Sinteza hibrida purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolnom premosnicom

Prpić, Helena

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:171898

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Helena Prpić

Sinteza purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolnom premosnicom

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Silvana Raić-Malić, prof. dr. sc.

Članovi ispitnog povjerenstva:

Silvana Raić-Malić, prof. dr. sc.

Andrijana Meščić, dr. sc.

Šime Ukić, doc.dr.sc.

Zagreb, srpanj 2017.

ZAHVALE

Zahvaljujem se mentorici i profesorici Silvani Raić-Malić na predloženoj temi, stručnom vođenju, te korisnim savjetima i pomoći.

Zahvaljujem se i mag. appl. chem. Andrei Bistrović na pomoći i savjetima, te strpljenju i puno dobre volje, od eksperimentalnog rada u laboratoriju do pisanja ovog rada.

Zahvaljujem se i svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju na pomoći i odličnoj atmosferi u laboratoriju.

Na kraju bih se zahvalila obitelji i prijateljima koji su mi podrška tijekom cijelog školovanja.

SAŽETAK RADA

Sinteza purina, pseudopurina i L-askrobinske kiseline s 1,2,3-triazolnom premosnicom

Cilj ovog rada bila je sinteza novih potencijalno biološki aktivnih hibrida purinskih izostera i L-askorbinske kiseline (**15** – **19**) povezanih preko 1,2,3-triazolne poveznice. U tu svrhu priređeni su *N*-propargilni purinski i pseudopurinski derivati (**6** – **10)**, te 6-azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (**14**) višestupnjevitom sintezom.

1,4-disupstituirana 1,2,3-triazolna premosnice pripravljena je Cu(I) kataliziranom regioselektivnom 1,3-dipolarnom cikloadicijom 6-azido derivata L-askorbinske kiseline (**14**) i odgovarajućih terminalnih alkina purinskih izostera (**6 – 10**). Ciljani hibridi (**15** – **19**) pripravljeni su „click“ reakcijom potpomognutom ultrazvučnim (metoda A) i mikrovalnim (metoda B) zračenjem koristeći $CuSO_4$ i Cu(0), kao izvor Cu(I) iona, te klasičnom sintezom primjenom $Cu(OAc)_2$ u metanolu na sobnoj temperaturi (metoda C).

Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su ^{1}H NMR, ^{13}C NMR i MS spektroskopijom.

Ključne riječi: molekulski hibridi, L-askorbinska kiselina, purinski izosteri, Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija, ultrazvučno i mikrovalno potpomognute reakcije

SUMMARY

Synthesis of purine, pseudopurine and L-ascorbic acid with 1,2,3-triazole linker

The aim of this work was the synthesis of novel biologically active of purines, pseudopurines and L-ascorbic acid hybrids (**15** – **19**) connected through 1,2,3-triazole linker. For this purpose, *N*-propargylated purine and pseudopurine derivatives (**6** – **10)** and 6-azido-2,3-*O*,*O*-dibenzyl-L-ascorbic acid (**14**) were prepared in a multistep syntheses.

The 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole spacer was synthesized using Cu(I)-catalyzed regioselective 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 6-azido-L-ascorbic acid derivative (**14**) with the corresponding purine isostere terminal alkynes (**6 – 10**). The target hybrids (**15** – **19**) were prepared by ultrasound (method A) and microwave (method B) assisted "click" reactions using $CuSO_4$ and Cu(0), as catalysts, as well as using classical synthetic protocol with $Cu(OAc)_2$ in methanol (method C).

The structures of all synthesized compounds were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and MS spectroscopy.

Keywords: molecular hybrids, L-ascorbic acid, purine isosteres, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition, ultrasound and microwave assisted reactions.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Purini i pseudopurini 4
2.1.1. Purini 4
2.1.2. Deazapurini 6
2.2 L-askorbinska kiselina 9
2.3 Triazoli 12
2.3.1 1,2,3- Triazol 13
2.4 'Click' kemija 16
2.4.1 Huigenova cikloadicija 17
2.5 Molekulska hibridizacija 20
2.6 Zelena kemija 22
2.6.1 Mikrovalovima potpomognute reakcije 22
2.6.2 Ultrazvukom potpomognute reakcije 23
3. ESKPERIMENTALNI DIO 26
3.1. Opće napomene 27
3.2. Pregled sintetiziranih spojeva 28
3.3. Priprava spojeva 29
4. REZULTATI I RASPRAVA 34
4.1. Sinteza spojeva 35
4.2. Spektroskopska karakterizacija novoprpipravljenih spojeva ^{1}H NMR, ^{13}C NMR i MS spektroskopijom 39
5. ZAKLJUČAK 41
6. LITERATURA 43
7. PRILOZI 49

1. UVOD

Nukleozidni analozi pronašli su primjenu kao antivirusni, antitumorski i antibakterijski lijekovi. S obzirom na ograničenja u primjeni postojećih lijekova, zbog njihove citotoksičnosti i nedovoljne selektivnosti, stalna je potreba za pronalaskom boljih, selektivnijih i djelotvornijih sredstava. Povezivanjem dva ili više farmakofora, različitih bioloških aktivnosti, nastaje molekulski hibrid.[1] Novonastali hibridi zadržavaju funkcionalnost farmakofora, te se primjenjuju u raznim terapijama, posebno u liječenju tumora i neuroloških bolesti, ali i u liječenju tuberkuloze, AIDS-a, malarije i dr.[2]

Purini i purinski izosteri primjeri su prirodnih farmakofora, širokog spektra biološke aktivnosti. Strukturne su jedinice biološki važnih molekula, poput DNK i RNK, temeljnih struktura u prenošenju genetičke informacije.[3] Postoji veliki broj lijekova koji sadrže purinsku bazu u svojoj strukturi, kao što su 6-merkaptopurin, koji se koristi u liječenju tumora, te aciklovir, karbovir i ganciklovir, lijekovi za liječenje virusne infekcije Herpsea i AIDS-a. Širok spektar biološke aktivnosti purina, potaknule su mnoge znanstvenike na proučavanje bioloških i kemijski sličnih heterocikličkih sustava, poput 7-deazapurina, koji također imaju izraženo biološko djelovanje i važnu ulogu u liječenju tumora i virusa.[4]

L-Askorbinska kiselina, također je zanimljiv prirodni, heterociklički spoj s izraženim biološkim djelovanjem. Askorbinska kiselina važna je biomolekula, koja sudjeluje u sintezi karnitina iz lizina, sintezi neurotransmitera, te kao antioksidanas.[5] L-Askorbinska kiselina, poznata kao vitamin C, pokazala je antitumorsko djelovanje.[6] Njeni derivati su također pokazali biološku aktivnost, tako 5,6-*O*-modificirani derivati askorbinske kiseline pokazuju antitumorsko djelovanje, dok C2-*O*- i C3-*O*- alkilirani derivati sprječavaju peroksidaciju lipida biomembrana.[7]

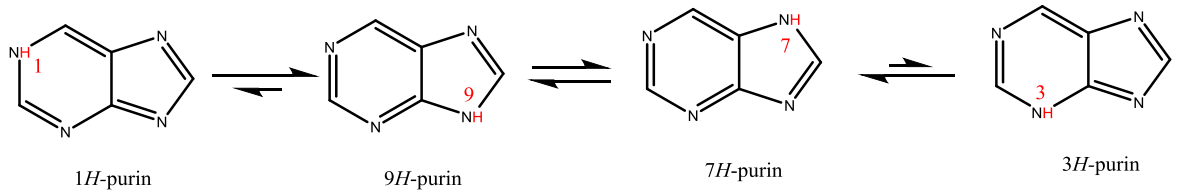
U zadnjih nekoliko godina intenzivno se proučavaju 1,2,3-triazolni derivati nukleozida i njihovih analoga, među kojima je i askorbinska kiselina. Razlog tomu su obećavajuća svojstva 1,2,3-triazola, koji pokazuje antivirusno, antibakterijsko i citostatsko djelovanje, a u strukturama sudjeluje kao bioizosteri ili premosnica. Sintetski se 1,2,3-triazol može dobiti bakar kataliziranom azid-alkin cikloadicijom (CuAAC), koja spada u područje '*Click*' kemije.[8] CuAAC pokazala se pogodna reakcija za sintezu 1,2,3-triazola, jer omogućava visoko iskorištenje, upotrebu ne toksičnih otapala, dok se vrijeme reakcije, osim bakrom kao katalizatorom, dodatno skraćuje djelovanjem mikrovalnog ili ultrazvučnog zračenja.[9] Tako se u ovom radu provodi sinteza purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline sa 1,2,3-triazolnom premosnicom u svrhu ispitivanja antivirusnog i antitumorskog djelovanje.

2. OPĆI DIO

2.1. Purini i pseudopurini

2.1.1. Purini

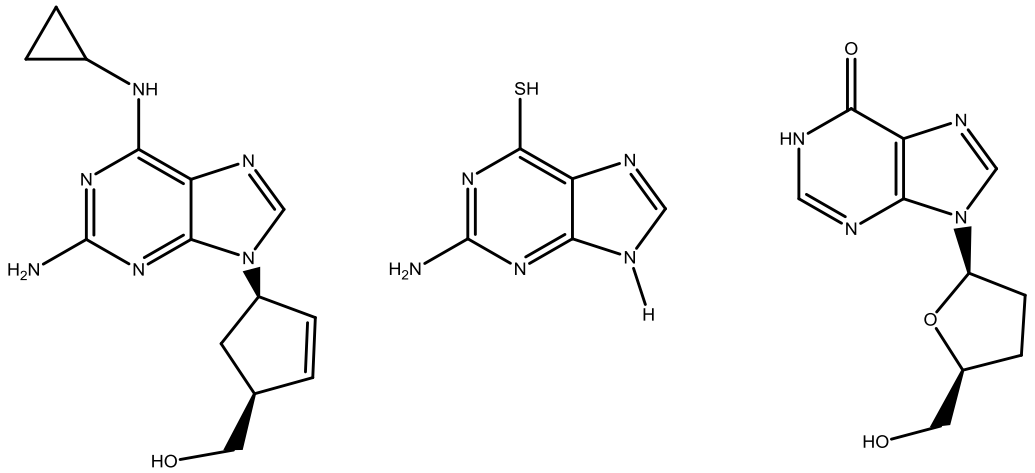
Purin ili imidazo[4,5-*d*]pirimidin jedan je od najraširenijih dušikovih heterocikla u prirodi.[10] Sastoji se, kako i sam naziv kaže od međusobno povezanog imidazolnog i pirimidinskog prstena (Slika 1). Nobelovac *Emil Fischer* prvi je sintetizirao bezbojne kristale purina 1899. godine, a nakon toga dao mu je i naziv 'purin' (*purum uricum*).[11] Purini podliježu reakcijama sa elektrofilima i nukleofilima, na ugljikovom atomu (C-8) peteročlanog prstena, te pretežno nukleofilnim reakcijama na ugljiku (C-2 i/ili C-6) šesteročlanog prstena.[12]



Slika 1. Strukturni prikaz tautomera purina[12]

Nesupstituirani purin nije pronađen u prirodi, dok su njegovi derivati, posebno adeninski derivati uključeni u niz metaboličkih procesa. Adenozin 5'-trifosfat (ATP) glavni je izvor energije u živim stanicama. Adenozin 3',5'-ciklofosfat (ciklički-AMP; cAMP) sudjeluje u kontroli aktivacije kinaznih proteina, koncentracije K^+ iona, te sudjeluje u transkripciji. Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD; NAD^+) i flavin adenin dinukleotid (FAD) su koenzimi uključeni u stanične oksido-redukcijske procese. Važno je spomenuti i acetil-koenzim koji posjeduje visoki potencijal prijenosa C_2- skupine. Purinske i pirimidineske baze sastavni su dio deoksiribonukleinske kiseline (DNK) i ribonukleinskeke kiseline (RNK).[10]

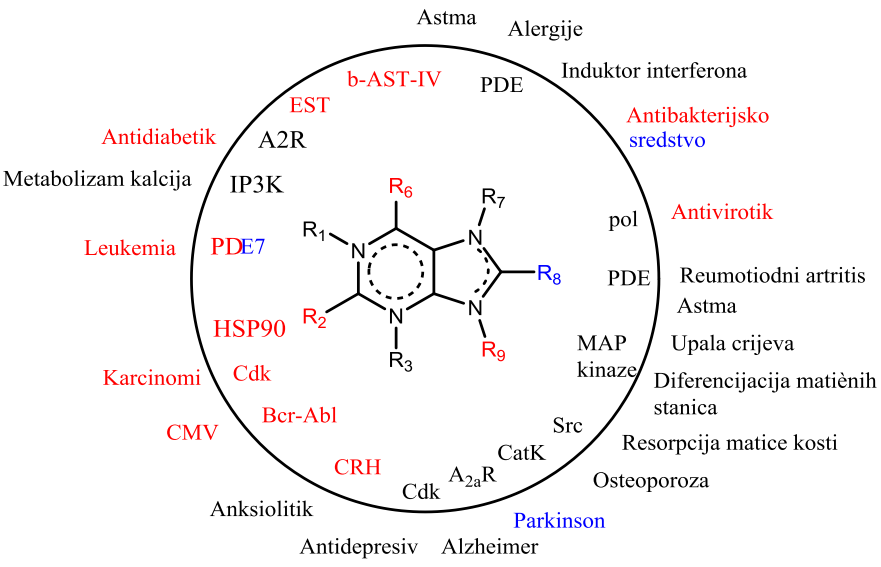
Osim što su važne komponente metaboličkih procesa, mnogi analozi purina pokazuju biološku aktivnost, te se primjenjuju u farmaceutskoj industriji kao lijekovi, protiv leukemije (tiopurin, pentostatin), antivirusni lijekovi (aciklovir, peniciklovir, genciklovir, abacavir), imunosupresivna sredstva (tioazapurin), antitrombozni lijekovi (kengreal) i antitumorska sredstva (fludrabin, kladribin, klofrabin, tenofovir) (Slika 2). Purini su važni farmakofori koji sudjeluju u sintezi i funkcioniranju DNK i enzima, te su jedni od najvažnijih heterocikla koji se koriste za razvoj inhibitora protein-kinaze.[13]



a) Abakavir (ABC) b) 6-Tiogvanin c) ddl

Slika 2. Strukturni prikaz nekih od derivata purina koji se koriste u liječenju virusnih infekcija poput herpesa (a), AIDS-a (c) i karcinoma (b).[14]

Polifukcionalni purini, supstituirani na mjestima 2-, 6- i 8- pripravljaju se iz odgovarajućih aktiviranih purinskih intermedijara reakcijama nukleofilne supstitucije na ugljikovom i heteroatomu, reakcijama povezivanja uz pomoć prijelaznih metala kao katalizatora, *N*-alkiliranjem/aciliranjem te Vorbrüggen-ovim reakcijama.[14]

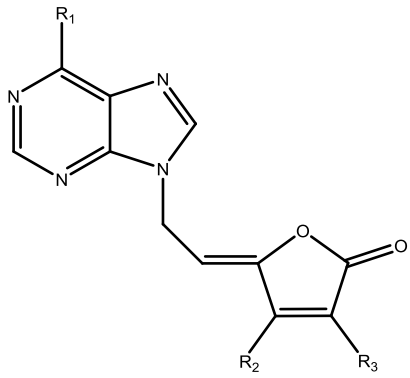


Slika 3. Shematski prikaz potencijalnog djelovanja purinskih derivata kao lijekova, unutar kruga prikazane su mete djelovanja, a izvan kruga bolesti na koje se odnosi meta.[14]

Sintetski derivati purina interferiraju s enzimima, pri čemu djeluju kao antivirusna sredstva, induktori interferona, antibakterijska sredstva, inhibitori leukotrien A4 hidrolaze, Hsp90, cisteinske proteaze katepsina K, fosfodiestera, te u inhibiciji nukleozidnog transporta

te različitih kinaza poput Src tirozin kinaze, P38 MAP kinaze, Inozitol-1,4,5-trifosfat-3-kinaze (Slika 3).[14]

Nukleozidni analozi također su pokazali snažno antivirusno i antitumorsko djelovanje. Nukleozidi su građeni od dušične baze (purinske ili pirimidnske) i šećera, međusobno povezani *N*-glikozidnom vezom. Nukleozidni analozi nastaju pri strukturnim promjenama na dušičnoj bazi ili šećernoj komponenti. Istraživanja su pokazala da 6-klorpurinski derivati purina (čija potencijalna djelovanja su dio i ovog rada) i L-askorbisnke kiseline, koja imitira šećer, pokazuju snažnu inhibitornu aktivnost prema zloćudnim tumorskim stanicama: leukemije limfoblasta (CEM), mišje leukemije (L1210),[15] karcinoma vrata grlića maternice (HeLa) i karcinoma gušterače (Mia-PaCa-2) (Slika 4.).[16] Osim antikancerogenog, pokazali su i antivirusna svojstva na herpes simpleks tipa 1 i tipa 2 (HSV-1, HSV-2) te varicella zoster virus (VZC).[15]

