

# Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila

---

Tandarić, Tana

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:937517>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Tana Tandarić**

# **Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila**

## **DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Organska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka.

Veliku zahvalnost iskazujem prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku za puno strpljenja, prenesenog znanja i poklonjenog vremena.

Hvala dr. sc. Davoru Šakiću na slamci spasa kada bi bilo što pošlo krivo.

Na kraju, puno hvala mojim prijateljima na podršci tokom svih ovih godina. Hvala vam što postojite!

# SADRŽAJ

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. UVOD .....                                                            | 1  |
| 1.1. LIJEKOV I U OKOLIŠU .....                                           | 1  |
| 1.2. OBRADA OTPADNIH VODA KLOORIRANJEM .....                             | 2  |
| 1.3. 5-FLUOROURACIL .....                                                | 3  |
| 1.4. RAČUNALNI MODELI U PROCJENI OKOLIŠNE SUDBINE FARMA CEUTIKA .....    | 5  |
| 2. METODE .....                                                          | 7  |
| 2.1. OSNOVE KVANTNO-KEMIJSKIH IZRA ČUNA .....                            | 7  |
| 2.1.1. IZRAČUN ENERGIJE I GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA .....                | 8  |
| 2.1.2. FREKVENCIJSKI RAČUN .....                                         | 10 |
| 2.2. METODE I PARAMETRI KVANTNO-KEMIJSKIH IZRA ČUNA .....                | 12 |
| 2.2.1. DFT METODE .....                                                  | 13 |
| 2.2.2. BAZNI SKUPOVI .....                                               | 14 |
| 2.2.3. SOLVATACIJSKI EFEKTI .....                                        | 15 |
| 2.2.4. POPULACIJSKA ANALIZA .....                                        | 16 |
| 2.2.5. KONDENZIRANA FUKUI FUNKCIJA .....                                 | 17 |
| 2.3. NMR SPEKTROSKOPIJA .....                                            | 18 |
| 2.3.1. KEMIJSKI POMAK .....                                              | 21 |
| 2.3.2. SPREZANJE IZMEĐU JEZGARA RAZLIČITIH SPINOVA .....                 | 21 |
| 3. OBRAZLOŽENJE TEME .....                                               | 22 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....                                            | 24 |
| 4.1. PRIPRA VA KLOORHIDRINA .....                                        | 24 |
| 4.2. NMR ANALIZA REAKCIJSKE SMJESE 5-FU I HOCl .....                     | 25 |
| 4.2. REAKCIJSKI MEHANIZAM KLOORIRANJA 5-FLUOROURACILA .....              | 30 |
| 4.2.1. EPOKSIDACIJA 5-FU .....                                           | 31 |
| 4.2.2. USKLAĐENA ADICIJA Cl <sup>+</sup> I OH <sup>-</sup> NA 5-FU ..... | 33 |
| 4.2.3. N-KLOORIRANJE 5-FU .....                                          | 35 |
| 4.2.4. C5-KLOORIRANJE PREKO IMINSKOG INTERMEDIJERA .....                 | 37 |
| 4.2.4.1. ANALIZA KONDENZIRANIH FUKUI FUNKCIJA .....                      | 43 |
| 6. LITERATURA .....                                                      | 49 |
| 7. SAŽETAK .....                                                         | 55 |
| SAŽETAK .....                                                            | 55 |

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| 8. PRILOZI.....                                              | 57 |
| 8.1.GEOMETRIJE LOCIRANIH MINIMUMA I PRIJELAZNIH STANJA ..... | 57 |
| 9. ŽIVOTOPIS .....                                           | 67 |

# 1. UVOD

## 1.1. LIJEKOVI U OKOLIŠU

Sve veća proizvodnja i potrošnja farmaceutika odrazila se na njihovu učestalu pojavnost u okolišu, izazivajući rastuću zabrinutost zbog mogućih ekoloških posljedica. Posljednjih dvadesetak godina intenzivno se provode istraživanja koja prate trend rastuće pojavnosti različitih farmaceutika, njihovih metabolita i razgradnih produkata u otpadnim vodama putem kojih dospijevaju u rijeke, jezera i mora. Poseban problem su podzemne vode u blizini otpada medicinskog podrijetla, kao i otpadne vode iz bolničkih kompleksa (Hug i sur., 2014; Schwarzbauer i Ricking, 2010; Loos i sur., 2009; Terzić i sur., 2008; Kolpin, 2002; Heberer, 2002; Holm i sur., 1995). Od posebne važnosti su farmaceutici i spojevi sadržani u proizvodima za osobnu njegu i higijenu koji su često detektirani u okolišu (Khetan i Collins, 2007). Također, mnogi od njih su izrazito toksični spojevi te je sama njihova pojavnost u okolišu dovoljan razlog za zabrinutost.

Prisutnost farmaceutika u okolišu većinom je uzrokovana njihovom nepotpunom obradom u postrojenjima za obradu otpadnih voda ili neprikladnim načinima obrade. Osim toga, tokom obrade otpadnih voda, farmaceutske aktivne spojeve podvrgnuti su oksidativnim procesima poput kloriranja i ozonolize, a izloženi su i UV zračenju. Takva obrada može rezultirati formiranjem niza produkata nepoznatih svojstava. Nedavno je pokazano da produkti kloriranja farmaceutika mogu varirati od „neobičnih“ (DellaGreca i sur., 2009) do „neočekivanih“, no također mogu biti toksičniji nego ishodne supstance (Bedner i MacCrehan, 2006).

Nažalost, farmakoekologija tek je nedavno postala tema koja zaokuplja širu javnost. Zasad su uglavnom provedene analitičke studije koje detektiraju farmaceutike u okolišu i otpadnim vodama, no o putevima degradacije, mogućim intermedijerima i produktima malo se zna. Također, nema mnogo studija koje se bave produktima nastalim u procesima obrade otpadnih voda, a još manje njihovom potencijalnom toksičnošću.

## 1.2. OBRADA OTPADNIH VODA KLORIRANJEM

Dezinfekcija otpadnih voda nužna je za zdravstvenu ispravnost pitke vode te kako bi se spriječila kontaminacija rijeka, podzemnih voda i ostalih vodotoka mikroorganizmima (Blatchley i sur., 2007; Tchobanoglous i sur., 2003). Kloriranje otpadnih voda najčešće je korištena metoda obrade otpadnih voda. Ovakva obrada efektivno uništava velik broj bakterija, virusa i protozoa odgovornih za teške infekcije, poput *Salmonella* sp., *Shigella* sp. i *V.cholerae* (Levine i sur., 1990; Haas i sur., 1987). Prva primjena u svrhu pročišćavanja otpadnih voda bila je 1910. u Philadelphiji u SAD-u, te je ubrzo široko prihvaćena jer se pokazala vrlo učinkovitom (Stover i sur., 1986).

U obradi otpadnih voda klor se može koristiti kao plin ( $\text{Cl}_2$ ) koji se uvodi u vodu, ili kao otopina natrijevog hipoklorita ( $\text{NaOCl}$ ) odnosno krutog kalcijevog hipoklorita ( $\text{Ca(OCl)}_2$ ). Nakon obrade potrebno je provesti i dekloriranje kako bi voda koja je prošla proces kloriranja bila primjerena za vraćanje u sustav vodoopskrbe (White, 2005).

Kada se uvodi u vodu molekulski klor ( $\text{Cl}_2$ ) reagira s vodom i disproportionira se u hipoklorastu kiselinu ( $\text{HOCl}$ ) i klorovodičnu kiselinu ( $\text{HCl}$ ) prema jednadžbi (1):



$\text{HOCl}$  je u ravnoteži s molekulskim klorom ( $\text{Cl}_2$ ) prema izrazu (1) te s hipokloritnim anionom ( $\text{OCl}^-$ ) (Voudrias i sur., 1988) prema izrazu:



Distribucija klornih specija ovisi o pH otopine. Sam raspad klornih specija u nekoj otopini ovisi također o pH otopine, koncentraciji klornih specija u otopini, dozi UV zračenja i kvaliteti vode (Feng i sur., 2007).

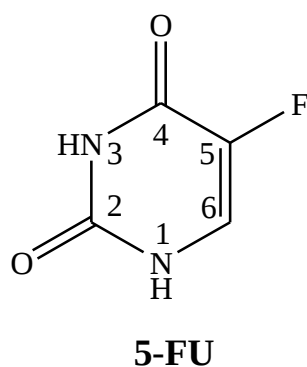
Primjerice, pri niskom pH glavna klorirajuća specija je sam molekularni klor ( $\text{Cl}_2$ ), a oko pH 6 to je hipoklorasta kiselina ( $\text{HOCl}$ ). Pri pH 9 predvadaajuća specija je hipokloritni anion ( $\text{OCl}^-$ ) (Antelo i sur., 1995).

Kao što je raspravljeno u predhodnom poglavlju, osim bioloških onečišćenja, u otpadnim vodama mogu biti prisutni i mali organski spojevi, poput farmaceutika, koji reagiraju s klorirajućim specijama.

U literaturi je opisano više primjera reakcije HOCl i lijekova, pri čemu nastaju reaktivniji, toksičniji ili perzistentniji oblici. Primjerice, diklofenak, protuupalni lijek koji se osim u humanoj nalazi i u veterinarskoj upotrebi, reagira s otopljenim HOCl u vodi ( $k_{\text{obs}} = 3,9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pri pH = 7) pri čemu nastaju i neki produkti koji su netopljivi u vodenoj otopini (Soufan i sur., 2012). U preglednim radovima postoje podaci za kloriranje mnogih terapijskih skupina lijekova u okolišu, poput sulfonamida, fluorokinolona, fibrata, beta-blokatora, antiaritmika i protuupalnih lijekova (Sharma i sur., 2008). No ipak, reakcije lijekova s klorirajućim specijama i dalje su slabo istražene, te se o mehanizmima samog kloriranja farmaceutika ne zna mnogo.

### 1.3. 5-FLUOROURACIL

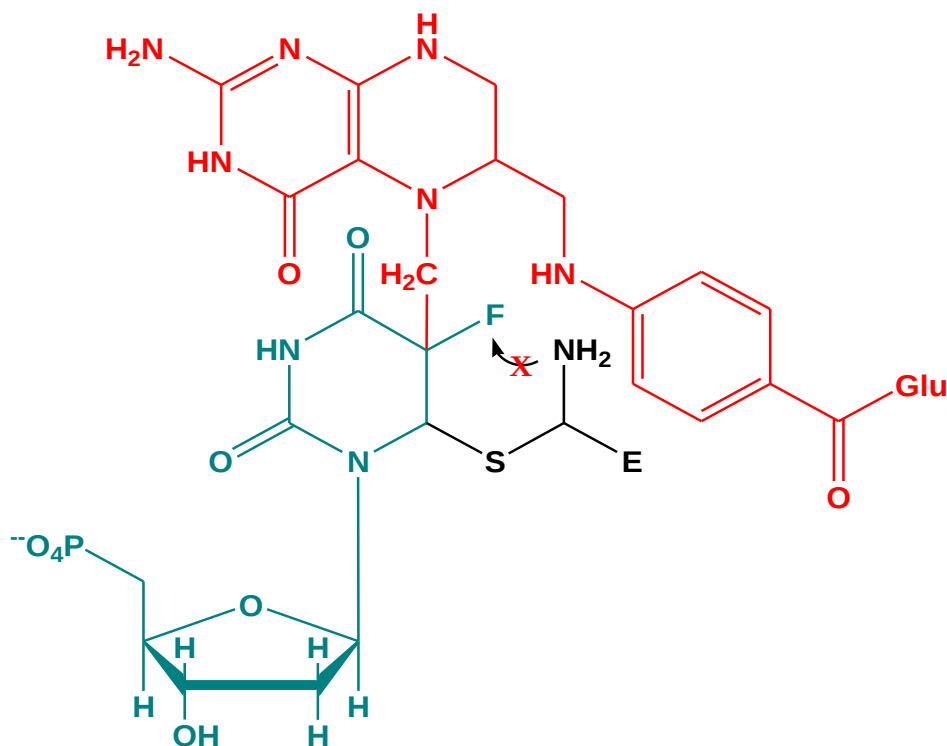
5-fluorouracil (5-FU) analog je pirimidina koji pripada skupini antimetabolita (Slika 1). Pripravio ga je 1957. Charles Heidelberger. Lijek se nalazi na WHO listi esencijalnih lijekova, potrebnih za osnovnu zdravstvenu zaštitu ([www.who.int](http://www.who.int)).



Slika 1. 5-FU s označenim brojevima atoma unutar prstena.

Mehanizam njegova djelovanja temelji se na ireverzibilnoj inhibiciji timidilat sintaze, enzima koji metilacijom prevodi deoksiuridilat-monofosfat (dUMP) u deoksitimidilat-monofosfat (dTMP). In vivo 5-FU prevodi se u fluor-deoksiuridilat-monofosfat (F-dUMP). Ovaj analog dUMP u dijelu katalitičkog ciklusa djeluje kao normalni supstrat.

Da bi se dTMP stvorio potrebno je uklanjanje protona ( $H^+$ ) s C5 nukleotida vezanog u aktivno mjesto. 5-FU ima fluor na C5 položaju, koji enzim ne može eliminirati. Kataliza je zaustavljena u fazi kovalentnog kompleksa (slika 2) nastalog između F-dUMP, metiltetrahidrofolata i sulfhidrilne skupine enzima. To je primjer suicidalne inhibicije u kojoj enzim pretvara supstrat u reaktivni inhibitor koji zaustavlja enzimsku aktivnost (Berg i sur., 2013).



**Slika 2. Ternarni kompleks 5-FdUMP (zeleno), metiltetrahidrofolata (crveno) i timidilat sintaze (crno).**

Stanice koje se brzo dijele (poput tumorskih stanica) trebaju obilnu opskrbu timidilatom za sintezu DNA. Stoga se inhibicijom timidilat sintaze zapravo posredno inhibira replikacija DNA, te dolazi do smrti stanice zbog nedostatka timina takozvane „tymineless death“.

Osim toga, 5-FU ugrađuje se u RNA umjesto uracila te na taj način ometa transkripciju i postranskripcijsku obradu RNA (Katzung i sur., 2011).

Ove karakteristike 5-FU iskorištene su u terapijske svrhe. 5-FU jedan je od najčešće korištenih lijekova u onkoloških bolesnika. 5-fluorouracil, kao monoterapija ili u kombinaciji sa drugim citostaticima, indiciran je za liječenje karcinoma dojke, debelog crijeva i rektuma ([www.almp.hr](http://www.almp.hr)).

Budući da je 5-FU u širokoj upotrebi, a nema povoljnu biorazgradljivost (Kummerer, 2008), potrebno je detaljnije istražiti njegovu sudbinu u okolišu. Studije (Kosjek i sur., 2013) su pokazale da se 5-FU nalazi u otpadnim vodama u koncentracijama od 4,7 do 14,0 ng/L, dok u otpadnim vodama bolnica ta razina dostiže i do 63,0 ng/L. Radi se o citotoksičnoj supstanci pa je sama njegova pojavnost u okolišu dovoljna da izazove zabrinutost. Pokazano je da čak i niske koncentracije ove neoplastične supstance inhibiraju rast primarnih proizvođača (algi i cijanobakterija) u vodenom mediju (Elersek i sur., 2016). Zbog svega navedenog potrebno je istražiti njegov ekotoksikološki profil kao i moguće (nus)produkte nastale obradom otpadnih voda, koji dosada nisu razmatrani.

#### **1.4. RAČUNALNI MODELI U PROCJENI OKOLIŠNE SUDBINE FARMACEUTIKA**

Postoje dva osnovna pristupa u predviđanju okolišne sudbine farmaceutskih spojeva. Prvi su prediktivne statističke metode, koje se baziraju na kvantitativnoj povezanosti strukture i svojstva/aktivnosti/toksičnosti (QSPR/QSAR/QSTR). Drugi pristup predstavljaju metode elektronske strukture poput kvantno-kemijskih metoda i metoda molekuskog modeliranja ([www.echemprotal.org](http://www.echemprotal.org); [www.qsartoolbox.org](http://www.qsartoolbox.org)).

Za razliku od statističkih pristupa razmatranju povezanosti strukture i ekološke sudbine lijekova, metode molekuskog modeliranja, u koje pripadaju i kvanto-kemijske metode, imaju

prednost što mogu predvidjeti različite puteve razgradnje/pregradnje, interakciju s drugim molekulama, koeficijente distribucije te tako opisati ekološku sudbinu svakog pojedinog lijeka u skupini. Metode molekulskog modeliranja odlikuje računalna zahtjevnost, parametriziranje metoda na osnovu eksperimentalnih podataka te veliki broj kemijskih reakcija i interakcija koje se moraju uzeti u obzir. Najzahtjevnije metode molekulskog modeliranja su kvantno-kemijske metode, koje uglavnom ne koriste empirijske parametre u svojim izračunima.

Kvantno-kemijskim proučavanjem mogućih mehanizama pregrađivanja okolišnih onečišćivača, mogu se predvidjeti energijski najpovoljniji reakcijski putevi te strukture nastalih produkata. Poznavanje mehanizma degradacije farmaceutskih onečišćivala u okolišu važno je pri dizajniranju tzv. „zelenih lijekova“, farmaceutskih derivata koji imaju isti terapijski, ali povoljniji ekološki učinak. To se područje farmaceutskih znanosti naziva „zelenom farmacijom“. Također, ukoliko su poznati mehanizmi, moguće je prilagoditi sam sustav kemijske obrade otpadnih voda na način da se izbjegne ona obrada koji rezultira ekološki nepovoljnim produktima. Računalne metode predstavljaju vrijedan alat u predviđanju mehanizama degradacije farmaceutika u okolišu kao i karakterizaciju mogućih produkata, što olakšava analitičke i ekotoksikološke studije.

## 2. METODE

### 2.1. OSNOVE KVANTNO-KEMIJSKIH IZRAČUNA

Računalna kemija je grana kemije koja numerički proučava kemijske strukture i reakcije. Rezultati računalne kemije posebno su korisni kada su eksperimentalni podaci nedostupni ili nepoznati. Osim toga može se koristiti kao dopuna eksperimentu, u svrhu boljeg tumačenja reakcijskih mehanizama i puteva. Temelje računalne kemije čine zakoni fizike (uglavnom zakoni kvantne mehanike, a ponekad i Newtonovi zakoni) te odgovarajuće aproksimacije. Osim za proučavanje stabilnih molekula, računalna se kemija može koristiti za opis kratkoživućih, nestabilnih intermedijera i prijelaznih stanja, čije se strukture ne mogu odrediti ili mjeriti eksperimentalno, što predstavlja značajnu prednost u odnosu na eksperimentalne metode. Osnovne vrste izračuna su:

- Izračun energije određenog molekulskog sustava. Također se mogu izračunati svojstva povezana s energijom i/ili rasporedom elektrona (raspodjelu naboja u sustavu, EPR, NMR, IR spektri).
- Geometrijska optimizacija. To je procedura kojom je moguće locirati minimum koji se nalazi u blizini početne, odnosno zadane geometrije. Geometrijska optimizacija se temelji na postepenoj promjeni geometrije molekule u smjeru gradijenta potencijalne energije sustava.
- Izračun vibracijskih frekvencija molekula. Poznavanje frekvencija vibracija molekule (kao i vibracijskih valnih funkcija) omogućuje nam izračun termodinamičkih potencijala (i entropije) molekule. Uz to možemo predvidjeti IR spektar molekule te karakterizirati prirodu stacionarne točke na plohi potencijalne energije (minimum kao stacionarna točka nultog reda, prijelazno stanje kao stacionarna točka prvog reda, itd.)
- Rješavanje vremenski-ovisnih potencijala unutar molekula. Vremenski promjenjivi električni i magnetski potencijali prikazuju interakciju okoliša s elektronskom strukturom molekule te daju podatke o ekscitacijskim energijama, svojstvima koje su ovisne o frekvenciji zračenja te predviđaju UV/Vis spektar.

### 2.1.1. IZRAČUN ENERGIJE I GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA

Elektronska energija je najvažnija informacija koja je rezultat kvantno-kemijskih izračuna. Računanjem razlika u energiji između struktura, dobiva se informacija neophodna za procjenu relativne (termodinamičke) stabilnosti. Elektronska energija se računa numeričkim rješavanjem elektronske Schrödingerove jednačbe (unutar Born-Oppenheimerove aproksimacije), u skladu s odabranom teorijskom metodom. Ukratko o metodama kvantno kemijskih izračuna biti će raspravljeno u sljedećem poglavlju. Kod *ab-initio* metoda energija se računa iterativnim postupkom bez korištenja empirijskih parametara. U Hartree-Fockovoj metodi samousklađenog polja (HF-SCF) variraju se jednoelektronske valne funkcije (Hartree-Fockove spin-orbitale) s ciljem određivanja ukupne elektronske valne funkcije koja daje najnižu elektronsku energiju. Kod Kohn-Shamovih DFT metoda koristi se slična iteracijska metoda za izračun energije (KS-SCF) uz upotrebu funkcionala (najčešće semiempirijskog) koji povezuje elektronsku gustoću i elektronsku energiju molekule.

Strukturne promjene unutar molekule (duljine veza, vrijednosti veznih i diedarskih kuteva) uzrokuju promjene energije i ostalih svojstava molekulskog sustava (Foresman i Frisch, 1996). Iteracijski postupak određivanja molekulske strukture u minimumima elektronske energije uz pomoć optimizacijskih algoritama unutar određenog koordinativnog sustava koji opisuje položaj svih jezgara (npr. korištenjem kartezijevih koordinata) naziva se geometrijska optimizacija. Dakle, geometrijska optimizacija je metoda energijske minimizacije. Način na koji energija molekulskog sustava varira s promjenama u njegovoj strukturi definiran je plohom potencijalne energije (PES, engl. potential energy surface). Ploha potencijalne energije je matematička funkcija koja svakoj molekulskoj strukturi (geometriji) pridružuje odgovarajuću energiju. Za dvoatomske molekule to je dvodimenzijski prikaz udaljenosti dviju jezgara na osi  $x$  i energije na osi  $y$ . Za veće molekulske sustave ploha potencijalne energije ima toliko dimenzija koliko je potrebno parametara da se jednoznačno definira geometrija molekule ( $3N-6$  dimenzija za nelinearne molekule, pri čemu je  $N$  broj atoma u molekuli).

Svaka točka na plohi potencijalne energije predstavlja posebnu molekulsku strukturu.

