

# Fotokemijska reakcija razgradnje ferocenskih derivata purina i pirimidina

---

Petrinec, Lana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:840567>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-06**



Repository / Repozitorij:

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



**Lana Petrinec**

**Fotokemijska reakcija razgradnje ferocenskih  
derivata purina i pirimidina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-IP-2016-06-1137 (Kvantno-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza, OrDeN), pod vodstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka i neposrednim vodstvom Mateje Toma mag. appl. chem.

Zahvaljujem se dr. Martinu Lončariću, znanstvenom suradniku na Institutu „Ruđer Bošković“ na savjetima i posudbi korištenih izvora svjetlosti.

Posebno se zahvaljujem asistentici Mateji Toma mag. appl. chem na velikoj podršci prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, te mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na brojnim savjetima, pomoći i velikom strpljenju.

## SADRŽAJ

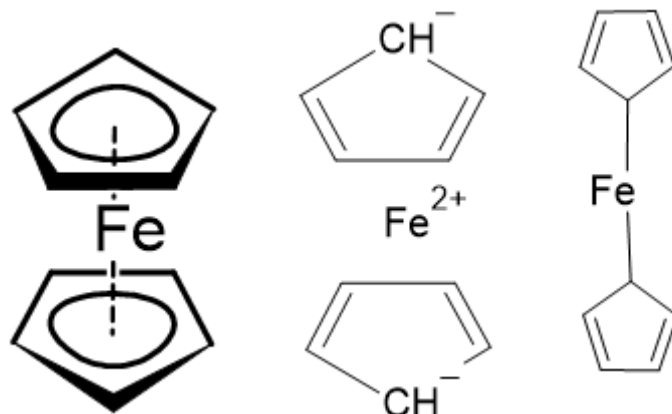
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Ferocen.....	1
1.2. Istraživanja fotokemije ferocena i derivata.....	2
1.3. Kemijska kinetika.....	5
1.4. Red fotokemijske reakcije.....	6
1.5. Konjugati ferocena i nukleobaza.....	7
1.6. Antitumorski lijek 5-fluorouracil.....	8
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>11</b>
3.1. Priprava spojeva.....	11
3.1.1. N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin.....	11
3.1.2. N1-ferocenoil-5-fluorouracil.....	14
3.1.3. 4-fluorobenzoil-purin.....	15
3.2. NMR spektrometrija.....	18
3.3. Deuterirana otapala.....	19
3.4. Eksperimentalni postupak.....	20
3.5. Odabir prikladnog izvora zračenja.....	23
3.6. Metoda početne brzine.....	26
3.7. Tankoslojna kromatografija.....	27
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>28</b>
4.1. Fotokemijska razgradnja N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina.....	28
4.1.1. Reakcija pokrenuta različitim izvorima u različitim otapalima.....	28
4.1.2. Provjera hipoteze o pokretanju reakcije isključivo svjetlošću.....	29
4.1.3. Eksperiment s derivatom u krutom stanju.....	33
4.1.4. Izolacija produkta fotorazgradnje.....	33
4.1.5. Ispitivanje početne brzine reakcije.....	34
4.1.6. Kinetika fotorazgradnje.....	36
4.1.7. Ispitivanje utjecaja otopljenih plinova u uzorku na fotorazgradnju.....	39
4.1.8. Ispitivanje utjecaja vode u uzorku na fotokemijsku reakciju.....	39
4.2. Fotokemijska razgradnja N1-ferocenoil-5-fluorouracila.....	41
4.3. Fotokemijska razgradnja N,N-difenil-1-ferocenkarboksamida.....	44
4.4. Spojevi koji su fotostabilni u danim uvjetima.....	46

4.5. Značaj rezultata.....	47
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>48</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>49</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>52</b>
<b>9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....</b>	<b>54</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Ferocen

Ferocen je jedna od najposebnijih i najpoznatijih molekula koje su kemičari otkrili u dvadesetom stoljeću (Okuda, 2016).



**Slika 1.** Različiti načini prikazivanja strukture ferocena u literaturi.

Ferocen pripada skupini organometalnih kompleksa koji se zovu metaloceni. To su spojevi građeni od dvaju paralelnih aromatskih prstenova između kojih je ugrađen atom ili ion prijelaznog elementa. Ferocen je metalocen građen od jednog iona željeza ( $\text{Fe}^{2+}$ ) koji se nalazi u „sendviču“ između dvaju paralelnih ciklopentadienilnih aniona (Roberts i Caserio, 1965; Pine, 1984).

Pripravljen je slučajno, 1951. godine, tijekom istraživačkog rada Pausona i Kealyja (Kealy i Pauson, 1951). Nakon tog povijesnog događaja, došlo je do naglog razvoja organometalne kemije. To je područje koje proučava kemijske spojeve s vezom ugljik-metal (Astruc, 2007). U sljedećim godinama otkrivena su mnoga svojstva ferocena i njegovih mnogobrojnih derivata. (Fery-Forgues i Delavaux-Nicot, 2000). Ferocen je danas važan molekularni fragment koji se koristi za pripravu složenijih struktura. Suvremenim metodama moguće je pripremiti raznolike derivate s mnogim ciljanim svojstvima. Ovakvo ponašanje ferocenu omogućuje njegova izvanredna stabilnost (Roberts i Caserio, 1965).

## 1.2. Istraživanja fotokemije ferocena i derivata

Fotokemija proučava kemijske procese potaknute apsorpcijom svjetlosti iz ultraljubičastog ili vidljivog područja. Valna duljina primijenjenog zračenja ne smije biti kraća od 200 nm kako bi se reakcija mogla nazvati fotokemijskom (Pine, 1984).

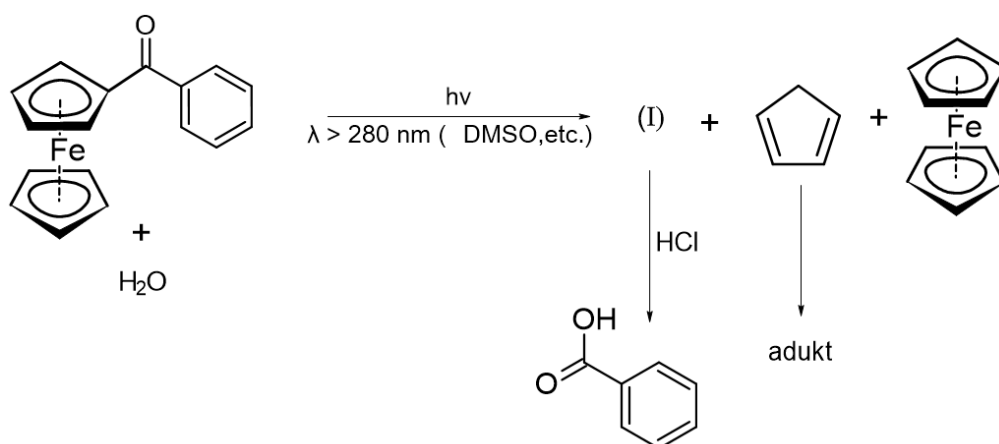
Brojni su radovi u kojima je istraživano kako se ferocenski derivati ponašaju u interakciji sa svjetlošću. Rezultati ukazuju da su ferocenski derivati uglavnom fotokemijski inertni, odnosno stabilni. Ponekad, međutim, svjetlost pokreće njihovu kemijsku promjenu (Fery-Forgues i Delavaux-Nicot, 2000).

Nedugo nakon otkrića ferocena, objavljeni su prvi radovi o njegovim fotokemijskim svojstvima. Tarr i Wiles u svom radu opisali su interakciju svjetlosti s ferocenom i odabranim derivatima otopljenima u različitim otapalima. Pripremljene otopine zračene su ultraljubičastim zračenjem živine lampe (uz filter koji zaustavlja zračenja  $\lambda < 230$  nm) ili su bile izložene sunčevom zračenju. Promjene su praćene snimanjem UV apsorpcijskih spektara ozračenih otopina. Ustanovljeno je da dolazi do razgradnje spojeva. Reakcija ovisi o otapalu i (u manjoj mjeri) o valnoj duljini zračenja. Reakcija se ne pokreće dokle god su otopine u tami. Time je dokazano da je zaista riječ o fotokemijskoj reakciji (Tarr i Wiles, 1968).

Ferocen u otopini ili kao čvrsta tvar stabilan je na UV zračenje. Razgradnju ferocena moguće je pokrenuti jedino kada se kao otapalo koriste organoklorna otapala, poput tetraklormetana. Kao razlog razgradnje u tetraklometanu navodi se reakcija prijenosa naboja s ferocena na molekulu tetraklormetana. (Tarr i Wiles, 1968; Ali i sur, 1973).

Pripravljene derivati ferocena otopljeni su u metanolu i izloženi sunčevoj svjetlosti. Otkriveno je da su acil-feroceni znatno osjetljiviji na fotorazgradnju u odnosu na alkil-ferocene. Primjer acil-ferocena je spoj dibenzoil-ferocen (DBZF). Nakon zračenja otopina DBZF-a pripremljenih u različitim otapalima najčešće dolazi do fotokemijske razgradnje. U gotovo svim otapalima koja sadrže u strukturi kisik ili dušik DBZF se razgrađuje. U polarnijim otapalima kao što su piridin, DMF, DMSO u tijeku reakcije nastaje tamnoljubičasto-smeđa otopina bez taloga. Smatra se da u navedenim fotoreakcijama sudjeluje otapalo kao reaktant (Tarr i Wiles, 1968).

Drugo je mišljenje da reakciju ketona ne izaziva organsko otapalo, već voda koja je prisutna kao onečišćenje u otapalima. Proveden je eksperiment u kojem su izrađene otopine benzoilferocena (BZF) u DMSO-u i zatim ozračene. Kada je korišten „svježe destiliran, bezvodan“ DMSO nije došlo do reakcije. Reakcija je pokrenuta nakon dodatka vode (Ali i sur, 1973).



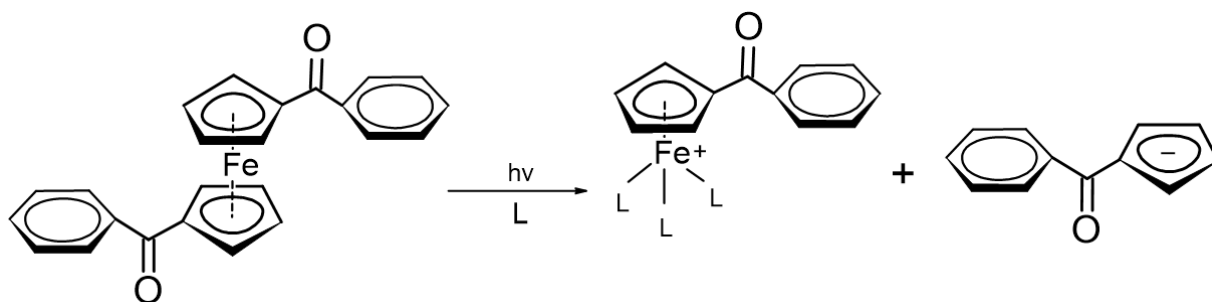
**Slika 2.** Razgradnja benzoilferocena (ketona) potaknuta svjetlošću pri čemu kao produkti nastaju karboksilna kiselina, ciklopentadien (dokazan NMR spektrometrijom i nastankom Diels-Alder adukta u reakciji s anhidridom maleinske kiseline) i ferocen u tragovima (Ali i sur, 1973).

U većem broju radova potvrđeno je da je ciklopentadien produkt fotokemijske razgradnje acil-ferocena (Tarr i Wiles, 1968; Heaney i Logan, 1977; Yamaguchi i sur, 2006).

U otopinama kojima su uklonjeni otopljeni plinovi reakcija je usporena. Čini se da se razgradnja odvija kroz dva procesa. U prvom dijelu reakcije ne sudjeluje kisik, a za drugi dio je nužan. (Tarr i Wiles, 1968; Ali i sur, 1977).

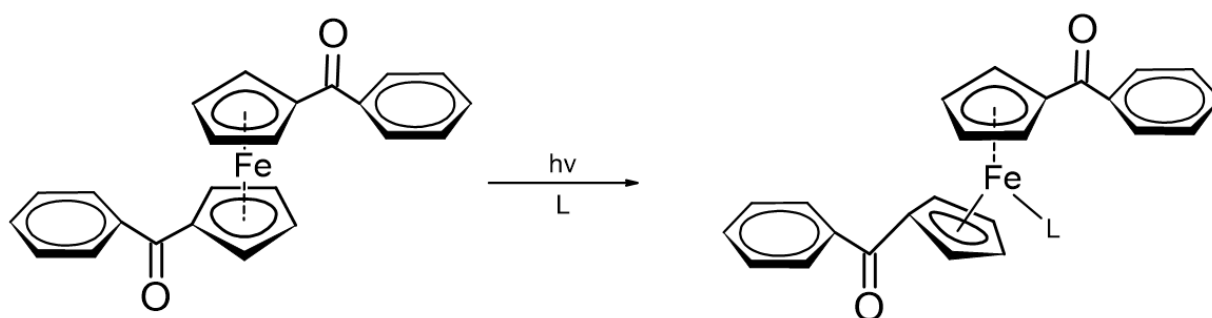
Yamaguchi i suradnici također su istraživali fotokemiju dibenzoil-ferocena. Otopina DBZF-a u acetonitrilu s dodatkom iona natrija ozračena je unutar sustava masenog spektrometra. Maseni spektar sadržavao je tri glavne skupine produkata. Jednu skupinu čine adukti benzoil-ciklopentadiena s protonom ili natrijem, a drugu skupine čine adukti kompleksa željeza(II) i protona koji imaju strukturu „polusendviča“. Treća skupina su kompleksi željeza(II) opće formule  $[\text{Fe}(\text{AN})_n]^{2+}$  gdje je AN acetonitril.





**Slika 3.** Pretpostavljena primarna fotokemijska reakcija dibenzoilferocena na temelju produkata dobivenih masenom spektrometrijom. Oznaka L predstavlja molekulu otapala.

Otapalo ima važnu ulogu u fotokemijskoj reakciji jer pomaže u nastanku intermedijera nukleofilnim napadom na elektrofilni metalni centar. Pritom dolazi do djelomičnog uklanjanja peteročlanog prstena ferocena.



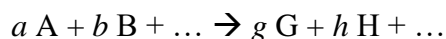
**Slika 4.** Predloženi fotoinducirani gubitak benzoil-ciklopentadienilnog liganda. Oznaka L predstavlja molekulu otapala.

Intermedijer može dalje reagirati s otapalom što dovodi do stvaranja „polusendvič“ kompleksa. Druga je mogućnost uklanjanje molekule otapala i regeneracija početnog reaktanta (Yamaguchi i sur, 2006).

### 1.3. Kemijska kinetika

Grana kemije koja proučava brzine kemijskih reakcija naziva se kemijska kinetika (Petrucci i sur, 2017). Glavni faktori koji utječu na brzinu kemijske reakcije su priroda reaktanata, koncentracija reaktanata, temperatura, površina čvrstih reaktanata, zračenja (valova i čestica) i prisutnost stranih tvari (katalizatora) (Filipović i Lipanović, 1987).

Jedan od ciljeva kemijske kinetike je definiranje jednadžbi kojima se predviđa odnos između brzine reakcije i koncentracija reaktanata. Eksperimentalno se dobiva jednadžba koja se naziva zakon brzine. U zamišljenoj reakciji :



gdje  $a, b \dots$  predstavljaju koeficijente u uravnoteženoj jednadžbi, zakon brzine može se izraziti kao:

$$\text{brzina reakcije} = k [A]^m [B]^n \dots$$

Oznake  $[A], [B], \dots$  predstavljaju molarnosti reaktanata, a eksponenti  $m, n, \dots$  najčešće su mali pozitivni brojevi koji se određuju eksperimentalno. Red reakcije je suma svih eksponenata  $m + n + \dots$ , a  $k$  je konstanta brzine reakcije. Što je njena vrijednost veća, brzina reakcije je veća. Kada je suma eksponenata  $m + n + \dots$  jednaka nuli, tada je riječ o reakciji nultog reda. Zakon brzine glasi :

$$\text{brzina reakcije} = k [A]^0 = k$$

Brzina reakcije nultog reda je konstantna i ne ovisi o koncentracijama reaktanata.

Kada je suma eksponenata  $m + n + \dots = 1$ , tada je to reakcija prvog reda.

Zakon brzine glasi :

$$\text{brzina reakcije} = k [A]^1$$

pri čemu brzina reakcije ovisi o koncentraciji reaktanta (Petrucci, 2017). Kemijske reakcije u kojima sudjeluje samo jedan reaktant, bilo da se pretvara u drugu molekulu ili raspada, nazivaju se unimolekulskim reakcijama, koje su najčešće prvog reda. Međutim, reakcija prvog reda ne mora nužno biti unimolekulska. Postoje reakcije u kojima reagiraju dva

reaktanta, a da je pritom brzina promjene koncentracije proporcionalna koncentraciji samo jednog reaktanta. Za takve reakcije kaže se da su pseudo-prvog reda. To su često reakcije kod kojih je jedan reaktant u suvišku (Filipović i Lipanović, 1987). Kinetika nultog reda uvijek nastaje kao posljedica uvjeta reakcije. Iz tog razloga, reakcije koje slijede kinetiku nultog reda često se još nazivaju reakcijama pseudo-nultog reda (<https://chem.libretexts.org/>).