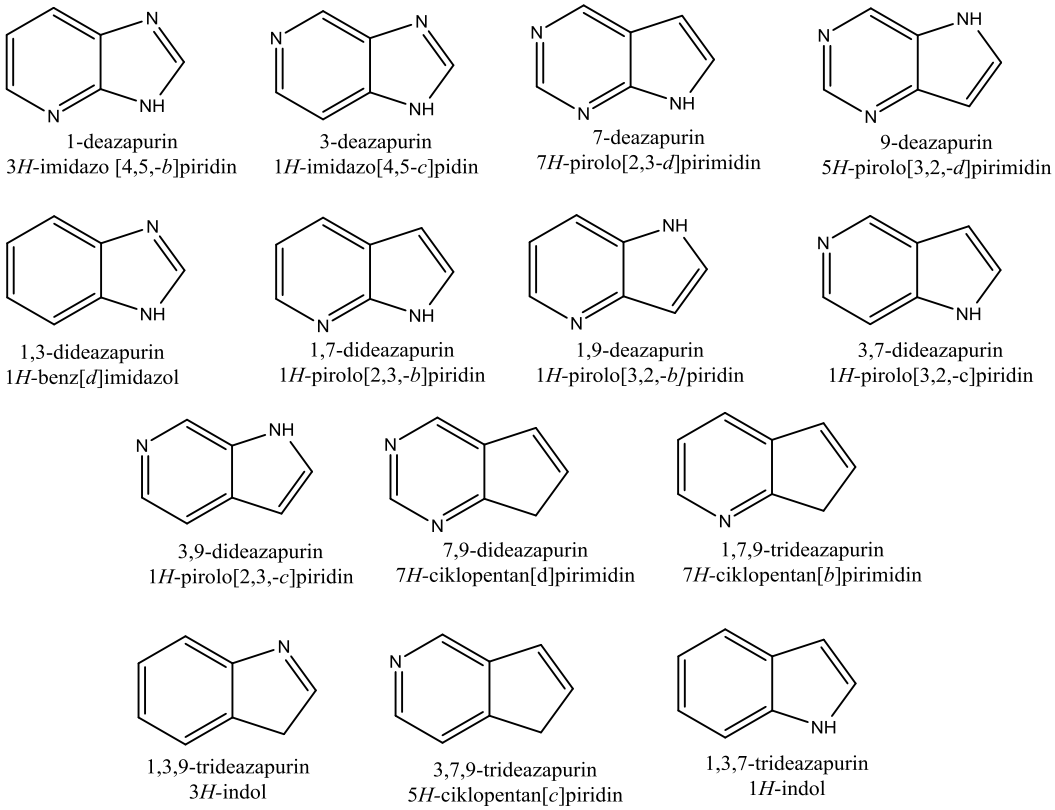


	1	2
R_1	Cl	Cl
R_2	OBn	OMe
R_3	OH	OMe

Slika 4. Strukturni prikaz nukleozidnog analoga

2.1.2. Deazapurini

Obzirom na izrazito široko djelovanje purina, struktura purina postala je inspiracija za sintezu novih heterocikličkih spojeva, čija se kemijska i biološka svojstva i danas istražuju. Ti spojevi nazivaju se deazapurini (pseudopurini) odnosno deazapurinski bioizosteri.[14] Bioizisteri, općenito, su spojevi kod kojih je izmijenjen osnovni skelet molekule i/ili supstituent na molekuli, pri čemu, novonastali spojevi zadržavaju biološku aktivnost početnog spoja. Bioizosteri imaju široku primjenu, posebno u medicinskoj kemiji.[17] Deazapurini su purinski izosteri kod kojih je dušikov atom zamijenjen ugljikovim (Slika 5), te pokazuju antivirusno, antitumorsko i antituberkulostatsko djelovanje.[18,19]

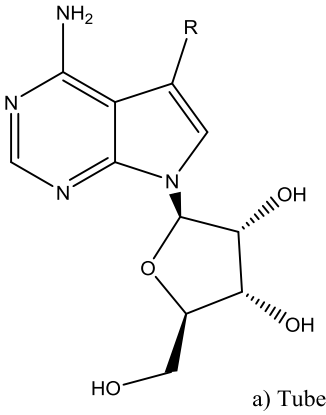


Slika 5. Prikaz deazapurinskih izostera

Kako su u ovom radu priređeni 7-deazapurinski derivati (7*H*-pirolo [2,3,-*d*]pirimidini) istaknut ćemo neke važne strukture i svojstva tih bioizostera.

2.1.2.1. 7-deazapurini (7H-pirolo [2,3,-d]pirimidini)

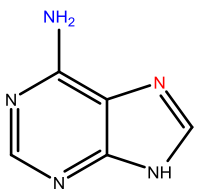
Pirolopirimidini, u koje spadaju 7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin i 5*H*-pirolo[3,2,-d]pirimidin pirolopirimidini, posjeduju antibakterijska, antivirusna, antikancerogena, anti-inflamatorna te anti-hiperglikemična djelovanja. Kod ovih deazapurinkih izostera je sedmi odnosno deveti heteroatom dušika pirolopirimidinskog prstena zamijenjen ugljikom. Poznati su 7-deazapurinski analozi koji se koriste kao antibiotici poput tubercidina, toyocamycina i sagicamycina (Slika 6) izolirani iz različitih bakterija vrste *Streptomyces.* Sagicamycin (Slika 6c) selektivno i reverzibilno inhibira sintezu stanične RNK, te sintezu virusne DNK, dok za tubercidin nije poznata specifična meta citostatskog djelovanja (Slika 6a).[20]



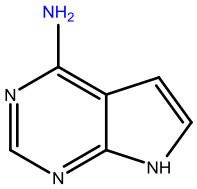
a) Tubercidin (R=H)
b) Toyocamycin (R=CN)
c) Sagicamycin (R (1-5)= $CONH_2$, F, Cl, Br, I)

Slika 6. Stukturni prikaz Tubercidina (a), Toyocamycina (b) i Sagycamycina c).[20]

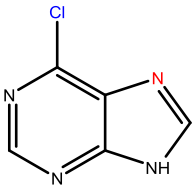
Halogenirani purinski izosteri pokazali su dobru biološku aktivnost, poput 6-klorpurinskih analoga prikazanih na slici 4, koji djeluju na tumorske stanice mišje leukemije (L1210/0), karcinoma dojke miša (FM3A) i leukemije limfoblasta (Molt4/C8 i CEM/0).[21] Uzevši u obzir biološku aktivnost purina i deazapurina, u ovom radu priređeni su derivati različitih purinskih izostera (Slika 7).



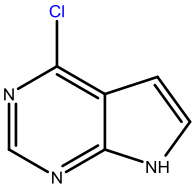
Adenin
9*H*-purin-6-amin



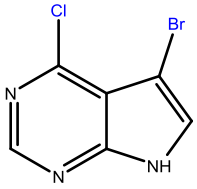
6-amino-7-deazapurin
7*H*-pirol[2,3,-*d*]pirimidin-6-amin



6-klor-9*H*-purin



6-klor-7-deazapurin
6-klor-7*H*-pirol[2,3,-*d*]pirimidin

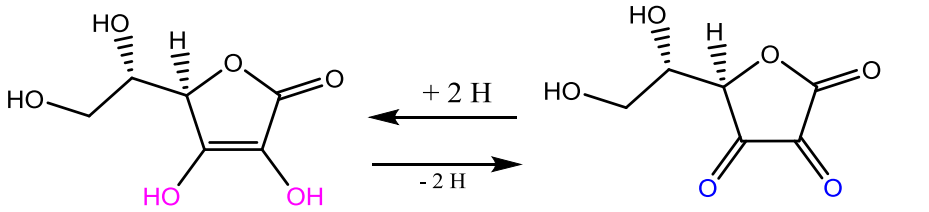


7-brom-6-klor-7-deazapurin
7-brom-6-klor-7*H*-pirol[2,3,-*d*]pirimidin

Slika 7. Strukturni prikaz purina i deazapurina korištenim u ovom radu.

2.2 L-askorbinska kiselina

L-Askorbinska kiselina, poznata i kao vitamin C, je ketolakton molekulske formule $C_6H_{12}O_6$. Po strukturi je vrlo slična glukozi i topljiva je u vodi. Sudjeluje u mnogim biokemijskim procesima, poput reakcija hidroksilacije, pri čemu se oksidira do dehidroaskorbinske kiseline (Slika 8).[22] U organizmu, pri fiziološkim uvjetima (pH~7,4), askorbinska se kiselina nalazi u obliku askorbatnog aniona.[23]



L- askorbinska kiselina L-dehidroaskorbisnka kiselina

Slika 8. Shematski prikaz oksidacije L- askorbinske kiseline

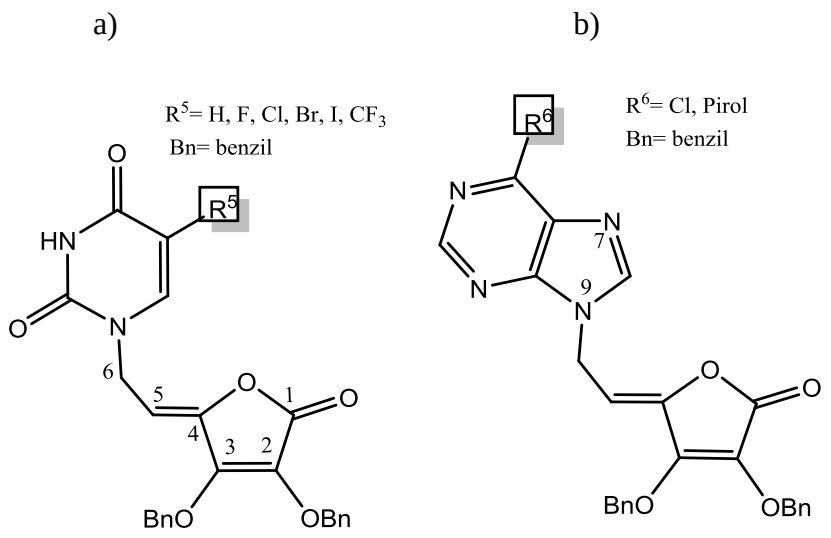
Četiri hidrokislne skupine pokazuju različitu reaktivnost u bazičnim uvjetima, te visoko hidrofilni karakter. Zbog toga askorbinska kiselina nije topljiva u organskim otpalima. Često se zbog toga hidroksilne skupine supstituiraju sa skupinama topljivim u organskim otapalima.[25]

Askorbinska kiselina sudjeluje u sintezi kolagena (vezivnog tkiva), koji organizmu daje čvrstoću i potporu.[24] Nedostatak kolagena uzrokuje skorbut, bolest koja dovodi do promjena na zubnom mesu, pucanje krvnih žila, slabljenja zglobova i imunološkog sustava, a u krajnjem slučaju može doći i do smrti. Osim kolagena, askorbinska kiselina neophodna je za sintezu karnitina iz lizina, sintezu neurotransmitera, aktivnost citokroma P-450, metabolizam kolesterola, a smatra se i najvažnijim antioksidansom u izvanstaničnoj tekućini. Glavni izvor L-askorbisnke kiseline su proizvodi biljnog i životinjskog podrijetla. Posebno veliki udio vitamina C nalazi se u agrumima, papaji, jagodama, rajčici, brokuli, zeljastom povrću i slično.[25]

Istraživanja su pokazala da L-askorbinska kiselina i njeni derivati pokazuju antikancerogeno i antivirusno djelovanje.[26,27] Smatra se da askorbinska kiselina inhibira apoptozu izazvanu oksidacijskim stresom u stanicama HL-60 mijeloične leukemije,[28] dok neki derivati L-askorbinske kiseline poput 6-bromo-, 6-amino- i *N*,*N*-dimetil-6-amino-6-deoksi-L-askorbinska kiselina inhibiraju rast zloćudnih tumorskih stanica: vrata maternice

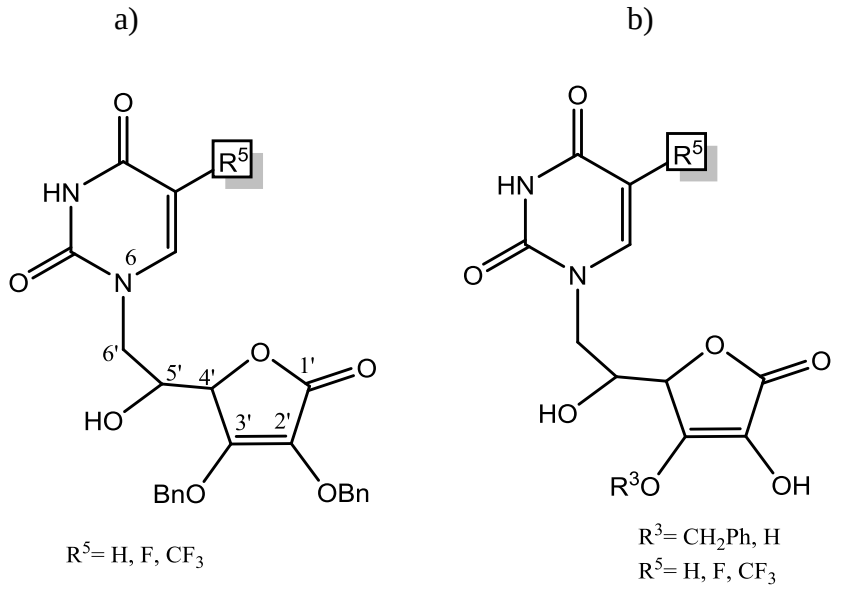
(HeLa), grkljana (Hep2) i gušterače (MiaPaCa 2).[27,29] U kombinaciji sa vitaminom K pokazuje antitumorsku aktivnost protiv staničnih linija karcinoma prostate (DU145).[30] Važno je i napomenuti da purinski i pirimidinski derivati L-askorbinske kiseline pokazuju antitumorsko djelovanje na stanice mišje leukemije (L1210/0), karcinoma dojke miša (FM3A), i zloćudno preobraženih T-limfocita (Molt4/C8 i CEM/0).[31]

Kako je u prethodnom odlomku navedeno, L-askorbinska kiselina i njeni derivati pokazuju i antivirusno djelovanje. Tako L-askorbinska kiselina-2-fosfat pokazuje antivirusno djelovanje protiv humanog citomegalovirusa (CMS), sojeva u ljudskim stanicama fibrioblasta (HFF) i endotelnih stanica (EC).[26] Već spomenuti purinski i pirimidinski derivati L-askorbinske kiseline pokazuju antivirusno djelovanje na varicella zoster virus (TK^+VZV i TK^-VZV) i citomegalovirus (CMV) (Slika 9).[31]



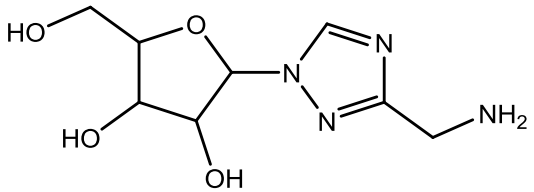
Slika 9. Strukturne formule a) pirimidinskih i b) purinskih derivata 2,3-dibenzil-4,5-dihidro-5,6-dideoksi-L-askorbinske kiseline koji pokazuju antitumorsko i antivirusno djelovanje na varicella-zoser virus (TK+VZV i TK-VZV) i citomegalovirus (CMV).[31]

Raić-Malić i suradnici priredili su različite pirimidinske nukleozidne analoge od kojih je najizraženije citostatsko djelovanje pokazao spoj koji sadrži trifluorometilnu skupinu u položaju 5 uracilne jezgre (IC_{50}=0,9μM) na stanice Molt4/C8 (stanice zloćudno preobraženih T-limfocita), dok spoj 6-(*N*-pirolil)purin najveću selektivnost u antitumorskom djelovanju (Slika 10).[32-]



Slika 10. Strukturni prikaz pirimidinskih derivata a) 2,3-*O*,*O*-dibenzil-6-deoksi-L-askorbinske kiseline i b) 4,5-didehidro-5,6-dideoksi-L-askorbinske kiseline koji pokazuju antitumorski i antivirusno djelovanje.[32]

Nukleozidni analozi koji sadrže peteročlani triazolni prsten od velikog su interesa, posebno nakon dokaza o antivirusnom djelovanju ribavirina.[33] Istoimeni lijek koji se koristiti za liječenje infekcija uzrokovanih respiratornim sinsicijskim virusom (RSV) i virusom hepatitis C (HCV) (Slika 11).[34]



Slika 11. Ribavirin, istoimeni lijek koji se koristi u liječenju infekcija uzrokovanih respiratornim sinsicijskim virusom (RSV) i virusom hepatitis C (HCV).

2.3 Triazoli

Triazoli, poznati i kao pirodiazoli su peteročlani, aromatični, heterociklički spojevi. Građeni su od tri atoma dušika i dva ugljikova atoma, molekulske formule $C_2H_3N_3$.[35] Pojavljuju se u dva izomerna oblika: 1,2,3- Traizol i 1,2,4- Triazol (Slika 12).[36] 1,2,3-Triazol kao jedinka ne postoji u prirodi.[37]

a) b)

Slika 12. Strukturni prikaz izomera triazola a) 1,2,3-triazol b) 1,2,4-triazol

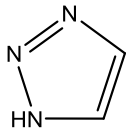
Zbog svoje aromatske stabilnosti, u kiselom i bazičnom mediju, ne podliježu redukciji, oksidaciji ni hidrolizi,[38] a stabilni su i u širokom temperaturnom području.[39] Ponašaju se kao slabe baze,[40] te reagiraju s elektrofilnim reagensima. Imaju visoki dipolni moment (oko 5 D),[41] te zbog toga sudjeluju u dipol–dipol i π interakcijama, a mogu stvarati i vodikove veze.[42] Ta svojstva omogućuju triazolima bolju topljivost i lakše vezivanje za biološke mete.[38]

Triazoli imaju važnu ulogu u medicinskoj kemiji. Pokazuju široki spektar farmakološkog djelovanja na razne bolesti poput malarije, HIV-a, alergija, karcinoma, tuberkuloze, konvulzivnih te bakterijskih bolesti i slično.[43] Osim što pokazuje snažnu biološku aktivnost, triazol i njegovi izosteri imaju nisku toksičnost, visoku bio dostupnost, dobru biokompatibilnost, te pokazuju dobra farmakokinetička svojstva.[35]

Triazol i njegovi derivati ne primjenjuju se samo u medicinskoj kemiji, već se nalaze u sastavu različitih bojila i pigmenata, služe kao inhibitori korozije različitih metala i legura, te kao herbicidi i fungicidi u agrokemikalijama.[35]

U ovom radu proučavamo hibride purina i pseudopurina sa L- askorbinskom kiselinom povezanih preko 1,2,3-triazolne premosnice, te ćemo veću pažnju posvetiti njegovim svojstvima.