Minimum je točka na dnu potencijalne plohe (u potencijalnoj jami) iz koje „pomak“ u bilo kojem smjeru vodi u stanje više energije. Sve komponente gradijenta energije u toj točki iznose 0, dok su sve svojstvene vrijednosti matrice drugih derivacija pozitivne. Razlikujemo lokalni i globalni minimum, pri čemu je lokalni predstavlja točku najniže energije na

ograničenom dijelu PES, dok je globalni najniža energetska točka na cijeloj plohi potencijalne energije. Različiti minimumi mogu odgovarati reaktantima i (među)produktima u slučaju razmatranja određenih reakcijskih koordinata, odnosno konformerima u slučaju promatranja nekog fleksibilnog molekulskog sustava.

Stacionarna točka u kojoj je jedna svojstvena vrijednost matrice drugih derivacija negativna, a sve ostale pozitivne naziva se sedlasta točka prvog reda. Ona označava prijelazno stanje koje povezuje dvije lokalne strukture tj. dva minimuma.

Geometrijskom optimizacijom lociraju se stacionarne točke na PES, no tom se procedurom ne može se odrediti njezina priroda, odnosno radi li se o (stvarnom) minimumu ili prijelaznom stanju. Za karakterizaciju stacionarne točke potreban je frekvencijski račun na odgovarajućoj teorijskoj razini. U minimumu kao i točki prijelaznog stanja sve prve derivacije energije po koordinatama svih atomskih jezgara iznose nula. Svaka uspješna optimizacija završava lociranjem stacionarne točke.

Geometrijska se optimizacija pokreće ulaznim podacima, odnosno „inputom“ koji sadrži predloženu ili traženu molekulsku strukturu prikazanu koordinatama atoma (z-matrica, kartezijske koordinate, interne redundantne koordinate). Metodom se računa gradijent i energija u toj točki. Zatim se određuje koliko daleko i u kojem će smjeru biti provedena sljedeća iteracija. Gradijent ukazuje na smjer duž plohe u kojem energija najbrže raste kao i na stupanj tog nagiba. Također, većina algoritama izračunava vrijednost drugih parcijalnih derivacija energije s obzirom na molekulske koordinate čija se matrica zove Hessian. One opisuju zakrivljenost površine u toj točki što pridonosi točnijem predviđanju sljedeće iteracije.

Geometrijska optimizacija osnovnih stanja, minimuma, odnosno struktura reaktanata, intermedijera i produkata razmjerno je jednostavna. Za geometrijsku optimizaciju prijelaznog stanja, koja je kritična točka prvog reda na PES-u, potrebno je upotrijebiti dodatne algoritme i zadati početnu geometriju što sličniju traženoj strukturi prijelaznog stanja.

Kada optimizacijski postupak konvergira, pod određenim uvjetima i kriterijima, locirana struktura je stacionarna točka. Tijekom geometrijske optimizacije, nakon svake iteracije prikazano je aktualno stanje optimizacijskog računa (vidi Tablicu 1):

**Tablica 1. Primjer kriterija konvergencije geometrijske optimizacije nakon nekoliko iteracija (dio završenog računa). Zadovoljen je samo jedan od četiri kriterija konvergencije (Maximum displacement).**

| Item                       | Value    | Threshold     | Converged? |
|----------------------------|----------|---------------|------------|
| Maximum Force              | 0.001414 | 0.000450      | NO         |
| RMS Force                  | 0.001158 | 0.000300      | NO         |
| Maximum Displacement       | 0.001702 | 0.001800      | YES        |
| RMS Displacement           | 0.001764 | 0.001200      | NO         |
| Predicted change in Energy |          | -4.145142D-06 |            |

Prva dva reda (Maximum Force, RMS Force) sadrže informaciju o maksimalnoj sili na određeni atom u molekulskom sustavu i prosječnu silu (RMS, eng. root mean square) na sve atome. Prikazana je zadana vrijednost kriterijskog praga konvergencije (Threshold) uz podatak o vrijednosti za aktualnu geometriju. Treći i četvrti red sadrže konvergencijske kriterije za maksimalnu strukturnu promjenu određene koordinate (Maximum Displacement) kao i prosječnu promjenu svih strukturnih parametara (RMS Displacement) u posljednje dvije iteracije.

Prijevrmeno lociranje minimuma sprječavaju četiri različita konvergencijska kriterija. To je posebno važno u slučaju kada je PES „plitak“ s vrlo blagim udolinama, gdje sile mogu biti blizu nulte vrijednosti (ispod praga) dok izračunate strukturne promjene mogu biti velike uslijed konvergencije prema pravom minimumu.

### **2.1.2. FREKVENCIJSKI RAČUN**

Primjena frekvencijskog računa je raznolika. Osnovne namjene frekvencijskog računa su:

- karakterizacija prirode (stacionarnih) točaka
- izračun frekvencija gibanja (vibriranja) atoma unutar molekula

- izračun termokemijskih parametara
- izračun IR i Raman spektara

Za potpunu karakterizaciju stacionarnih točaka na PES-u, potrebno je izvršiti frekvencijski račun, koji izračunava frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge (i viših) derivacije energije u odnosu na atomske koordinate te rješavajući vibracijske Schrödingrove jednadžbe (svaki vibracijski mod je opisan različitim potencijalom). Uz prikaz svih dostupnih vibracija atoma u molekuli (vrsta vibracije i atomi koji sudjeluju u vibraciji), frekvencijskim računom dobivamo i informaciju da li optimizirana struktura odgovara minimumu na PES (reaktanti, intermedijeri i produkti) ili prijelaznom stanju. Ako postoji samo jedna imaginarna vibracijska frekvencija, dobiven je minimum u svim smjerovima osim u smjeru vibracije s imaginarnom frekvencijom, što predstavlja strukturu prijelaznog stanja (TS) za kemijsku reakciju na toj plohi potencijalne energije. Ukoliko je locirana stacionarna točka s dvije i više imaginarnih frekvencija potrebno je dodatno optimizirati strukturu dok se ne locira stacionarna točka s jednom (TS) ili bez (minimum) imaginarnih frekvencija. Postojanje jedne imaginarne frekvencije karakterizira točku kao prijelazno stanje, no potrebno je primijeniti dodatne procedure kako bi se došlo do zaključka koje minimume ispitivano prijelazno stanje povezuje. Za potvrdu traženog reakcijskog puta, kojeg definira TS, potrebno je pratiti oba reakcijska smjera prema gradijentu intrinzičke reakcijske koordinate (IRC).

IRC (Fukui , 1981; Hratchian, 2005) je računalna tehnika kojom se parcijalno optimizira struktura duž reakcijske kooordinate. Početna točka u IRC računu odgovara strukturi prijelaznog stanja, a njezina se geometrija postupno optimizira (po reakcijskoj koordinati) do (među)produkata (napredni smjer) i reaktanata (povratni smjer). Dobivene strukture, nakon dodatne geometrijske optimizacije daju (lokalne) minimume koji odgovaraju reaktantima i (među)produktima povezanih tim prijelaznim stanjem.

Ukupna elektronska energija izračunata geometrijskom optimizacijom odgovara minimumu na PES. U stvarnosti molekula nema tu energiju, jer sama molekula nikada nije u stanju potpunog mirovanja, već će imati određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje. Energija nulte točke (*zero-point energy*) se računa kao zbroj elektronske energije i tzv. "korekcije nulte točke", energije koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K. Entalpija i entropija molekule se računaju kao različiti doprinosi translacijskog, vibracijskog i rotacijskog gibanja molekule (izvode se iz frekvencijskog računa) pribrojeni

energiji nulte točke. Tu je uključena aproksimacija idealnog plina za translacijsko gibanje kao i aproksimacija rigidnog rotora za rotacijsko gibanje. U izračunima se mogu podesiti parametri za temperaturu (zadana temperatura iznosi 298 K) i tlak (zadani tlak iznosi 1 atm), te izotopi pojedinih elemenata. Gibbsova slobodna energija jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom ( $G = H - TS$ ).

## 2.2. METODE I PARAMETRI KVANTNO-KEMIJSKIH IZRAČUNA

Metode za proučavanje elektronske strukture koriste zakone kvantne mehanike. Osnovni koncept kvantne mehanike temelji se na činjenici da se vrijednost energije i svih svojstava može izračunati rješavanjem Schrödingerove jednadžbe. No, Schrödingerova se jednadžba može egzaktno riješiti samo za sustave s jednim elektronom (atom vodika, kation helija i molekulski kation  $H_2^+$ ). Stoga su uvedene aproksimacije koje se koriste u rješavanju Schrödingerove jednadžbe prema kojima se i razlikuju različite metode elektronske strukture.

Semi-empirijske metode (npr. AM1, PM3, MINDO) koriste parametre izvedene iz eksperimentalnih podataka (Dewar i Thiel, 1977; Stewart, 1989). *Ab-initio* metode (npr. Hatree-Fock (HF) metoda (Roothan, 1951; Pople i Nesbet, 1954), Møller-Plesset (MP) skupina metoda (Møller i Plesset, 1934; Pople i sur., 1976), skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI) (Pople i sur., 1977)) ne koriste eksperimentalne parametre u svojim izračunima te se oslanjaju na zakone kvantne mehanike koristeći osnovne fizikalne konstante poput Planckove konstante, brzine svjetlosti te mase i naboja elektrona i jezgri. Te metode (posebno  $MP_n$ , QCISD, multikonfiguracijske i kompozitne metode) daju precizne kvantitativne podatke za široki raspon kemijskih sustava, ali su jako zahtjevne u pogledu računalnih resursa. Teorija funkcionala gustoće (*Density Functional Theory*, DFT) po točnosti je u nekim slučajevima usporediva s *ab-initio* metodama. DFT metode se temelje na Kohn-Sham teoriji da energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekulskom sustavu (Hohenberg i Kohn, 1964; Becke, 1992; Pople i sur., 1992). Za razliku od HF metode, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekulskom sustavu „reagiraju“ na kretanje drugih elektrona te se orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile u molekuli u ravnoteži. Prikladnim odabirom DFT parametara mogu se dobiti izračuni koji su usporedivi s puno zahtjevnijim *ab-initio*

metodama. Parametri koje je potrebno odabrati su funkcional i bazni skup prikladan za odgovarajući opis modeliranog kemijskog sustava.

### 2.2.1. DFT METODE

U izradi ovog rada poglavito su korištene DFT metode. DFT metode se temelje na teoriji funkcionala gustoće, a kao osnovna premisa koristi se teorem koji za izračun energije koristi elektronsku gustoću, a ne valnu funkciju. Polazeći od osnovnog teorema, Kohn i Sham su, uvođenjem molekulskih orbitala u teoriju funkcionala gustoće (KS-DFT), razvili metodologiju koja je po svom iterativnom postupku slična Hartree-Fockovoj metodi.

Kohn-Shamove orbitale se formiraju kao linearna kombinacija baznih funkcija koja predviđa najnižu energiju molekule (kao u HF metodi). Za izračun energije iz KS orbitala koristi se DFT funkcional. Funkcional je funkcija funkcije, u ovom slučaju funkcija elektronske gustoće. Točan funkcional koji povezuje gustoću elektrona s energijom nije poznat. Postoji niz različitih funkcionala koji imaju svoje prednosti i nedostatke. Neki su izvedeni iz fundamentalnih postavki kvantne mehanike, a neki su razvijeni parametrizacijom prema eksperimentalnim rezultatima. Prema tome DFT metode se mogu svrstati i u *ab-initio* metode, ali i u semiempirijske metode. DFT funkcionali se međusobno razlikuju prema opisu funkcionala izmjene, funkcionala korelacije i udjela HF funkcionala kao dopune člana izmjene (kod hibridnih funkcionala). Najpoznatiji i jedan od češće korištenih funkcionala (postavljen je kao zadana opcija u nekim kvantno-kemijskim programima) je B3LYP (Becke Three Parameter Hybrid Functionals), koji se sastoji od Becke funkcionala izmjene (B), korekcijskog funkcionala (LYP), kojeg su razvili Lee, Yang i Parr te određenog udjela HF funkcionala u elektronskoj izmjeni, tvoreći taj funkcional kombinacijom triju parametara (Becke, 1988 ). Osim Becke funkcionala izmjene, postoji još desetak funkcionala u istoj skupini, kao i u skupini korelacijskih funkcionala. Udio HF izmjene (od 0% za čiste funkcionale do 80% za hibridne funkcionale) može se podesiti za nove funkcionale, ili za procjenu učinka HF izmjene na konačne rezultate. Funkcionalima se može dodati i empirijska disperzijska korekcija, kao što je slučaj s empirijskom korekcijom D za sustave s raspršenim (disperznim) elektronima. Među češće korištenim funkcionalima nalaze se: B3LYP, BP86, PW91, PBE1PBE, M06, wB97XD, OLYP (Becke, 1993; Perdew i sur., 1996; Lee i sur, 1988; Zhao i Truhlar, 2008).

### 2.2.2. BAZNI SKUPOVI

Bazni skup baza je vektorskog prostora u kojoj se zapisuju molekulske orbitale. Potpuni opis valne funkcije zahtjeva beskonačan skup baznih funkcija, što je računski nedostupno. Odabirom baznog skupa opisuje se valna funkcija s konačnim brojem baznih funkcija. Što je veći broj baznih funkcija koje opisuju valnu funkciju, to je uglavnom točniji opis molekularnih orbitala.

Promjena baznog skupa, mijenja i energiju i geometriju najniže energije kemijskog sustava kojeg promatramo. Za procjenu pogrešaka zbog uporabe (pre)malih baznih skupova, provode se najprije računi s minimalnim baznim skupom te se ponavljaju izračuni s većim baznim skupom. Usporedbom dobivenih rezultata utvđuje se efekt baznog skupa.

Kao osnovne funkcije za opis atomskih orbitala koriste se Slaterove orbitale (STO) ili Gaussove orbitale. Iako Slaterove orbitale bolje opisuju orbitale, numerički su zahtjevnije. Stoga se koriste linearne kombinacije većeg broja primitivnih gaussiana (pojedina Gaussova orbitala), koje daju složene osnovne funkcije, koje imaju veće slaganje sa Slaterovim orbitalama. Uz navedene funkcije prisutne su polarizacijske i difuzne funkcije. Polarizacijske funkcije formiraju se dodavanjem osnovnih funkcija većeg angularnog momenta na funkcije s manjim angularnim momentom (primjerice dodavanje  $p$  funkcije na  $s$  funkciju) te one omogućuju veću fleksibilnost molekulskim orbitalama. Difuzne funkcije su vrlo plitke gaussianske funkcije koje proširuju i točnije opisuju rubove gaussianske funkcije te time daju bolji opis molekulskih orbitala koje opisuju elektrone (u prosjeku) udaljenije od jezgara.

Bazni skupovi se međusobno dijele po broju primitivnih gaussiana za opis unutarnjih orbitala, broju i kombinaciji primitivnih gaussiana koji čine složenu osnovnu funkciju za opis valentnih orbitala te prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Skupina Popleovih baznih skupova (Ditchfield, 1971), s notacijom 6-31G i dodatnim difuznim i/ili polarizacijskim funkcijama, često je korištena kombinacija. Tako kod 6-31+G(d) baznog skupa, unutrašnje orbitale su opisane s jednom osnovnom funkcijom sastavljenom od 6 primitivnih gaussiana, a valentne orbitale su opisane s dvije složene osnovne funkcije, pri čemu je prva dobivena kombinacijom tri primitivna gaussiana, dok je druga dobivena kombinacijom jednog primitivnog gaussiana. Znak „+“ označava dodatak difuzne funkcije na sve teške atome, dok  $d$  označava primjenu  $d$  polarizacijskih funkcija ( $d$  primitivnog gaussiana) na sve teške atome. Najčešće korišten Popleov bazni skup je 6-31G(d), a često se

koriste i 6-311G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d). Također se koriste i bazni skupovi drugih autora (npr. Dunning (Dunning, 1989) i Wachters (Wachters, 1970)), ali oni se razlikuju u notaciji od Popleovih baznih skupova.

Pravilan izbor baznog skupa posebno je važan primjerice kod opisivanja nabijenih sustava, kada je nužan dodatak difuzne funkcije kako bi se dobro opisao sustav. Općenito, pravilnom varijacijom baznog skupa mogu se postići točniji rezultati.

### 2.2.3. SOLVATACIJSKI EFEKTI

Većina organskih reakcija događa se u otopini. Geometrijska optimizacija i izračun energija te frekvencijski račun provode se najčešće u plinskoj fazi, odnosno u vakuumu ( $\epsilon_r = 1$ ). Kako bi se opisali solvatacijski efekti, nužno je izračunati interakciju otapala i otopljene tvari. Otapalo utječe i na energiju i na strukturu, pa je dobar odabir solvatacijskog modela i načina izračuna solvatacije ključan u ispravnom opisu kemijskog sustava. Osim toga, otapalo često sudjeluje u samom mehanizmu reakcije. Najčešće korišteni pristupi su implicitna te eksplicitna solvatacija, odnosno kombinacija oba pristupa.

Implicitna solvatacija podrazumijeva model polarizabilnog kontinuuma. Proces solvatacije u ovim modelima promatra se kao niz sljedećih procesa: nastanak solvatacijske šupljine u polarizabilnom kontinuumu, ulazak promatrane molekule u „nastalu“ šupljinu i relaksacija kontinuuma oko molekule. Postoje različiti modeli implicitne solvatacije, među kojima su korišteniji PCM, CPCM, COSMO i SMD modeli (Scalmani i Frisch, 2010; Barone i Cossi, 1998; Marenich i sur., 2009). Implicitna solvatacija može se koristiti pri geometrijskoj optimizaciji ili pri izračunu Gibbsove energije solvatacije (solvatacijski efekt na geometriji dobivenoj optimizacijom u plinskoj fazi). Uobičajeno se geometrijska optimizacija u implicitnom otapalu provodi zbog usporedbe struktura dobivenih geometrijskom optimizacijom u vakuumu i modelnom otapalu. Ako se strukture ne razlikuju značajno, izračun Gibbsove slobodne energije solvatacije provodi se na strukturi dobivenoj geometrijskom optimizacijom bez implicitnog otapala. Osnovni parametri koji su potrebni za (C)PCM račune su: modelno otapalo s odgovarajućom dielektričnom konstantom ( $\epsilon$ ), elektrostatički korekcijski faktor ( $\alpha$ ) te parametri radijusa pojedinog atoma. Radijusi atoma u solvatacijskim računima empirijske su prirode te su provjereni na velikom nizu molekula i korištenjem teorijskih računa različite složenosti. Od poznatijih su UFF, UAKS, UAHF i

UA0. SMD solvacijski model je visoko parametrizirani model pogodan za izračun termodinamičkih veličina vezanih za solvaciju sustava.

Eksplcitnim dodavanjem molekula otapala u kemijski okoliš promatranog sustava, simuliraju se solvacijske ljuske (obično samo prva solvacijska ljuska) koje se nalaze u bliskom kontaktu sa sustavom i time se razlikuju od otapala koje nije u „dodiru“ s otopljenom tvari. Vrlo je zahtjevno opisati prvu solvacijsku ljusku. Molekule otapala, intermolekulskim silama vezane na strukturu u prvoj solvacijskoj ljusci, mijenjaju slobode kretanja, moguće vibracije te reaktivnost otopljene tvari, a ponekad sudjeluju u samoj reakciji. Poseban problem predstavlja voda kao otapalo, čije molekule u velikom broju mogu zauzeti prostor prve solvacijske ljuske. Osim toga, razmještaj i međusobna interakcija molekula voda predstavlja dodatni problem. Molekule vode su međusobno povezane brojnim vodikovim vezama i često se u računima, tijekom geometrijske optimizacije, udaljuju od otopljene tvari te međusobno formiraju grozdove. Za svaku je kemijsku strukturu potrebno odrediti „optimalni broj molekula otapala“ u solvacijskoj ljusci, pri čemu struktura sa solvacijskom ljuskom tvori zasebnu kemijsku speciju.

Kombinacija implicitnog i eksplicitnog opisa otapala računalno je najzahtjevnija ali daje najtočnije podatke. Zbog toga je ovaj pristup korišten u svim solvacijskim izračunima u ovom radu (Pliego, 2014). U literaturi se pristup opisuje kao supramolekulski solvacijski model.

#### **2.2.4. POPULACIJSKA ANALIZA**

Populacijska analiza je procedura kojom se iz valne funkcije računa distribucija elektronske gustoće u prostoru, naboj na pojedinim jezgrama, odnosno druga povezana svojstva. Budući se neki od ovih rezultata ne mogu dobiti eksperimentalno, njihova je primjena vrlo važna. Naboji se na pojedinim atomima ne mogu izmjeriti eksperimentalno jer sami po sebi nisu fizikalno svojstvo već produkt, odnosno rezultat modela. U stvarnosti, atomi imaju pozitivne jezgre okružene negativno nabijenim elektronima, a ne parcijalne naboje na svakoj jezgri. Parcijalni naboji opisuju mnoga svojstva molekule, poput polarnosti, a služe i za predviđanje mjesta nukleofilnih odnosno elektrofilnih napada. To nisu formalni naboji, već se bolje opisuju kao naboj koji se u vremenskom prosjeku nalazi u blizini odgovarajuće jezgre.

Jedna od vrlo korištenih populacijskih analiza je Mullikenova populacijska analiza. Temeljna

pretpostavka Mullikenove sheme je da se vezni elektroni jednako dijele na atome u kovalentnoj vezi, iako to ne odgovara elektronegativnosti pojedinih elemenata. Mullikenova analiza vrlo je efikasna kada se izračuni provode na malom osnovnom skupu, no za velike bazne skupove rezultati mogu biti nepouzdana. Iako ima nedostataka i dalje je vrlo korištena upravo zbog jednostavnog tumačenja rezultata

NBO (Natural Bond Orbital) analiza naziv je cijele skupine tehnika populacijske analize (Foster i sur., 1980). Jedna od njih je NPA (Natural Population Analysis) koja promatra popunjenost orbitala (koliko elektrona je dodjeljeno svakom atomu) i naboje na atomima. NBO analiza ne koristi molekulske orbitale već prirodne orbitale. Prirodne orbitale su lokalizirane orbitale koje dijagonaliziraju matricu elektronske gustoće. Mogu biti integrirane u svrhu dobivanja naboja na pojedinom atomu. Formirane orbitale mogu biti klasificirane kao vezujuće, razvezujuće, unutarnje ili Rydbergove. Za razliku od Mullikenove analize, ovaj način populacijske analize manje je ovisan o izboru osnovnog skupa.

