupinu, posebna pozornost pri sintezi je usmjerena na regioselektivnost provedenih reakcija. U drugom dijelu su strukture sintetiziranih spojeva potvrđene korištenjem IR i NMR spektroskopije.

4.2. Sinteza i spektralna analiza prekursora ferocenoil adenina

Modificirani nukleozid, ferocenoil adenin (**4**), pripravljen je višestupanjskom sintezom počevši od ferocena i difenilkarbomoil-klorida (Ph_2NCOCl) pri čemu je izoliran *N*,*N*-difenilferocenkarboksamida (**1**) u 60 %-tnom iskorištenju. Hidrolizom pripravljenog amida **1** u etanolnoj otopini kalijeva hidroksida nastaje ferocenkarboksilna kiselina (**2**) kao tamnožuta kristalinična tvar u iskorištenju od 80 % (shema 1).

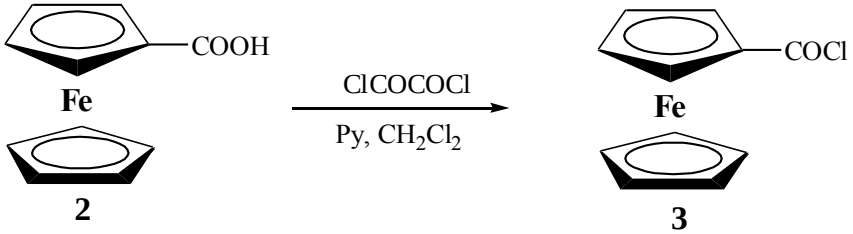
Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. IR-spektar *N*,*N*-difenilferocenkarboksamid (**1**) sadrži signale pri 1642, 1594 cm^{-1} koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida dok je u IR spektru spoja (**2**) vidljiva apsorpcijska vrpca pri 3100-2700 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istezanja hidroksilnih skupina koje su asocirane intermolekulskim vodikovim vezama. U spektrima spoja **2** također je prisutna vrpca karakteristična za karbonilnu skupinu pri 1657 cm^{-1}. ^{1}H-NMR spektar amida **1** snimljen u $CDCl_3$ sadrži kemijske pomake na 7.39 i 7.25 ppm koji se pripisuju fenilnim protonima i pomake koji su karakteristični za ferocenske protone.



Shema 1. Priprava ferocenkarboksilne kiseline (**2**)

U nastavku je pripremljen ključni intermedijar, ferocenoil-klorid (**3**), reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (**2**) i oksalil-klorida u suhom diklormetanu. Reakcija se završava višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta, u iskorištenju od 85 % (shema 2) [17].

U IR spektru klorida **3** asignirana je apsorpcijska vrpca karakteristična za kiselinske kloride pri 1755 cm^{-1}, u ^{1}H NMR spektru prisutni su kemijski pomaci monosupstituiranog ferocena budući da su siganli vidljivi u rasponu od δ 4.38 do 4.91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta, a u ^{13}C NMR spektru uz ferocenske ugljikove atome prisutan je i kemijski pomak karakterističan za karbonilnu skupinu pri 178 ppm.

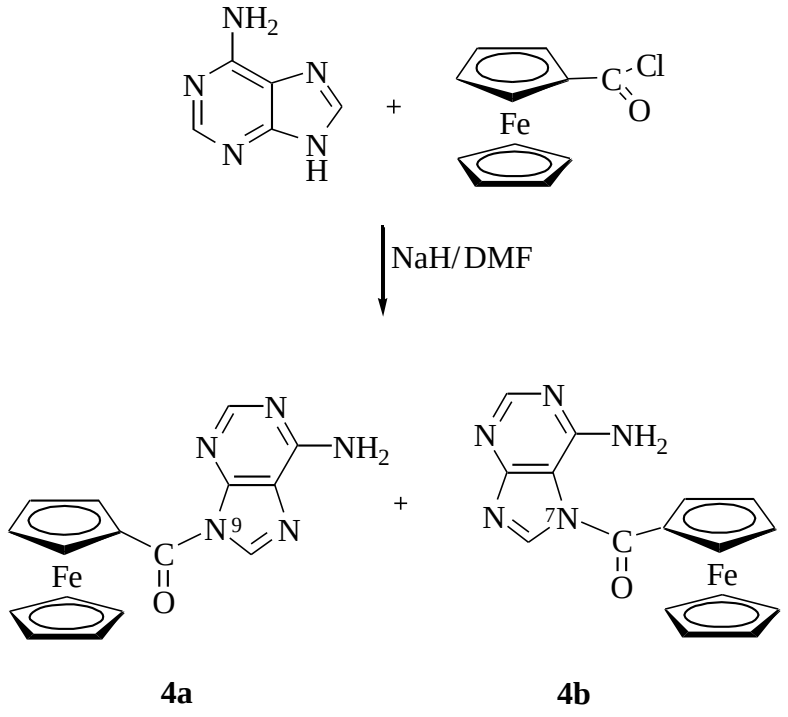


Shema 2. Priprava ferocenoil klorida (**3**)