#### 1.4. Red fotokemijske reakcije

U slučaju fotokemijskih reakcija, način na koji dolazi do pada koncentracije reaktanta ovisi o specifičnim parametrima. Primjer fotokemijske reakcije je pretvorba reaktanta A u produkt B, pri čemu samo A apsorbira zračenje. Broj molova A koji reagira u vremenu može se izraziti kao :

$$\frac{\phi Q (1 - 10^{-\epsilon cl})}{N_A}$$

$\phi$  - kvantno iskorištenje

Q - broj kvantata koji u sekundi ulaze u reakcijsku posudu

$\epsilon$  - molarni ekstinkcijski (apsorpcijski) koeficijent

l - duljina puta svjetlosti kroz posudu

$N_A$  - Avogadrov broj

c – koncentracija reaktanta A

U slučaju da je  $\epsilon cl > 2$ , broj molova A koji reagiraju u jedinici vremena je približno  $\frac{\phi Q}{N_A}$ .

Brzina reakcije tada je neovisna o koncentraciji A, odnosno reakcija je nultog reda. Ukoliko je

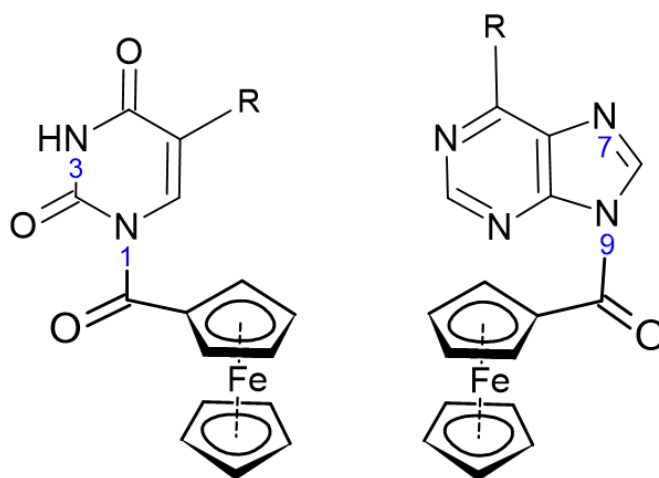
$\epsilon cl \ll 1$ , broj molova A koji reagira u vremenu iznositi će  $\frac{2,303\phi Q\epsilon cl}{N_A}$ . U tom slučaju brzina je

izravno proporcionalna koncentraciji, a reakcija je prvog reda.

Povećanje koncentracije reaktanta najlakši je način kako se reakcija prvog reda može prevesti u reakciju nultog reda. Sličan učinak može se ostvariti i odabirom valne duljine za koju reaktant ima veći  $\epsilon$  ili povećanjem duljine puta svjetlosti kroz reakcijsku posudu. Iz svega navedenog slijedi da je kvantno iskorištenje jedini zaista koristan parametar za iskazivanje efikasnosti fotokemijskih reakcija (Logan, 1997).

## 1.5. Konjugati ferocena i nukleobaza

U posljednjem desetljeću u području bioloških istraživanja porastao je interes za organometalne komplekse. U porastu je interes za njihovo antibakterijsko, antiparazitsko i antitumorsko djelovanje (Kowalski i sur, 2016). Feroceni i nukleobazu moguće je povezati u jednu molekulu putem različitih kemijskih poveznica, odnosno *linkera*. Jedan od jednostavnijih je karbonilna skupina. Ovakav tip konjugata moguće je sintetizirati u reakciji između nukleobaze i ferocenoil-klorida (Toma i sur, 2019).



**Slika 5.** Opća formula konjugata ferocena i pirimidinskih, odnosno purinskih nukleobaza u kojima su navedeni elementi povezanih preko karbonilne skupine. Lijevo je struktura derivata ferocenoil-pirimidina, a desno derivata ferocenoil-purina. Ferocenoilni fragment može biti povezan s pirimidinskom bazom preko N1 ili N3 dušikovog atoma, a s purinskom preko N7 ili N9 atoma. Izomeri koji nastaju vezanjem ferocenoilnog fragmenta na različite dušikove atome nukleobaza nazivaju se regioizomeri.

Otkriveno je da se u otopini DMSO-a odvija reakcija transacilacije, odnosno pregradnja N7-izomera u N9-izomer i obrnuto dok se ne uspostavi ravnoteža. (Toma i sur, 2019).

## 1.6. Antitumorski lijek 5-fluorouracil

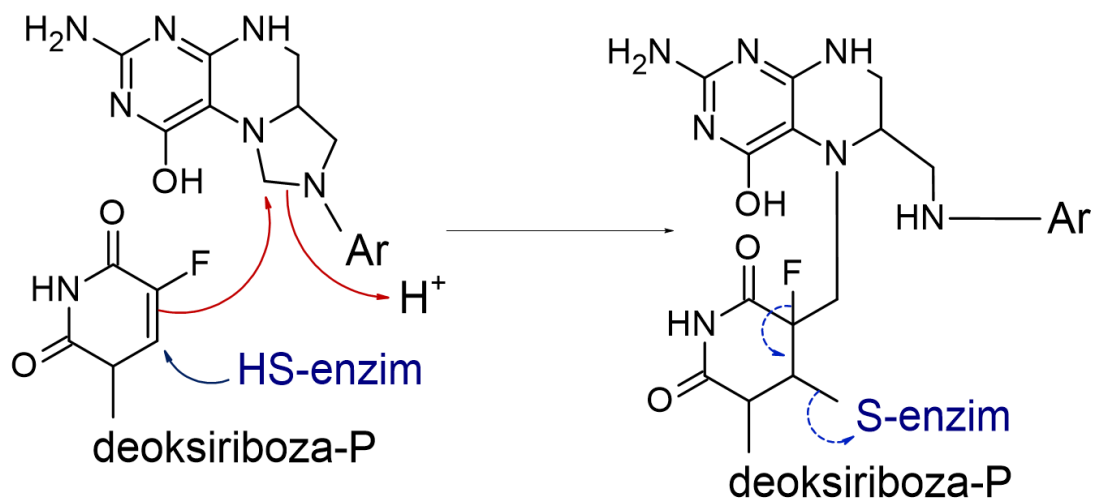
Neki derivati purina i pirimidina primjenjuju se u medicini kao lijekovi. Primjer je 5-fluorouracil (5-FU) koji se zbog svog citotoksičnog djelovanja koristi u terapiji karcinoma. Djeluje tako što u tumorskim stanicama inhibira enzim timidilat sintazu (TS), koji katalizira reakciju metilacije deoksiuridilat monofosfata (dUMP) iz kojeg nastaje deoksitimidilat monofosfat (dTMP). Enzimu je za reakciju potreban i kofaktor, 5,10-metilentetrahidrofolat. Inhibicijom enzima TS-a spriječena je biosinteza dTMP-a, bez kojeg stanica ne može sintetizirati molekulu DNA.

Fluorouracil nakon konverzije u fluorodeoksiuridilat (FdUMP) u ljudskom organizmu ulazi u reakciju kataliziranu enzimom TS-om kao da je fiziološki supstrat (dUMP). Tetrahidrofolat formira kovalentnu vezu s uracilom preko metilenskog mosta. U slučaju fiziološkog supstrata, uracil se metilira i gubi proton na položaju 5, a nakon toga se oslobađaju enzim i molekula dTMP-a. Budući da fluorouracil na položaju 5 ima atom fluora umjesto vodika, reakcija se zaustavlja. Za nastavak reakcije bilo bi potrebno da fluor postane kation ( $F^+$ ) i iziđe iz kompleksa kao izlazna skupina, što nije moguće, jer je fluor previše elektronegativan. Fluorouracil ostaje kovalentno vezan u aktivnom mjestu enzima i sinteza timidina je zaustavljena.

Fluorouracil se primjenjuje parenteralno zbog nepotpune i nepredvidive apsorpcije nakon *per os* primjene. Neželjeni učinci uključuju anoreksiju, mučninu, stomatitis i dijareju, a čija pojava je ujedno znak da je primijenjena dovoljno velika doza. Najopasniji toksični učinak je mijelosupresija (Brunton i sur, 2018; Patrick, 2013).

Kapicitabin i tegafur su prolijekovi 5-fluorouracila koji su danas u primjeni i kojima je riješen problem nepredvidive peroralne apsorpcije (Pazdur i sur, 1998). Prolijekovi su molekule koje nisu (ili su vrlo slabo) farmakološki aktivne, ali *in vivo* enzimskom ili kemijskom reakcijom prelaze u aktivne spojeve (Rautio i sur, 2018).

Ferocen je prikladan molekulski fragment za pripravu lijekova, jer je stabilan u fiziološkom mediju i dovoljno lipofilan za prolazak kroz stanične membrane. Ferokin i ferocifen primjeri su lijekova kandidata koji u strukturi sadrže ferocenski fragment (Chellan i Sadler, 2020; Peter i Aderibigbe, 2019).



**Slika 6.** Mehanizam inhibicije timidilat sintaze. U prvom koraku nastaje kovalentna veza između metilenske skupine tetrahydrofolata i fluorodeoksiuridilata. Enzim preko sulfhidrilne skupine tvori kovalentnu vezu sa supstratom. U idućem koraku, fluor bi trebao otpustiti elektrone i izaći u obliku kationa (prikazano isprekidanim plavim strelicama), no to se ne događa i enzim je ireverzibilno inhibiran.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog istraživanja je opisati uvjete pri kojima dolazi do fotokemijski potaknute razgradnje konjugata ferocena i nukleobaza. Opisati reakcijske uvjete podrazumijeva istražiti utjecaj koncentracije reaktanata, prisutnosti plinova u otapalu, medija u kojemu se reakcija odvija i učinka valne duljine zračenja na reakciju. Cilj je osim toga dobivene rezultate usporediti s rezultatima prijašnjih radova u kojima je proučavana fotorazgradnja sličnih ferocenskih derivata, poput dibenzoil-ferocena. U ovom su radu predstavljeni konjugati ferocena i nukleobaza čija fotokemijski potaknuta razgradnja još nije opisana u znanstvenoj literaturi.

Različiti derivati ferocena i nukleobaza sintetizirani su u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju te su im određena spektroskopska i redoks svojstva (Toma i Vrček, 2020). Ovim je radom prošireno razumijevanje stabilnosti i fotokemijskih svojstava tih spojeva, što je ujedno i svrha rada.

Reakcijske otopine zračene su različitim izvorima svjetlosti u mjerenim vremenskim intervalima nakon čega su snimani NMR spektri. Na temelju spektara dobivena su saznanja o nastalim produktima, kinetici i utjecaju različitih parametara na reakciju.

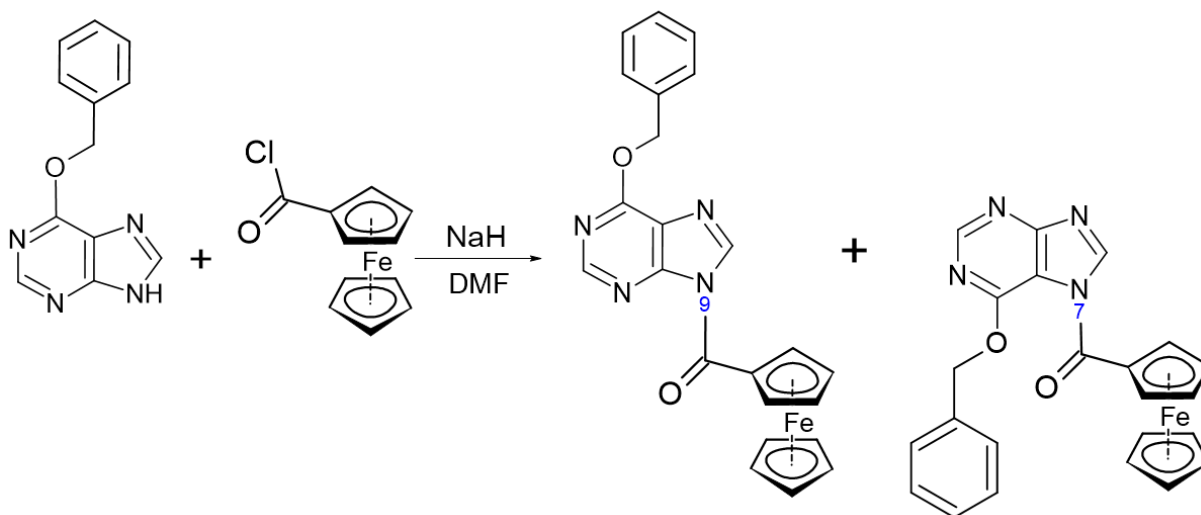
Danas se derivati ferocena koriste u mnogim područjima. Primjenjuju se kao molekularne probe (Bhatta i sur, 2017), u istraživanju novih lijekova (Chellan i Sadler, 2020), u poljoprivredi (Floris, 2015), pri sintezi polimera, katalizi reakcija, za izradu raketnog goriva (Larik i sur, 2016). Veliko zanimanje za ferocenske derivate i njihova široka primjena potvrda su relevantnosti odabrane teme.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Priprava spojeva

##### 3.1.1. N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin

Tikvica okruglog dna volumena 25 ml propuhana je argonom. Zatim su u nju dodani 6-benziloksipurin (253.4 mg, 1.120 mmol) i natrijev hidrid (40.2 mg, 1.675 mmol) otopljeni u 5 ml dimetilformamida (DMF). Smjesa je miješana magnetom uz magnetsku miješalicu pri brzini od 400 okretaja u minuti. Nakon pola sata miješanja, tikvica s reakcijskom smjesom uronjena je u uljnu kupelj i zagrijana do temperature 50°C uz konstantno miješanje kako bi se pospješilo otapanje. Nakon ukupno sat vremena miješanja, u reakcijsku smjesu dodan je ferocenoil-klorid (360 mg, 1,457 mmol), a miješanje je nastavljeno idućih desetak minuta. Završetak reakcije određen je pomoću tankoslojne kromatografije (TLC).



**Slika 7.** Reakcija sinteze ferocenoil-(6-benziloksi)purina u dimetilformamidu. Natrijev hidrid dodaje se radi aktivacije nukleobaze. Nastaju dva produkta, N7- i N9-izomeri ferocenoil-(6-benziloksi)purina.

Otopina je neutralizirana dodatkom klorovodične kiseline ( $10^{-3}$  M) i destilirane vode pri završetku reakcije. Reakcijska smjesa je prenesena u lijevak za ekstrakciju i ekstrahirana diklormetanom. Ukoliko spoj slabo prelazi u organski sloj, dodaje se zasićene otopine natrijeva klorida (NaCl). Ekstrakcija je ponovljena nekoliko puta. U sloj diklormetana u kojemu je otopljen produkt dodan je natrijev sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) za uklanjanje zaostale vode iz organskog otapala. Otopina je filtrirana i skupljena u tikvici okruglog dna volumena 100 mL.



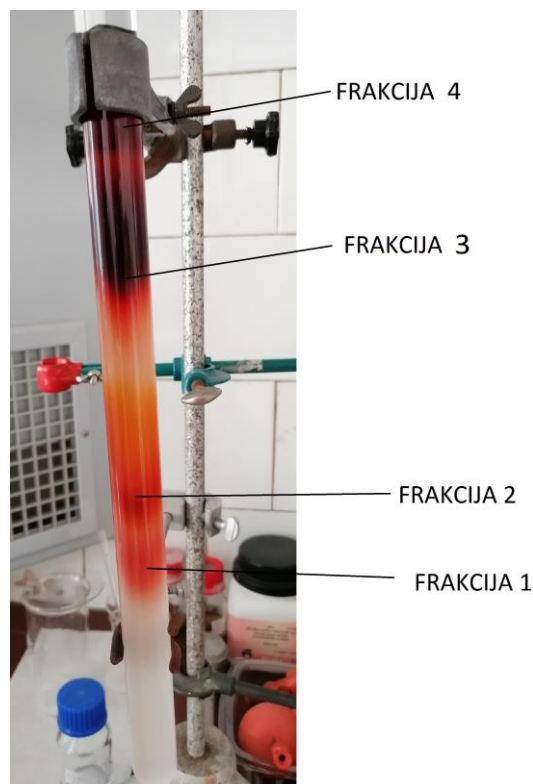
**Tablica 1.** Tvari korištene za reakciju sinteze ferocenoil-(6-benziloksi)purina.

	<b>Spoj</b>	<b>Proizvođač i karakteristike</b>
<b>Purinska baza</b>	6-benziloksipurin	TCI; >98%
<b>Otapalo</b>	Dimetilformamid (DMF)	Kemika
<b>Kiselinski klorid</b>	Ferocenoil-klorid	Sigma Aldrich; $\geq 96,0\%$
<b>Baza za aktivaciju</b>	Natrijev hidrid (NaH)	Sigma Aldrich 98%



**Slika 8.** Aparatura za pripravu ferocenoilne nukleoaze. U tikvici se nalazi reakcijska smjesa koja sadrži 6-benziloksipurin aktiviran bazom NaH u DMF-u prije dodatka kiselinskog klorida. Reakcijska smjesa miješa se magnetskom miješalicom, iznad koje je i smještena tikvica.

