

Eksperimentalno i kvantno-kemijsko istraživanje regioselektivnog aciliranja ferocenoilnih derivata nukleobaza

Havaić, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:821430>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Valentina Havaić

**Eksperimentalno i kvantno - kemijsko istraživanje
regioselektivnog aciliranja ferocenoilnih derivata
nukleobaza**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Organska kemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju, Zavoda za kemiju i biokemiju Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta te na Zavodu za organsku kemiju Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta pod stručnim vodstvom prof. dr.sc. Valerija Vrčeka.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku i višem asistentu dr. sc. Davoru Šakiću na stručnim savjetima, razumijevanju, uloženom trudu i vremenu te pomoći prilikom izrade ovog rada. Želim se zahvaliti izv. prof. dr. sc. Senki Djaković i doc. dr. sc. Jasmini Lapić na velikom zalaganju i trudu. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci.

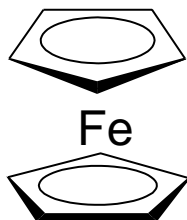
Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 FEROCEN	1
1.2. NUKLEINSKE BAZE	2
1.3. KONJUGATI FEROCENA I NUKLEINSKIH BAZA	4
2. OBRAZLOŽENJE TEME	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1 PRIPRAVA SPOJEVA	7
3.1.1. N,N-difenilferocenkarboksamid	7
3.1.2. Ferocenkarboksilna kiselina.....	8
3.1.3. Ferocenoil klorid	8
3.1.4. Ferocenoil etil karbonat	8
3.2 METODE KARAKTERIZACIJE UZORAKA.....	10
3.3 NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA.....	11
3.3.1. KEMIJSKI POMAK.....	14
3.3.2. SPREZANJE SPINOVA	14
3.3.3. NOESY SPEKTROSKOPIJA	15
3.4 RAČUNALNE METODE.....	15
3.4.1. METODE I PARAMETRI KVANTNO - KEMIJSKIH IZRAČUNA.....	16
3.4.2. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA I FREKVENCIJSKI RAČUN	19
3.4.3. BAZNI SKUPOVI.....	21
3.4.4. SOLVATACIJSKI EFEKTI	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA.....	38
7. SAŽETAK.....	45
8. SUMMARY	46

1. UVOD

1.1 FEROCEN

Otkriće ferocena 1951. pridonijelo je eksplozivnom razvoju organometalne kemije (Kealy i Pauson, 1951). Feroceni su organometalni spojevi koji sadrže željezo u „sendviču“ između dva ciklopentadiena, a imaju važnu ulogu u istraživanjima antianemičnih, antiseptičkih i antitumorskih aktivnosti. Razlog tome je stabilnost ferocenske podjedinice u vodenom mediju te posebna elektrokemijska svojstva. U posljednjih 10-ak godina povećalo se zanimanje za ferocenima modificirane DNA, RNA i njihove komponente: nukleobaze, nukleozide, nukleotide i oligonukleotide (Simenel i sur., 2009).



Slika 1. Struktura ferocena

U literaturi su prikazane nukleobaze koje su povezane s ferocenskim fragmentom različitih skupina (tzv. linkera), ali ne i preko karbonilne skupine. Ukoliko se nukleobaza, promatrana kao aromatska cjelina, poveže s ferocenskim prstenom preko karbonilne skupine dolazi do izražene delokalizacije elektrona, odnosno do produljenja konjugacije sustava.

U ovom je radu ferocenoilni fragment (Fc-C=O) vezan za pirimidinske baze uracila i timina, te 5-FU (5-fluorouracil). 5-FU pripada u skupinu antimetabolita, te je jedan od najčešćih sintetskih spojeva korišten u terapiji solidnih malignih tumora kolona, rektuma, želuca i maternice (Varghese i sur., 2015). Očekuje se da ferocenoilna skupina može mijenjati ili potencirati biološko djelovanje konjugiranih farmakofora.

U namjeri da se šećerni fragment nukleozida zamijeni s ferocenskom skupinom, pirimidinske se nukleobaze moraju selektivno supstituirati na N1-položaju (Lapić i sur., 2015). U dosadašnjim istraživanjima u reakcijama pirimidinskih nukleobaza s elektrofilima često dolazi do paralelnih supstitucija na N1- i N3-položajima. To je nepovoljno jer nastaju smjese N1- i

N3- produkata, stoga je redovito bila potrebna zaštita jedne amidne skupine pirimidinskih baza.

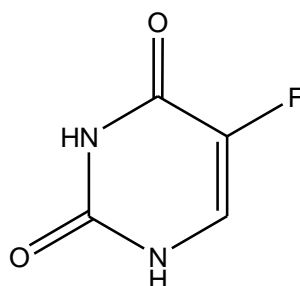
U ovoj je studiji pokazano da prikladno odabrani reakcijski uvjeti omogućuju regioselektivnu N1-supstituciju pirimidinskih nukleobaza s ferocenoilnim fragmentima. NMR spektroskopska mjerenja te kvantno - kemijski izračuni potvrdili su i razjasnili zbog čega nije potrebna zaštita N3-položaja pirimidinskog prstena kako bi N1-izomer nastao kao jedini produkt reakcije.

1.2. NUKLEINSKE BAZE

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA) su biomakromolekule koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetske informacije. DNA sadrži genetičke upute neophodne za razvitak i funkcioniranje svih živih bića i nekih virusa, dok RNA sudjeluje u sintezi proteina te u nizu drugih životno važnih procesa.

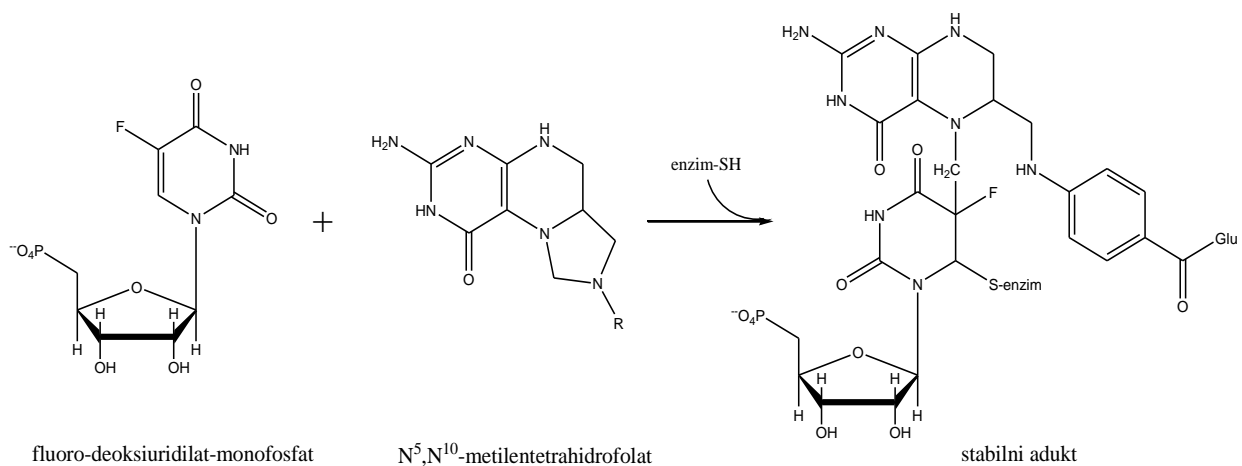
DNA i RNA su dugački linearni polimeri građeni od monomernih jedinica zvanih nukleotidi. Svaki monomer se sastoji od šećera, fosfatne skupine i dušične baze (Berg i sur., 2013). Dušične baze su planarne aromatske heterocikličke molekule koje se dijele u dvije skupine, purinske i pirimidinske, ovisno o molekuli čiji su derivati (Clowney i sur., 1996). Purinske baze adenin (A) i gvanin (G) te pirimidinska baza citozin (C) grade i DNA i RNA, dok se pirimidinska baza timin (T) nalazi samo u DNA, a RNA umjesto timina sadrži uracil (U). Timin i uracil se razlikuju prema metilnoj skupini na C5 atomu prstena koja izostaje u strukturi uracila.

5-fluorouracil analog je uracila, komponente ribonukleinske kiseline koji pripada u skupinu antimetabolita. 5-FU sintetizirao je Charles Heidelberger 1957.godine. Indiciran je za palijativno liječenje karcinoma dojke, debelog crijeva i rektuma kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim citostaticima (www.almp.hr).



Slika 2. 5-fluorouracil

Stanice koje se brzo dijele (tumorske stanice) trebaju obilnu opskrbu timidilatom za sintezu DNA. Osjetljivost tih stanica na inhibiciju sinteze timidilat-monofosfata (TMP) iskorištena je u liječenju raka. Klinički upotrebljavani lijek protiv raka, fluorouracil, prevodi se *in vivo* u fluor-deoksiuridilat-monofosfat (F-dUMP). Budući da u dijelu katalitičkog ciklusa djeluje kao normalni supstrat, ovaj analog deoksiuridilata ireverzibilno inhibira timidilat sintazu. Za stvaranje TMP potrebno je uklanjanje protona (H^+) s C-5 nukleotida vezanog u aktivno mjesto. Međutim, enzim ne može oduzeti fluor s F-dUMP, pa je kataliza zaustavljena u fazi kovalentnog kompleksa nastalog između fluor-uridilat-monofosfata (F-UUMP), metilentetrahidrofolata i sulfhidrilne skupine enzima. To je primjer suicidalne (samoubojstvene) inhibicije, pri kojoj enzim pretvara supstrat u reaktivni inhibitor koji zaustavlja enzimsku aktivnost. Osim toga, 5-FU ugrađuje se u RNA umjesto uracila te na taj način ometa transkripciju i postranskripcijsku obradu RNA (Berg i sur., 2013).



Slika 3. Reakcija nastajanja ternarnog kompleksa iz F-UUMP, metilentetrahidrofolata i sulfhidrilne skupine enzima timidilat sintaze

Kompleksi metala mogu stvarati interakcije s dvostrukom uzvojnicom DNA na dva načina: kovalentno i nekovalentno (Chen i sur., 2007). Smatra se da biološka aktivnost kompleksa metala koji imaju antitumorsko djelovanje isključivo ovisi o njihovoj sposobnosti vezanja s DNA te na taj način oštete dvostruku uzvojnica i ometaju njezinu funkciju (Burrows i Rokita, 1994). Kao najuspješniji antitumorski lijekovi u povijesti kemoterapija smatraju se cisplatin ($cis-Pt(NH_3)_2Cl_2$) i karboplatin (Siddik, 2003) koji često izazivaju nuspojave, nisu specifični

te su toksični prema zdravim stanicama (Florea i Büsselberg, 2001). Iz tog razloga proučavaju se brojni kompleksi različitih metala koji bi trebali uzrokovati manje nepoželjnih popratnih pojava, a imati širi spektar antitumorskog djelovanja.

5-FU koristi se više od 40 godina u liječenju raka debelog crijeva. Primjenjuje se intravenozno i upotrebljava u različitim kombinacijama kako bi se odredila optimalna doza i način primjene. U liječenju naprednog oblika debelog crijeva, odgovor na monoterapiju je prilično nizak (oko 10 - 15 %). Međutim, proteklih 20 godina, napravljene su različite modulacije kako bi se povećala antikancerogena aktivnost 5-FU i prevladala rezistentnost na lijek. Strategije za povećanje aktivnosti 5-FU uključuju smanjenje degradacije i povećanje aktivacije 5-FU te povećanje vezanja timidilat sintaze za FdUMP. Posljedica toga je da je 5-FU ostao glavno sredstvo za liječenje ranog i naprednog oblika kolorektalnog tumora (Longley i sur., 2003).

1.3. KONJUGATI FEROCENA I NUKLEINSKIH BAZA

Istraživanje interakcija ferocena i ferocenskih derivata s biomolekulskim sustavima važno je za razumijevanje mehanizma bioloških aktivnosti i za razvoj novih lijekova. Zbog svojih redoks karakteristika, ferocen i njegovi derivati imaju veliki značaj u istraživanju molekuskog prepoznavanja (Van Staveren i Metzler-Nolte, 2004; Westwood i sur., 2004; Cooke i Rotello, 2002; Inouye i Takase, 2001; Li i sur., 1997; Fan i sur., 1994). Ferocenske jedinice povezane s međusobno sparenim nukleobazama, odnosno s DNA/RNA fragmentima, mogu biti korisni građevni blokovi u supramolekularnoj kemiji koja povezuje molekularno prepoznavanje s elektrokemijom (Patwa i sur., 2008).

1980. godine po prvi put je pripremljen ferocenski derivat s nuklobazom, N-supstituirani ferocenilmetil adenin (Chen, 1980). Ukoliko se organometalni fragment uvede na mjesto vezivanja šećera fragmenta (N1-položaj kod pirimidinskih baza, odnosno N9-položaj kod purinskih baza), biološki su učinci novosintetiziranih spojeva veći (Nguyen i sur., 2014).

Ferocenski fragment je sintetski ugrađen u strukture mnogih biološki relevantnih sustava kao što su peptidi, šećeri, lijekovi ili nukleozidi (Mawande-Maguene i sur., 2011; Patra i sur., 2010; Kirin i sur., 2006; Song i sur., 2006). Iz istog su razloga, nukleinske baze potencijalni ciljevi za konjugaciju s ferocenima (Lapić i sur., 2015). S obzirom na to da se zbog svoje

strukture mogu ugraditi u biološke i elektrokemijski aktivne sustave, pirimidin i purin supstituirani ferocenom zanimljivi su organometalni spojevi.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

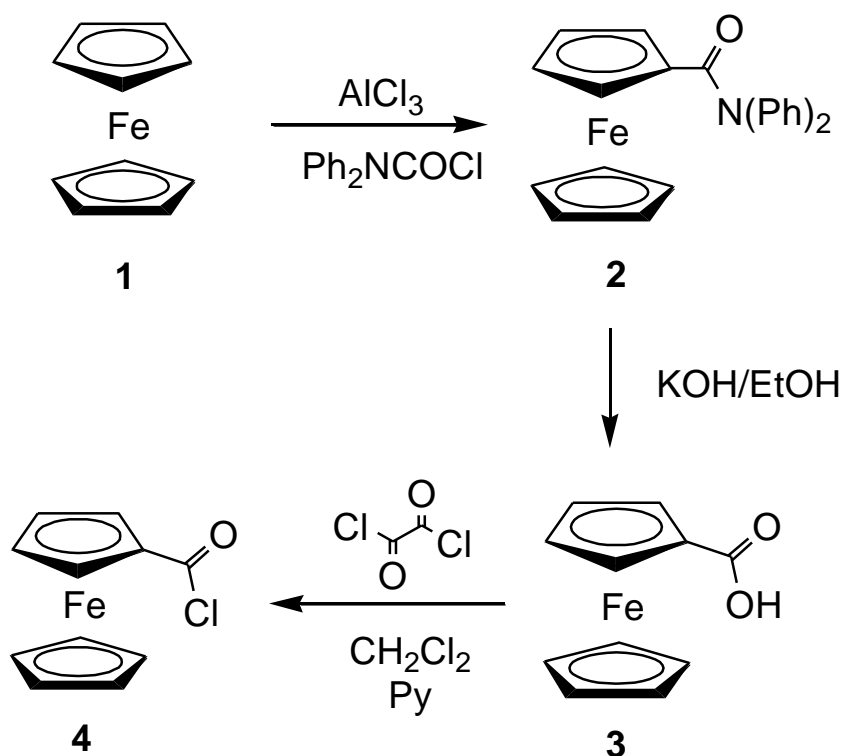
Ova se studija temelji na kombinaciji teorije i eksperimenta. Istraživanje uključuje sintetske postupke, spektroskopske analize i kvantno - kemijske račune. Cilj ovog istraživanja je priprava ferocenoilnih derivata pirimidinskih baza, spektroskopsko proučavanje njihovih svojstava i kvantno - kemijsko tumačenje dobivenih eksperimentalnih rezultata. Ferocenima supstituirani nukleozidi posebno su zanimljivi jer su nedovoljno ispitani derivati te njihove strukture sadrže biološki i elektrokemijski aktivne komponente. S obzirom na redukcijski potencijal i posebna elektrokemijska svojstva ferocena, očekuje se zanimljiva interakcija ferocenoilnih supstituenata s aromatskim sustavom nukleobaze.