Hirshfeldovi naboji (CM5 naboji) računaju se tako da se u svakoj točki prostora elektronska gustoća podjeli atomima sukladno tome kolika bi elektronska gustoća u toj točki bila da u sustavu postoji samo odgovarajući atom (s koordinatama na kojima je u promatranoj molekuli) (Hirshfeld i sur., 1977).

MK naboji izračunati su tako da reproduciraju molekulski elektrostatski potencijal (MEP) (Besler i sur., 1990). U prvom koraku procedure MEP se računa za nekoliko točaka lociranih na slojevima oko molekule. Slojevi su konstruirani tako da leže izvan van der Waalovih sfera svakog atoma. Sve točke koje se nalaze unutar van der Waalovih sfera su odbačene. Najmanjem mogućem sloju dodjeljuje se faktor skaliranja 1.4. Konstruiraju se još tri sloja s faktorima skaliranja 1.6, 1.8 i 2.0. Nakon procijene MEP, naboji atoma se izvode tako da odgovaraju MEP što je bolje moguće uz uvjet da ukupni naboj molekule mora biti jednak zbroju naboja svakog pojedinog atoma.

## **2.2.5. KONDENZIRANA FUKUI FUNKCIJA**

Izračun kondenzirane Fukui funkcije omogućuje kvantitativnu usporedbu nukleofilnih i elektrofilnih svojstava pojedinih atoma unutar molekule. Kondenziranu Fukui funkciju za procjenu nukleofilnosti, odnosno elektrofilnosti atoma opisao je Kenichi Fukui (Fukui i sur., 1952), koji je pokazao da je elektronska gustoća graničnih orbitala (tzv. HOMO i LUMO orbitale), uz ostalo, funkcija promjene ukupnog broja elektrona u molekulskom sustavu.

Jednostavnim populacijskim analizama (npr. Hirshfeld ili NBO) mogu se locirati nukleofilni, odnosno elektrofilni položaji molekule. Prema tome, kondenzirana Fukui funkcija može poslužiti kao indikator reaktivnosti (Fuentelba i sur., 2010).

Kondenzirana Fukui funkcija za nukleofilnost ( $f^-_A$ ) atoma izračunava se prema izrazu:

$$f^-_A = q_A(N) - q_A(N-1)$$

gdje je  $q_A(N)$  izračunati naboj atoma A (pomoću neke od populacijskih analiza) u molekulskom sustavu s N brojem elektrona. (N-1) predstavlja broj elektrona u kationskom obliku molekule, odnosno u molekulskog sustavu kojem je iz HOMO orbitale izbačen jedan elektron. Što je veća vrijednost Fukui funkcije, to je određeni atom nukleofilniji.

Kondenzirana Fukui funkcija za elektrofilnost ( $f^+_A$ ) atoma izračunava se prema izrazu:

$$f^+_A = q_A(N+1) - q_A(N)$$

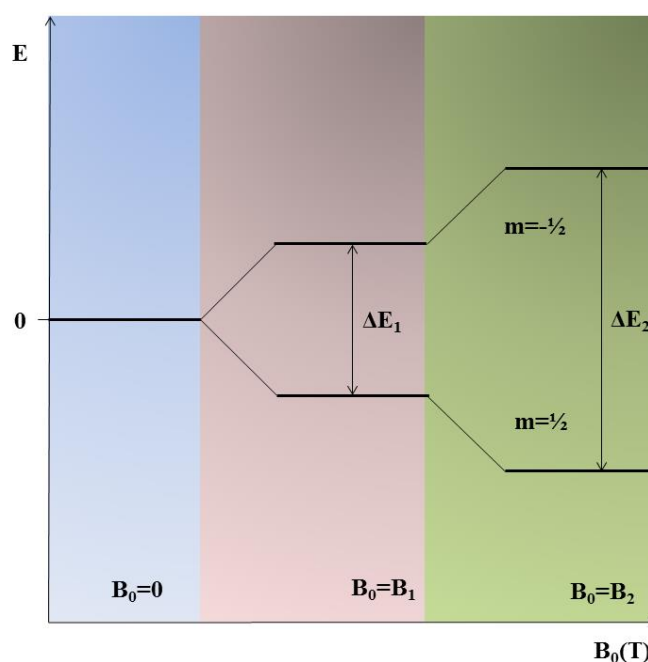
gdje je  $q_A(N+1)$  izračunati naboj atoma A u anionskom sustavu s N+1 brojem elektrona, odnosno u molekulskog sustavu kojem je u LUMO orbitalu dodan jedan elektron. Izračuni kondenziranih Fukui funkcija za nukleofilnost i elektrofilnost provode se na geometriji osnovnog stanja molekule (broj elektrona = N).

## 2.3. NMR SPEKTROSKOPIJA

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, poznata kao NMR spektroskopija, metoda je koja koristi magnetska svojstva pojedinih jezgra u svrhu dobivanja informacije o kemijskoj okolini same jezgre. Dobivene informacije primarno se koriste za određivanje strukture molekula, a mogu se koristiti i u analitičkim i kinetičkim mjerenjima (Atkins i de Paula, 2014).

Jezgre koje se mogu proučavati NMR spektroskopijom su one koje imaju spin. Ukupni spin jezgre (I), mora biti različit od 0 da bi jezgra bila NMR aktivna. Ukoliko molekula primjerice ima paran broj neutrona i protona, suprotni spinovi su spareni i rezultatni spin jezgre je 0. Takve se jezgre ne mogu proučavati NMR spektroskopijom.

Jezgra koja ima spin  $I$  može imati  $2I+1$  mogućih spinskih orijentacija. Primjerice, jezgra  $^1\text{H}$  ima spinski broj  $I=1/2$  stoga ima dvije moguće orijentacije u odnosu na vektor vanjskog magnetskog polja. Ukoliko nema vanjskog nametnutog magnetskog polja, energijske razine jezgara različitih orijentacija bit će jednake. Po djelovanjem vanjskog magnetskog polja dolazi do separacije energetske razine spinova. Što je jače vanjsko magnetsko polje, veće je razdvajanje energetske razine (slika 3).



**Slika 3. Razmicanje energetske razine NMR aktivnih jezgara u vanjskom magnetnom polju. ( $I=1/2$ )**

Jezgra ima pozitivni naboj i spin, pa se stoga rotacijom generira se lokalno magnetsko polje. Prema tome, jezgra posjeduje magnetski moment  $\mu$  koji je proporcionalan njenom spinu ( $I$ ):

$$\mu = \frac{\gamma \hbar}{2\pi}$$

gdje je  $\hbar$  Planckova konstanta a  $\gamma$  žiromagnetska konstanta koja je specifična za svaku jezgru. Tada je energija svake energetske razine:

$$E = -\frac{\gamma \hbar}{2\pi} m B$$

gdje je B snaga magnetskog polja koje djeluje na jezgru. Razlika između energijskih razina tada može biti izražena kao:

$$\Delta E = \frac{\gamma h B}{2\pi}$$

Kada se primjeni vanjsko magnetno polje, jezgra koja ima spin  $I=1/2$  može se orijentirati na dva moguća načina; prvi je da precesira u smjeru vanjskog magnetnog polja, a drugi da precesira u smjeru suprotnom od vanjskog magnetnog polja. Jezgre niže energije su one koje precesiraju u smjeru vanjskog magnetnog polja. Frekvencija precesije definirana je Larmorovom frekvencijom, koja je jednaka frekvenciji tranzicije između dviju energijskih razina.

Kada se primjeni elektromagnetsko zračenje frekvencije jednake Larmorovoj frekvenciji, dolazi do izjednačavanja populacija u dvije energijske razine. Kada sustav više ne apsorbira energiju to se naziva saturacija spina. Nakon toga slijedi proces relaksacije. Ona se može dogoditi na dva načina: relaksacija spin-rešetka i relaksacija spin-spin.

Relaksacija spin-rešetka karakterizirana je relaksacijskim vremenom  $T_1$  (prosječno poluvrijeme koje jezgra provede u višem energijskom stanju). Pojam rešetka označava uzorak u kojem se nalaze promatrane jezgre. Jezgre u rešetci stvaraju kompleksno magnetno polje zbog svog rotacijskog i vibracijskog gibanja. Magnetsko polje nastalo zbog kretanja jezgara u rešetci naziva se polje rešetke. Polje rešetke ima mnogo komponenata, a neke od njih će biti jednake Larmorovoj frekvenciji molekule od interesa. Ove komponente rešetke mogu utjecati na promatrane jezgre u višem energijskom nivou i vratiti ih u niže energijsko stanje. Prema tome, relaksacijsko vrijeme  $T_1$  ovisno je o žiromagnetskom omjeru promatrane jezgre i mobilnosti rešetke. Kako mobilnost raste, rastu i vibracijske i rotacijske frekvencije, pa postaje vjerojatnije da će neka od njih intezivirati s jezgrama od interesa na višoj energijskoj razini.

Relaksacija spin-spin opisuje interakciju između susjednih jezgara sa istim precesijskim frekvencijama ali drugačijim magnetnim kvantnim stanjem. U takvom slučaju jezgre mogu zamijeniti kvantna magnetska stanja. Nema promjene u ukupnom udjelu pojedinih populacija, ali ova pojava povećava prosječno vrijeme koje jezgra provede u ekscitiranom stanju, što uzrokuje proširenje linija.

### 2.3.1. KEMIJSKI POMAK

Magnetsko polje koje djeluje na jezgru nije jednako primjenjenom magnetskom polju. Razlog tomu je utjecaj elektrona oko jezgre koji zasjenjuju jezgru tako da ona „osjeća“ efektivno magnetsko polje, koje je umanjeno zbog utjecaja elektrona. Stoga će jezgre koje oko sebe imaju veću elektronsku gustoću biti pod djelovanjem slabijeg efektivnog magnetskog polja. Sukladno tome, različita je i frekvencija rezonancije (Larmorova frekvencija) potrebna da bi jezgre prešle iz niže u višu energijsku razinu. Tako razlikujemo različite jezgre.

Kemijski pomak je relativni položaj rezonancijskog signala u NMR spektru, a uveden je kako bi na različitim spektrofotometrima iste jezgre imale isti položaj u spektrima, neovisno o jačini i vrsti NMR spektrometra. Kemijski pomak dan je izrazom:

$$\delta = \frac{(v_{uzorak} - v_{ref})}{v_{ref}} \times 10^6 ppm$$

Kemijski pomak obično se izražava u odnosu na referentnu supstancu, što je u slučaju  $^1\text{H}$  NMR spektroskopije tetrametilsilan ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ). Kao referentni signali mogu se koristiti i signali deuteriranih otapala za koja je poznat kemijski pomak.

### 2.3.2. SPREZANJE IZMEĐU JEZGARA RAZLIČITIH SPINOVA

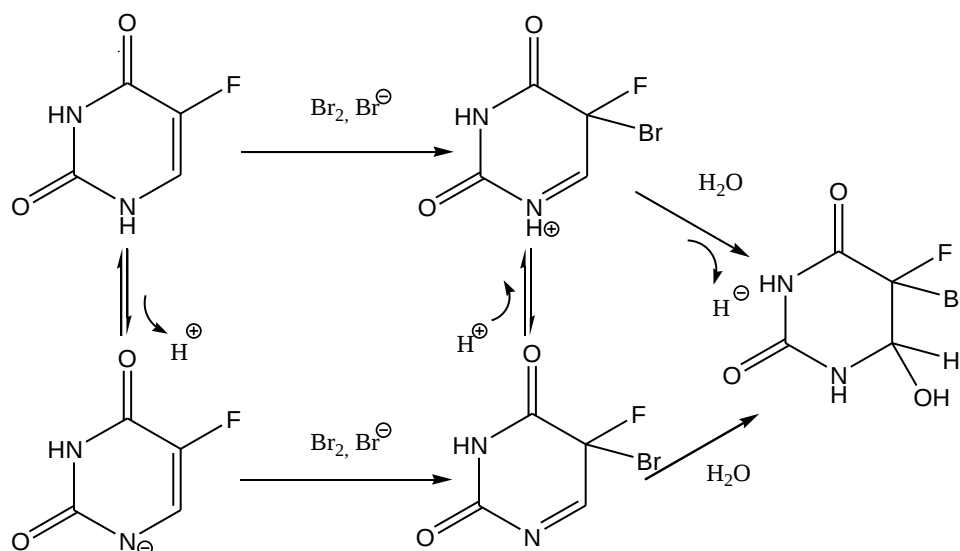
Zbog sprezanja između različitih jezgara dolazi do cijepanja signala u NMR spektru. Do ove pojave dolazi zbog postojanja susjednih, kemijski različitih jezgara koje posjeduju spin, u više različitih kombinacija spinskih stanja. Ovisno o tome koliko različitih susjednih jezgara postoji, i u koliko kombinacija spinova se one mogu nalaziti, efektivno polje koje jezgra osjeća je blago veće ili manje od onog kojeg bi osjećalo da nema te jezgre u blizini. Sprezanje  $n$  ekvivalentnih jezgara (ukoliko je njihov spin  $1/2$ ) uzrokuje cijepanje signala na multiplet od  $n+1$  signala. Konstata cijepanja  $J$  (izražena u Hz) razlika je rezonantnih frekvencija pocjepanih signala iste jezgre. Ona nam, kao i tip cijepanja, puno govori o okolini u kojoj se jezgra nalazi.

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Kemija 5-fluorouracila i drugih pirimidina važno je područje u biomedicinskim istraživanjima. Važnost ovih spojeva u biološkim sustavima je povezana s njihovom ulogom u metabolizmu i sintezi RNA i DNA, prijenosu genske informacije i razvoju mutacija. (Berg i sur., 2013) Primjena u farmaceutskoj industriji temelji se na njihovim interakcijama u metabolizmu nukleinskih kiselina, što se koristi u terapijske svrhe. 5-FU spada u skupinu antimetabolita i jedan je od najradikalnijih oblika farmakoterapije u onkologiji (Katzung i sur., 2011). U novije vrijeme 5-FU je postao predmetom ekoloških istraživanja. Objavljeni su radovi o njegovoj kemijskoj sudbini u okolišu i o toksičnosti na vodene organizme. U mnogim analitičkim studijama prikazane su reakcije pregrađivanja 5-FU, te posebno transformacije do kojih dolazi obradom otpadnih voda kloriranjem. Okolišni metaboliti 5-FU, iako često nepoznatih struktura, imaju negativan učinak na ekološki sustav.

Položaj kloriranja u strukturi 5-FU kontroverzna je znanstvena tema. Neki autori (Miyashita i sur., 1981) tvrde da reakcija 5-FU s klorirajućim agensima poput  $\text{Cl}_2$  i  $\text{HOCl}$  daje produkte koji na C5 položaju imaju vezani atom klora. Drugi autori (Li i sur., 2015) tvrde da se kloriranje odvija na C6 položaju aromatske strukture, te da nakon početnog kloriranja dolazi i do sekundarne reakcije u kojoj nastaju poliklorirani spojevi. U studijama u kojima se istražuje kloriranje uracila (Gould i sur., 1983) razmotrena je također i mogućnost kloriranja dušikovih atoma u pirimidinskom prstenu.

Osim položaja kloriranja, nepoznat je i sam mehanizam reakcije 5-FU i  $\text{HOCl}$ . Studijama u kojima je opisano bromiranje 5-FU (Tee i Banerjee, 1979) predložen je reakcijski put koji uključuje bromirani iminski međuprodukt (Slika 4). Prema analogiji, u reakciji kloriranja 5-FU, adicijom vode na imin nastaje klorhidrin, konačni produkt kojeg su Miyashita i sur. prvi predložili na temelju rezultata dobivenih  $^1\text{H}$  NMR spektroskopskom analizom reakcijske smjese 5-FU u vodenoj otopini s plinovitim klorom ( $\text{Cl}_2$ ).



**Slika 4. Predloženi reakcijski mehanizam (Tee i Banerjee, 1979) bromiranja 5-FU**

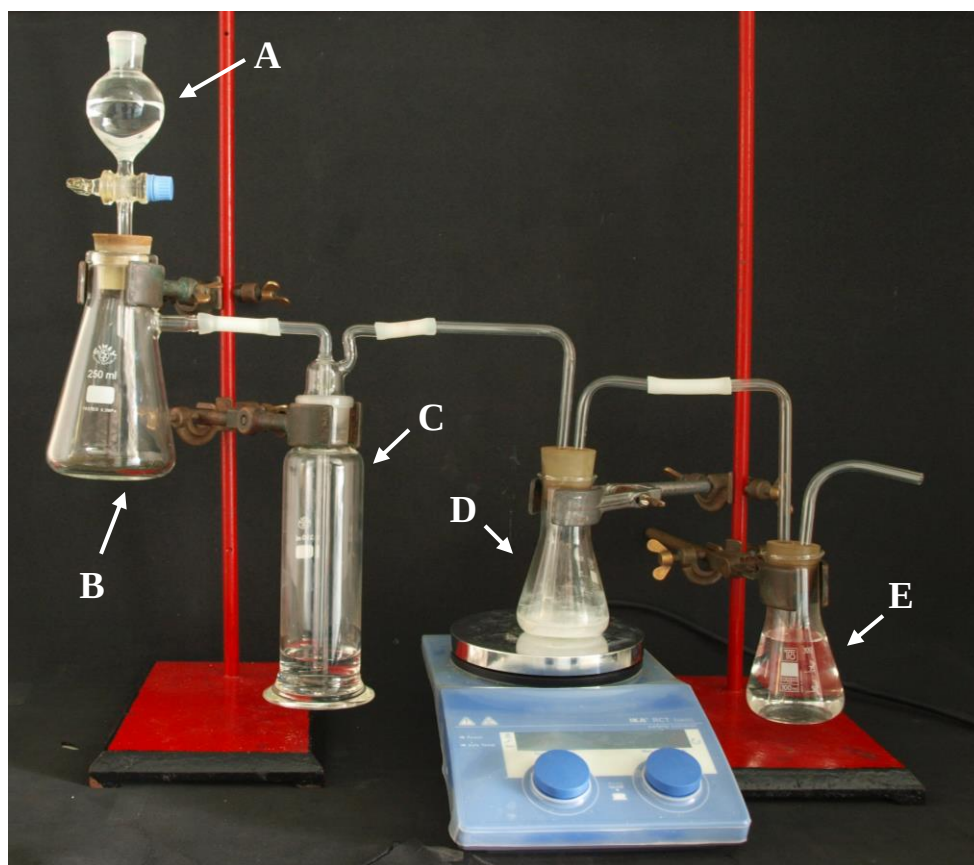
Zbog navedenih razloga potrebno je detaljnije istražiti reakciju **5-FU** s  $\text{Cl}_2$  i  $\text{HOCl}$ , jer se radi o biološki i ekološki relevantnom procesu. U ovom diplomskom radu kombinacijom eksperimentalnih (sinteza, NMR spektroskopija) i teorijskih (DFT računi, populacijska analiza) metoda rasvjetljen je reakcijski mehanizam kloriranja **5-FU**.

Kvantno kemijskim metodama locirani su reaktanti, međuprodukti i produkti te odgovarajuće energijske barijere za svaki predloženi reakcijski korak. Osim toga, eksperimentalno je provedena reakcija kloriranja **5-FU** s  $\text{HOCl}/\text{Cl}_2$  u vodi, a dobiveni su se rezultati usporedili s teorijskim podacima. Dobiveni produkti su izolirani i karakterizirani NMR-spektroskopijom.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

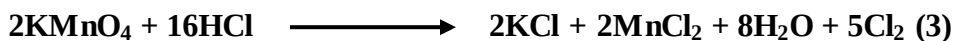
### 4.1. PRIPRAVA KLORHIDRINA

Prema literaturi (Miyashita i sur., 1981.) proveden je postupak kloriranja 5-FU. U erlenmeyerovoj tikvici pripravi se suspenzija 450 mg 5-FU u 6 mL vode. Sastavi se aparatura prema slici 5.



Slika 5. Aparatura za kloriranje. A-HCl (aq, konc), B-KMnO<sub>4</sub>(s), C- ispiralica, D-suspenzija 5-fluorouracila, E- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(aq)

U tikvicu sa suspenzijom 5-FU u vodi uvodi se plinoviti klor (Cl<sub>2</sub>) dobiven reakcijom (3):

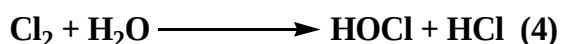


Za pripravu plinovitog klora potrebno je odvagati 1,500 g krutog kalijevog permanganata ( $\text{KMnO}_4$ ) te u malim obrocima dodati 3 ml koncentrirane kloridne kiseline ( $\text{HCl}$ ). Razvijeni  $\text{Cl}_2$  se uvodi u suspenziju 5-FU sve dok se suspenzija ne razbistri. Nakon toga uzima se prvi alikvot i provjeri doseg reakcije  $^{19}\text{F}$  NMR spektroskopijom. Uvođenje  $\text{Cl}_2$  prekida se kada je nestao signal 5-FU u  $^{19}\text{F}$  NMR spektru. Nakon toga se otapalo i suvišak otopljenog klora upari, a u tikvici zaostaje bijeli prah produkta.