Sljedeći korak je pročišćavanje produkta reakcije kolonskom kromatografijom. Kolona je ispunjena silikagelom. Sustav otapala sadrži diklormetan i aceton (DCM : AC = 10 : 0.5). Prije nanošenja na kolonu, volumen otopine dobivene ekstrakcijom reduciran je rotacijskim uparivačem.



**Slika 9.** Razdvajanje produkata reakcije ferocenoil-klorida i 6-benziloksimurina kolonskom kromatografijom.

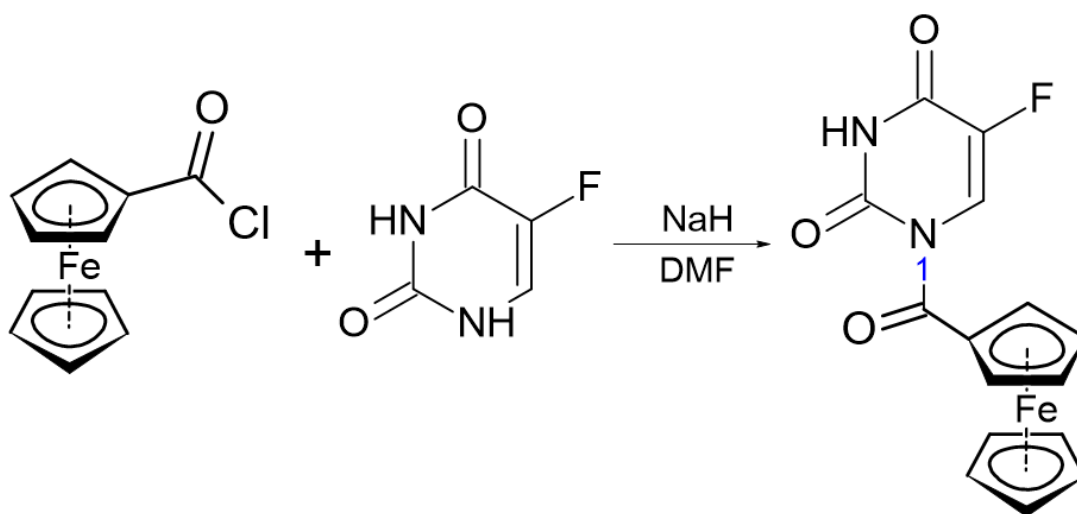
Na pločicu silikagela nanese mrlje frakcija razdvojenih kolonskom kromatografijom. Pločica je uronjena u sustav otapala DCM : AC = 10 : 0.5 , a nakon toga je osušena i pregledana ispod UV lampe. Frakcije jednakog sastava spojene su. Frakcije za koje je pregledom kromatograma procijenjeno da sadrže previše onečišćenja ponovno su pročišćene kolonskom kromatografijom. Tijekom postupka jasno su razdvojene dvije tamnocrvene frakcije (frakcije 3 i 4 na slici 9). Osim njih, razdvojene su još dvije, sadržajem tvari manje frakcije (frakcija 1 i 2 na slici 9). Pregledom  $^1\text{H}$  NMR spektra ustanovljeno je da frakcija 3 sadrži N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin, koji je željeni produkt reakcije. Frakcija 4 sadrži N7- izomer istog spoja. Frakcija 1 i 2 sadrže produkte razgradnje i predstavljaju onečišćenja. U frakciji 1 je identificiran ferocen prisutan u tragovima, a u frakciji 2 ferocenska kiselina.

N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin: crveni kristali (169 mg,  $\eta$  = 34.47 %)

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm):  $\delta$  8.89 (1H, s, C8-H), 8.63 (1H, s, C2-H), 7.47 (5H, m,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 5.66 (2H, s,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O-}$ ), 5.02 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2$  Hz,  $H\text{-}\beta'$ ), 4.81 (2H, t,  $^3J_{\text{HH}} = 2$  Hz,  $H\text{-}\alpha'$ ), 4.33 (5H, s, Cp), 3.30 (2H, s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 2.48 (6H, s,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ).

### 3.1.2. N1-ferocenoil-5-fluorouracil

U tikvici okruglog dna propuhanoj argonom otopljeni su 5-fluorouracil (63.2 mg, 0.486 mmol) i natrijev hidrid (30 mg, 0.729 mmol) u 3 mL dimetilformamida. Reakcijska smjesa je miješana magnetskom miješalicom i zagrijavana u uljnoj kupelji tijekom sat vremena do temperature  $50^\circ\text{C}$ , nakon čega je dodan ferocenoil-klorid (120 mg, 0.486 mmol).



**Slika 10.** Reakcija sinteze N1-ferocenoil-5-fluorouracila. Reaktanti ferocenoil-klorid i 5-fluorouracil otopljeni su u dimetilformamidu uz dodatak natrijeva hidrida koji se koristi za aktivaciju nukleobaze. Nije opažen nastanak N3-regioizomera.

Kraj reakcije određen je tankoslojnom kromatografijom. Reakcijska smjesa zakiseljena je dodatkom klorovodične kiseline ( $c = 10^{-3}$  M) uz dodatak vode i ekstrahirana diklormetanom. Otopina natrijeva klorida dodaje se ukoliko spoj teže prelazi iz vodenog u organski sloj. Organski sloj, koji sadrži produkt, osušen je dodatkom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i filtriran. Pročišćavanje je provedeno kolonskom kromatografijom uz sustav otapala DCM : EtOAc = 10 : 1.

$^1\text{H}$  NMR spektrometrijom potvrđena je prisutnost željenog produkta.

N1-ferocenoil-5-fluorouracil: sitni crveni kristali (38 mg,  $\eta = 22.86\%$ )

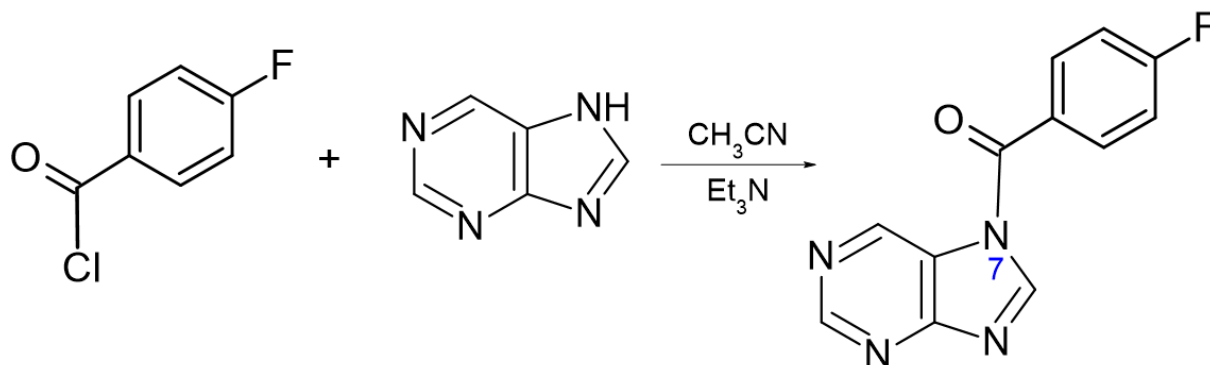
$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm) :  $\delta$  11.99 (1H, s, N3-H), 8.43 (1H, d,  $^2J_{\text{HF}} = 6.4$  Hz, C4-H=C5-F), 4.89 (2H, t, H- $\alpha'$ ), 4.73 (2H, t, H- $\beta'$ ), 4.34 (5H, s, Cp), 3.31 (2H, s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 2.48 (6H, s,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ).

**Tablica 2.** Kemikalije korištene za reakciju sinteze ferocenoil-5-fluorouracila.

	<b>Spoj</b>	<b>Proizvođač i svojstva</b>
<b>Pirimidinska baza</b>	5-fluorouracil	Alfa Aesar, 99%
<b>Otapalo</b>	Dimetilformamid (DMF)	Kemika
<b>Kiselinski klorid</b>	Ferocenoil-klorid	Sigma Aldrich; $\geq 96,0\%$
<b>Baza za aktivaciju</b>	Natrijev hidrid (NaH)	Sigma Aldrich, 56%

### 3.1.3. 4-fluorobenzoil-purin

U tikvici okruglog dna propuhanoj argonom otopljeni su purin (100 mg, 0.833 mmol) i trietilamin (104.6  $\mu\text{L}$ , 0.75 mmol) u 3 mL acetonitrila. Reakcijska smjesa miješana je magnetskom miješalicom i zagrijavana u uljnoj kupelji do temperature  $50^\circ\text{C}$  tijekom 40 minuta. Tikvica s reakcijskom smjesom uklonjena je iz kupelji i ohlađena, nakon čega je dodan 4-fluorobenzoil-klorid (93.5  $\mu\text{L}$ , 0.79 mmol).



**Slika 11.** Reakcija sinteze 4-fluorobenzoilpurina. Reaktanti 4-fluorobenzoil-klorid i purin otopljeni su u acetonitrilu uz dodatak trietilamina koji se koristi za aktivaciju nukleobaze. Kao glavni produkt nastaje N7-izomer.

Završetak reakcije određen je tankoslojnom kromatografijom u sustavu DCM : AC = 1:1.

Reakcijska smjesa je filtrirana i dopunjena diklormetanom. Ekstrahirana je vodom uz dodatak

klorovodične kiseline ( $c = 10^{-3}\text{M}$ ) . Sloju diklormetana dodan je  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  za uklanjanje zaostale vode. Spoj je pročišćen kolonskom kromatografijom u sustavu DCM : AC = 5:1, a kasnije je tijekom pročišćavanja omjer promijenjen (DCM : AC = 1:1). Skupljene frakcije uparene su rotacijskim uparivačem. Prisutnost željenog produkta potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR spektrometrijom.

N7-4-fluorobenzoil-purin: bijeli kristali (9,5 mg ,  $\eta = 4.71\%$ )

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , 400 MHz, 298 K, ppm) :  $\delta$  11.99 (1H, s, N3-*H*), 8.43 (1H, d,  $^2J_{\text{HF}} = 6.4$  Hz, C4-*H*=C5-*F*), 4.89 (2H, t, *H*- $\alpha'$ ), 4.73 (2H, t, *H*- $\beta'$ ), 4.34 (5H, s, Cp), 3.31 (2H, s,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 2.48 (6H, s,  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ ).

**Tablica 3.** Kemikalije potrebne za reakciju priprave 4-fluorobenzoil-purina.

	<b>Spoj</b>	<b>Proizvođač i svojstva</b>
<b>Nukleobaza</b>	Purin	Acros Organics, 99%
<b>Otapalo</b>	Acetonitril	Kemika
<b>Kiselinski klorid</b>	4-fluorobenzoil-klorid	Sigma Aldrich, 98%
<b>Baza za aktivaciju</b>	Trietilamin	Kemika

**Tablica 4.** Pribor i oprema korišteni tijekom priprave svih spojeva.

<b>Pribor</b>	<b>Tip opreme</b>
Mikropipeta 100 – 1000 $\mu\text{L}$	P1000, Gilson pipetman
Mikropipeta 20 – 200 $\mu\text{L}$	P200, Gilson pipetman
Magnetska miješalica i grijač	Heidolph MR3001
Rotacijski uparivač	Heidolph, Laborota 4000
Silika gel za kromatografiju	Acros Organics 0,060 – 0,200 mm, 60 Å
Laboratorijska vaga	HAA 2287, Acculab sartorius group
TLC pločice	Sigma Aldrich, silika gel na aluminijskim folijama s fluorescentnim indikatorom (254 nm)
UV lampa za pregled TLC pločica	UVP UVGL-58, Analytik Jena; 254 nm/365 nm

Osim svega navedenog, za pripravu spojeva i eksperimentalni rad općenito potreban je stakleni pribor (tikvice okruglog dna, Erlenmeyerove tikvice, pipete, obični lijevci, lijevci za ekstrakciju, čaše, stakleni štapić, kolone za kromatografiju, NMR cjevčice, menzure, kapalice, sinter filter), metalni pribor (stativ, mufa, klema, špatula, pinceta) i ostalo (termometar, uljna kupelj, pamučna vata, argon za stvaranje inertne atmosfere, šprice, igle, Eppendorf epruvete, papirnate lađice za vaganje).

U poglavlju 4.3. opisana je reakcija N,N-difenil-1-ferocenkarkboksamida koji je nabavljen od proizvođača Sigma-Aldrich.

### 3.2. NMR spektrometrija

Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije (NMR) je važna spektroskopska metoda za određivanje strukture organskih spojeva. Spektrometar može „opaziti“ samo one jezgre koje imaju neparni atomski broj ili neparni maseni broj. Takve jezgre imaju nuklearni spin. Najjednostavnija jezgra je proton koji je moguće zamisliti kao mali rotirajući pozitivni naboj. Gibanjem naboja stvara se lokalno magnetsko polje. Kada se nađe u snažnom vanjskom magnetskom polju, zauzima jedno od dva moguća energetska, odnosno spinska stanja. Veći je broj jezgara koje zauzmu stanje niže energije. Što je jače vanjsko magnetsko polje, razlika u energiji između dva stanja je veća. Kada je jezgra u magnetskom polju izložena djelovanju radio-valova, ona apsorbira energiju. Pritom dolazi do prelaska iz stanja niže u stanje više energije. Tada je jezgra „u rezonanciji“. Razlike u frekvenciji rezonancije pojedinih jezgara nastaju zbog razlike u elektronskoj gustoći oko različitih protona u molekuli. Što je elektronska gustoća veća, potrebno je jače vanjsko magnetsko polje da bi došlo do rezonancije pri danoj frekvenciji. Signali koji se pojavljuju u spektru razlikuju se po površinama. U protonskom spektru omjeri površina jednaki su omjeru broja raznovrsnih protona u molekuli. Signali u spektru mogu biti spregnuti, a to daje informaciju o susjednim protonima u molekuli (Wade, 2017).

Za potrebe ovog rada korišten je NMR spektrometar Varian INOVA 400 koji proizvodi magnetsko polje jakosti 9.4 T pri čemu jezgre vodika rezoniraju na frekvenciji od 400 MHz.



**Slika 12.** NMR spektrometar Varian INOVA 400.

### 3.3. Deuterirana otapala

Deuterirana otapala u svojoj strukturi umjesto izotopa vodika procija ( $^1\text{H}$ ) sadrže izotop deuterij ( $^2\text{H}$  ili D) (<https://chem.libretexts.org/>). Koriste se za pripremu uzoraka koji se analiziraju NMR spektrometrijom. Spektar uzorka pripremljenog u običnom, nedeuteriranom otapalu sadrži (osim signala otopljenih tvari) signale otapala koji su vrlo velikih površina. Ponekad ti signali prekriju manje signale koji potječu od tvari prisutnih u manjim količinama, što je problem prilikom interpretacije spektara. Deuterirana otapala nemaju vidljive signale u protonskom spektru. Postupkom kojim se danas pripremaju deuterirana otapala nije moguće u potpunosti zamijeniti izotop  $^1\text{H}$  deuterijem, ali je udio nedeuteriranih molekula malen ( $\leq 1\%$ ). Zaostale molekule otapala koje sadrže  $^1\text{H}$  vidljive su u spektru, ali je signal znatno manji nego



kad se koristi obično, nedeuterirano otapalo. Iako nije vidljiv u protonskim spektrima, signal deuterija registrira se specijalnim sustavom unutar spektrometra (*lock system*). Ovaj sustav tijekom eksperimenata održava konstantnu jakost magnetskog polja u kojem se nalazi uzorak (Shoolery, 1972; <http://www2.chem.uic.edu/nmr/downloads/bruker/>). Za provođenje eksperimenata predstavljenih u ovome radu korišteni su deuterirani dimetilsulfoksid (DMSO-d<sub>6</sub>), dimetilformamid (DMF-d<sub>7</sub>), acetonitril-d<sub>3</sub>, aceton-d<sub>6</sub> i voda-d<sub>2</sub>.

### 3.4. Eksperimentalni postupak

Izvagana masa ferocenoil-purina (ferocenoil-pirimidina) u Eppendorf epruveti zaštićena je od svjetlosti aluminijskom folijom. Deuterirano otapalo mikropipetom je dodano u epruvetu. Derivat je otopljen laganim miješanjem rukom ili u ultrazvučnoj kupelji. Izrađena otopina brzo je kapalicom premještena iz epruvete u NMR cjevčicu zaštićenu aluminijskom folijom.

