

# Transacilacija u konjugatima ferocena i purinskih baza. Računalna studija mehanizma

---

**Božičević, Lucija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:616608>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-27**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Lucija Božičević**

**Transacilacija u konjugatima ferocena i  
purinskih baza. Računalna studija mehanizma**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitička kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitičku kemiju i Zavodu za organsku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Davora Šakića te suvoditeljstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka.

Rad je izrađen u sklopu projekta „Kvantno-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza“ (OrDeN) kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (šifra projekta: IP-2016-06-1137).

*Prije svega zahvaljujem svojem mentoru, doc. dr. sc. Davoru Šakiću na svom prenesenom znanju te vremenu i trudu koje je uložio u posljednje dvije godine kako bih naučila nešto novo. Hvala i za svaki prijateljski razgovor i savjet kad je zatrebalo.*

*Zahvaljujem i prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na svojoj pomoći, strpljenju te uloženom vremenu. Hvala Vam na svemu što ste me naučili, na svakoj konstruktivnoj kritici te cjelokupnoj podršci u posljednje dvije godine.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su bili uz mene još od srednje škole, a i tijekom studiranja. Hvala na svakom ramenu za plakanje, piću za feštanje i svim dobrim i manje dobrim danima koje smo prošli zajedno. Hvala i za sve projekte u koje ste me uvukli, jer sam u svakom uživala.*

*Posebna zahvala ide Heleni Sremec bez koje se nikad ne bih odvažila na pola stvari koje sam započela tijekom faksa (između ostalog vjerojatno i ovaj rad) i bez kojih sada ne mogu zamisliti svoje studiranje.*

*I na kraju, ono najbitnije, želim se zahvaliti svojoj obitelji. Hvala vam što ste vjerovali u mene i onda kada sama nisam. Hvala na svakoj lijepoj riječi kad je bilo najteže, hvala na beskonačnoj podršci, ljubavi i svemu što ste mi tijekom obrazovanja pružili, jer bez vas sve ovo ne bi bilo moguće.*

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. UVOD.....</b>                                       | <b>1</b>  |
| 1.1. ORGANOMETALNA KEMIJA .....                           | 1         |
| 1.1.1. FEROCEN .....                                      | 1         |
| 1.2. NUKLEOBAZE .....                                     | 2         |
| 1.2.1. DERIVATI PURINSKIH NUKLEOBAZA U FARMACIJI .....    | 3         |
| 1.3. KONJUGATI FEROCENA I NUKLEINSKIH BAZA .....          | 5         |
| 1.4. BIOMEDICINSKI ZNAČAJ KONJUGATA FEROCENA .....        | 6         |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>                         | <b>9</b>  |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>                       | <b>10</b> |
| 3.1. RAČUNALNA KEMIJA .....                               | 10        |
| 3.3. RAČUNALNE TEHNIKE .....                              | 12        |
| 3.3.1. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA.....                     | 12        |
| 3.3.3. IZRAČUN ENERGIJE .....                             | 14        |
| 3.3.4. SOLVATACIJSKI RAČUNI .....                         | 14        |
| 3.4. KORIŠTENE RAČUNALNE METODE I TEHNIKE.....            | 15        |
| 3.5. NMR SPEKTROSKOPIJA .....                             | 15        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>                       | <b>18</b> |
| 4.1. EKSPERIMENTALNI PODACI.....                          | 18        |
| 4.2. MOGUĆI MEHANIZMI TRANSACILACIJE.....                 | 19        |
| 4.2.1. INTRAMOLEKULSKI MEHANIZAM.....                     | 19        |
| 4.2.2. INTERMOLEKULSKI MEHANIZAM .....                    | 21        |
| 4.2.3. PRIJENOS FEROCENOILNE SKUPINE POMOĆU OTAPALA ..... | 23        |
| <b>5. ZAKLJUČCI .....</b>                                 | <b>27</b> |
| <b>6. LITERATURA .....</b>                                | <b>28</b> |
| <b>7. SAŽETAK.....</b>                                    | <b>32</b> |
| <b>8. PRILOZI.....</b>                                    | <b>34</b> |
| <b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....</b>           | <b></b>   |

## 1. UVOD

### 1.1. ORGANOMETALNA KEMIJA

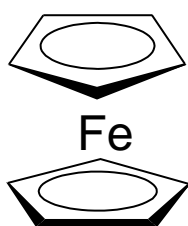
Organometalna kemija je grana kemije koja izučava kemijske spojeve u kojima postoji veza između atoma ugljika iz organske molekule i metala, pri čemu metali mogu biti alkalijski, zemno-alkalijski ili prijelazni metali. Razvoj ove grane uvelike je potaknut otkrićem ferocena 1951. godine (Kealy i Pauson, 1951.) Osim ferocena, često su spominjani i trimetilaluminij, dimetilcink te kobaltocen. Organometalni spojevi rijetko su prisutni u prirodi i živim organizmima, a iznimka je vitamin B<sub>12</sub>, poznatiji kao kobalamin. Danas je, pogotovo za biomedicinsko područje, organometalna kemija postala vrlo zanimljivim područjem. Organometalni derivati određenih farmaceutika ili molekula prirodno prisutnih u ljudskom organizmu pokazuju primjenu u vidu antitumorskih, antibakterijskih i antifungalnih lijekova te biosenzora i dijagnostičkih alata (Fish i Jaouen, 2003).

#### 1.1.1. FEROCEN

Ferocen je organometalni spoj čija je molekulska formula FeC<sub>10</sub>H<sub>10</sub>. Kod ferocena je atom željeza smješten u „sendvič“ između dvaju ciklopentadienskih prstena čiji su atomi svi jednako nezasićeni (Slika 1.). Jednaka nezasićenost ugljikovih atoma u ciklopentadienilnim anionima upućuje na to da ove strukture s ionom željeza tvore simetrične kovalentne veze (Wilkinson i sur., 1952). Pretpostavke o ekvivalentnim C-H vezama u ciklopentadienilnim dijelovima strukture potvrđene su IR apsorpcijskim spektrom molekule ferocena koji sadrži jednu oštru vrpcu na 3077 cm<sup>-1</sup>. Sve C-C veze u molekuli ferocena iste su duljine, a atom željeza jednako je udaljen od svih 10 atoma ugljika iz ciklopentadienilnih prstena.

Ferocen je spoj žute do narančaste boje, otapa se u organskim otapalima poput alkohola, etera i benzena. Ne otapa se u vodi, 10%-noj otopini natrijeva hidroksida niti u vrućoj koncentriranoj klorovodičnoj kiselini te je stabilan na zraku. Točka tališta ferocena je 173,0°C – 174,0°C, a prilikom taljenja ne dolazi do raspadanja spoja. Na temperaturama višim od 100°C ferocen sublimira, također bez razgradnje spoja. Zbog svojih aromatskih svojstava, ferocen podliježe sličnim kemijskim reakcijama kao benzen, a to su elektrofilne reakcije poput Friedel-Craftsove alkilacije te acilacije. (Rausch i sur., 1957; Miller i sur., 1952).

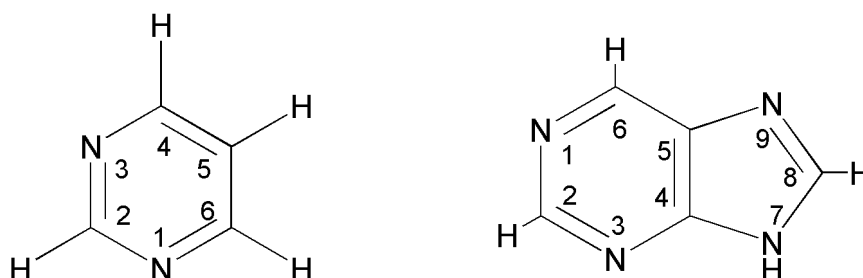
Difrakcijom rendgenskih zraka određena je i kristalna struktura ferocena, kojom je ponovno potvrđeno kako je molekula centrosimetrična, a u njezinu se središtu nalazi atom željeza. Ferocen karakterizira monoklinska kristalna rešetka koja je bazno centrirana. U jediničnoj ćeliji smještene su dvije molekule ferocena, odnosno dva atoma željeza (Eiland i Pepinsky, 1952). Ferocen je spoj čija se primjena istražuje u nizu različitih područja: katalizi kemijskih reakcija, bio-organometalnoj kemiji, procesima prijenosa elektrona u elektrokemiji, sintezi organskih spojeva i polimera, biokemiji te razvoju novih lijekova. Siguran je za primjenu jer se s njime ne povezuju nikakvi štetni učinci po zdravlje i okoliš (Kumar i sur., 2019).



**Slika 1.** Strukturni prikaz molekule ferocena ( $\text{FeC}_{10}\text{H}_{10}$ ).

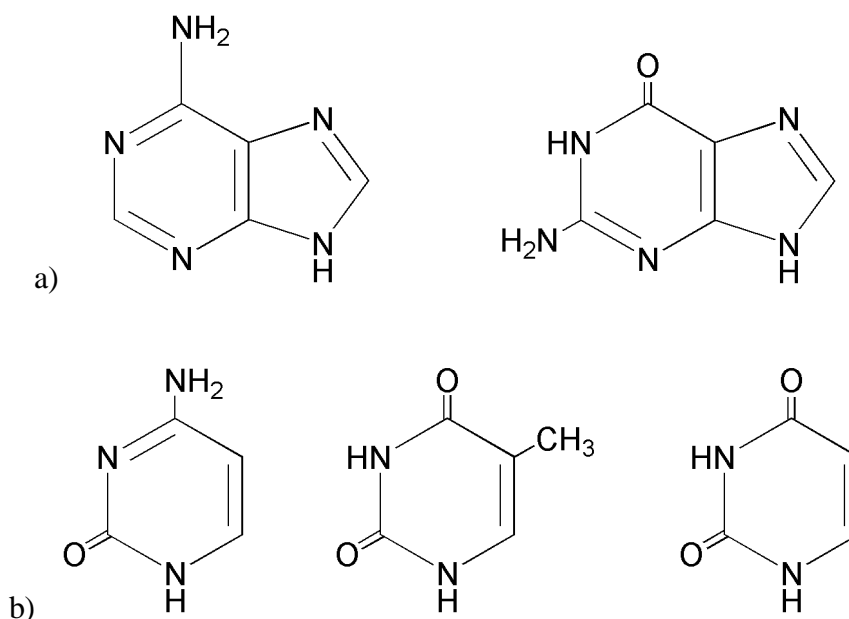
## 1.2. NUKLEOBAZE

Nukleinske kiseline među najvažnijim su makromolekulama u ljudskom organizmu. Linearni su polimeri izgrađeni od međusobno sličnih monomera nukleotida. Svaki se nukleotid sastoji od šećerne komponente, fosfata te jedne od četiriju nukleobaza. Četiri nukleobaze koje izgrađuju DNA su purinske baze adenin i gvanin te pirimidinske baze citozin i timin (Slike 2. i 3.). RNA umjesto timina u svojoj građi sadrži uracil, koji je također pirimidinska baza (Berg i sur., 2013).



**Slika 2.** Strukturni prikaz pirimidinske (lijevo) i purinske baze (desno) (Berg i sur., 2013).

Nukleobaze su planarni aromatski heterociklički sustavi (Clowney i sur., 1996). Njihova planarnost bitna je za održavanje DNA u strukturi dvostruke uzvojnice čiju okosnicu čini niz šećera međusobno povezanih fosfodieterskim mostovima, a u središtu uzvojnice nalaze se specifično povezani parovi nukleobaza. Specifične parove nukleobaza u dvostrukoj uzvojnici DNA, poznatije kao Watson-Crickove bazne parove, čine adenin i timin koji se međusobno povezuju dvama vodikovim vezama te gvanin i citozin koji tvore tri vodikove veze (Berg i sur., 2013). U ovom će radu biti obrađena pregradnja ferocenoilnih derivata purina sa različitim supstutientima na C6-atomu heterocikličkog prstena.



**Slika 3.** Strukturni prikaz nukleobaza: **a)** purinske baze (adenin lijevo, gvanin desno); **b)** pirimidinske baze (citozin lijevo, timin u sredini, uracil desno).

### 1.2.1. DERIVATI PURINSKIH NUKLEOBAZA U FARMACIJI

Derivati nukleobaza vrlo su često prisutni kao lijekovi za veći broj različitih bolesti. Najzastupljeniji su među antiviruscima i citostaticima.

U terapiji virusnih infekcija, derivati purinskih baza mogu se koristiti za infekcije koje uzrokuju DNA i RNA virusi. U terapiji herpes simpleksa 1 i 2 te *varicella zoster* virusa koriste se aciklovir te njegovi prolijekovi valaciklovir, ganciklovir, desciklovir i penciklovir. Navedeni lijekovi su inhibitori DNA-polimeraze zato što su strukturno slični nukleotidu deoksigvanozin-trifosfatu te se kao supstrati DNA-polimeraze ugrađuju u rastući lanac nukleinske kiseline, ali

zbog nekompletnog šećera prekidaju daljnji rast lanca. Didanozin i tenofovir dizoproksil su nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze te se koriste u terapiji infekcije HIV-om. S obzirom na to da su nukleozidni inhibitori, prolijekovi su te se nakon apsorpcije u organizmu aktiviraju trima uzastopni fosforilacijama. Reverzna transkriptaza virusa HIV-a je RNA-ovisna DNA-polimeraza, zbog čega je za lijekove koji djeluju na nju bitno da su selektivni prema virusnoj DNA-polimerazi te da ne interferiraju s aktivnosti humane DNA-polimeraze. Nukleozidni inhibitori reverzne transkriptaze djeluju na HIV-1 i HIV-2 viruse te se dobro apsorbiraju i primjenjuju peroralno, ali zbog afiniteta prema ljudskim enzimima imaju brojne nuspojave.