U svrhu pripreme ferocenoilnih derivata nukleobaza potrebno je optimirati sintetsku proceduru, odnosno odrediti najpovoljnije reakcijske uvjete (otapalo, temperaturu, katalizatori...) pri kojima dolazi do formiranja željenih produkata. Za praćenje tijeka reakcije između nukleobaza i ferocenoil klorida (FcCOCl) potrebno je odrediti najprikladniju spektroskopsku metodu. U tu će se svrhu testirati NMR spektroskopija (^1H , ^{13}C , ^{19}F), jer ona omogućuje analizu dinamike reakcije, te određuje strukturalna svojstva produkata. Analiza eksperimentalnih podataka provedena je upotrebom niza teorijskih modela (takozvani DFT funkcionali), to jest provjerit će se kvantno - kemijski računi (geometrijska optimizacija, frekvencijski računi) koji omogućuju razumijevanje reakcijske kinetike i elektronske strukture/svojstava reaktanata i produkata.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 PRIPRAVA SPOJEVA

Produkti su pročišćeni komatografijom na koloni (Fluka, Silica gel, 90 Å) koristeći smjese $\text{CH}_2\text{Cl}_2/(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ (10:1). *N, N* - difenilferocenkarboksamid je pripremljen uz 54 % iskorištenje iz ferocena i *N, N* - difenilkarbamoil klorida. Alkalnom hidrolizom *N, N* - difenilkarbamoil klorida nastaje 80 % ferocenkarboksilne kiseline.



Slika 4. Shematski prikaz pripreve ferocenoil klorida

3.1.1. *N,N*-difenilferocenkarboksamid (2)

Suspenziji aluminijskoga klorida (3,58 g, 26,8 mmol) u suhom dikloretanu (27 mL) doda se otopina Ph_2NCOCl (6,23 g, 26,8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26,8 mmol). Nakon 24 sata refluksiranja reakcijska se smjesa prenese u čašu s ledom i ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom otopinom NaCl , osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **2** (8,5 g).

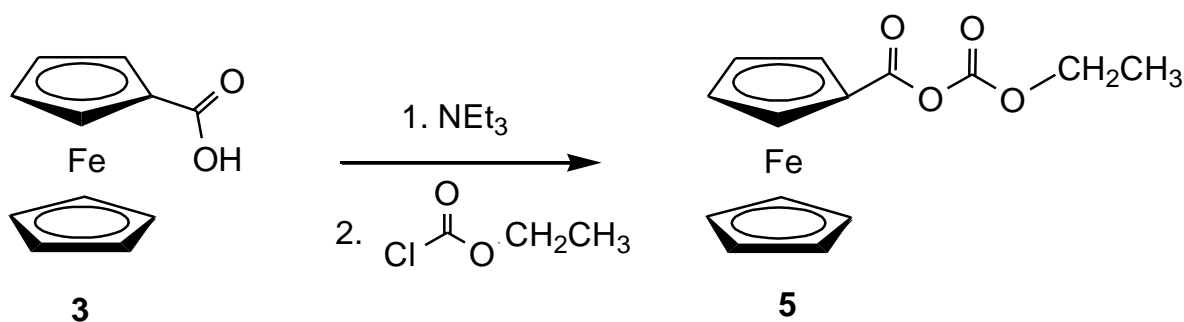
3.1.2. Ferocenkarkoboksilna kiselina (3)

Sirovi se spoj *N,N*-difenilferocenkarkoboksamid (8,3 g) otopi u 20 %-tnoj etanolnoj otopini kalijeva hidroksida (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5 %-tnoj otopini NaHCO₃ i estrahira diklormetanom. Organska se faza ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari, pri čemu je dobiveno 4,05 g neizreagirano supstrata *N,N*-difenilferocenkarkoboksamida. Zakiseljavanjem alkalne vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3,98 g (80 %) tamnožutih kristala kiseline **3**. $t_f = 193-200$ °C.

3.1.3. Ferocenoil klorid (4)

Otopini ferocenkarkoboksilne kiseline (300 mg, 1,3 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se svježe destiliran oksalil klorid (274 mL, 3,13 mmol) i jedna kap piridina. Nakon dva sata refluksiranja, u reakcijskoj se smjesi upari diklormetan, dobije se tamna smjesa te se doda petroleter (3 mL) i ponovo refluksira 10 minuta na 80 °C. Filtriranjem i uparavanjem dobiva se 275 mg crvenih kristala FcCOCl **4**. ($\eta = 85$ %)

IR (CH₂Cl₂): ν 2958 (w, C-H, Fc), 1755 (s, C=O) cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 4.38 (5H, s, Cp), 4.58 (2H, t, H- β'), 4.91 (2H, t, H- α'); ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz, 298 K, ppm): δ 70.4 (C- α'), 71.2 (C- β'), 71.7 (Cp), 73.3 (Ci), 178.3 (CO).

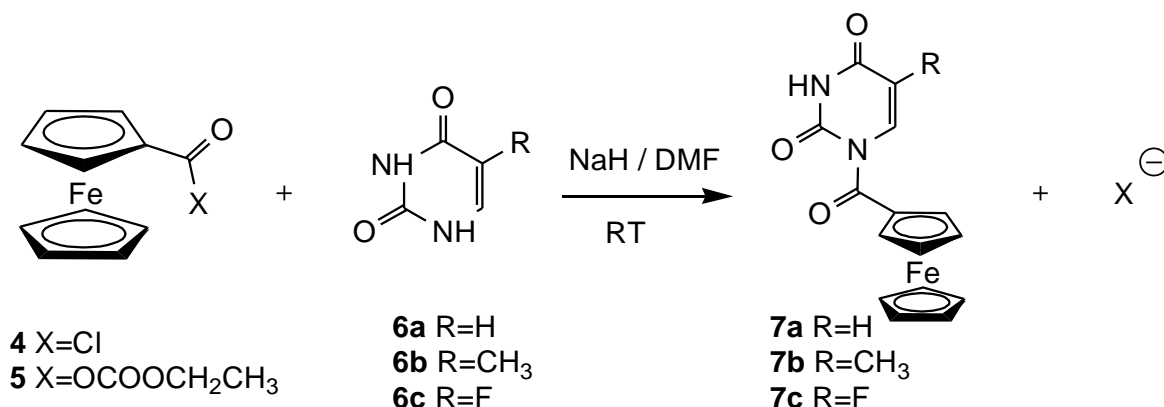


Slika 5. Prikaz reakcijskog puta za sintezu ferocenoil etil karbonata

3.1.4. Ferocenoil etil karbonat (5)

Suspendirana otopina FcCOOH (500 mg, 2,175 mmol) u vodi (0,41 mL) se otopi dodatkom acetona (7,4 mL) i ohladi na 0 °C. Dokapava se trietilamin (7,4 μ L) u acetonu (4,5 mL), a potom otopina etilklorformijata (5,8 μ L) u acetonu (1,15 mL). Nakon 30 minuta miješanja,

reakcijska se smjesa upari i sirovi produkt ferocenoil etil karbonata (narančasta krutina) **5** koristi za kopulaciju s nukleobazama.



Slika 6. Regioselektivno N1-aciliranje nukleobaza **6** (uracil, **6a**; timin, **6b**; 5-fluorouracil, **6c**) s ferocenoil kloridom **4**, odnosno s ferocenoil etil karbonatom **5**.

Postupak pripreve N1-ferocenoilnih derivata pirimidinskih nukleobaza započinje dodatkom smjese 1,0 mmol FcCOCl i 1,5 mmola NaH otopini pirimidinske baze (1,0 mmol) u 3 mL DMF. Smjesa se miješa 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega se bistroj otopini dokapava FcCOOH (1 mmol) ili kod određenih baza FcCOOCOOEt. Nakon 10 - 30 minuta miješanja, reakcijska se smjesa neutralizira s 10 % limunskom kiselinom. Nakon ekstrakcije s diklormetanom, organski se sloj uparava *in vacuo*. Dobiveno ulje se pročišćava preparativnom tankoslojnom kromatografijom (silika gel, diklormetan : aceton 10:1). Prva se frakcija uglavnom sastoji od žutog produkta (~10 %) dok druga frakcija sadrži N1-ferocenoilnu pirimidinsku bazu.

N1-ferocenoil uracil (**6a**) : crveno-narančasti kristali (269,62 mg, $\eta = 64,58\%$)

IR (CH₂Cl₂): $\nu = 3374$ (w, NH), 3099 (w, CH, Fc), 1700 (s, CO), 1633 (w, CO) cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 11.5 (1H, s, N3-H), 8.00 (1H, d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, C6-H), 5.74 (1H, d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, C5-H), 4.85 (2H, t, ³J_{HH} = 2.0 Hz, H-β'), 4.74 (2H, t, ³J_{HH} = 2.0 Hz, H-α'), 4.33 (5H, s, Cp). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, 298 K, ppm): δ 173.59 (FcCO), 163.8 (C4), 149.9 (C2), 141.3 (C6), 102.9 (C5), 74.1 (C-α'), 72.6 (Ci), 71.9 (C-β'), 71.1 (Cp).

N1-ferocenoil timin (**6b**) : narančasti kristali (245,79 mg, $\eta = 72,68 \%$)

IR (CH₂Cl₂): $\nu = 3375$ (w, NH), 2927 (w, CH, Fc), 1730 (s, CO), 1700 (s, CO) cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 11.48 (1H, s, N3-H), 7.87 (1H, q, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, C6-H), 4.84 (2H, t, ³J_{HH} = 2.2 Hz, H- α'), 4.71 (2H, t, ³J_{HH} = 2.2 Hz, H- β'), 4.32 (5H, s, Cp), 1.85 (3H, d, ⁴J_{HH} = 1.3 Hz, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, 298 K, ppm): δ 173.7 (FcCO), 164.6 (C4), 149.9 (C2), 136.6 (C6), 111.6 (C5), 73.8 (C- α'), 72.9 (Ci), 71.9 (C- β'), 71.1 (Cp), 12.3 (CH₃).

N1-ferocenoil 5-fluorouracil (**6c**) : crveni kristali (203,04 mg, $\eta = 59.35 \%$)

IR (CH₂Cl₂): $\nu = 3366$ (w, NH), 2924 (w, C-H, Fc), 1720 (s, CO), 1648 (s, CO) cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz, 298 K, ppm): δ 11.98 (1H, s, N3-H), 8.42 (1H, d, ³J_{FH} = 6.4 Hz, C6-H), 4.89 (2H, t, ³J_{HH} = 2.3 Hz, H- α'), 4.73 (2H, t, ³J_{HH} = 2.3 Hz, H- β'), 4.34 (5H, s, Cp). ¹³C NMR (DMSO-d₆, 100 MHz, 298 K, ppm): δ 172.7 (FcCO), 158.1 (d, ³J_{FC} = 27.05 Hz, C4), 148.6 (C2), 140.9 (d, ²J_{FC} = 234.50 Hz, C5), 125.7 (d, ³J_{FC} = 36.06 Hz, C6), 73.9 (C- α'), 72.48 (Ci), 71.9 (C- β'), 71.1 (Cp). ¹⁹F NMR (DMSO-d₆, 376 MHz, 298 K, ppm): δ -167.4 (d, ³J_{HF} = 6.4 Hz, C5-F).

3.2 METODE KARAKTERIZACIJE UZORAKA

Temperature tališta pripremljenih spojeva određene su pomoću Buechi aparature. Infracrvena (IR) spektroskopska mjerenja provedena su na Bomem MB100 Mid FT IR spektrofotometru. Korišteni su KBr-diskovi ili otopine u diklormetanu. NMR spektri spojeva u DMSO-d₆ (dimetilsulfoksid-d₆) ili CDCl₃ (kloroform) izmjereni su na Varian INOVA 400 spektrometru, pri 399.6 MHz za ¹H, 100.5 MHz za ¹³C i 375.9 MHz za ¹⁹F. Kemijski pomaci, δ , za ¹H i ¹³C NMR spektre izraženi su u ppm vrijednostima prema internom standardu TMS (tetrametilsilan), a za ¹⁹F NMR spektre prema CFCl₃ (fluortriklormetan). Kostante sprege, *J*, izražene su u Hz. Signali su označeni kao s - singlet, d - dublet i t - triplet. Produkti su pročišćeni tankoslojnom kromatografijom na silikagelu („Merck“, Kieselgel 60 HF₂₅₄). DMF (dimetilformamid) je pročišćen vakuumskom destilacijom i čuva se stajanjem iznad

molekulskih sita. Sve pripreve su izvedene u bezvodnoj sredini i u atmosferi inertnog plina argona.

3.3 NUKLEARNA MAGNETSKA REZONANCIJA

NMR je važna komplementarna metoda za ispitivanje strukture organskih spojeva i određivanje trodimenzionalne strukture makromolekula. Moderne se NMR tehnike koriste za određivanje struktura makromolekula kao što su: ugljikohidrati, nukleinske kiseline, male i prosječno velike proteine. NMR može dati uvid u dinamiku struktura, uključujući konformacijske promjene i interakcije s drugim molekulama. Pritom se podaci o strukturi molekule dobivaju ispitivanjem magnetskih svojstava pojedinih atoma unutar molekula. NMR se može primijeniti na jezgre koje imaju magnetski moment.

Jezgre s neparnim atomskim brojem ili neparnim masenim brojem imaju nuklearni spin koji se može detektirati NMR spektrometrom (*engl.* spin, brzo okretanje zvrka, okretanje oko svoje osi). NMR se temelji na interakciji magnetskog polja i spinskog magnetskog momenta jezgre, kvantno mehaničke veličine. Samo određene jezgre, uključujući ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F i ^{31}P , posjeduju spin i njemu pripadajući spinski magnetski moment.