Za svaku izrađenu otopinu ferocenoilne nukleobaze snimljen je <sup>1</sup>H NMR spektar prije kontroliranog pokretanja reakcije odabranim izvorom zračenja. Svrha snimanja početnog spektra je da se procijeni stabilnost derivata u odabranom otapalu. Osim toga, početnim spektrom provjerava se eventualni raspad početnog spoja potaknut zračenjem tijekom izrade otopina. U spektru prikladno izrađene otopine prisutni su isključivo signali početnog spoja (uz signale otapala). Nakon toga se uzorak prenosi iz NMR spektrometra do aparature za ozračivanje. Jednostavna aparatura sastoji se od stativa, pričvršćene lampe i držača za NMR cjevčicu. Cjevčicu s uzorkom potrebno je namjestiti na način da je vanjski zid cjevčice u izravnom kontaktu s lampom. Aparatura je smještena u uvjetima koji onemogućuju interakciju uzorka s vanjskim izvorima svjetlosti. Uzorak se zrači u definiranim vremenskim intervalima od 10 sekundi do nekoliko minuta. Vrijeme zračenja mjereno je mobilnom aplikacijom Multi Stopwatch and Timer. Nakon zračenja otopinu je potrebno promiješati kako bi bila homogena. Neposredno nakon toga slijedi snimanje novog <sup>1</sup>H NMR spektra. Zračenje uzoraka i snimanje spektara provedeno je na temperaturi 25°C.

Nakon završetka eksperimenta, dobiveni spektri i podaci interpretirani su pomoću računalnih programa. Za uređivanje i interpretiranje <sup>1</sup>H NMR spektara korišten je program MestReNova (MNOVA) verzija 14.2.0 i verzija 6.0.2-5475 proizvođača Mestrelab Research. Relativni porast koncentracije produkta u vremenu dobije se integriranjem signala produkta razgradnje i

otapala. Obradom eksperimentalnih podataka u programu Microsoft Excel dobiva se krivulja koja predstavlja ovisnost koncentracije produkta o vremenu zračenja uzorka.

Za eksperiment kojim se ispituje utjecaj otopljenih plinova u otapalu na reakciju fotorazgradnje korišten je DMSO kojem su uklonjeni otopljeni plinovi. Postupak uklanjanja otopljenih plinova iz tekućina naziva se otplinjavanje. Aparatura za otplinjavanje sastoji se od vakuum-pumpe povezane putem cijevi s hladnom stupicom i staklenim razdjelnikom. Razdjelnik se grana na tri otvora s ventilima. Postupak otplinjavanja započinje uključivanjem vakuum-pumpe i uranjanjem hladne stupice u posudu s tekućim dušikom. Hladna stupica služi kao spremnik u kojem se kondenziraju i zaustavljaju plinovite tvari (kao što su pare otapala) koje bi u protivnom dospjele u unutrašnjost pumpe i ondje potencijalno izazvale oštećenja. Staklena tikvica u kojoj je otapalo priključena je na otvor razdjelnika i uronjena u posudu s tekućim dušikom. Nakon što se otapalo skrutnulo, plinovi u tikvici iznad otapala uklonjeni su pumpom. Tikvica je zatim ugrijana, a otapalo se rastalilo. Otopljeni plinovi izlaze iz otapala u obliku mjehurića zbog niskog tlaka. Postupak je ponovljen nekoliko puta kako bi se povećala učinkovitost, odnosno kako bi se uklonilo što više otopljenih plinova (<https://schlenklinesurvivalguide.com/>).



**Slika 13.** Dio aparature za otplinjavanje. Desno je hladna stupica uronjena u Dewarovu posudu punjenu tekućim dušikom. Lijevo od nje je staklena tikvica u kojoj je skrutnuto otapalo priključena na stakleni razdjelnik. Pumpa se nalazi desno od hladne stupice.



**Slika 14.** Vakuumpumpa Varian DS 102, model 949-9315 stvara vakuum do  $10^{-3}$  bara.  
Sastavni je dio aparature za otplinjavanje otapala.

### 3.5. Odabir prikladnog izvora zračenja

Prikladan izvor odabran je pokretanjem reakcije i praćenjem nastanka produkta u vremenu snimanjem  $^1\text{H}$  NMR spektara. Glavni kriteriji po kojima su odabrane lampe za eksperimente su prikladno vrijeme trajanja reakcije i jednostavnost uklapanja u aparaturu za ozračivanje.

**Tablica 5.** Ispitivani izvori zračenja i valne duljine koje proizvode.

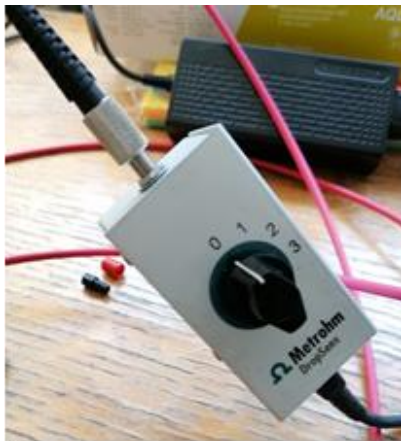
Naziv lampe	Valna duljina zračenja (nm)
Elegoo Mercury Plus Washing & Curing Machine for LCD/DLP/SLA Printed Models	385 i 405
Model D 1000 CE UV Light Source, Analytical Instrument Systems, Inc	200 – 800
Metrohm DropSens	200 – 650
Crvena lampa	645
UV lampa	395
Plava lampa	405



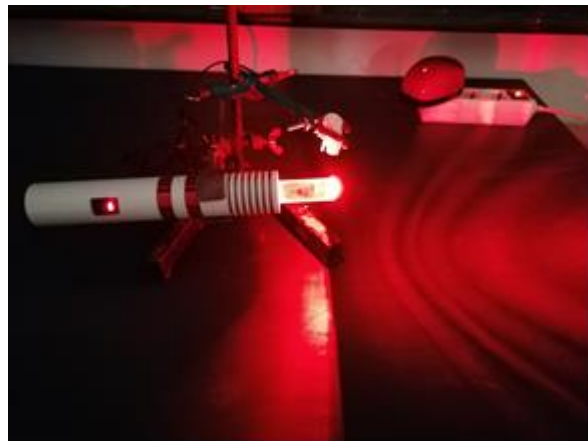
**Slika 15.** Elegoo Mercury Plus lampa.



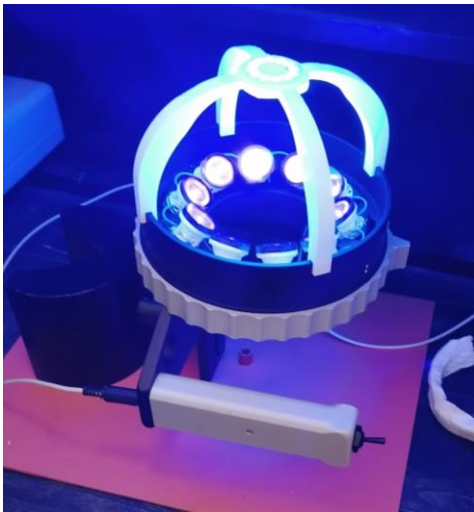
**Slika 16.** D 1000 CE Light Source.



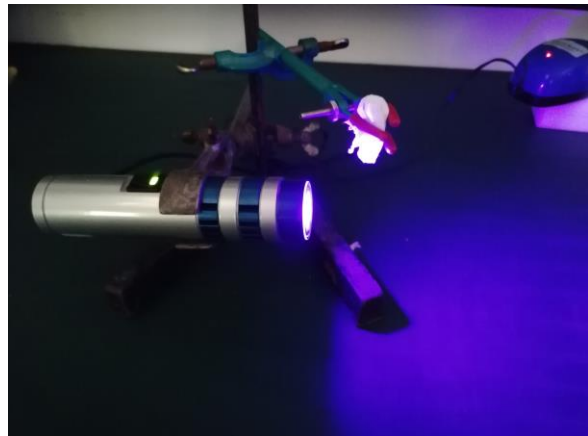
**Slika 17.** Metrohm DropSens.



**Slika 18.** Crvena lampa zračenja valne duljine 645 nm.



**Slika 19.** UV lampa. Bijela konstrukcija na vrhu lampe je 3D printani stalak za NMR cijevčice.



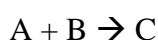
**Slika 20.** Plava lampa zračenja valne duljine 405 nm.

Potvrđeno je da promatranu fotokemijsku reakciju pokreću svi ispitani izvori zračenja prikazani na slikama (od slike 15 do slike 20), ali osim njih reakciju pokreću sunčeva svjetlost i stolna svjetiljka. Izvori zračenja koji su odabrani za izvođenje eksperimenata su crvena lampa, valne duljine zračenja 645 nm i plava lampa, valne duljine zračenja 405 nm. Odabrani izvori osiguravaju prikladno trajanje reakcije, što znači da je brzina reakcije takva da je povećanje koncentracije produkta u uzorku moguće jednostavno pratiti spektrometrijski. Crvena i plava lampa su monokromatski izvori koji tijekom rada ne proizvode značajnu količinu topline, što olakšava održavanje konstantne temperature uzoraka. Izvori Metrohm i D 1000 CE nisu korišteni u eksperimentalnom radu jer je reakcija pokrenuta njima prespora. Nedostatak specifikacije drugi je razlog nekorištenja ovih izvora. Elegoo Mercury Plus i UV lampa proizvode zračenje prikladne energije te je brzina reakcije zadovoljavajuća. Tijekom sastavljanja aparature s UV lampom pojavile su se poteškoće zbog kojih ona u daljnjim eksperimentima nije korištena. Prednost lampe Elegoo Mercury Plus pred svim ostalim lampama je ugrađena rotirajuća ploča, ali nedostatak je što proizvodi zračenje koje se sastoji od dviju različitih valnih duljina.

### 3.6. Metoda početne brzine

Brzina reakcije katkad se mjeri na početku, odmah nakon što se reaktanti pomiješaju. Riječ je o metodi početne brzine. Početna brzina može se dobiti iz tangente na krivulju ovisnosti koncentracije o vremenu u  $t \approx 0$ . Drugi način je mjerenje koncentracije odabranog reaktanta što prije nakon pokretanja reakcije.

Red reakcije izračuna se na temelju eksperimentalnih podataka. Primjer reakcije u kojoj iz dva reaktanta nastaje jedan produkt glasi:



Reakcija se pokrene i njena brzina se mjeri na temelju promjene koncentracije reaktanta A. Ako udvostručenjem koncentracije A dođe do udvostručenja početne brzine reakcije, tada je reakcija prvog reda s obzirom na reaktant A. Ukoliko promjenom koncentracije A početna brzina ostaje ista, reakcija je nultog reda s obzirom na reaktant A.

Jednak postupak primjenjuje se za sve reaktante. Red reakcije je suma parcijalnih redova reakcije s obzirom na svaki reaktant (Petrucci, 2017).

Pogreška opisanog postupka prema metodi s tangentom zanemariva je ukoliko je nastalo 5% produkta, odnosno ako je mjerenje izvedeno na samom početku reakcije (Connors, 1990).

### 3.7. Tankoslojna kromatografija

Tankoslojna kromatografija (TLC) je najjednostavnija kromatografska tehnika. Za izvedbu tankoslojne kromatografije potrebna je prikladna zatvorena posuda s otapalom i pločica obložena stacionarnom fazom. Alikvot ispitivane otopine nanosi se uz rub pločice, na stacionarnu fazu. Pločica se uranja u posudu s mobilnom fazom nakon što je nanosena mrlja alikvota osušena. Odgovarajuća kombinacija mobilne i stacionarne faze potiče razdvajanje komponenti alikvota. Različite tvari koje se nalaze u alikvotu migriraju različitim brzinama tijekom uspinjanja mobilne faze duž stacionarnu fazu. Razlog tome je različit afinitet komponenti alikvota prema stacionarnoj i mobilnoj fazi. Nakon što mobilna faza prijeđe dovoljno veliku udaljenost duž stacionarne faze, pločica se uklanja iz posude i suši. Detekcija razdvojenih zona izvodi se vizualnim pregledom pri danjem svjetlu ili pod UV svjetiljkom. U nekim slučajevima potrebno je primijeniti reagens za detekciju kako bi nastalo obojenje ili fluorescencija. Većina aromatskih i nezasićenih spojeva apsorbiraju UV zračenje. Njih je moguće jednostavno detektirati pregledom pod svjetlom valne duljine 254 nm na pločicama impregniranim fluorescentnim indikatorom. Ukoliko je u mrlji prisutan spoj, opaža se gašenje fluorescencije. Identifikacija se temelji na usporedbi  $R_f$  vrijednosti dobivenih mrlja sa  $R_f$  vrijednošću standarda (Sherma i Fried, 2003).

Preparativna tankoslojna kromatografija (PTLC) izvodi se na pločama presvučenim debljim slojem silikagela. Dostupne su ploče s debljinama sloja između 500 i 2000  $\mu\text{m}$ . (Sherma i Fried, 2003). Cilj preparativnih tehnika je pročišćavanje i izolacija većih količina tvari iz određenog uzorka. Provode se kada je namjera izoliranu tvar koristiti u daljnjim ispitivanjima.



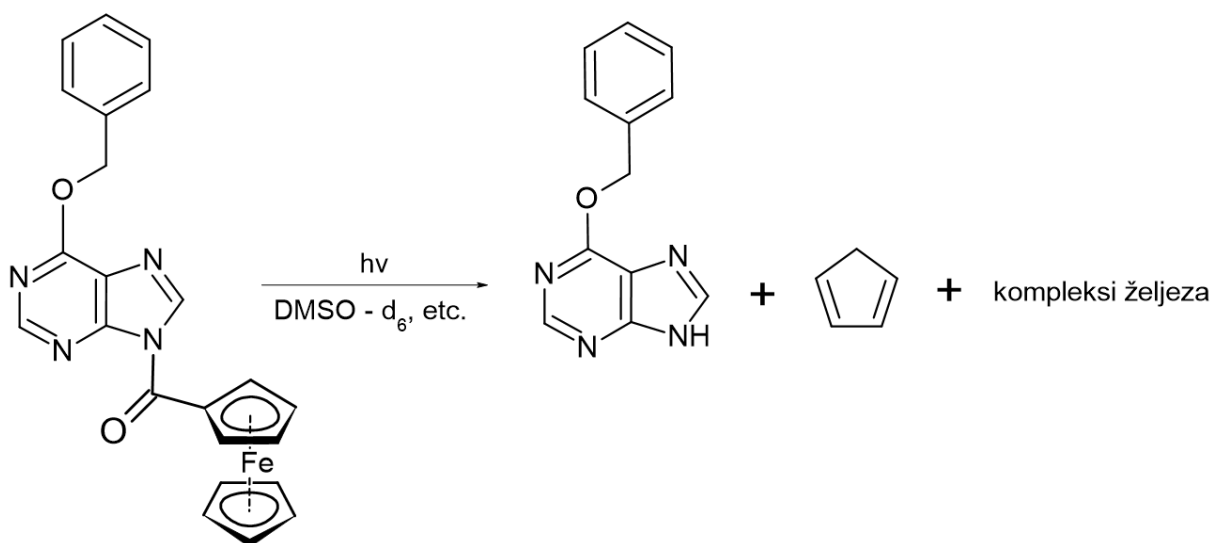
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Fotokemijska razgradnja N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina

#### 4.1.1. Reakcija pokrenuta različitim izvorima u različitim otapalima

Pripremljeni su uzorci N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina otapanjem derivata u acetonu, acetonitrilu, dimetilsulfoksidu i dimetilformamidu. Sva korištena otapala su deuterirana. Svjetlošću inducirana reakcija pokrenuta je u svim pripremljenim uzorcima.

Opaženo je nastajanje identičnih signala za različite uzorke pregledom  $^1\text{H}$  NMR spektara reakcijske smjese snimljenih nakon zračenja. Interpretacijom spektara predložene su strukture molekula produkata. Fotokemijskom reakcijom razgradnje spoja N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina nastaju isti produkti, neovisno o odabranom otapalu ili izvoru zračenja.



**Slika 21.** Interpretacijom  $^1\text{H}$  NMR spektara ozračenih uzoraka ustanovljeno je da fotorazgradnjom nastaju slobodni 6-benziloksi purin i ciklopentadien, a ferocenski dio molekule se raspada. Početni spoj i produkti reakcije imaju najveću topljivost u otapalu DMSO, stoga je ono korišteno u svim eksperimentima, osim ako nije navedeno drugačije.

Spektri su prikazani na slikama 22, 23 i 24.

Predstavljena reakcija fotokemijske razgradnje nije do sada opisana u znanstvenoj literaturi za ferocenoilne nukleobaze. Poznato je, međutim, da se slična reakcija odvija kada se otopljeni benzoil-ferocen (BZF) i dibenzoil-ferocen (DBZF) izlože zračenju (Tarr i Wiles, 1968; Ali i sur, 1973; Yamaguchi i sur, 2006). Svim navedenim spojevima zajedničko je što pripadaju skupini acil-ferocena te je zato moguće rezultate dobivene istraživanjem ferocenoilnih nukleobaza u određenoj mjeri usporediti s dosadašnjim otkrićima vezanima za slične spojeve.