2.3.1 1,2,3-triazol



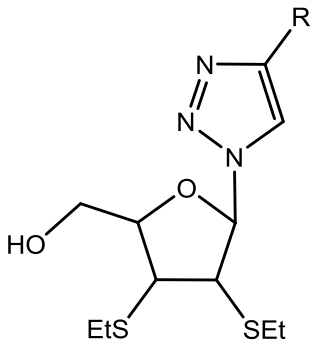
Slika 13. Strukturni prikaz 1,2,3-triazola

U prethodnom poglavlju opisali smo neka svojstva 1,2,3- triazola i posebno istaknuli njegovu važnost u medicinskoj kemiji. 1,2,3-Triazol može imati ulogu bioizostera (amidne veze, nukleozida, *trans* olefinske premosnice), farmakofora ili može biti premosnica koja povezuje različite farmakofore, stvarajući molekulske hibride koji pokazuju učinkovitije i selektivnije djelovanje na željenu metu.[44,45]

Najčešći način sinteze 1,2,3-triazola je Huisgenova cikloadicija (1,3-dipolarna cikloadicija).[38] Početkom dvadesetog stoljeća opisana je ova reakcija, ali ju je tek šezdesetih godina (dvadesetog stoljeća) mehanistički opisao Huisgen.[38] Riječ je o egzergonoj reakciji[46] između terminalnog alkina i azida.[47] Uz primjenu pogodnog katalizatora reakcija je regioselektivna (Slika 14), visokih iskorištenja i brza, jer su alkini slabi 1,3-dipol akceptori.[48]

Najpogodniji katalizatori za Huigenovu cikloadiciju 1,4-disupstituiranog-1,2,3-triazola su bakar i njegove soli.[49] Ova vrsta cikoadicije pronašla je široku primjenu u raznim područjima znanosti kao što u biokonjugacija,[50] sinteza oligonukleotida,[51] označavanje DNK[52] te otkrivanju lijekova.[53] Pokazalo se da je reakcija uspješnija *in situ*, uz redukciju Cu(II) soli, poput bakar(II)acetata ($Cu(OAc)_2$), koje su jeftinije i čišće od Cu(I) soli.[39]

Derivati 1,2,3-triazol-2,3-dideoksi-2,3-dietantioribonukleozida pokazali su visoku citotoksičnost prema hepatocelularnom karcinomu jetre (HepG2), plućnom karcinomu (LAC) te karcinomu vrata grlića maternice (HeLa) (Slika 14.).[54]



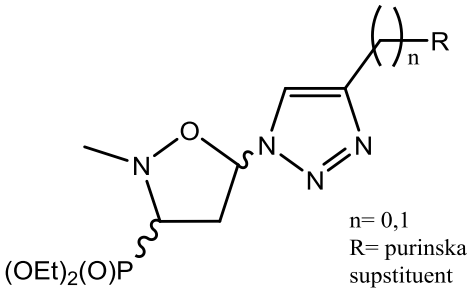
R= Ph; 4-F-Ph; 4-OCH_3-Ph; N-metil-karbamoil:;CH_2OH

Slika 14. Strukturni prikaz 1,2,3-triazol-2,3-dideoksi-2,3-dietantioribonukleozida i njihovog antitumorksog djelovanja.[44]

Tablica 1. Prikaz antitumorskog djelovanja 1,2,3-triazol-2,3-dideoksi-2,3-dietantioribonukleozida.[44]

EC_{50}(μM)				
	HepG2	A549	LAC	HeLa
1: R= Ph	9,6	44,2	20,7	11,2
2: R= 4-F-Ph	9,6	20,2	16,2	6,9
3: R= 4-OCH_3-Ph	11,0	23,4	14,5	5,7

Skupina nukleozidnih analoga, čija se struktura sastoji od izoksazolidnog prstena povezanog sa purinskom ili pirimidinskom bazom ili nekom drugom aromatskom funkcijskom skupinom preko 1,2,3-triazolne premosnice, pokazala je antikancerogeno djelovanje. Pokazano je da ovi *trans*- i *cis*-(1,2,3-triazol-1-il)izoksazolidini, koji sadrže nesupstituiranu *orto*-, *meta*-fluorfenil, 2,4-diflourfenil i piridin-2-il skupinu, inhibiraju proliferaciju stanica za 50% (CC_{50}) u području koncentracija od 40 do 78 μM za karcinom vrata maternice (HEL), i od 120 do 250 μM za mijšiju leukemiju (L1210), ljudskih limfocita (CEM) i karcinoma vrata grlića maternice (HeLa). No izoksazolidini koji su preko 1,2,3-triazolne premosnice povezani sa uracilom, timinom, citozinom i adeniom nisu pokazali inhibiciju proliferacije stanica (Slika 15).[55]



n= 0,1
R= purinska ili pirimidinska baza; aromatski ili heterociklicki supstituent

Slika 15. Nukleozidni analozi sastavljeni od izoksazolidinskog prstena povezanog sa purinskom, pirimidinskom bazom, aromatskom ili heterocikličkom skupinom preko 1,2,3-triazolne premosnice i njihovo antitumorsko djelovanje.[44]

Tabica 2. Prikaz antitumorskog djelovanja nukleozidnih analoga izoksazolidinskog prstena povezanih sa purinskom, pirimidinskom bazom, aromatskom ili heterocikličkom skupinom preko 1,2,3-triazolne premosnice.[44]

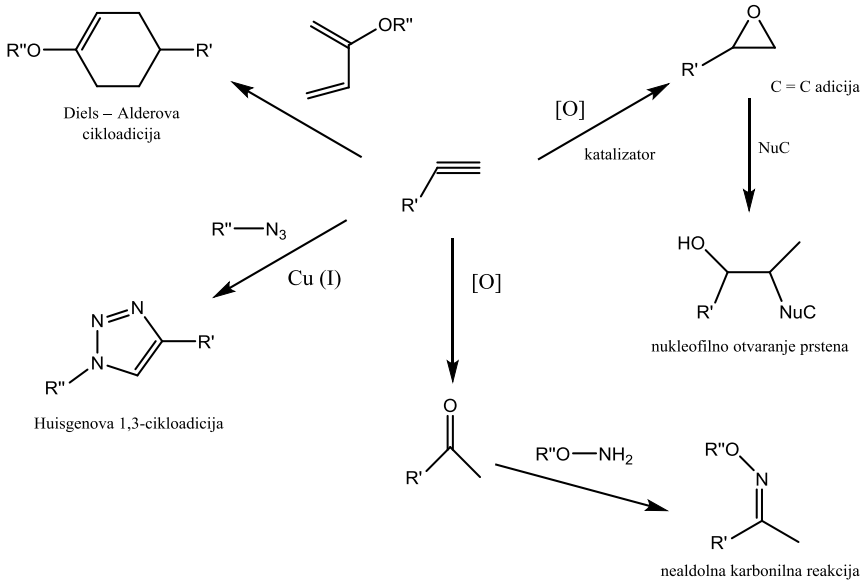
CC_{50}(μM)								
	L1210		CEM		HeLa		HEL	
	Trans	*Cis*	*Trans*	*Cis*	*Trans*	*Cis*	*Trans*	*Cis*
1: R= Ph	>250	172	>250	>250	>250	>250	40	54
2: R= 2-F-Ph	120	122	>250	>250	202	247	73	41
3: R= 3-F-Ph	>250	104	>250	>250	>250	212	40	43
4: R=2,4-diF-Ph	131	124	>250	>250	162	135	59	42
5: R= piridin-2-il	>250	206	>250	>250	>250	>250	62	78
n=0 za 1-5								

2.4 '*Click*' kemija

Koncept '*click*' kemije opisali su K. B. Sharpless i suradnici 2001. godine.[56] Važno je da '*click*' reakcija bude modularna, stereospecifična, širokog opsega, omogućava visoka iskorištenja bez ili sa malom količinom neželjenih produkata, da proizvodi produkte koji se jednostavno izoliraju i koji su neškodljivi za okoliš, ima široka dostupnost početnih reagensa, te upotrebu okolišu prihvatljivih otapala, ili otapala koja se jednostavno uklanjaju. Poželjno je i da se produkti reakcije ne moraju pročišćavati kromatografskim metodama, te da su stabilni u fiziološkim uvjetima.[57] Postoji širok spektar reakcija u području '*click*' kemije, koje se mogu razvrstati u četiri glavne kategorije:

- Cikloadicija – prvenstveno 1,3-dipolarna cikloadicija, te hetero Diels – Alder cikoadicija.
- Nukleofilno otvaranje prstena – odnosi se na otvaranje napetih heterocikličkih elektrofila, poput aziridina, epoksida, cikličkih sulfata, aziridinijeva iona, episulfatnog iona i sl.
- Nealdolne reakcije karbonilnog tipa – formacija oksima, hidrazona i aromatskih heterocikla
- Adicija na dvostruku vezu između dva C-atoma – reakcije oksidacija, kao što su epoksidacija, dihidroksilacija, aziridinacija te nitrozilna i sulfonilna halo adicija i Michaelova adicija Nu-H reakanata.[57]

(Slika 16.)



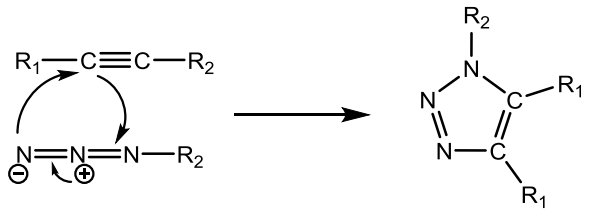
Slika 16. Prikaz reakcija koje ispunjavaju uvjet '*click*' kemije.[57]

Bez obzira na velike zahtjeve, '*click*' kemija ima izrazito široku primjenu u biokonjugaciji, modifikaciji površina nanočestica, te farmaceutskoj industriji.[58]

U vidu ovog rada će se proučavati 1,3-dipolarna cikloadicija (Huisgenova cikloadicija), s bakrom kao katalizatorom.

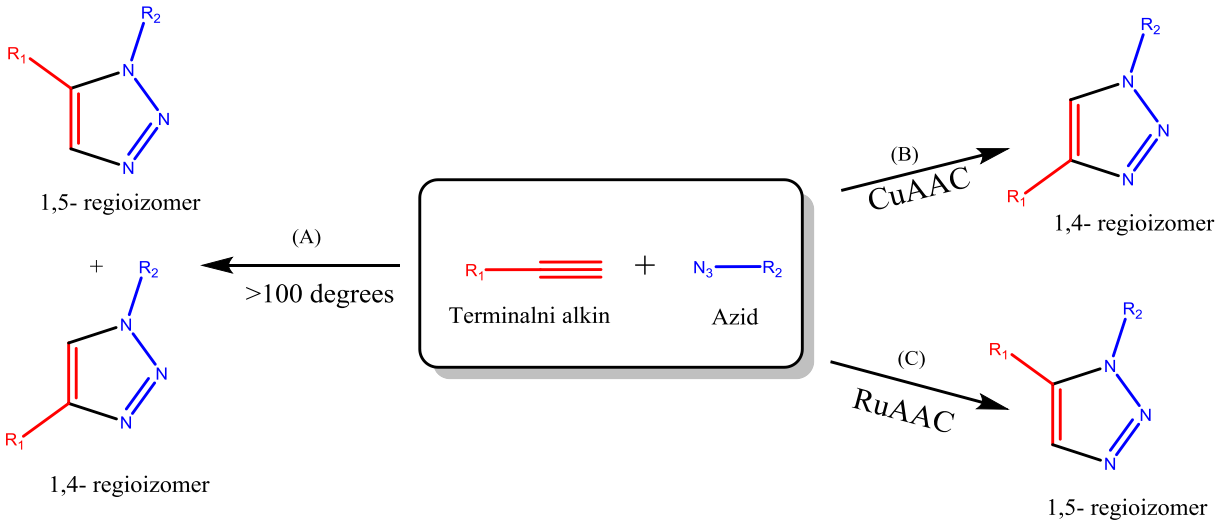
2.4.1 Huigenova cikloadicija

Huisgenova cikloadocija, poznata i kao 1,3-dipolarna cikloadicija, je elektrofilna, egzergona reakcija između 1,3-dipola i dipolarofila, pri čemu nastaje petročlani prsten.[59] Cikloadicija, općenito sugerira nastajanje cikličkog produkta, kod kojeg nastaju dvije σ veze na temelju dvije π veze.[60] Primjer 1,3-dipolnih molekula su azidi, nitriloksidi i nitrililidi, u kojima je centralni atom, sp hibridizirani dušik, te nitroni i kabonililidi kod kojih je centralni dušikov atom sp^2 hibridiziran. Dipolarofili sadrže dvostruku vezu i mogu biti karbonili, alkeni ili alkini. Konačni produkti cikloadicije između alkina i azida su 1,4- i 1,5-disupstituirani triazoli.[61]



Slika 17. Općeniti prikaz Huisgenove (1,3-dipolarne cikloadicije)

Huisgenova cikloadicija se provodi pri povišenim temperaturama, te je vrijeme reakcije izrazito sporo. Osim toga, reakcija nije regioselektivna i zahtjeva dodatno kromatografsko pročišćavanje. Problem regioselektivnosti riješen je upotrebom katalizatora i to upotrebom Cu(I) ili Cu(II) soli za sintezu 1,4-disupstituiranog triazola, dok se za sintezu 1,5-disupstituiranog triazola koriste rutenijevi kompleksi.[62]



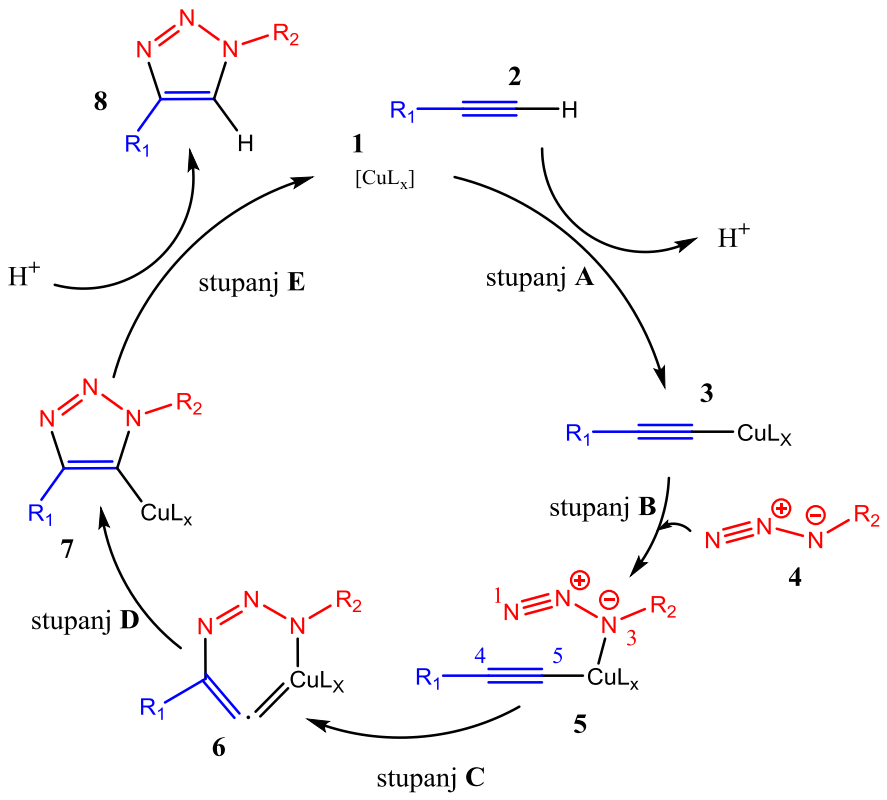
Slika 18. Strukturni prikaz Huisgen-ove cikloadicije (A) termalna rekacija cikloadicije rezultira nastajanjem smjese 1:1 1,4- i 1,5-disupstituiranog-1,2,3-triazola, (B) reakcija katalizirana bakrom (Cu) rezultira samo nastajanjem 1,4-disupstituiranog-1,2,3-trizola, (C) reakcija katalizirana rutenijem (Ru) rezultira nastajanjem 1,5-disupstituiranih-1,2,3-triazola.

2.4.1.1 Azid-alkin cikoadicija katalizirana Cu(I)

Kako je u prethodnom odlomku navedeno, 1,3-dipolarnom cikloadicijom terminalnih alkina i azida s bakrom kao katalizatorom (CuAAC) priređen je 1,4 disupstituirani triazolni prsten. Azidi i terminalni alkini pokazuju izrazitu kinetičku stabilnost te stabilnost u širokom području pH, odlično toleriraju kisik, vodu i standardne uvjete organske sinteze, te zbog navedenih svojstava tih molekula, CuAAC je izrazito proučavana reakcija. Proces sinteze pokazuje odlična iskorištenja u sustavu *t*-BuOH:H_2O, pri sobnoj temperaturi, a velika kinetička stabilnost, uzrokuje izrazito dugo vrijeme sinteze 1,4-disupstituiranog triazola.[63] Dugo vrijeme reakcije može se skratiti upotrebom katalizatora u kombinaciji s mikrovalnim i ultrazvučnim zračenjem, što je dokazano i u ovom radu. Katalizatori reakcije mogu biti Cu(I) soli (CuX (X=Cl,Br,I), CuOTf,[63] koje se koriste direktno u sintezi, ili *in situ* iz Cu(II) soli, poput $CuSO_4$ ili $Cu(OAc)_2$ s odgovarajućim reducensom, poput natrijevog askorbata ili elementarnog bakra. Bakar(II) soli preferirane su zbog čistoće soli i produkata,.[64]

Jedan od prijedloga mehanizma sinteze 1,4-disupstituiranog-1,2,3-trazola dali su J. E. Hein i V. V. Fokin. Prema njihovom proračunu sinteza započinje reakcijom bakar(I)acetilida **1** i terminalnog alkina **2** (stupanj **A**). Ova reakcije je egzotermna, pri čemu nastaje π–