Jezgra posjeduje dva kvantna broja: kvantni broj nuklearnog spina I koji može biti cijeli ili polucijeli broj (npr. 0, 1/2, 1, 3/2) te nuklearni magnetni spinski kvantni broj m_I koji govori o orijentaciji nuklearnog spina u magnetnom polju. Atomska jezgra koja ima spinski kvantni broj I može u prostoru prema proizvoljnoj osi zauzeti $2I+1$ različitih orijentacija magnetskog momenta. Orijetacije međusobno razlikujemo magnetskim kvantnim brojem m_I koji može imati vrijednosti:

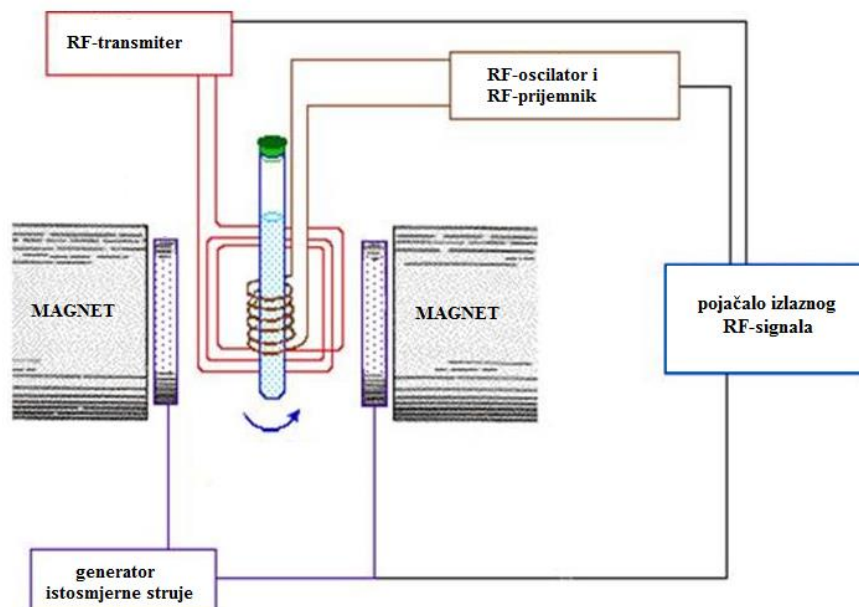
$$m_I = I, I-1, \dots, -I.$$

Energetska razlika između spinova proporcionalna je jakosti magnetskog polja što je vidljivo iz jednadžbe:

$$\Delta E = h\nu = \gamma \frac{h}{2\pi} H_0$$

pri čemu je ΔE energetska razlika dvaju stanja spina, h je Planckova konstanta, ν je frekvencija rezonancije, H_0 jakost vanjskog magnetskog polja te γ žiromagnetski omjer svojstven za pojedine vrste jezgre (konstanta ovisna o magnetskom momentu ispitivane jezgre).

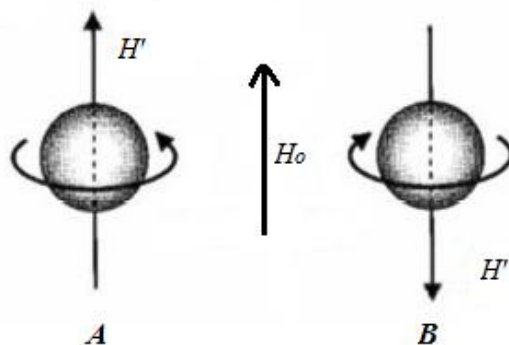
Uzorak za analizu stavlja se u staklenu cjevčicu smještenu između polova snažnog magneta. Oko cjevčice s uzorkom nalazi se uzvojnica spojena na izvor i prijammnik elektromagnetskog zračenja (RF-oscilator i RF-prijemnik). NMR analiza najčešće se provodi u deuteriranim otapalima, kao što su tetraklorugljik (CCl_4) ili deuterirani kloroform (CDCl_3), tako da se opažaju samo protoni uzorka. Cjevčica s uzorkom brzo rotira (Slika 7.). NMR-spektroskopijom mogu se analizirati i čvrste tvari i plinovi.



Slika 7. Shema spektrometra nuklearne magnetske rezonancije

Proton se promatra kao pozitivno nabijena čestica koja se okreće oko svoje osi. Pritom se stvara vrlo slabo magnetsko polje H_0 u smjeru osi vrtnje (spina). Djelovanjem vanjskog magnetskog polja H dolazi do usmjeravanja protona paralelno (A) ili antiparalelno (B) prema smjeru magnetskog polja. Paralelna orijentacija (A) ima nižu energiju, no riječ je o vrlo malim razlikama. Zajedničkim djelovanjem vanjskog magnetskog polja i radiozračenja za vrijeme NMR-analize jezgre se energetski preturbiraju, odnosno prelaze iz paralelnog u antiparalelno stanje. Kada se energija, koja se prenosi na jezgre mijenja kontinuirano promjenom magnetskog polja ili radiofrekvencije kaže se da instrument radi tehnikom kontinuiranog vala. Većina NMR-spektrometara radi uz primjenu stalne radiofrekvencije, dok se jakost magnetskog polja mijenja prilikom snimanja spektra. Kad se energija koju je primila jezgra izjednači s razlikom energija stanja spina, postignut je uvjet za nuklearnu magnetsku rezonanciju. Do apsorpcije energije u jezgri dolazi prilikom prelaska iz jednog spinskog stanja

u drugo. Apsorpciju i potom emisiju energije vezanu uz zakretanje spina detektira radiofrekvencijski prijemnik, što se naposljetku bilježi kao signal u NMR-spektru (Pine, 1994).

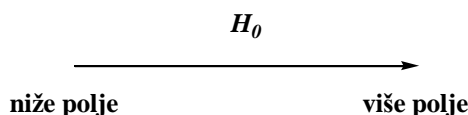


Slika 8. Usmjereni stanja spina vodikove jezgre u magnetskom polju H_0

Primjena NMR-spektroskopije temelji se na činjenici da jakost magnetskog polja pri jezgri nije jednaka jakosti primijenjenog magnetskog polja H_0 . Kad se molekula nađe u magnetskom polju, elektroni svakog atoma proizvode mala inducirana magnetska polja h_0 - proporcionalna, ali suprotnog smjera od primijenjenog polja H_0 . Stoga pojedinačne jezgre stvarno „osjećaju“ polje H , koje je rezultat međudjelovanja jakog polja magnetometra i brojnih malih induciranih polja susjednih atoma u molekuli. Kažemo da inducirana polja zaklanjaju pojedine jezgre od polja magnetometra.

$$H = H_0 - (h_0 + h'_0 + h''_0 + \dots)$$

Posljedica zaklanjanja jest da se magnetsko polje H_0 koje proizvodi spektrometar mora malo razlikovati od polja H da bi jezgre u magnetski različitoj okolini bile izložene energiji potrebnoj za postizanje rezonancije. U NMR-spektrometru, koji radi s nepromijenjenom radiofrekvencijom, mijenja se magnetsko polje koje „osjeća“ uzorak. Kad energija koja djeluje na pojedinu jezgru zadovolji vrijednost potrebnu za rezonanciju, ona se apsorbira, a prouzročena emisija (energije) se registrira uz pomoć uzvojnice radiofrekvencijskog prijemnika. Tako se dobiva NMR-spektar koji predstavlja graf rezonancije u ovisnosti o promjenjivom magnetskom polju. Dogovorno, spektar se snima slijeva udesno, u smjeru povećanja primijenjenog magnetskog polja.



3.3.1. KEMIJSKI POMAK

Kemijski pomak je položaj u NMR-spektru pri kojem nastupa rezonancija pojedine jezgre u određenoj molekulskoj okolini. Kemijski se pomak uvijek definira u odnosu na neki rezonancijski signal. U ^1H -NMR-spektrima i ^{13}C -NMR-spektrima organskih spojeva kao referentna vrijednost uzima se rezonancijski signal metilnih skupina tetrametilsilana (TMS, $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$); položaj tog signala označava se nulom. Budući da energija potrebna za rezonanciju pojedine jezgre ovisi o frekvenciji instrumenta i jakosti polja, kemijski pomaci istog uzorka izraženi u hercima razlikuju se na različitim instrumentima ovisno o tim karakteristikama. Da bi se pojednostavila usporedba spektara snimljenih na različitim instrumentima, za označavanje kemijskih pomaka rabi se ljestvica δ -vrijednosti, koje ne ovise o frekvenciji. Na toj se ljestvici kemijski pomaci izražavaju u dijelovima na milijun (ppm - parts per million):

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

pri čemu je δ_A kemijski pomak jezgre A izražen u ppm, $\Delta\nu$ razlika frekvencija rezonancija između standarda (TMS) i izmjenjenog signala (izraženi u Hz) te ν frekvencija spektrometra izražena u Hz (Pine, 1994).

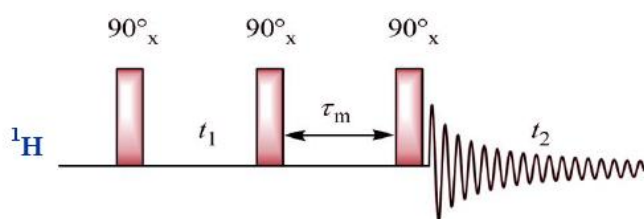
3.3.2. SPREZANJE SPINOVA

NMR-spektri ne sadrže samo pojedinačne signale već su u spektru prisutni višestruki signali (multipleti). Multipleti su izvor važnih informacija o strukturi spoja. Do nastanka multiplleta dolazi zato jer je proton u NMR-spektrometru istovremeno izložen utjecaju vanjskog magnetskog polja i induciranog polja elektrona koji ga zasjenjuju. Ako u blizini ima drugih protona, njihova mala magnetska polja također utječu na apsorpcijsku frekvenciju promatranog protona. Cijepanje signala u multiplete nastupa u slučaju kada su dvije različite vrste protona dovoljno blizu da osiguraju interakciju njihovih magnetskih polja. Singlet se cijepaju u multiplete kod kojih su linije udaljene za tzv. konstantu sprege J (Hz), koja zapravo predstavlja razliku frekvencija između susjednih linija multiplleta. Moguće je jednostavno cijepanje prvog reda, ali i cijepanja višeg reda djelovanjem daleke sprege. Za takve protone kažemo da su magnetski spregnuti.

3.3.3. NOESY SPEKTROSKOPIJA

Tehnika NOESY (*engl.* nuclear Overhauser effect spectroscopy) koristi se u strukturnoj i konformacijskoj analizi molekula, kao i za određivanje prostorne udaljenosti pojedinih atoma unutar molekule. Riječ je o homonuklearnoj dvodimenzijskoj tehnici koja se temelji na križnoj relaksaciji spinova koji su u dipolnoj sprezi, a čija je udaljenost unutar 5 Å. Simetrični spektri NOESY sastoje se od dijagonalnih signala, koji predstavljaju običan jednodimenzijški spektar promatrane aktivne jezgre, te izvandijagonalnih signala, koji indiciraju NOE interakciju između dipolno spregnutih spinova. Intenzitet signala NOE proporcionalan je recipročnoj vrijednosti šeste potencije udaljenosti između spinova, r^{-6} . Predznak efekta NOE funkcija je korelacijskog vremena, τ_c , definiranog kao prosječno vrijeme potrebno molekuli da bi se zakrenula za kut od jednog radijana oko bilo koje osi. U slučaju tehnike NOESY, NOE je pozitivan za molekule male molekulske mase (malo korelacijsko vrijeme), a negativan za molekule velikih molekulskih masa (veliko korelacijsko vrijeme). Dogovorno, predznak dijagonale u spektrima NOESY je pozitivan, dok je predznak izvandijagonalnih (korelacijskih) signala određen njihovim podrijetlom.

Pulsni slijed tehnike NOESY započinje pulsom od 90°_x koji prenosi magnetizaciju s osi z na ravninu xy . Nakon vremenskog perioda evolucije magnetizacije, t_1 , primjenom drugog pulsa 90°_x dio magnetizacije prenosi se na negativni dio osi z . Time se generira inverzija napućenosti koja omogućuje razvoj efekta NOE tijekom vremena miješanja, τ_m . Posljednim pulsom 90°_x magnetizacija se vraća u ravninu xy te se detektira (Slika 9.).



Slika 9. Pulsni slijed tehnike NOESY

3.4 RAČUNALNE METODE

Proučavane su molekulske strukture i svojstva koristeći računalnu kemiju i grafičke tehnike vizualizacije s ciljem da se opiše i razumije ponašanje molekula. Proces započinje nacrtom

struktura analiziranih molekula u jednom od programskih paketa za molekulske modeliranje. Nijedan takav virtualni prikaz nije realan uvid u stvarnu strukturu molekule, ona se optimira minimizacijom energije, tj. rješavanjem N-elektronske Schrödingerove jednadžbe (Enoch, 2002). Geometrijske optimizacije i frekvencijski računi provedeni su uporabom programskog paketa Gaussian09 instaliranog na klasteru Isabella Sveučilišnog računalnog centra (SRCE) u Zagrebu. Uporabom programa GaussView 3.0. (Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA), vizualizirana su strukturna i dinamička svojstva istraživanih molekula.

Korištene su komputacijske metode za predviđanje reakcijskih puteva, relativnih energijskih odnosa, geometrija i NMR kemijskih pomaka te su tako potvrđeni i razjašnjeni rezultati eksperimentalnih istraživanja. Kvantno - kemijski proračuni mogu biti izvedeni koristeći *ab-initio* metodu, DTF (teorija funkcionala gustoće) metodu i semiempirijske metode. Pritom su eksperimentalni podaci korišteni za provjeru točnosti i preciznosti komputacijskih modela.

3.4.1. METODE I PARAMETRI KVANTNO - KEMIJSKIH IZRAČUNA

Računalna kemija je grana kemije koja numerički proučava kemijske strukture i reakcije. Rezultati računalne kemije posebno su korisni kada su eksperimentalni podaci nepoznati. Može se koristiti kao dopuna eksperimentu, u svrhu boljeg tumačenja reakcijskih mehanizama i puteva. Temelje računalne kemije čine zakoni fizike (uglavnom zakoni kvantne mehanike, a ponekad i Newtonovi zakoni) te odgovarajuće aproksimacije. Osim za proučavanje stabilnih molekula, računalna se kemija može koristiti za opis kratko- živućih, nestabilnih intermedijera i prijelaznih stanja, čije se strukture ne mogu odrediti ili mjeriti eksperimentalno, što predstavlja značajnu prednost u odnosu na eksperimentalne metode. Osnovne vrste izračuna su geometrijska optimizacija, izračun energije određenog molekuskog sustava, izračun vibracijskih frekvencija molekula te rješavanje vremenski-ovisnih potencijala unutar molekula

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

Semiempirijske metode (npr. AM1, PM3, MINDO) koriste parametre izvedene iz eksperimentalnih podataka (Dewar i Thiel, 1977; Stewart, 1989). *Ab-initio* metode (npr.

Hartree-Fock (HF) metoda (Roothan, 1951; Pople i Nesbet, 1954), Møller-Plesset (MP) skupina metoda (Møller i Plesset, 1934; Pople i sur., 1976), skupina metoda konfiguracijske interakcije (CI) (Pople i sur., 1977) ne koriste eksperimentalne parametre u svojim izračunima te se oslanjaju na zakone kvantne mehanike koristeći osnovne fizikalne konstante poput Planckove konstante, brzine svjetlosti te mase i naboja elektrona i jezgri.