Kao produkt fotokemijske razgradnje N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina nastaje ciklopentadien, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima provedenima s acil-ferocenima (Tarr i Wiles, 1968; Heaney i Logan, 1977; Yamaguchi i sur, 2006). U slučaju odabranog ferocenoilnog purina, drugi važan produkt reakcije je slobodna nukleobaza, 6-benziloksipurin.

Reakcija je ireverzibilna i kvantitativna. Jednom razgrađeni ferocenski fragment više se ne može sastaviti u povratnoj reakciji. Reakcija se zbiva sve do potpune razgradnje početnog konjugata. Jedini uvjet koji je potrebno pritom zadovoljiti je odgovarajuće vrijeme izloženosti uzorka elektromagnetskom zračenju. Ako je uzorak prekratko zračen, početni spoj neće u potpunosti nestati. Što je energija zračenja veća, vrijeme potrebno za kvantitativnu razgradnju je kraće.

#### ***4.1.2. Provjera hipoteze o pokretanju reakcije isključivo svjetlošću***

Tijekom eksperimentalnog rada pripremljen je niz uzoraka ferocenoilnih nukleobaza te su neka njihova svojstva opažena prilikom same izrade, rukovanja i čuvanja uzoraka.

Primijećeno je da se otopljeni uzorci ferocenoilnih nukleobaza mogu skladištiti u prostoriji zaštićenoj od svjetlosti u trajanju od nekoliko dana do nekoliko tjedana, a da pritom ne dolazi do razgradnje. Jedina promjena koja se opaža u takvim uzorcima je ravnotežna izomerizacija kojom se N9-izomer pregrađuje u N7-izomer i obratno, a što je već otkriveno u prethodnom istraživanju (Toma i sur, 2019). U svrhu konačne potvrde hipoteze da reakciju razgradnje ferocenoilnih nukleobaza pokreće isključivo svjetlost, proveden je poseban eksperiment s N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purinom.

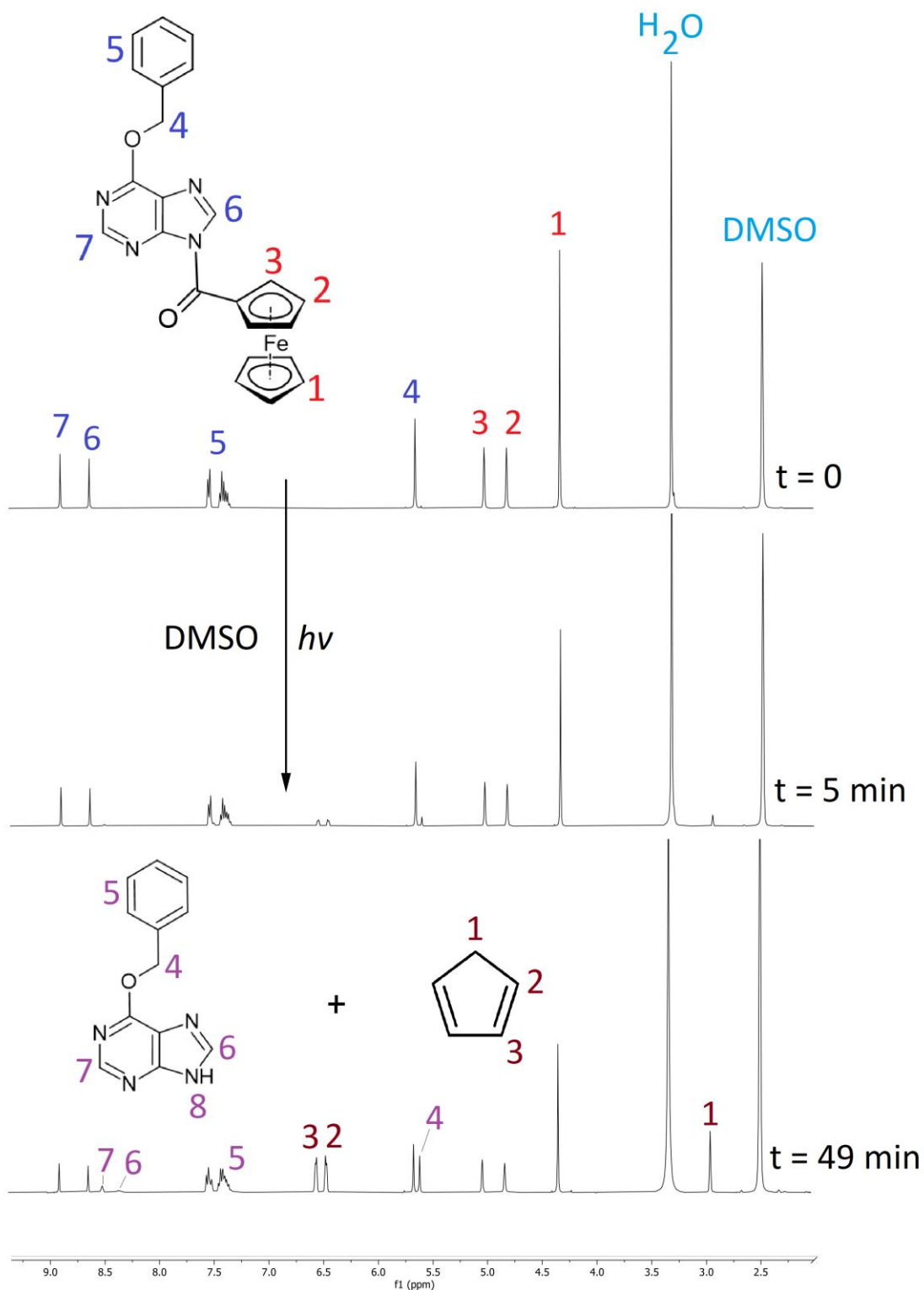
Pripremljen je uzorak N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina otapanjem u DMSO ( $c_0 = 1.52 \times 10^{-2}$  mol/L) i ozračen crvenom lampom valne duljine 645 nm u trajanju od jedne minute.

Uzorak je zatim tijekom idućih 30 minuta ostavljen u magnetu spektrometra, gdje je zaštićen

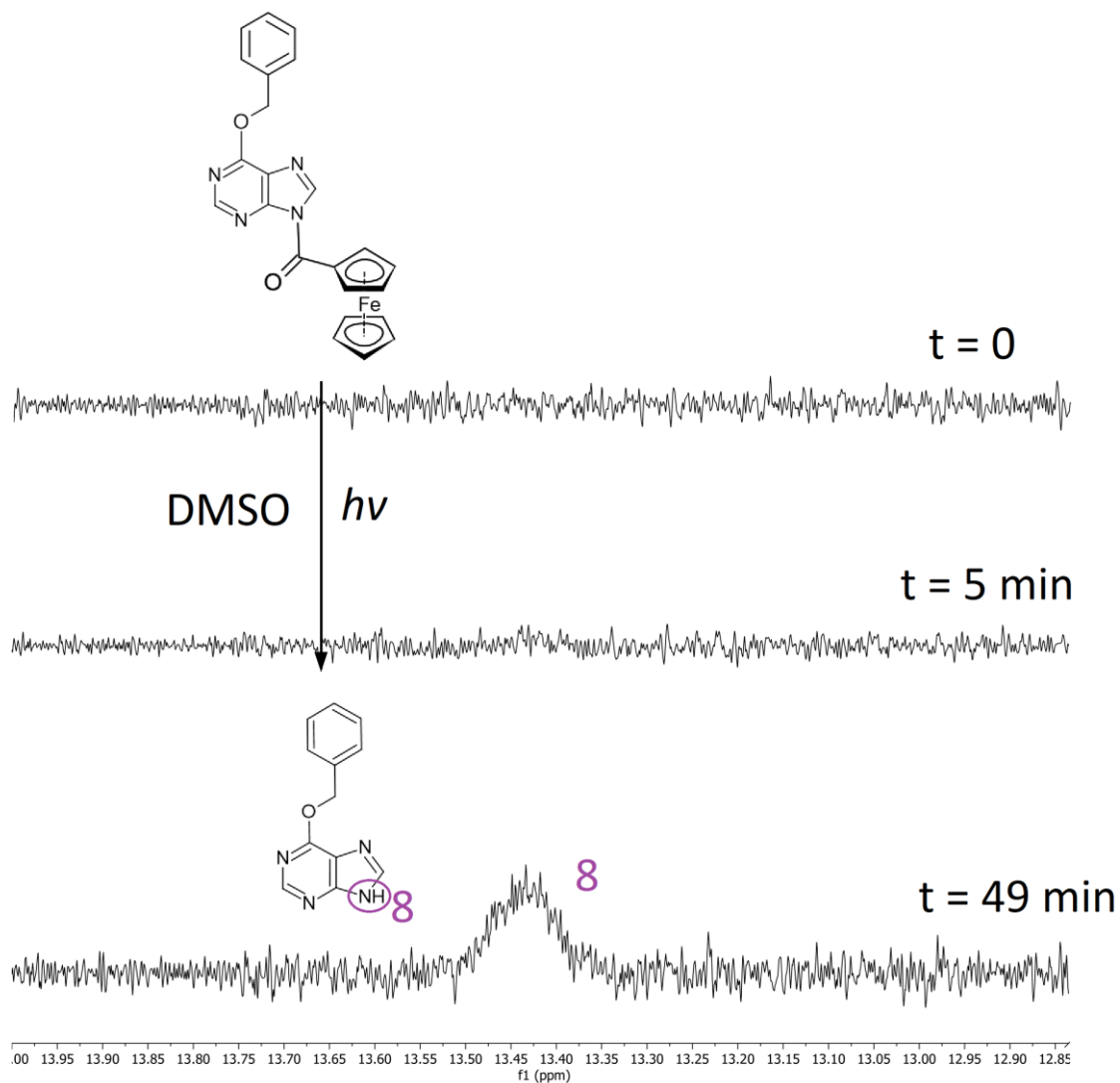
od svjetlosti. U tom vremenu snimljeno je desetak spektara pri čemu uzorak. U spektrima se uočavaju signali produkata nastalih tijekom jednogminutnog zračenja i njihova koncentracija ne povećava se tijekom držanja uzorka u magnetu. Nakon toga, uzorak je izvađen iz magneta te je opisani postupak ponovljen, jedino što je vrijeme zračenja produženo na 3 minute, a vrijeme držanja u magnetu na 40 minuta. Koncentracija produkata u uzorku povećala se odmah nakon drugog zračenja, ali se tijekom stajanja u magnetu ne povećava. Analizom spektra dobivenog nakon nekoliko dana čuvanja istog uzorka u tami, ustanovljeno je kako je tijekom nekoliko dana nakon zračenja došlo do malog porasta koncentracije produkata, unatoč čuvanju u mraku.

Zaključak je da je za pokretanje opažene reakcije nužna svjetlost. Premda se početak reakcije fotokemijske razgradnje ferocenoilnih nukleobaza opaža odmah nakon izlaganja uzorka zračenju, zaustavljanje reakcije ne događa se simultano s premještanjem uzorka u mračnu prostoriju. Reakcija se nastavlja i kad je uzorak u mraku, ali je mnogo sporija. Naknadna reakcija u tami osim toga dovodi do nastanka vrlo male količine produkata. Pretpostavka je da produkti nastaju kontinuirano tijekom držanja uzorka u tami, ali je brzina povećanja njihove koncentracije neznatna i ne može se pratiti spektrometrijski. Tek nakon što je uzorak držan u mraku jedan dan bilo je moguće detektirati povećanje koncentracije produkata snimanjem  $^1\text{H}$  NMR spektra. Reakcija se potpuno zaustavlja nakon nekoliko dana držanja uzorka u mraku.

Ovim eksperimentom dokazano je kako je moguće koncentraciju produkata točno odrediti snimanjem spektra do četrdeset minuta nakon izlaganja uzorka zračenju. Dokazano je da neće doći do pogreške zbog naknadnog stvaranja produkata u mraku. Navedeni zaključak je važan zbog toga što nije bilo moguće sastaviti aparaturu s većim volumenom otopine derivata od koje bi se uzimao po jedan alikvot (koji se više ne vraća u otopinu). Iako je moguće više puta zračiti isti uzorak i pritom zadržati točnost rezultata, poželjno je eksperimente provesti u što kraćem vremenu kako bi pogreška bila što manja.

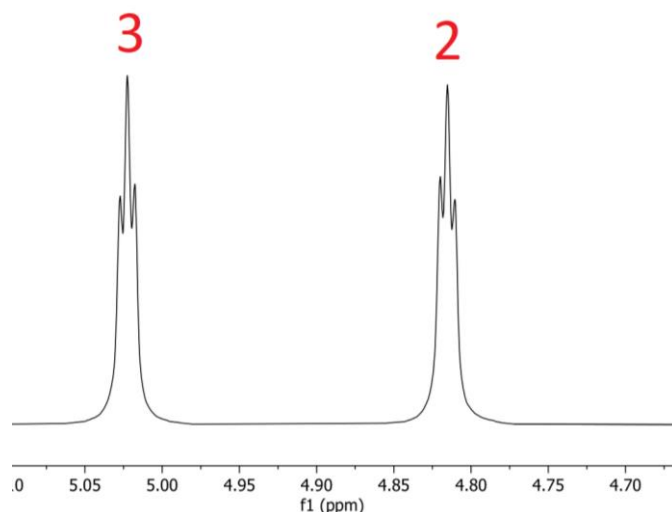


**Slika 22.** <sup>1</sup>H NMR spektar N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina snimljen prije zračenja (t = 0) i dva spektra dobivena nakon ukupno 5, odnosno 49 minuta zračenja plavom lampom (valne duljine 405 nm). Signal protona asigniran brojem 8 (N9-H) pri kemijskom pomaku od približno 13.5 ppm nije prikazan (vidi sliku 23), a smješten je u području niskog magnetskog polja.



**Slika 23.** <sup>1</sup>H NMR spektar N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina snimljen prije zračenja ( $t = 0$ ) i dva spektra dobivena nakon ukupno 5, odnosno 49 minuta zračenja plavom lampom (valne duljine 405 nm). Ovdje su prikazani samo dijelovi pri kemijskom pomaku od oko 13.5 ppm.

U spektrima dobivenim za uzorke N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina nakon pokretanja fotorazgradnje uočava se signal koji je na ovoj slici označen brojem 8. To je signal protona slobodne nukleobaze (6-benziloksipurina) koja je produkt fotokemijske reakcije.



**Slika 24.** Dio  $^1\text{H}$  NMR spektra početnog spoja N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina u kojem su prikazani signali supstituiranog ferocenskog prstena.

#### ***4.1.3. Eksperiment s derivatom u krutom stanju***

Proveden je eksperiment s ferocenoil-(6-benziloksi)purinom bez otapala. Derivat, koji je u čvrstom agregatnom stanju, unesen je u NMR cjevčicu i ozračen crvenom lampom valne duljine 645 nm. Vrijeme zračenja derivata u krutom stanju iznosi 33 minute. Nakon toga, krutina je otopljena u DMSO. Spektar sadrži samo signale početnog spoja, bez signala produkata. Rezultat pokazuje kako je otapalo nužno za pokretanje reakcije. Važnost otapala objašnjena je detaljnije u poglavlju 4.1.7.

#### ***4.1.4. Izolacija produkta fotorazgradnje***

Izvagano je 42,9 mg ferocenoil-(6-benziloksi)purina i otopljeno u 3 mL dimetilformamida u staklenoj posudi ( $c_0 = 3.27 \times 10^{-2}$  mol/L). Otopina je tijekom 6 dana čuvana na mjestu u laboratoriju koje je izloženo sunčevom zračenju. Neposredno nakon izrade, otopina je bistra i narančastocrvene boje. Nakon 6 dana zračenja, otopina je mutna i crne boje sa crvenkastim sjajem. Uz primjenu tehnike preparativne tankoslojne kromatografije izolirano je 5 mg produkta. Usporedbom spektara dobivene čvrste tvari i komercijalnog uzorkanukleobaze, potvrđeno je da je izolirani produkt 6-benziloksiipurin. Izolacija nukleobaze 6-benziloksiipurina potvrđuje nastanak reakcijskog produkta, detektiranog ranijespektrometrijskom metodom.

#### 4.1.5. Ispitivanje početne brzine reakcije

Proveden je eksperiment kojim je određena početna brzina reakcije za uzorke različitih koncentracija N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina pokrenuta crvenom, odnosno plavom lampom.

**Tablica 6.** Početne brzine ( $v_0$ ) izračunate za pripremljene uzorke N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina otopljene u DMSO- $d_6$ . Početne koncentracije uzoraka označene su sa  $c_0$ .