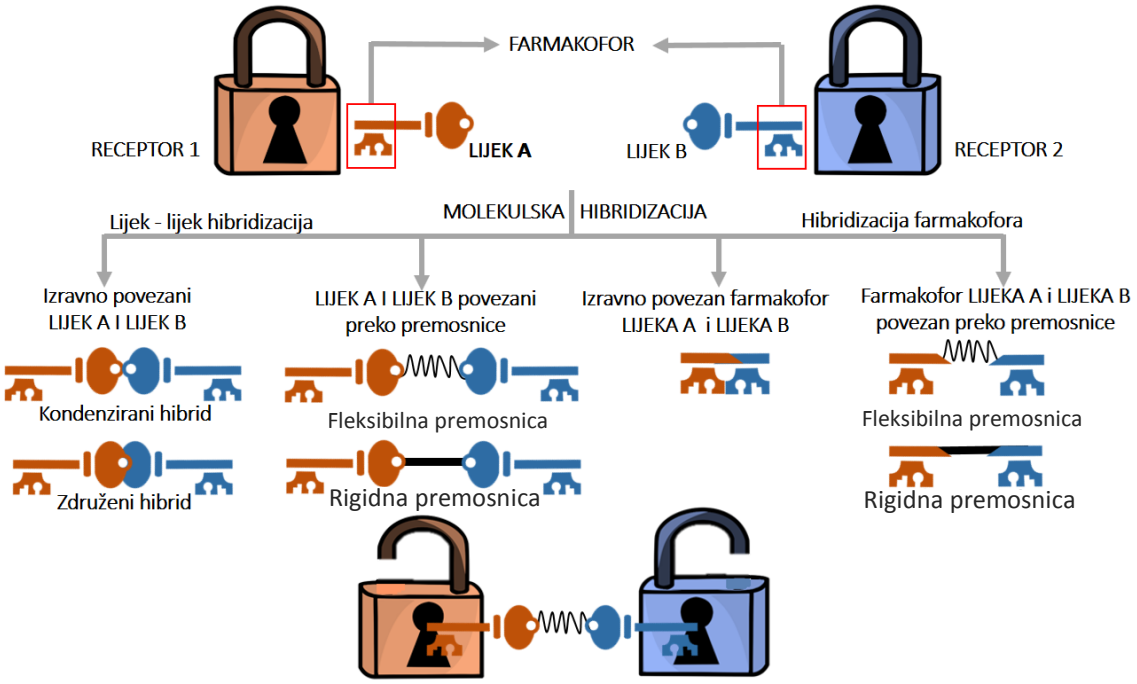
koordinirani alkin–bakar kompleks **3**, takav položaj alkina obzirom na bakar zakiseljuje sredinu, što omogućava deprotoniranje u vodenom mediju, pri čemu nastaje σ–acetilid. U ovom stupnju ulazi azid koji preko N1 atoma reagira sa atomom bakra i tvori intermedijar **5** (stupanj **B**). Prilikom ovog procesa, azid se aktivira za nukleofilni napad C5 atoma, te zbog blizine i elektronskog utjecaja, N3 napada C4 atom alkina (stupanj **C**)[58] zbog čega se formira C-N veze, što rezultira nastankom spoja **6**. Ova reakcije je endotermna i preferira nastanak bakrova triazolida **7** (stupanj **D)**. Kada je sterički zaštićen, Cu-triazolil (**7**) može se jednostavno izolirati, iz CuAAC reakcije, te prevesti u spoj **8**. U rijetkim slučajevima, niska razina katalizatora i velika brzina katalize može uzrokovati da stupanj **E** bude najsporiji.[65] (Slika 19)



Slika 19. Prijedlog sintetskog puta 1,4-disupstituiranog-1,2,3-triazola.[65]

2.5 Molekulska hibridizacija

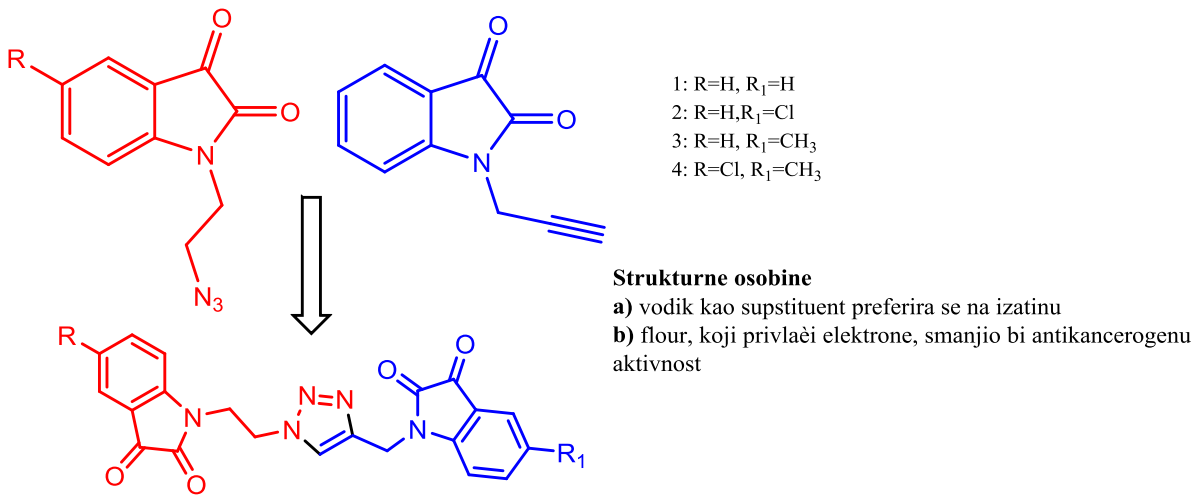
Molekulska hibridizacija je strategija racionalnog dizajna novih molekula, koja se temelji na kovalentnom povezivanju dva ili više farmakofora s ciljem da takve novonastale molekule imaju bolje djelovanje od početnih molekula (Slika 20).[66] Hibridizacija biološki aktivnih molekula značajna je metoda u pronalaženju novih lijekova koji ciljano djeluju na razne bolesti poput malarije, karcinoma tuberkuloze, AIDS-a i drugih.[67] Povezivanjem farmakofora mogu se ublažiti nuspojave, dok novonastali hibrid pokazuje snažnije djelovanje na ciljanu metu,[68] a moguće je i djelovanje na više meta istovremeno, analogno kombiniranoj terapiji.[69] Hibridni sojevi pokazuju veću specifičnost, bolju selektivnost, manju toksičnost i snažnije djelovanje od konvencionalnih terapija.[67] Na taj način smanjuje se mogućnost međudjelovanja lijekova i njihove rezistentosti.[70]



Slika 20. Shematski prikaz molekulske hibridizacije[66]

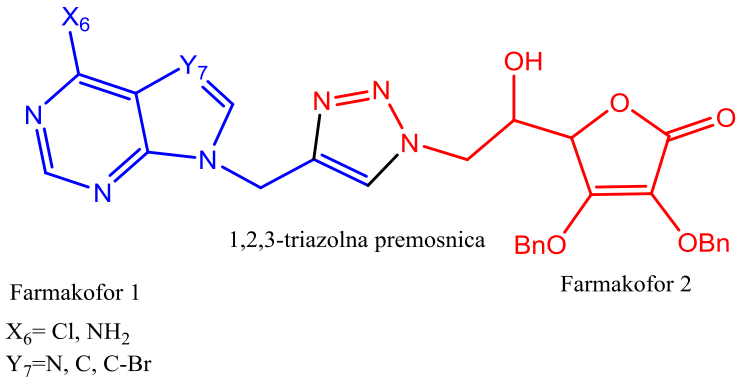
Jedan od primjera uspješno sintetiziranih molekulskih hibrida su 1*H*-1,2,3-triazol-izatin konjugati koji nastaju cikloadicijom između azida i alkina. Pokazalo se da ovi spojevi pokazuju citotoksično djelovanje prema karcinomu pluća (A-549), prostate (PC-3), leukemije (THP-1) i debelog crijeva (Caco-2). Dokazano je da spojevi na slici 21 imaju dva puta

snažnije djelovanje na THP-1 stanične linije (stanice akutne monocitne leukemije) od 5-fluoruracila.[71]



Slika 21. Stukturni prikaz konjugata 1H-1,2,3-triazol-izatina[79]

U ovom radu razmatrat ćemo sintezu i djelovanje farmakofora purina, odnosno pseudopurina i L-askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolnim prstenom kao premosnicom.



Slika 22. Strukturni prikaz farmakofora purina i pseudopurina sa L-askorbinskom kiselinom, povezani 1,2,3-triazolnom premosnicom.

2.6 Zelena kemija

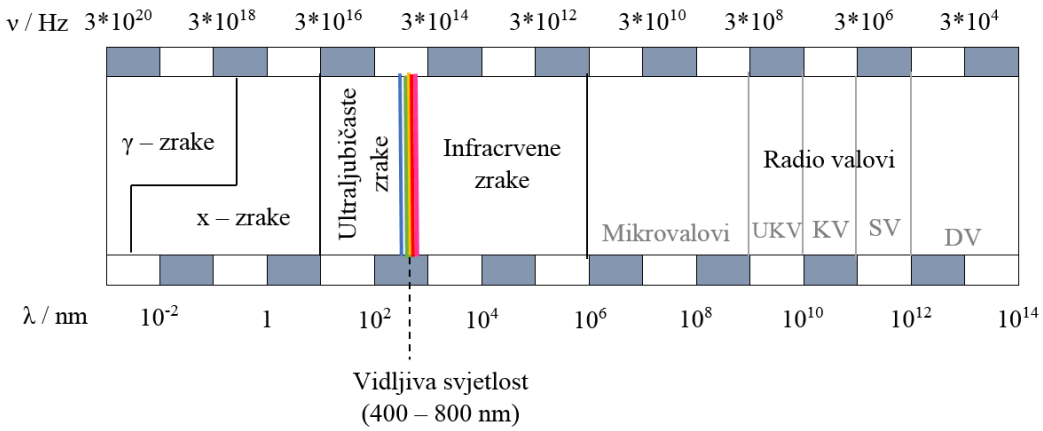
Prema definiciji Američke agencije za zaštitu okoliša (eng. Unites States Environmental Protection Agency – EAP) zelena kemija je dio kemije koji osmišljava kemijske produkte i procese neškodljive za okoliš, te na taj načina sprječava nastajanje onečišćenja.[72] Zelena kemija temelji se na nekoliko načela, poput, sprječavanje upotrebe hlapljivih i toksičnih otapala, smanjenje potrebne količine reagensa i katalizatora, upotrebe benignih kemikalija, smanjenje kemijskog otpada, minimalizacija potrošnje energije i druga.[73]

Obzirom da se većina organskih sinteza odvija uz povišenu temperaturu, gdje uvjeti zagrijavanja, putem refluksa, mogu biti preagresivni, znanstvenici su posegli za alternativnim izvorima energije.[74] Postoje četiri skupine alternativnih izvora energije: fotokemija-reakcije potaknute UV/ViS zračenjem, mikrovalno zračenje, ultrazvučno zračenje i mehanokemijsko miješanje.[75]

U ovom radu se sinteza propargiliranih derivata purinskih izostera i L-askorbisnke kiseline, povezanih preko 1,2,3-triazolne premosnice, provodila potpomognuta mikrovalnim i ultrazvučnim valovima.

2.6.1 Mikrovalovima potpomognute reakcije

Elektromagnetsko područje u kojem zrače mikrovalovi kreće se od 0,3 GHz do 300 GHz, te prema tome mikrovalno zračenje (eng. microwave MW) se nalazi između radiovalova (Rf) i infracrvenog područja (IR) frekvencija, valne duljine od 1 mm do 1 m.



Slika 23. Prikaz elektromagnetskog spektra

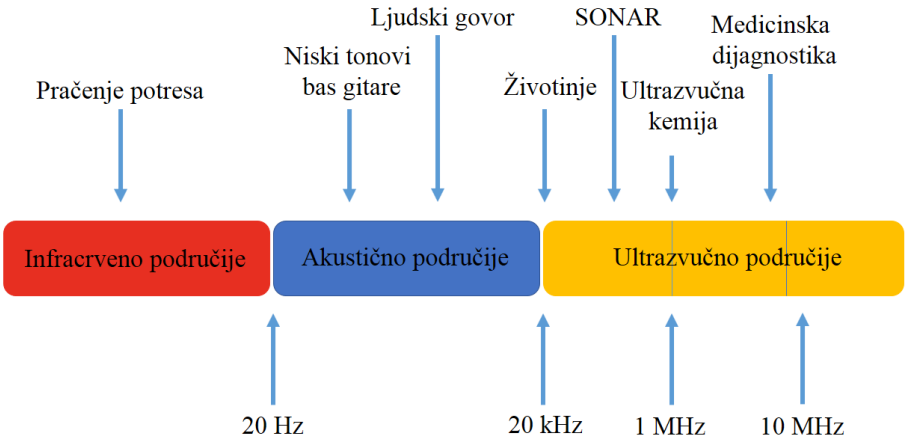
Energija koju proizvode mikrovalovi, rezultira nastankom toplinske energije koju različiti mediji ili materijali mogu reflektirati (metali), apsorbirati (smanjujući mikrovalnu

energiju, povećavanjem topline uzorka) ili transmitirati (izolatori).[73] Mikrovalno zračenje ima široku primjenu u organskoj sintezi, pri čemu je glavni preuduvjet reakcije potaknute mikrovalnim zračenjem, postojanje stalnog dipola barem jedne komponente u reakcijskoj smjesi. Obzirom na apsorpciju mikrovalova, koriste se polarna otapala poput metanola, etanola, DMF-a, DMSO-a, acetonitrila i etil-acetata[75] koji omogućavaju apsorpciju između mikrovalnog zračnja i polarnih molekula otapala, zatim se apsorbirana energija prenosi na reakcijsku smjesu, a dobiveni rezultati su slični klasičnim reakcijama zagrijvanja. Nepolarna otapala s druge strane ne mogu apsorbirati energiju, već dolazi do direktne apsorpcije energije mikrovalova i reaktanata, te se apsorbirana energija prenosi na otapalo, a dobiveni rezultati se ne podudaraju sa klasičnim reakcijskim uvjetima uz zagrijavanje. Osim što ubrzavaju selektivnu apsorpciju, mikrovalno zračenje smanjuje vrijeme reakcije, povećava iskorištenje, te omogućava reakcije bez upotrebe otapala, odnosno zamjenu štetnih organskih otapala 'zelenim' otapalima, poput vode.[74]

Mnoga istraživanja pokazala su kako bakar katalizirana azid-alkin cikloadicija (eng. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, CuAAC) potpomognuta mikrovalovima rezultira visokim iskorištenjem, čistoćom produkta i kraćim vremenom reakcije. Tako se mikrovalno zračenje primijenilo u sintezi peptida i pseudopeptida, u modificiranju nukleotida ili DNK, konjugaciji oligo- i polisaharida, konjugaciji nanočestica, te u sintezi manjih molekula poput nukleotidnih triazolnih derivata.[77]

2.6.2 Ultrazvukom potpomognute reakcije

Ultrazvučni valovi (eng. ultrasound – US) nalaze se na frekvencijama od 20 kHz do 100 MHz, te ih ljudsko uho ne može opaziti (ljudski sluh osjeti frekvencije od 16 Hz do 18 kHz).[78] Iako ultrazvučni valovi imaju široko područje frekvencija, ultrazvučna kemija najčešće koristi frekvencije of 20 kHz do 1 MHz, dok se valovi iznad 1 MHz koriste u medicini i dijagnostici.



Slika 24. Dijagram raspona ultrazvuka.[73]

Ultrazvučni valovi mogu biti usmjereni, mogu se reflektirati ili se mogu lomiti, ali zahtijevaju medij s elastičnim svojstvima za širenje vala. Prilikom širenja vala, čestice u elastičnom mediju osciliraju i prenose energiju duž medija, te na taj način nastaje ultrazvučni efekt. Dok u krutom mediju nastaju longitudinalni i transverzalni valovi, u tekućem i plinovitom mediju nastaju samo longitudinalni valovi. Zbog longitudinalnih vibracija molekula u tekućini nastaju zone visokog i niskog tlaka. Područje niskog tlaka uzrokuje nastanak kavitacijskih mjehurića, koji se šire i sudaraju, te pri tome nastaju tzv. šok valovi.[73] Ova pojava odgovorna je za većinu kemijskih i fizikalnih svojstava ultrazvučnih efekata.[79] Ultrazvučni valovi, poput mikrovalova, imaju široku primjenu, u organskoj sintezi, sintezi nanomatreijala, homogenim i heterogenim reakcijama, te u ultrazvučnoj kemiji. Također pokazalo se da ultrazvučni valovi pospješuju selektivnost, skraćuju vrijeme reakcije, omogućuju blaže reakcijske uvjete i imaju jednostavnu izvedbu.[73]

Ultrazvučni valovi su se pokazali najuspješniji u homogenoj i u heterogenoj katalizi.[80] U homogenim reakcijama, koje se odvijaju formiranjem radikala i radikalskih međuprodukata, ultraljubičasto zračenje može utjecati na reakcije. Ako su molekule u otopini hlapljive, visoka temperatura i tlak, potaknuti kavitacijom, uzrokuju pucanje kemijske veze, te kratkoživući radikalski međuprodukti međusobno reagiraju (pri sobnoj temperaturi). Molekule niske hlapljivosti, ne podliježu sličnim reakcijama, te visoki tlak, uzrokuje visoke energije molekula, što rezultira nastankom šok valova. S druge strane u heterogenim sustavima, kavitacija uzrokuje promjene mehaničkih svojstava, poput smanjenje veličine čestica, povećani prijenos mase te pročišćavanje površine.[73]

U reakcijama koje sadrže metalni katalizator, ultrazvučni valovi omogućavaju mehaničku depasivaciju, povećavaju prijenos mase i elektrona s metala do organskog akceptora,[81] dok mikrovalovi mogu dovesti do stvaranja opasnog luka (eng. dangerous arcing), ili je reakciju moguće provesti uz dobru raspršenost metalnih čestica u polarnom otapalu, visokog vrelišta.[82]

3. ESKPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sva otapala su sušena/pročišćivana prema preporučenom postupku sušenja agensima i/ili destiliranjem preko molekulskih sita veličine 3Å. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče 60F-254 prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm. Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063-0,2 mm), staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije, a kao eluens su korištene odgovarajuće smjese CH_2Cl_2/CH_3OH. Točke tališta sintetiziranih spojeva su određene na instrumentu Kofler (Reichert, Wien) i nisu korigirane.

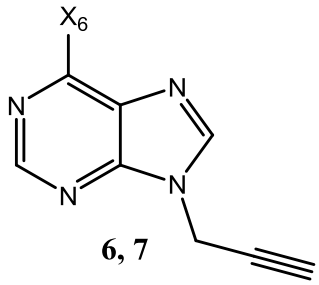
Spektri 1H NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci otopljeni su u DMSO-*d6* i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u 1H NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema DMSO na δ2,50 ppm. Pojedine rezonancije su pridružene na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

Maseni spektri zabilježeni su na Agilent 6410 instrumentu opremljenom elektrosprejnim sučeljem i trostrukim kvadrupolskim analizatorom (LC / MS / MS). Tekuća kromatografija visokog učinka (HPLC) provedena je na serijskom sustavu Agilent 1100 sa UV detekcijom (fotodiodni raspon detektor) pomoću analitičke kolone reverzne faze Zorbax C18 (2,1 x 30 mm, 3,5 um).