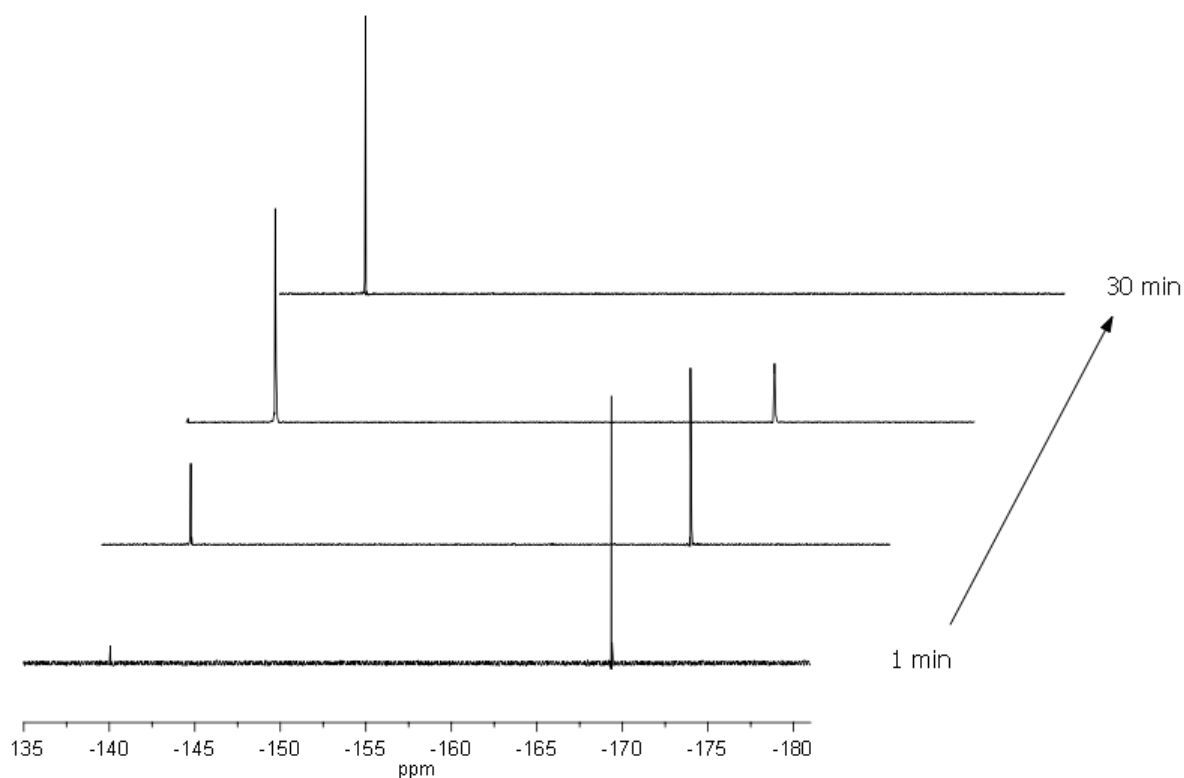
## 4.2. NMR ANALIZA REAKCIJSKE SMJESE 5-FU I HOCl

U izradi ovog rada korištena je  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  i  $^{19}\text{F}$  NMR spektroskopija. Pomoću sva tri tipa NMR spektroskopije određivani su strukturni parametri reaktanata, intermedijera i dobivenih produkata. Pomoću konstanti cijepanja određena je konfiguracija stereoizomera.  $^{19}\text{F}$  NMR spektroskopija korištena je za određivanje dosega, odnosno završetka reakcije. Za lock signal korištena je kapilara s odgovarajućim deuteriranim otapalom ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ili je izolirana supstanca snimljena tako da je otopljena u  $\text{D}_2\text{O}$  ili deuteriranom dimetilsulfoksidu ( $\text{DMSO-d}_6$ ). Svi spektri snimljeni su na uređaju Varian INOVA 400 koji koristi magnet snage 9.4 Tesla (400 MHz). Obrada spektara izvršena je u programu SpinWorks 4.2.0.0. (Spinworks 4.2.0.0., University of Manitoba).

Reakcija između  $\text{HOCl}$  i 5-fluorouracila odvija se u vodenom mediju. Tijekom reakcije dolazi do promjene pH medija, odnosno do zakiseljavanja uslijed reakcije (4):



Monitoring reakcije proveden je pomoću  $^{19}\text{F}$  NMR i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopske analize alikvota reakcijske smjese u određenim vremenskim razmacima (Slika 6).



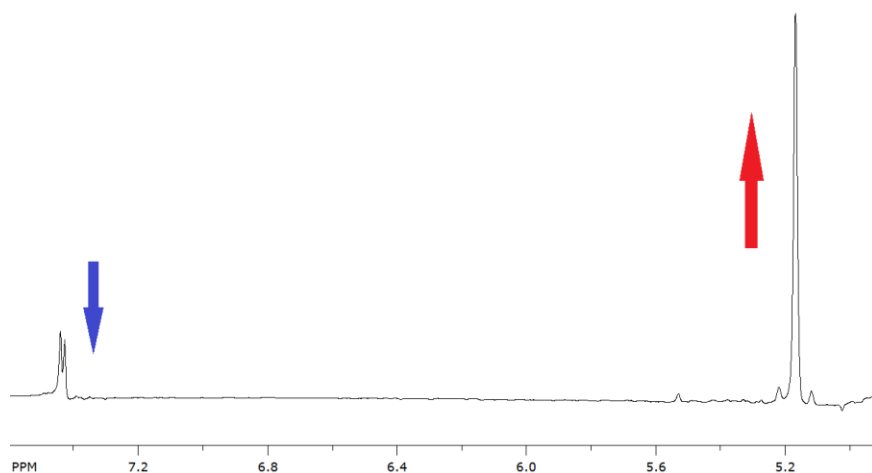
**Slika 6.**  $^{19}\text{F}$  NMR spektroskopska analiza reakcije 5-FU i HOCl u vodi.

Tijekom reakcije između 5-FU i HOCl u  $^{19}\text{F}$  NMR spektrima nestaje signal koji odgovara **5-FU** (-169,28 ppm) te se pojavljuje novi signal produkta (-140,37 ppm). Po završetku reakcije signal koji odgovara 5-FU u potpunosti je nestao. Nestajanje jednog i istovremeno nastajanje drugog signala u  $^{19}\text{F}$  NMR spektrima upućuje na proces u kojem iz jednog reaktanta nastaje samo jedan produkt. Izolacijom produkta i snimanjem  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$  NMR spektara potvrđena je pretpostavka izvedena iz analize  $^{19}\text{F}$  NMR spektra da se radi o samo jednom spoju, a ne o smjesi produkata. Dobiveni spektri u skladu su sa strukturom klorhidrina **3a** (Slika 11).

Ukoliko se reakcija između **5-FU** i HOCl prati  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom, aromatski signal koji odgovara vodikovom atomu na C6 položaju u **5-FU** (dublet na 7,40 ppm) nestaje uz istovremenu pojavu novog dubleta na 5,16 ppm (slika 7). Ovaj pomak signala prema višem magnetskom polju upućuje na rehibridizaciju C6 ugljika iz  $\text{sp}^2$  u  $\text{sp}^3$  tijekom reakcije. Multiplicitet obaju signala (dubleti u  $^1\text{H}$  NMR spektrima reaktanta i produkta) potvrđuje da

vodikova jezgra na C6 položaju spregnuta sa spinom jezgre fluora na C5 položaju u **5-FU**, odnosno sa spinom jezgre fluora na C5 položaju u kloriranom produktu **3a**.

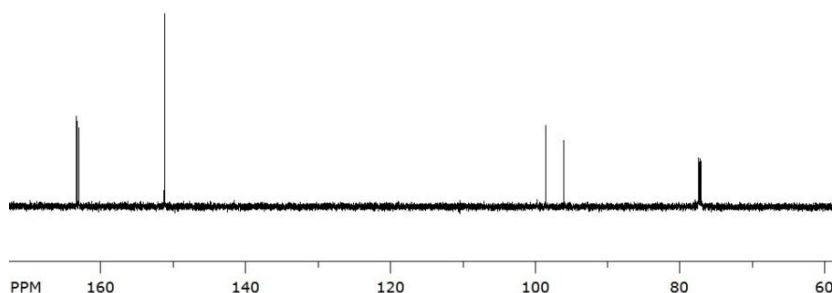
U  $^1\text{H}$  NMR spektru kloriranog produkta **3a** osim dubleta koji odgovara vodikovom atomu na C6 položaju, nalaze se još tri signala koji odgovaraju amidnom vodikovom atomu (8,87 ppm), imidnom vodikovom atomu (11,03 ppm) i vodikovom atomu hidroksidne skupine (7,40 ppm).



**Slika 7.  $^1\text{H}$  NMR spektar alikvota reakcijske smjese 5-FU i HOCl u vodi. Prikazani signali pripadaju C6 vodikovom atomu u 5-FU (7,4 ppm, plava strelica) i produktu **3a** (5,16 ppm, crvena strelica)**

U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru kloriranog produkta **3a** nalaze se četiri signala (slika 8). Na 163,2 ppm nalazi se dublet ( $^2J_{\text{FC}} = 26,9$  Hz), što sugerira da se radi o ugljikovom atomu C4, odnosno karbonilnoj skupini u susjedstvu C5 ugljika na koji je vezan fluor. Signal drugog karbonilnog ugljika (singlet) nalazi se na 151,22 ppm i odgovara C2 položaju. Budući je atom fluora na C5 položaju udaljen 4 veze od C2 atoma, ne dolazi do sprege između jezgri fluora i ugljika. Dublet koji se nalazi na 97,30 ppm odgovara C5 ugljikovom atomu i spreže s velikom konstantom ( $^1J_{\text{FC}} = 255,0$  Hz) s jezgrom fluora. Četvrti signal je dublet na 77,22 ppm koji odgovara C6 ugljikovom atomu, koji je također spregnut fluorom ( $^2J_{\text{FC}} = 26,3$  Hz). Najveća relativna promjena kemijskog pomaka od gotovo 30 ppm u niže magnetsko polje, tijekom

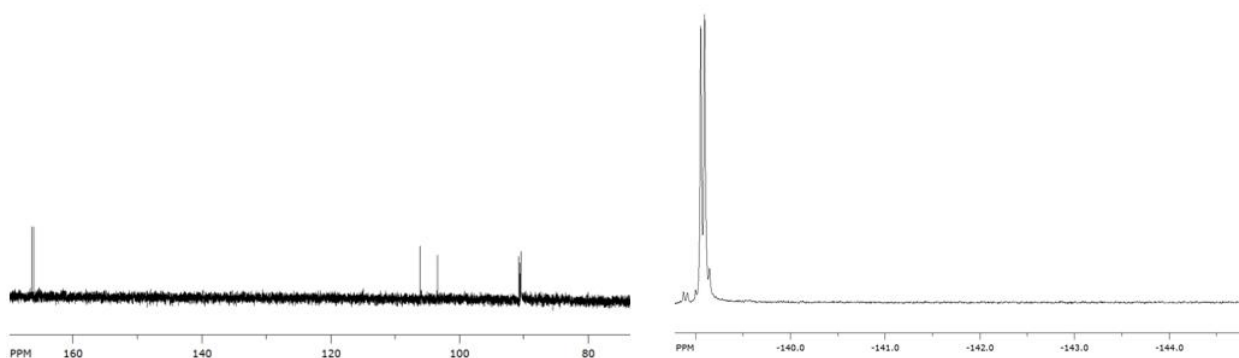
reakcije 5-FU → klorhidrin **3a**, vezana je uz rehibridizaciju C5 ugljikova atoma iz  $sp^2$  u  $sp^3$ , što je još jedna potvrda se je položaj kloriranja C5, a ne C6 ugljikov atom.



Slika 8.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **3a** (u  $\text{DMSO-d}_6$ ).

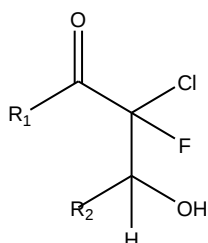
Relativno mala konstanta sprege u  $^{19}\text{F}$  NMR i  $^1\text{H}$  NMR spektru ( $^3J_{\text{FH}} = 2 \text{ Hz}$ ) sugerira da se fluor na C5 položaju i vodikov atom na C6 položaju u klorhidrinskom produktu nalaze u *trans* položaju. Prema literaturi (Miyashita i sur., 1981) u *cis* izomeru klorhidrina konstanta sprege između C6 vodikovog atoma i C5 fluorovog atoma iznosila bi preko 10 Hz.

Dobiveni spoj **3a** bijela je kristalična krutina, dobro topljiva u vodi, etanolu, metanolu, acetonu i dimetilsulfoksidu. Vodena otopina neutralna je do blago lužnata. Spoj je vrlo otporan na djelovanje jakih kiselina ( $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Također, stabilan je u 0,1 M  $\text{NaOH}$ , dok se u lužnatijim uvjetima pregrađuje u više produkata. Uvođenjem plinovitog klora u vodenu otopinu dobivenog spoja dobiven je sekundarni produkt kloriranja čiji NMR spektri (slika 9) ukazuju na eliminaciju fragmenta koji sadrži C2 ugljikov atom. Vjerojatno se radi o procesu dekarboksilacije, budući se u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru reakcijske smjese nalaze samo tri signala (odnosno, nedostaje jedan signal početne strukture klorhidrina **3a**).



**Slika 9.  $^{13}\text{C}$  NMR (lijevo) 3a i  $^{19}\text{F}$  NMR spektar (desno) produkta kloriranja klorhidrina 3a.**

Sva tri signala u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru (Slika 9) u sprezi su s fluorovim atomom na C5 položaju što odgovara strukturi prikazanoj na slici 10. U  $^{19}\text{F}$  NMR spektru nalazi se dublet na -139 ppm, a u  $^1\text{H}$  NMR spektru dublet na 5,06 ppm koji odgovara vodikovom atomu vezanom na ugljik u susjedstvu fluora.



**Slika 10. Pretpostavljeni fragment strukture produkta dobivenog kloriranjem 3a.**

Određivanje konačne strukture ( $\text{R}_1$  i  $\text{R}_2$  supstituenata) izvan je okvira ovog diplomskog rada.

## 4.2. REAKCIJSKI MEHANIZAM KLORIRANJA 5-FLUOROURACILA

Svi računi (geometrijske optimizacije, frekvencijski računi i solvacijski modeli) provedeni su uz upotrebu programskog paketa Gaussian09. Vizualizacija dobivenih rezultata (optimizacije i frekvencijski računi) provedena je korištenjem programa GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA). Svi računi provedeni su na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu ([www.srce.hr](http://www.srce.hr)) i klastera Andrija smještenog u Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu ([andrija.pharma.hr](http://andrija.pharma.hr)).

Sve su geometrije optimizirane u zadanoj simetriji koristeći DFT funkcionalne B3LYP i M062X. Za opis molekulskih orbitala korišteni su bazni skupovi 6-311+G(d) i 6-311++G(3df,2p), koji se često koriste za opis malih organskih molekula. Kompleksi reaktanata, produkata, intermedijera i prijelaznih stanja optimizirani su sa dvije eksplicitno dodane molekule vode kako bi se točnije opisala prva solvacijska ljuska. Za implicitnu solvataciju korišten je SMD solvacijski model (otapalo voda,  $\alpha=1,2$ ). Računati su NBO, MK i CM5 (Hirshfeld) naboji pojedinih reaktanta i intermedijera.

Korištenjem navedenih postupaka i metoda istražen je reakcijski mehanizam 5-FU s HOCl/Cl<sub>2</sub>. Za predviđanje mogućih reakcijskih mehanizma korisno je provjeriti literaturno dostupne podatke o analognim procesima. Informacije o raspodjeli reakcijskih produkata, o konstantama brzina reakcija ili utjecaju otapala na reakcije, mogu poslužiti za definiranje najvjerojatnijeg mehanističkog puta.

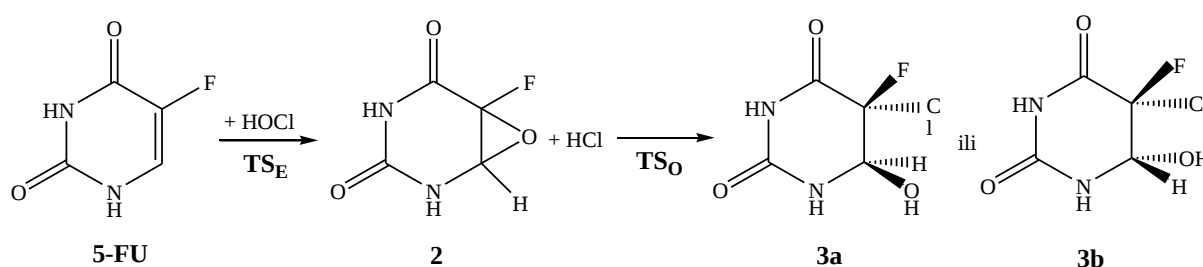
Koordinate za pretpostavljene strukture prijelaznog stanja definiraju se u programu za vizualizaciju (npr. GaussView). Važno je da početna geometrija prijelaznog stanja odgovara „stvarnoj“ situaciji kako bi se struktura prijelaznog što lakše locirala. Nakon optimizacije prijelaznog stanja na odgovarajućoj teorijskoj razini, IRC računom se lociraju minimumi povezani s tim prijelaznim stanjem. Optimizacijom minimuma zapravo se dobiju reaktanti (u povratnom smjeru), odnosno produkti (u naprednom smjeru). Osim toga potrebno je odrediti optimalni broj molekula otapala koji sudjeluju u reakciji, te provesti eksplicitnu i implicitnu solvataciju. Razlika Gibbsovih energija reaktanata i prijelaznog stanja odgovara Gibbsovoj energiji aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ) u naprednom smjeru. Uvrštavanjem dobivenog rezultata u Eyringovu jednadžbu dobiva se konstanta brzine kemijske reakcije,  $k$ . Razmatrajući sve moguće procese

i usporedbom in silico dobivenih podataka s eksperimentalnim podacima (produkti reakcije, konstante brzine) može se odrediti najvjerojatniji mehanizam reakcije.

U vodenoj otopini **5-FU** egzistira kao ravnotežna smjesa N1 i N3 anionskih formi i molekulske forme (Markova i sur., 2010). Molekulska forma **5-FU** je najzastupljenija u neutralnom i kiselom mediju ( $pK_a(\text{5-FU})=8,15$ ) (Sardo i sur., 2009), no usprkos tome očekuje se veća reaktivnost, odnosno nukleofilnost anionskih oblika. Pokazano je da kod analogne reakcije bromiranja uracila, anionski oblik uracila za pet redova veličine brže reagira s HOBr od molekulskog oblika uracila (Tee i Berks, 1980). Eksperimentalno je vrlo teško odrediti koji je anionski oblik **5-FU** reaktivniji (N1 ili N3), kao i udio molekulskog (vrlo sporog) puta reakcije u ukupnom procesu. Iz navedenih razloga, provedeno je kvatno-kemijsko istraživanje svih mogućih reakcijskih putova, jer računalne tehnike ne podliježu eksperimentalnim ograničenjima, te omogućuju izravnu usporedbu kinetičkih i termodinamskih parametara svih razmatranih procesa. Korištenjem M062X funkcionala uz bazni skup 6-311+G(d), te uz korištenje solvacijskog modela SMD locirano je nekoliko mogućih prijelaznih stanja koja opisuju i odgovaraju različitim mehanizmima kloriranja **5-FU**.

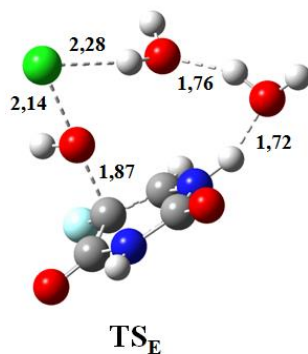
#### 4.2.1. EPOKSIDACIJA 5-FU

Prvi predloženi reakcijski put (Slika 11) odnosi se na dvostupanjsku reakciju u kojoj u prvom koraku, u reakciji **5-FU** i HOCl nastaje epoksid **2** koji zatim reagira s HCl te daje dva moguća klorhidrinska produkta, **3a** i **3b**.



**Slika 11. Predloženi mehanizam reakcije 5-FU i HOCl s epoksidom 2 kao intermedijerom.**

Locirana je struktura za prijelazno stanje epoksidacije 5-FU ( $TS_E$ ) s HOCl i dvije eksplicitno dodane vode (slika 12) koja povezuje dva minimuma, kompleks reaktanata (5-FU, HOCl i dvije vode) i kompleks produkata, epoksida **2** i HCl (u kompleksu s dvije eksplicitne vode).



**Slika 12. Struktura prijelaznog stanja epoksidacije 5-FU s HOCl ( $TS_E$ ) optimizirana na M062X/6-311+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.**

Energijska barijera koja odgovara prijelaznom stanju  $TS_E$  iznosi 124,1 kJ/mol (Tablica 2). Nastali kompleks produkata vrlo je stabilan u relativnom odnosu na reaktante (-118,2 kJ/mol). Za proces otvaranja epoksida ( $TS_O$ ) energijska barijera iznosi 35,0 kJ/mol, u odnosu na epoksid **2** kao intermedijer. Također, dobiveni rezultati pokazuju da je *trans* produkt **3a** termodinamički 13,7 kJ/mol stabilniji od *cis* produkta **3b**. Gibbsove slobodne energije ( $G$ ), Gibbsove slobodne energije solvatacije ( $\Delta G_{solV}$ ) te relativne energije pri temperaturi od 298,15 K ( $\Delta G_{298}$ ) za reaktante, prijelazna stanja, intermedijere i produkte, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu, prikazani su u tablici x. Osim toga, u tablici je prikazan broj imaginarnih frekvencija dobivenih frekvencijskim računom kao i vrijednost imaginarne frekvencije (NImag).

**Tablica 2. Energije minimuma i prijelaznih stanja za reakcijski mehanizam epoksidacije 5-FU s HOCl izračunate na M062X/6-311+G(d) razini.**

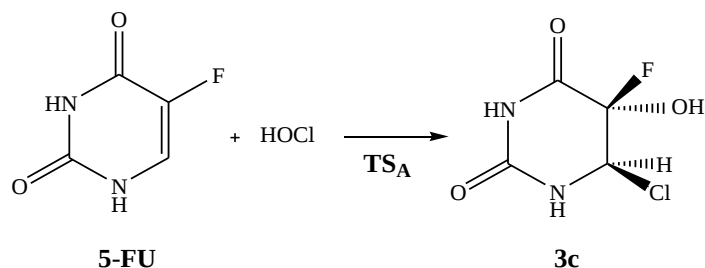
|                         | NImag<br>(cm <sup>-1</sup> ) | G<br>(Hartree) | $\Delta G_{\text{solv}}$<br>(kJ/mol) | $\Delta G_{298}$<br>(kJ/mol) |
|-------------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>5-FU<sup>a</sup></b> | 0                            | -1202,709591   | -33,59                               | 0,0                          |
| <b>TS<sub>E</sub></b>   | 1 (552,6i)                   | -1202,661336   | -36,19                               | 124,1                        |
| <b>2</b>                | 0                            | -1202,757388   | -26,28                               | -118,2                       |
| <b>TS<sub>o</sub></b>   | 1 (430,9i)                   | -1202,739698   | -52,09                               | 35,0                         |
| <b>3a</b>               | 0                            | -1202,783432   | -39,87                               | -200,1                       |
| <b>3b</b>               | 0                            | -1202,781741   | -37,94                               | -186,4                       |

<sup>a</sup> 5-fluorouracil u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode

Visoka barijera za prvi reakcijski korak sugerira da je ovaj proces malo vjerojatan iako dobiveni klorhidrinski produkt **3a** odgovara eksperimentalno opaženim podacima. Očigledno je da klorhidrinski produkti nastaju nekim drugim mehanističkim putem.

#### 4.2.2. USKLAĐENA ADICIJA $\text{Cl}^+$ I $\text{OH}^-$ NA 5-FU

Usklađena adicija  $\text{Cl}^+$  i  $\text{OH}^-$  na dvostruku vezu u pirimidinskom prstenu **5-FU** druga je mehanistička mogućnost (slika 13). Nastali produkt **3c** je 184,5 kJ/mol stabilniji od reaktanata, no u odnosu na klorhidrinske produkte kod kojih se klor nalazi na C5 položaju, termodinamički je 2,0 kJ/mol (u odnosu na **3b**) odnosno 15,7 kJ/mol (u odnosu na **3a**) manje stabilan.