Citostatici koji su analozi purina također djeluju na DNA-polimerazu te se uglavnom koriste u terapiji različitih tipova leukemija. U ovoj skupini lijekova prevladavaju analozi deoksiadenozina, a princip djelovanja sličan je kao kod ranije opisanih antivirusnih lijekova, ali u ovom slučaju djelovanje je usmjereno na humane enzime u tumorskim stanicama. Naravno, apsolutnu selektivnost prema tumorskim stanicama gotovo je nemoguće postići pa i ovi lijekovi imaju širok profil nuspojava, kao i većina kemoterapeutika. Klofarabin, fludarabin i kladribin su derivati deoksiadenozina, dok je nelarabin derivat deoksigvanozina. Oni su također prolijekovi koji se u organizmu prevode u aktivne trifosfate, a nakon aktivacije mogu djelovati kao kompetitivni inhibitori DNA-polimeraze ili se ugraditi u DNA i spriječiti njezinu daljnju sintezu te replikaciju. Citostatici su i antagonisti purina: azatioprin, 6-merkaptopurin i 6-tiogvanin. Njihovi su aktivni oblici monofosfati koji djeluju kao inhibitori sinteze purina te trifosfati koji nakon ugradnje u DNA ili RNA molekule u stanici dovode do apoptoze (Nastavni materijali iz kolegija Farmaceutska kemija 1, 2017./2018.).

Alopurinol, lijek koji se koristi u terapiji gihta, izomer je hipoksantina koji je također purinska baza. Giht karakterizira nakupljanje kristala mokraćne kiseline u zglobovima. Mokraćna kiselina nastaje kao produkt metabolizma purinskih baza, a njezin nastanak katalizira enzim ksantin-oksido-reduktaza. Alopurinol je kompetitivni inhibitor ksantin-oksido-reduktaze, a oksipurinol koji nastaje kao metabolit alopurinola u toj reakciji je nekompetitivni inhibitor ksantin-oksido-reduktaze (Rendić i Medić-Šarić, 2013).



### 1.3. KONJUGATI FEROCENA I NUKLEINSKIH BAZA

Ferocenski konjugati nukleobaza trenutno privlače mnogo pažnje kao molekule novih svojstava i možebitno široke primjenjivosti u brojnim granama biologije, farmaciji, elektrokemiji, razvoju novih materijala i sličnim (Kowalski, 2016).

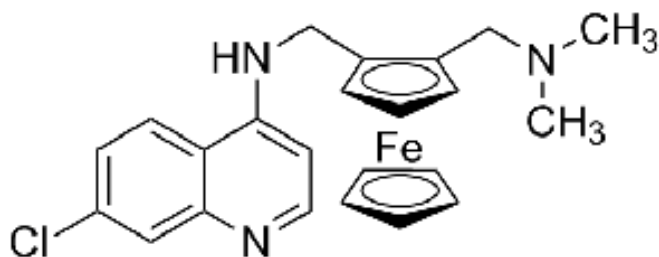
Možda najzanimljivije područje od interesa u istraživanju ferocenskih konjugata nukleinskih baza su ksenonukleinske kiseline (XNA). XNA označava nukleinske kiseline koje ne postoje u prirodi i čiji su uobičajeni šećeri zamijenjeni alternativnom šećernom komponentom ili nekim spojem koji nije šećer. Proučavaju se brojne alternative D-(deoksi)riboze inače prisutne u DNA i RNA, a mogu se podijeliti u dvije skupine: organski i organometalni spojevi. Ferocen je, zbog njegove redoks aktivnosti, jedna od istraživačima najzanimljivijih organometalnih komponenata u XNA. Smatra se kako bi se daljnim istraživanjem i boljim razumijevanjem XNA moglo podrobnije istražiti pohranu i procesuiranje genetske informacije, ali i podrijetlo života na Zemlji (Kowalski i sur., 2018).

Nukleinske baze tvore Watson-Crickove baze parove vodikovim vezama te  $\pi$ - $\pi$  i hidrofobnim interakcijama. Kada se tome dodaju molekule ferocena koje zamjenjuju šećerne komponente inače prisutne u nukleotidima, ovakvi konjugati postaju korisni građevni blokovi u supramolekularnoj kemiji koja povezuje molekularno prepoznavanje s elektrokemijom. (Havaić, 2017.) Elektrokemijski eksperimenti pokazuju kako je ferocen osjetljiv na elektronske promjene u heterocikličkom prstenu nukleinskih baza zbog čega bi se ovakvi spojevi mogli koristiti kao elektrokemijski markeri DNA ili lijekova koji su derivati nukleobaza, ali su u organizmu prisutni u iznimno niskim koncentracijama (Hocek i sur., 2004).

Ranije je dokazano kako će prilikom sinteze konjugata ferocena i pirimidina (uracil, timin i 5-fluorouracil) ferocenoilna skupina (poveznica ferocena i nukleinske baze je karbonilna skupina) nastajati isključivo N1-supstituirani produkt te nije potrebno uvoditi zaštitnu skupinu na N3-atom prilikom sinteze (Vrček i sur., 2015). U ovom radu proučavani su konjugati purinske baze adenina i drugih purinskih derivata pri čemu je uočeno kako se ferocen može vezati na N7- i N9-atome u purinskom prstenu te se može dogoditi pregradnja tih dvaju izomera u polarnom organskom otapalu DMSO-u.

#### 1.4. BIOMEDICINSKI ZNAČAJ KONJUGATA FEROCENA

Polje organometalnih farmaceutika istražuje se od 1970-ih godina kad su Köpf i Köpf – Maier počeli istraživati antitumorska svojstva kompleksa ciklopentadiena i prijelaznih metala. Upravo je antitumorsko djelovanje najviše istraživano djelovanje organometalnih farmaceutika, ali u posljednjih se nekoliko godina sve više istražuju i drugi terapijski učinci (Dyson i sur., 2004). Mnogi konjugati ferocena pokazuju i antibakterijsko, antifungalno te antiparazitsko djelovanje. Najčešće se radi o konjugatima sa spojevima koji i inače ispoljavaju određene biološke učinke koje ferocen može pojačati ili modulirati. Takvi su primjeri citostatika tamoksifena te ferokini (Slika 4.) (derivati klorokina i ferocena) koji imaju antiparazitsko djelovanje. Terapijske učine pokazuju i konjugati ferocena s molekulama koje samostalno ne ostvaruju biološke učinke, ali nakon vezanja ferocena konjugati postaju biološki aktivni (Kowalski i sur., 2013).

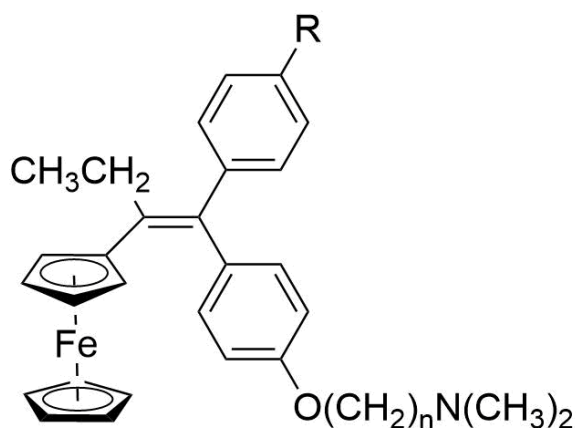


**Slika 4.** Strukturni prikaz ferokina, konjugata ferocena s klorokinom.

Postoji nekoliko skupina organometalnih derivata koje karakteriziraju određena svojstva koja ih čine pogodnima za primjenu u biomedicinskom području. Prva su organometalni spojevi kod kojih je ligand vezan labilno te se iz spoja oslobodi prije no što stigne do ciljne stanice. Drugoj skupini pripadaju kompleksi ferocena s platinom ili zlatom, metalima koji tvore koordinativne komplekse i za koje je od ranije poznato da posjeduju antitumorsko djelovanje. Ferocen može tvoriti konjugate i sa organskim molekulama koje se koriste kao lijekovi, za što su najbolji primjer ranije spomenuti ferocifen (kompleks ferocena i tamoksifena) te ferokini. Brojne su vrste razvile rezistenciju na klorokin, ali njegovim se vezanjem u kompleks s ferocenom njegova toksičnost za vrste roda *Plasmodium* pojačava. Ovi su spojevi najbolji primjer značaja organometalnih derivata u razvoju lijekova, uzimajući u obzir činjenicu kako je ferokin došao do druge faze kliničkih ispitivanja (Dive i Biot, 2008), dok bi ferocifen u vrlo

skoroj budućnosti trebao krenuti u prvu fazu kliničkih istraživanja. Vodotopljivi organometalni spojevi koji sadrže radioaktivne elemente potencijalni su dijagnostici i terapeutici karcinomskih oboljenja. Kod ovakvih spojeva farmakofor je radioaktivni element, ali učinkovitost i selektivnost prema stanicama ovisit će o dizajnu ostatka molekule (Dyson i sur., 2004).

Antitumorsko, odnosno antiproliferativno djelovanje inače netoksičnog ferocena pokazuju njegov kation te hidroksilni radikali koji nastaju pri fiziološkim uvjetima. Postoji mogućnost kako se nastanak hidroksilnog radikala ferocena može povezati s njegovim metabolizmom. Kako je ranije navedeno, ferocen je po određenim karakteristikama sličan benzenu pa stoga i slično metabolizira. Ferocen se hidroksilira citokrom P450 enzimima u jetri nakon čega podliježe reakcijama sulfokonjugacije te glukuronidacije. Njegov je glavni metabolit u urinu glukuronid, ali pri određenim uvjetima moguće je da prilikom hidroksilacije nastaju reaktivni radikali, između ostalog i hidroksilni (Gasser i sur., 2010). Druga pretpostavka na kojoj se temelji antitumorski potencijal ferocenskih derivata je ta da je zbog redoks aktivnosti ferocena moguće kako se do tumorske stanice dostavlja ferocen u netoksičnom obliku koji se u tumorskim stanicama oksidira u toksični ferocenski kation. Upravo na tom principu temelji se djelovanje ferocifena (Slika 5.) koji djeluje na invazivni karcinom dojke rezistentan na terapiju tamoksifenom. Ferocifen uklopljen u lipidne nanokapsule pokazao je antiproliferativni učinak na stanice glioblastoma u *in vivo* modelima (Dyson i sur., 2012). Antiproliferativno djelovanje ferocenskih derivata ispitano je i na konjugatima s pirazolom, podofilotoksinom te selenoureom. Iako su neka od tih istraživanja pokazala zavidne rezultate u terapiji karcinoma dojke, kolorektalnog karcinoma pa čak i neuroblastoma, sva su ispitivanja provedena *in vitro* na kulturama stanica, zbog čega je teško procijeniti njihov stvarni potencijal (Kumar i sur., 2019). Fotodinamička terapija (PDT) i fotoaktivirana kemoterapija (PACT) također su područja od interesa u istraživanju biomedicinskog značaja organometalnih derivata (Kowalski i sur., 2017).



**Slika 5.** Strukturni prikaz ferocifena.

Smatra se kako su organometalni spojevi često potentni inhibitori enzima zahvaljujući atomu metala koji s aminokiselinom iz proteina može tvoriti kovalentnu vezu i na taj način snažno i dugotrajno inhibirati enzim (Gasser i Patra, 2012). Zanimljiva je činjenica kako su ferocenski derivati koji inhibiraju topoisomerasu II pokazali antivirusni učinak na HIV-1. Prethodno tome ispitani su ferocenski derivati pirimidinskih baza od kojih su samo ferocenski derivati 3'-deoksi-3'-azidotimidina pokazali antiretroviralno djelovanje, ali znatno slabije od onog azidotimidina koji je korišten kao referentni lijek. Suprotno tome, ferocenski inhibitori topoisomerase II pokazuju učinak već u nanomolarnim koncentracijama (Fouda i sur., 2007).

Postoji i niz drugih indikacija u kojima su ispitivani ferocenski derivati kao potencijalno inovativni i uspješniji terapijski sustavi. Antituberkulotsko djelovanje ferocenskih derivata tiosemikarbazida pokazalo se znatno manje uspješnim od uobičajenog lijeka izoniazida (Kumar i sur., 2019). Ispitivano je i djelovanje ferocenskih derivata na rezistentne sojeve bakterije *Staphylococcus aureus* (MRSA, VRSA) te su derivati fluorouracila pokazali antibakterijsko djelovanje na rezistentne sojeve ove Gram-pozitivne bakterije (Kowalski i sur., 2013).

Osim terapijskog značaja, organometalni derivati, a time i konjugati ferocena istražuju se i u dijagnostici kao biosonde, za označavanje staničnih organela i proteina, izučavanje protein-protein interakcija te *in vivo* detekciju proteina (Gasser i Patra, 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nukleozidi kod kojih je šećerna komponenta zamijenjena organometalnim spojem ferocenom u posljednjih su nekoliko godina privukli značajan interes u biomedicinskom području. Takvi se derivati nukleinskih baza, s obzirom na to da kombiniraju redoks i biološku aktivnost, potencijalno mogu primijeniti kao početni spojevi u razvoju novih lijekova za terapiju karcinoma te bakterijskih i virusnih infekcija, bioanalitički alati, strukturni analozi DNA (XNA) te kao elektrokemijski senzori.

Prilikom sinteze konjugata ferocena i nukleobaza, za čiju je poveznicu u ovom radu odabrana karbonilna skupina, nastaju dva produkta: N7- i N9-izomer. U polarnom organskom otapalu (DMSO) dolazi do intramolekulske pregradnje N7-izomera u stabilniji N9-izomer, a u ravnotežnoj su smjesi prisutna oba izomera.