Kvantno - mehaničke metode nazivaju se još i *ab-initio* metode. Naziv *ab-initio* latinskog je podrijetla i u prijevodu znači „od samog početka“. *Ab-initio* metode kreću od prvih principa (postulata) kvantne mehanike te ne uzimaju u obzir eksperimentalno dobivene (empirijske) parametre, osim fundamentalnih konstanti kao što su masa elektrona, Planckova konstanta, masa elementarnih čestica i sl. Subatomske kvantno - mehanički pristup koristi se za određivanje svojstava koja direktno ovise o raspodjeli elektronske gustoće ili u nekim nestandardnim sustavima za koje nisu dostupni empirijski parametri, a također i za opisivanje kemijskih reakcija u kojima dolazi do pucanja i/ili stvaranja veze. Kvantna mehanika daje detaljnu i točnu informaciju o nekoj molekuli (termodinamičke i strukturne vrijednosti), ali zbog svoje računalne zahtjevnosti ograničena je na male sustave. Te metode (posebno MPn, QCISD, multikonfiguracijske i kompozitne metode) daju precizne kvantitativne podatke za široki raspon kemijskih sustava, ali su jako zahtjevne u pogledu računalnih resursa.

Hartree-Fock metodom određuju se valna funkcija i energija višeelektronskog sustava u ravnotežnom stanju. Točnije, smatra se da elektroni međusobno ne interagiraju već se promatraju u srednjem polju koje je rezultat djelovanja svih ostalih elektrona u sustavu (tj. zauzimaju jednočestične orbitale) tvoreći time valnu funkciju, čime je zapravo višeelektronski problem sveden na niz jednoelektronskih. HF metodom aproksimira se valna funkcija kao skup jednoelektronskih funkcija (orbitala), pri čemu je svaka produkt prostorne funkcije i spinskog stanja. Semiempirijske, kao i *ab-initio* metode, počivaju na kvantno - mehaničkim principima, tj. Hartree-Fock (Enoch, 2008) formalizmu. I jednim i drugim metodama rješava se Schrödingerova jednadžba (Fischer, 1977) za elektronsku valnu funkciju, u okviru Born-Oppenheimerove aproksimacije (Born i Oppenheimer, 1927). Međutim, semiempirijske metode znatno su pojednostavljene na način da uključuju mnoge aproksimacije i eksperimentalno dobivene (empirijske) parametre. Bazni skup ograničen je na valentne orbitale i račun elektronskih integrala znatno je pojednostavljen zanemarivanjem ili parametarskom procjenom određenih doprinosa. Takve metode pogodne su za tretiranje velikih molekulskih sustava u kojima su kvantno - mehaničke metode neučinkovite jer su računski prezahtjevne. Tako je npr. novijim semiempirijskim metodama omogućeno

proučavanje molekularnih sustava koji se sastoje od nekoliko tisuća atoma dok se *ab-initio* pristupom za rješavanje istog problema može tretirati oko pedeset do sedamdeset atoma. Semiempirijske metode mogu se koristiti i za početnu procjenu geometrije molekule na koju se zatim naknadno primjenjuje *ab-initio* postupak.

Teorija funkcionala gustoće po točnosti je u nekim slučajevima usporediva s *ab-initio* metodama. DFT metode se temelje na Kohn-Sham teoriji da energija osnovnog stanja kemijskog sustava izravno ovisi o elektronskoj gustoći u molekularnom sustavu (Hohenberg i Kohn, 1964; Becke, 1992; Pople i sur., 1992). Za razliku od HF metode, DFT metode uključuju efekt elektronske korelacije, tj. činjenicu da elektroni u molekularnom sustavu „reagiraju“ na kretanje drugih elektrona te se orijentiraju tako da su privlačne i odbojne sile u molekuli u ravnoteži. Prikladnim odabirom DFT parametara mogu se dobiti izračuni koji su usporedivi s puno zahtjevnijim *ab-initio* metodama. Parametri koje je potrebno odabrati su funkcional i bazni skup prikladan za odgovarajući opis modeliranog kemijskog sustava.

Metoda koja ima vrlo čestu primjenu u kvantno - kemijskim računima je DFT (*engl.* Density Functional Theory). Kvantno - kemijske metode koje koriste DFT prikladne su za točan opis prijelaznih metala i vrlo pogodne za opis strukture, energija, vibracijskih frekvencija, te drugih svojstva (Koch i Holthausen, 2001).

DFT i HF teorije povezane su metodom izračuna elektronske strukture, a to je iz elektronske gustoće. Mogu se smatrati djelomično analognima jer se unutar obje koriste tzv. bazne funkcije i varijacijsko načelo, za pronalazak valne funkcije koja odgovara najnižem energetsom stanju (Enoch, 2008). Za razliku od valne funkcije, koja nije fizička observabla već matematička konstrukcija, elektronska gustoća je fizičko svojstvo svih molekula. Hohenberg i Kohn su 1964. godine (Hohenberg i Kohn, 1964) pokazali da u osnovnom energetsom stanju svojstva sustava su jedinstveno definirana elektronskom gustoćom. Teorija funkcionala gustoće gleda na elektronska kretanja kao da su „nepovezana“ dok aproksimacija slobodnih elektrona može biti iskorištena za prikaz kinetičke energije.

Temelji se na dva zaključka koji su danas prihvaćeni kao teoremi kvantne mehanike:

- 1) Funkcija osnovnog stanja je jedinstvena funkcija gustoće čestica, što implicira da se iz gustoće čestica može izračunati valna funkcija, a iz valne funkcije sve ostale fizikalne veličine.

2) Energija osnovnog stanja je funkcional gustoće čestica i ima minimalnu vrijednost za pravu gustoću čestica (Lundqvist i March, 1983).

DFT metodom dimenzionalnost problema se smanjuje budući da se ne razmatraju valne funkcije, već gustoća vjerojatnosti (naboja) koja je njima određena. Naime, dok se HF pristupom, za sustav koji se sastoji od N elektrona, ukupna valna funkcija izračunava na temelju N jednoelektronskih valnih funkcija, DFT metodom opisuju se svojstva molekule na temelju prostorno ovisne elektronske gustoće, $\rho(x, y, z)$ i ne vodi se računa o broju elektrona. Na taj se način potrebno računalno vrijeme bitno smanjuje što je jedna od najznačajnijih prednosti DFT metode. DFT metoda može biti primijenjena na većinu sustava.

Za provedbu kvantno - mehaničkih računa koriste se određeni bazni skupovi kojima su opisane molekulske orbitale. To su linearne kombinacije skupa temeljnih funkcija tj. atomskih orbitala (rješenja Hartree-Fock jednadžbi) centriranih na svaku atomsku jezgru unutar molekule (engl. Linear combination of atomic orbitals, LCAO).

Za geometrijsku optimizaciju molekula korišten je B3LYP (engl. Becke Three Parameter Hybrid Functionals) funkcional i bazni skup 6-31G(d) za sve atome. Za opis željeza korišten je SDD (engl. Stuttgart-Dresden-Bonn) bazni skup. Nakon što je definiran reakcijski profil, energije stacionarnih točaka na odgovarajućoj potencijalnoj plohi (PES) izračunate su s proširenim baznim skupom 6-31+G(d,p).

3.4.2. GEOMETRIJSKA OPTIMIZACIJA I FREKVENCIJSKI RAČUN

Za potpunu karakterizaciju stacionarnih točaka na PES-u (engl. potential energy surface), potrebno je izvršiti frekvencijski račun, koji izračunava frekvencije vibracija atoma unutar molekule izračunom druge (i viših) derivacije energije u odnosu na atomske koordinate te rješavajući vibracijske Schrödingerove jednadžbe (svaki vibracijski mod je opisan različitim potencijalom). Uz prikaz svih dostupnih vibracija atoma u molekuli (vrsta vibracije i atomi koji sudjeluju u vibraciji), frekvencijskim računom dobivamo i informaciju da li optimizirana struktura odgovara minimumu na PES (reaktanti, intermedijeri i produkti) ili prijelaznom stanju. Globalni se minimum, odnosno maksimum, definira kao najmanja (najveća) vrijednost funkcije na njenom području definiranosti, dok je lokalni minimum (maksimum) minimum funkcije u nekom intervalu koji ne mora, ali može biti globalni minimum (maksimum). Ako postoji samo jedna imaginarna vibracijska frekvencija, dobiven je minimum u svim smjerovima osim u smjeru vibracije s imaginarnom frekvencijom, što predstavlja strukturu prijelaznog stanja (TS) za kemijsku reakciju na toj plohi potencijalne energije. Ukoliko je

locirana stacionarna točka s dvije i više imaginarnih frekvencija potrebno je dodatno optimizirati strukturu dok se ne locira stacionarna točka s jednom (TS) ili bez (minimum) imaginarnih frekvencija. Postojanje jedne imaginarne frekvencije karakterizira točku kao prijelazno stanje, no potrebno je primjeniti dodatne procedure kako bi se došlo do zaključka koje minimume ispitivano prijelazno stanje povezuje. Za potvrdu traženog reakcijskog puta, kojeg definira TS, potrebno je pratiti oba reakcijska smjera prema gradijentu intrinzičke reakcijske koordinate (IRC).

IRC računi (*engl.* Intrinsic Reaction Coordinate) opisuju reakcijsku koordinatu koja povezuje prijelazno stanje s lokalnim minimumima te se tako potvrđuje izravna povezanost reaktanata i produkata preko odgovarajućeg prijelaznog stanja (Gonzales i Schlegel, 1990). Početna točka u IRC računu odgovara strukturi prijelaznog stanja, a njezina se geometrija postupno optimizira (po reakcijskoj koordinati) do međuprodukata, odnosno produkata, te reaktanata (povratni smjer). Dobivene strukture, nakon dodatne geometrijske optimizacije daju lokalne minimume koji odgovaraju reaktantima i (među)produktima povezanih tim prijelaznim stanjem.

Geometrijska optimizacija je procedura kojom je moguće locirati minimum koji se nalazi u blizini početne, odnosno zadane geometrije. Temelji se na postepenoj promjeni geometrije molekule u smjeru gradijenta potencijalne energije sustava. Ukupna elektronska energija izračunata geometrijskom optimizacijom odgovara minimumu na PES. U stvarnosti molekula nema tu energiju, jer sama molekula nikada nije u stanju potpunog mirovanja, već će imati određeno vibracijsko, rotacijsko i translacijsko gibanje. Energija nulte točke (zero-point energy) se računa kao zbroj elektronske energije i tzv. "korekcije nulte točke", energije koja odgovara najnižem vibracijskom stanju molekule pri 0 K. Entalpija i entropija molekule se računaju kao različiti doprinosi translacijskog, vibracijskog i rotacijskog gibanja molekule (izvode se iz frekvencijskog računa) pribrojenu energiji nulte točke. Tu je uključena aproksimacija idealnog plina za translacijsko gibanje kao i aproksimacija rigidnog rotora za rotacijsko gibanje. U izračunima se mogu podesiti parametri za temperaturu (zadana temperatura iznosi 298 K) i tlak (zadani tlak iznosi 1 atm), te izotopi pojedinih elemenata. Gibbsova slobodna energija jednaka je razlici entalpije i entropije pomnožene s temperaturom ($G = H - TS$).

3.4.3. BAZNI SKUPOVI

Bazni skup baza je vektorskog prostora u kojoj se zapisuju molekulske orbitale. Potpuni opis valne funkcije zahtjeva beskonačan skup baznih funkcija, što je računski nedostupno. Odabirom baznog skupa opisuje se valna funkcija s konačnim brojem baznih funkcija. Što je veći broj baznih funkcija koje opisuju valnu funkciju, to je uglavnom točniji opis molekularnih orbitala. Promjena baznog skupa, mijenja i energiju i geometriju najniže energije kemijskog sustava kojeg promatramo. Za procjenu pogrešaka zbog uporabe (pre)malih baznih skupova, provode se najprije računi s minimalnim baznim skupom te se ponavljaju izračuni s većim baznim skupom. Usporedbom dobivenih rezultata utvđuje se efekt baznog skupa.

U kvantnoj su se kemiji i prije DFT metode desetljećima proučavali bazni skupovi za molekule, kroz Hartree-Fock i CI metode (Pople, 1999). Gotovo svo to znanje moglo se primijeniti i u DFT metodi što je uvelike doprinijelo velikoj popularnosti te metode u kemiji. Bazne funkcije dijele se po svom ponašanju kao funkcije radijalne koordinate na Slaterove orbitale (STOs, Slater type orbitals), koje eksponencijalno opadaju odmicanjem od izvora, te Gaussove orbitale (GTOs, Gaussian type orbitals), koje imaju oblik Gaussove krivulje. Slaterove orbitale bolje opisuju pravo ponašanje atomskih valnih funkcija, ali se s Gaussovima orbitalama lakše numerički barata jer je umnožak dviju Gaussovih orbitala „smještenih“ na različitim atomima opet Gaussova orbitala, dok produkt dvije Slaterove orbitale nije opet Slaterova orbitala. Zato je uveden kompromis između točnosti Slaterovih orbitala i prikladnosti Gaussovih, to su kontrahirane bazne funkcije, Slaterove orbitale raspisane preko malog broja Gaussovih orbitala. Primjeri takvih baznih skupova su 6-31G, 6-311++G(d,p) (Szabo i Ostlund, 1995; Pople, 1999) i oni su vrlo česta metoda rješavanja jednadžbi u kvantnoj kemiji.

Uz navedene funkcije prisutne su polarizacijske i difuzne funkcije. Polarizacijske funkcije formiraju se dodavanjem osnovnih funkcija većeg angularnog momenta na funkcije s manjim kutnim momentom (primjerice dodavanje p funkcije na s funkciju) te one omogućuju veću fleksibilnost molekulskim orbitalama. Difuzne funkcije su vrlo plitke gaussovske funkcije koje proširuju i točnije opisuju rubove gaussovske funkcije te time daju bolji opis molekulskih orbitala koje opisuju elektrone (u prosjeku) udaljenije od jezgara. Bazni skupovi se međusobno dijele po broju primitivnih gaussiana za opis unutarnjih orbitala, broju i kombinaciji primitivnih gaussiana koji čine složenu osnovnu funkciju za opis valentnih orbitala te prisutnost difuzijskih i/ili polarizacijskih funkcija. Skupina Popleovih baznih

skupova (Ditchfield, 1971), s notacijom 6-31G i dodatnim difuznim i/ili polarizacijskim funkcijama, često je korištena kombinacija. Tako kod 6-31+G(d) baznog skupa, unutarnje orbitale su opisane s jednom osnovnom funkcijom sastavljenom od 6 primitivnih gaussiana, a valentne orbitale su opisane s dvije složene osnovne funkcije, pri čemu je prva dobivena kombinacijom tri primitivna gaussiana, dok je druga dobivena kombinacijom jednog primitivnog gaussiana. Znak „+“ označava dodatak difuzne funkcije na sve teške atome, dok d označava primjenu d polarizacijskih funkcija (d primitivnog gaussiana) na sve teške atome. Najčešće korišten Popleov bazni skup je 6-31G(d), a često se koriste i 6-311G(d), 6-31G(d,p), 6-31+G(d). Također se koriste i bazni skupovi drugih autora (npr. Dunning (Dunning, 1989) i Wachters (Wachters, 1970)), ali oni se razlikuju u notaciji od Popleovih baznih skupova. Pravilan izbor baznog skupa posebno je važan primjerice kod opisivanja nabijenih sustava, kada je nužan dodatak difuzne funkcije kako bi se dobro opisao sustav. Općenito, pravilnom varijacijom baznog skupa mogu se postići točniji rezultati.