Valna duljina izvora (nm)	$c_0$ (mol/L)	$v_0$ (mol/L s)
$\lambda = 405$	$1.5 \times 10^{-2}$	$2.70 \times 10^{-4}$
	$3.0 \times 10^{-2}$	$2.53 \times 10^{-4}$
	$6.0 \times 10^{-2}$	$2.51 \times 10^{-4}$
$\lambda = 645$	$0.75 \times 10^{-2}$	$2.21 \times 10^{-4}$
	$1.5 \times 10^{-2}$	$4.26 \times 10^{-4}$
	$3.0 \times 10^{-2}$	$8.15 \times 10^{-4}$

Svi uzorci pripremljeni su u triplicatu, a vrijednost  $v_0$  odnosi se na aritmetičku sredinu početnih brzina izračunatih za svaki triplicat uzoraka. Iz dobivenih podataka može se zaključiti da se za reakciju pokrenutu crvenom lampom ( $\lambda = 645$  nm) udvostručenjem koncentracije derivata u uzorku početna brzina također udvostručuje. Fotokemijska reakcija je prema tome prvog reda s obzirom na ferocenoilnu nukleobazu. Zakon za brzinu reakcije se na temelju toga može izraziti kao :

$$v = k [FN]^1$$

pri čemu je  $v$  brzina reakcije,  $k$  konstanta brzine reakcije prvog reda (mjerna jedinica je  $s^{-1}$ ), a  $[FN]$  koncentracija ferocenoilne nukleobaze.

U slučaju plave lampe ( $\lambda = 405$  nm), vrijednosti početne brzine reakcije se ne mijenjaju s povećanjem koncentracije početnog spoja.. Može se zaključiti da je u tom slučaju reakcija

nultog reda s obzirom na ferocenoilnu nukleobazu. Zakon brzine za reakciju nultog reda glasi :

$$v = k$$

Brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji početnog spoja i jednaka je konstanti brzine reakcije, kojoj je mjerna jedinica mol/L s.

Ako se uzme u obzir mehanizam eliminacije ciklopentadiena koji su predložili Yamaguchi i suradnici, tada je u izraze za zakon brzine potrebno uključiti i koncentraciju otapala, budući da je otapalo reaktant. S druge strane, otapalo je prisutno u velikom suvišku u usporedbi s derivatom ferocena, tako da utjecaj promjene koncentracije DMSO zanemariv. Zakon brzine za reakciju pokrenutu crvenom lampom je :

$$v = k [\text{FN}] [\text{DMSO}]$$

Budući da je  $[\text{DMSO}] \gg [\text{FN}]$ , izraz se može napisati kao :

$$v = k_{obs} [\text{FN}]$$

pri čemu je  $k_{obs} = k [\text{DMSO}]$ , a reakcija je pseudo-prvog reda. Na sličan način se za reakciju induciranu plavom lampom dobiva izraz za pseudo-nulti red.

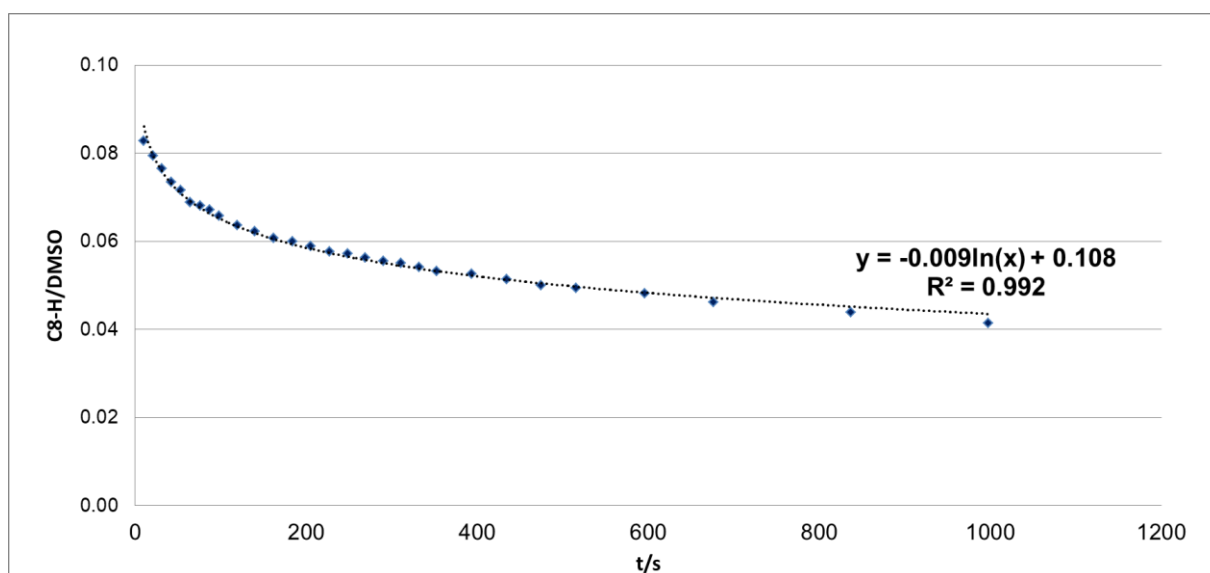
U skladu s ranijom studijom (Logan, 1997) može se zaključiti da je razlika u rezultatima dobivenim za crvenu i plavu lampu posljedica različitih vrijednosti molarnog apsorpcijskog (ekstinkcijskog) koeficijenta ( $\epsilon$ ) derivata pri različitim valnim duljinama. Molarni apsorpcijski koeficijent koristi se za opisivanje mjere kojom neka tvar apsorbira zračenje određene valne duljine. Što je vrijednost  $\epsilon$  veća, to će neka tvar snažnije apsorbirati zračenje pri danoj valnoj duljini (Atkins, 2010). Iz toga je lako zaključiti da N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin snažnije apsorbira zračenje valne duljine 405 nm od zračenja valne duljine 645 nm. Za usporedbu, ferocen, benzoil-ferocen i dibenzoil-ferocen otopljeni u metanolu apsorbiraju zračenje valne duljine 405 nm, ali pri 645 nm vrijednost  $\epsilon$  je gotovo jednaka nuli (Yamaguchi i sur, 2006). Čini se da proučavani konjugati ferocena s nukleobazama apsorbiraju pri 645 nm, jer u protivnom fotokemijska reakcija ne bi mogla biti započeta primjenom crvene lampe.



#### 4.1.6. Kinetika fotorazgradnje

Izvagan je N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina i otopljen ( $c_0 = 3.05 \times 10^{-3}$  mol/L). Pripremljeni je uzorak zračen crvenom lampom ( $\lambda = 645$  nm) u vremenskim intervalima od 10 sekundi do 10 minuta. Nakon svakog intervala zračenja snimljen je spektar. Ukupno vrijeme zračenja uzorka iznosi 49 minuta. Obradom podataka u programima MestReNova i Microsoft Excel prikazan je relativni pad koncentracije reaktanta u vremenu, odnosno porast koncentracije produkta u vremenu.

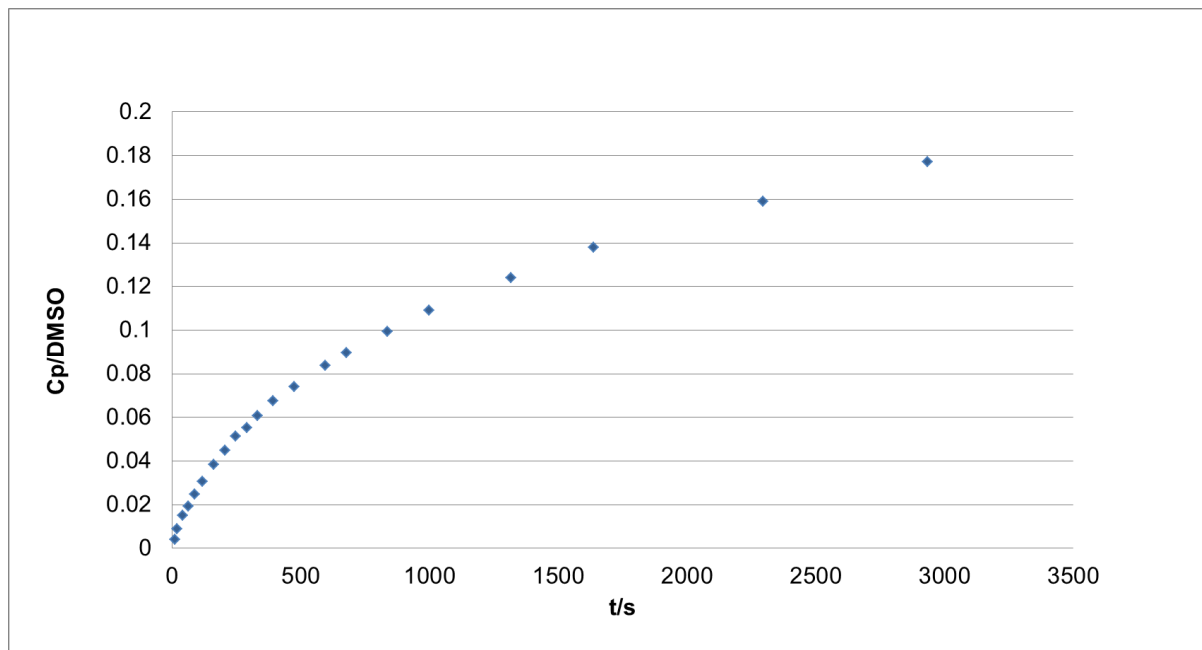
Signal nedeuteriranog (rezidualnog) DMSO velik je u odnosu na signale ferocenskog konjugata i tijekom reakcije njegova površina se ne mijenja, stoga je uzet kao referentni signal.



**Slika 25.** Ovisnost promjene koncentracije N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina o vremenu.

Uzorak je zračen crvenom lampom valne duljine zračenja 645 nm tijekom 49 minuta s definiranim prekidima (ovdje su prikazane točke dobivene tijekom prvih 1000 sekundi). Fotorazgradnja se odvija samo tijekom vremenskih intervala zračenja, zbog čega vrijednosti na x-osi imaju kumulativan karakter. Vrijednosti na y-osi predstavljaju omjer intenziteta signala reaktanta (C8-H) i rezidualnog signala DMSO.

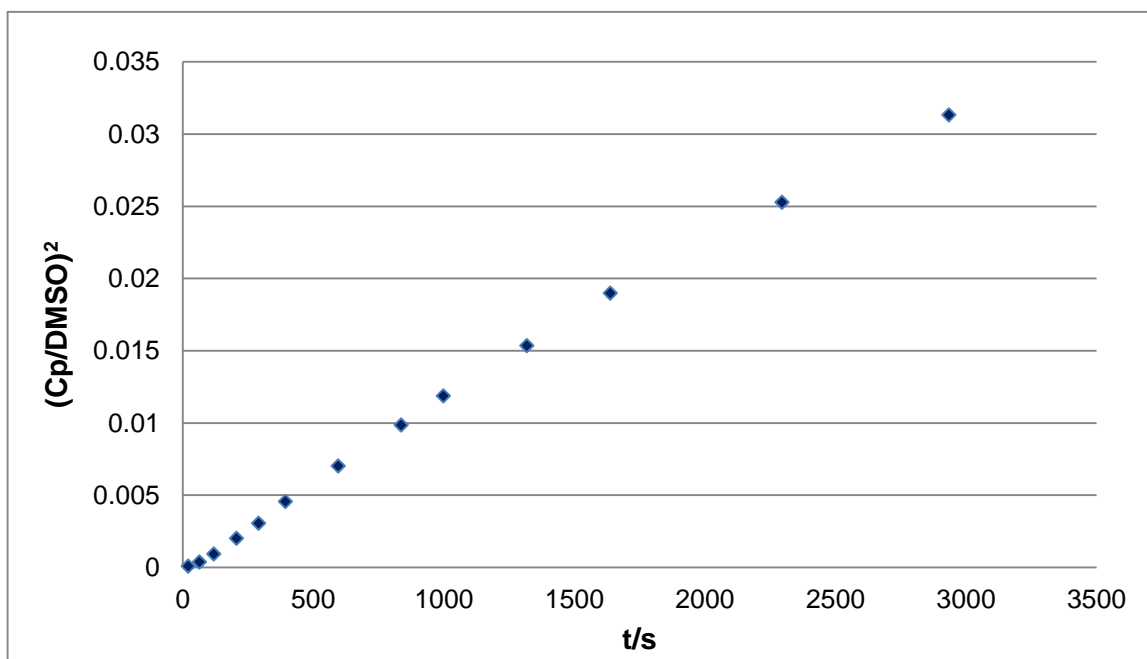
Analiza kakva je provedena za signal protona C8-H provedena je i za signale produkta, ciklopentadiena. Očekivano je da će točke dobivene analizom signala ciklopentadiena također slijediti krivulju logaritamske funkcije, no takva je korelacija bila vrlo slaba.



**Slika 26.** Ovisnost promjene koncentracije produkta (ciklopentadiena) o vremenu zračenja.

Uzorak je zračen crvenom lampom valne duljine zračenja 645 nm tijekom 49 minuta s definiranim prekidima. Fotorazgradnja se odvija samo tijekom vremenskih intervala zračenja, vrijednosti na x-osi imaju kumulativan karakter.. Vrijednosti omjera Cp/DMSO dobivene su integriranjem signala ciklopentadiena ( $C_{sp2-H}$ ) i DMSO-a.

Dodatnom obradom podataka pokazano je da kinetika reakcije slijedi kvadratnu funkciju.



**Slika 27.** Ovisnost promjene koncentracije produkta (ciklopentadiena) o vremenu zračenja. Vrijednosti na y-osidobivene su kvadriranjem vrijednosti omjera Cp/DMSO. Točke pripadaju pravcu, što znači da povećanje koncentracije produkta u vremenu slijedi kvadratnu funkciju, a krivulja koju opisuju točke prikazane na slici 26 je parabola.

Jedno od mogućih objašnjenja za opaženu kinetiku je stvaranje produkata koji usporavaju kemijsku reakciju. Tijekom eksperimentalnog rada uočeno je da se napredovanjem reakcije smanjuje bistrina uzorka i svjetlost teže prolazi kroz uzorak. Vrlo vjerojatno usporavanju reakcije pridonose kompleksi željeza koji se oslobađaju fotorazgradnjom. Neki od nastalih kompleksa, kao što su željezni oksidi, imaju svojstvo paramagnetičnosti, čime se objašnjava širenje signala u spektrima.

Tijekom provođenja ovog eksperimenta ukupno su snimljena 34 spektra, a kumulativno vrijeme zračenja iznosi 49 minuta. Svaki spektar predstavlja jednu točku. Za potrebe prikazivanja rezultata neke točke su uklonjene radi preglednosti.

#### **4.1.7. Ispitivanje utjecaja otopljenih plinova na fotorazgradnju**

Pripravljen je uzorak N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina ( $c_0 = 3.05 \times 10^{-3}$  mol/L) u otapalu kojem su prethodno, otplinjavanjem pri visokom vakuumu, uklonjeni otopljeni plinovi. Uzorak je ozračen crvenom lampom. Brzina nastajanja produkata na samom početku reakcije manja je u odnosu na početnu brzinu reakcije u uzorku pripravljenom u otapalu u kojem nisu uklonjeni otopljeni plinovi. To znači da na tijek reakcije utječu otopljeni plinovi u uzorku. Dobiveni rezultat u skladu je s ranijim studijama. Vjerojatno je da se reakcija odvija u više koraka, od kojih je za neke potreban kisik (Tarr i Wiles, 1968; Ali i sur, 1977).

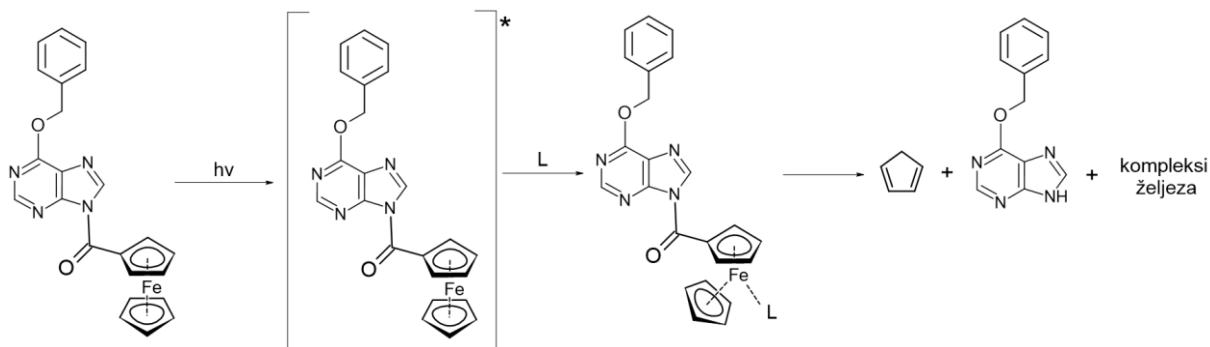
#### **4.1.8. Ispitivanje utjecaja vode na fotorazgradnju**

Pripravljen je uzorak N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina otapanjem 5 mg derivata u smjesi otapala koja se sastoji od 0.5 mL DMSO- $d_6$  i 0.1 mL D<sub>2</sub>O ( $c_0 = 1.90 \times 10^{-2}$  mol/L). Uzorak je izložen sunčevom zračenju. Nakon sat vremena, boja uzorka promijenila se iz početne narančastocrvene u žutu, dok je u cjevčici nastao smeđi želatinozni talog. Na dodirnoj površini otopine i zraka uočava se crno obojenje. Prisutnost veće količine vode u organskim otapalima potiče nastanak taloga.