4.3. Sinteza i spektralna analiza ferocenoil adenina

4.3.1. Sinteza

Dušikovi atomi adenina (N7, N9, N3, N1 i C6-NH_2) su donori elektrona što omogućuje vezanje ferocena na molekulu samog adenina. Molekula adenina ima dva dušikova atoma koji su dio imidazolnog prstena na poziciji 7 i 9, te jednu amino skupinu na C6 u pirimidinskom prstenu, a time i mogućnost supstitucije na tri dušikova atoma. U ovom završnom radu pozornost je usmjerena na regioselektivnost reakcije upotrebom natrijeva hidrida kao deprotonirajućeg agensa. Reakcije se provode u suhom dimetilformamidu (DMF), a usmjerenost reakcije ispituje se primjenom različitog vremena deprotekcije nukleobaze. Vrijeme deprotekcije opisano u ovom radu je standardnih 10 minuta i produljeno vrijeme deprotekcije, 30 minuta (shema 3).



Shema 3. Priprava kopulata ferocenoil-klorida (**3**) i adenina

Deprotekcija baze provedena je natrijevim hidridom (NaH) u DMF-u tijekom 10 i 30 minuta pri čemu nastaje natrijeva sol adenina, odnosno aktivirana nukleobaza. Slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ferocenoil-klorid (**3**) koja se odvija prilično brzo uz jasnu promjenu boje iz crvene u narančastožutu. Natrijeva sol adenina, zbog pozitivnog naboja na natriju i negativnog na dušikovom atomu, jak je nukleofil u reakciji kopulacije s ferocenoil-kloridom (**3**) što upućuje na S_{NAc} mehanizam. Reakcije je praćena tankoslojnom

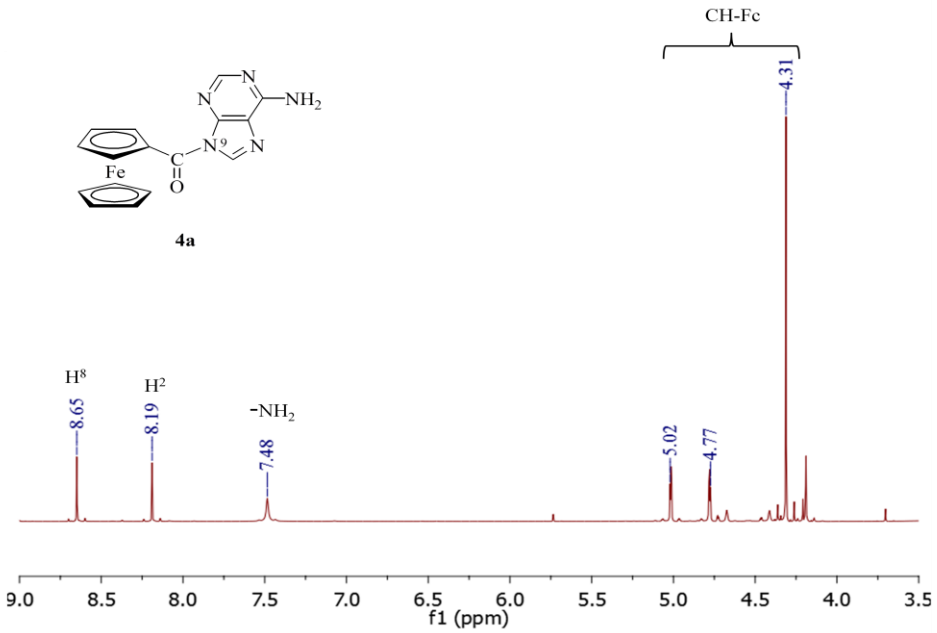
kromatografijom na silika gel pločama uz eluens diklormetan/aceton 10:1. Tijekom ovog postupka dolazi do velikih gubitaka radi vrlo slabe topljivosti sirovog produkta u ispitanim organskim otapalima poput diklormetana, acetona i etil-acetata. Izolirana komponeta na TLC-u pokazuje prisutnost tri različita spoja: žuta mrlja raspada (R_f= 0.1), narančastocrvena mrlja N7-ferocenoil-adenina (**4b**) (R_f= 0,3) i izrazito crvena mrlja N9-ferocenoil-adenina (**4a**) (R_f= 0.6). Postupak pročišćavanja reakcijske smjese proveden je kolonskom kromatografijom uz SiO_2 kao adsorbens (stacionarna faza). Sirovi produkt, radi vrlo slabe topljivosti, nanešen je na sloj adsorbensa u koloni kao suspenzija te je provedena eluacija s različitim otapalima od slabo polarnih (etil-acetat) do polarnih (smjesa diklormetana i acetona kojem se povećavao volumenski udio tijekom eluacije). Nakon provedene kolonske kromatografije izolirana su dva spoja od kojih je spoj **4a** dobiven u 10 %-tnom iskorištetnju kao narančasta kruta tvar, a spoj **4b** u 29 %-tnom iskorištenju kao crvena kruta tvar.