3.4.4. SOLVATACIJSKI EFEKTI

Računalna kemija omogućuje potpuno novi pristup proučavanju utjecaja otapala. Za razliku od eksperimentalnih metoda koje se gotovo beziznimno temelje na proučavanju ponašanja velikog mnoštva čestica, računalna kemija može dati informacije o ponašanju samo jedne, odnosno malog broja molekula u nekom sustavu. Takav pristup omogućuje istraživanje ponašanja različitih stabilnih i nestabilnih molekula u raznim otapalima, što ima primjenu u fizikalno-organskoj kemiji, organskoj sintezi i biokemiji (Tsai, 2002; Reichardt i Welton, 2011).

Otapalo se u računalnoj kemiji modelira na dva načina: implicitno i eksplicitno. Moderni implicitni modeli otapala, koji se temelje na parametrizaciji, vrlo su brzi i točni u slučaju stabilnih nenabijenih otapala, no ne mogu opisati usmjerene interakcije poput vodikovih veza (Ho i Coote, 2011). Metode implicitnog otapala moraju biti samousklađene, pa se nazivaju i SCRF (*engl.* Self-Consistent Reaction Field). S druge strane, eksplicitni modeli izravno uključuju molekule otapala u sustav, koristeći istu ili nižu razinu teorije od one upotrijebljene za otapalo. To im omogućava točniji opis nestabilnih sustava, ali i mogućnost opisa utjecaja otapala s mehanističkog aspekta. U tom smislu, eksplicitni modeli otapala daleko su korisniji alat od implicitnih, čija je upotreba uvelike ograničena na replikaciju poznatih, eksperimentalnih rezultata i na reakcije u kojima otapalo ne igra važnu ulogu.

Za opis reakcijskog medija u kojem se reakcija odvija, koriste se metode za izračunavanje solvatacijskih efekata. U tu se svrhu koristi SCRF metoda. U metodi samousklađenog polja preturbira se valna funkcija elektrona dok se ostale valne funkcije drži fiksnim te se tako računa energija sustava. Ovim principom se optimiziraju valne funkcije molekulskih orbitala te se računaju njihove energije. Ukupna elektronska energija sustava jednaka je zbroju energija svih orbitala.

Najpoznatija metoda za modeliranje efekata otapala je model polarizabilnog kontinuuma, PCM (engl. Polarizable continuum model) (Miertus i sur., 1981). Postoje dva tipa PCM modela: dielektrični, DPCM (engl. DielectricPCM) i provodni CPCM (engl. Conductor-like) model. DPCM tretira kontinuirano otapalo kao polarizirani dielektrik, a CPCM kao sredstvo konstantne permitivnosti.

Gibbsove slobodne energije određene su primjenom CPCM (*engl.* Conductor-like Polarizable Continuum Model) modela i skalirajućeg faktora zadane vrijednosti na 1,1 u Gaussian09 za sve atome (B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) razina) (Cossi i sur., 2002; Barone i Cossi, 1998; Barone i sur., 1997). Korišteni su UFF (*engl.* Universal Force Field) parametri radijusa solvatacijskih šupljina oko lakih i teških atoma. Relativna permitivnost (ϵ) otapala za DMF (N,N-dimetilformamid) iznosi 37.22.

Konstante zasjenjenja (σ) su izračunate B3LYP funkcionalom za CPCM/B3LYP/6-31G(d) geometrije optimizirane za dimetilsulfoksid (DMSO, $\epsilon = 46.83$), koristeći GIAO (*engl.* gauge including atomic orbitals) proširen s Wachter baznim skupom za željezo (8s7p4d) te 6-311G(d,p) za sve ostale atome. Kemijski su pomaci izraženi u odnosu na tetrametilsilan (TMS, $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) pri čemu konstante zasjenjenja za ^{13}C i ^1H iznose 181.29 te 31.86. Također se kao referentni signal koristio i ferocen kod kojeg su konstante zasjenjenja za ^{57}Fe , ^{13}C i ^1H iznosile -5299.35, 110.33 i 28.11, koristeći eksperimentalno dobivenu vrijednost kemijskog pomaka δ (^{57}Fe) od ferocena (1532 ppm). Sve su vrijednosti određene za najstabilnije konformere kod Boltzmannove konstante, temperature i tlaka.

Eksperimentalne vrijednosti ^{13}C NMR kemijskih pomaka u DMSO- d_6 uspoređene su s teorijskim vrijednostima dobivenima pomoću GIAO računa. Dobro slaganje eksperimentalnih s teorijski izračunatim kemijskim pomacima omogućuje pravilnu asignaciju NMR spektara.

Kako bi se odredio entropijski efekt zbog prisutnosti molekula otapala oko otopljene tvari može se koristiti model ćelije kojeg su razvili Adura i suradnici (Adura i sur., 2005). Ovaj model je predložen kako bi se eksplicitno procijenio efekt gubitka translacijskih stupnjeva

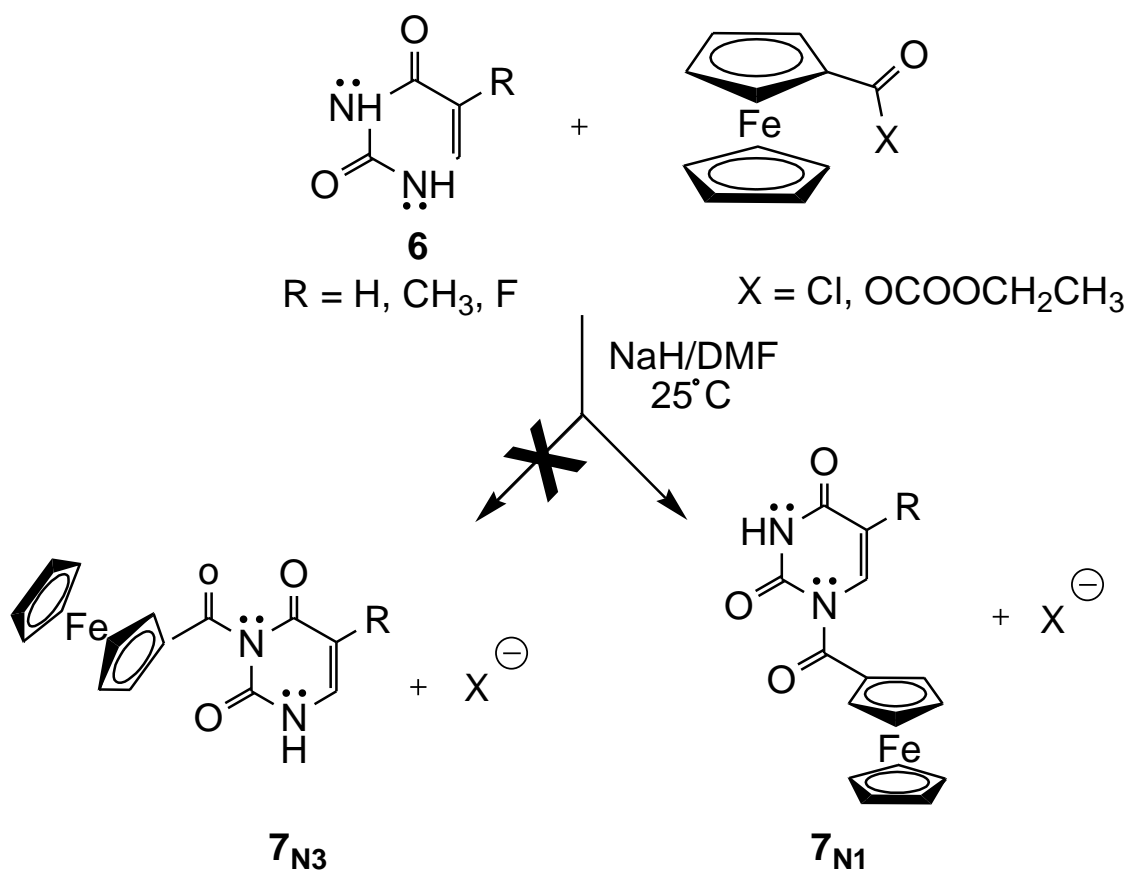
slobode u otopini na Gibbsovu energiju aktivacije biomolekulskih (ili više molekulskih) reakcija. Pokazano je da standardna implementacija modela kontinuuma nije dovoljna za adekvatnu procjenu povećanja Gibbsove energije koja odgovara smanjenju translacijskog kretanja specija duž reakcijske koordinate pri prelasku iz plinovite faze u otopinu. Pri prijelazu iz plinovitog u tekuće stanje pokazano je da primjena CPCM modela nije odgovarajuća za procjenu promjene Gibbsove energije koja odgovara smanjenju translacijskog gibanja. Razlika $\Delta\Delta G_{\text{sol}}$ između dviju Gibbsovih energija $\Delta G_{\text{sol}}^{\#}$ i ΔG_{sol} za reakcije $A + B \rightarrow A-B$ iznosi

$$\Delta\Delta G_{\text{sol}} = \Delta G_{\text{sol}}^{\#} - \Delta G_{\text{sol}} = RT \ln[(v_c(A)v_c(B))/v_c(A-B)] - RT \ln [k_B T/p]$$

gdje v_c odgovara volumenu solvacijske šupljine, k_B , T i p odgovaraju Boltzmannovoj konstanti, temperaturi i tlaku. Volumen modela radijusa za svaki spoj dobiven je CPCM izračunom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za pripremu N1-ferocenoil supstituiranih nukleobaza uracila, timina ili 5-fluorouracila korišteni su K_2CO_3 (kalijev karbonat), TEA (triethylamin) te NaH (natrijev hidrid) za deprotonaciju pirimidina. Priprava pirimidinskih baza u anionskom obliku s K_2CO_3 i s TEA dala je slabije rezultate, tj. manje iskorištenje i smanjen stupanj regioselektivnosti. Korištenjem NaH kao baze za deprotonaciju, dobiveni su isključivo N1-izomeri. Kiselist protona (pK_a) na N1- i N3- položaju uracila (ili timina) je slična (Zhachkina i Lee, 2009; Verdolino i sur., 2008; Kurinovich i Lee, 2000), te se time ne može objasniti uočena regioselektivnost reakcije. Korištenjem NMR spektroskopije i kvantno - kemijskih računa objašnjen je mehanizam te regioselektivnost reakcije između deprotoniranih nukleobaza i ferocenoil klorida (ili ferocenoil etil karbonata).



Slika 10. Regioselektivno N1-aciliranje pirimidinske nukleobaze **6** (uracil, $R = H$; timin, $R = CH_3$; 5-fluorouracil, $R = F$) s ferocenoil kloridom ($X = Cl$) ili ferocenoil etil karbonatom ($X = COOCH_2CH_3$)

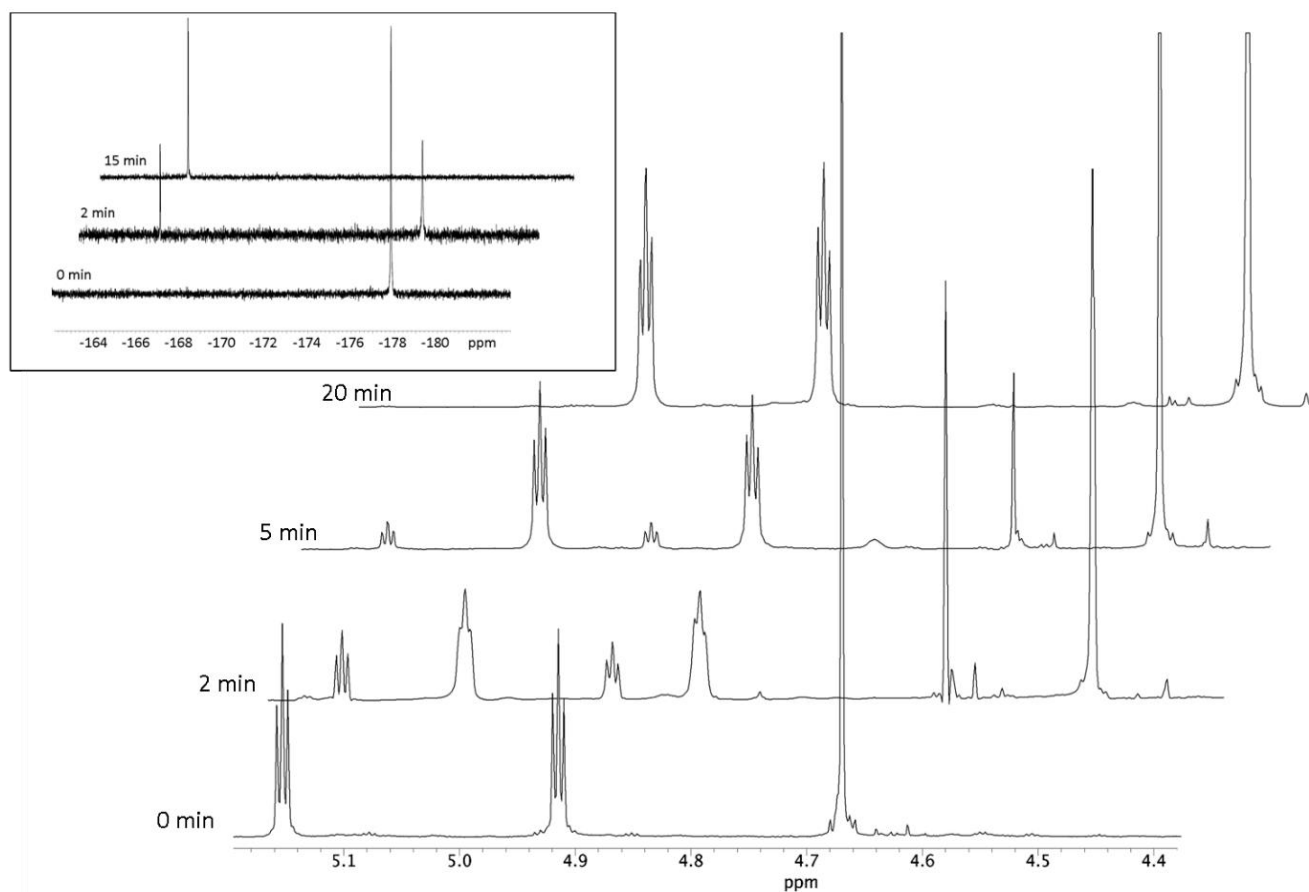
Objekte su reakcije $6 \rightarrow 7_{N1}$ i $6 \rightarrow 7_{N3}$ (vidi Sliku 10, gdje je R = H, CH₃ ili F) egzergone (Tablica 1). Izračunate Gibbsove slobodne energije (ΔG_r) za obje reakcije supstitucije (na N1- i N3-položaju nukleobaze) iznose između -50 i -120 kJ/mol. Za svaku reakciju locirano je nekoliko konformera produkata, a ovdje se razmatraju samo najstabilniji. U slučaju reakcije acetilklorida i nukleobaza, izračunata energija N1-produkata je niža od energije N3-acetiliranih produkata (Tablica 1). Međutim, u reakcijama benzoil klorida, odnosno ferocenoil klorida i nukleobaza, stabilnost N1- i N3-izomera je vrlo slična pa proizlazi da je formiranje produkata, u dvije različite reakcije, približno izoenergetski proces ($\Delta\Delta G_r = 0,7$ kJ/mol, za reakciju uracila s FcCOCl). Stoga se eksperimentalno uočena regioselektivnost ne može objasniti na temelju razlika u stabilnosti produkata (reakcije nisu termodinamički kontrolirane). Regioselektivnost reakcija je kinetički regulirana, odnosno određena je relativnom razlikom između aktivacijskih barijera za reakcije N1- i N3-aciliranja.