Reakcije potpomognute mikrovalovima provedene su u reaktoru Milestrone Start S koristeći staklene kivete pri 80°C i 300 W uz tlak 1 bar.

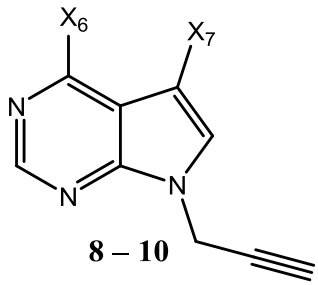
Reakcije potpomognute ultrazvučnim valovima provedene su u Bandelin Bath Cleaner (Sonorex digital 10 P) s nominalnom snoagom od 1000 W i frekvencijom od 35 kHz. Reakcije su provedene u tikvici od 25 mL s ravnim dnom, smještene u središtu kupelji 5cm ispod površine tekućine.

3.2. Pregled sintetiziranih spojeva



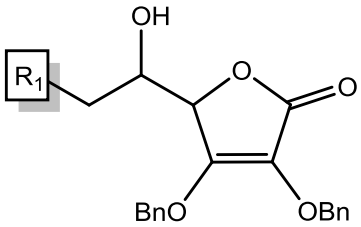
6, 7

SPOJ	6	7
X_6	Cl	NH_2



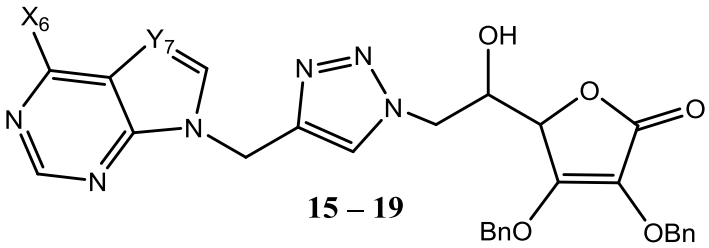
8 – 10

SPOJ	8	9	10
X_6	Cl	NH_2	Cl
X_7	H	H	Br



12 – 14

SPOJ	12	13	14
R_1	OH	OTs	N_3



15 – 19

SPOJ	15	16	17	18	19
X_6	Cl	NH_2	Cl	NH_2	Cl
Y_7	N	N	CH	CH	C-Br

3.3. Priprava spojeva

3.3.1. Općeniti postupak priprave propargiliranih purinskih izostera (6-10)

Odgovarajući purinski izoster (6-klorpurin, adenin, 6-klor-7-deazapurin, 6-amino-7-deazapurin, 7-brom-6-klor-7-deazapurin) otopljen je u DMF-u (5-10 ml), te je dodan NaH (1 eq). Nakon pola sata dodan je propargil-bromid (1,2 eq) i reakcijska smjesa je miješana 24 sata na sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije, otapalo je otpareno pri sniženom tlaku, a smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan-metanol.

3.3.1.1. 6-Klor-9-(prop-2-in-1-il)-9*H*-purin (6)

Spoj **6** dobiven je prema gore navedenom postupku iz 6-klorpurina (800 mg, 5,18 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 60 : 1) izoliran spoj **6** kao bijeli prah (549,00 g, 72,00 %). ^{1}H: δ 8,83 (1H, s, H2"), 8,76 (1H, s, H8"), 5,21 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, $\underline{CH_2}$CCH), 3,55 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, $CH_2C\underline{CH}$). ^{13}C (151 MHz, DMSO): δ 153,23 (C2"), 151,38 (C6"), 149,20 (C4"), 130,72 (C5"), 77,26 ($CH_2\underline{C}CH$), 76,67 ($CH_2C\underline{CH}$), 33.25 ($\underline{CH_2}$CCH). MS (ESI, m/z) 193.0 $[M+H]^+$.

3.3.1.2. 9-(Prop-2-in-1-il)-9*H*-purin-6-amin (7)

Spoj **7** dobiven je prema gore navedenom postupku iz adenina (500 mg, 3,70 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 20 : 1) izoliran je spoj **7** kao bijeli prah (467,76g, 73 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.18 (1H, s, H2"), 8.17 (1H, s, H8"), 7.25 (2H, s, NH_2), 5.02 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, $\underline{CH_2}$CCH), 3.44 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, $CH_2C\underline{CH}$). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 156.46 (C6"), 153.15 (C2"), 149.55 (C4"), 140.54 (C8"), 118.97 (C5"), 78.74 ($CH_2\underline{C}CH$), 76.26 ($CH_2C\underline{CH}$), 32.69 ($\underline{CH_2}$CCH).

3.3.1.3. 4-Klor-7-(prop-2-in-1-il)-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin (8)

Spoj **3** dobiven je prema gore navedenom postupku iz 6-klor-7-deazapurina (500,00 mg, 3,26 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 :1) izoliran je spoj **8** kao bijeli prah (439,90 g, 70,51%). ^{1}H (300 MHz, DMSO): δ 8,69 (1H, s, H2"), 7,82 (1H, d, *J* = 3,7 Hz, H6"), 6,71 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5"), 5,17 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, $\underline{CH_2}$CCH), 3,46 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, $CH_2C\underline{CH}$). ^{13}C (75 MHz, DMSO): δ 150,75 (C4"), 150,51 (C2"), 150,14 (7a"), 130,71 (C6"), 116,77 (C3a"), 99,08 (C5"), 78,31 ($CH_2\underline{C}CH$), 75,76 ($CH_2C\underline{CH}$), 33,69 ($\underline{CH_2}$CCH). MS (ESI, m/z) 192.0 $[M+H]^+$.

3.3.1.4. 4-Amino-7-(prop-2-in-1-il)-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin (9)

Spoj **9** dobiven je prema gore navedenom postupku iz 6-amino-7-deazapurina (500,00 mg, 3,73 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 : 1) izoliran spoj **9** kao bijeli prah (148,30 g, 23,11 %). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.08 (1H, s, H2"), 7.19 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H6"), 7.00 (2H, s, NH_2), 6.58 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H5"), 4.96 (2H, d, *J* = 2.5 Hz, 2H, $\underline{CH_2}$CCH), 3.35 – 3 31 (1H, m, $CH_2C\underline{CH}$).

3.3.1.5. 5-Brom-4-klor-7-(prop-2-in-1-il)-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin (10)

Spoj **5** dobiven je prema gore navedenom postupku iz 7-brom-6-klor-7-deazaprina (400,00 mg, 1,72 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom (CH_2Cl_2 : CH_3OH = 60 :1) izoliran je spoj **10** kao bijeli prah (244,00 mg, 70 %). ^{1}H (300 MHz, DMSO): δ 8,73 (1H, s, H2"), 8,08 (1H, s, H6"), 5,15 (2H, d, *J* = 2,5 Hz, CH_2), 3,50 (1H, t, *J* = 2,5 Hz, $C\underline{CH}$). ^{13}C (151 MHz, DMSO): δ 151,26 (C2"), 150,72 (C4"), 149,61 (C7a"), 130,64 (C6"), 114,13 (C3a"), 86,34 (C5"), 77,96 ($\underline{C}$CH), 76,32 ($C\underline{CH}$), 34,17 (CH_2).

3.3.2. 2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (12)

2,3-*O,O*-dibenzil-5,6-*O,O*-izopropiliden-L-askorbinska kiselina, (10,00 g, 25,22 mmol) otopljena je u metanolu (101,00 ml) i 50% octenoj kiselini (252,40 ml). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na temperaturi od 100 ºC. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno na sniženom tlaku, a uljasti produkt je otopljen u etil-acetatu (120,00 ml) te ekstrahiran sa zasićenom otopinom Na_2CO_3 (120,00 ml). Organski sloj je sušen iznad $MgSO_4$, a otapalo upareno pri sniženom tlaku. Produkt je pročišćen kolonskom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 40 : 1. Izoliran je spoj **12** (3,78 g, 42,05 %)

3.3.3. 6-*O*-tosil-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (13)

Spoj **12** (3,78 g, 10,61 mmol) otopljen je u suhom diklormetanu (31,43 ml) i suhom piridinu (4,25 ml). Reakcijska smjesa miješana je na 0 ºC, pri čemu je pola sata dokapavan *p*-toluensulfonil-klorid (2,25 g, 11,80 mmol) otopljen u diklormetanu (21,18 ml). Reakcijska smjesa miješana je preko noći na sobnoj temperaturi. Otapalo je otpareno pri sniženom tlaku, te je ostatak otopljen u diklometanu (120,00 ml) i ekstrahiran s vodom (2 x 55,00 ml). Organski sloj je sušen iznad bezvodnog $MgSO_4$. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 :1 izolirani je spoj **13** (2,88 g, 53,17 %).

3.3.4. 6-Azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (14)

Spoj **13** (2,88 g, 5,63 mmol) otopljen je u DMF-u (10,00 ml), te je dokapan natrijev azid (1,83 g, 28,17 mmol) otopljen u vodi (3,00 ml). Rekacijska smjesa zagrijavana je na temperaturi preko noći. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno pri sniženom tlaku. Zatim je produkt otopljen u etil-acetatu (100,00 ml) i ekstrahiran s destiliranom vodom (2 x 50,00 ml). Organski sloj sušen je iznad bezvodnog natrij-sulfata, koji se zatim odfiltrira. Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom uz eluens CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 : 1 izoliran je spoj **14** (570, 50 mg, 26,57 %).

3.3.5. Općeniti postupak za sintezu hibrida purina i pseudopurina s L-askorbinskom kiselinom preko 1,2,3-triazolne premosnice

METODA A: 6-azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina **14** (0,9 eq)**,** odgovarajući propargilirani purinski izoster **6**–**10** (1,1 eq), Cu(0) (0,8 eq) i $CuSO_4$ (1M, 0,3 eq) otopljeni su u DMF-u i *t*-BuOH : H_2O = 1 : 1. Reakcijska smjese smještena je u ultrazvučnu kupelj pri 80 ºC, 1000 W i 35 kHz, 90 minuta. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a reakcijska smjesa je pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

METODA B: 6-azido-2,3-O,O-dibenzil-L-askorbinska kiselina **14** (0,9 eq)**,** odgovarajući propargilirani purinski izoster **6**–**10** (1,1 eq), Cu(0) (0,8 eq) i $CuSO_4$ (1M, 0,3 eq) otopljeni su u DMF-u i *t*-BuOH : H_2O = 1 : 1. Reakcijska smjese miješana je 90 minuta u mikrovalnom reaktoru se pri 80 ºC i 300 W. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a reakcijska smjesa pročišćena je kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

METODA C: 6-Azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina **8** (0,9 eq), odgovarajući propargilirani purinski izoster **1**–**5** (1,1 eq) i bakar(II)acetat (0,05 eq) otopljeni su u metanolu. Reakcijska smjesa miješana je na refluksu 24 sata. Tijek reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a reakcijska smjesa se pročišćena kolonskom kromatografijom u eluensu diklormetan-metanol.

3.3.5.1. 6-{4-[(6-kloro-*9H*-purin-9-il)metil]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (15).

Spoj **15** dobiven je iz spoja **14 (** 356,41 mg, 0,94 mmol) i spoja **6** (200,00 mg, 1,04 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 :

1 dobiven je spoj **15** kao bijeli prah (Metoda A: 293,80 mg, 64,32 %; Metoda B: 198,20 mg, 34,18 %; Metoda C: 159,40 mg, 27,49 %; T_t =106–109 ºC). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,80 (1H, s, H2''), 8,78 (1H, s, H5'), 8,20 (1H, s, H8), 7,46–7,25 (10H, m, OCH_2Ph), 5,70–5,54 (3H, m, H4; CH_2), 5,20 (2H, dd, *J* = 25,9; 11,6 Hz, OCH_2Ph), 5,02–4,93 (3H, m, OCH_2Ph, OH), 4,62 (1H, dd, *J* = 13,7; 3,3 Hz, H6), 4,38 (1H, dd, *J* = 13,6; 9,6 Hz, H6), 4,19–4,03 (1H, m, *J* = 7,6; 3,7; 2,7 Hz, H5). MS (ESI, m/z) 574,20 $[M+H]^+$.

3.3.5.2. 6-{4-[(6-Amino-*9H*-purin-9-il)metil]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (16).

Spoj **16** dobiven je iz spoja **14** (Metoda A: 396,64 mg, 1,04 mmol; Metoda B: 396,64 mg, 1,04 mmol; Metoda C: 199,08 mg, 0,58 mmol) i spoja **7** (Metoda A: 200,00 mg, 1,15 mmol; Metoda B: 200,00 mg, 1,15 mmol; Metoda C: 100,00 mg, 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 : 1 izoliran je spoj **16** kao bijeli prah (Metoda A: 329,5 mg, 57,13 %; Metoda B: 174,50 mg, 30,28 %; Metoda C: 203,80 mg, 70,76 %; T_t = 113–115 ºC). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,17 (1H, s, H2''), 8,15 (1H, s, H8''), 8,12 (1H, s, H5'), 7,44–7,27 (10, m, OCH_2Ph), 7,19 (2H, s, NH_2), 5,63 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H4), 5,43 (2H, s, CH_2), 5,21 (2H, dd, *J* = 25,5, 11.6 Hz,OCH_2Ph), 4,97 (2H, d, *J* = 1,6 Hz, OCH_2Ph), 4,95 (1H, d, *J* = 1,4 Hz, OH), 4,62 (1H, dd, *J* = 13,7, 3,4 Hz, H6), 4,37 (1H, dd, *J* = 13,7, 9,5 Hz, H6), 4,20–4,07 (1H, m, H5). MS (ESI, m/z) 555,20 $[M+H]^+$.

3.3.5.3. 6-{4-[(4-Kloro-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin-7-il)metil]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O,O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (17).

Spoj **17** dobiven je iz spoja **14** (Metoda A: 358,50 mg, 0,94 mmol; Metoda B: 336,76 mg, 0,88 mmol; Metoda C: 356,97 mg, 0,94 mmol) i spoja **8** (Metoda A: 200,00 mg, 1,04 mmol; Metoda B: 188,00 mg, 0,98 mmol; Metoda C: 200,00 mg, 1,04 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 100 : 1 izoliran je spoj **17** kao bijeli prah (Metoda A: 468,40 mg, 86,96%; Metoda B: 208,40 mg, 41,33 %; Metoda C: 273,30 mg, 50,74 %; T_t = 84–87 ºC). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,67 (1H, s, H2''), 8,10 (1H, s, H5'), 7,80 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H6''), 7,49–7,22 (10H, m, OCH_2Ph), 6,67 (1H, d, *J* = 3,6 Hz, H5''), 5,62 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H4), 5,58 (2H, s, CH_2), 5,24 (1H, d, *J* = 11,5 Hz, OCH_2Ph), 5,16 (1H, d, *J* = 11,6 Hz, OCH_2Ph), 4,97 (2H, d, *J* = 6,3 Hz, OCH_2Ph), 4,95 (1H, d, *J* = 1,1 Hz, OH), 4,60 (1H, dd, *J* = 13,8; 3,4 Hz, H6), 4,36 (1H, dd, *J* = 13,8; 9,7 Hz, H6), 4,13–4,10 (1H, m, H5). MS (ESI, m/z) 573,10 $[M+H]^+$.

3.3.5.4. 6-{4-[(4-Amino-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin-7-il)metil]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (18).

Spoj **18** dobiven je iz spoja **14** (Metoda A: 398,95 mg, 1,05 mmol; Metoda B: 199,48 mg, 0,52 mmol; Metoda C: 199,42 mg, 0,52 mmol) i spoja **9** (Metoda A: 200,00 mg, 1,16 mmol; Metoda B: 100,00 mg, 0,58 mmol; Metoda C: 100,00 mg, 0,58 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 10 : 1 izoliran je spoj **18** kao bijeli prah (Metoda A: 203,40 mg, 35,67 %, Metoda B: 89,50 mg, 31,70 %; Metoda C: 156,80 mg, 55,54 %; T_t = 175–178 ºC). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8,01 (1H, d, *J* = 2,8 Hz, H6''), 7,95 (2H, s, H2''; H5'), 7,49–7,13 (10H, m, OCH_2Ph), 6,97 (2H, s, NH_2), 6,54 (1H, d, *J* = 3,0 Hz, H5''), 5,64 (1H, d, *J* = 6,6 Hz, H4), 5,36 (2H, s, CH_2), 5,20 (2H, dd, *J* = 25,5; 11,6 Hz, OCH_2Ph), 5,02–4,88 (3H, m, OCH_2Ph; OH), 4,60 (1H, dd, *J* = 13,8; 3,4 Hz, H6), 4,35 (1H, dd, *J* = 13,7; 9,6 Hz, H6), 4,19–3,99 (1H, m, H5). MS (ESI, m/z) 554,20 $[M+H]^+$.

3.3.5.5. 6-{4-[(5-Brom-4-klor-7*H*-pirolo[2,3,-*d*]pirimidin-7-il)metil]-1,2,3-triazol-1-il}-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska kiselina (19).

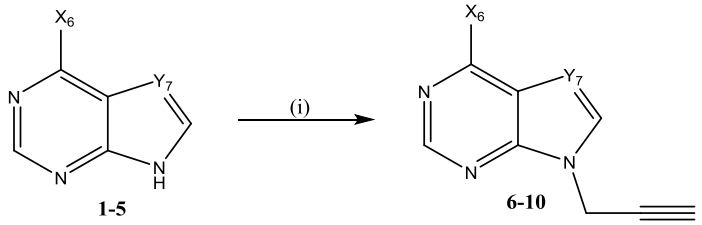
Spoj **19** dobiven je iz spoja **14** (Metoda A: 320,00 mg, 0,84 mmol; Metoda B: 255,36 mg, 0,67 mmol; Metoda C: 255,36 mg, 0,67 mmol) i spoja **10** (Metoda A: 252,16 mg, 0,93 mmol; Metoda B: 200,00 mg, 0,74 mmol; Metoda C: 200,00 mg, 0,74 mmol). Nakon pročišćavanja kolonskom kromatografijom u eluensu CH_2Cl_2 : CH_3OH = 50 : 1 izoliran je spoj **19** kao bijeli prah (Metoda A: 308,30 mg, 56,30 %; Metoda B: 210,30 mg, 48,15 %; Metoda C: 269,00 mg, 49,12 %; T_t = 146–149 ºC). ^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 8,70 (1H, s, H2''), 8,13 (1H, s, H5'), 8,04 (1H, s, H6''), 7,43–7,28 (10H, m, OCH_2Ph), 5,62 (1H, d, *J* = 7,0 Hz, H4), 5,56 (2H, s, CH_2), 5,24 (1H, d, *J* = 11,5 Hz, OCH_2Ph), 5,17 (1H, d, *J* = 11,6 Hz, OCH_2Ph), 4,97 (2H, d, *J* = 6,8 Hz, OCH_2Ph), 4,95 (1H, d, *J* = 1,4 Hz, OH), 4,61 (1H, dd, *J* = 13,8; 3,4 Hz, H6), 4,36 (1H, dd, *J* = 13,8; 9,7 Hz, H6), 4,14–4,09 (1H, m, H5). MS (ESI, m/z) 653,00 $[M+H]^+$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza spojeva

U ovom radu pripravljeni su potencijalni biološki aktivni 1,2,3-triazolni hibridi purinskih izostera i L-askorbinske kiseline (**15** – **19**) „click“ reakcijom iz purinskih i pseudopurinskih terminalnih alkina (**6** – **10)** i azida L-askorbinske kiseline (**14**).