Budući da su ciljani produkti N7 (**4b**) i N9 (**4a**) izolirani u relativno slabom iskorištenju, u svrhu poboljšanja istog, modificiran je sam postupak na način da je vrijeme deprotekcije produženo na 30 minuta. Modifikacije su provedene i tijekom izolacije ciljanih spojeva time što je reakcijska smjesa prije pročišćavanja kolonskom kromatgrafijom neutraliziran 10 % limunskom kiselinom, te ekstrahiran diklormetanom. Dobiveni je sirovi produkt podvrgnut kolonskoj kromatografiji uz početni eluens diklormetan te smjesu diklormetan/aceton 10:1, pri čemu je izoliran N7-ferocenoil-adenin (**4b**) uz iskorištenje od 19 % te N9-ferocenoil-adenin (**4a**) pri iskorištenju od 42 %.

Nakon provedenih postupaka jasno je vidljivo da je tijekom ova dva postupka dobivena smjesa produkata u različitom iskorištenju. U reakciji provedenoj uz vrijeme deprotekcije od 10 minuta nastaje nešto više N7-produkta (**4b**) dok produljeno vrijeme deprotekcije pogoduje nastajanju N9-produkta (**4a**). Na temelju provedenih reakcija može se zaključiti da vrijeme deprotekcije utječe na omjer nastalih produkata **4a** i **4b**, te da produljeno vrijeme deprotekcije usmjerava reakciju prema nastajanju kopulata N9-ferocenoil-adenina (**4a**).