Utjecaj vode na fotokemijsku reakciju nije u potpunosti razjašnjen. Osim što može sudjelovati kao reaktant, voda može reagirati i s produktima reakcije stvarajući različite željezne hidrokside koji formiraju želatinozni talog. Zamućenje koje nastaje nakon dodatka vode onemogućuje praćenje reakcije NMR spektroskopskom tehnikom. Voda prisutna u komercijalnim deuteriranim otapalima ipak ne izaziva poteškoće pri snimanju spektara jer je prisutna u vrlo niskim koncentracijama.

Zbog H/D izmjena između molekula vode, DMSO- $d_6$  i izmjenljivih H atoma u supstratu u uzorku se, osim molekula H<sub>2</sub>O, nalaze i molekule HDO i D<sub>2</sub>O, a posljedica toga je nemogućnost točnog određivanja koncentracije vode spektrometrijski (Pavia i sur, 2001). Pretpostavka je da reakcija započinje nukleofilnim napadom otapala (DMSO) na elektrofilni centar ferocenskog dijela molekule. Voda se ponaša kao nukleofil te vjerojatno sudjeluje u reakciji na sličan način kao DMSO (Wade, 2017). Vjerojatno je da se istovremeno događaju dvije reakcije, jedna u kojoj u eliminaciji ciklopentadiena sudjeluje otapalo DMSO i druga u

kojoj na isti način sudjeluje voda. Sličan mehanizam pretpostavljen je u prethodno objavljenom radu (Yamaguchi i sur, 2006).

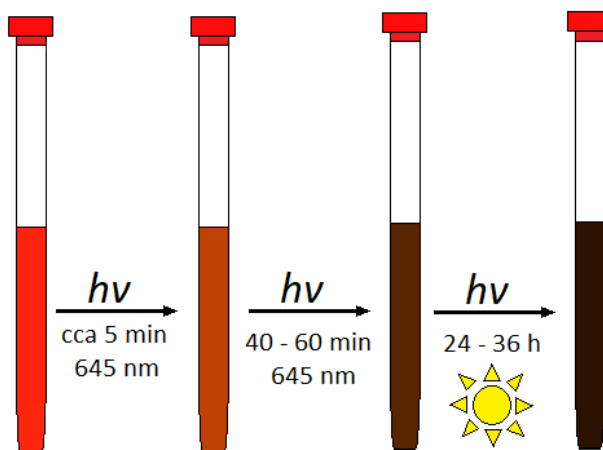


**Slika 28.** Fotokemijska reakcija započinje apsorpcijom fotona i prijelazom molekule ferrocenskog derivata u pobuđeno stanje. Supstituent (nukleobaza vezana preko karbonilne skupine) na ferocenskom prstenu djeluje kao elektron-odvlačeća skupina i čini ferocenski dio elektrofilnijim. Molekule otapala tada postepeno zamjenjuju ciklopentadienilni anion kao ligandi sve do potpune eliminacije ciklopentadiena.

## 4.2. Fotokemijska razgradnja N1-ferocenoil-5-fluorouracila

Pripremljen je uzorak N1-ferocenoil-5-fluorouracila otapanjem u DMSO. Fotokemijska reakcija pokrenuta je zračenjem uzorka crvenom lampom ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ). Uzorak je zatim izložen sunčevom zračenju do potpune razgradnje.

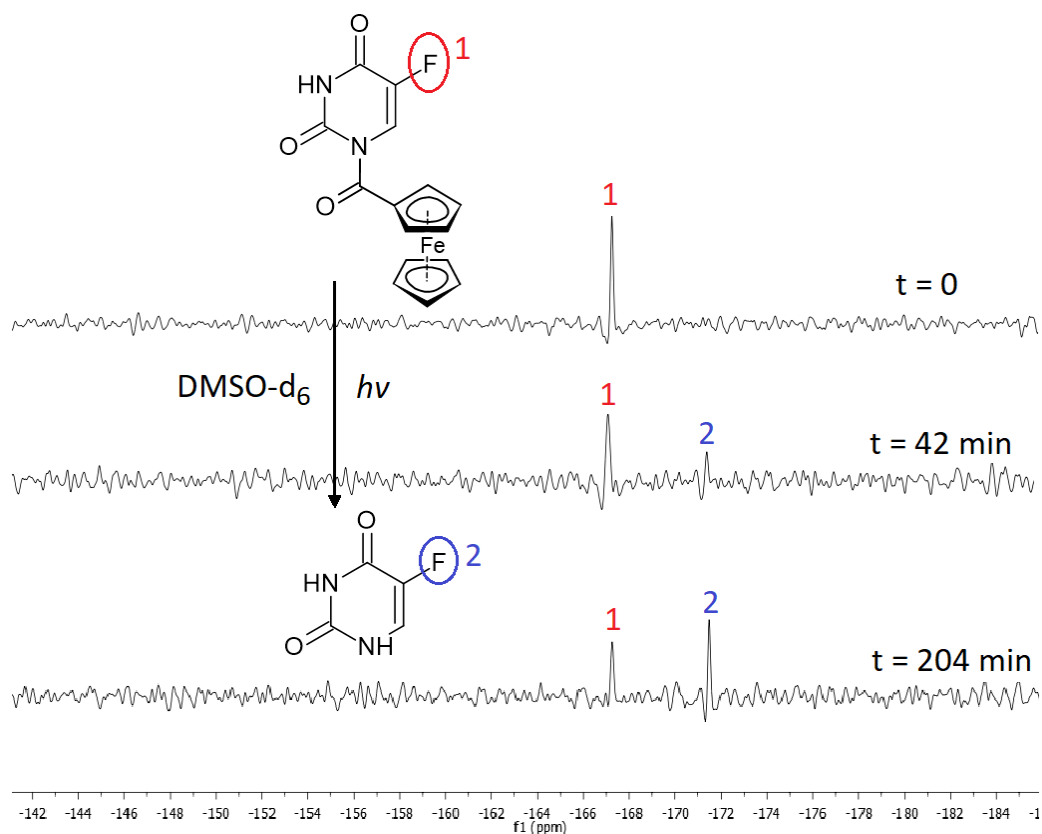
Opažena je postupna promjena boje uzorka. Prije izlaganja svjetlosti, uzorak je bistar, transparentan i crvene boje a nakon fotorazgradnje neproziran. Viskoznost uzorka povećava se s napredovanjem reakcije.



**Slika 29.** Uzorak N1-ferocenoil-5-fluorouracila u NMR cjevčici mijenja boju tijekom fotokemijske reakcije. Slična promjena uočena je i za N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin.

Reakcija odabranog derivata ferocenoil-pirimidina veoma je slična reakciji prethodno opisanog ferocenoil-purina. Produkti fotorazgradnje su slobodna nukleobaza i ciklopentadien. Kao i u slučaju derivata purina, proces započinje tek nakon izlaganja zračenju.

Odabrani derivat, N1-ferocenoil-5-fluorouracil, zanimljiv je zato što u strukturi sadrži atom fluora, pa je moguće reakciju pratiti i  $^{19}\text{F}$  NMR spektrometrijom. Značajno je otkriće da kao produkt eliminacije nastaje 5-fluorouracil koji se danas primjenjuje kao lijek za različite vrste karcinoma (Brunton i sur, 2018).

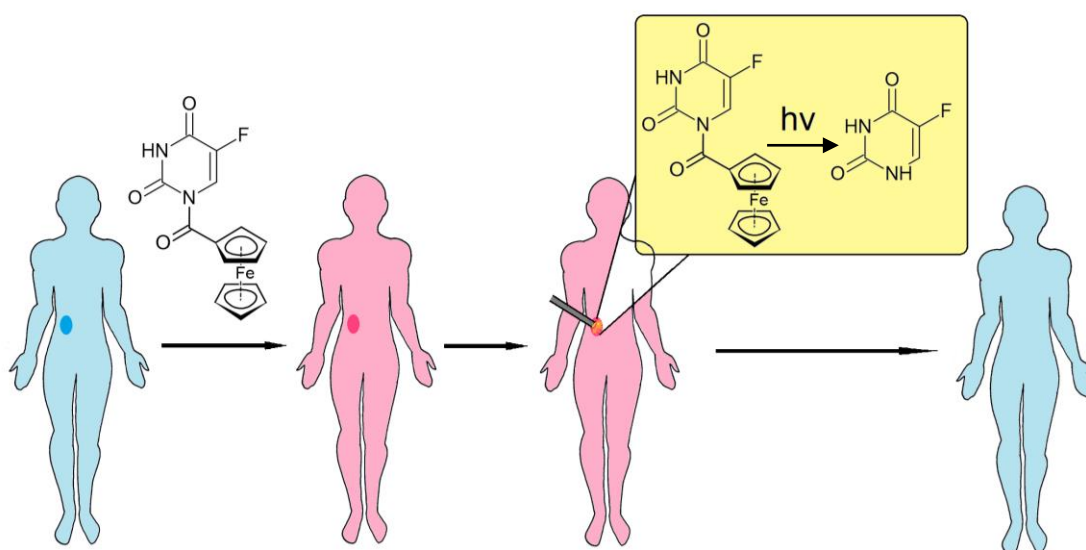


**Slika 30.**  $^{19}\text{F}$  NMR spektri snimljeni prije zračenja uzorka ( $t = 0$ ), nakon 42 min i nakon 204 min zračenja uzorka. U spektru za uzorak prije početka reakcije prisutan je samo jedan signal koji pripada jezgri fluora na položaju C5-*F* u strukturi početnog derivata. Napredovanjem reakcije nastaje slobodna baza, 5-fluorouracil. Signal označen brojem 2 na ovoj slici potječe od fluora na položaju C5-*F* slobodne pirimidinske baze.

Nije zapaženo da se konjugat raspada pod utjecajem bilo kojeg agensa kojem je bio izložen u laboratorijskim uvjetima, osim svjetlosti. Struktura N1-ferrocenil-5-fluorouracil sadrži 5-fluorouracil u farmaceutski neaktivnom obliku. Isti je moguće osloboditi kontroliranim zračenjem prikladnog izvora svjetlosti pa stoga N1-ferrocenil-5-fluorouracil predstavlja novi potencijalni prolijek koji se aktivira zračenjem.

U prošlosti su dizajnirani prolijekovi 5-fluorouracila koji oslobađaju aktivni oblik nakon kemijske ili enzimske hidrolize prolijeka. Oba ta pristupa imaju nedostatke. Kemijska hidroliza neće znatno povećati selektivnost, jer nije strogo ograničena samo na tumorska tkiva. Enzimska hidroliza zahtjeva pronalazak specifičnih enzima ili isporuku enzima zajedno s lijekom u tumorsko tkivo. Za razliku od toga, mnogo je jednostavnije i preciznije

kontrolirati oslobađanje aktivnog oblika usmjerenim elektromagnetskim zračenjem. Zračenje kratkih valnih duljina ne penetrira duboko u tkiva ljudskog organizma, ali je taj problem riješen uporabom endoskopa (Ito i sur, 2008). Prema tome, N1-ferocenoil-5-fluorouracil ima značajnu prednost pred drugim kandidatima prolijejkovima 5-fluorouracila koji se aktiviraju hidrolizom. Lako je iz svega navedenoga izvesti zaključak kako je vrlo važno da je prolijek stabilan u svim dijelovima ljudskog organizma, da ne bi došlo do aktivacije u onim tkivima gdje je to nepoželjno. Nisu provedeni eksperimenti kojima je detaljnije proučena stabilnost konjugata ferocena i 5-fluorouracila, a to je potrebno učiniti u idućim istraživanjima.

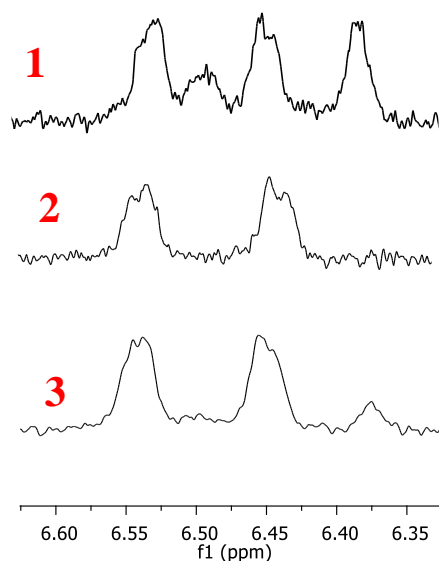


**Slika 31.** Pretpostavljeni mehanizam djelovanja N1-ferocenoil-5-fluorouracila kao potencijalni prolijeka. Pacijent s karcinomom (tamnije obojeno na shemi) uzima prolijek koji se nakon apsorpcije raspodjeljuje u cijelom organizmu, ali djeluje samo u ozračenom tkivu gdje dolazi do oslobađanja aktivnog lijeka, 5-fluorouracila. Ostatak prolijeka koji nije aktiviran eliminira se iz organizma i ne izaziva toksične učinke.



### 4.3. Fotokemijska razgradnja N,N-difenil-1-ferocenkarboksamida

Pripremljen je uzorak N,N-difenil-1-ferocenkarboksamida u DMSO i ozračen je crvenom lampom. Prva promjena u spektru uzorka uočena je nakon 51 sekunde zračenja. Signali produkta razgradnje (ciklopentadiena) jasno su razlučeni od bazne linije nakon 3 minute i 44 sekundi kontinuiranog zračenja. Drugi uzorak N,N-difenil-1-ferocenkarboksamida zračen je plavom lampom, a signali produkata reakcije jasno su vidljivi u spektru nakon 30 sekundi zračenja.



**Slika 32.**  $^1\text{H}$  NMR spektri snimljeni tijekom eksperimenta s N,N-difenil-1-ferocenkarboksamidom. Prikazani su dijelovi spektara (označenih brojevima od 1 do 3) u rasponu kemijskih pomaka od 6.35 do 6.60 ppm, gdje se očekuju signali produkta fotorazgradnje, ciklopentadiena. Spektar 1 snimljen je za uzorak N,N-difenil-1-karboksamida neposredno nakon zračenja crvenom lampom. Spektar 2 snimljen je nakon što je uzorak četiri dana čuvan u tami. Prisutni su očekivani signali ciklopentadiena. Nakon ponovnog zračenja istog uzorka, snimljen je spektar 3 u kojemu se uočava ponovni nastanak signala prisutnih u spektru 1.

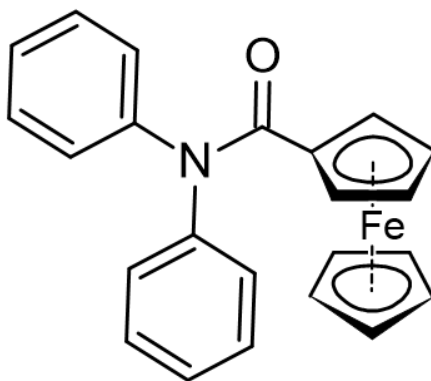
Svrha ispitivanja fotokemijske reakcije N,N-difenil-1-ferocenkarboksamida je provjeriti odvija li se reakcija na jednak način za acil-ferocen koji u svojoj strukturi nema nukleobazu. Iz rezultata se zaključuje da je derivat karboksamida fotostabilniji u usporedbi s prethodno opisanim ferocenoilnim nukleobazama jer je potrebno dulje vrijeme zračenja da bi reakcija

započela. U slučaju ferocenoilnih nukleobaza, čini se da reakcija počinje odmah nakon što se uzorak izloži svjetlosti.

Plavom lampom je uzorak derivata karboksamida potrebno zračiti kraće vrijeme za pokretanje reakcije u odnosu na crvenu lampu, što je očekivano zato što je zračenje koje proizvodi plava lampa veće energije.

Na temelju NMR spektara snimljenih za vrijeme eksperimenta, zaključuje se da je tijekom reakcije drugačiji od onog opaženog za ferocenoilne nukleobaze. Raspadom N,N-ferocenoil-1-karboksamida nastaje međuprodukt koji je dovoljno stabilan da ga je moguće detektirati spektrometrijski. Zatim se međuprodukt, vjerojatno ciklopentadien u formi kompleksa, transformira i nastaje slobodni ciklopentadien, odnosno u spektru se vide samo signali ciklopentadiena kao i u slučaju fotoreakcije ferocenoilnih nukleobaza.

Fotokemijski pokrenuta reakcija eliminacije ne odvija se istim mehanizmom za sve acilne ferocene, to jest spojeve opće formule  $\text{Fc-CO-N-R}_1\text{R}_2$ . Na tijek i produkte (i međuprodukte) reakcije utječu skupine u strukturi molekule na položajima  $\text{R}_1$  i  $\text{R}_2$ . Molekula N,N-difenil-1-ferocencarboksamida u svojoj strukturi ne sadrži nukleobazu, čime se objašnjava drugačije ponašanje u interakciji sa svjetlošću u odnosu na ferocenoilne nukleobaze.