N7/N9 transferocenoilacija koja je primjećena prilikom istraživanja može se okarakterizirati kao reakcija intramolekulskog prijenosa acilne skupine, odnosno reakcija koja se često događa u organizmu na makromolekulama ugljikohidratima, proteinima i lipidima. Navedena reakcija često se koristi i u dizajnu prolijekova te kemijskoj sintezi. Ono što je također važno jest to da se reakcija događa u DMSO-u, za koji je ranije navedeno kako je jedno od najčešće korištenih otapala u NMR-spektroskopiji, ali i općenito prilikom rada u istraživačkim laboratorijima. Stoga je vrlo važno poznavati mehanizam ove reakcije kako bi se moglo pravilno rukovati novosintetiziranim spojevima u kojima bi ovaj tip reakcije bio moguć.

U literaturi je predloženo nekoliko različitih mehanizama koji su u ovom radu modelirani računalno-kemijskim metodama, nakon čega su rezultati uspoređeni s eksperimentalno dobivenim podacima kako bi se odredio mehanizam koji odgovara procesu transacilacije.

### 3. MATERIJALI I METODE<sup>1</sup>

#### 3.1. RAČUNALNA KEMIJA

Računalna kemija je grana kemije koja strukture i reakcije promatra numerički. Primjenom zakona fizike i njihovih aproksimacija (primjerice Schrödingerova jednadžba riješena s Born-Oppenheimerovom aproksimacijom) računalna kemija kao rezultat daje energiju kao najbitniju informaciju dobivenu iz kvantno-kemijskih izračuna (Hok, 2017). S obzirom na to da ne zahtijeva eksperimentalna ispitivanja fizikalno-kemijskih svojstava molekula uključenih u reakcije niti ispitivanje tijeka kemijske reakcije kako bi se saznali, primjerice, mehanizmi određenih procesa, računalna kemija može dati uvid u svojstva i energije struktura koje je nemoguće izolirati. U prvom redu to su kratkoživuće strukture intermedijera i prijelaznih stanja. Računalno-kemijske metode moguće je primijeniti prilikom samostalnih istraživanja reakcijskih mehanizama ili kao dodatan vid istraživanja uz eksperimentalna ispitivanja (Šakić, 2015).

#### 3.2. RAČUNALNE METODE

Kvantno-kemijski izračune temelje se na rješavanju Schrödingerove jednadžbe koju je moguće egzaktno riješiti isključivo za sustave s jednim elektronom. Stoga je, kako bi se Schrödingerova jednadžba mogla riješiti za realne sustave, potrebno uvoditi aproksimacije. Računalne se metode razlikuju upravo prema aproksimacijama koje su primijenjene za rješavanje Schrödingerove jednadžbe, a postoje semi-empirijske, *ab initio* te DFT (eng. *Density functional theory*) metode (Tandarić, 2016).

Semi-empirijske metode daju vrlo brze izračune, ali točnost izračuna dobivenih ovom računalnom metodom je varijabilna. Ove metode koriste eksperimentalno dobivene parametre za procjenu promjene geometrije kojom se postiže što niža energija sustava. Osim loše opisanih elektronskih interakcija, u ovoj se metodi ne koriste niti unutarnji (nevalentni) ioni. Točnost izračuna je varijabilna jer ovisi o sličnosti računalnog sustava i sustava za koji su dobiveni eksperimentalni parametri.

---

<sup>1</sup> Dio Materijali i metode objavljen je u djelomično izmijenjenom obliku u radu za Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu 2018. godine pod naslovom „Mehanizam racemizacije oksazepama“.

*Ab initio* metode iznimno su precizne i daju konzistentne rezultate. Tome doprinosi činjenica kako se kod ovih metoda Schrödingerova jednažba odvaja u mnogo jednoelektronskih jednažbi koje se rješavaju zasebno čime se opisuje ponašanje svakog elektrona u polju svih drugih elektrona. Nedostatak je ovih metoda njihova dugotrajnost i velika potreba za računalnim resursima. *Ab initio* metode dijele se na Hartree-Fock metodu koja zanemaruje elektronsku korelaciju i post-Hartree-Fock metode koje je uzimaju u obzir.

Prilikom izrade ovog rada korištene su DFT metode. To su metode temeljene na Kohn-Sham teoremu koji dovodi u vezu energiju osnovnog stanja sustava i elektronsku gustoću molekule. Prema svojim karakteristikama, DFT metode mogu se usporediti i s *ab initio*, ali i sa semi-empirijskim metodama. S *ab initio* metodama, DFT metode dijele iterativni postupak izračuna, odnosno opisuje se ponašanje svakog elektrona u odnosu na elektronsku gustoću sustava. Međutim, točan oblik funkcionala koji povezuje elektronsku gustoću s energijom nije poznat, zbog čega je potrebno uvesti određene eksperimentalne parametre. Upravo je to sličnost DFT metoda sa semi-empirijskima. DFT metode danas su najčešće korištene metode računalne kemije ponajviše iz razloga što daju precizne i ponovljive rezultate usporedive s onima *ab initio* metoda uz znatno manju potrebu za računalnim resursima (Šakić, 2015.)

U ovom su radu korištena dva različita funkcionala iz porodice DFT metoda: B3LYP te M06L. B3LYP funkcional korišten je uz bazni skup 6-31G(d), a M06L uz bazni skup 6-311+G(d,p). Ranije navedeni bazni skupovi korišteni su za atome ugljika, dušika, kisika i sumpora, dok je u oba slučaja za opis željeza korišten SDD bazni skup (eng. Stuttgart-Dresden-Bonn). Elektronska gustoća dobiva se iz Kohn-Sham orbitala koje su linearne kombinacije baznih funkcija, a potom se korištenjem funkcionala iz te elektronske gustoće dobiva konačni izračun energije. B3LYP funkcional jedan je od danas najčešće korištenih DFT funkcionala. B označava Becke funkcional izmjene, LYP korelacijski funkcional kojeg su razvili Lee, Yang i Parr, a 3 označava da je funkcional kombinacija 3 parametra, jer se uz dva već navedena tu nalazi i određeni udio HF (Hartree-Fock) izmjene (Becke, 1988). M06L spada u skupinu visoko parametriziranih Minnesota funkcionala te je pogodan za karakterizaciju prijelaznih metala te organometalnih spojeva. Bazni skupovi opisuju valnu funkciju konačnim brojem baznih funkcija, pri čemu je opis molekulskih orbitala to kvalitetniji što je broj baznih funkcija veći. Bazni skupovi razlikuju se prema broju primitivnih gaussiana koji opisuju unutrašnje orbitale ili od kojih su sastavljene složene osnovne funkcije za opis valentnih orbitala te prisutnosti polarizacijskih ili difuzijskih funkcija. Bazni skup, 6-31G(d), korišten u ovom radu ima 6 primitivnih gaussiana koji opisuju unutarnje orbitale, dok se valentne orbitale opisuju sa

složenim funkcijama dobivenih kontrakcijom tri (3), odnosno jednog (1) gaussiana, a d označava primjenu d polarizacijskih funkcija (Hok, 2017). Kod baznog skupa 6-311+G(d,p) plus označava dodatak difuzne funkcije na sve atome osim vodika, a kao što je vidljivo iz oznaka d i p korištene su d i p polarizacijske funkcije (Young, 2001). SDD bazni skup korišten je za opis atoma željeza zato što sve nevalentne elektrone stavlja u pseudopotencijal čime skraćuje vrijeme i računalne resurse potrebne za izračune.

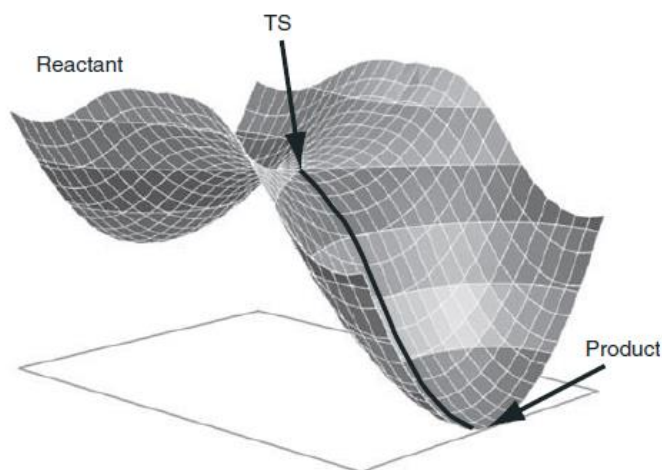
### **3.3. RAČUNALNE TEHNIKE**

#### **3.3.1. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA**

Geometrijska optimizacija predstavlja vrstu izračuna koji se koriste u računalnoj kemiji, a kojom se traže strukture energijskih minimuma u blizini početne strukture. Strukture energijskih minimuma traže se na plohi potencijalne energije (Slika 6.), složenoj matematičkoj funkciji koja molekulskim strukturama pridružuje odgovarajuće energije. Svaka točka plohe potencijalne energije odgovara drugačijoj strukturi.

Minimumi su na plohi potencijalne energije točke smještene u „potencijalnoj jami“, odnosno točke za koje pomak u bilo kojem smjeru na plohi podrazumijeva povišenje energije sustava. Stoga su točke u kojima se nalaze minimumi kritične, odnosno stacionarne točke u kojima prva derivacija energije s obzirom na promjenu atomskih koordinata iznosi 0. Pronalazak strukture koja odgovara energijskom minimumu podrazumijeva iteracijsko variranje atomskih položaja u koordinativnom sustavu počevši od strukture promatrane molekule generirane u nekom od programa za vizualiziranje strukture (u ovom slučaju GaussView) pa do točke u kojoj se prva derivacija energije spusti ispod određene konvergencijske vrijednosti. Pri svakoj se iteraciji računaju energija i gradijent sila pri čemu pozitivna vrijednost gradijenta sila odgovara porastu, a negativna sniženju energije sustava.





**Slika 6.** Prikaz plohe potencijalne energije. Tamnom linijom prikazana je opća reakcija nastajanja produkata preko prijelaznog stanja (TS) koje povezuje dva minimuma (Bachrach, 2014).

Stacionarne točke na plohi potencijalne energije su i maksimumi. Sedlasta točka prvog reda je stacionarna točka koja spaja dva lokalna minimuma, jednostavnije rečeno – prijelazno stanje. Svaka uspješna geometrijska optimizacija završit će lokalizacijom stacionarne točke na plohi potencijalne energije. Međutim, kako bi se moglo odrediti je li locirana stacionarna točka minimum ili prijelazno stanje, potrebni su dodatni podatci (Tandarić, 2016).

### 3.3.2. FREKVENCIJSKI RAČUN

Za karakterizaciju stacionarnih točaka lociranih na plohi potencijalne energije nužan je frekvencijski račun na odgovarajućoj teorijskoj razini. Frekvencijski je račun postupak kojim se izračunavaju sve frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge (i viših) derivacija energije u odnosu na atomske koordinate. Frekvencijski će nam račun dakle, osim prikaza svih vrsta vibracija u molekuli i atoma koji u njima sudjeluju, dati i odgovor na pitanje je li određena stacionarna točka prijelazno stanje ili minimum. Kod strukture prijelaznog stanja postoji jedna imaginarna frekvencija, odnosno vibracija s negativnim predznakom. S druge strane, kod struktura minimuma uopće nema imaginarnih frekvencija. Imaginarna frekvencija označava reakcijsku koordinatu u kojoj je ta struktura maksimum. Ukoliko struktura ima više imaginarnih frekvencija, potrebno ju je daljnjim optimizacijama dovesti do točke minimuma ili prijelaznog stanja (Hok, 2017).

### 3.3.3. IZRAČUN ENERGIJE

Optimizacijom strukture i određivanjem minimuma dobiva se energija koja odgovara ukupnoj elektronskoj energiji molekule te su potrebne dodatne korekcije za energiju koja je poveziva s termodinamičkim parametrima. Pri temperaturi od 0 K molekule nisu bez vibracija već imaju određeno vibracijsko gibanje pa se stoga uvodi energija nulte točke („zero point energy“, ZPE) koja se izražava kao zbroj elektronske energije i energije najnižeg vibracijskog stanja molekule. Energija nulte točke potom se korigira različitim doprinosima translacijskog, rotacijskog i vibracijskog gibanja molekule koji se izražavaju kao entalpija i entropija. Moguće je podesiti parametre izračuna kao što su temperatura i tlak. Apsolutna Gibbsova slobodna energija, koju smo koristili za određivanje termodinamskih parametara reakcijskih puteva, jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom:

$$G = H - TS.$$

### 3.3.4. SOLVATACIJSKI RAČUNI

Reakcija koja je ispitivana u ovom radu se, kao i većina drugih reakcija, odvija u otopini. Frekvencijski račun daje energije koje su izračunate u vakuumu, stoga je za realan prikaz sustava potrebno korištenjem solvatacijskih modela opisati interakcije otapala i ispitivanih struktura. Otapalo može uvelike utjecati na energiju i geometriju struktura pa je nužno odabrati dobar solvatacijski model kako bi opis kemijskog sustava bio što točniji. Pojedine molekule otapala mogu biti reaktanti ili katalizatori u pojedinim reakcijskim putevima.

Dva su načina kojima se mogu opisati solvatacijski efekti – implicitna i eksplicitna solvatacija. Implicitna solvatacija podrazumijeva opis utjecaja otapala na promatranu strukturu djelovanjem dielektričnog polja otapala. Koristi se model polarizabilnog kontinuuma pri čemu prvo nastaje solvatacijska šupljina u polarizabilnom kontinuumu, nakon čega molekula ulazi u tu šupljinu pri čemu se kontinuum oko nje relaksira. Iz interakcije molekule i solvatacijske šupljine dobiva se Gibbsova slobodna energija solvatacije koja utječe na promjenu energetskog gradijenta kod geometrijske optimizacije. Kod eksplicitne se solvatacije molekule otapala modeliraju u interakciji sa solvatiranom strukturom. Na ovaj način dobiva se točniji opis prve solvatacijske ljuske u kojoj molekule otapala ostvaruju interakcije s promatranom molekulom te joj ograničavaju slobodu kretanja, a time i reaktivnost. Supramolekulski pristup (korišten u ovom radu) kombinira implicitnu i eksplicitnu solvataciju, odnosno daje informaciju o učinku

pojedinačnih molekula otapala u prvoj solvatacijskoj ljusci i učinak dielektričnog polja otapala (Šakić 2015).