Tablica 1. Relativna^a Gibbsova energija (ΔG_r) i aktivacijska barijera ($\Delta G^\#$) (u kJ/mol na 298,15 K) za reakcije deprotoniranih nukleobaza (N1- i N3- položaj) i acil klorida (CPCM/UFF//B3LYP/6-31+G(d,p)/SDD metodom)^b

reakcija aciliranja na pirimidinskom prstenu		baza					
		uracil		timin		5-fluorouracil	
		ΔG_r	$\Delta G^\#$	ΔG_r	$\Delta G^\#$	ΔG_r	$\Delta G^\#$
baza +	N1	-116.4	39.4	-106.4	63.2	-89.3	75.5
MeCOCl	N3	-95.1	78.3	-83.4	104.5	-65.4	93.3
baza + PhCOCl	N1	-98.4	55.1	-84.0	80.3	-66.0	77.2
	N3	-95.1	96.7	-86.2	124.5	-67.9	115.8
baza + FcCOCl	N1	-84.3	87.8	-71.4	92.1	-53.4	97.6
	N3	-83.6	134.9	-69.1	164.0	-50.9	153.9

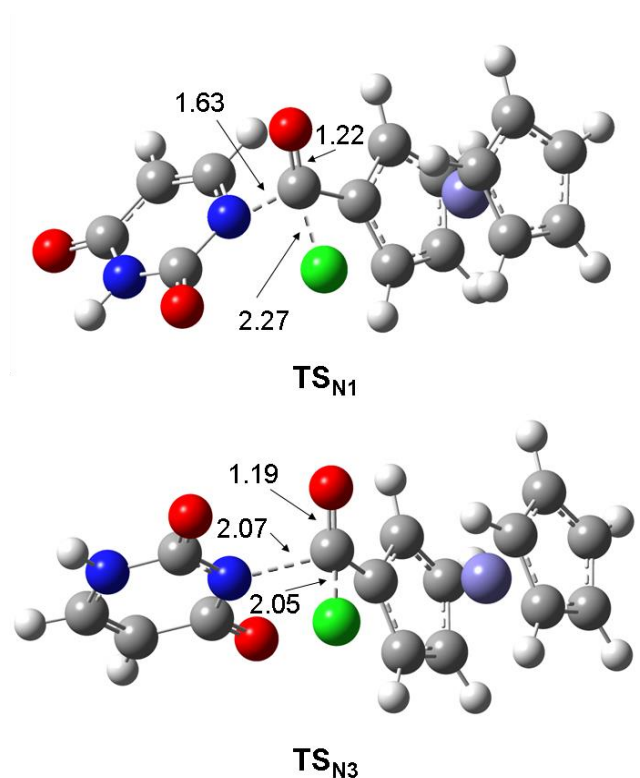
^a Kao nulta vrijednost uzet je zbroj vrijednosti energija za N1-deprotoniranu bazu i acil klorid

^b Sve geometrije su optimizirane na B3LYP/6-31G(d) razini, a solvacijski efekti izračunati su za DMF ($\epsilon = 37,22$)



Slika 11. Prikaz ^1H NMR spektra (400 MHz) reakcijske smjese (timin/NaH+FcCOCl u DMF-u). U gornjem lijevom kutu, prikazan je ^{19}F NMR spektar reakcijske smjese (5-FU/NaH+FcCOCl u DMF-u). Svi spektri su izmjereni u DMSO- d_6 na 25°C .

^{13}C NMR spektri acil-supstituiranih uracila i timina pokazuju da se N1- i N3-acilirani izomeri mogu razlikovati na temelju kemijskih pomaka za odgovarajuće C5 ugljikove atome (Fox i sur., 2004). Uvođenjem benzilne skupine na N1-položaj vrijednost kemijskog pomaka za C5 atom je za oko 3 ppm veća (pomaknuta u niže magnetsko polje) od odgovarajućeg signala u početnoj strukturi nukleobaze (timin, uracil). No, takva razlika u kemijskim pomacima nije uočena uvođenjem benzoila na N3-položaju (Cruickshank i sur., 1984). U našem slučaju, reakcija između uracila/timina s FcCOCl rezultira produktom u kojem je C5 signal također pomaknut za oko 3 ppm u niže magnetsko polje u odnosu na odgovarajući signal kod reaktanata. Stoga je reakcija uvođenja ferocenoilne skupine, popraćena s pomakom C5 signala u niže magnetsko polje, što je karakteristično za supstituciju na N1-položaju.



Slika 12. Prijelazno stanje TS_{N1} i TS_{N3} za reakciju između N1- i N3- deprotoniranog uracila s ferocenoil kloridom ($FcCOCl$), dobivena kvantno - kemijskim izračunom pomoću B3LYP/6-31G(d) metode. Udaljenosti su izražene u angstromima.

U kvantno - kemijskom istraživanju mehanizma reakcije pirimidinskih baza s ferocenoil kloridom korištena je B3LYP metoda. Stacionarne točke locirane su na plohi potencijalne energije i određene kao minimumi ($N_{\text{Imag}} = 0$) ili maksimumi ($N_{\text{Imag}} = 1$). Locirano je samo jedno prijelazno stanje (TS_{N1} , Slika 12) za reakciju N1-deprotoniranog uracila i ferocenoil klorida (potvrđeno IRC tehnikom) koje ukazuje na usklađen S_N2 -tip mehanizma reakcije. Isti mehanizam vrijedi za reakciju N3-deprotoniranog uracila (6_{N3} , $R = H$) i ferocenoil klorida, za koju je također locirano samo jedno prijelazno stanje (TS_{N3} , Slika 12). Ni u jednom slučaju nije pronađen tetraedarski međuprodukt koji je inače karakterističan za mehanizam nukleofilne adicije, odnosno eliminacije.

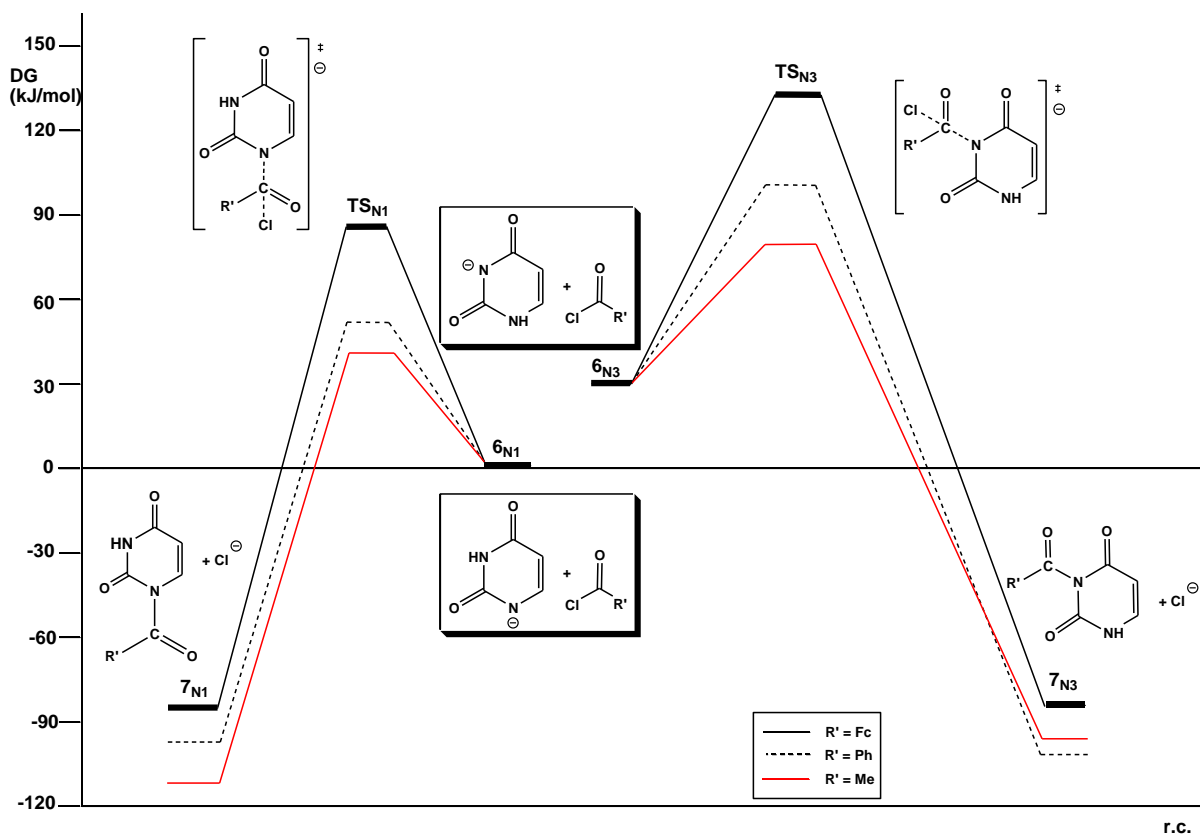
Procesi stvaranja N-C veze i kidanja C-Cl veze odvijaju se simultano, tj. u jednom reakcijskom koraku. To je u skladu s ranijim teorijskim i eksperimentalnim istraživanjima koja su potvrdila da se nukleofilna adicija na karbonilnu skupinu kiselinskih klorida odvija usklađenim S_N2 mehanizmom (bez tetraedarskog međuprodukta) (Ruff i Farkas, 2011; Bentley i sur., 1996; Cruickshank i sur., 1984).

Mehanizam reakcije **6** → **7** jednak je u reakcijama ostalih pirimidinskih baza, timina (**6**_{N1}, R = CH₃) i 5-fluorouracila (**6**_{N1}, R = F), što je potkrijepljeno računalnim rezultatima. Međutim, ukoliko se u strukturi acilirajućeg agensa nalazi slaba izlazna skupina, mehanizam se reakcije odvija u dva koraka. Prema izračunima dobiven je tetraedarski međuprodukt u reakcijama uracila s ferocenilnim esterom (FcCOOCH₃), odnosno s ferocen karboksilnom kiselinom (FcCOOH). Dobiveni podaci za te reakcije ukazuju na stupnjeviti mehanizam, koji uključuje tetraedarski međuprodukt, što je također u skladu s eksperimentalnim rezultatima za „klasičnu“ nukleofilnu supstituciju na karbonilnoj skupini.

Razmotrena je regioselektivnost reakcija pirimidinskih nukleobaza s ferocenoil kloridom. Literaturni podaci o regioselektivnom aciliranju uracila i timina vrlo su rijetki (Rad i sur., 2014; Lahsasni, 2013). Većina reakcija nezaštićenih uracilnih, odnosno timinskih derivata sa supstratima za aciliranje (acilkloridi, esteri, anhidridi) daje smjesu N1- i N3- produkata (Kametani i sur., 1980). Položaj supstitucije na dušikovom atomu ovisi o temperaturi reakcije, baznom katalizatoru i korištenom supstratu za aciliranje (Ardura i sur., 2005; Nováček i Hedrlín, 1967).

U ovom je slučaju spektroskopskim mjerenjima reakcije timina s ferocenoil kloridom dokazano formiranje samo jednog produkta. Kinetika same reakcije mjerena je tako da je ¹H NMR spektar alikvota reakcijske smjese (0,2 mL) snimljen (u DMSO-d₆) u određenim vremenskim intervalima. U području spektra 4-5 ppm uočeno je nestajanje signala reaktanta (protoni ferocenskog prstena) i nastajanje novih signala produkta. Prema detaljnoj analizi ¹H, ¹³C i 2D NOESY NMR spektara dobivenih produkata, može se zaključiti da je nastao samo N1- supstituirani produkt.

Isti zaključak proizlazi iz ¹⁹F NMR spektra reakcije 5-fluorouracila i ferocenoil klorida. Signal deprotoniranog 5-fluorouracila (-178.3 ppm) postepeno nestaje, dok nastaje novi signal spektra na -166 ppm. Dobiveni produkt, kao N1-izomer, potkrijepljen je 2D NMR spektrom (**7**_{N1}, R = F)



Slika 13. Energijski profil (B3LYP/6-31+G(d,p) + ΔG_{solV}) reakcije deprotoniranog uracila (N1- i N3-položaj) strukturnih analoga acilklorida ($R' = \text{CH}_3, \text{Ph}, \text{Fc}$)

Kvantno - kemijskim računima (B3LYP/6-31+G(d,p) razina), kod reakcija ferocenoil klorida s atomom dušika na N1-položaju, proizlazi da je Gibbsova aktivacijska energija reakcije na N3-položaju za 40 kJ/mol viša od barijere reakcije na N1-položaju. To znači da je reakcija na N1-položaju brža od paralelne reakcije na N3-položaju. Izračunata energija N1-ferocenoil supstituiranog uracila (7_{N1} , $R' = \text{Fc}$) slična je energiji N3-supstituiranog izomera (7_{N3} , $R' = \text{Fc}$). Prema tome, reakcija N1-aciliranja $6_{\text{N1}} \rightarrow 7_{\text{N1}}$ je kinetički, ali ne i termodinamički povoljnija. Računalnim metodama dobiveno je da su energijske barijere reakcija supstitucije acil klorida, benzoil klorida ($R' = \text{Ph}$) i acetil klorida ($R' = \text{CH}_3$), na N1-položaju pirimidinskih baza manje od odgovarajućih barijera reakcija na N3-položaju (Slika 13). To potvrđuje da je reakcija između ferocenoil klorida i deprotonirane pirimidinske baze kinetički kontrolirana.