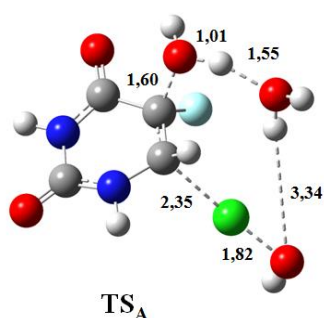
**Slika 13. Predloženi reakcijski mehanizam usklađene adicije  $\text{Cl}^+$  i  $\text{OH}^-$  na dvostruku vezu 5-FU.**

**Tablica 3. Energije minimuma i prijelaznog stanja za reakcijski mehanizam usklađene adicije  $\text{Cl}^+$  i  $\text{OH}^-$  na dvostruku vezu 5-FU izračunate na M062X/6-311+G(d) razini.**

|                   | NImag                | G            | $\Delta G_{\text{solv}}$ | $\Delta G_{298}$ |
|-------------------|----------------------|--------------|--------------------------|------------------|
|                   | ( $\text{cm}^{-1}$ ) | (Hartree)    | (kJ/mol)                 | (kJ/mol)         |
| 5-FU <sup>a</sup> | 0                    | -1202,709591 | -33,59                   | 0,00             |
| TS <sub>A</sub>   | 1 (306,9i)           | -1202,599220 | -60,38                   | 263,0            |
| 3c                | 0                    | -1202,772440 | -53,14                   | -184,5           |

<sup>a</sup> 5-fluorouracil u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode

Energijska barijera koja odgovara prijelaznom stanju za ovu reakciju (TS<sub>A</sub>) iznosi 263,0 kJ/mol. Optimizirana struktura prijelaznog stanja TS<sub>A</sub> (slika 14) prikazuje ciklički mehanizam u kojem  $\text{Cl}^+$  iz HOCl elektrofilno napada C6 ugljikov atom. Istovremeno dolazi do prijenosa protona duž prstena eksplicitnih molekula otapala i nukleofilnog napada  $\text{OH}^-$  skupine iz molekule vode na C5 ugljik.

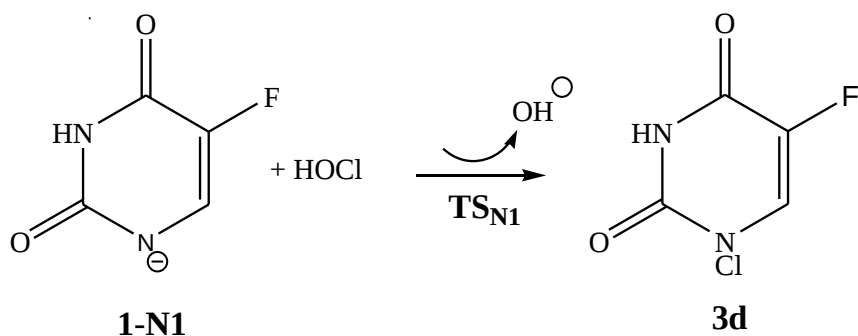


**Slika 14. Struktura prijelaznog stanja (TS<sub>A</sub>) simultane adicije Cl<sup>+</sup> i OH<sup>-</sup> na dvostruku vezu 5-FU optimizirana na M062X/6-311+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.**

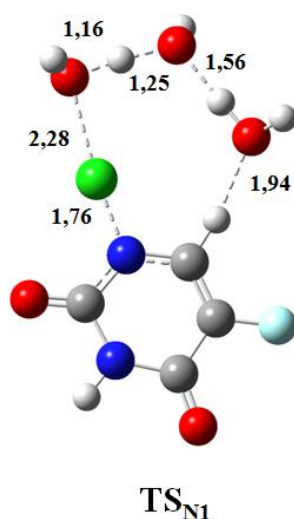
U dobivenom produktu C6 klorov atom i C5 hidroksilna skupina nalaze se u *trans* položaju. Za razliku od predhodno predloženog mehanizma u kojemu je intermedijer epoksid **2**, produkt **3c** ima klor na C6 položaju. S obzirom na visoku energijsku barijeru reakcije (263,0 kJ/mol), formiranje ovog klorhidrinskog produkta je kinetički vrlo nepovoljno. Gibbsove slobodne energije (*G*), Gibbsove slobodne energije solvatacije ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) te relativne energije pri temperaturi od 298,15 K ( $\Delta G_{298}$ ) za reaktante, prijelazno stanje i produkt, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu, prikazani su u tablici 3.

#### 4.2.3. N-KLORIRANJE 5-FU

Osim reakcije C-kloriranja, moguće je pretpostaviti i kloriranje amidnog i imidnog dušika u pirimidinskom prstenu 5-FU. N-kloriranje sličnih cikličkih amida/imida razmatrano je ranije (Šakić i sur., 2014). Pokazano je da kloriranju neutralnih amida prethodi izomerizacija amidne skupine u iminolnu formu. Ravnotežni udio iminolnih oblika 5-FU je vrlo mali (Markova i sur., 2010), a izračunate barijere za tautomerizaciju 5-FU i sličnih cikličkih sustava (npr. derivati barbiturne kiseline) iznose preko 60 kJ/mol (Šonjić i sur., 2015.). Stoga je ovakav reakcijski mehanizam malo vjerojatan.



Slika 15. Predloženi mehanizam reakcije N-kloriranja 5-FU s HOCl.



Slika 16. Struktura prijelaznog stanja (TS<sub>N1</sub>) izravnog N-kloriranja aniona 1-N1 optimizirana na M062X/6-311+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.

Za razliku od neutralnog 5-FU, kod anionske specije **1-N1** moguće je izravno kloriranje amidnog dušika (Slika 15). Locirano je prijelazno stanje TS<sub>N1</sub> (Slika 16) za izravno kloriranje aniona **1-N1**. Reakcija je kinetički relativno povoljna ( $\Delta G^\ddagger = 93,4$  kJ/mol), no nastali je kloramid izrazito nestabilan u odnosu na reaktante. Također, mnogo je nestabilniji od odgovarajućeg klorhidrinskog produkta **3a** ( $\Delta G = 175,4$  kJ/mol). Za razliku od aniona **1-N1**, za reakciju izravnog N-kloriranja aniona **1-N3** nije locirano prijelazno stanje. Energije minimuma i prijelaznog stanja za reakcijski mehanizam kloriranja N1 položaja aniona **1-N1** izračunate na M062X/6-311+G(d) razini prikazane su u tablici 4.

**Tablica 4. Energije minimuma i prijelaznog stanja za reakcijski mehanizam izravnog N kloriranja aniona 1-N1 izračunate na M062X/6-311+G(d) razini.**

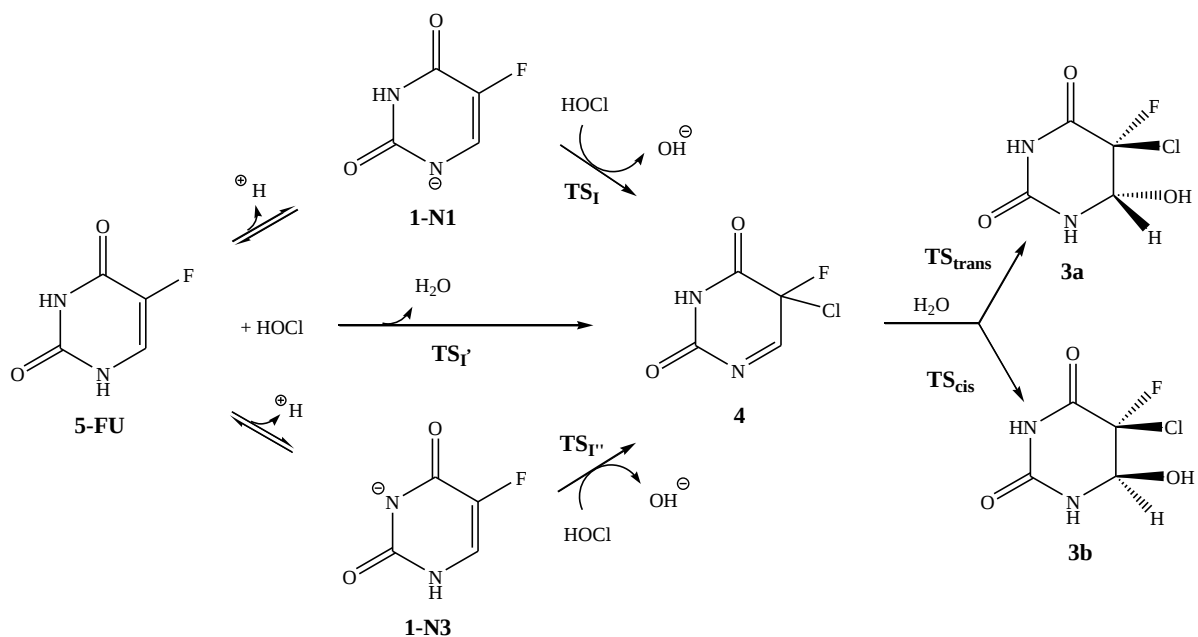
|                                    | NImag               | G            | $\Delta G_{\text{solv}}$ | $\Delta G_{298}$ |
|------------------------------------|---------------------|--------------|--------------------------|------------------|
|                                    | (cm <sup>-1</sup> ) | (Hartree)    | (kJ/mol)                 | (kJ/mol)         |
| <b>5-FU<sup>a</sup></b>            | 0                   | -1202,709591 | -33,59                   | 0,00             |
| <b>1-N1<sup>b</sup></b>            | 0                   | -1202,212325 | -186,86                  | 47,8             |
| <b>TS<sub>N1</sub><sup>c</sup></b> | 1 (560,6i)          | -1202,191608 | -195,68                  | 93,4             |
| <b>3d</b>                          | 0                   | -1202,718078 | -36,11                   | -24,8            |

<sup>a</sup> 5-fluorouracil u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode

<sup>b</sup> Relativne Gibbsove energije anionskog kompleksa, u odnosu na 5-FU u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode, korigirane su za iznos  $\Delta G_r$  iz izraza za reakciju  $5\text{-FU} \rightarrow 1\text{-N1} + \text{H}^+$ , odnosno  $5\text{-FU} \rightarrow 1\text{-N3} + \text{H}^+$ , gdje je za  $G(\text{H}^+)_{\text{solv}}$  uzeta eksperimentalna vrijednost od -1104,5 kJ/mol (Tissandier i sur., 1998).

#### 4.2.4. C5-KLORIRANJE PREKO IMINSKOG INTERMEDIJERA

Četvrti razmatrani mehanistički put odvija se preko iminskog intermedijera (slika 17) prema analogiji s eksperimentalnom studijom o bromiranju 5-FU (Tee i sur., 1979).



**Slika 17. Predloženi mehanizam reakcije kloriranja 5-FU preko iminskog intermedijera 4.**

Kao što je navedeno ranije, u vodenoj otopini 5-FU egzistira kao ravnotežna smjesa molekulskog i dvaju anionskih oblika (1-N1 i 1-N3). Iz tog su razloga razmatrani anionski i neutralni put reakcije kloriranja 5-FU. U neutralnom putu početna reakcija je adicija  $Cl^+$  iz HOCl na C5 položaj 5-FU, odnosno reakcija 5-FU → 4 preko prijelaznog stanja  $TS_I$  prikazana na Slici 16. Istovremeno s formiranjem C5-Cl veze dolazi do deprotonacije N1 položaja te nastaje neutralni iminski intermedijer 4. U anionskom putu također dolazi do adicije  $Cl^+$  iz HOCl na C5 položaj 1-N1, preko prijelaznog stanja  $TS_I$  (odnosno na C5 položaj 1-N3, preko prijelaznog stanja  $TS_{I'}$ ) (slika 18). Prema tome, u oba reakcijska puta nastaje iminski intermedijer 4, koji zatim reagira s vodom pri čemu nastaju klorhidrinski produkti 3a i 3b. Reakcija adicije vode na 4 može se odvijati preko prijelaznih stanja  $TS_{cis}$  ili  $TS_{trans}$ . Gibbsove slobodne energije ( $G$ ), Gibbsove slobodne energije solvatacije ( $\Delta G_{solv}$ ) te relativne energije pri temperaturi od 298,15 K ( $\Delta G_{298}$ ) za reaktante, prijelazna stanja, intermedijere i produkte, koji odgovaraju predloženom reakcijskom mehanizmu, prikazani su u tablici 5.

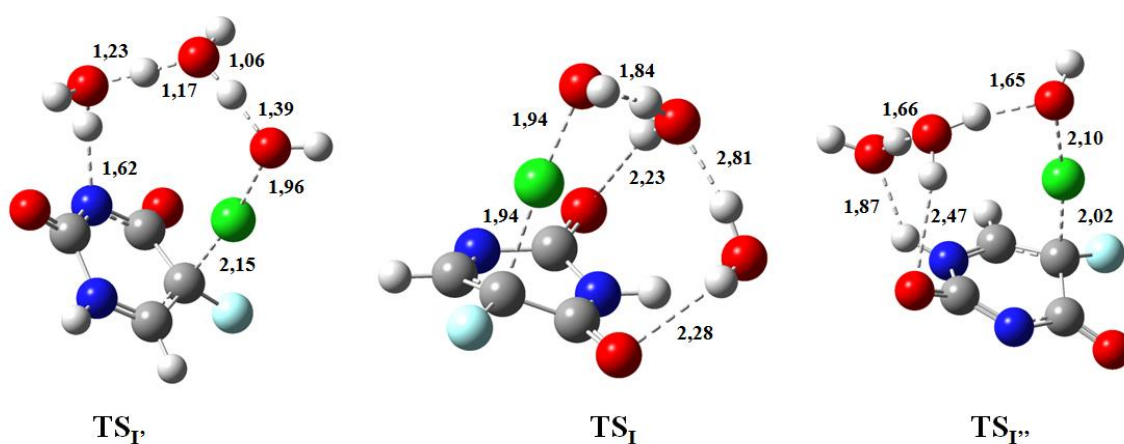
**Tablica 5. Energije minimuma i prijelaznih stanja za reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU s HOCl preko iminskog intermedijera izračunate na M062X/6-311+G(d) razini.**

|                                       | NImag<br>(cm <sup>-1</sup> ) | G<br>(Hartree) | $\Delta G_{\text{solv}}$<br>(kJ/mol) | $\Delta G_{298}^c$<br>(kJ/mol) |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------|--------------------------------------|--------------------------------|
| <b>5-FU<sup>a</sup></b>               | 0                            | -1202,709591   | -33,59                               | 0                              |
| <b>1-N1<sup>b</sup></b>               | 0                            | -1202,212325   | -186,86                              | 47,8                           |
| <b>1-N3<sup>b</sup></b>               | 0                            | -1202,203838   | -199,33                              | 57,6                           |
| <b>TS<sub>I'</sub></b><br>(134,4i)    | 1                            | -1202,187833   | -192,09                              | 135,8                          |
| <b>TS<sub>I</sub></b><br>(796,9i)     | 1                            | -1202,646128   | -66,52                               | 106,8                          |
| <b>TS<sub>I''</sub></b>               | 0                            | -1202,160516   | -222,46                              | 148,2                          |
| <b>4</b>                              | 0                            | -1202,755130   | -27,11                               | -113,0                         |
| <b>TS<sub>trans</sub></b><br>(411,2i) | 1                            | -1202,734390   | -54,85                               | -86,4                          |
| <b>TS<sub>cis</sub></b><br>(243,7i)   | 1                            | -1202,730562   | -56,90                               | -72,0                          |
| <b>3a</b>                             | 0                            | -1202,783432   | -39,87                               | -200,1                         |
| <b>3b</b>                             | 0                            | -1202,781741   | -30,62                               | -186,4                         |

<sup>a</sup> 5-fluorouracil u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode.

<sup>b</sup> Anion u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode.

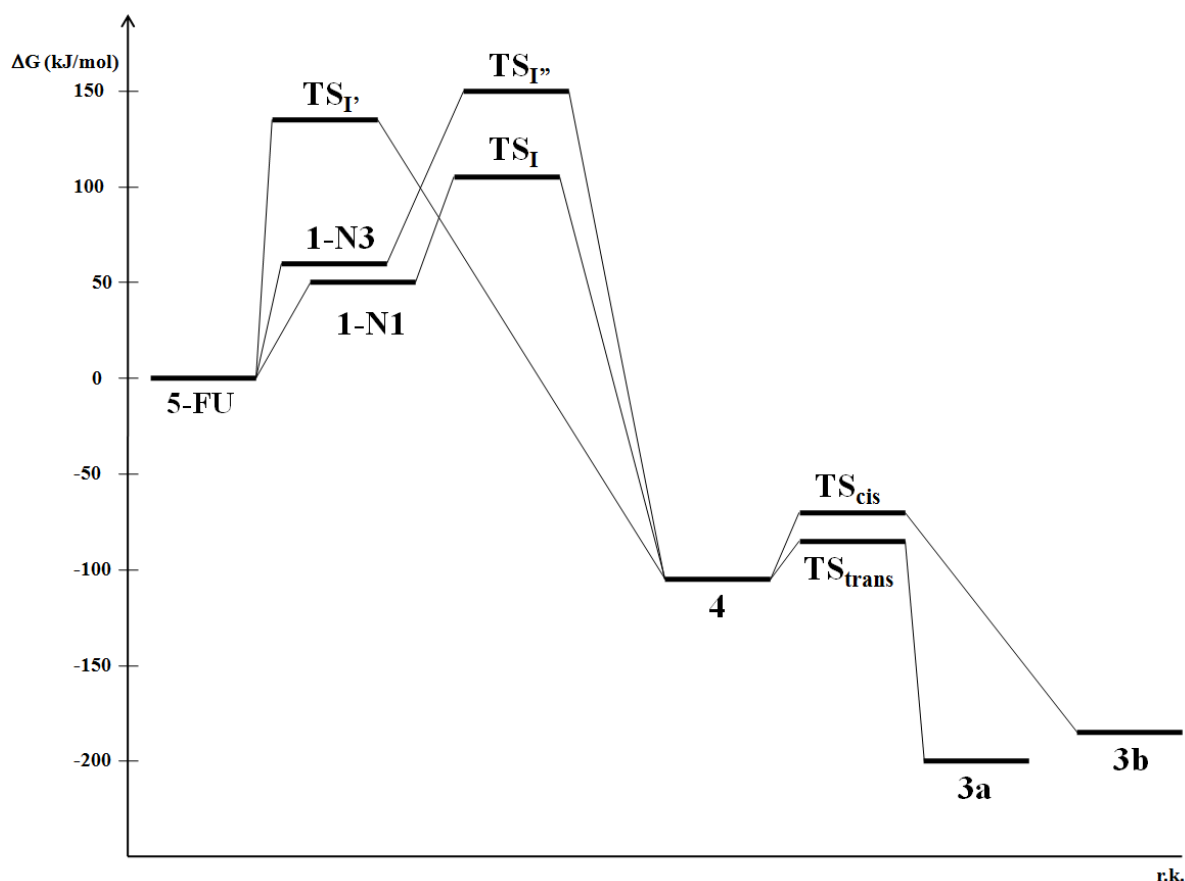
<sup>c</sup> Relativne Gibbsove energije anionskih kompleksa, u odnosu na **5-FU** u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode, korigirane su za iznos  $\Delta G_r$  iz izraza za reakciju **5-FU**  $\rightarrow$  **1-N1** + H<sup>+</sup>, odnosno **5-FU**  $\rightarrow$  **1-N3** + H<sup>+</sup>, gdje je za  $G(\text{H}^+)_{\text{solv}}$  uzeta eksperimentalna vrijednost od -1104,5 kJ/mol (Tissandier i sur., 1998).



**Slika 18. Struktura prijelaznih stanja adicije  $\text{Cl}^+$  na C5 položaj 5-FU (TS<sub>T</sub>), anionu 1-N1 (TS<sub>I</sub>) i anionu 1-N3 (TS<sub>I''</sub>) optimizirana na M062X/6-311+G(d) razini. Udaljenosti između atoma izražene su u angstromima.**

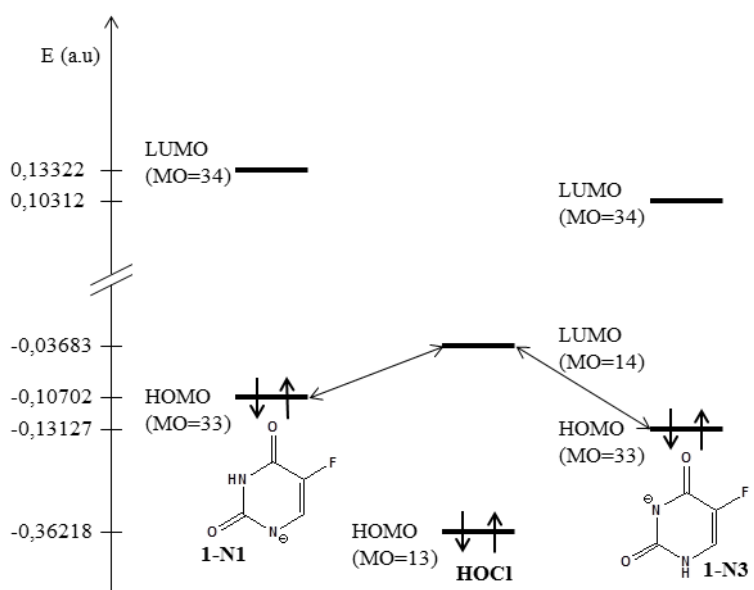
Energjska barijera za adiciju  $\text{Cl}^+$  na C5-položaj molekulskog oblika **5-FU** iznosi 135,8 kJ/mol dok za analognu reakciju u anionu **1-N1** iznosi 106,8 kJ/mol (59,0 kJ/mol u odnosu na anion **1-N1** u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode). Iz navedenog je vidljivo da je anionska specija kinetički mnogo reaktivnija, što je u skladu s objavljenim rezultatima reakcije bromiranja **5-FU** (Tee i Berks, 1980). Iako je udio anionske forme u neutralnom ili kiselom vodenom mediju relativno mali, zbog velike razlike u reaktivnosti, koju opisuju i izračunate energjske barijere za neutralni i anionski put, proizlazi da je **1-N1** jedina reaktivna specija u procesu kloriranja **5-FU**. Iz izraza za Eyringovu jednadžbu izračunati omjer konstanti brzina reakcija adicije  $\text{Cl}^+$  na anionski oblik **1-N1** i molekulski oblik **5-FU** iznosi  $k_{1\text{-N1}} / k_{5\text{-FU}} \approx 10^{13}$ .