N-alkiliranjem odgovoarajućih heterocikličkih baza (6-klorpurina, adenina, 6-klor-7-deazapurina, 6-amino-7-deazapuina i 7-brom-6-klor-7-deazapurina) s propargil-bromidom i NaH kao deprotonirajućim agensom priređeni su *N*-propargilni purinski izosteri (**6** – **10)** u iskorištenju od 23% do 72% (Shema 1).

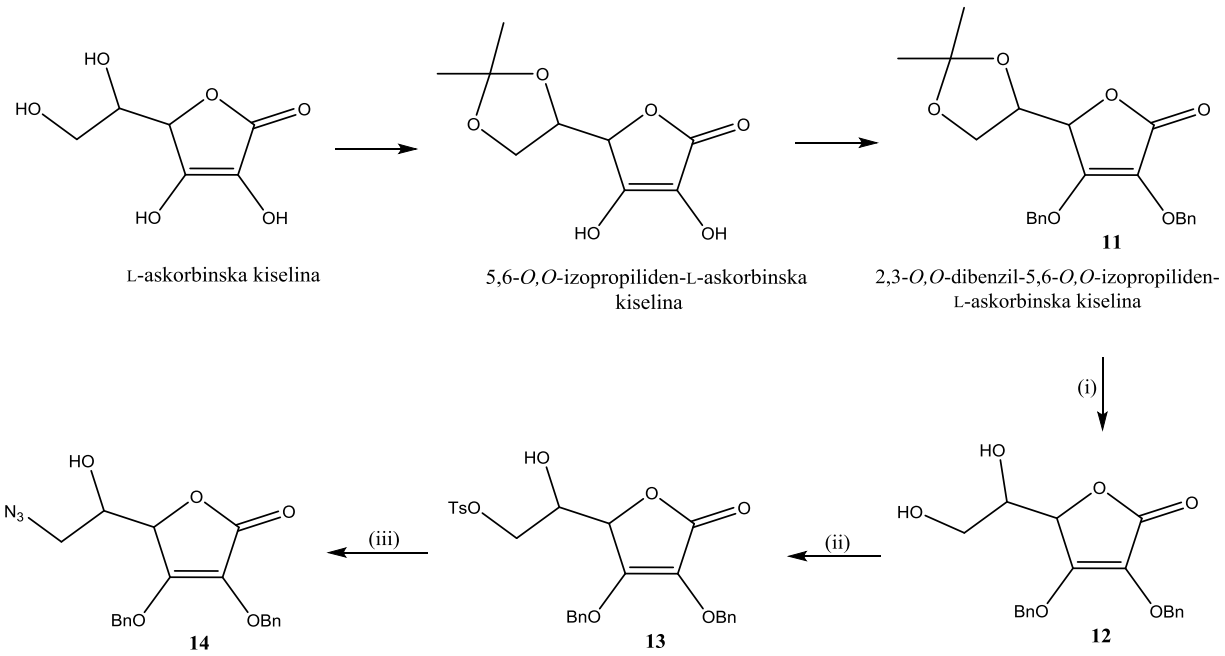


1; X_6=Cl, Y_7=N
2; X_6=NH_2, Y_7=N
3; X_6=Cl, Y_7=C
4; X_6=NH_2, Y_7=C
5; X_6=Cl, Y_7=C-Br

6; X_6=Cl, Y_7=N
7; X_6=NH_2, Y_7=N
8; X_6=Cl, Y_7=C
9; X_6=NH_2, Y_7=C
10; X_6=Cl, Y_7=C-Br

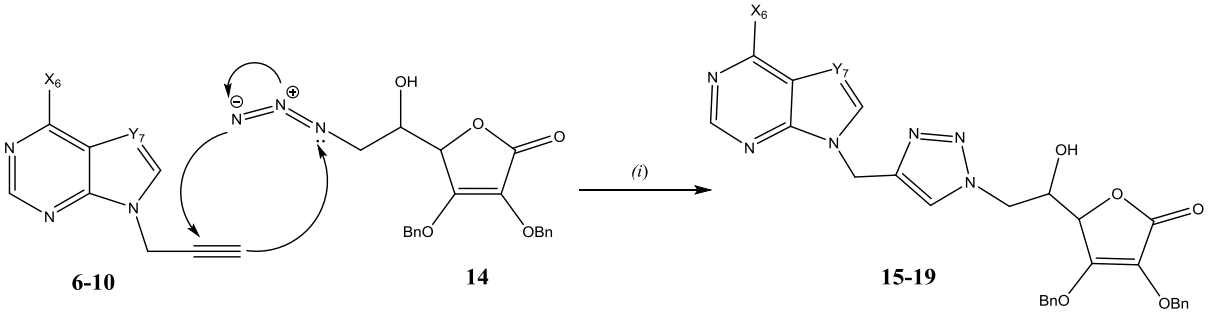
Shema 1. Reagensi i uvjeti: (*i*) NaH, propargil-bromid, DMF, st, 24 h

Shema 2 prikazuje sintetski put za pripravljanje 6-azido-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinske kiseline (**14**), kao ključnog prekursora za sintezu 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazolnih hibrida. Kao početni spoj se koristi L-askorbinska kiselina. Zaštita hidroksilnih skupina u položajima C-5 i C-6 u obliku ketala provodi se s acetil-kloridom u acetonu. Zatim se štite hidroksilne skupine laktonskog prstena u položajima C-2 i C-3 uvođenjem benzilne skupine.[78] Uklanjanja se izopropilidenska zaštitna skupina u kiselim uvjetima pri čemu nastaje 2,3-di-*O*-benzil-L-askorbinska kiselina (**12**), koja se prevodi u dobro odlazeće tosilatnu skupinu s *p*-toluensulfonil-kloridom u piridinu i bezvodnom diklormetanu. 6-tosil-2,3-*O*,*O*-dibenzil-L-askorbinska (**13)** nukleofilnom supstitucijom s natrijevim azidom daje azido derivat **14**.



Shema 2. Reagensi i uvjeti: (*i*) 50% octena kiselina, metanol, 100 ºC, 24 h; (*ii*) *p*-toluensulfonil-klorid, bezvodni CH_2Cl_2, piridin, 0 – 25 ºC, 24 h; (*iii*) DMF, voda, natrijev azid (NaN_3), 80 ºC – st, 24 h.

Hibridi purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline s 1,2,3-triazolnom premosnicom (**15 – 19)** pripravljeni su regioselektivnom bakrom (I) kataliziranom Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikoadicijom azida askorbinske kiseline (**14**) kao 1,3-dipolom i odgovarajućim purinskim dipolarofilom (**6 – 10**) (Shema 3). Ciljani hibridi priređeni su „click“ reakcijom potpomognutom ultrazvukom (Metoda A) i mikrovalovima (Metoda B) koristeći Cu(II)sulfat i Cu(0), te reakcijom na sobnoj temperaturi koristeći Cu(II)acetat i metanol (Metoda C) kao izvor Cu(I) iona. Akustična kavitacija u heterogenom sustavu povećala je prijenos mase i elektrona s površine metala do organskog akceptora, te je pokazala bolja iskorištenja u odnosu na mikrovalovima potpomognute reakcije (Tablica 3).

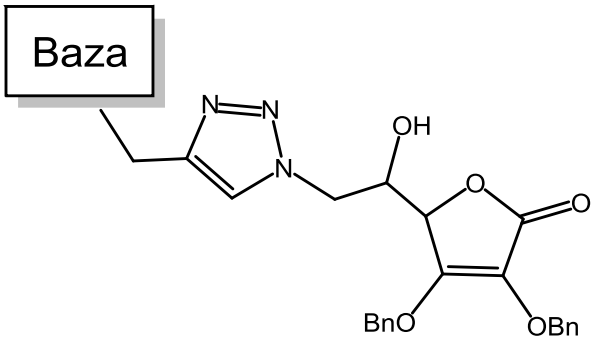


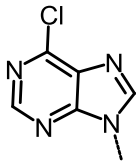
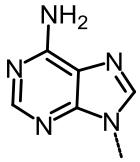
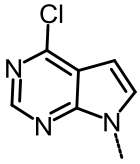
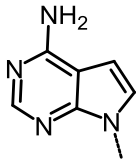
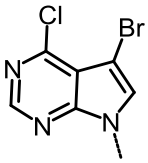
6; X_6=Cl, Y_7=N
7; X_6=NH_2, Y_7=N
8; X_6=Cl, Y_7=C
9; X_6=NH_2, Y_7=C
10; X_6=Cl, Y_7=C-Br

15; X_6=Cl, Y_7=N
16; X_6=NH_2, Y_7=N
17; X_6=Cl, Y_7=C
18; X_6=NH_2, Y_7=C
19; X_6=Cl, Y_7=C-Br

Shema 3. Reagensi i uvjeti: „*click*“ reakcija (*i*) Metoda A: Cu(0), 1M $CuSO_4$, DMF, *t*-BuOH : H_2O = 1 : 1, 80 ºC, US, 90 min; Metoda B: Cu(0), 1M $CuSO_4$, DMF, *t*-BuOH : H_2O = 1 : 1, MW, 300 W, 80 ºC, 90 min; Metoda C: st, $Cu(OAc)_2$, MeOH, 24 h

Tablica 3. Prikaz iskorištenja novonastalih spojeva **15** – **19**, obzirom na metodu sinteze. US - sinteza potpomognuta ultrazvučnim valovima, MW - sinteza potpomognuta mikrovalovima, ST - sinteza na sobnoj temperaturi.

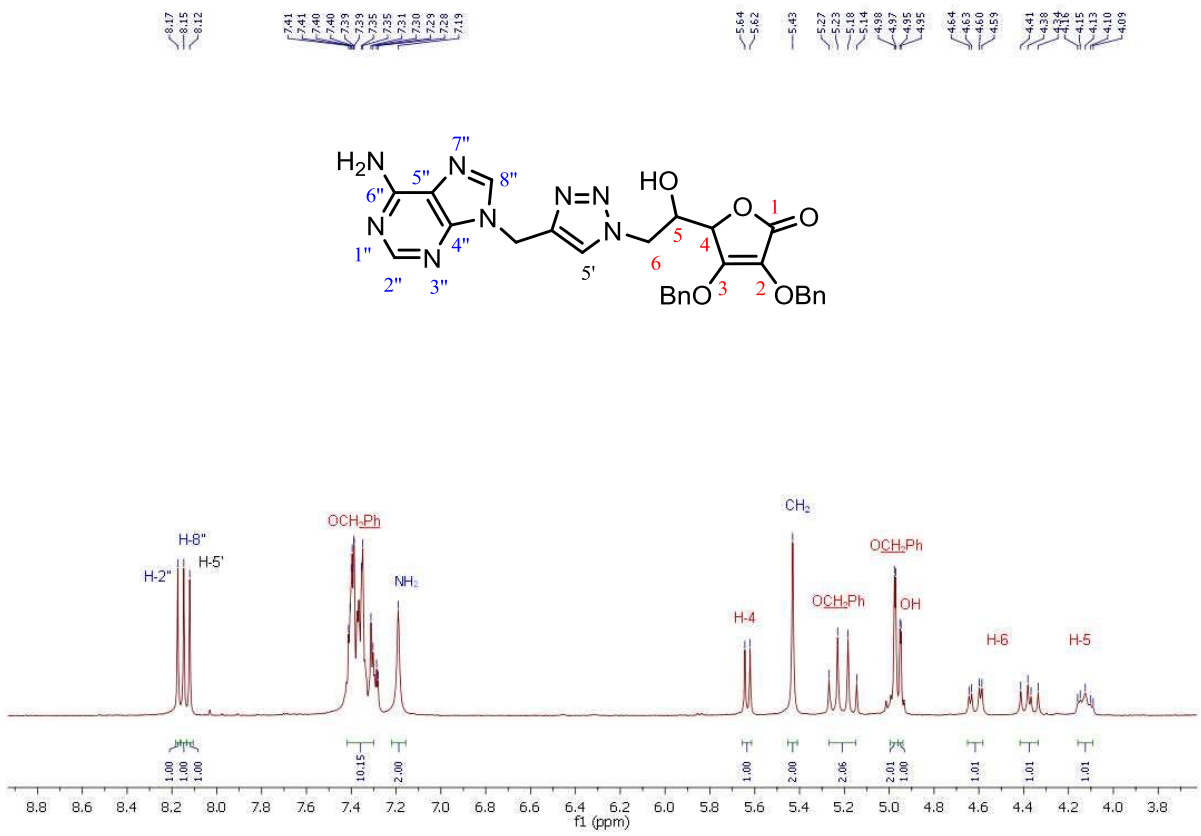


SPOJ	STRUKTURA	US/ %	MW/ %	ST/ %	Log P
15		57,13	30,28	70,67	1,96
16		86,96	41,33	50,74	0,97
17		64,43	34,18	27,49	2,73
18		56,30	84,62	74,21	1,73
19		35,67	31,70	55,54	3,55

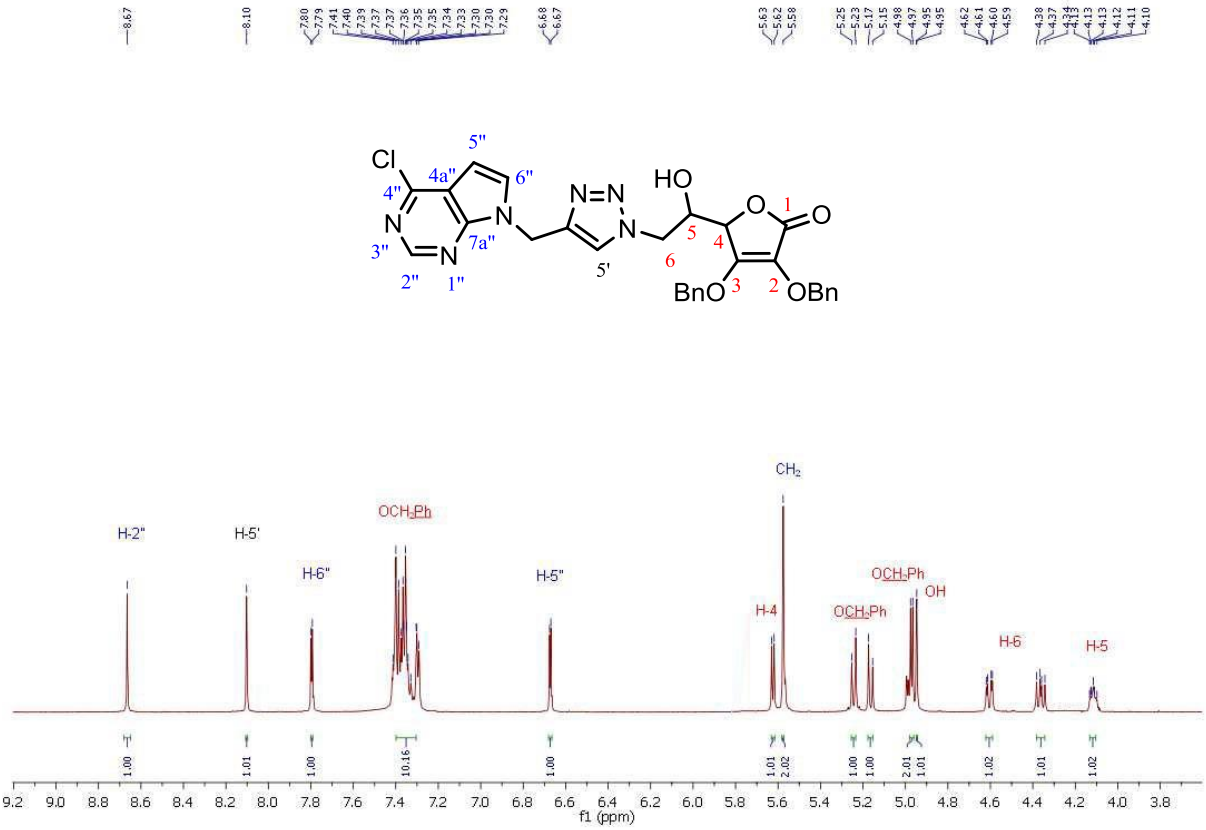
4.2. Spektroskopska karakterizacija novoprpipravljenih spojeva ^{1}H NMR, ^{13}C NMR i MS spektroskopijom

Strukture svih priređenih spojeva određene su na temelju kemijskih pomaka, veličine signala, veličine i multipliciteta rezonancija te H-H konstanti sprega. Osnovna karakteristika ^{1}H NMR spektara spojeva **15** – **19** su signali protona lakotonskog prstena L-askorbinske kiseline (H4, H5 i H6), te metilenski protoni benzilne zaštite (~ 5 ppm) kao i fenilni protoni benzilne zaštite (~ 7,4 ppm). Prisutnost triazolnog prstena potvrđeno je karakterističnim signalom protona H5' 1,2,3-triazolnog prstena (~ 8 ppm). Purinski derivati **6**, **7**, **15** i **16** u aromatskom području pokazuju karakteristične signale purinskog prstena H2" i H8" (Slika 28) (Slika 25), dok 7-deazapurinski analozi posjeduju karakteristične signale pirolopirimidinskog prstena H2" (~ 8 ppm), H5" (~ 6.6 ppm) i H6" (~ 7.7 ppm) (Slika 26).