### 3.4. KORIŠTENE RAČUNALNE METODE I TEHNIKE

Geometrijske optimizacije, frekvencijski i solvatacijski računi provedeni su uporabom programskog paketa Gaussian16 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016). Vizualizacija dobivenih rezultata provedena je pomoću programa GaussView (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.). Za provedbu računa korišten je klaster Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu ([www.srce.hr](http://www.srce.hr)). DFT funkcionali B3LYP i M06L korišteni su za optimizaciju geometrija, dok su za opis orbitala korišteni bazni skupovi 6-31G(d) i 6-311+G(d,p) za atome ugljika, dušika, kisika i sumpora te bazni skup SDD za opis željeza.

Kompleksi reaktanata, produkata i prijelaznih stanja optimizirani su dodavanjem do dvije eksplicitne molekule dimetilsulfoksida za opis prve solvatacijske ljuske. Eksplicitne molekule DMSO-a dodavane su u programu GaussView, a različite konfiguracije molekula otapala oko zadane strukture su dobivene korištenjem modificirane verzije stohastičke metode (<http://andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html>; Saunders, 2004). Modeliranje implicitne solvatacije izrađeno je korištenjem SMD modela na B3LYP/6-31G(d)/SDD ili M06L/6-311+G(d,p)/SDD razini.

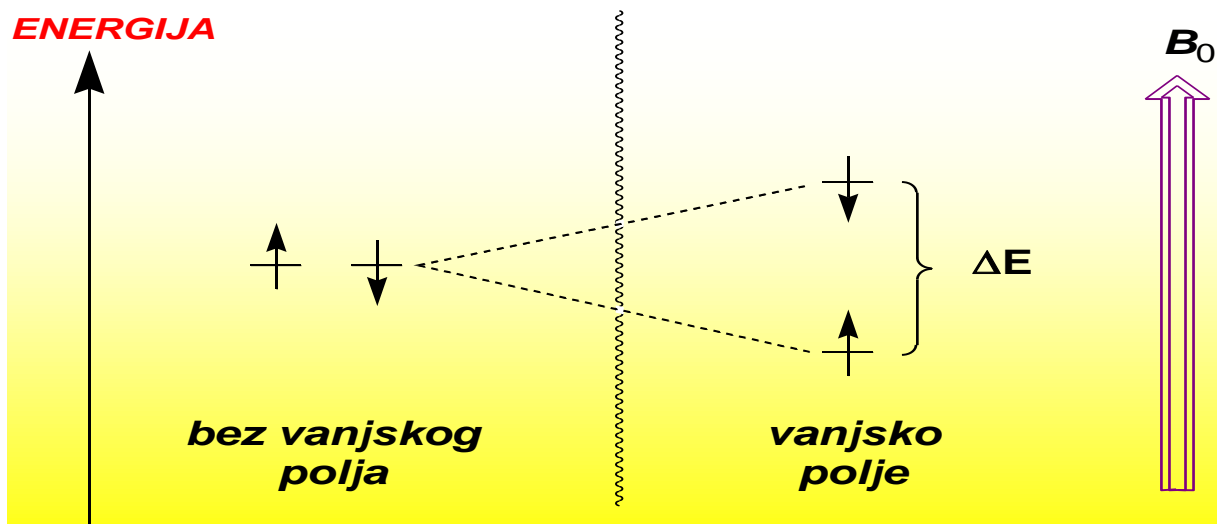
### 3.5. NMR SPEKTROSKOPIJA

NMR spektroskopija analitička je metoda od iznimne važnosti u poljima kemije, fizike, ali i biologije. Svoje široko područje primjene NMR duguje prije svega činjenici kako je iz spektara koji se dobivaju kao rezultat NMR spektroskopske analize moguće odrediti strukturu ispitivane molekule, ali i tome da je kao tehnika neinvazivna te ne uništava uzorak (Ahuja, 2001). NMR spektroskopija koristi magnetna svojstva jezgara kako bi se dobile informacije o kemijskoj okolini same jezgre.

Kako bi se jezgre mogle proučavati NMR spektroskopijom, moraju imati spin različit od 0. Takva svojstva u pravilu karakteriziraju jezgre s neparnim masenim ili neparnim atomskim brojem. Jezgre kojima se mogu snimiti NMR spektri su  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{29}\text{Si}$  i  $^{31}\text{P}$  (Watson, 2000). Jezgra sa spinom  $I$  može imati  $2I+1$  spinskih orijentacija. Jezgre sa spinom  $1/2$

poput  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  jezgara imaju dvije moguće spinske orijentacije u odnosu na vanjsko magnetno polje. Vanjsko magnetno polje od iznimne je važnosti za NMR spektroskopiju. Ukoliko nema djelovanja vanjskog magnetnog polja, energetske razine jezgara koje imaju različite spinske orijentacije bit će jednake. Tek uz djelovanje vanjskog magnetnog polja dolazi da razdvajanja tih energetskih razina, pri čemu vrijedi da što je jače primjenjeno vanjsko magnetno polje, to je jače razdvajanje energetskih razina (Hok, 2017).

Djelovanjem vanjskog magnetnog polja, jezgre atoma mogu se orijentirati u smjeru magnetnog polja (paralelno) ili u smjeru suprotnom od magnetnog polja (antiparalelno). Paralelno orijentirane jezgre imaju nižu energiju, a antiparalelne pripadaju višem energetskom nivou (Slika 7.). U NMR spektroskopiji, uz vanjsko magnetno polje koristi se i radiozračenje kako bi se jezgre mogle prevesti iz nižeg u više energetsko stanje. Kad jezgre prime iznos energije koji odgovara razlici energetskih stanja dvaju spinova, dolazi do rezonancije. Prilikom relaksacije jezgara i njihova povratka u niže energetsko stanje dolazi do emisije energije što detektira radiofrekvencijski prijemnik te se u spektru te informacije prevode u signale (Havaić, 2017).



**Slika 7.** Paralelna i antiparalelna orijentacija jezgara pod utjecajem vanjskog magnetskog polja: paralelno orijentirane jezgre imaju nižu energiju od antiparalelno orijentiranih jezgara.

Magnetsko polje koje djeluje na jezgru nije jednako primjenjenom magnetskom polju zbog elektrona koji se nalaze u okolini te jezgre i zasjenjuju je. Iz tog će razloga i frekvencija

rezonancije potrebna da bi se dogodio prijelaz iz nižeg u više energetske stanje biti različita ovisno o kemijskoj okolini molekule. Upravo o frekvenciji rezonancija ovisi i kemijski pomak, koji se definira kao položaj u NMR spektru pri kojem nastupa rezonancija pojedine jezgre u kemijskoj okolini u kojoj se ona nalazi.

$$\delta_A = \frac{\Delta\nu}{\nu} \times 10^6 \text{ ppm}$$

Kemijski se pomak računa prema navedenoj formuli pri čemu je  $\delta_A$  kemijski pomak jezgre izražen u ppm,  $\Delta\nu$  razlika frekvencija rezonancija između standarda (TMS) i izmjenjenog signala (izraženi u Hz) te  $\nu$  frekvencija spektrometra izražena u Hz. Kao što je uočljivo, kemijski je pomak relativan, odnosno promatra se u odnosu na neki rezonancijski signal, a kod  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektara kao referentni signal uzima se trimetilsilan (TMS,  $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$ ) čiji se signal uzima kao pomak od 0 ppm. Kemijski se pomaci izražavaju u ppm-ima umjesto u hercima kako bi se eliminirale razlike u spektrima uzrokovane frekvencijom instrumenta i jakosti polja (Pine, 1994).

Osim kemijskog pomaka, važne informacije o strukturi molekule mogu se dobiti i iz cijepanja signala do kojeg dolazi zbog utjecaja magnetskih polja drugih jezgara koje se nalaze u blizini promatrane jezgre. Do cijepanja signala doći će između kemijski neekvivalentnih jezgara, a jedan pik cijepa se na  $n+1$  pikova pri čemu je  $n$  broj susjednih jezgara koje utječu na promatranu.

U NMR spektroskopiji koriste se brojna otapala koja su deuterirana kako bi se eliminirale interferencije otapala sa signalima koje dobivamo snimanjem uzorka. Neka od najčešće korištenih otapala u NMR spektroskopiji su dimetilsulfoksid (DMSO), kloroform, metanol, voda, aceton te acetonitril. U nekim se udžbenicima analitike ljekovitih oblika upravo DMSO spominje kao vrlo dobro i često otapalo zbog toga što je u njemu moguće otopiti veliki broj ljekovitih tvari, ali i zbog visoke točke vrelišta koja omogućuje da se provedu različita kinetička ispitivanja. Činjenica kako se DMSO navodi kao jedno od najčešće korištenih otapala dodatno naglašava važnost reakcije praćene u ovom radu, koja se odvija upravo u DMSO-u (Ahuja, 2001).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA<sup>2</sup>

### 4.1. EKSPERIMENTALNI PODACI

N7-izomer otopljen je u DMSO-u pri čemu je NMR spektroskopskom analizom uočeno kako kroz određeni vremenski period ferocenoilni supstituent migrira sa N7 atoma na N9 atom u purinskoj bazi pri čemu nastaje stabilniji N9-izomer. Promjene u položaju i intenzitetu signala praćene su snimanjem <sup>1</sup>H NMR spektara te iste dokazuju proces pregrađivanja N7 izomera u N9 izomer u ranije navedenom polarnom organskom otapalu. Signali dvaju ugljikovih atoma iz heteroaromatskog prstena N7 izomera s vremenom postupno smanjuju (C8-*H* na 9.00 i C2-*H* na 8.37 ppm) i u konačnici nestaju, dok se pojavljuju novi signali ugljikovih atoma, ali ovog puta iz N9-izomera (C8-*H* na 8.65 te C2-*H* na 8.19 ppm).

Prilikom reakcije transacilacije konjugata adenina i ferocenoilne skupine dolazi do uspostavljanja ravnoteže u kojoj su prisutna oba izomera. Smjesa produkata sadrži 12% N7-izomera te 88% N9-izomera. Iz tog je podatka moguće odrediti konstantu ravnoteže reakcije  $K_{eq} = 7,3$  pri temperaturi od 298,15 K (25°C) te energijsku razliku dvaju izomera ( $\Delta G_{298}$ ) koja iznosi 4,9 kJ/mol. Ukoliko se N9-izomer otopi u DMSO-u dolazi do uspostave iste ravnoteže, što dokazuje kako je N7/N9 transacilacija u adeninu reverzibilan proces.

Ekperimentalni podaci dobiveni praćenjem kinetike reakcije N7/N9 transacilacije ukazuju na to da reakcija prati kinetiku prvog reda pri čemu  $k_{obs}$  iznosi 0,3668 h<sup>-1</sup> na temperaturi od 25°C što odgovara vremenu poluživota od 1,9h. Navedeni su rezultati za ferocenoilirani adenin, a moguće je zaključiti kako se N7-ferocenoilirani izomer lako prevodi u N9-izomer.

Kada se uz podatke o kinetici reakcije u obzir uzmu i računalno dobiveni rezultati, dolazimo do pretpostavke kako je otapalo (DMSO) reaktant u reakciji transacilacije. U tom slučaju reakciju možemo promatrati kao reverzibilnu reakciju: **N7** + DMSO  $\rightleftharpoons$  **N9** + DMSO. Za takvu je reakciju  $k_{obs} = k_1 + k_{-1}$  gdje su  $k_1$  i  $k_{-1}$  konstante brzine reakcije i povratne reakcije. S obzirom na to da je koncentracija DMSO-a konstantna, s obzirom na to da ga kao otapala u reakcijskoj smjesi ima mnogo više, ova reakcija drugog reda postaje reakcijom pseudo-prvog reda. Ravnotežna koncentracija za reakciju je  $K_{eq} = k_1 / k_{-1}$  pa se konstante brzine reakcije ( $k_1$  i  $k_{-1}$ ) mogu izračunati iz konstante ravnoteže i eksperimentalno dobivene konstante  $k_{obs}$ .

---

<sup>2</sup> Svi rezultati navedeni u ovom poglavlju objavljeni su u znanstvenom radu: Toma M et al. Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J. Org. Chem.* 2019, (<https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944>).

Na taj su način dobivene konstante brzine reakcija prikazane u Tablici 1. Reakcijski mehanizmi koji se mogu uzeti u obzir kao mehanizmi reakcije transacilacije trebali bi imati energetska barijeru manju od eksperimentalno dobivene barijere.

**Tablica 1.** Prikaz eksperimentalnih rezultata za odabrane kinetičke i termodinamičke parametre (pri 298,15K) za reakciju N7/N9 transacilacije u N7-aciliranim purinima.