Tablica 2. Eksperimentalni^a i izračunati NMR (GIAO-CPCM/UFF//B3LYP/6-311G(d,p)//B3LYP/6-31G(d)/Wachter-f metoda)^b kemijski pomaci za C5 signal (za atom željeza, gdje je to moguće) u pirimidinskim bazama i njihovim N1- i N3- aciliranim derivatima (Bz=benzoil, Fc=ferocenoil)

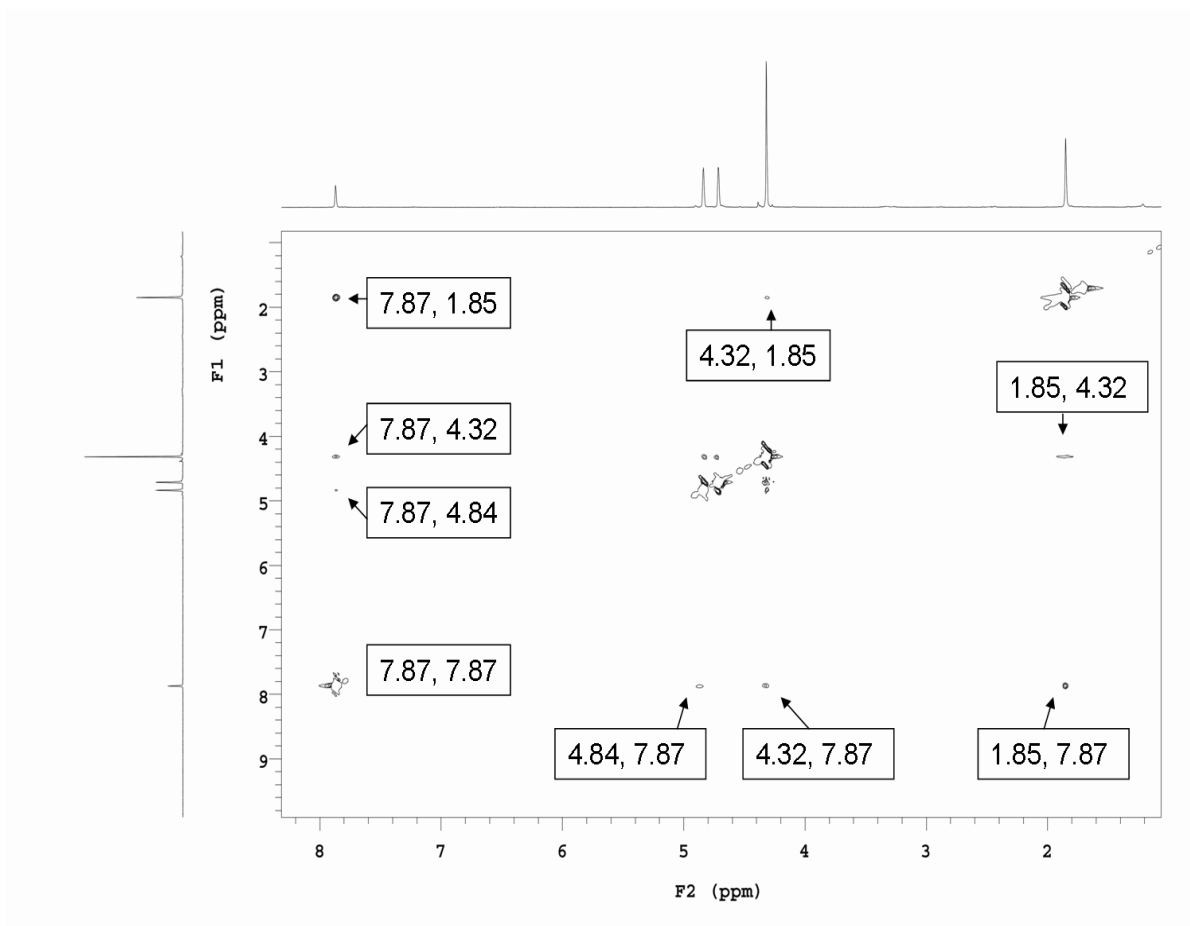
	C5	C5	Fe
	δ_{exp} (δ_{calc}) ^c	$\Delta\delta_{\text{exp}}$ ($\Delta\delta_{\text{calc}}$) ^d	δ_{calc}
Uracil	101.1 (101.8)	-	-
N1- <i>Bz</i> -uracil	103.7 (105.0)	+2.6 (+3.2)	-
N3- <i>Bz</i> -uracil	100.1 (102.2)	-1.0 (+0.4)	-
N1- <i>Fc</i> -uracil	102.9 (104.0)	+1.8 (+2.2)	1970.4
N3- <i>Fc</i> -uracil	n. a. (102.3)	n. a. (+0.5)	1984.8
Thymine	107.8 (111.6)	-	-
N1- <i>Bz</i> -thymine	111.5 (115.4)	+3.7 (+3.8)	-
N3- <i>Bz</i> -thymine	107.9 (112.2)	+0.1 (+0.6)	-
N1- <i>Fc</i> -thymine	111.6 (114.6)	+3.8 (+3.0)	1919.0
N3- <i>Fc</i> -thymine	n. a. (112.1)	n. a. (+0.5)	1935.8
5-Fluorouracil	139.9 (146.1)	-	-
N1- <i>Fc</i> -5-fluorouracil	140.1 (147.2)	+0.2 (+1.1)	1935.5
N3- <i>Fc</i> -5-fluorouracil	n. a. (145.9)	n. a. (-0.2)	1952.9

^a Eksperimentalni NMR spektri mjereni su u DMSO-*d*₆. ^b Geometrijska optimizacija struktura i kemijski pomaci izračunati su u otapalu DMSO-*d*₆. ^c ¹³C kemijski pomaci ugljikovih atoma (u ppm) u odnosu na tetrametilsilan (TMS; 0 ppm) i ⁵⁷Fe kemijski pomaci u odnosu na ferocen (1532 ppm) ^d Razlika kemijskih pomaka za C5 signale $\delta_{\text{C5}}(\text{acilirane baze}) - \delta_{\text{C5}}(\text{baze})$

Dobivene eksperimentalne podatke potkrijepili smo GIAO-NMR izračunima za N1- i N3-supstituirane strukture te pripadajuće pirimidinske baze (uracil i timin). Izračunata razlika kemijskih pomaka između C5 signala uracila ($\delta_{\text{calc}} = 101.8$ ppm) i N1-benzoil uracila ($\delta_{\text{calc}} = 105.8$ ppm) iznosi 3.2 ppm što se podudara s izmjerenim podacima. Nema značajnije razlike za C5 kemijske pomake usporedbom uracila i N3-benzoil supstituiranog uracila ($\delta_{\text{calc}} = 102.2$ ppm). Slično je uočeno i kod timina i njegovih N1-, odnosno N3-benzoil supstituiranih derivata (Tablica 2). Ovi podaci pokazuju da je razlikovanje N1- od N3-aciliranih produkata moguće provesti ^{13}C NMR spektroskopijom.

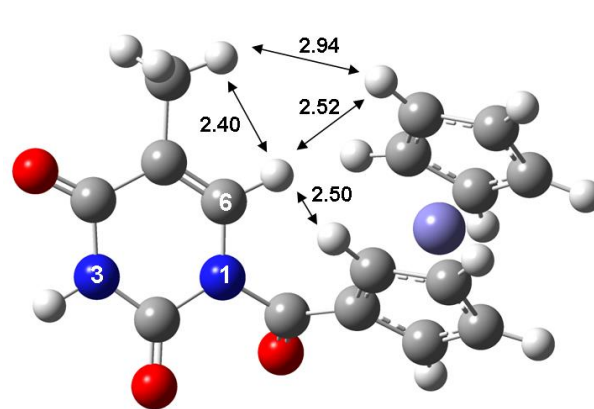
Eksperimentalnim mjerenjima i teorijskim izračunima pokazano je da nema značajnijih razlika za kemijske pomake C5 signala kod 5-FU i N1-ferocenoil supstituiranom 5-FU, što se također slaže s ranijim NMR istraživanjima (Abdrakhimova i sur., 2014). Međutim, NMR analizom reakcijske smjese utvrđeno je da regioselektivnost reakcije 5-FU i FcCOCl (Slika 10) slijedi isti obrazac kao što je opisano za uracil i timin.

Iako NMR spektar za ^{57}Fe jezgru ima veliki raspon kemijskih pomaka (nekoliko tisuća ppm!), a te vrijednosti mogu biti vrlo osjetljive na male promjene u geometriji (Lapić i sur., 2010; Šarić i sur., 2008; Wrackmeyer i sur., 2004; Bühl i sur., 2002), izračunata razlika od 18 ppm (Tablica 2) između ^{57}Fe NMR kemijskih pomaka u N1- i N3-ferocenoil nukleobaza je relativno vrlo mala. To upućuje da ^{57}Fe NMR spektroskopija nije dovoljno osjetljiva metoda za određivanje položaja supstitucije ferocena na pirimidinskim bazama.

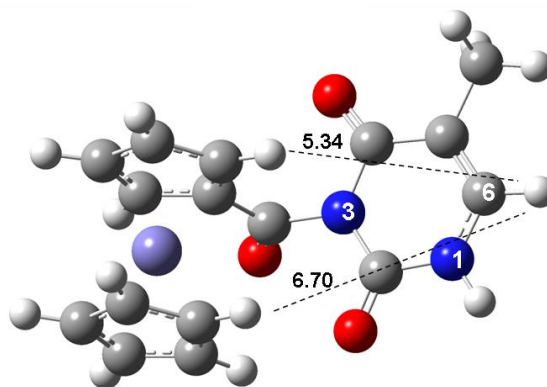


Slika 14. Prikaz NOESY korelacija između određenih vodikovih atoma N1-ferrocenil timina **7b**.

Tehnika NOESY (*engl.* Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) temelji se na prostornoj sprezi spinova. Tom se tehnikom dobivaju informacije o prostornoj udaljenosti jezgara što omogućuje određivanje konformacije i trodimenzijske strukture spojeva u otopini.



7b_{N1}



7b_{N3}

Slika 15. Najstabilniji N1- i N3-suptituirani produkti optimizirani B3LYP/6-31G(d) metodom za reakcije timina i ferocenoil klorida (FcCOCl). Strelice pokazuju ^1H - ^1H NOESY korelacije za određene vodikove jezgre u **7b_{N1}**, a brojevi prikazuju udaljenosti među atomima (Å). Iscrtkanim linijama naznačene su udaljenosti (Å) između vodikovih atoma na C6 i određenih ferocenskih protona u **7b_{N3}** (koji su od njega udaljeni više od 5 Å)

Korištena je ^1H - ^1H NOESY tehnika za lociranje C5 signala N1- aciliranih pirimidinskih nukleobaza (približno 3 ppm u odnosu na nesupstituirane nukleobaze). Kod N1-ferocenoil timina (**7b_{N1}**, Slika 15), NOESY eksperimentom (Slika 14) su dobiveni križni signali prostorno bliskih vodikovih atoma nukleobaze (C6 protona i metilne skupine) i vodikovih atoma na ferocenskoj jezgri (sve udaljenosti iznose približno 2.5 Å). Ne postoji križna relaksacija između odgovarajućih vodikovih atoma u N3-izomeru **7b_{N3}**, jer su sve udaljenosti između tih vodikovih atoma veće od 5 Å. Istim su postupkom dobiveni križni signali za uracil i 5-fluorouracil između C6-H i protona ferocena na odgovarajućem 2D NOESY spektru. Detaljna analiza ^1H i ^{13}C spektara te dvodimenzijских NOESY spektara potvrđuje da u reakciji

deprotoniranih nukleobaza (koristeći NaH kao deprotonirajući agens) i ferocenoil klorida u DMF-u nastaju isključivo N1-ferocenoilni produkti.

5. ZAKLJUČCI

Pripremljeni su N1-ferocenski derivati nukleobaza (uracila, timina i 5-fluorouracila). U sintetskoj proceduri u kojoj kao produkti nastaju isključivo N1-izomeri nije potrebno provesti kemijsku zaštitu na N3-položaju pirimidinskih baza. Korišteno je nekoliko reagenasa za deprotoniranje pirimidinskih baza (K_2CO_3 , TEA i NaH), no jedino je natrijev hidrid (NaH) prikladan za reakciju regioselektivnog aciliranja na N1-položaju.

Prikazani su 1D i 2D NMR spektri kojima se potvrđuje N1-aciliranje pirimidinskih baza. Mjerenja reakcijskih promjena provedena 1H i ^{19}F NMR spektroskopijom ukazuju na formiranje samo jednog produkta. Struktura produkta i položaj supstitucije potvrđeni su ^{13}C NMR spektroskopijom i dvodimenzijskim NOESY spektrima u kojima je nedvojbeno identificiran isključivo N1-regioizomer. Prema tome, eksperimentalna analiza NMR podataka povezana s GIAO-NMR izračunima dobra je metoda kod razlikovanja N1- od N3-aciliranih produkata.

Za interpretaciju i objašnjenje uočene regioselektivnosti reakcija, provedena je komparativna analiza kiselosti protona na N1- i N3- položaju nukleobaza, termokemijskih podataka o produktima reakcija (7_{N1} i 7_{N3}), te energijskih barijera za dvije paralelne reakcije ($6 \rightarrow 7_{N1}$ i $6 \rightarrow 7_{N3}$). Otkriveno je da jedino kinetički faktori upravljaju regioselektivnošću istraživanih reakcija. Prijelazna stanja za reakciju aciliranja na N1-položaju (TS_{N1}) zantno su stabilnija (>45 kJ/mol) od odgovarajućih prijelaznih stanja za formiranje N3-izomera (TS_{N3}). Prema izračunima na B3LYP/6-31+G(d,p)//B3LYP/6-31G(d) razini, za reakcije pirimidinskih nukleobaza i ferocenoil klorida vrijedi usklađeni S_N2 -mehanizam. Nukleofilni napad deprotonirane baze na karbonilnu skupinu ferocenoil klorida odvija se u jednom koraku što upućuje da u istraživanim reakcijama ne sudjeluje „klasičan“ tetraedarski međuprodukt.

6. LITERATURA

Abdrakhimova GS, Ovchinnikov MY, Lobov AN, Spirikhin LV, Ivanov SP, Khursan SL. 5-Fluorouracil solutions: NMR study of acid–base equilibrium in water and DMSO. *J Phys Org Chem*, 2014, 27, 876-883.

Ardura D, López R, Sordo TL. Relative Gibbs energies in solution through continuum models: Effect of the loss of translational degrees of freedom in bimolecular reactions on Gibbs energy barriers. *J Phys Chem B*, 2005, 109, 23618-23623.

Barone V, Cossi M, Tomasi J. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model. *J Chem Phys*, 1997, 107, 3210-3221.

Barone V, Cossi M. Quantum calculation of molecular energies and energy gradients in solution by a conductor solvent model. *J Phys Chem A*, 1998, 102, 1995-2001.

Becke AD. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J Chem Phys*, 1992, 96, 2155-60.

Bentley TW, Llewellyn G, McAlister JA. S_N2 mechanism for alcoholysis, aminolysis, and hydrolysis of acetyl chloride. *J Org Chem*, 1996, 61, 7927-7932.

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

Born M, Oppenheimer R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Annalen der Physik*. 1927, 84, 457–484.

Bühl M, Mauschick FT, Terstegen F, Wrackmeyer B. Remarkably large geometry dependence of ⁵⁷Fe NMR chemical shifts. *Angew Chem Int Ed*, 2002, 41, 2312-2315.

Burrows CJ, Rokita SE. Recognition of guanine structure in nucleic acids by Nickel complexes. *Acc. Chem. Res.* 1994, 27, 295-301.

Chen R, Liu CS, Zhang H, Guo Y, Bu XH, Yang M. Synthesis, characterization, antioxidant activity and DNA-binding studies of three rare earth (III) complexes with 1-(4-aminoantipyrine)-3-tosylurea ligand. *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101, 412-421.

Chen SC. The syntheses and mass spectra of some *N*-substituted ferrocenylmethyl adenines. *Journal of Organometallic Chemistry*. 1980, 202, 183-189.

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.

Cooke G, Rotello VM. Methods of modulating hydrogen bonded interactions in synthetic host-guest systems. *Chem Soc Rev*, 2002, 31, 275-286.