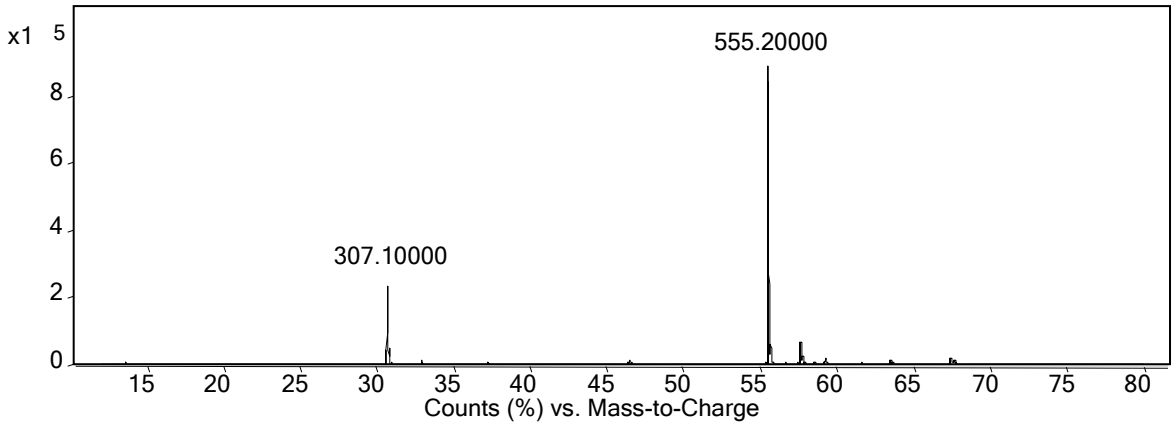
Strukture novopripravljenih spojeva su dodatno potvrđene kvalitativnom analizom masenom spektrometrijom (Slika 27).



Slika 25. ^{1}H NMR spektar spoja **16**



Slika 26. ^{1}H NMR spektar spoja **17**



Slika 27. MS spektar spoja **16**

5. ZAKLJUČAK

- U ovom radu uspješno je provedena sinteza hibrida purina, pseudopurina i L-askorbinske kiseline preko 1,2,3-triazolne premosnice (**15** – **19**).
- Sintetizirani su odgovarajući *N*-propargilni purinski izosteri (**6 – 10)** u iskorištenju od 23 % do 72 %, koji su poslužili kao dipolarofili u 1,3-dipolarnoj cikloadiciji.
- Višestupnjevitom sintezom pripravljen je 6-azidni derivat L-askorbinske kiseline (**14**), kao ključni prekursor u sintezi ciljanih hibrida.
- Regioselektivnom Huisgenovom 1,3-dipolarnom cikloadicijom 6-azido derivata L-askorbinske kiseline (**14**) i odgovarajućih terminalnih alkina purisnkih izostera (**6 – 10**) priređeni su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni hibridi (**15** – **19**) uz Cu(I) katalizator *in situ* priređen iz Cu(II) soli ($CuSO_4$ ili $Cu(OAc)_2$) i odgovarajućeg reducensa.
- Ciljani hibridi (**15** – **19**) pripravljeni su reakcijama potpomognutim ultrazvučnim i mikrovalnim zračenjem koristeći $CuSO_4$ i Cu(0) kao izvor Cu(I) iona, te klasičnom sintezom na sobnoj temperaturi koristeći $Cu(OAc)_2$ kao izvor Cu(I) iona.
- Reakcije potpomognute ultrazvučnim zračenjem pokazuju bolja iskorištenja u odnosu na reakcije potpomognute mikrovalovima.
- Novopripravljenim spojevima potvrđena je struktura primjenom ^{1}H NMR, ^{13}C NMR i MS spektroskopije.
- Novopripravljenim spojevima (**15** – **19**) ispitat će se antiproliferativno djelovanje na zloćudne tumorske stanice porijeklom iz čovjeka i antivirusno djelovanje.

6. LITERATURA

1. B. Meunier, *Accounts of Chemical Reasearch,* **41** (2008) 69 – 77.
2. G. Bérubé, *Expert Opinion on Drug Discovery,* **8**, 2013, 1029 – 1047
3. L. M. De Coen, T. S. A. Heugebeart, D. García, C. V. Stevens, *Chemical Review,* **116** (2016) 80 – 139.
4. M. Legraverend, D. S. Grierson, *Bioorganic & Medicinal Chemistry,* **14** (2006) 3987 – 4006.
5. M. J. González, J. R. Miranda – Massari, E. M. Mora, A. Guzmán, N. H. Riordan, H. D. Riordan, J. J. Caciari, J. A. Jackson, A. R. Franco, *Intergrative Cancer Therapies,* **4(1)** (2005) 32 – 45.
6. S. W. Hong, S. H. Lee, J. H. Moon, J. J. Hwang, D. E. Kim, E. Ko, H. S. Kim, I. J. Cho, J. S. Kang, D. J. Kim, J. E. Kim, J. S. Shin, D. J. Jung, Y. J. Jeong, B. J. Cho, T. W. Kim, J. S. Lee, J. S. Kang, Y. -I. Hwang, D. -Y. Noh, D. -H. Jin, W. J. Lee, *Oncogene,* **32** (2013) 1508 – 1517.
7. R. P. Tripathi, B. Singh, S. S. Bisht, J. Pandey, *Current Organic Chemistry,* **13** (2009) 99 – 122.
8. S. Rjić-Malić, A.Meščić, *Current Organic Chemistry,* **22** (2015) 1 – 38.
9. A. Barge, S. Tagliapietra, A. Binello, G. Cravotto, *Current Organic Chemistry,* **15** (2011) 189 – 203.
10. H. Rosemeyer, *Chemistry & Biodiversity,* **1** (2004) 361-401
11. E. Fischer, *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **32** (1899) 2550
12. J. A. Joule, K. Milles, Heterocyclic Chemistry, 5. iz., JohnWiley and Sons, UK, 2010, str 515.
13. S. Sharma, J. Singh, R. Ojha, H. Singh, M. Kaurm PMS Bedi, K. Napali, *European Journal of Medicinal Chemistry,* **112** (2016) 298 – 346.
14. M. Legraverend, D. S. Grierson, *Biooirganic & Medicinal Chemistry,* **14** (2006) 3987 – 4006
15. G. H. Hakimelahi, N.-W. Mei, A. A. Mosavi-Movahedi, H. Davari, S. Hakimelahi, K.-Y. King, J. R. Whu, Y.-S. Wen, *Journal of Medicinal Chemistry,* **44** (2001) 1749 – 1757.
16. T. Gazivoda, M. Plevnik, J. Plavec, S. Kraljević, M. Kralj, Krešimir Pavelić, J. Balzarini, E. De Clercq, M. Mintas, S. Raić-Malić, *Biooirganic & Medicinal Chemistry* **13** (2005) 131 – 139.
17. J. Desaphy, D. Rognan, *Journal of Chemical Information and Modeling,* **54** (2014) 1908 – 1918.

18. B. Lemrova, P. Smyslova, I. Popa, T. Ozdian, P. Zajdel, M. Soural, *ACS Combinatorial Science* **16** (2014) 558 – 565.
19. L. M. De Coen, T. S. A. Heugebaert, D. Garcia, C. V. Stevens, *Chemical Review,* **116** (2016) 80 – 139.
20. L. M. De Coen, Thomas S. A. Heugebaert, D. García, C. V. Stevens, *Chemical Review,* **116** (2016) 80 – 139.
21. S. Rajić – Malić, A. Hergold – Brundić, A. Nagl, M. Grdiša, K. Pavelić, E. De Clecq, M. Mintas, *Journal of Medinical Chemistry,* **42** (1999) 2673 – 2678.
22. M. J. González, J. R. Miranda-Massari, E. M. Mora, A. Guzmán, N. H. Riordan, H. D. Riordan, J. J. Casciari, J. A. Jackson, and A. Román-Franco, *Integrative Cancer Therapies,* **4(1)** (2005) 32 – 44.
23. Vladimir Camarena, Gaofeng Wang, *Celllural and Molecular Life Scinece.,* **73** (2016) 1645 – 1658.
24. M. Osmak, M. Eckert- Maksić, K. Pavelić, Z.B. Makslć, R. Spaventi, *Research in Experimental Medicine,* **190** (1990) 443 – 449.
25. Rama Pati Tripathi, Biswajit Singh, Surendra Singh Bisht, Jyoti Pandey, *Current Organic Chemistry,* **13** (2009) 99 – 122.
26. J. Cinatl, B. Weber, H. Rabenau, H. O. Gumbel, J. F. Chenot, M. Scholz, A. Encke, H. W. Doerr, *Antiviral Research,* **27** (1995) 405 – 418.
27. M. Grdiša, M. Kralj, M. Eckert-Maksić, Z. B. Maksić, K. Pavelić, *Journal of Cncer Research and Clinical Oncology,,* **121** (1995) 98 – 102.
28. B. Witenberg, H. H. Kalir, Z. Raviv, Y. Kletter, V. Kravtsov, Fabian, *Biochemical Pharmacology,*.**57** (1999) 823 – 832.
29. M. Kralj, B. Kojić -Prodić, Z. Banić, M. Grdiša, V. Vela, B. Šušković, K. Pavelić, *European Journal of Medicinal Chemistry,* **31** (1996) 23 – 35.
30. J. Gilloteaux, J. M. Jamison, M. Venugopal, D. Giammar, J. L. Summers, *Scanning Microscopy,* **9** (1995) 159 – 173.
31. S. Raić – Malić, A. Hergold- Brundić, A. Nagl, M. Gradiša, K. Pavelić, E. De Clercq, M. Mintas, *Journal of Medicinal Chemistry,* **42** (1999) 2673 – 2678.
32. S. Raić – Malić, D. Svedružić, T. Gazivoda, A. Marunović, A. Hergold- Brundić, A. Nagl, J. Balzarski, E. De Clercq, M. Mintas, *Journal of Medicinal Chemistry,* **43** (2000) 4806 – 4811.
33. M. Jashes, G. Mlynarz, E De Clercq, A. M. Sandino, *Antiviral Research,* **45** (2000) 9
34. W. B. Parker, *Virus Research,* **107** (2005) 165

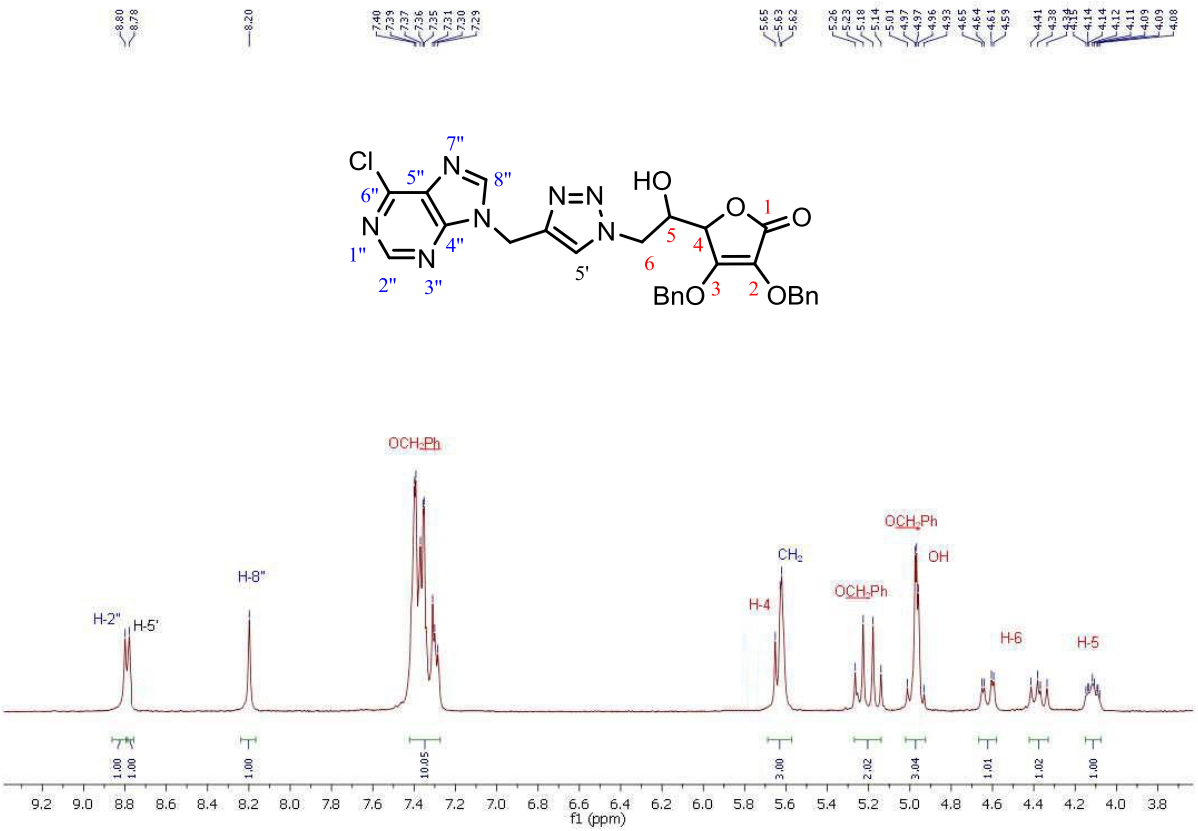
35. C. H. Zhou, Y.Wang, *Current Medical Chemistry*, **19** (2012) 239 – 280.
36. R. Kumar, M. Shahar Yar, S. Chaturvedi, A. Srivastava, *Interational Journal of PharmTech Research*, **4** (2013) 1844 – 1869.
37. S. G. Agalave, S. R. Maujan and V. S. Pore, *Chemistry Asian Journal*, **6** (2011) 2696 – 2718.
38. S. Haider, M. Sarwar Alam, H. Hmid, *Inflammation & Cell Signaling*, **1** (2011) 95.
39. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. Berry Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition*, **41** (2002) 14.
40. M. I. Garcia-Moreno, D. Rodriguez-Lucena, C. O. Mellet, J. M. G. Fernandez, *Organic Chemistry*, **126** (2004) 15366 – 15367.
41. Y. Bourne, H. C. Kolb, Z. Radic, K. B. Sharpless, P. Taylor, P. Marchot, *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, **101** (2004) 1449 – 1454.
42. M. Whiting, J. Muldoon, Y. C. Lin, S. M. Silverman, W. Lindstron, A. J. Olson, *Angewandete Chemie International Edition*, **45** (2006) 1435 – 1439.
43. C.P. Kaushik, K. Kumar, K. Lal, B. Narasimhan, A. Kumar, *Springer – Verlag Wien*, 2015
44. H.C. Kollo, K.B. Sharpless, *Drug Discovovery Today*, **8** (2003) 1128 – 1137.
45. K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, P.M.S. Bedi, K.L. Dhar, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **77** (2014) 422 – 487.
46. S. Raić – Malić, A. Meščić, *Current Medical Chemistry*, 2015, **22**, 1
47. M. T. Reetz, J. Rudolph, R. Goddard, *Canadian Journal Chemistry*, **79** (2001) 1806
48. C.W. Tornoe, C. Christensen, M. Meldal, *Journal of Organic Chemistry.*, 2002, **67**, 3057 – 3064.
49. J. F. Lutz, *Angewandete Chemie International Edition*, **46** (2007) 1018 – 1025.
50. R.J. Pieters, D.T.S. Rijkers, *QSAR &Combinatorial Science*, **26** (2007) 1181 – 1190.
51. A. Nuzzi, A. Massi, A. Dondoni, *QSAR & Combinatorial Science*, **26** (2007) 1191 – 1199.
52. J. Gierlich,G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Organic Letters*, **8** (2006) 3639 – 3642.
53. G. C. Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Medicinal Research Review*, **28** (2008) 278 – 308.
54. J. L. Yu, Q. P. Wu, Q. S. Zhang, Y. H. Liu, Y. Z. Li, Z. M. Zhou, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20(1)** (2010) 240 – 243.

55. D. G. Piotrowska, J. Balzarini, I. E. Głowacka, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **47** (2012) 501 – 509.
56. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. Barry Sharpless, *Angewandete Chemie International Edition*, **40** (2001) 2004 – 2021.
57. H. C. Kolb and K. Barry Sharpless, *Drug Discovery Today*, **8** (2003) 1128 – 1137.
58. C. D. Hein, X. M. Liu, D. Wang, *Pharmaceutical Reasearch*, **25** (2008) 2216 – 2230.
59. J. A. Joule, K. Mills, Heterocyclic chemistry, 5. iz, A John Wiley & Sons, Ltd. Publication, UK, 2010, str. 112
60. R. Huisgen, *Angewandete Chemie International Edition. Vol 2.*, 1963, **10**, 565 – 598.
61. Y. Nomura, Y. Takeuchi, S.Tomoda and M. M. Ito, *Bulletin of the Chemical Society of Japan.*, **54** (1981) 261
62. G. Cesare Tron, T. Pirali, R. A. Billington, P. L. Canonico, G. Sorba, A. A. Genazzani, *Medicinal Reasearch Review*, **28** (2008) 278 – 308.
63. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Folkin, K. B. Sharpless, *Angewandete Chemie International Edition*, **41** (2002) 2596 – 2599.
64. F. Ambrald, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chemical Review*, **109(9)** (2009) 4207 – 4220.
65. J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chemical Society Review*, **39** (2012) 1302 – 1315.
66. C. Viegas- Junior, A. Danuello, B. V. Da Silva, E. J. Barreiro, C. A. Fraga, *Current Medicinal Chemistry*, **14** (2007) 1829 – 1852.
67. Gervais Bérubé, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **11** (2016) 665 – 680.
68. K. Nepali, S. Sharma, M. Sharma, P.M.S. Bedi, K.L. Dhar, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **77** (2014) 422 – 487.
69. C. Biot, K. Chibale, *Angewandte Chemie International*, **42** (2003) 3996 – 4028.
70. J.M. Contelles, E. Soriano, *Current Topics In Medicinal Chemistry*, **11** (2011) 2714 – 2715.
71. P. Singh, P. Sharma, A. Anand, P.M.S. Bedi, T. Kaur, A.K. Saxen, V. Kumar, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **55** (2012) 455 – 464.
72. https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry, pogledano dana 10. 06. 2017.
73. R. B. Nasir Baig, Rajender S.Varma, *Chemical Society Review*, **41** (2012) 1559 – 1584.
74. L. Perreux, A. Loupy, *Tetrahedron*, **57** (2001) 9199 – 9223.
75. A. Bruckmann, A Krebs, C. Bolm, *Green Chemistry*, **10** (2008) 1131 – 1141.