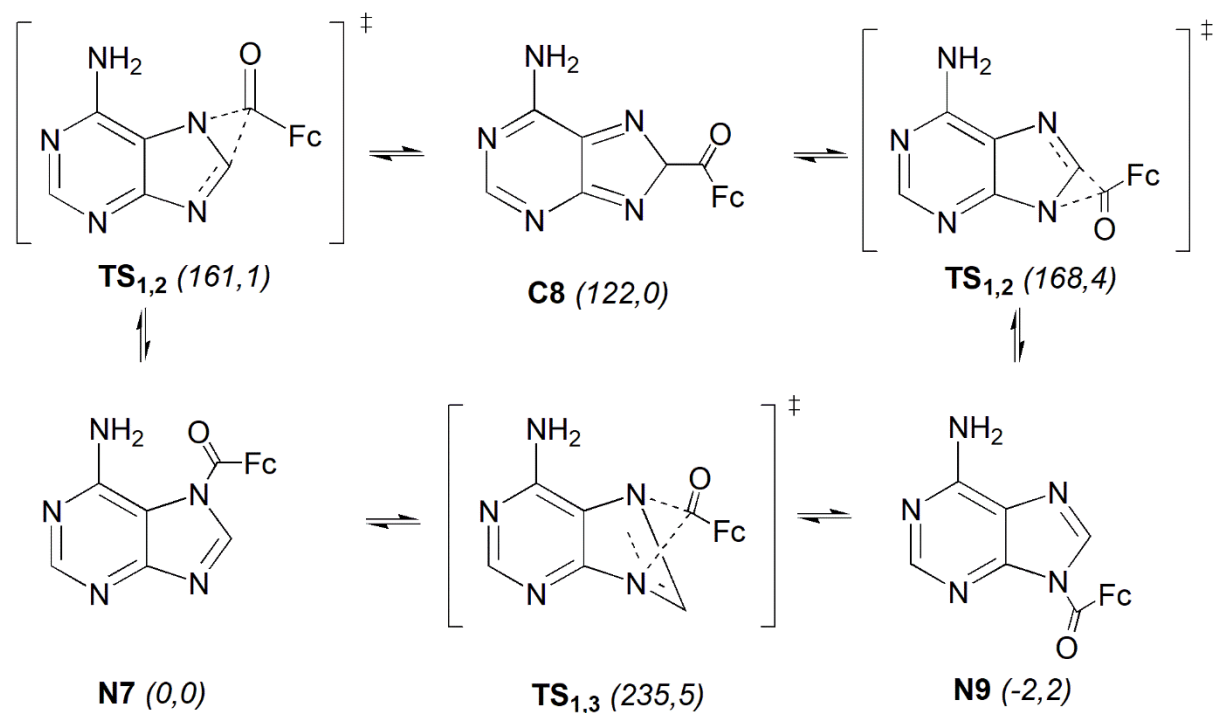
| Purinska baza                   | $k_{\text{obs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )<br>N7 $\rightarrow$ N9 | $K_{\text{eq}}$<br>[N9] / [N7] | $\Delta G_r$ (kJ/mol)<br>N7 $\rightarrow$ N9 | $k_1$ ( $\text{h}^{-1}$ )<br>N7 $\rightarrow$ N9 | $k_{-1}$ ( $\text{h}^{-1}$ )<br>N9 $\rightarrow$ N7 | $\Delta G^\ddagger$ (kJ/mol)<br>N7 $\rightarrow$ N9 |
|---------------------------------|---|--------------------------------|--|--|---|---|
| C6-NHBz-<br>N7-COFc             | 0,4446  | 5,2                            | -4,1   | 0,02645  | 0,00510   | 102,3   |
| C6-NH <sub>2</sub> -<br>N7-COFc | 0,3668  | 7,3                            | -4,9   | 0,02283  | 0,00311   | 102,7   |
| C6-CH <sub>3</sub> -<br>N7-COFc | 0,2128  | 3,7                            | -3,3   | 0,01188  | 0,00319   | 104,3   |
| C6-OBz-<br>N7-COFc              | 0,0066  | 4,2                            | -3,6   | 0,00038  | 0,00009   | 112,8   |

## 4.2. MOGUĆI MEHANIZMI TRANSACILACIJE

Prema literaturi, postoje dva reakcijska mehanizma koja bi potencijalno mogla odgovarati procesu transacilacije purinskih baza: intramolekulska N7/N9 izomerizacija te intermolekularni prijenos skupine s N7,N9-disupstituiranim intermedijerom. Intramolekularni mehanizam opisan je kod 1,3-migracije metilne skupine (-CH<sub>3</sub>) ili vodikova atoma u adeninu (Rao, 2012; Holmen i Broo, 1995), dok intermolekularni mehanizam odgovara N7/N9 transglikozilaciji purinskih nukleozida (Boryski, 1996; Dudycz i Wright, 1984). Treći mehanizam je transacilacija potpomognuta molekulom polarnog otapala dimetilsulfoksida. U ovom su radu korištenjem računalnih metoda ispitani svi navedeni mehanizma.

### 4.2.1. INTRAMOLEKULSKI MEHANIZAM

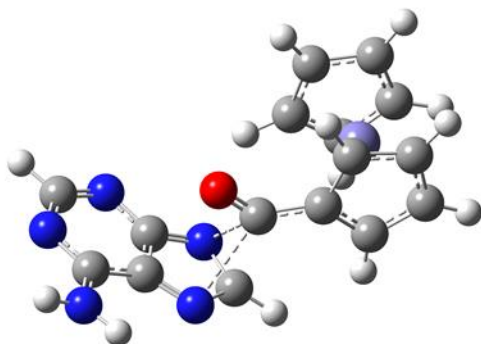
Intramolekulska N7/N9 transferocenoilacija može se odvijati ili direktno 1,3-sigmatropnim pomakom ili u dva koraka uzastopnim 1,2-migracijama pri čemu dolazi do nastanka C8-ferocenoiliranog intermedijera (Slika 8.).



**Slika 8.** Shematski prikaz intramolekulske N7/N9 transferocenoilacije; u donjem dijelu slike prikazan je direktni 1,3-sigmatropni pomak, a u gornjem dijelu uzastopne 1,2-migracije preko C8-supstituiranog intermedijera. Prikazane relativne Gibbsove energije ( $\Delta G_{298}$ , kJ/mol) stacionarnih točaka izračunate su na teorijskoj razini SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD.

Dobiveni računalni rezultati pokazali su kako su intramolekulski 1,2-pomaci ferocenoilne skupine energetski veoma skupi procesi pri čemu energija N7/C8 prijelaza iznosi 161,1 kJ/mol, a C8/N9 168,4 kJ/mol. C8-supstituirani intermedijer također ima visoku energiju te je za 122,0 kJ/mol manje stabilan od reaktanta (N7-izomera). Uzimajući u obzir eksperimentalno dobivenu barijeru ( $\Delta G_{\text{exp}}^{\ddagger}$ ) koja iznosi 102,7 kJ/mol, iz računalnih je rezultata vidljivo kako je ovakav reakcijski mehanizam energetski nedostupan da bi se mogao smatrati mehanizmom transferocenoilacije u slučaju ispitivanih ferocenskih derivata purinskih baza. Prijelazno stanje ( $\text{TS}_{1,3}$ ) (Slika 9.) 235,5 kJ/mol je nestabilnije od N7-izomera, što je također daleko više od eksperimentalne barijere čime je intramolekulski prijenos ferocenoilne skupine u potpunosti eliminiran kao mogući mehanizam ispitivane reakcije.

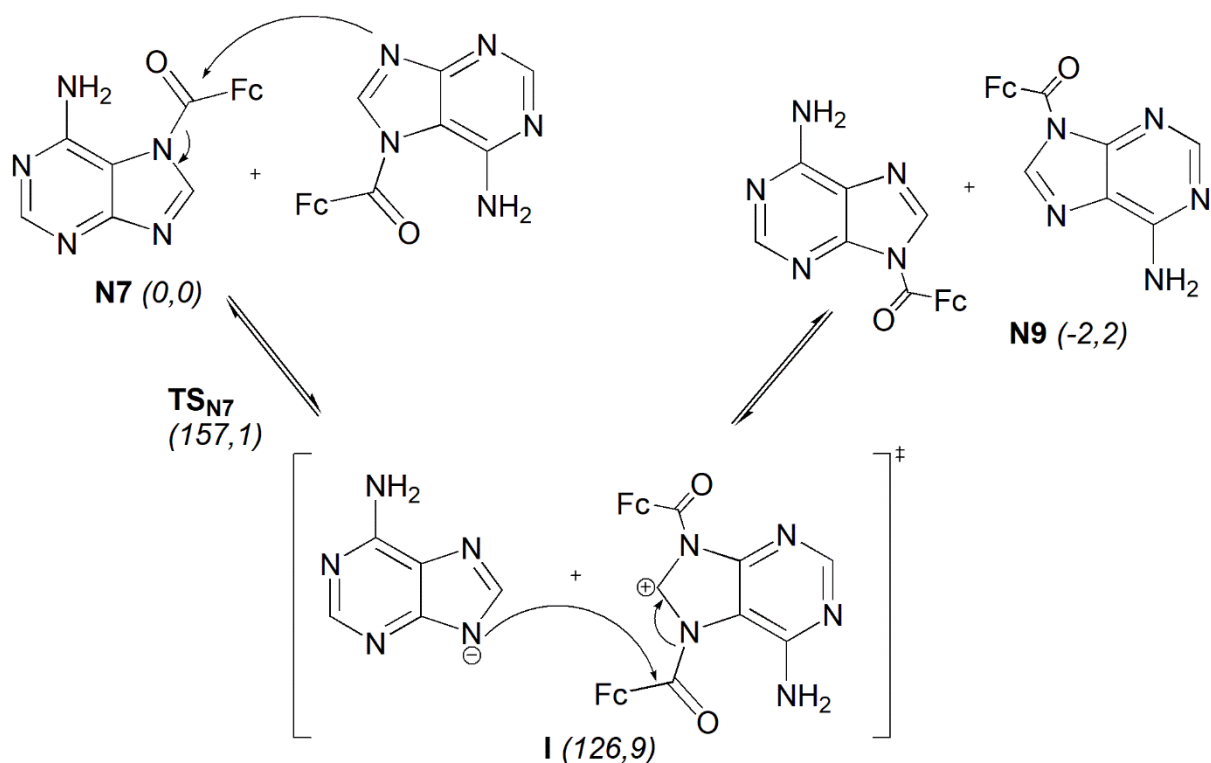




**Slika 9.** Struktura prijelaznog stanja ( $\text{TS}_{1,3}$ ) reakcije direktnog 1,3-sigmatropnog pomaka ferocenoilnog supstituenta na adeninskoj nukleinskoj bazi. Energetska barijera ( $\Delta G^\ddagger = 235,5$  kJ/mol) izračunata je na teorijskoj razini SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD.

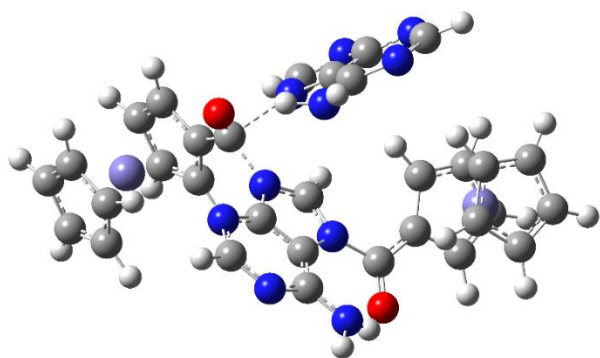
#### 4.2.2. INTERMOLEKULSKI MEHANIZAM

Drugi je razmatrani mehanizam reakcije intermolekulska transacilacija, točnije reverzibilni bimolekularni mehanizam u kojem sudjeluju dvije molekule N7-izomera. U prvom reakcijskom koraku dolazi do nukleofilne adicije N7-atoma iz jedne molekule na ugljik karbonilne skupine u drugoj molekuli pri čemu nastaje N7,N9-diferocenoilirani intermedijer **I** (Slika 10.). Ova je reakcija opisana kao mehanizam reakcija transglikozilacije purinskih baza, zbog čega je u ovom radu ispitana i kao potencijalni mehanizam transacilacije (Shimizu i Miyaki, 1970; Shimizu i Miyaki, 1968).



**Slika 10.** Shematski prikaz intermolekulske reakcije transacilacije (nukleofilna adicija N7 atoma na karbonilni ugljik druge molekule) na primjeru adenina sa ferocenoilnim supstytutom. Prikazane su relativne slobodne Gibbsove energije ( $\Delta G_{298}$ , kJ/mol) izračunate na teorijskoj razini SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD.

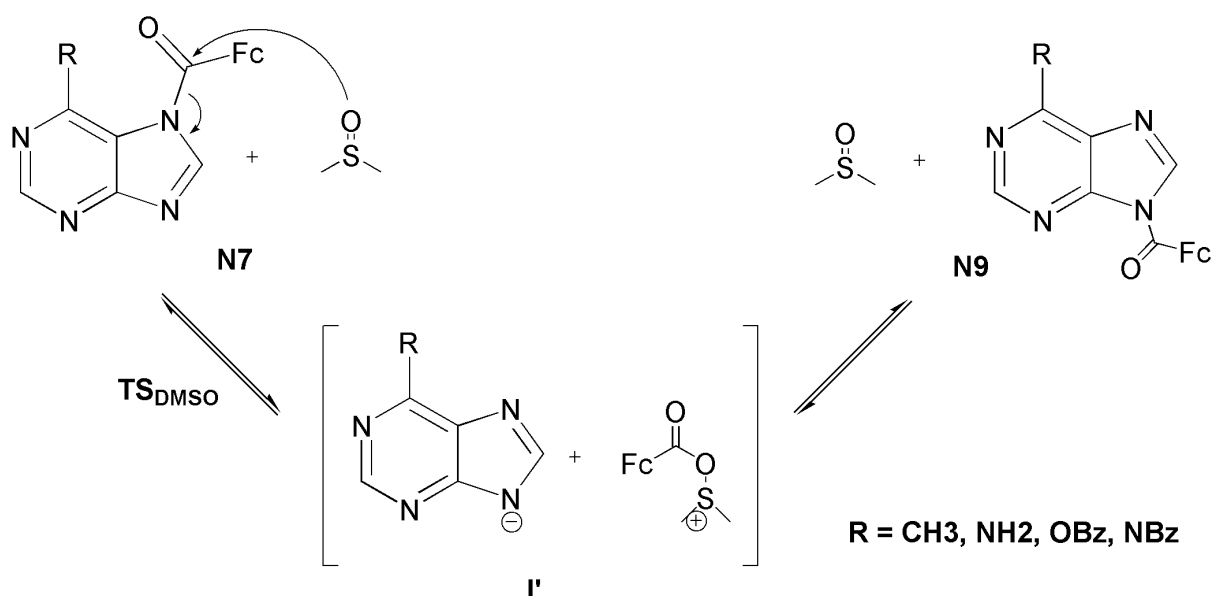
Izračunata energetska barijera za intermolekulsku reakciju dvaju N7-izomera iznosi 157,1 kJ/mol te je po vrijednosti slična energijama prijelaznih stanja sukcesivnih 1,2-migracija kod intramolekulskog mehanizma. Dobiveni podaci pokazuju kako niti intermolekulski mehanizam u kojem su reaktanti dvije molekule N7-izomera ne odgovara eksperimentalnim podacima dobivenim za reakciju transferocenoilacije te ga se može isključiti kao potencijalni mehanizam reakcije. Dodatno, ovakav reakcijski mehanizam zahtijeva odvijanje reakcije kinetikom drugog reda pa ga se može isključiti i na temelju ranije navedenih eksperimentalnih podataka.