Energjska barijera za kloriranje C5 položaja u **1-N3** anionu (preko prijelaznog stanja TS<sub>I''</sub>) iznosi 148,2 kJ/mol (90,6 kJ/mol u odnosu na anion **1-N3** u kompleksu s HOCl i dvije molekule vode), što je znatno veća barijera u odnosu na odgovarajući proces u **1-N1** anionu. Reakcijski profil za neutralni i anionski put kloriranja prikazan je na slici 19 iz kojeg je vidljivo da je kloriranje reakcijski korak koji određuje ukupnu brzinu reakcije, a da se najniža barijera kloriranja odnosi upravo na reakciju HOCl i aniona **1-N1**.

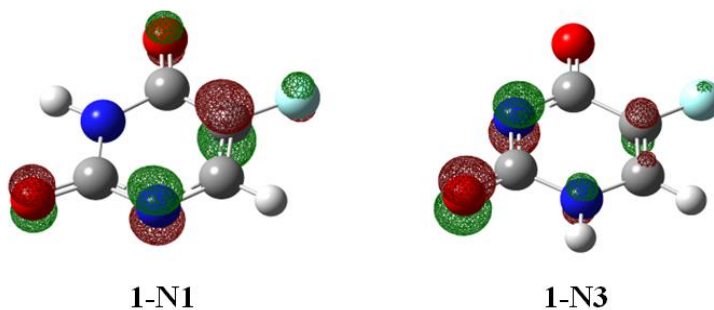


**Slika 19. Grafički prikaz relativnih energetskeg odnosa minimuma i prijelaznih stanja anionskog i neutralnog puta.**

Analiza graničnih molekularnih orbitala (FMO analiza) također ukazuje na mnogo veću reaktivnost aniona **1-N1**. Energija HOMO orbitale u anionu **1-N3** je 63,6 kJ/mol stabilnija od HOMO orbitale u anionu **1-N1** (Slika 20). To znači da je energijska razlika između HOMO orbitale nukleofila (anioni 5-fluorouracila) i LUMO orbitale elektrofila (HOCl) mnogo veća u slučaju aniona **1-N3**, odnosno da je njegova reaktivnost prema elektrofilu znatno manja. Osim toga, iz grafičkog prikaza HOMO orbitala za anione **1-N1** i **1-N3** (Slika 21) vidi se da je HOMO orbitala u anionu **1-N1** najvećim dijelom lokalizirana na C5 položaju, što upućuje na nukleofilnost tog ugljikovog atoma.

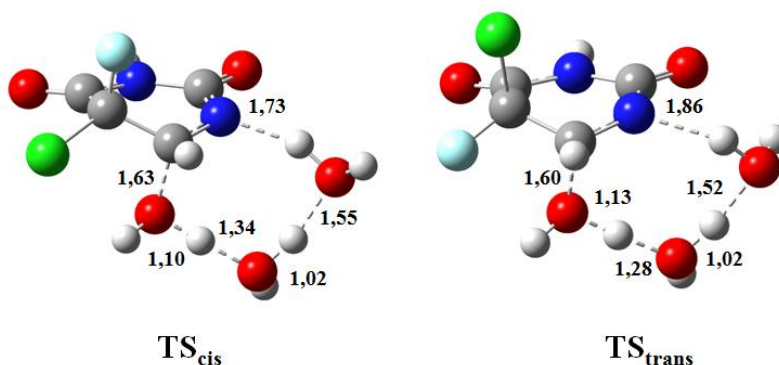


Slika 20. Prikaz energija HOMO i LUMO orbitala u anionima 1-N1 i 1-N3 i HOCl.



Slika 21. Grafički prikaz prostorne distribucije HOMO (MO = 33) orbitala 1-N1 i 1-N3 aniona na B3LYP/6-31+G(d) razini teorije.

U reakciji adicije vode na iminski intermedijer **4** moguća su dva produkta **3a** i **3b**. Stabilniji *trans* izomer **3a** nastaje adicijom vode sa suprotne strane prstena na kojoj se nalazi C5 klorov atom. Locirana su odgovarajuća prijelazna stanja za *cis*(TS<sub>cis</sub>) i *trans*(TS<sub>trans</sub>) adiciju vode na imin**4**, pri čemu je struktura TS<sub>trans</sub> stabilnija za 14,3 kJ/mol (Slika 22). Kao što je već navedeno, formiranje *trans* produkta **3a** termodinamički je povoljniji proces, a usporedbom energija prijelaznih stanja TS<sub>trans</sub> i TS<sub>cis</sub> proizlazi da je taj proces i kinetički povoljniji.



**Slika 22. Strukture prijelaznih stanja TS<sub>cis</sub> i TS<sub>trans</sub> za adiciju vode na imin **4** optimizirane na M062X/6-311+G(d) razini.**

#### 4.2.4.1. ANALIZA KONDENZIRANIH FUKUI FUNKCIJA

Izračun kondenziranih Fukui funkcija proveden je za N3- i N1-anione 5-fluorouracila, te za iminski intermedijer **4** (vidi detaljnije u metodama 2.4.3.). Naime, u skladu s ranijim eksperimentalnim rezultatima (Tee i Berks, 1980.), realno je pretpostaviti da je anionski oblik 5-FU mnogo reaktivniji od neutralne forme. U anionima su izračunate kondenzirane Fukui funkcije za N1, N3, C5 i C6 atome, koji su mogući položaji adicije elektrofilnog Cl<sup>+</sup>. Fukui analiza provedena je koristeći B3LYP funkcional uz 6-311+G(d) i 6-311++G(3df,2p) bazne skupove, te MP2 ab initio metodu uz 6-311+G(d) bazni skup. Sve teorijske razine daju slične rezultate, a ovdje su prikazani samo rezultati izračunati na B3LYP/6-311++G(3df,2p) modelu (Tablica 6).

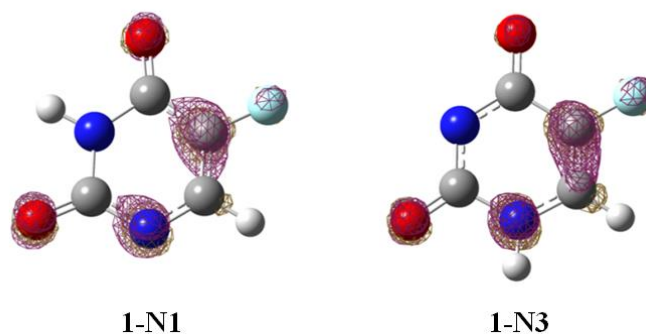
Iz rezultata je vidljivo da je Fukui indeks nukleofilnosti najveći za C5-položaj u anionu **1-N1** ( $f^- = 0.252$ ). To sugerira da je C5 atom mjesto adicije kloronijevog iona (Cl<sup>+</sup> iz HOCl), te potvrđuje mehanističku pretpostavku da se reakcija kloriranja odvija na dvostrukoj C-C vezi aromatskog sustava, a ne na amidnoj, odnosno imidnoj skupini cikličkog sustava. Indeks nukleofilnosti C5 položaja u anionu **1-N1**, nešto je veći od indeksa za isti položaju u anionu **1-N3**. To sugerira moguću kompeticiju dvaju aniona u reakciji kloriranja, ukoliko se razmatra jedino njihova intrinzička nukleofilnost. No, budući je energijska barijera za kloriranje C5

položaja u anionu **1-N3** vrlo visoka ( $\Delta G = 148,2$  kJ/mol), taj se anion ne smatra relevantnim za tumačenje mehanističke slike kloriranja 5-fluorouracila.

Ono što analiza Fukui funkcija jasno pokazuje jest da je kloriranje C5 ugljikova atoma u 5-fluorouracilu povoljniji proces od kloriranja dušikovih atoma. Grafički se to može prikazati vizualizacijom kondenzirane Fukui funkcije, odnosno mapiranjem konturnih razina elektronske gustoće na strukturama aniona (Slika 23), dobivenih na temelju populacijske analize (naboja). Prostorna distribucija elektronske gustoće analizirana je programom Multiwfn (Lu i Chen, 2012), te prikazana pomoću *cubegen* opcije u programu Gaussview.

**Tablica 6. Indeks nukleofilnosti za N1 i N3 anione 5-FU izraženi kao kondenzirane Fukui funkcije ( $f^-$ ). Naboji ugljikovih i dušikovih atoma izračunati su na SMD-B3LYP/6-311++G(3df,2p) razini.**

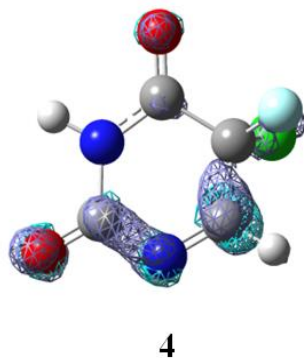
| Atom<br>(A) | Tip<br>naboja | 1-N1     |            |         | 1-N3     |            |         |
|-------------|---------------|----------|------------|---------|----------|------------|---------|
|             |               | $q_A(N)$ | $q_A(N-1)$ | $f^-$   | $q_A(N)$ | $q_A(N-1)$ | $f^-$   |
| N1          | NPA           | 7,67398  | 7,43805    | 0,23593 | 7,60432  | 7,41970    | 0,18462 |
|             | CM5           | 7,48165  | 7,32827    | 0,15338 | 7,43475  | 7,30667    | 0,12808 |
|             | MK            | 8,00758  | 7,77778    | 0,22979 | 7,745023 | 7,52948    | 0,21555 |
| N3          | NPA           | 7,63635  | 7,61790    | 0,01845 | 7,72767  | 7,67134    | 0,05633 |
|             | CM5           | 7,42911  | 7,40122    | 0,02788 | 7,48474  | 7,43748    | 0,06664 |
|             | MK            | 7,74503  | 7,52948    | 0,03648 | 8,13296  | 7,99041    | 0,14255 |
| C5          | NPA           | 5,79990  | 5,54756    | 0,25234 | 5,75727  | 5,50837    | 0,24890 |
|             | CM5           | 6,01029  | 5,85004    | 0,16025 | 5,99727  | 5,83252    | 0,16475 |
|             | MK            | 6,29952  | 6,03557    | 0,26395 | 6,19622  | 5,91171    | 0,28452 |
| C6          | NPA           | 5,97075  | 5,96006    | 0,01069 | 5,99868  | 5,91509    | 0,08359 |
|             | CM5           | 5,96824  | 5,88270    | 0,08554 | 5,95792  | 5,84075    | 0,11717 |
|             | MK            | 5,55562  | 5,50148    | 0,05414 | 5,84947  | 5,71967    | 0,12981 |



**Slika 23. Prikaz konturnih razina kondenzirane Fukui funkcije ( $f^-$ ) za anione fluorouracila (vrijednost izohipse = 0.007) na temelju izračunatih MK naboja.**

U grafičkom prikazu konturnih razina kondenzirane Fukui funkcije vidi se da je u oba aniona elektronska gustoća lokalizirana na C5 ugljikovom atomu, zbog čega se taj ugljikov atom može smatrati najpovoljnijim položajem za elektrofilni napad kloronijevog kationa.

Osim izračuna kondenzirane Fukui funkcije za anione **1-N1** i **1-N3**, provedena je analiza i za iminski intermedijer **4** (Tablica 7).



**Slika 24. Prikaz konturne razine kondenzirane Fukui funkcije ( $f^+$ ) za iminski intermedijer 5-FU (vrijednost izohipse = 0.004) na temelju izračunatih MK naboja.**

**Tablica 7. Indeksi nukleofilnosti i elektrofilnosti za iminski međuprodukt izraženi kao kondenzirane Fukui funkcije ( $f$ ). Naboji ugljikovih i dušikovih atoma izračunati su na SMD-B3LYP/6-311++G(3df,2p) razini.**

| Atom<br>(A) | Tip<br>naboja | $q_A(N)$ | $q_A(N+1)$ | $f^+$    |
|-------------|---------------|----------|------------|----------|
| N1          | NPA           | 7,49949  | 7,61593    | 0,11644  |
|             | CM5           | 7,35193  | 7,46802    | -0,13256 |
|             | MK            | 7,86168  | 7,91783    | 0,11609  |
| N3          | NPA           | 7,63732  | 7,64189    | 0,00457  |
|             | CM5           | 7,39561  | 7,42277    | 0,02716  |
|             | MK            | 7,94417  | 7,81161    | -0,13256 |
| C5          | NPA           | 5,74596  | 5,77418    | 0,02822  |
|             | CM5           | 5,87542  | 5,91843    | 0,04301  |
|             | MK            | 6,55738  | 6,14716    | -0,41023 |
| C6          | NPA           | 5,81832  | 6,02030    | 0,20198  |
|             | CM5           | 5,84761  | 5,99608    | 0,14848  |
|             | MK            | 5,29738  | 6,30499    | 1,00761  |

Nakon adicije klor na C5 položaj i promjene hibridizacije C5 ugljika u  $sp^3$  centar, smanjuje se nukleofilnosti C5 ugljikova atoma. Za daljnji tijek reakcije postaje značajna elektrofilnost C6 položaja. Relativno najveći indeks elektrofilnost, u odnosu na ostale atome (Tablica 7), čini ga najpovoljnijim položajem za nukleofilni napad vode koji sljedi kao drugi reakcijski korak u procesu formiranja klorhidrinskog produkta **3a**.

U grafičkom prikazu konturnih razina kondenzirane Fukui funkcije (Slika 24) vidi se da je u iminskom intermedijeru **4** dolazi do relativnog manjka elektronske gustoće C6 ugljikovom atomu, zbog čega se taj ugljikov atom može smatrati najpovoljnijim položajem za nukleofilni napad vode.

## 5. ZAKLJUČAK

U posljednjih dvadesetak godina, sve veća proizvodnja i potrošnja farmaceutika dovela je do nagomilavanja lijekova i njihovih metabolita u okolišu. Osim toga, prilikom kemijske obrade otpadnih voda nastaju produkti koji mogu imati nepovoljniji ekotoksikološki profil. Jedna od najčešće korištenih metoda za kemijsku obradu otpadnih voda je kloriranje hipoklorastom kiselinom (HOCl). Kao primjer transformacija induciranih procesom kloriranja, u ovom je diplomskome radu prikazan 5-fluorouracil (**5-FU**). Kvantno-kemijskim i eksperimentalnim metodama detaljno je istražen mehanizam reakcije kloriranja **5-FU**.

U eksperimentalnom dijelu simulirana je reakcija kloriranja. Pripravljen je klorhidrin **3a** uvođenjem plinovitog klora ( $\text{Cl}_2$ ) u vodenu suspenziju **5-FU**. Doseg je reakcije praćen NMR spektroskopijom. Produkt je izoliran u visokom iskorištenju, a njegova je struktura određena uporabom  $^{19}\text{F}$ ,  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopije.

Kvantno-kemijskim je izračunima istraženo nekoliko reakcijskih mehanizama. Reakcija epoksidacije s HOCl koju prati otvaranje epoksida u drugom reakcijskom koraku, te simultana adicija  $\text{Cl}^+$  i  $\text{OH}^-$  na dvostruku vezu **5-FU**, isključeni su kao mehanističke mogućnosti. Osnovni eliminacijski faktor za obje reakcije jesu visoke energijske barijere ( $\Delta G^\ddagger > 120$  kJ/mol), u odnosu na druge mehanističke mogućnosti. Također, reakcija N-kloriranja isključena je zbog formiranja termodinamički nestabilnih produkata (N-kloramidi). Pokazano da je klorhidrin **3a** kinetički i termodinamički najpovoljniji produkt reakcije kloriranja **5-FU** s HOCl. Na M062X teorijskoj razini uz 6-311+G(d) bazni skup locirani su minimumi i prijelazna stanja odgovarajućih reakcija. Solvacijski model SMD (otapalo voda) korišten je za implicitnu solvataciju, dok je svakom prijelaznom stanju i minimumu pridružen optimalan broj eksplicitnih molekula vode.

Podaci izneseni u ovom diplomskom radu pokazuju kako do kloriranja **5-FU** s HOCl dolazi na C5 položaju pirimidinskog sustava. Mehanizam kloriranja anionskim putem preko **1-N1** aniona najvjerojatniji je mehanizam reakcije između **5-FU** i HOCl. U prvom reakcijskom koraku, preko prijelaznog stanja **TS<sub>I</sub>**, nastaje iminski međuprodukt **4**, a energijska barijera tog procesa ( $\Delta G^\ddagger$ ) iznosi 106,8 kJ/mol. U drugom reakcijskom koraku dolazi do adicije vode na

imin, preko prijelaznog stanja  $TS_{trans}$ , a barijera tog brzog procesa iznosi samo 26,7 kJ/mol. Nastali klohidrinski produkt **3a** u skladu je s eksperimentalno dobivenim podacima.

Poznavanje početnog produkta kloriranja **5-FU**, kao i mehanizma kojim on nastaje ključno je za razumijevanje okolišne sudbine ovog lijeka. Također, potrebno je ispitati toksičnost dobivenog produkta kloriranja **3a** i njegov mogući utjecaj na ekosustav. Podaci izneseni u ovom diplomskom radu sugeriraju da je potrebno razmotriti drugačije pristupe obradi otpadnih voda kako bi se izbjegli klorirani produkti lijekova. Konačno, prikazano je da u procjeni kemijske sudbine lijekova, prikladno mjesto imaju kvantno-kemijske metode.

## 6. LITERATURA

1. Antelo JM, Arce F, Parajo M, Pousa AI, Perez-moure JC. Chlorination of N-Methylacetamide: A kinetic study. *Int J Chem Kinet*, 1995, 27 (10), 1021-1031.
2. Atkins P, de Paula J. Atkins' Physical Chemistry, 10th edition. Oxford, 2014, Oxford University press, str. 568.
3. Barone V, Cossi M. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J Phys Chem A*, 1998, 102, 1995-2001.
4. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. *Phys Rev A*, 1988, 38, 3098-100.
5. Becke AD. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J Chem Phys*, 1992, 96, 2155-60.
6. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J Chem Phys*, 1993, 98, 5648-52.
7. Bedner M, MacCrehan WA. Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imin. *Environ Sci Technol*, 2006, 40, 516-522.
8. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija, 6. izdanje. Zagreb, 2013, Školska knjiga, str. 722.
9. Besler BH, Merz Jr. KM, Kollman PA. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J Comp Chem*, 1990, 11, 431-39.
10. Blatchley ER, Gong WL, Alleman JE, Rose JB, Huffman DE, Otaki M, Lisle JT. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. *Water Environ Res*, 2007, 79 (1), 81-92.
11. DellaGreca M, Iesce MR, Pistillo P, Previtera L, Temussi F. Unusual products of the aqueous chlorination of atenolol. *Chemosphere* 2009, 74, 730-734.
12. Dewar MJS, Thiel W. Ground-States of Molecules. 38. The MNDO Method: Approximations and Parameters. *J Am Chem Soc*, 1977, 99, 4899-907.
13. Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 9. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J Chem Phys*, 1971, 54, 724.

14. Dunning TH Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J Chem Phys*, 1989, 90, 1007-23.
15. Foster JP, Weinhold F. Natural hybrid orbitals. *J Am Chem Soc*, 1980, 102, 7211-18.
16. Singh UC, Kollman PA. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J Comp Chem*, 1984, 5, 129-145.
17. Elersek T, Milavec S, Korošec M, Brezovsek P, Negreira N, Zonja B, López de Alda M, Barceló D, Heath E, Ščančar J, Filipič M. Toxicity of the mixture of selected antineoplastic drugs against aquatic primary producers. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016 .
18. Feng Y, Smith DW, Bolton JR. Photolysis of aqueous free chlorine species (HOCl and OCl-) with 254 nm ultraviolet light. *J Environ Eng Sci*, 2007, 6, 277-284.
19. FLUOROURACIL, PLIVA. [www.almp.hr](http://www.almp.hr), pristupljeno 17.1.2016.
20. Foresman JB, Frisch A. Gaussian, I., *Exploring chemistry with electronic structure methods*. 2nd ed. 1996, Gaussian, Inc.
21. Fuentealba P, Pérez P, Contreras R. On the condensed Fukui function. *J Chem Phys*, 2000, 113, 2544.
22. Fukui K, Yonezawa T, Shingu, H. (). "A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons". *J Chem Phys*, 1952, **20** (4), 722.
23. Fukui K. The path of chemical-reactions - The IRC approach. *Acc Chem Res*, 1981, 14, 363-68.
24. Gaussian 09, Revision A.02. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson GA, Nakatsuji H, Caricato M, Li X, Hratchian HP, Izmaylov AF, Bloino J, Zheng G, Sonnenberg JL, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark M, Heyd JJ, Brothers E, Kudin KN, Staroverov VN, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell A, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Rega N, Millam NJ, Klene M, Knox JE, Cross JB, Bakken V, Adamo C, Jaramillo J, Gomperts R, Stratmann RE, Yazyev O, Austin AJ, Cammi R, Pomelli C, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Zakrzewski VG, Voth GA, Salvador P, Dannenberg JJ, Dapprich S, Daniels AD, Farkas Ö, Foresman JB, Ortiz JV, Cioslowski J, Fox D J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
25. GaussView, Version 5. Dennington R; Keith T; Millam J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.

26. Gould JP, Richards JT, MtLes MG. The kinetics and primary products of uracil chlorination. *Water Res*, 1984, 18 (2), 205-212.
27. Haas, CN. Assessing the Need for Wastewater Disinfection. *J Wat Pollut Cont Fed*, 1987, 59, 856-64.
28. Heberer J. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J Hydrol*, 2002, 266, 175-189.
29. Hirshfeld FL. Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities. *Theor Chem Acc*, 1977, 44, 129-38.
30. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*, 1964, 136, B864-B71.
31. Holm JV, Rügge K, Bjerg PL, Christensen TH. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of the landfill (Grindsted, Denmark). *Environ Sci Tehnol*, 1995, 29, 1415-1420.
32. Hratchian HP, Schlegel HB. Using Hessian updating to increase the efficiency of a Hessian based predictor-corrector reaction path following method. *J Chem Theory and Comput*, 2005, 1, 61-69.
33. Hug C, Ulrich N, Schulze T, Brack W, Krauss M. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ Pollut*, 2014, 184, 25-32.
34. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Klinička i temeljna farmakologija, 11. izdanje. Zagreb, 2011, Medicinska naklada, str. 946.
35. Khetan SK, Collins TJ. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chem Rev*, 2007, 107, 2319-2364.
36. Klaster Andrija, 2011, <http://andrija.pharma.hr/Andrija/HOME.html>, pristupljeno 01.03.2016.
37. Klaster Isabella, 2007, <http://www.srce.hr/isabella>, pristupljeno 01.03.2016.
38. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Tehnol*, 2002, 36, 1202-1211.
39. Kosjek T, Perko S, Žigon D, Heath E. Fluorouracil in the environment: analysis, occurrence, degradation and transformation. *J Chromatogr A*, 2013, 1290, 62-72.
40. Kümmerer K, urednik. Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks. Berlin, 2008, Springer, str. 74.

41. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B*, 1988, 37, 785-89.
42. Levine WC, Stephenson WT, Craun, GF. Waterborne Disease Outbreaks, 1986-1988. *MMWR CDC Surveill Summ*, 1990, 39 (1), 1-13.
43. Li W, Tanumihardja J, Masuyama T, Korshin G. Examination of the kinetics of degradation of the antineoplastic drug 5-fluorouracil by chlorine and bromine. *J Haz Mat*, 2015, 282, 125–132.
44. Loos R, Gawlik BM, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ Pollut*, 2009, 157, 561-568.
45. Lu T, Chen F. Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. *J Comput Chem*, 2012, 33(5), 580-92.
46. Marenich AV, Cramer CJ, Truhlar DG. Universal solvation model based on solute electron density and a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *J Phys Chem B*, 2009, 113, 6378-96.
47. Markova N, Enchev V, Ivanova G. Tautomeric Equilibria of 5-Fluorouracil Anionic Species in Water. *J Phys Chem A*, 2010, 114, 13154–13162.
48. Miyashita O, Kasahara T, Matsumura K, Shimadzu H, Takamoto M, Hashimoto N. Studies on fluorinated pyrimidines. IV. Stereochemistry of 6-alkoxyl-5-fluoro-5,6-dihidouracils and 5-alkoxycarbonyl-5-fluoro-6-substituted-5,6-dihidroracils. *Chem Pharm Bull*, 1982, 36(7), 2333-2341.
49. Møller C, Plesset MS. Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Phys Rev*, 1934, 46, 618-22.
50. Perdew JP, Burke K, Ernzerhof M. Generalized gradient approximation made simple. *Phys Rev Lett*, 1996, 77, 3865-68.
51. Pliego JR Jr. Basic hydrolysis of formamide in aqueous solution: A reliable theoretical calculation of the activation free energy using the cluster-continuum model. *Chem Phys*, 2004, 306, 273-280.
52. Pople JA, Nesbet RK. Self-Consistent Orbitals for Radicals. *J Chem Phys*, 1954, 22, 571-72.
53. Pople JA, Binkley JS, Seeger R. Theoretical Models Incorporating Electron Correlation. *Int J Quantum Chem*, 1976, Y-10, 1-19.
54. Pople JA, Seeger R, Krishnan R. Variational Configuration Interaction Methods and Comparison with Perturbation Theory. *Int J Quantum Chem*, 1977, Y-11, 149-63.

55. Pople JA, Gill PMW, Johnson BG. Kohn-Sham density-functional theory within a finite basis set. *Chem Phys Lett*, 1992, 199, 557-560.
56. OECD, eChemPortal. OECD: <http://www.echemportal.org>.
57. QSAR Toolbox. <http://www.qsartoolbox.org>.
58. Roothaan CCJ. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev Mod Phys*, 1951, 23, 69.
59. Sardo M, Ruano C, Castro JL, López-Tocón I, Soto J, Ribeiro-Claro P, Otero JC. Surface-enhanced Raman scattering of 5-fluorouracil adsorbed on silver nanostructures. *Phys Chem Chem Phys*, 2009, 11, 7437-7443.
60. Scalmani G, Frisch MJ. Continuous surface charge polarizable continuum models of solvation. I. General formalism. *J Chem Phys*, 2010, 132, 114110.
61. Schwarzbauer J, Ricking M. Non-target screening analysis of the river water as compound-related base for monitoring measures. *Environ Sci Pollut Res*, 2010, 17, 934-947.
62. Sharma VK. Oxidative transformations of environmental pharmaceuticals by Cl<sub>2</sub>, ClO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, and Fe(VI): Kinetics assessment. *Chemosphere*, 2008, 73, 1379-1386.
63. Soufan M, Deborde M, Legube B. Aqueous chlorination of diclofenac: Kinetic study and transformation products identification. *Water research*, 2012, 46, 3377-3386.
64. Spinworks 4.2.0.0., Marat K, University of Manitoba, 2015.
65. Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods. I. Method. *J Comp Chem*, 1989, 10, 209-20.
66. Stover EL, Haas CN, Rakness KL, Scheible, OK. *Design Manual: Municipal Wastewater Disinfection*. Cincinnati, 1986, US Environmental Protection Agency.
67. Šakić D, Šonjić P, Tandarić T, Vrčak V. Chlorination of N - Methylacetamide and Amide-Containing Pharmaceuticals. Quantum-Chemical Study of the Reaction Mechanism. *J Phys Chem A*, 2014, 118, 2367-2376.
68. Šonjić P, Tandarić, T; Šakić, D, Vrčak, V. Utjecaj supstituenata na otpornost derivata barbiturne kiseline na kloriranje hipoklornom kiselinom. Kvantno-kemijska studija. XXIV. HRVATSKI SKUP KEMIČARA I KEMIJSKIH INŽENJERA, *Knjiga sažetaka*. Zagreb, 2015, HDKI, HKD, 2015, 68-68.
69. Tchobanoglous G, Franklin BL, Stensel HD. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* 4th Edition. New York, 2003, Mc Graw Hill, str. 1300.

70. Tee O, Banerjee S. Mechanisms of bromination of uracil derivatives. Formation of adducts in acidic aqueous solutions and their dehydration to 5-bromouracils. *Can J Chem*, 1979, 57, 626-634.
71. Tee O, Berks CG. Mechanisms of Bromination of Uracil Derivatives. 5. Reaction of Uracil and 5-Bromouracil via Their Anions in Weakly Acidic Aqueous Solution. *J Org Chem*, 1980, 45, 830-835.
72. Terzić S, Senta I, Ahel M, Gros M, Petrović M, Barcelo D, Müller J, Knepper T, Marti I, Ventura F, Jovančić P, Jabučar D. Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Sci Total Environ*, 2008, 399, 66-77.
73. Tissandier MD, Cowen KA, Feng WY, Gundlach E, Cohen MH, Earhart AD, Coe JV. The Proton's Absolute Aqueous Enthalpy and Gibbs Free Energy of Solvation from Cluster-Ion Solvation Data. *J Phy Chem A*, 1998, 102, 7787-7794.
74. Voudrias E, Reinhard M. Reactivities of hypochlorous and hypobromous acid, chlorine monoxide, hypobromous acidium ion, chlorine, bromine, and bromine chloride in electrophilic aromatic substitution reactions with p-xylene in water. *Environ Sci Teh*, 1988, 22, 1049-56.
75. Wachters AJH. Gaussian basis set for molecular wavefunctions containing third-row atoms. *J Chem Phys*, 1970, 52, 1033.
76. White, GC. *Handbook of Chlorination*, 5th edition. New York, 2005, Wiley, str. 554.
77. WHO Model List of Essential Medicines, 19th List. 2015., [www.who.int](http://www.who.int), pristupljeno 15. 2. 2016.
78. Zhao Y, Truhlar DG. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals. *Theor Chem Acc*, 2008, 120, 215-41.

## 7. SAŽETAK

### SAŽETAK

Pojava lijekova u okolišu u posljednjih je dvadesetak godina postala goruća ekološka tema. Jedan od takvih farmaceutika je 5-fluorouracil (5-FU), antimetabolit koji se nalazi u okolišu u koncentracijama i do 63 ng/L. Eksperimentalno je pokazano da se tijekom postupka kloriranja, koji predstavlja jednu od najučestalijih metoda obrade otpadnih voda, 5-FU pregrađuje u klorhidrinski produkt **3a**. Strukturne karakteristike dobivenog spoja određene su  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. Kvantnokemijskim metodama istražen je reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU. Korišten je M062X funkcional uz 6-311+G(d) bazni skup. Solvatacijski efekti opisani su implicitnim SMD solvatacijskim modelom, te korištenjem optimalnog broja eksplicitnih molekula otapala ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Pokazano je da dolazi do kloriranja na C5 položaju u pirimidinskom prstenu 5-FU. Dvostupanjska reakcija u kojoj u prvom koraku dolazi do adicije  $\text{Cl}^+$  na anion **1-N1**, uz nastanak iminskog intermedijera **4**, određena je kao najvjerojatniji reakcijski mehanizam. Energjska barijera za reakciju adicije kloronijevog iona (preko prijelaznog stanja **TS<sub>1</sub>**) iznosi 106,8 kJ/mol. U drugom reakcijskom koraku dolazi do adicije vode na iminski intermedijer ( $\Delta G^\ddagger = 26,7$  kJ/mol) uz nastanak klorhidrinskog produkta **3a**. Rezultati dobiveni kvantno-kemijskim metodama u skladu su s eksperimentalno dobivenim podacima. Dobiveni rezultati ključni su za poznavanje ekološke sudbine 5-FU.

## SUMMARY

In the last twenty years, the occurrence of pharmaceuticals in environment has become a burning ecological issue. One of these pharmaceuticals is 5-fluorouracil (5-FU), antimetabolite drug which has been found in the environment in concentrations up to 63 ng/L. In this work, it is experimentally shown that during the chlorination process, which is one of the most common method for wastewater treatment, the 5-FU yields chlorohydrine product **3a**. Structural characteristics of **3a** are determined using  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Reaction mechanism of chlorination of 5-fluorouracil is investigated using quantum chemistry methods. M062X functional with 6-311+G(d) basis set is applied. The solvent effects are described by the implicit SMD solvation model, using the optimal number of the explicit solvent molecules ( $\text{H}_2\text{O}$ ). It has been shown that 5-FU is chlorinated at the C5 position in the pyrimidine ring. The two steps reaction in which the first step is the addition of  $\text{Cl}^+$  on **1-N1** anion, yielding the imine intermediate **4**, is determined as the most possible reaction mechanism. The energy barrier which corresponds to the addition of chloronium ion (through the transition state structure **TS<sub>I</sub>**) is 106,8 kJ/mol. The addition of water on the imine intermediate ( $\Delta G^\ddagger = 26,7$  kJ/mol), which results in the chlorohydrine **3a**, is the second reaction step. The results obtained with quantum chemical methods are in agreement with experimental data. Results of these study play a key role in predicting the ecological fate of 5-FU.

## 8. PRILOZI

### 8.1.GEOMETRIJE LOCIRANIH MINIMUMA I PRIJELAZNIH STANJA

#### 5-FU

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -1.99915100 | 1.33913000  | 0.24052500  |
| C  | -2.85943200 | -0.93686600 | 0.17489400  |
| C  | -1.70102100 | -1.40970600 | -0.30174600 |
| C  | -0.57811400 | -0.51891200 | -0.55190500 |
| H  | -3.70824200 | -1.57946800 | 0.36989900  |
| H  | -0.02945600 | 1.46675900  | -0.35505100 |
| N  | -3.00530800 | 0.40114400  | 0.43357200  |
| O  | -2.15127000 | 2.50963100  | 0.47437400  |
| O  | 0.49756600  | -0.90355800 | -0.99783300 |
| N  | -0.81966100 | 0.79574100  | -0.24568400 |
| F  | -1.52716500 | -2.70313900 | -0.56443100 |
| O  | 2.71497000  | -1.46483900 | 0.50462000  |
| O  | 2.91809300  | 0.57095600  | -1.59774600 |
| H  | 2.13068400  | 0.01934400  | -1.71090700 |
| H  | 3.49382500  | 0.07536100  | -1.00457200 |
| O  | 1.34738800  | 2.44976500  | -0.50703300 |
| H  | 1.35706000  | 3.35023800  | -0.83723600 |
| H  | 2.09801200  | 1.95095500  | -0.88875600 |
| Cl | 2.19639900  | -0.27010800 | 1.59185400  |
| H  | 1.92642000  | -1.64715100 | -0.04069600 |
| H  | -3.87547000 | 0.76832400  | 0.78879600  |

### 1-N1

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -0.50754800 | 1.72016600  | -0.31248500 |
| C  | -2.23622300 | 0.72576900  | 0.81253800  |
| C  | -2.16972900 | -0.44468500 | 0.10981600  |
| C  | -1.19345900 | -0.60882700 | -0.91298200 |
| H  | -2.98609700 | 0.79882100  | 1.59966200  |
| H  | 0.22756600  | 0.53949600  | -1.82591900 |
| N  | -1.44646100 | 1.79780400  | 0.64916700  |
| O  | 0.35248200  | 2.58273700  | -0.55134100 |
| O  | -0.93675100 | -1.62372600 | -1.57266600 |
| N  | -0.49042600 | 0.56587200  | -1.11394100 |
| F  | -2.98252500 | -1.48559200 | 0.40685200  |
| O  | 2.51136200  | -1.09740500 | 1.23098700  |
| O  | 2.57835200  | 1.03316900  | -0.98875000 |
| H  | 1.89607100  | 1.72652200  | -0.85437900 |
| H  | 2.90878900  | 0.80255800  | -0.11267200 |
| O  | 1.87003500  | -1.63202900 | -1.24045700 |
| H  | 0.93139600  | -1.80434600 | -1.44043300 |
| H  | 2.06443000  | -0.70280200 | -1.46118800 |
| Cl | 1.10239600  | -0.32417800 | 1.77295100  |
| H  | 2.25595600  | -1.48113900 | 0.34302800  |

### 1-N3

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.04900100  | -0.91135300 | 1.09341300  |
| C  | -1.54448200 | -0.87735500 | -0.67378600 |
| C  | -2.26166200 | 0.17806300  | 0.07203900  |
| C  | -1.83697300 | 0.59446700  | 1.26848700  |
| H  | -0.27542100 | 0.40377700  | 2.62633500  |
| N  | -0.40043200 | -1.35066500 | -0.08663000 |
| O  | 1.12468200  | -1.26644800 | 1.61858300  |
| N  | -0.72289100 | 0.00747000  | 1.81564100  |
| F  | -3.36841800 | 0.70923200  | -0.47717700 |
| O  | 2.32798800  | 2.27456200  | -0.57839500 |
| O  | 1.98150600  | -2.51369100 | -0.98372600 |
| H  | 2.08309400  | -2.81298900 | -0.07238700 |
| H  | 1.05735800  | -2.18138300 | -0.98139100 |
| O  | 3.05949700  | -0.16742700 | -0.02232700 |
| H  | 2.53518800  | -0.44309100 | 0.75267400  |
| H  | 2.84978200  | -0.86718600 | -0.66923600 |
| Cl | 0.64611900  | 2.11147700  | -0.45570400 |
| H  | 2.67053600  | 1.34653900  | -0.41442200 |
| O  | -1.97116000 | -1.27570300 | -1.74690500 |
| H  | -2.34093700 | 1.36522200  | 1.83816400  |

## 2

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -1.26296700 | 1.07693200  | 0.45785900  |
| C  | 0.00263600  | 1.25931200  | -0.24121900 |
| C  | -2.16781500 | -0.05968600 | 0.03019600  |
| N  | 0.35220200  | 0.39229400  | -1.27159100 |
| N  | -1.55470500 | -0.91417600 | -0.86237800 |
| C  | -0.34531400 | -0.75161700 | -1.57200100 |
| O  | -3.28282000 | -0.20273900 | 0.44337800  |
| O  | 0.00731300  | -1.56820800 | -2.37789200 |
| O  | -0.09105300 | 0.69598700  | 1.11522400  |
| H  | 0.48638200  | 2.22669900  | -0.26702200 |
| H  | 1.27384600  | 0.52622300  | -1.68480700 |
| H  | -2.08301300 | -1.73465400 | -1.13491500 |
| H  | 0.40544300  | -1.14493100 | 1.35299300  |
| Cl | 1.10209700  | -2.23993100 | 1.28932900  |
| O  | 2.74491700  | 1.68638000  | -1.28205900 |
| H  | 3.03673200  | 1.38854500  | -0.40206000 |
| H  | 3.49044700  | 2.05837900  | -1.75687600 |
| O  | 2.86324900  | 0.61412300  | 1.20327400  |
| H  | 2.16516600  | 0.90500000  | 1.79909700  |
| H  | 2.86432200  | -0.34964300 | 1.22417700  |
| F  | -1.91661500 | 2.10026700  | 1.00268700  |

## 4

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.91636000  | -0.87300400 | 0.68039500  |
| C  | -0.29764700 | -0.39296200 | -1.23229600 |
| C  | -1.48466200 | 0.07359800  | -0.42846800 |
| C  | -1.08229100 | 0.56012400  | 0.96229600  |
| N  | 0.76338200  | -0.87255100 | -0.73412600 |
| O  | 1.80854000  | -1.48257300 | 1.20572600  |
| O  | -1.71718800 | 1.34531200  | 1.59821000  |
| N  | 0.03396000  | -0.10496100 | 1.43014900  |
| H  | 2.89616500  | -1.07277000 | -1.38894600 |
| H  | 0.29335500  | 0.05010600  | 2.39681400  |
| H  | -0.41263700 | -0.33385700 | -2.31355500 |
| O  | 0.29753700  | 2.04749000  | -0.75255000 |
| H  | -0.01980600 | 2.95304700  | -0.72799700 |
| O  | 2.77524600  | 1.45138300  | 0.15808600  |
| H  | 3.38098400  | 1.91947100  | 0.73641100  |
| H  | 1.23044900  | 2.02395100  | -0.46618900 |
| O  | 3.69329900  | -0.88388400 | -0.87631800 |
| H  | 3.60864000  | -1.44927200 | -0.09867900 |
| H  | 3.25548100  | 0.69779600  | -0.24566200 |
| F  | -2.17982700 | 1.00980500  | -1.08795100 |
| Cl | -2.55091900 | -1.35661700 | -0.20762300 |

**3a**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.81485400  | -1.24166900 | 0.24452900  |
| C  | -0.04047900 | 0.88502500  | -0.56498400 |
| C  | -1.45202400 | 0.44814200  | -0.17179400 |
| C  | -1.42501900 | -0.48608100 | 1.04807200  |
| N  | 0.79567600  | -0.25159200 | -0.70051300 |
| O  | 1.70409600  | -2.04715400 | 0.36823700  |
| O  | -2.30471700 | -0.50911300 | 1.85854700  |
| N  | -0.31205100 | -1.29080300 | 1.08467000  |
| H  | 1.69567800  | -0.15234300 | -1.19231100 |
| H  | -0.27323900 | -1.99045100 | 1.81547000  |
| H  | -0.07794400 | 1.43075100  | -1.51091600 |
| O  | 0.45875900  | 1.71868200  | 0.47721300  |
| H  | -0.06870200 | 2.52406900  | 0.54993700  |
| O  | 3.23650000  | 1.31065300  | 0.90491300  |
| H  | 3.47121300  | 1.05665600  | 1.80033400  |
| H  | 2.30043600  | 1.56001400  | 0.89423400  |
| O  | 3.48055500  | -0.21169900 | -1.37748500 |
| H  | 3.64853400  | -1.12703400 | -1.13084500 |
| H  | 3.66828100  | 0.32919400  | -0.59052100 |
| F  | -2.16564000 | 1.55878200  | 0.14026200  |
| Cl | -2.24967200 | -0.38744700 | -1.51606900 |

**3b**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.97839200  | 1.35731500  | 0.38049800  |
| C  | 0.05195000  | -0.86235300 | 0.22809200  |
| C  | -1.36070100 | -0.28835300 | 0.37269600  |
| C  | -1.43975200 | 1.14166200  | -0.21146700 |
| N  | 0.96653100  | 0.06165400  | 0.81249200  |
| O  | 1.94808400  | 2.07918600  | 0.39606900  |
| O  | -2.43580000 | 1.61251400  | -0.67674100 |
| N  | -0.25340500 | 1.83099300  | -0.09630800 |
| H  | 1.87400200  | -0.33524000 | 1.06841800  |
| H  | -0.24910600 | 2.78857500  | -0.42615800 |
| H  | 0.11975500  | -1.81329200 | 0.76046000  |
| O  | 0.37534000  | -1.00548000 | -1.14455600 |
| H  | -0.13677400 | -1.71854100 | -1.54484900 |
| O  | 3.15423300  | -0.12919100 | -1.41622100 |
| H  | 3.14853800  | 0.77765100  | -1.08560200 |
| H  | 2.24046500  | -0.35455800 | -1.64063800 |
| O  | 3.14395000  | -1.64418200 | 0.80956200  |
| H  | 3.88468900  | -2.02446300 | 1.28550700  |
| H  | 3.45750700  | -1.26294800 | -0.03213100 |
| Cl | -2.54333400 | -1.34318800 | -0.41317600 |
| F  | -1.66223000 | -0.20710300 | 1.69576300  |

**3c**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| N  | 0.58209300  | -0.75449900 | -1.47586900 |
| C  | -0.04562600 | 0.34800500  | -0.82678600 |
| H  | -0.10180900 | 1.20845500  | -1.48971400 |
| C  | 0.77781200  | 0.72536500  | 0.40265200  |
| C  | 1.10397800  | -0.50042400 | 1.27620500  |
| O  | 1.38182500  | -0.38899000 | 2.43942100  |
| N  | 1.14117500  | -1.68673600 | 0.58845100  |
| H  | 1.43361400  | -2.50972600 | 1.10132300  |
| C  | 0.97606600  | -1.87886700 | -0.79495600 |
| O  | 1.20425800  | -2.94248800 | -1.30558900 |
| H  | 0.35192300  | -0.92632000 | -2.44442400 |
| O  | 1.95967500  | 1.30611000  | -0.02548700 |
| O  | 0.34133400  | 3.35295600  | -1.33210900 |
| H  | 2.55747700  | 1.39784700  | 0.72955400  |
| H  | 1.18424000  | 3.10748000  | -0.93437600 |
| O  | -4.40587500 | -0.60669500 | 0.50309400  |
| Cl | -1.73217500 | -0.02891500 | -0.30219000 |
| H  | -4.51346700 | -1.16556700 | 1.27709400  |
| H  | -0.19031300 | 3.75341200  | -0.63848700 |
| F  | 0.09929100  | 1.62353100  | 1.17075900  |
| H  | -4.95431700 | 0.17121600  | 0.63401600  |