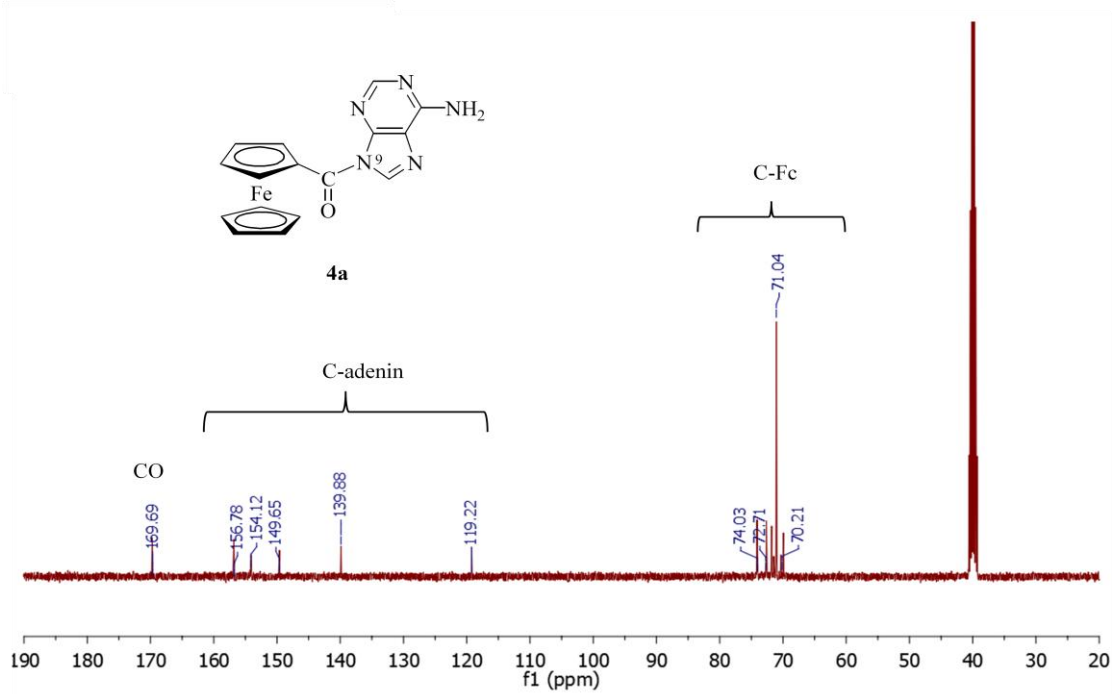
4.3.2. Spektralna analiza

Struktura oba izomera ferocenoil-adenina (**4a,b**) potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru izomera **4a** vidljiva su dvije apsorpcijske vrpce pri 3403 i 3302 cm^{-1} koje se pripisuju slobodnoj i asociranoj amino skupini koja se nalazi na C6-poziciji, te apsoprcijska vrpca jakog intenziteta pri 1680 cm^{-1} koja odgovara karbonilnoj skupini premosnice ferocenske i adeninske podjedinice. U IR spektru izomera **4b** asignirane su apsorpcijske vrpce s neznatnim pomakom u odnosu na apsorpcijske vrpce izomera **4a** te je time potvrđena prisutnost istih karakterističnih skupina u oba spoja. U ^{1}H NMR (slika 14.) spektru N9-kopulata **4a**, snimljenom u DMSO-d6, vidljiv je kemijski pomak pri δ 7.52 ppm koji se pripisuje NH_2 skupini adenina. Kemijski pomak pri δ 12.8 ppm karakterističan za NH skupinu adenina (u imidazolnom prstenu adenina) nije prisutan, što ukazuje na vezanje ferocenske podjedinice na *N*-atom imidazolnog prstena adenina. U spektru izomera **4a** prisutni kemijski pomaci pri δ 8.65 i 8.19 ppm pripisuju se CH skupinama adeninskog prstena na C^8 i C^2. U ^{1}H NMR spektru izomera **4a** vidljivi su i kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen pri δ 5.01 i 4,76 ppm koji se pripisuju CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak pri δ 4.31 ppm potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 14. ^{1}H NMR spektar N9-ferocenoil-adenin (**4a**)

U ^{13}C NMR (slika 15.) spektru N9-kopulata **4a** vidljiv je kemijski pomak pri δ 169.7 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine premosnice ferocenske i adeninske podjedinice. Signal pri δ 156.8, 154.09, 149.62, 139.9 i 119.26 ppm pripisuju se ugljikovim atomima adeninske podjedinice (C^6, C^2, C^4, C^8 i C^5), kemijski pomaci pri δ 74.1 i 72.6 ppm odgovaraju ugljikovim atomima supstituiranog Cp-prstena ferocena, a kemijski pomak pri δ 71.65 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog Cp-prstena.



Slika 15. ^{13}C NMR spektar N9-ferocenoil-adenin (**4a**)

U ^{1}H NMR spektru kopulata **4b** vidljiv je kemijski pomak pri δ 7.7 ppm koji potvrđuje prisutnost NH_2 skupine, te u spektru također nije zamijećen pomak pri δ 12.8 ppm što ukazuje na povezivanje ferocenske i adeninske podjedinice. U spektru izomera **4b** kemijski pomaci pri δ 9.06 i 8.37 ppm se pripisuju CH skupinama adeninskog prstena na C^8 i C^2. Potvrda monosupstituiranog ferocenskog kopulata vidljiva je iz kemijskih pomaka pri δ 5.12 i 4,87 ppm za CH skupine supstituiranog Cp-prstena i pri δ 4.36 ppm za nesupstituirani Cp-prsten. U ^{13}C-NMR spektru spoja **4b** kemijski pomak pri δ 171.11 ppm se pripisuje karbonilnoj skupini premosnice ferocenske i adeninske podjedinice, a kemijski pomaci za ugljikove atome adenina neznatno su pomaknuti u više ili niže polje čime je potvrđena njihova prisutnost. Ugljikovi atomi ferocenske podjedinice potvrđeni su kemijskim pomacima pri δ 74.37 i 72.66 ppm za supstituirani Cp-prsten i pri δ 71.59 ppm za nesupstituirani Cp-prsten.