**Slika 11.** Struktura prijelaznog stanja ( $TS_{N7}$ ) u reakciji intermolekulskog N7/N9 prijenosa ferocenoilne skupine u adeninu. Odgovarajuća energetska barijera ( $\Delta G^\ddagger = 157,1$  kJ/mol) izračunata je na teorijskoj razini SMD-M06L/6-311+G(d,p)/SDD.

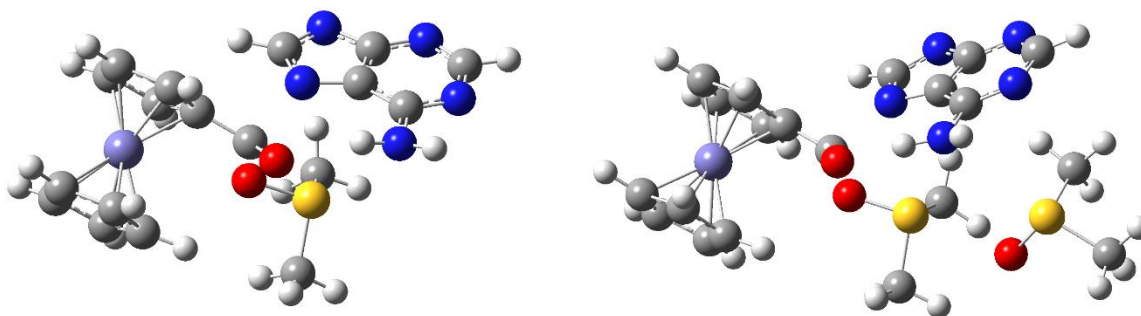
#### 4.2.3. PRIJENOS FEROCENOILNE SKUPINE POMOĆU OTAPALA

Treći mehanizam započinje nukleofilnom adicijom molekule otapala dimetilsulfoksida na ugljik karbonilne skupine u ferocenoilnom supstituentu na N7-atomu (Slika 12.). Upravo ovaj reakcijski korak određuje brzinu reakcije, a izračunata energetska barijera za ovu reakciju na adeninskom derivatu iznosi 107,9 kJ/mol. Takav rezultat slaže se sa ranije dobivenom eksperimentalnom barijerom od 102,7 kJ/mol za adeninski derivat (uzimajući u obzir pogrešku od  $\pm 5,0$  kJ/mol). Odgovarajuće prijelazno stanje ( $TS_{DMSO}$ , Slika 13.) pokazuje jednu imaginarnu frekvenciju koja odgovara formiranju O-C veze koju prati kidanje veze između N7-atoma dušične baze i C-atoma supstituenta.



**Slika 12.** Shematski prikaz N7/N9 transacilacije potpomognute otapalom. Intermedijer I' je oksosulfonijev ion, a reakcija se odvija  $S_{N2}$ -like mehanizmom.

Prijelazno stanje rezultira nastankom intermedijera (I'), točnije nestabilna oksosulfonijeva iona koji lako „predaje“ supstituent N9-atomu dušične baze. Iako tijekom istraživanja za potrebe ovog rada intermedijer I' nije izoliran, postojanje oksosulfonijeva iona potvrđeno je u ranijim radovima (Creary i Burtch, 2004; Creary i sur., 2003). Pomoću DFT računalno-kemijskih metoda, intermedijer I' uspješno je lociran kao minimum na odgovarajućoj plohi potencijalne energije.



**Slika 13.** Strukture prijelaznog stanja ( $T_{DMSO}$ ) adenina koje uključuje prijenos ferocenoilne skupine između dušične baze i molekule DMSO-a. Struktura je optimizirana na teorijskoj razini SMD-M06L/6-311+G(d,p). Prikazane strukture sadrže jednu (lijevo) i dvije (desno) eksplicitno dodane molekule DMSO-a. Strukture prijelaznih stanja ostalih derivata prikazane su u poglavlju Prilozi.

Kako je ranije opisano, reakcija počinje nukleofilnim napadom atoma kisika iz molekule DMSO na ugljik karbonilne skupine supstituenta. Nukleofil u molekuli DMSO-a, uz kisik, može biti i atom sumpora. Međutim, ispitivanjem reakcije koja započinje nukleofilnim napadom sumpora na karbonilni C-atom dobiveno je prijelazno stanje čija energetska barijera iznosi 253,3 kJ/mol, što je daleko iznad eksperimentalno dobivene barijere. Dobiveni je rezultat u skladu s ranijim ispitivanjima nukleofilnosti atoma kisika i sumpora u molekuli DMSO-a (Smith i Winstein, 1958). Sudjelovanje DMSO-a u ovoj reakciji može se očekivati zbog njegovih parametara nukleofilnosti (Phan i sur., 2009). Eksperimentalni podaci o reaktivnosti atoma kisika u DMSO-u pokazuju kako je isti nukleofilniji od vode ili alkohola (Minegishi i sur., 2004; McClelland i sur., 1989). Upravo zato, moguće je očekivati sudjelovanje DMSO-a u  $S_N2$ -like reakcijama transacilacije purina.

N7/N9 transacilacija promatrana je u nizu C6-supstituiranih purinskih baza pri čemu su C6-supstituenti  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{NHBz}$  te  $-\text{OBz}$ . Uočeno je kako C6-supstituent utječe na brzinu reakcije, ali ne utječe na omjer N7- i N9-izomera u ravnotežnoj smjesi (Tablica 1.). Tako je, primjerice, konstanta ravnoteže ( $K_{\text{eq}}$ ) slična za C6-OBz i C6-NHBz derivate ( $K_{\text{eq}}$  za C6-OBz derivat iznosi 4,2, a za C6-NHBz derivat 5,2). Konstanta brzine reakcije za ova je dva derivata znatno različita, točnije, reakcija transacilacije u C6-OBz derivatu odvija se čak 67 puta sporije nego ista reakcija u C6-NHBz derivatu.

Značajna razlika u brzini reakcije može se pripisati vodikovoj vezi koja u C6-NHBz derivatu nastaje između NH i CO skupina te pojačava reaktivnost elektro pozitivnog karbonilnog kationa. Ovakva intramolekulska kataliza nije moguća u C6-OBz derivatu. Dokaz postojanja ranije opisane vodikove veze u C6-NHBz derivatu moguće je dobiti analizom  $^1\text{H}$  NMR spektara N7- i N9-izomera C6-NHBz derivata u deuteriranom kloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) pri čemu se uočava pomak signala NH skupine sa 7,7 ppm u spektru N7-izomera na 6,4 ppm u spektru N9-izomera u kojem ne može doći do nastanka vodikove veze. Osim toga, „cijepanje“ signala NH (triplet) i  $\text{CH}_2$  (dublet) događa se samo kod N7-izomera u kojem dolazi do stvaranja vodikove veze.

Svi prethodno navedeni zaključci doneseni su na temelju računalno-kemijskih rezultata dobivenih korištenjem DFT metoda za optimizaciju stacionarnih točaka u reakcijama transacilacije potpomognute DMSO-om za četiri različito C6-supstituirana derivata purinskih baza. Rezultati se nalaze u Tablici 2.

**Tablica 2.** Slobodne Gibbsove energije i solvatacijske energije stacionarnih točaka transacilacije potpomognute otapalom izračunate na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD i B3LYP/6-31G(d)/SDD.

| C6-supstituent    | M06L/6-311+G(d,p)/SDD      |                             |                            | B3LYP/6-31G(d)/SDD         |                             |                            |       |
|-------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------|
|                   | G <sub>298</sub> (Hartree) | ΔG <sub>solv</sub> (kJ/mol) | ΔG <sub>298</sub> (kJ/mol) | G <sub>298</sub> (Hartree) | ΔG <sub>solv</sub> (kJ/mol) | ΔG <sub>298</sub> (kJ/mol) |       |
| -NH <sub>2</sub>  | N7                         | -2196,78498                 | -98,9                      | 0,0                        | -2196,474589                | -111,8                     | 0,0   |
|                   | TS <sub>DMSO</sub>         | -2196,735129                | -121,9                     | 107,9                      | -2196,407747                | -155,2                     | 132,1 |
|                   | I'                         | -2196,745332                | -143,1                     | 59,9                       | -2196,416007                | -159,0                     | 106,6 |
|                   | N9                         | -2196,782415                | -104,7                     | 0,9                        | -2196,468227                | -105,2                     | -23,3 |
| -CH <sub>3</sub>  | N7                         | -2180.710496                | -98.8                      | 0,0                        | -2180.407076                | -112.8                     | 0,0   |
|                   | TS <sub>DMSO</sub>         | -2180.666403                | -106.3                     | 108.2                      | -2180.351115                | -140.7                     | 119.0 |
|                   | I'                         | -2180.680876                | -123.6                     | 52.9                       | -2180.359749                | -151.6                     | 85.5  |
|                   | N9                         | -2180.715015                | -106,0                     | -19,1                      | -2180.414116                | -104.6                     | -10.3 |
| -NHBz             | N7                         | -2467.064696                | -123.4                     | 0,0                        | -2466.72225                 | -109.4                     | 0,0   |
|                   | TS <sub>DMSO</sub>         | -2467.025091                | -112.1                     | 107,3                      | -2466.672196                | -128.5                     | 112.3 |
|                   | I'                         | -2467.040493                | -127.2                     | 59.8                       | -2466.682                   | -127.6                     | 87.5  |
| -OBz <sup>a</sup> | N7                         | -1933.76925                 | -107.7                     | 0,0                        | -1933.462015                | -108.7                     | 0,0   |
|                   | TS <sub>DMSO</sub>         | -1933.717474                | -133.2                     | 110.5                      | -1933.417582                | -148.7                     | 76.6  |
|                   | I'                         | -1933.722833                | -110,0                     | 119.6                      | -1933.425639                | -146.9                     | 57.3  |

<sup>a</sup> Kod –OBz derivata prikazani rezultati dobiveni su korištenjem jedne eksplicitne molekule otapala, dok su svi drugi rezultati u tablici dobiveni korištenjem dvije eksplicitne molekule DMSO-a.

## 5. ZAKLJUČCI

Intramolekulski prijenos acilne skupine s položaja N7 na položaj N9 u purinskom prstenu potvrđen je eksperimentalno  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom te računalnim podacima. Izomerizacija se događa u polarnom organskom otapalu DMSO-u te se odvija kinetikom prvog reda. N7/N9 transacilacija odvija se do uspostave ravnoteže u kojoj su prisutna oba izomera pri čemu je N9-izomer stabilniji te ga u ravnotežnoj smjesi ima više. Konstanta ravnoteže  $K_{\text{eq}}$  slična je za četiri purinska derivata koja se razlikuju u supstituentu na C6-atomu ( $\text{R} = -\text{NH}_2, -\text{CH}_3, -\text{NHBz}, -\text{OHBz}$ ). Unatoč sličnim vrijednostima konstante ravnoteže, konstanta brzine reakcije znatno se razlikuje za ispitane derivate purina pri čemu je najbrža reakcija transacilacije u C6- $\text{NH}_2$  derivatu ( $t_{1/2} = 1,9$  h), a najsporija u C6-OBz derivatu ( $t_{1/2} = 105,0$  h). Nekoliko je reakcijskih mehanizama ranije opisanih u literaturi, koji bi se mogli smatrati potencijalnim mehanizmima transacilacije, ispitano računalno-kemijskim DFT metodama korištenjem M06L te B3LYP funkcionala. Jedini reakcijski mehanizam koji odgovara eksperimentalno dobivenim podacima je transacilacija potpomognuta otapalom. Reakcija se odvija  $\text{S}_{\text{N}}2$ -like mehanizmom. U slučaju adenina, eksperimentalno dobivena vrijednost energetske barijere za reakciju transacilacije ( $\Delta G_{\text{exp}}^{\ddagger} = 102,7$  kJ/mol) uspješno je reproducirana računalnim metodama na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD ( $\Delta G_{\text{calc}}^{\ddagger} = 107,9$  kJ/mol). Veća sklonost C6-amino supstituiranih derivata reakciji transacilacije može se objasniti postojanjem intramolekulske vodikove veze između amino skupine C6-supstituenta i karbonilne skupine u molekuli koja povećava reaktivnost karbonilne skupine. Analogne migracije acilne skupine primjećene su i u drugim aciliranim purinima u DMSO-u što je dokaz kako bi ovakva pregradnja mogla biti uobičajena reakcije aciliranih derivata nukleobaza.

## 6. LITERATURA

Ahuja S, Scypinski S. Handbook of modern pharmaceutical analysis. San Diego, Academic Press, 2001, str. 147-166.

Bachrach SM. Computational Organic Chemistry. 2nd ed., New Jersey, John Wiley & Sons, 2014, str. 29-40.

Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. Phys Rev A, 1988, 38, 3098-3100.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 722.

Biot C, Dive D. Ferrocene Conjugates of Chloroquine and other Antimalarials: the Development of Ferroquine, a New Antimalarial. ChemMedChem 2008, 3, 383 – 391.

Boryski J. Transglycosylation Reactions of Purine Nucleosides. A Review. Nucleosides Nucleotides 1996, 15 (1–3), 771–791.