Cossi M, Scalmani G, Rega N, Barone V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. *J Chem Phys*, 2002, 117, 43-54.

Cruickshank KA, Jiricny J, Reese CB. Selective cleavage of bridged-ring cyclopropyl ketones. *Tetrahedron Letters*, 1984, 25, 681-684.

Cruickshank KA, Jiricny J, Reese CB. The benzylation of uracil and thymine. *Tetrahedron Letters*. 1984, 25, 681-684.

Dewar MJS, Thiel W. Ground-States of Molecules. 38. The MNDO Method: Approximations and Parameters. *J Am Chem Soc*, 1977, 99, 4899-907.

Ditchfield R, Hehre WJ, Pople JA. Self-Consistent Molecular Orbital Methods. 9. Extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J Chem Phys*, 1971, 54, 724.

Dunning TH Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *J Chem Phys*, 1989, 90, 1007-23.

Enoch SJ. The use of quantum mechanics derived descriptors in computational toxicology. U: Recent advances in QSAR studies. Heidelberg D, New York, Springer, 2008, str. 13-28.

Fan E, Vicent C, Geib SJ, Hamilton AD. Molecular recognition in the solid state: hydrogen-bonding control of molecular aggregation. *Chem Mater*, 1994, 6, 1113-1117.

Fischer CF. The Hartree-Fock method for atoms: a numerical approach. Wiley, 1977, str. 46.

Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*. 2011, 3, 1351-1371.

Fluorouracil, Pliva. www.almp.hr, pristupljeno 24.4.2017.

Fox JM, Dmitrenko O, Liao L, Bach RD. Computational studies of nucleophilic substitution at carbonyl carbon: the SN2 mechanism versus the tetrahedral intermediate in organic synthesis. *J Org Chem*, 2004, 69, 7317-7328.

Gaussian 09, Revision D.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2013.
Gaussian, Inc., Carnegie Office Park, Pittsburgh, PA.

Gonzales C, Schlegel HB. Reaction path following in mass-weighted internal coordinates. *J Phys Chem*, 1990, 94, 5523-5527.

Ho J, Coote M. First Principles Prediction of Acidities in the Gas and Solution Phase. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2011, 1, 649-660.

Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*, 1964, B 136, B864-+.

Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*, 1964, 136, B864- B71.

Inouye M, Takase M. Specific binding and separation of dinucleotides by ferrocene-modified artificial receptors. *Angew Chem Int Ed.* 2001, 40, 1746-1748.

Kametani T, Kigasawa K, Hiiragi M, Wakisaka K, Haga S, Nagamatsu Y, Sugi H, Fukawa K, Irino O. Synthesis and antitumor activity of N-acyl- and N-(alkoxycarbonyl)-5-fluorouracil derivatives. *J Med Chem*, 1980, 23, 1324-1329.

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

Kirin SI, Kraatz HB, Metzler-Nolte N. Systematizing structural motifs and nomenclature in 1,n'-disubstituted ferrocene peptides. *Chem Soc Rev*, 2006, 35, 348–354.

Koch, W.; Holthausen, MC. *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*; Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, str. 96.

Kurinovich MA, Lee JK. The acidity of uracil from the gas phase to solution: The coalescence of the N1 and N3 sites and implications for biological glycosylation. *J Am Chem Soc*, 2000, 122, 6258–6262.

Lahsasni SA. Microwave-and ultrasound-assisted synthesis of some acyclonucleobases based on a uracil moiety using Dmap as base. *Nucleos Nucleot Nuc,l* 2013, 32, 439–452.

Lapić J, Cetina M, Šakić D, Djaković S, Vrček V, Rapić V. Experimental and DFT study of 2-ferrocenylpropan-2-ol cyclodimerization products. *Arkivoc*, 2010, ix, 257-268.

Lapić J, Havaić V, Šakić D, Sanković K, Djaković S, Vrček V. Ferrocenoyl-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.

Li C, Medina JC, Maguire GEM, Abel E, Gokel GW. Neutral molecule receptor systems using ferrocene's "Atomic ball bearing" character as the flexible element. *J Am Chem Soc*, 1997, 119, 1609-1618.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*. 2003, 3, 330-338.

Lundqvist S, March NH. Theory of inhomogeneous electron gas. New York, Plenum Press, 1983, str. 50.

Miertus S, Scrocco E, Tomasi J. Electrostatic interaction of a solute with a continuum. A direct utilizaion of AB initio molecular potentials for the prevision of solvent effects. *Chem Phys*, 1981, 55, 117-129.

Møller C, Plesset MS. Note on an approximation treatment for many-electron systems. *Phys Rev*, 1934, 46, 618-22.

Mwande-Maguene G, Jakhal J, Lekana-Douki JB, Mouray E, Bousquet T, Pellegrini S, Grellier P, Ndouo FST, Lebibi J, Pelinski L. One-pot microwave-assisted synthesis

and antimalarial activity of ferrocenyl benzodiazepines. *New J Chem*, 2011, 35, 2412–2415.

Nováček A, Hedrlín I. Nucleic acids components and their analogues. XC. Acylation of 5-methoxyuracil and 5-methoxy-2-thiouracil. *Collect Czech Chem Commun*, 1967, 32, 1045-1050.

Patra M, Gasser G, Wenzel M, Merz K, Bandow JE, Metzler-Nolte N. Synthesis and biological evaluation of ferrocene-containing bioorganometallics inspired by the antibiotic platensimycin lead structure. *Organometallics*, 2010, 29, 4312–4319.

Patwa AN, Gupta S, Gonnade RG, Kumar VA, Bhadbhade MM, Ganesh KN. Ferrocene-linked thymine/uracil conjugates: Base pairing directed self-assembly and supramolecular packing. *J Org Chem*, 2008, 73, 1508-1515.

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

Pople JA, Binkley JS, Seeger R. Theoretical Models Incorporating Electron Correlation. *Int J Quantum Chem*, 1976, Y-10, 1-19.

Pople JA, Gill PMW, Johnson BG. Kohn-Sham density-functional theory within a finite basis set. *Chem Phys Lett*, 1992, 199, 557-560.

Pople JA, Nesbet RK. Self-Consistent Orbitals for Radicals. *J Chem Phys*, 1954, 22, 571-72.

Pople JA, Seeger R, Krishnan R. Variational Configuration Interaction Methods and Comparison with Perturbation Theory. *Int J Quantum Chem*, 1977, Y-11, 149-63.

Pople JA. Nobel Lecture: Quantum chemical models. *Rev. Mod. Phys.* 1999, 71, 1267-1274.

Pregosin PS (Ed.), *Transition Metal Nuclear Magnetic Resonance*, New York, Elsevier, 1991, str. 186.

Rad MNS, Behrouz S, Asrari Z, Khalafi-Nezhad A. A simple and regioselective one-pot procedure for the direct N-acylation of some purine and pyrimidine nucleobases via carboxylic acids using cyanuric chloride. *Monatsh Chem*, 2014, 145, 1933–1940.

Reichardt C, Welton T. *Solvents and solvent effects in organic chemistry*. Weinheim, Wiley, 2011, str. 34.

Roothaan CCJ. New Developments in Molecular Orbital Theory. *Rev Mod Phys*, 1951, 23, 69.

Ruff F, Farkas O. Concerted S_N2 mechanism for the hydrolysis of acid chlorides: comparisons of reactivities calculated by the density functional theory with experimental data. *J Phys Org Chem*, 2011, 24, 480–491.

Schrödinger E. An Undulatory Theory of the Mechanics of Atoms and Molecules. *Phys Rev*, 1926, 28, 1049-1070.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003, 22, 7265-7279.

Simenel AA, Morozova EA, Snegur LV, Zykova SI, Kachala VV, Ostrovskaya LA, Bluchterova NV, Fomina MM. Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl Organometal Chem*, 2009, 23, 219–224.

Song H, Li X, Long Y, Schatte G, Kraatz HB. Ferrocene-modified pyrimidine nucleosides: synthesis, structure and electrochemistry. *Dalton Trans*, 2006, 39, 4696–4701.

Stewart JJP. Optimization of parameters for semiempirical methods. I. Method. *J Comp Chem*, 1989, 10, 209-20.

Szabo A, Ostlund NS. Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory. New York, Dover Publications, 1995, str. 23.

Šarić A, Vrček V, Bühl M. Density functional study of protonated formylmetallocenes. *Organometallics*, 2008, 27, 394–401.

Tsai CS. An introduction to computational biochemistry. New York, Wiley, 2002, str. 55.

Van Staveren DR, Metzler-Nolte N. Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem Rev*, 2004, 104, 5931-5986.

Varghese V, Magnani L, Harada N, Eric LW, Kenny L. Inhibition of FOXM1 by thiostrepton increases sensitivity to 5-fluorouracil (5-FU) by downregulating thymidylate synthase (TS) in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2015, 21 (4 Suppl): Abstract nr A54.

Verdolino V, Cammi R, Munk BH, Schlegel HB. Calculation of pK_a values of nucleobases and the guanine oxidation products guanidinohydantoin and

spiroiminodihydantoin using density functional theory and a polarizable continuum model. *J Phys Chem B* 2008, 112, 16860–16873.

Wachters AJH. Gaussian basis set for molecular wavefunctions containing third-row atoms. *J Chem Phys*, 1970, 52, 1033.

Westwood J, Coles SJ, Collinson SR, Gasser G, Green SJ, Hursthouse MB, Light ME, Tucker JHR. Binding and electrochemical recognition of barbiturate and urea derivatives by a regioisomeric series of hydrogen-bonding ferrocene receptors. *Organometallics*, 2004, 23, 946-951.

Wrackmeyer B, Tok OL, Ayazi A, Maisel HE, Herberhold M. ^{57}Fe NMR spectroscopy of ferrocenes bearing pi-acceptor substituents. *Magn Reson Chem*, 2004, 42, 827-830.

Zhachkina A, Lee JK. Uracil and thymine reactivity in the gas phase: The $\text{S}_{\text{N}}2$ reaction and implications for electron delocalization in leaving groups. *J Am Chem Soc*, 2009, 131, 18376–18385.

7. SAŽETAK

Valentina Havaić: Eksperimentalno i kvantno - kemijsko istraživanje regioselektivnog aciliranja ferocenoilnih derivata nukleobaza

Ferocenoilna skupina je selektivno uvedena na N1-položaj pirimidinskog prstena uracila, timina i 5-fluorouracila. Deprotonirane pirimidinske nukleobaze reagiraju s ferocenoil kloridom (FcCOCl) ili ferocenoil etil karbonatom (FcCOOCOEt) u prisutnosti natrij hidrida (NaH) u dimetilformamidu (DMF). Regioselektivnost reakcija analizirana je NMR spektroskopijom i kvantno - kemijskim računima. ^1H i ^{19}F NMR spektri reakcijskih smjesa te ^{13}C NMR i 2D NOESY spektri produkata potvrđuju stvaranje isključivo N1-izomera. Izračunata energijska barijera za aciliranje N3-položaja značajno je viša (> 40 kJ/mol) od odgovarajuće barijere za N1-aciliranje, što upućuje na kinetičku kontrolu reakcije supstitucije na N1-položaju. Nukleofilna supstitucija na karbonilnoj skupini ferocenoil klorida odvija se prema usklađenom $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu bez tetraedarskog međuprodukta.

8. SUMMARY

Valentina Havaić: Experimental and quantum - chemical study of regioselective acylation ferrocenoyl-substituted nucleobases

Uracil, thymine, and 5-fluorouracil (5-FU) have been ferrocenoylated selectively at N1-position. Deprotonated pyrimidine nucleobases, prepared by sodium hydride (NaH) in dimethylformamide (DMF), reacted with ferrocenoylchloride (FcCOCl), or ferrocenoyl ethyl carbonate (FcCOOCOEt), in DMF to obtain a single product. Regioselectivity of these reactions have been analyzed in details by NMR spectroscopy and quantum - chemical calculations. ^1H and ^{19}F NMR spectra of reaction mixtures, and ^{13}C NMR and 2D NOESY spectra of products, confirm the formation of the N1-isomer only. The calculated energy barrier for acetylation at N3-position is significantly higher (> 40 kJ/mol), which suggests that the analogous reaction at N1-position is kinetically controlled. The nucleophilic addition of pyrimidine base to the carbonyl group of FcCOCl proceeds by a concerted $\text{S}_{\text{N}}2$ -like mechanism with the absence of the generally assumed tetrahedral intermediate.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Eksperimentalno i kvantno - kemijsko istraživanje regioselektivnog aciliranja ferocenoilnih derivata nukleobaza

Valentina Havaić

SAŽETAK

Ferocenoilna skupina je selektivno uvedena na N1-položaj pirimidinskog prstena uracila, timina i 5-fluorouracila. Deprotonirane pirimidinske nukleobaze reagiraju s ferocenoil kloridom (FcCOCl) ili ferocenoil etil karbonatom (FcCOOEt) u prisutnosti natrij hidrida (NaH) u dimetilformamidu (DMF). Regioselektivnost reakcija analizirana je NMR spektroskopijom i kvantno - kemijskim računima. ^1H i ^{19}F NMR spektri reakcijskih smjesa te ^{13}C NMR i 2D NOESY spektri produkata potvrđuju stvaranje isključivo N1-izomera. Izračunata energijska barijera za aciliranje N3-položaja značajno je viša (> 40 kJ/mol) od odgovarajuće barijere za N1-aciliranje, što upućuje na kinetičku kontrolu reakcije supstitucije na N1-položaju. Nukleofilna supstitucija na karbonilnoj skupini ferocenoil klorida odvija se prema usklađenom $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu bez tetraedarskog međuprodukta.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 15 grafičkih prikaza, 2 tablica i 76 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ferocen, nukleobaze, DFT, NMR, reakcijski mehanizam

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, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Senka Djaković, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2017.

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

Experimental and quantum - chemical study of regioselective acylation ferrocenoyl-substituted nucleobases

Valentina Havaić

SUMMARY

Uracil, thymine, and 5-fluorouracil (5-FU) have been ferrocenoylated selectively at N1-position. Deprotonated pyrimidine nucleobases, prepared by sodium hydride (NaH) in dimethylformamide (DMF), reacted with ferrocenoylchloride (FcCOCl), or ferrocenoyl ethyl carbonate (FcCOOCOEt), in DMF to obtain a single product. Regioselectivity of these reactions have been analyzed in details by NMR spectroscopy and quantum - chemical calculations. ^1H and ^{19}F NMR spectra of reaction mixtures, and ^{13}C NMR and 2D NOESY spectra of products, confirm the formation of the N1-isomer only. The calculated energy barrier for acetylation at N3-position is significantly higher (> 40 kJ/mol), which suggests that the analogous reaction at N1-position is kinetically controlled. The nucleophilic addition of pyrimidine base to the carbonyl group of FcCOCl proceeds by a concerted $\text{S}_{\text{N}}2$ -like mechanism with the absence of the generally assumed tetrahedral intermediate.

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

Thesis includes: 46 pages, 15 figures, 2 tables and 76 references. Original is in Croatian language.

Keywords: ferrocene, nucleobase, DFT, NMR, reaction mechanism

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
Senka Djaković, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology

The thesis was accepted: July 2017.