**3d**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 1.67321000  | -1.31314500 | 0.12586000  |
| C  | 0.72706700  | 0.59147100  | -1.08280800 |
| C  | -0.75556200 | -1.20057200 | -0.39354700 |
| H  | 0.22545400  | -2.69989400 | 0.52896400  |
| O  | -1.86593900 | -1.62818200 | -0.18795700 |
| N  | 0.39144000  | -1.85520800 | -0.00488900 |
| O  | -3.14199000 | 0.09904600  | 1.69434200  |
| O  | -0.40103800 | 0.47991100  | 1.64038300  |
| H  | 0.01792000  | 1.34956000  | 1.60407600  |
| H  | -1.33536200 | 0.57667700  | 1.88178000  |
| O  | 1.39373300  | 2.62647000  | 1.04590900  |
| H  | 1.50851200  | 3.49470400  | 1.44225800  |
| Cl | -1.85444400 | 0.95111200  | -1.42533200 |
| H  | -3.00849500 | -0.54724500 | 0.98520300  |
| N  | -0.50255100 | -0.04269200 | -1.13555900 |
| C  | 1.77353500  | -0.00313600 | -0.51162100 |
| F  | 2.95743100  | 0.61783400  | -0.44045500 |
| H  | 2.26081100  | 2.20715700  | 1.01766600  |
| O  | 2.56485300  | -1.89392900 | 0.68627300  |
| H  | -3.67399000 | -0.31931600 | 2.37517400  |
| H  | 0.78514800  | 1.58001400  | -1.51614900 |

**TS<sub>E</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -1.06034500 | -0.31808200 | 1.04198600  |
| C  | -0.10313100 | 0.68808100  | 1.17758700  |
| C  | -2.15803700 | -0.15522500 | 0.06415800  |
| N  | 0.07434100  | 1.56002900  | 0.19961800  |
| N  | -1.86069900 | 0.81737500  | -0.88982700 |
| C  | -0.76173100 | 1.65227600  | -0.93374300 |
| O  | -3.17268700 | -0.79303900 | 0.05626900  |
| O  | -0.53396200 | 2.42435600  | -1.81991700 |
| O  | 0.10658400  | -1.32146300 | -0.02885600 |
| H  | 0.59978900  | 0.70082600  | 2.00297700  |
| H  | 0.93241700  | 2.14209000  | 0.21511800  |
| H  | -2.50936200 | 0.90565800  | -1.66298800 |
| H  | -0.10526500 | -2.16940100 | 0.40061900  |
| Cl | 1.42525400  | -2.43007100 | -1.31025300 |
| O  | 2.57447800  | 2.36340400  | 0.67176700  |
| H  | 2.91495200  | 1.44821700  | 0.64154700  |
| H  | 3.20972400  | 2.95997600  | 0.27086100  |
| O  | 2.76793000  | -0.30631400 | 0.75109300  |
| H  | 3.45591300  | -0.86928400 | 1.11589900  |
| H  | 2.30570400  | -0.83924000 | 0.08089000  |
| F  | -1.32977500 | -1.08303400 | 2.09978400  |

**TS<sub>o</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 1.92034900  | 0.28518300  | -0.58105300 |
| C  | 1.98154900  | -0.90249400 | 0.38531800  |
| O  | 2.97493200  | -1.28536200 | 0.91916500  |
| N  | 0.73333300  | -1.48652500 | 0.62895000  |
| H  | 0.69764300  | -2.18896200 | 1.35969600  |
| C  | -0.47103600 | -1.17641400 | 0.05217800  |
| O  | -1.51077100 | -1.68968500 | 0.36118400  |
| Cl | -0.63996900 | 1.61102800  | 1.59188200  |
| O  | 1.64438200  | 1.46792700  | -0.01558400 |
| H  | 0.60668900  | 1.57351200  | 0.82579000  |
| F  | 3.05075500  | 0.29791400  | -1.32958700 |
| H  | -3.44280400 | -1.40025000 | 0.11583900  |
| O  | -4.16063300 | -0.89705900 | -0.29081300 |
| H  | -4.99496500 | -1.15397600 | 0.10622000  |
| O  | -2.64647900 | 1.14428900  | -1.12062700 |
| H  | -3.40679500 | 0.57023800  | -0.90300300 |
| H  | -2.48532600 | 1.71012000  | -0.35400500 |
| H  | 0.63328300  | 1.10429200  | -2.17568900 |
| C  | 0.67301200  | 0.36954000  | -1.37994100 |
| N  | -0.42545600 | -0.21228700 | -0.99258300 |
| H  | -1.37485500 | 0.23224300  | -1.21075000 |

**TS<sub>A</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| N  | -0.85074800 | -1.36223900 | 0.94691400  |
| C  | 0.06267600  | -0.27052300 | 0.75791000  |
| H  | 0.59563300  | -0.00648300 | 1.66220900  |
| C  | -0.41187700 | 0.81367600  | -0.03245000 |
| C  | -1.84262300 | 0.78045500  | -0.53266000 |
| O  | -2.33978700 | 1.79693300  | -0.96842800 |
| N  | -2.46909900 | -0.41215800 | -0.40679800 |
| H  | -3.40783400 | -0.48770800 | -0.78027000 |
| C  | -2.01650800 | -1.55647800 | 0.30005500  |
| O  | -2.68268100 | -2.56646600 | 0.30028500  |
| H  | -0.45437900 | -2.21200000 | 1.32401700  |
| O  | -0.38040600 | 2.19204800  | 0.78001400  |
| O  | 2.14696500  | 2.09832400  | 0.85711000  |
| H  | -0.78893200 | 2.86256700  | 0.19939700  |
| H  | 0.61836700  | 2.35704200  | 0.90423800  |
| O  | 3.74902900  | -1.54176600 | -0.71365700 |
| H  | 2.77613400  | 2.15218900  | 1.58133700  |
| Cl | 2.09531200  | -1.01673100 | -0.16277600 |
| H  | 3.59215300  | -2.02142600 | -1.53692600 |
| H  | 2.39852700  | 1.34995000  | 0.28931100  |
| F  | 0.39933200  | 1.25285700  | -1.07296100 |

**TS<sub>I</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.08639600  | 1.53463200  | -1.08391800 |
| C  | 1.95857200  | 0.22948200  | -1.12396300 |
| C  | 1.68280800  | -0.26819800 | 0.18601300  |
| C  | 0.89246400  | 0.60454400  | 1.05321000  |
| H  | 2.83404600  | -0.17448800 | -1.63410100 |
| H  | -0.69437100 | 1.85807800  | 0.80051200  |
| N  | 1.20609600  | 1.05809900  | -1.77316500 |
| O  | -0.87516900 | 2.01475700  | -1.64862900 |
| O  | 0.81922800  | 0.53225700  | 2.26558800  |
| N  | 0.12435300  | 1.49011300  | 0.31165600  |
| F  | 2.67128700  | -0.97588200 | 0.78727700  |
| O  | -1.59308800 | -2.63073900 | -0.63674000 |
| O  | -2.83626000 | -0.11989800 | -0.43157100 |
| H  | -2.36984700 | 0.46480000  | -1.04265300 |
| H  | -2.50147400 | -1.02699500 | -0.57367500 |
| O  | -2.15849300 | 1.07682700  | 1.97631200  |
| H  | -1.46154100 | 0.56387200  | 2.40246100  |
| H  | -2.48765700 | 0.55949400  | 1.21441100  |
| Cl | 0.02639400  | -1.62808600 | -0.26684400 |
| H  | -1.69378200 | -3.21024100 | 0.12672500  |

**TS<sub>r</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -0.48018300 | -1.76403600 | -0.54275800 |
| C  | -2.03936900 | 0.03152900  | -0.99868400 |
| C  | -1.65241200 | 0.61510200  | 0.21025500  |
| C  | -1.00667500 | -0.27168900 | 1.24025500  |
| H  | -2.74194700 | 0.52254100  | -1.66428600 |
| H  | 1.22082800  | -1.60700500 | 0.99875100  |
| N  | -1.48755100 | -1.10916300 | -1.36244200 |
| O  | 0.19029600  | -2.61002400 | -1.10563400 |
| O  | -0.99503400 | 0.05190000  | 2.40168000  |
| N  | -0.37020700 | -1.37647300 | 0.73013000  |
| F  | -2.39452800 | 1.63299600  | 0.65475800  |
| O  | 1.98472700  | 2.07063300  | -1.02690000 |
| O  | 3.21072900  | 0.47608600  | 0.39182600  |
| H  | 3.46410200  | 0.86265700  | 1.23478700  |
| H  | 2.72561600  | 1.20012300  | -0.22811400 |
| O  | 2.21002400  | -1.68103100 | 0.76013900  |
| H  | 2.22708200  | -2.27721800 | -0.00135100 |
| H  | 2.70996000  | -0.57453500 | 0.53556800  |
| Cl | 0.16418800  | 1.46615400  | -0.59001900 |
| H  | 2.02908000  | 3.01532500  | -0.84241100 |
| H  | -1.60495700 | -1.48995100 | -2.29254000 |

**TS<sub>r</sub>'**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | -0.14018100 | -1.68656100 | -0.66605100 |
| C  | -2.08739500 | -0.40039900 | -0.46193900 |
| C  | -1.39513800 | 0.36473700  | 0.65363000  |
| C  | -0.42791100 | -0.40209100 | 1.37619300  |
| H  | 1.07738800  | -1.69976500 | 1.12379500  |
| N  | -1.32165000 | -1.30928400 | -1.12047000 |
| O  | 0.75397500  | -2.29952500 | -1.22095100 |
| N  | 0.17761700  | -1.36620200 | 0.76143100  |
| F  | -2.20552000 | 1.11166900  | 1.43769200  |
| O  | 1.64533400  | 2.54580000  | -1.05299000 |
| O  | 2.84009200  | 0.20248200  | -0.72991800 |
| H  | 2.31502100  | -0.38441100 | -1.28760300 |
| H  | 2.48895300  | 1.12990300  | -0.86525400 |
| O  | 2.72509700  | -0.97260900 | 1.63866200  |
| H  | 3.56116300  | -1.42450300 | 1.76769300  |
| H  | 2.81031800  | -0.44071900 | 0.80101500  |
| Cl | 0.02572000  | 1.55420500  | -0.15437400 |
| H  | 1.83481400  | 3.30205600  | -0.48837000 |
| O  | -3.24709000 | -0.14143300 | -0.71421600 |
| H  | -0.10250300 | -0.11250200 | 2.37143400  |

**TS<sub>trans</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 0.81473600  | 1.28104000  | -0.13082000 |
| C  | -0.02351300 | -0.71706700 | 0.70246400  |
| C  | -1.41905500 | -0.42773700 | 0.16219900  |
| C  | -1.36526600 | 0.48532400  | -1.06816000 |
| N  | 0.85214000  | 0.31144600  | 0.81420300  |
| O  | 1.68111000  | 2.12348600  | -0.28343600 |
| O  | -2.20486000 | 0.45822900  | -1.92465800 |
| N  | -0.28506200 | 1.31836800  | -1.04053700 |
| H  | 2.65593600  | 0.38586900  | 1.29122100  |
| H  | -0.21642500 | 2.01431200  | -1.77270100 |
| H  | -0.06999800 | -1.35842600 | 1.58336800  |
| O  | 0.52077200  | -1.70798400 | -0.44194100 |
| H  | 0.13887100  | -2.59524900 | -0.42315500 |
| O  | 2.92930400  | -1.56027100 | -0.61685200 |
| H  | 3.26143500  | -1.44678100 | -1.51181600 |
| H  | 1.64929500  | -1.66341400 | -0.52316700 |
| O  | 3.58008800  | 0.32618000  | 0.95906100  |
| H  | 3.71326700  | 1.17676400  | 0.52281400  |
| H  | 3.30133400  | -0.81712100 | -0.01709100 |
| F  | -2.03479500 | -1.59538700 | -0.15874600 |
| Cl | -2.36369600 | 0.37690300  | 1.43130000  |

**TS<sub>cis</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 1.07277500  | 1.27333700  | 0.07866100  |
| C  | -0.04244100 | -0.65382900 | 0.73255600  |
| C  | -1.40498900 | -0.01842200 | 0.45080600  |
| C  | -1.31152400 | 1.05139700  | -0.65465100 |
| N  | 1.01243300  | 0.17898500  | 0.87694600  |
| O  | 2.06400100  | 1.96470600  | -0.06295700 |
| O  | -2.23346000 | 1.35444000  | -1.35962000 |
| N  | -0.08029400 | 1.63865000  | -0.67841900 |
| H  | 2.85852100  | -0.11825400 | 1.17648700  |
| H  | 0.04415900  | 2.42708200  | -1.30175600 |
| H  | -0.12018600 | -1.41251700 | 1.51167600  |
| O  | 0.19826600  | -1.52851100 | -0.61013700 |
| H  | -0.30319800 | -2.35388600 | -0.65443000 |
| O  | 2.58854800  | -1.75779600 | -1.02162000 |
| H  | 2.88535100  | -1.58676200 | -1.91938500 |
| H  | 1.27628100  | -1.64724500 | -0.80131300 |
| O  | 3.72146600  | -0.27106300 | 0.73494500  |
| H  | 3.95765800  | 0.60361800  | 0.40307800  |
| H  | 3.14029500  | -1.20210700 | -0.37334800 |
| Cl | -2.63844900 | -1.23203800 | 0.06395800  |
| F  | -1.77819000 | 0.61135100  | 1.59921100  |

**TS<sub>N1</sub>**

|    |             |             |             |
|----|-------------|-------------|-------------|
| C  | 2.95321400  | 0.19753000  | -0.01286900 |
| C  | 0.57191000  | 0.74851300  | -0.00875700 |
| C  | 1.17767800  | -1.59355200 | -0.00635600 |
| H  | 3.19977300  | -1.83772800 | -0.01281500 |
| O  | 0.93432700  | -2.77754200 | 0.00280900  |
| N  | 2.48986400  | -1.11760800 | -0.01384400 |
| O  | -3.74845800 | -1.26832700 | 0.00987000  |
| O  | -4.16239500 | 1.11171700  | -0.10205000 |
| H  | -4.65521000 | 1.31773800  | -0.89963000 |
| H  | -3.99813000 | -0.12829100 | -0.04206800 |
| O  | -1.95057600 | 2.42609900  | 0.07938200  |
| H  | -2.15540500 | 3.11863900  | 0.71099500  |
| H  | -2.80501900 | 1.88571300  | -0.02338800 |
| Cl | -1.47806600 | -0.99094100 | 0.00140700  |
| H  | -4.02359200 | -1.60737000 | 0.86535600  |
| N  | 0.24177800  | -0.58313900 | -0.00944600 |
| C  | 1.85749900  | 1.14458200  | -0.00969000 |
| F  | 2.18278700  | 2.44649800  | -0.00500400 |
| H  | -0.27216900 | 1.44731100  | 0.00007500  |
| O  | 4.14066300  | 0.45234100  | -0.01355400 |

## 9. ŽIVOTOPIS

Tana Tandarić

Datum rođenja: 6. lipnja 1992.

### OBRAZOVANJE

---

**Farmaceutsko-  
biokemijski fakultet**

- Integrirani diplomski studij medicinske biokemije

**Sveučilište u  
Zagrebu**

**2011.-**

**XV. gimnazija  
Zagreb**

**2007.-2011.**

- sudjelovanje na državnom LIDRANU u kategoriji video-filmsko stvaralaštvo
- završena matematička gimnazija s odličnim uspjehom
- položena Državna matura s vrlo dobrim uspjehom

**OŠ Murterski škoi  
Murter**

**1999.-2007.**

- sudjelovanje na državnom natjecanju iz biologije sa istraživačkim radom „Kartiranje nekih endemičnih biljaka na Kornatima.“
- sudjelovanje u GLOBE projektu
- završena osnovna škola s odličnim uspjehom

### ZNANSTVENO-STRUČNI RAD I SUDJELOVANJA

---

**Zavod za organsku  
kemiju  
Farmaceutsko-  
biokemijskog  
fakulteta, Zagreb**

**2013.-**

- Sudjelovanje na projektu pod vodstvom dr. sc. Valerija Vrčeka
  - primjena računalnih i kvantnokemijskih metoda
  - analiza znanstvenih radova
  - istraživanje mehanizama i termodinamike kemijskih reakcija

## Simpoziji

- održano usmeno izlaganje na 3. Simpoziju studenata farmacije i medicinske biokemije (FARMEBS) na temu „Zašto se barbiturati teško kloriraju? Kvantno kemijska studija.“
- održano usmeno izlaganje na 1. Simpoziju studenata kemičara (SISK) na temu „Utjecaj supstituenata na N3 i C5 položaju na reaktivnost barbiturne s hipoklornom kiselinom. Kvantno kemijska studija.“
- usmeno priopćenje na 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera na temu „Utjecaj supstituenata na otpornost derivata barbiturne kiseline na kloriranje hipoklornom kiselinom. Kvantno-kemijska studija.“
- postersko priopćenje na 5. Hrvatskom kongresu farmacije: „Utjecaj supstituenata na reaktivnost derivata barbiturne kiseline s hipoklorastom kiselinom“
- volontiranje i pasivno sudjelovanje na međunarodnom simpoziju o glikokonjugatima „GLYCO 23“
- poster „Hypochlorous acid – hydroxylation vs chlorination“ na Europskom simpoziju organske reaktivnosti (European symposium on Organic Reactivity, Kiel, Germany 30.8. – 4.9.2015.)
- članica organizacijskog odbora 2. Simpozija studenata kemičara (SISK)

## Znanstveni radovi

- Šakić D, Šonjić P, Tandarić T, Vrčec V. Chlorination of N-methylacetamide and amide-containing pharmaceuticals. Quantum-chemical study of the reaction mechanism. J Phys Chem A, 2014, 118, 2367-2376.

## Ljetne škole

- sudjelovanje na 12. Internacionalnoj školi biofizike Greta Pitaf – Mrzljak u Primoštenu (27.9.-6.10.2014.)

## Nagrade

- dobivena godišnja Dekanova nagrada za znanstveni rad „Chlorination of N-Methylacetamide and Amide-Containing Pharmaceuticals. Quantum-Chemical Study of the Reaction Mechanism.“ objavljen u znanstvenom časopisu Journal of Physical Chemistry A za akademsku godinu 2013./2014.
- dobivena godišnja Dekanova nagrada za studentski znanstveni rad „Kemijska sudbina antiepileptika u neutrofilima. In silico istraživanje reakcije s hipoklorastom kiselinom.“ za akademsku godinu 2014./2015.

## VJEŠTINE

---

---

**Jezici**

- Hrvatski - izvorna govornica
- Engleski - napredni
- Talijanski - napredni, prijelazni stupanj

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za organsku kemiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila

Tana Tandarić

#### SAŽETAK

Pojava lijekova u okolišu u posljednjih je dvadesetak godina postala goruća ekološka tema. Jedan od takvih farmaceutika je 5-fluorouracil (5-FU), antimetabolit koji se nalazi u okolišu u koncentracijama i do 63 ng/L. Eksperimentalno je pokazano da se tijekom postupka kloriranja, koji predstavlja jednu od najučestalijih metoda obrade otpadnih voda, 5-FU pregrađuje u klorhidrinski produkt **3a**. Strukturne karakteristike dobivenog spoja određene su  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. Kvantnokemijskim metodama istražen je reakcijski mehanizam kloriranja 5-FU. Korišten je M062X funkcional uz 6-311+G(d) bazni skup. Solvatacijski efekti opisani su implicitnim SMD solvatacijskim modelom, te korištenjem optimalnog broja eksplicitnih molekula otapala ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Pokazano je da dolazi do kloriranja na C5 položaju u pirimidinskom prstenu 5-FU. Dvostupanjska reakcija u kojoj u prvom koraku dolazi do adicije  $\text{Cl}^+$  na anion **1-N1**, uz nastanak iminskog intermedijera **4**, određena je kao najvjerojatniji reakcijski mehanizam. Energjska barijera za reakciju adicije kloronijevog iona (preko prijelaznog stanja **TS<sub>1</sub>**) iznosi 106,8 kJ/mol. U drugom reakcijskom koraku dolazi do adicije vode na iminski intermedijer ( $\Delta G^\ddagger = 26,7$  kJ/mol) uz nastanak klorhidrinskog produkta **3a**. Rezultati dobiveni kvantno-kemijskim metodama u skladu su s eksperimentalno dobivenim podacima. Dobiveni rezultati ključni su za poznavanje ekološke sudbine 5-FU.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 67 stranica, 24 grafičkih prikaza, 7 tablica i 78 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: 5-fluorouracil, hipoklorasta kiselina, NMR spektroskopija, računalna kemija

Mentor: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Valerije Vrček**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Davor Šakić**, viši asistent - poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Tin Weitner**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: travanj 2016.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medicinal biochemistry  
Department of organic chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Reaction mechanism of 5-fluorouracil chlorination

Tana Tandarić

#### SUMMARY

In the last twenty years, the occurrence of pharmaceuticals in environment has become a burning ecological issue. One of these pharmaceuticals is 5-fluorouracil (5-FU), antimetabolite drug which has been found in the environment in concentrations up to 63 ng/L. In this work, it is experimentally shown that during the chlorination process, which is one of the most common method for wastewater treatment, the 5-FU yields chlorohydrine product **3a**. Structural characteristics of **3a** are determined using  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. Reaction mechanism of chlorination of 5-fluorouracil is investigated using quantum chemistry methods. M062X functional with 6-311+G(d) basis set is applied. The solvent effects are described by the implicit SMD solvation model, using the optimal number of the explicit solvent molecules ( $\text{H}_2\text{O}$ ). It has been shown that 5-FU is chlorinated at the C5 position in the pyrimidine ring. The two steps reaction in which the first step is the addition of  $\text{Cl}^+$  on **1-N1** anion, yielding the imine intermediate **4**, is determined as the most possible reaction mechanism. The energy barrier which corresponds to the addition of chloronium ion (through the transition state structure **TS<sub>I</sub>**) is 106,8 kJ/mol. The addition of water on the imine intermediate ( $\Delta G^\ddagger = 26,7$  kJ/mol), which results in the chlorohydrine **3a**, is the second reaction step. The results obtained with quantum chemical methods are in agreement with experimental data. Results of these study play a key role in predicting the ecological fate of 5-FU.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 67 pages, 24 figures, 7 tables and 78 references. Original is in Croatian language.

Keywords: 5-fluorouracil, hypochlorous acid, NMR spectroscopy, computational chemistry

Mentor: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Valerije Vrčec, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Davor Šakić, Ph.D.** *Senior Research Assistant/Postdoctoral fellow*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Tin Weitner, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: April 2016.