Na temelju provedene spektralne analize može se potvrditi nastajanje dva izomerna produkta ferocenoil-adenina u ovim reakcijama kopulacije. Također može se zaključiti da je ferocenska podjedinica vezana na adenin na dva položaja, N9 **4a** i N7 **4b**.

5. ZAKLJUČAK

1. Višestupanjskom sintezom pripravljeni su monosupstituirani ferocenski derivat, N9-ferocenoil-adenini (**4a**) i N7-ferocenoil-adenin (**4b**).
2. Povezivanje ferocenske podjedinice na *N*-atom imidazolnog prstena adenina, u oba izomerna produkta **4a** i **4b**, potvrđen je odsutnošću kemijskog pomaka pri δ 12.8 ppm koji je karakterističan za NH skupinu u imidazolnom prstenu i kemijskim pomakom oko δ 7.6 ppm koji se pripisuje NH_2 skupini adenina.
3. Na temelju provedenih reakcija može se zaključiti da vrijeme deprotekcije nukleobaze adenina utječe na omjer nastalih produkata **4a** i **4b**, odnosno produljeno vrijeme deprotekcije (30 minuta) usmjerava reakciju prema nastajanju kopulat N9-ferocenoil-adenin (**4a**) u većem iskorištenju u odnosu na N7-produkt **4b**.
4. U nastavku istraživanja planirana se provedba optimiranja reakcijskih uvjeta u svrhu dobivanja primarno N9-ferocenoil-adenina (**4a**) u što većem iskorištenju.

6. POPIS LITERATURE

[1] De Champdore, M., Di Fabio G., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G., Loddo, R., La Colla, M., La Colla, P. (2004) In-water reactivity of nucleosides and nucleotides: one-step preparation and biological evaluation of novel ferrocenyl-derivatives. *Tetrahedron* **60,** 6555–6563.

[2] Nesmeyanov, A. N., Bogomolova, L. G., Andrianova, I. G., Vilchevskaya, V. D., Kockhetova, N. S. (1972) Synthesis and antitumor activity of vitamin B_1 derivatives containing ferrocene fragment. *Khim.-Farm.Zh*. **6(4),** 61-62.

[3] Köpf-Maier, P., Köpf, H. (1987) Vanadium (IV) metalocenne complexes having spermicidal activity. *Chem. Rev*. **87,** 1137-1140.

[4] Simenel, A. A., Morozova, E. A., Snegur, L.V., Zykova, S.I., Kachala, V.V., OStrovskaya, L. A., Bluchterova, N. V., Fomina, M. M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl. Organomet. Chem*. **23,** 219-224.

[5] Charma, M., Lee, J.S., Kraatz, H.-B. (2002) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *J. Organomet. Chem*. **648,** 81-82.

[6] Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maeda, M. (2002) DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate. *Talanta*. **56,** 857-866.

[7] Kowalski, K., Koceva-Chyla, A., Pieniazek, A., Bernasinska, J., Skiba, J., Rybarczyk-Pirek, A. J., Jozwiak, Z. (2012) *J. Organomet. Chem*. **700,** 58-68.

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

[9] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A new type of organo-iron compound. *Nature* **168,** 1039-1040.

[10] Wilkinson, G., Pauson, P. L., Cotton, F. A. (1954) Bis-cyclopentadienyl Compounds of Nickel and Cobalt. *J. Am. Chem. Soc.* **76,** 1970-1974.

[11] Wilkinson, G., Cotton, F. A. (1959) Cyclopentadienyl and arene metal compounds. *Progress in Inorganic Chemistry* **1,** 1-124.

[12] Rapić, V., Kovačević, M. (2012) Organometalna i bioorganometalna kemija-ferocenski peptidi**.** *Kem. Ind.* **61,** 71–120.

[13] Ascoli, A. (1900) Allgemeine Bestandtheile der Nahrungs-und Genussmittel**.** *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **31,** 161-164.

[14] Rosemeyer, H. (2004) The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chemistry & Biodiversity* **1,** 361-401.

[15] Hunter, G. K. (2000) Vital Forces: The discovery of the molecular basis of life, 1.izd., Academic Press, London.

[16] Singh, P., Menrad-Moyon, C., Kumar, J., Fabre, B., Verma, S., Bianco, A. (2012) Nucleobase-pairing triggers the self-assembly of uracil-ferrocene on adenine functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Carbon* **50,** 3170-3177.

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