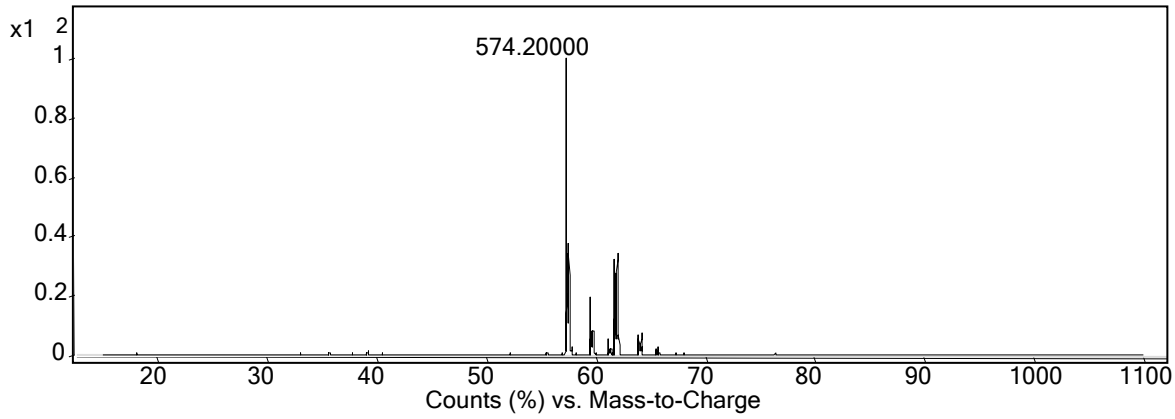
76. (a) V Polshettiwar i R. S. Varma, *Accounts of Chemical Research.*, **41** (2008) 629; (b) D. Dallinger i C.O. Kappe, *Chemical Review*, **107** (2007) 2563 – 2591; (c) V. Polshettiwar i R.S. Varma, *Chemical Society Review*, **37** (2008) 1546; (d) V. Polshettiwar i R. S. Varma, *Green Chemistry*, **12** (2010) 743 – 754.
77. I. Zrinski, M. Eckert-Maksić, *Kemija u industriji*, **54** (2005) 469 – 476.
78. (a) F. Von Dallacker and J. Sanders, *Chemker Zeitung.*, **109** (1985) 197 – 202; (b) T. Gazivoda, K. Wittine, I. Lovrić, D. Makuc, J. Plavec, M. Cetina, D. Mrvoš-Sermek, L. Šuman, M. Kralj, K. Pavelić, M. Mintas and S. Raić-Malić, *Carbohydrate Research*., **4** (2006) 433–442

7. PRILOZI

a)

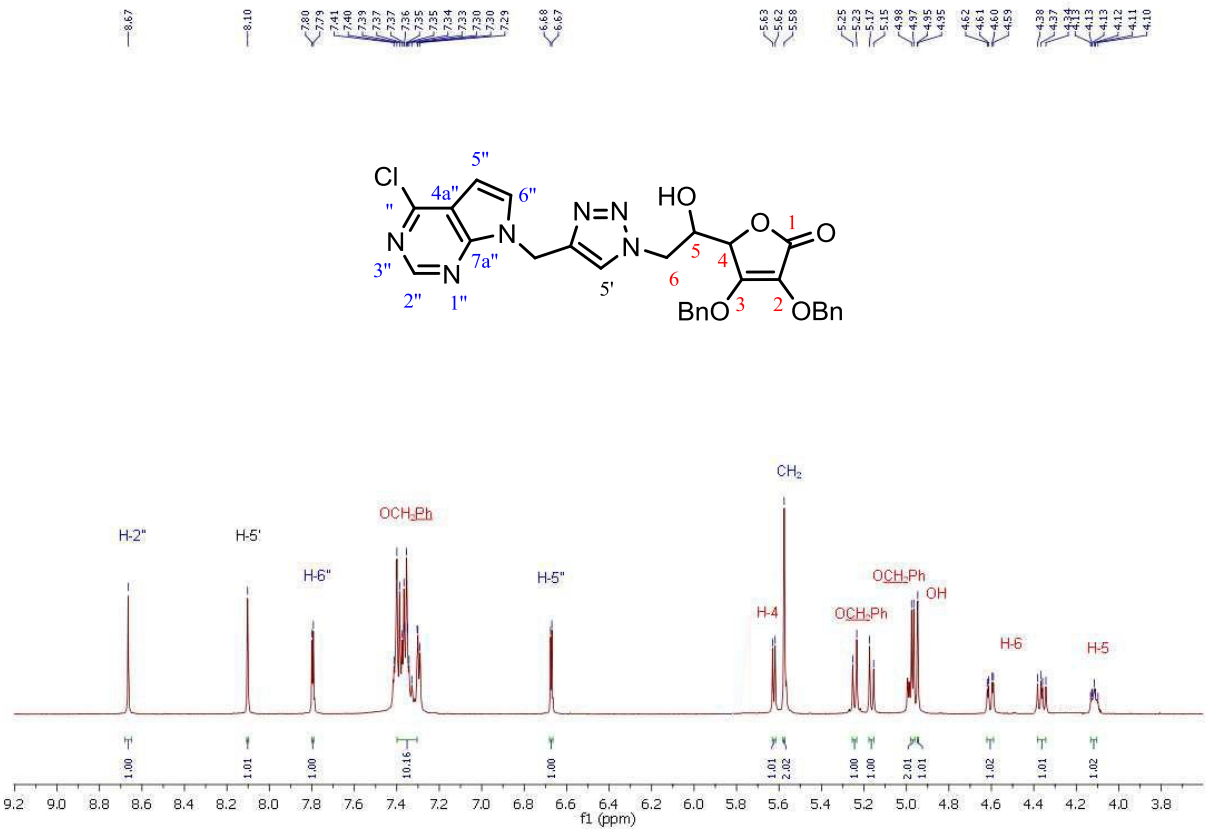


b)

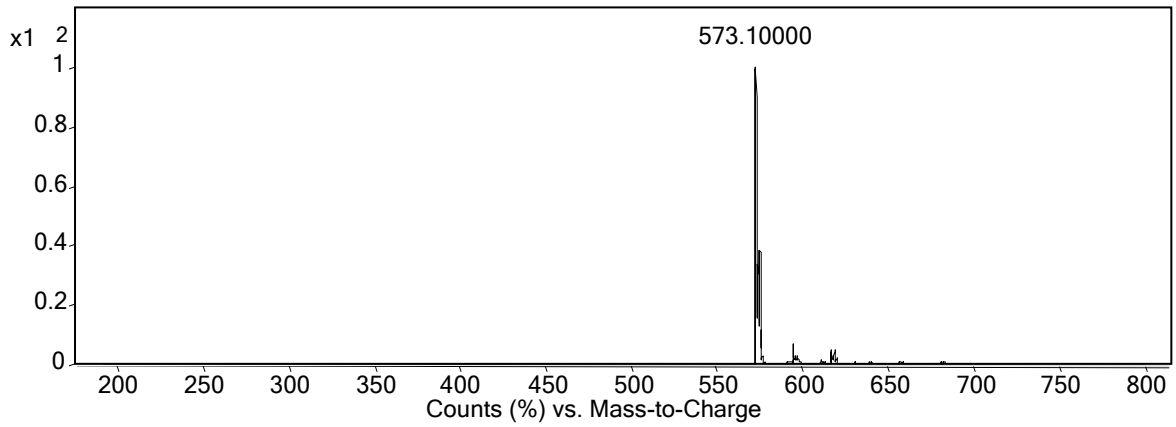


Slika 28. ^{1}H NMR (a) i MS (b) spektar spoja **15**.

a)

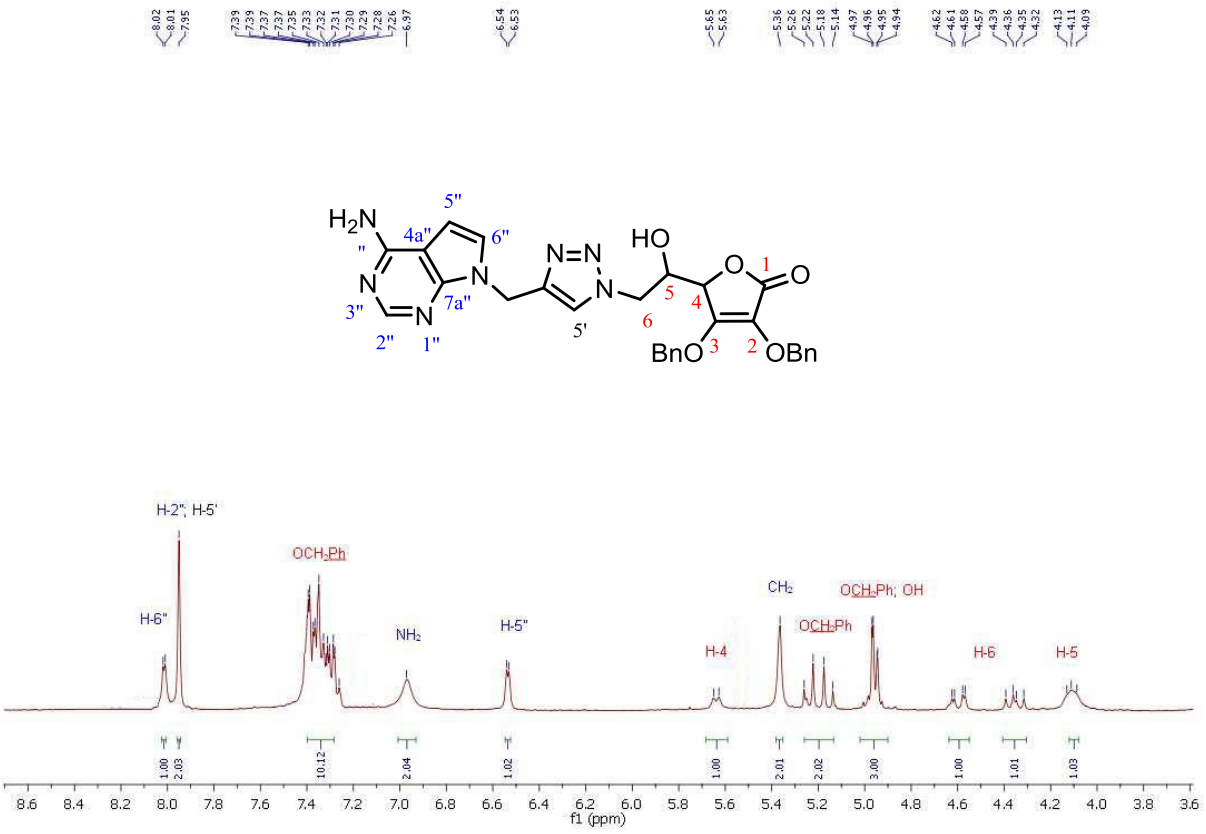


b)

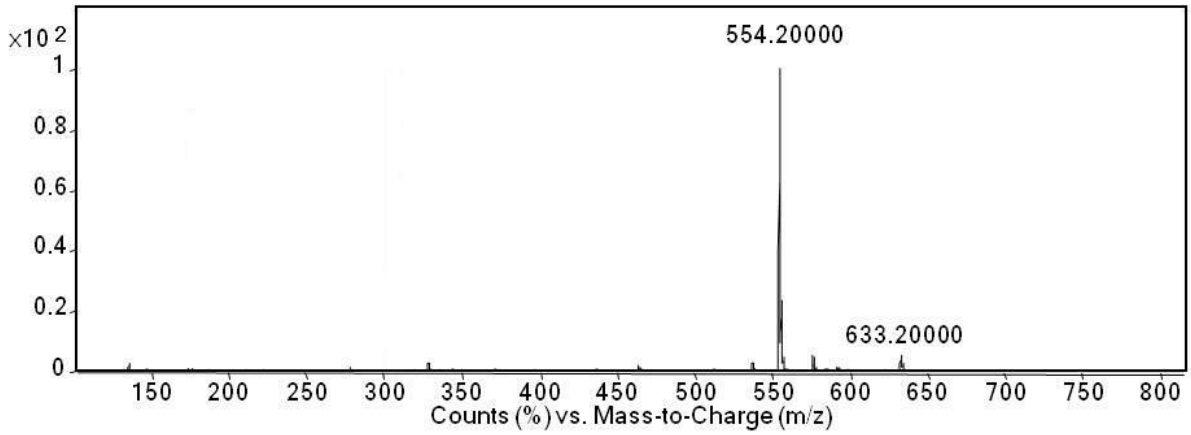


Slika 29. ^{1}H NMR (a) i MS (b) spektar spoja **17.**

a)

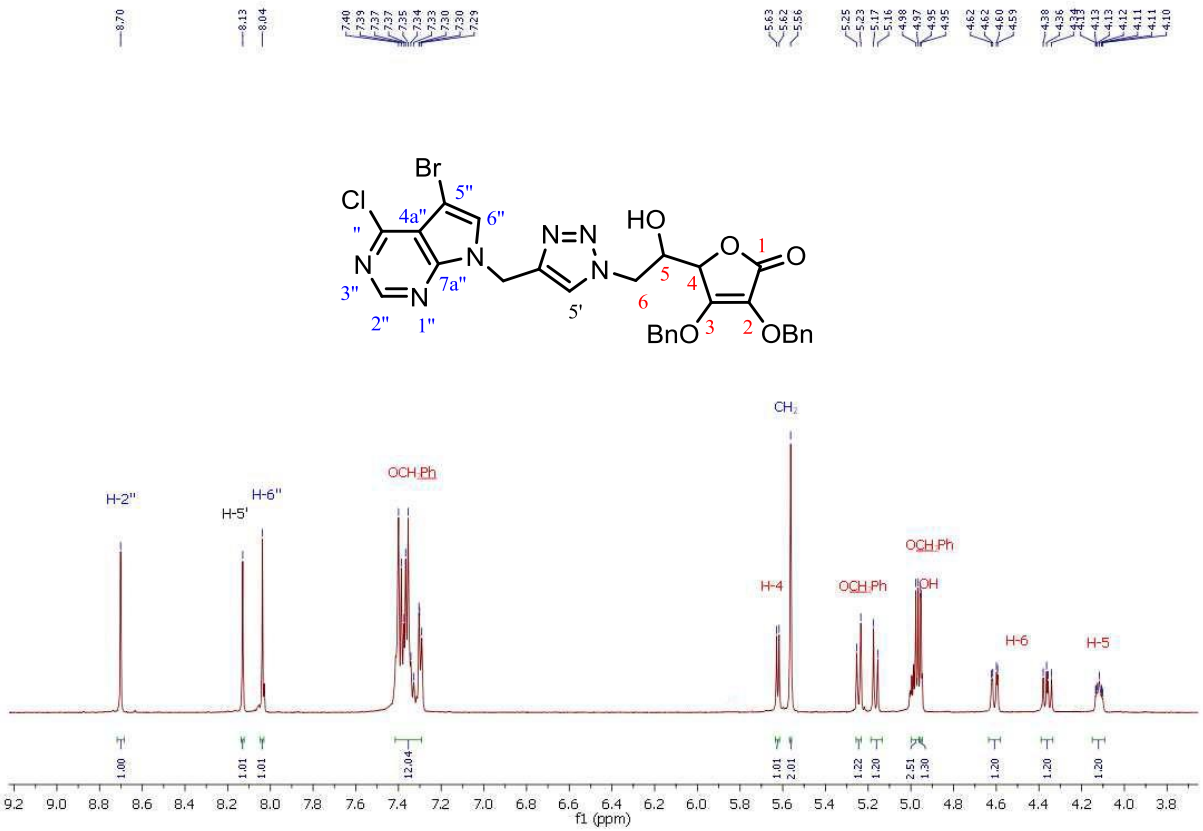


b)

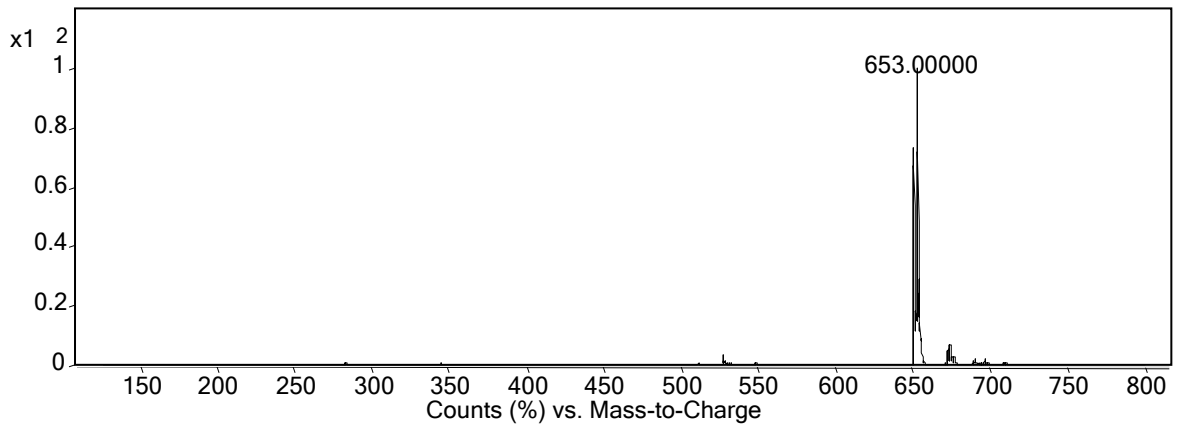


Slika 30. ^{1}H NMR (a) i MS (b) spektar spoja **18.**

a)



b)



Slika 31. ^{1}H NMR (a) i MS (b) spektar spoja **19.**

ŽIVOTOPIS

Helena Prpić [redacted] Od 2002. do 2010. pohađala je O. Š. Silvija Strahimira Kranjčevića u Senju. Od 2010. do 2014. pohađala je gimnazijski program S. Š. Paval Rittera Vitezovića u Senju te je maturirala kao učenica generacije. U razdoblju od 2003. do 2009. pohađala je Glazbenu školu Vjenceslava Novaka u Senju, te je u razdoblju od 2010. do 2013. pohađala Govorničku školu 'Ivo Škarić'. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2014. godine. Stručnu praksu odradila je u Plivi.