Clowney L, Jain SC, Srinivasan AR, Westbrook J, W. K. Olson WK, Berman HM. Geometric parameters in nucleic acids: nitrogenous bases. J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 505-518.

Creary X, Burtch EA, Jiang Z. Carbocation-Forming Reactions in Dimethyl Sulfoxide. J. Org. Chem. 2003, 68 (3), 1117–1127.

Creary X, Burtch EA. Remarkably Facile Solvolyses of Triflates via Carbocationic Processes in Dimethyl Sulfoxide. J. Org. Chem. 2004, 69 (4), 1227–1234.

Dudycz LW, Wright GE. A Simple One-Pot Method for 6-Oxopurine Ribonucleoside Synthesis: Control and Mechanism of Isomer Distribution. Nucleosides Nucleotides 1984, 3 (1), 33–44

Dyson PJ, Allardyce CS, Dorcier A, Scolaro C. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. Appl. Organometal. Chem. 2005, 19, 1–10.

Dyson PJ, Metzler-Nolte N, Hartinger CG. Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs. Organometallics 2012, 31, 5677–5685.

Eiland PF, Pepinsky R. X-ray examination of iron biscyclopentadienyl. J Am Chem Soc, 1952, 74, 4971.

Fish RH, Jaouen G. Bioorganometallic Chemistry: Structural Diversity of Organometallic Complexes with Biologands and Molecular Recognition Studies of Several Supramolecular



Hosts with Biomolecules, Alkali-Metal Ions, and Organometallic Pharmaceuticals. *Organometallics*, 2003, 22, 2166-2177.

Fouda MFR, Abd-Elzaher MMM, Abdelsamaia RA, Labib AA. On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl. Organometal. Chem.* 2007, 21, 613–625.

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H et al. *Gaussian 16 Rev. B.01*; Wallingford, CT, 2016.

Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic Anticancer Compounds. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 3–25

Gasser G, Patra M. Organometallic Compounds: An Opportunity for Chemical Biology?. *ChemBioChem* 2012, 13, 1232 – 1252

Havaić V. Diplomski rad: Eksperimentalno i kvantno - kemijsko istraživanje regioselektivnog aciliranja ferrocenilnih derivata nukleobaza. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Hocek M, Soe P, Ludvik J, Cisaroevu I, Votruba I, Roeha D, Hobza P. Ferrocene-Modified Purines as Potential Electrochemical Markers: Synthesis, Crystal Structures, Electrochemistry and Cytostatic Activity of (Ferrocenylethynyl)- and (Ferrocenylethyl)purines. *Chem. Eur. J.* 2004, 10, 2058-2066

Hok L. Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila i ekotoksikološka analiza kloriranih produkata. Rad prijavljen za Rektorovu nagradu Sveučilišta u Zagrebu, 2017.

Holmén A, Broo A. A Theoretical Investigation of the Solution N(7)H ↔ N(9)H Tautomerism of Adenine. *Int. J. Quantum Chem.* 1995, 56 (S22), 113–122.

Kealy TJ, Pauson PL. A new type of organo-iron compound. *Nature*, 1951, 168, 1039-1040.

Kowalski K, Skiba J, Oehninger L, Ott I, Solecka J, Rajnisz A, Therrien B. Metallocene-Modified Uracils: Synthesis, Structure, and Biological Activity. *Organometallics* 2013, 32 (20), 5766–5773.

Kowalski K, Szczupak Ł, Saloman S, Steverding D, Jabłoński A, Vrček V, Hildebrandt A, Lang H, Rybarczyk-Pirek A. Cymantrene, Cyrtetrene and Ferrocene Nucleobase Conjugates: Synthesis, Structure, Computational Study, Electrochemistry and Antitrypanosomal Activity. *ChemPlusChem* 2017, 82 (2), 303–314.

Kowalski K. Ferrocenyl-Nucleobase Complexes: Synthesis, Chemistry and Applications. *Coord. Chem. Rev.* 2016, 317, 132–156.

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

McClelland RA, Kanagasabapathy VM, Banait NS, Steenken S. Flash-Photolysis Generation and Reactivities of Triarylmethyl and Diarylmethyl Cations in Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111 (11), 3966–3972.

Miller SA, Tebboth JA, Tremaine JF. Dicyclopentadienyliron. *J Chem Soc*, 1952, 632-635.

Minegishi S, Kobayashi S, Mayr H. Solvent Nucleophilicity. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126 (16), 5174–5181.

Miyaki M, Shimizu BN. N Alkyl and Glycosyl Migration of Purines and Pyrimidines. II. Glycosyl Migration of 3-Glycosyl-N6-Acyladenine Derivatives. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1970, 18 (4), 732–740.

Nastavni materijali iz kolegija Farmaceutska kemija 1, 2017./2018.

Phan TB, Nolte C, Kobayashi S, Ofial AR, Mayr H. Can One Predict Changes from SN1 to SN2 Mechanisms? *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131 (32), 11392–11401.

Pine SH. *Organska kemija*. Zagreb, Školska knjiga, 1994, str. 1065.

Računalni klaster Isabella, SRCE – Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računalni centar Srce. <https://www.srce.unizg.hr/en/isabella-cluster>.

Rao BR. Study of [1,3] Sigmatropic Hydrogen Migration in Adenine and Guanine by AM1 Method. *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 2012, 3 (1), 275–281.

Rausch M, Vogel M, Rosenberg H. Ferrocene: A novel organometallic compound. *J Chem Ed*, 1957, 34, 268-272.

Rendić S, Medić-Šarić M. *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 165.

Shimizu B, Miyaki M. Transglycosylation from Pyrimidines to Purines. *Tetrahedron Lett.* 1968, 9 (7), 855–859.

Singh A, Lumb I, Mehra V, Kumar V. Ferrocene-Appended Pharmacophores: An Exciting Approach for Modulating the Biological Potential of Organic Scaffolds. *Dalton Trans.* 2019, 48 (9), 2840–2860.

Skiba J, Yuan Q, Hildebrandt A, Lang H, Trzybiński D, Woźniak K, Balogh RK, Gyurcsik B, Vrčec V, Kowalski K. Ferrocenyl GNA Nucleosides: A Bridge between Organic and Organometallic Xeno-Nucleic Acids. *ChemPlusChem* 2018, 83 (2), 77–86.

Smith, S. G.; Winstein, S. Sulfoxides as Nucleophiles. *Tetrahedron* 1958, 3 (3), 317–319.

Šakić D, Hanževački M, Smith DM, Vrčec V. A Computational Study of the Chlorination and Hydroxylation of Amines by Hypochlorous Acid. *Org. Biomol. Chem.* 2015, 13 (48), 11740–11752. Dostupno na: <http://andrija.pharma.hr/Andrija/SCRIPT.html>

Šakić D. Doktorski rad: Kvantno-kemijsko istraživanje reakcija pregrađivanja odabranih psihofarmaka. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015.

Tandarić T. Diplomski rad: Mehanizam reakcije kloriranja 5-fluorouracila. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.

Toma M, Božičević L, Djaković S, Lapić J, Šakić D, Vrčec V, Vianello R, Tandarić T. Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J. Org. Chem.* 2019, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944>

Watson DG. *Pharmaceutical Analysis: A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists.* London, Churchill Livingstone, 2000, str. 146-166.

Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB. The structure of iron biscyclopentadienyl. *J Am Chem Soc*, 1952, 74, 2125-2126.

Young DC, Introduction. In *Computational Chemistry*, John Wiley & Sons, 2001; pp 1-4.

## 7. SAŽETAK

### TRANSACILACIJA U KONJUGATIMA FEROCENA I PURINSKIH BAZA. RAČUNALNA STUDIJA MEHANIZMA

Purinske baze mogu biti supstituirane ferocenoilnom skupinom pri čemu se ista može vezati na N7- te N9-atom purinskog prstena. U polarnom organskom otapalu dimetilsulfoksidu (DMSO) dolazi do interkonverzije dvaju izomera. Reakciju je moguće pratiti NMR-spektroskopijom. Iz podataka dobivenih praćenjem reakcije do uspostave ravnoteže moguće je odrediti eksperimentalne konstante brzine reakcija  $k_{\text{obs}}$  te konstante ravnoteže  $K_{\text{eq}}$  te izračunati promjenu Gibbsove slobodne energije potrebnu za odvijanje procesa.

Korištenjem računalno-kemijskih metoda modelirana su tri reakcijska mehanizma, ranije opisana u literaturi, koja bi potencijalno mogla odgovarati mehanizmu transacilacije u konjugatima ferocena i purinskih baza. Odgovarajućim procesima smatraju se oni čije su energetske barijere niže ili jednake eksperimentalno dobivenima. Reakcija koja uključuje dimetilsulfoksid kao nukleofilni reaktant jedina odgovara eksperimentalno dobivenim parametrima, zbog čega je ova  $S_{\text{N}}2$ -like reakcija najvjerojatnije odgovorna za transacilaciju konjugata ferocena i purinskih baza. Supstituenti na C6-atomu pokazuju znatan utjecaj na brzinu reakcije transacilacije.

Izomerizacija acilnih derivata purinskih baza u polarnim organskim otapalima, ukoliko njezin mehanizam nije poznat, predstavlja problem prilikom rukovanja sa spojevima. Transacilacija u polarnom otapalu poput DMSO-a nije ograničena samo na organometalne derivate purinskih baza, a poznavanje ovakvih reakcija moglo bi se pokazati ključnim i za derivate drugih nukleobaza, ali i brojnih heterocikličkih sustava.

## SUMMARY

### TRANSACYLATION IN FERROCENE DERIVATIVES OF PURINE NUCLEOBASES. COMPUTATIONAL STUDY OF THE MECHANISM

In ferrocene-nucleobase conjugates ferrocenoyl group can be placed at N7- and N9- atoms of purine ring. There is an interconversion between the two when the compound is dissolved in polar organic solvents, such as dimethylsulfoxide (DMSO). Reaction was followed using the NMR-spectroscopy until dynamic equilibrium is reached. From obtained experimental data,  $k_{\text{obs}}$  and  $K_{\text{eq}}$  can be determined, as well as  $\Delta G^\ddagger$ .

By use of DFT calculations, three reaction pathways, formerly described in literature, were considered and modelled. These reaction pathways are considered as potential transacylation mechanisms if the calculated energy barriers are lower or close to the experimental ones. Only the  $S_{\text{N}2}$ -like reaction mechanism involving DMSO as a nucleophilic reactant agrees well with experimental data. It was also determined that C6-substituent of purine ring has a great influence on reaction kinetics.

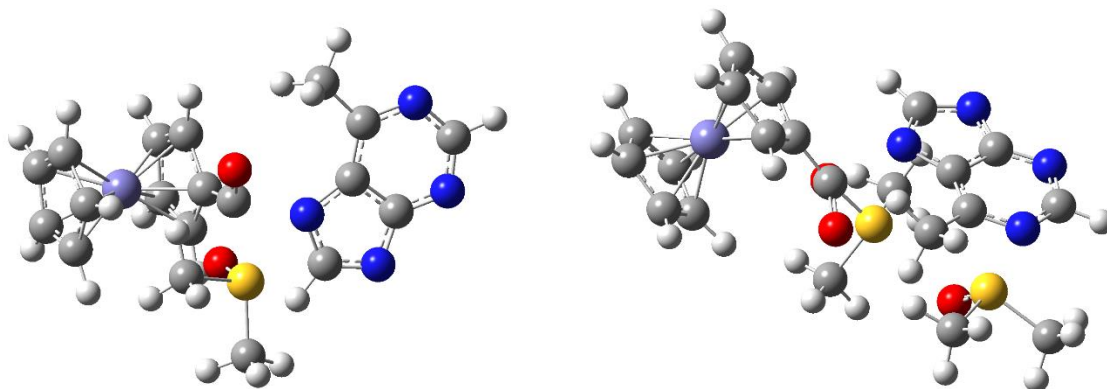
Isomerization of acylated purines in polar organic solvent, DMSO, is of great importance for treating or dissolving acylated purines in it. Transacylation is not limited to organometallic-nucleobase conjugates and could possibly be important in many other purine-acyl derivatives, as well as some other heterocyclic systems in general.