**Slika 33.** Struktura molekule N,N-difenil-1-ferocencarboksamida.

#### 4.4. Spojevi koji su fotostabilni u danim uvjetima

Derivat 4-fluorobenzoil-purin pripravljen je postupkom kojim je kao glavni produkt nastao N7-izomer ovog spoja. Međutim, za potrebe ovog istraživanja to ne predstavlja pogrešku, budući da je dokazano kako u DMSO dolazi do pregradnje N7-izomera u N9-izomer te da su oba regioizomera osjetljiva na svjetlost. Poznato je i da derivat ferocenoil-purin podliježe fotokemijskoj reakciji na način veoma sličan N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purinu.

Pripremljen je uzorak N7-4-fluorobenzoil-purina otopljenog u DMSO. Uzorak je zračen 15 minuta crvenom i zatim još 16 minuta plavom lampom. U  $^1\text{H}$  NMR spektru uzorka snimljenog nakon zračenja nije uočena promjena u odnosu na početni spektar koji je snimljen prije izlaganja zračenju. Iz toga se izvodi zaključak da je derivat benzena stabilan na primijenjeno zračenje. Benzen je vrlo jednostavan spoj, građen od samo jednog aromatskog prstena, bogat elektronima i najčešće reaktivan prema elektrofilima, a ne nukleofilima (Wade, 2017). Ferocen je građen od dva aromatska ciklopentadienilna aniona, no na temelju rezultata zaključuje se da je u ispitivanim acil-ferocenima središnji ion željeza u pobuđenom stanju dovoljno elektrofilan i pogodan za nukleofilni napad molekulama otapala.

Ispitana je osjetljivost nesupstituiranog ferocena na zračenje. Uzorak ferocena u DMSO čuvan je tijekom 3 mjeseca u laboratoriju na mjestu nezaštićenom od svjetlosti. Spektrometrijski je prvo potvrđeno da je uzorak stabilan, a zatim je zračen plavom lampom tijekom dužeg vremenskog perioda. Nikakva reakcija nije pokrenuta. Rezultat ovog eksperimenta u skladu je s onim opisanim u dosadašnjoj literaturi (Tarr i Wiles, 1968). Nukleobaza povezana karbonilnom skupinom vrlo vjerojatno djeluje kao elektron-odvlačeći supstituent na ferocenskom fragmentu koji je zbog toga pogodnija meta za nukleofilni napad. Sam ferocen je bogatiji elektronima i time stabilniji.

#### 4.5. Značaj rezultata

Otkriće kemijske reakcije razgradnje otopljenih ferocenoilnih nukleobaza za koju je jedino potrebna svjetlost proširuje dosadašnje spoznaje o svojstvima ovih važnih spojeva. Spoznaja da se tijekom fotoreakcije oslobađa slobodna nukleobaza čini reakciju pogodnom za različite primjene. Fotokemijski inducirana razgradnja ferocenoil-5-fluorouracila ima potencijal za primjenu u terapiji malignih bolesti. Važno je uzeti u obzir da red reakcije ovisi o brojnim parametrima te da prikazana kinetika vrijedi samo u ovdje odabranim uvjetima. U sljedećim istraživanjima trebalo bi detaljnije ispitati mehanizam reakcije, proučiti reakciju većeg broja različitih konjugata te pronaći nove mete za primjenu. U slučaju N1-ferocenoil-5-fluorouracila, potrebno je provesti dodatna istraživanja stabilnosti derivata u fiziološkim uvjetima, i provjeriti da li u ljudskim stanicama postoje fiziološki agensi koji bi mogli aktivirati razgradnju derivata.

## 5. ZAKLJUČCI

Opisanu reakciju razgradnje ferocenoilnih nukleobaza pokreće isključivo svjetlost. Kao glavni produkti oslobađaju se nukleobaza i ciklopentadien. Kada se reakcijska smjesa zaštiti od izvora svjetlosti, fotorazgradnja se zaustavlja. N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purin nije osjetljiv na zračenje u čvrstom agregatnom stanju, nego samo u otopini. Reakcija se odvija u otapalima DMSO, DMF, acetonitrilu i acetonu. Voda dodana u reakcijsku smjesu izaziva formiranje želatinoznog taloga i ometa spektrometrijsko praćenje reakcije.

Red ispitivane reakcije ovisi o valnoj duljini primijenjenog zračenja. Što je veći molarni apsorpcijski koeficijent ( $\epsilon$ ) derivata za neku valnu duljinu, veća je vjerojatnost da će reakcija u danim uvjetima biti nultog reda. Ako je vrijednost  $\epsilon$  mala, reakcija će vjerojatnije slijediti prvi red s obzirom na ferocenoilnu nukleobazu.

Kao produkti reakcije nastaju i kompleksi željeza koji usporavaju reakciju. Rezultat toga je ukupna kinetika koja slijedi kvadratnu funkciju za reakciju pokrenutu zračenjem valne duljine 645nm.

Otapalo je ujedno i reaktant koji nukleofilnim napadom na ferocenski dio molekule u prvom koraku reakcije potiče eliminaciju ciklopentadiena. Nakon odvajanja nesupstituiranog ciklooptadienilnog aniona, ion željeza kompleksira molekule otapala kao ligande. Protoniranjem atoma dušika na položaju N9 nastaje slobodna nukleobaza.

N1-ferocenoil-5-fluorouracil osjetljiv je na svjetlost i razgrađuje se pri čemu se oslobađa antitumorski lijek 5-fluorouracil. Reakcija pokazuje potencijal za primjenu u terapiji karcinoma.

N,N-difenil-1-ferocenkarboksamid je fotostabilniji i raspada se drugačijim mehanizmom u odnosu na ferocenoilne nukleobaze. Opažena reakcija nije ista za sve spojeve opće formule  $Fc-CO-N-R_1R_2$  i ovisi o supstituentima  $R_1$  i  $R_2$ .

Zamjenom ferocenskog dijela molekule benzenom spoj postaje fotostabilan, što je dokazano na primjeru N7-4-fluorobenzoil-purina.

## 6. LITERATURA

Okuda J. The Beginings of Ferrocene. Ferrocene – 65 Years After. *Eur J Inorg Chem*. 2017, 217–219.

Roberts JD, Caserio MC. Basic Principles of Organic Chemistry, New York, W. A. Benjamin, Inc, 1965, str. 830-831.

Pine SH, Henderickson JB, Cram DJ, Hammond GS. Organska kemija, Zagreb, 1984, str. 967-968.

Kealy TJ, Pauson PL. A New Type of Organo-Iron Compound, *Nature*, 1951, 168, 1039-1040  
Astruc D. Why is Ferrocene so Exceptional? , *Eur J Inorg Chem*, 2017, 6-29.

Fery-Forgues S, Delavaux-Nicot B. Ferrocene and ferrocenyl derivatives in luminescent systems, *Journal of Photochemistry and Photobiology A:Chemistry*, 2000, 132, 137-159.

Tarr AM, Wiles DM. Electronic absorption spectra and photodecomposition of some substituted ferrocenes, *Can J Chem*, 1968, 46, 2725-2731.

Ali LH, Cox A, Kemp TJ, Photochemistry od Ferrocenyl Ketones and Acids in Dimethyl Sulphoxide and Related Solvents, *J C S Dalton*, 1973, 14, 1468-1473.

Heaney EK, Logan SR. Photochemical Reactions of Acetylferrocene, *Inorganica Chim Acta*, 1977, 22, L3-L4

Yamaguchi Y, Ding W, Sanderson CT, Borden ML, Morgan MJ, Kutal C. Electronic structure, spectroscopy, and photochemistry of group 8 metallocenes, *Coord Chem Rev*, 2007, 251, 515-524.

Petrucci RH, Jeffry FGH, Madura D, Bissonnette C. General Chemistry: Principles and Modern Applications, 2017, Toronto, 602-612.

- Logan SR. Does a Photochemical Reaction Have a Reaction Order?, *J Chem Educ*, 1997,74, 1303.
- Kowalski K, Szczupak L, Saloman S, Steverding D, Jablonski A, Vrčec V, Hildebrandt A, Lang H, Rybarczyk-Pirek A. Cymantrene, Cyrehetrene and Ferrocene Nucleobase Conjugates: Synthesis, Structure, Computational Study, Electrochemistry and Antitrypanosomal Activity, *ChemPlusChem*, 2016, 82, 303-31.
- Toma M, Božičević L, Lapić J, Djaković S, Tandarić T, Vianello R, Vrčec V. Trasacylation in Ferrocenoyl-Purines. NMR and Computational Study of Isomerisation Mechanism, *J Org Chem*, 2019, 84, 12471-12480.
- Brunton LL, Knollmann BC, Hilal-Dandan R. Goodman & Gilman's : the Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, 2018, str. 1181-1182.
- Patrick GL. An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford, 2013, 407, 531-532.
- Pazdur R, Hoff PM, Medgyesy D, Royce M, Brito RA. The Oral Fluorouracil Prodrugs, *Oncology*, 1998, 12.
- Rautio J, Meanwell NA, Li D, Hageman MJ. The Expanding role of prodrugs in contemporary drug design and development, *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17, 559-587.
- Chellan P, Sadler PJ. Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments, *Chem Eur J*, 26, 8676-8688.
- Peter S, Aderibigbe BA. Ferrocene-Based Compounds with Antimalaria/Anticancer Activity, *Molecules*, 2019, 3604.
- Toma M, Vrčec V. Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza, *KUI*, 2020, 69, 21-29.

Bhatta SR, Bheemireddy V, Vijaykumar G, Debnath S, Thakur A. An Efficient Molecular Tool with Ferrocene Backbone : Discriminating Fe<sup>3+</sup> from Fe<sup>2+</sup> in Aqueous Media, *Organometallics*, 2017, 36, 2141-2152.

Floris B. Ferrocene in agriculture: from agrochemicals and soil remediation to selective chemosensors, *Chem Biol Technol Agric*, 2015, 2, 15.

Larik FA, Saeed A, Fattah TA, Muqadar U, Channar PA. Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives, *Appl Organomet Chem*, 2016, 31, 1-22.

Wade, LG. *Organska kemija*, Zagreb, 2017, str. 561-592; 234-238.

Isotopes of Hydrogen, 2020, <https://chem.libretexts.org/>, pristupljeno 25.5.2021.

Shoolery, JN. *A Basic Guide to NMR*. Castano Primo, 2008, str. 1-15.

Bruker BioSpin END, *AVANCE Beginners Guide*. Rheinstetten, 2014, str. 29.

The Schlenk Line, 2021, <https://schlenklinesurvivalguide.com/>, pristupljeno 25.5.2021.

Connors KA. *CHEMICAL KINETICS The Study of Reaction Rates in Solution*. Madison, 1990, str. 28-29.

Sherma J, Fried B. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York, 2003,

Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. *Introduction to spectroscopy*. Boston, 2001, str. 309-310.

Atkins P, de Paula J. *Atkins' Physical Chemistry*. Oxford, 2010, str 490.

Ito T, Tanabe K, Yamada H, Hatta H, Nishimoto S. Radiation- and Photo-induced Activation of 5-Fluorouracil Prodrugs as a Strategy for the Selective Treatment of Solid Tumors, *Molecules*, 2008, 13, 2370-2384.



## 7. SAŽETAK

### **Fotokemijska reakcija razgradnje ferocenskih derivata purina i pirimidina**

Ferocenoilne nukleobaze su osjetljive na svjetlost kada su otopljene u organskim otapalima, kao što je DMSO. Svjetlost inducira reakciju eliminacije ciklopentadiena, razgradnju ferocenskog dijela molekule i formiranje slobodne nukleobaze. Reakcija je proučena na primjeru derivata N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina i N1-ferocenoil-5-fluorouracila. Kompleksi željeza koji također nastaju kao produkti usporavaju reakciju. Otapalo (DMSO) djeluje kao reaktant i sudjeluje u nukleofilnom napadu na središnji atom željeza. Red fotokemijske reakcije ovisi o molarnom apsorpcijskom (ekstinkcijskom) koeficijentu i uvjetima reakcije. Kada je reakcija pokrenuta crvenom lampom ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ) opaža se pseudo-prvi red, a kada je pokrenuta plavom lampom ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) opaža se pseudo-nulti red. N,N-difenil-1-ferocenakarboksamid također je osjetljiv na svjetlost, ali se mehanizam reakcije razlikuje od fotorazgradnje ferocenoilnih-nukleobaza. Ukoliko se ferocenska jezgra zamijeni benzenskom, nastali benzoil-purinski derivati (N7-4-fluorobenzoil-purin) nisu osjetljivi na djelovanje svjetlosnog zračenja.

## SUMMARY

### Photochemical decomposition reaction of Ferrocenoyl-Purines and Pyrimidines

Ferrocenoyl-substituted nucleobases are light-sensitive when dissolved in organic solvents, i.e. dimethyl sulfoxide. Light induces an elimination reaction which results in degradation of ferrocene moiety, loss of cyclopentadiene ring and release of free nucleobase. N9-ferrocenoyl-(6-benzyloxy)purine and N1-ferrocenoyl-5-fluorouracyl were used in the study of this photochemical reaction. The formation of ring-deligated iron complexes during the reaction decreases the reaction rate. The solvent (DMSO) is also a reactant which assists in gradual displacement of the five-membered cyclopentadiene ring. Reaction conditions and molar absorption (extinction) coefficients of ferrocene conjugates affect the reaction order. Pseudo-first order kinetics occurs when the red lamp ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ) is used to trigger the reaction. When the blue lamp ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) is used, it changes to pseudo-zero order. N,N-diphenyl-1-ferrocene carboxamide is also light-sensitive, but the reaction mechanism differs from the mechanism observed for ferrocenoyl-nucleobases. Different acyl-ferrocenes react in different manner in this photochemical reaction. When the ferrocene moiety is replaced by a benzene ring, like in N7-4-fluorobenzoyl-purine, the obtained compound is not light-sensitive.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### FOTOKEMIJSKA REAKCIJA RAZGRADNJE FEROCENSKIH DERIVATA PURINA I PIRIMIDINA

Lana Petrinec

#### SAŽETAK

Ferocenoilne nukleobaze su osjetljive na svjetlost kada su otopljene u organskim otapalima, kao što je DMSO. Svjetlost inducira reakciju eliminacije ciklopentadiena, razgradnju ferocenskog dijela molekule i formiranje slobodne nukleobaze. Reakcija je proučena na primjeru derivata N9-ferocenoil-(6-benziloksi)purina i N1-ferocenoil-5-fluorouracila. Kompleksi željeza koji također nastaju kao produkti usporavaju reakciju. Otapalo (DMSO) djeluje kao reaktant i sudjeluje u nukleofilnom napadu na središnji atom željeza. Red fotokemijske reakcije ovisi o molarnom apsorpcijskom (ekstinkcijskom) koeficijentu i uvjetima reakcije. Kada je reakcija pokrenuta crvenom lampom ( $\lambda = 645$  nm) opaža se pseudo-prvi red, a kada je pokrenuta plavom lampom ( $\lambda = 405$  nm) opaža se pseudo-nulti red. N,N-difenil-1-ferocenakarboksamid također je osjetljiv na svjetlost, ali se mehanizam reakcije razlikuje od fotorazgradnje ferocenoilnih-nukleobaza. Ukoliko se ferocenska jezgra zamijeni benzenskom, nastali benzoil-purinski derivati (N7-4-fluorobenzoil-purin) nisu osjetljivi na djelovanje svjetlosnog zračenja.

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

Rad sadrži: 59 stranica, 33 grafičkih prikaza, 6 tablica i 33 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fotokemija, ferocenoilne nukleobaze, fotorazgradnja

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

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

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

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

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### PHOTOCHEMICAL DECOMPOSITION REACTION OF FERROCENOYL-PURINES AND PYRIMIDINES

**Lana Petrinec**

#### SUMMARY

Ferrocenoyl-substituted nucleobases are light-sensitive when dissolved in organic solvents, i.e. DMSO. Light induces an elimination reaction which results in degradation of ferrocene moiety, loss of cyclopentadiene ring and release of free nucleobase. N9-ferrocenoyl-(6-benzyloxi)purine and N1-ferrocenoyl-5-fluorouracyl were used in the study of this photochemical reaction. The formation of ring-deligated iron complexes during the reaction decreases the reaction rate. DMSO is also a reactant which assists in gradual displacement of the five-membered cyclopentadiene ring. Reaction conditions and molar absorption (extinction) coefficients of ferrocene conjugates affect the reaction order. Pseudo-first order kinetics occurs when the red lamp ( $\lambda = 645 \text{ nm}$ ) is used to trigger the reaction. When the blue lamp ( $\lambda = 405 \text{ nm}$ ) is used, it changes to pseudo-zero order. N,N-diphenyl-1-ferrocene carboxamide is also light-sensitive, but the reaction mechanism differs from the mechanism observed for ferrocenoyl-nucleobases. Different acyl-ferrocenes react in different manner in this photochemical reaction. When the ferrocene moiety is replaced by a benzene ring, like in N7-4-fluorobenzoyl-purine, the obtained compound is not light-sensitive.

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

Thesis includes: 59 pages, 33 figures, 6 tables and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: photochemistry, ferrocenoyl-substituted nucleobases, photoreaction

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.**, *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Tin Weitner, Ph.D.**, *Assistant Professor Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2021.