## 8. PRILOZI

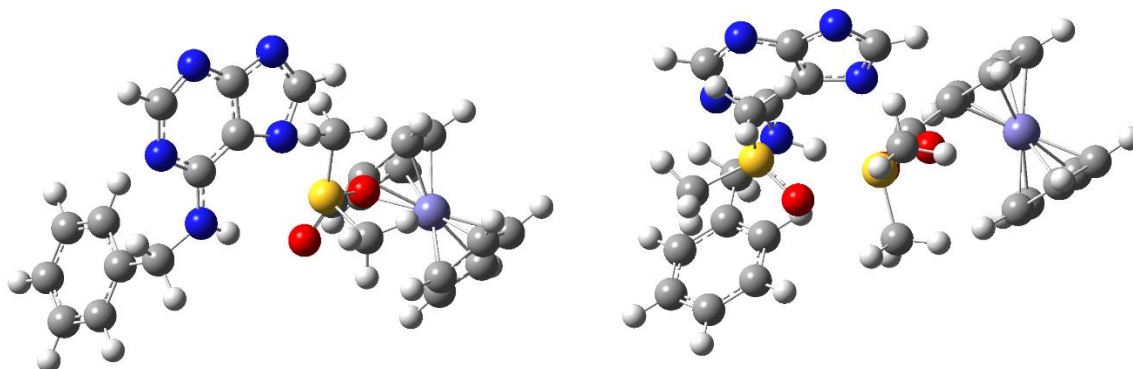
**Prilog 1.** Izračunate slobodne Gibbsove i solvatacijske energije svih stacionarnih točaka u reakciji transacilacije potpomognute otapalom. Računi su provedeni na teorijskim razinama M06L/6-311+G(d,p)/SDD i B3LYP/6-31G(d)/SDD uz 0-3 eksplicitno dodanih molekula DMSO-a.

| Stacionarne točke            | Supstituenti                              | Broj eksplicitno dodanih molekula DMSO-a | M06L/6-311+G(d,p)/SDD      |                             | B3LYP/6-31G(d)/SDD         |                             |
|------------------------------|---|--|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|                              |   |  | G <sub>298</sub> (Hartree) | ΔG <sub>solv</sub> (kJ/mol) | G <sub>298</sub> (Hartree) | ΔG <sub>solv</sub> (kJ/mol) |
| <b>N7</b>                    | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 0  | -1090,448912               | -88,5                       | -1090,220363               | -88,1                       |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1643,612561               | -99,2                       | -1643,349503               | -99,5                       |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2196,784980               | -98,9                       | -2196,474589               | -111,8                      |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 3  | -2749,934531               | -108,8                      | -2749,601430               | -115,7                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 0  | -1074,376314               | -84,1                       | -1074,158740               | -80,3                       |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1627,546869               | -78,1                       | -1627,284458               | -96,7                       |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2180,710496               | -98,8                       | -2180,407076               | -112,8                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 3  | -2733,871145               | -102,0                      | -2733,532501               | -121,1                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 0  | -1360,734579               | -99,1                       | -1360,474224               | -99,7                       |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 1  | -1913,896427               | -116,9                      | -1913,598704               | -111,4                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 2  | -2467,064696               | -123,4                      | -2466,722250               | -109,4                      |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 0  | -1380,605514               | -88,1                       | -1380,342093               | -89,2                       |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 1  | -1933,769250               | -107,7                      | -1933,462015               | -108,7                      |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 2  | -2486,945024               | -87,7                       | -2486,588971               | -95,9                       |
| <b>N9</b>                    | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 0  | -1090,452108               | -82,4                       | -1090,224032               | -81,8                       |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1643,616989               | -91,9                       | -1643,344560               | -92,9                       |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2196,782415               | -104,7                      | -2196,468227               | -105,2                      |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 3  | -2749,938679               | -105,1                      | -2749,606034               | -109,9                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 0  | -1074,381647               | -75,7                       | -1074,166958               | -69,9                       |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1627,545886               | -88,6                       | -1627,291578               | -95,1                       |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2180,715015               | -106,0                      | -2180,414116               | -104,6                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 0  | -1360,736980               | -98,3                       | -1360,481070               | -89,8                       |
| R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc | 0   | -1380,608832                             | -84,3                      | -1380,348301                | -85,5                      |                             |
| <b>TS<sub>DMSO</sub></b>     | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1643,555786               | -135,9                      | -1643,278954               | -146,4                      |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2196,735129               | -121,9                      | -2196,407747               | -155,2                      |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 3  | -2749,876255               | -159,4                      | -2749,535928               | -161,3                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1627,486773               | -122,9                      | -1627,220583               | -133,3                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2180,666403               | -106,3                      | -2180,351115               | -140,7                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 3  | -2733,808539               | -159,0                      | -2733,476275               | -145,4                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 1  | -1913,841917               | -142,9                      | -1913,534090               | -154,2                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 2  | -2467,025091               | -112,1                      | -2466,672196               | -128,5                      |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 1  | -1933,717474               | -133,2                      | -1933,417582               | -148,7                      |
| R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc | 2   | -2486,885215                             | -120,2                     | -2486,527223                | -124,2                     |                             |
| <b>I'</b>                    | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1643,563068               | -154,3                      | -1643,287841               | -151,6                      |
|                              | R = NH <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2196,745332               | -143,1                      | -2196,416007               | -159,0                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 1  | -1627,495002               | -148,1                      | -1627,232299               | -147,0                      |
|                              | R = CH <sub>3</sub> , R <sub>1</sub> = Fc | 2  | -2180,680876               | -123,6                      | -2180,359749               | -151,6                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 1  | -1913,846937               | -161,3                      | -1913,543666               | -158,1                      |
|                              | R = NHBz, R <sub>1</sub> = Fc             | 2  | -2467,040493               | -127,2                      | -2466,682000               | -127,6                      |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 1  | -1933,722833               | -110,0                      | -1933,425639               | -146,9                      |
|                              | R = OBz, R <sub>1</sub> = Fc              | 2  | -2486,913547               | -70,8                       | -2486,559095               | -123,8                      |

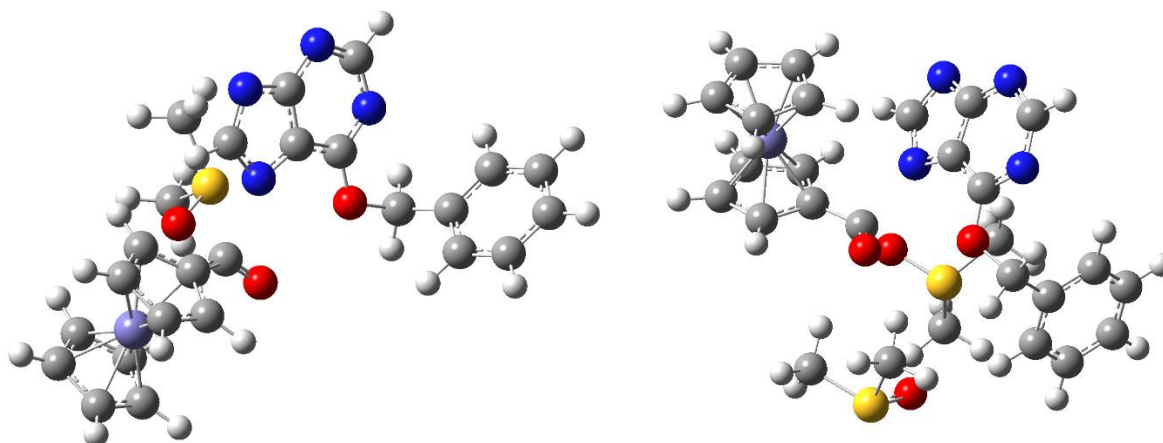
**Prilog 2.** Optimizirane strukture derivata purina s C6-supstuentima –CH<sub>3</sub>, -NHBz i –OBz. Strukture su optimizirane na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD



- a) Strukture prijelaznih stanja reakcije transacilacije potpomognute otapalom za derivat purina supstituiran metilnom skupinom na C6-atomu. Prikazane su strukture s jednom (lijevo) i dvije (desno) eksplicitno dodane molekule DMSO-a. Strukture su optimizirane na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD.



- b) Strukture prijelaznih stanja reakcije transacilacije potpomognute otapalom za derivat purina supstituiran NH-benzilnom skupinom na C6-atomu. Prikazane su strukture s jednom (lijevo) i dvije (desno) eksplicitno dodane molekule DMSO-a. Strukture su optimizirane na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD.



- c) Strukture prijelaznih stanja reakcije transacilacije potpomognute otapalom za derivat purina supstituiran O-benzilnom skupinom na C6-atomu. Prikazane su strukture s jednom (lijevo) i dvije (desno) eksplicitno dodane molekule DMSO-a. Strukture su optimizirane na teorijskoj razini M06L/6-311+G(d,p)/SDD.



### Prilog 3. Životopis

Lucija Božičević rođena je 1995. godine u Ogulinu gdje je završila Prvu osnovnu školu te opći smjer Gimnazije Bernardina Frankopana. 2014. godine upisuje farmaciju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 2017. godine sudjeluje u istraživačkom znanstvenom radu na fakultetu na polju računalne kemije pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka te doc. dr. sc. Davora Šakića. Tijekom tog razdoblja objavljena su dva znanstvena rada na kojima je jedna od koautorica:

1. Hok L, Božičević L, Sremec H, Šakić D, Vrček V. Racemization of oxazepam and chiral 1,4-benzodiazepines. DFT study of the reaction mechanism in aqueous solution. *Org. Biomol. Chem.*, 2019, 17, 1471-1479.
2. Toma M, Božičević L, Djaković S, Lapić J, Šakić D, Vrček V, Vianello R, Tandarić T. Transacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of the Isomerization Mechanism. *J. Org. Chem.* 2019, <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01944>.

Za znanstveni rad "Mehanizam racemizacije oksazepama" nagrađena je Rektorovom nagradom u ak. god. 2017./2018. te je održala postersko izlaganje na konferenciji "Computational Chemistry Day" i usmeno izlaganje na FARMEBS-u u 2018. godini. Na FARMEBS-u 2019. godine održano je postersko izlaganje rada „Reakcijski mehanizam transaciliranja ferocenoil-purina. Računalna studija“ koji je prezentirala Mateja Toma, a na kojem je koautorica. U 2019. godini bila je koautorica i na posteru prezentiranom na konferenciji Computational Chemistry Day pod nazivom „Reaction mechanism of transferrocenylation of purines. A DFT study“ na kojem je sudjelovala u organizaciji projekta.

Tijekom studiranja također se počinje aktivnije uključivati u rad Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije Hrvatske (CPSA) kroz sudjelovanje u organizacijskim i pomoćnim odborima na raznim projektima. Bila je članica organizacijskih odbora 5. i 6. Kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije te Natjecanja u konzultacijskim vještinama 2018, a sudjelovala je i u pomoćnim odborima 4. Kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije te Natjecanja u kliničkim vještinama 2017. i Danima karijera.

Od akademske godine 2017./2018. aktivni je član redakcije časopisa Recipe te jedna od 5 članova redakcije portala Recipe. Za potrebe tog projekta na tjednoj bazi piše znanstveno-popularne članke iz različitih područja biomedicinskih znanosti te sudjeluje u uređivanju web stranice te Facebook Like Pagea. Za rad na Recipe portalu, zajedno s ostalim članovima redakcije osvojila je Rektorovu nagradu u ak. god. 2018./2019. u kategoriji F za društveno koristan rad u akademskoj i široj društvenoj zajednici.

Mnogo je područja koja su joj u području interesa, ali ističu se računalna i organska kemija, biokemija te farmakologija. Općenito je fasciniraju mehanistički principi, kako oni kemijskih reakcija, tako i oni raznih fizioloških procesa ili djelovanja lijekova u organizmu.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### TRANSACILACIJA U KONJUGATIMA FEROCENA I PURINSKIH BAZA. RAČUNALNA STUDIJA MEHANIZMA

Lucija Božičević

#### SAŽETAK

Purinske baze mogu biti supstituirane ferocenoilnom skupinom pri čemu se ista može vezati na N7- te N9-atom purinskog prstena. U polarnom organskom otapalu dimetilsulfoksidu (DMSO) dolazi do interkonverzije dvaju izomera. Reakciju je moguće pratiti NMR-spektroskopijom. Iz podataka dobivenih praćenjem reakcije do uspostave ravnoteže moguće je odrediti eksperimentalne konstante brzine reakcija kobs te konstante ravnoteže  $K_{eq}$  te izračunati promjenu Gibbsove slobodne energije potrebnu za odvijanje procesa. Korištenjem računalno-kemijskih metoda modelirana su tri reakcijska mehanizma, ranije opisana u literaturi, koja bi potencijalno mogla odgovarati mehanizmu transacilacije u konjugatima ferocena i purinskih baza. Odgovarajućim procesima smatraju se oni čije su energetske barijere niže ili jednake eksperimentalno dobivenima. Reakcija koja uključuje dimetilsulfoksid kao nukleofilni reaktant jedina odgovara eksperimentalno dobivenim parametrima, zbog čega je ova SN2-like reakcija najvjerojatnije odgovorna za transacilaciju konjugata ferocena i purinskih baza. Supstituenti na C6-atomu pokazuju znatan utjecaj na brzinu reakcije transacilacije. Izomerizacija acilnih derivata purinskih baza u polarnim organskim otapalima, ukoliko njezin mehanizam nije poznat, predstavlja problem prilikom rukovanja sa spojevima. Transacilacija u polarnom otapalu poput DMSO-a nije ograničena samo na organometalne derivate purinskih baza, a poznavanje ovakvih reakcija moglo bi se pokazati ključnim i za derivate drugih nukleobaza, ali i brojnih heterocikličkih sustava.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 19 grafičkih prikaza, 3 tablice i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ferocen, purinske baze, transacilacija, DFT metode, računalna studija

Mentor: **Dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Davor Šakić**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Valerije Vrček**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Tin Weitner**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2019.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Analytical Chemistry, Department of  
Organic Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### TRANSACYLATION IN FERROCENE DERIVATIVES OF PURINE NUCLEOBASES. COMPUTATIONAL STUDY OF THE MECHANISM

Lucija Božičević

#### SUMMARY

In ferrocene-nucleobase conjugates ferrocenoyl group can be placed at N7- and N9-atoms of purine ring. There is an interconversion between the two when the compound is dissolved in polar organic solvents, such as dimethylsulfoxide (DMSO). Reaction was followed using the NMR-spectroscopy until dynamic equilibrium is reached. From obtained experimental data,  $k_{obs}$  and  $K_{eq}$  can be determined, as well as  $\Delta G^\ddagger$ . By use of DFT calculations, three reaction pathways, formerly described in literature, were considered and modelled. These reaction pathways are considered as potential transacylation mechanisms if the calculated energy barriers are lower or close to the experimental ones. Only the  $S_N2$ -like reaction mechanism involving DMSO as a nucleophilic reactant agrees well with experimental data. It was also determined that C6-substituent of purine ring has a great influence on reaction kinetics. Isomerization of acylated purines in polar organic solvent, DMSO, is of great importance for treating or dissolving acylated purines in it. Transacylation is not limited to organometallic-nucleobase conjugates only and could possibly be important in many other purine-acyl derivatives, as well as some other heterocyclic systems in general.

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

Thesis includes: 38 pages, 19 figures, 3 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ferrocene, purine nucleobases, transacylation, DFT methods, computational study

Mentor: **Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Co-mentor: **Valerije Vrček, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Davor Šakić, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Valerije Vrček, Ph.D.** *Full Professor*, 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: May 2010.

