Interakcije metalnih iona s konjugatima ciklamskih derivata citozina praćene spektrometrijom masa

Ključarić, Valentina

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:491708

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-
MATEMATIČKI FAKULTET

Valentina Ključarić

INTERAKCIJE METALNIH IONA S KONJUGATIMA CIKLAMSKIH DERIVATA CITOZINA PRAĆENE SPEKTROMETRIJOM MASA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Valentina Ključarić

METAL ION INTERACTIONS WITH CYCLAM DERIVATIVES OF CYTOSINE INVESTIGATED BY MASS SPECTROMETRY

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Valentina Ključarić

INTERAKCIJE METALNIH IONA S KONJUGATIMA CIKLAMSKIH DERIVATA CITOZINA PRAĆENE SPEKTROMETRIJOM MASA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Biserka Žinić
Dr. sc. Renata Kobetić

Zagreb, 2016.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Valentina Ključarić

METAL ION INTERACTIONS WITH CYCLAM DERIVATIVES OF CYTOSINE INVESTIGATED BY MASS SPECTROMETRY

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Dr. Biserka Žinić Prof.
Dr. Renata Kobetić

Zagreb, 2016.

Prvenstveno zahvaljujem svojim mentoricama, dr.sc. Biserki Žinić i dr.sc. Renati Kobetić na podršci i pomoći tijekom izrade ovog rada, na izuzetnoj pozitivnoj energiji kojom su me usmjeravale kroz čitavo vrijeme. Entuzijastičnim stavom i originalnim idejama, nesebično su u meni razvijale i poticale istraživački zanos tijekom istraživačkog rada i na tome im od srca zahvaljujem.

Zahvaljujem se članovima povjerenstva, Izv. prof. dr. sc. Ines Primožič, Izv. prof. dr. sc. Sandi Rončevi i, Izv. prof. dr. sc. Vesni-Petrović-Perokovićna na pomoći kod pisanja i oblikovanja ovog rada. Svojim savjetima i sugestijama učinili su ovaj rad još kvalitetnijim. Na pomoći i podršci također zahvaljujem i dr.sc. Sreću Kirinu.

Neizmjerno hvala dr.sc. Snježani Kazazić i dipl. ing. Lidiji Brkljačić na brojnim snimanjima MS spektara, kao i na konstruktivnim savjetima u svrhu dobivanja što boljih rezultata.

Zahvaljujem svim članovima Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, a posebno Dijani, Željki, Josipi, Tamari i Davorki na svesrdnoj pomoći, podršci i poticajnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Zahvaljujem se i svojim kolegama s Hrvatskog vojnog učilišta „Petar Zrinski“, a posebno djelatnicima NBK laboratorija na pomoći, podršci i razumijevanju.

Posebno i najviše zahvaljujem mojoj obitelji, suprugu, djeci i ocu, na neizmjernoj podršci i pomoći u svakom trenutku. Vi ste mi, sve ovo vrijeme, bili najveći oslonac i izvor snage i na tome vam veliko HVALA.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XIV**

ABSTRACT ..... **XV**

§ 1. UVOD **1**

§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**

2.1.Općenito o nukleotidima, nukleozidima i nukleobazama 5

2.1.1. Interakcija nukleobaza s metalnim ionima 7

2.1.1.1.Modeli vezanja metala 8

2.1.1.1.1. Vezanje metala na fosfatnu skupinu 9

2.1.1.1.2. Vezanje metala na šećer 9

2.1.1.1.3. Vezanje metala na nukleobaze 10

2.1.1.1.4. Vezanje metala na citozin 10

2.1.2. *N*-sulfonilpirimidinski derivati 13

2.2. Makrociklički poliamini 16

2.2.1. Sinteze makrocikličkih poliamina 19

2.3.Općenito o spektrometriji masa 26

2.3.1. Spektrometrija masa (MS) 26

2.3.1.1. Spektrometrije masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS) 28

2.3.1.1.1. Metoda ESI-MS za proučavanje slabih nekovalentnih veza 31

2.3.1.1.2. Primjena metode ESI-MS za studije organometalnih kompleksa 32

2.3.1.1.3. Stvaranje plinske faze metalnih kompleksa pomoću elektroraspršenja 33

2.3.1.1.4. Primjena na sisteme metal–ligand 34

2.3.1 2. Usporedba ESI-MS i tradicionalnih tehnika za proučavanje nekovalentnih interakcija 35

2.3.1.2.1. Kvalitativna usporedba 35

2.3.1.2.2. Kvantitativna usporedba 35

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **38**

3.1. Sinteza 38

3.1.1. Materijali i metode 38

3.1.2. Priprava spojeva 39

3.1.2.1. *1-(*p-*Toluensulfonil)citozin (**2**)* 39

3.1.2.2. *1-Metansulfonilcitozin (**3**) i 4-*N*-metansulfonilcitozin (**4**)*……39
3.1.2.3.[*Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$](**5**)*……40
3.1.2.4. [*Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$](**6**)*……40
3.1.2.5. *1,4,8-Tris(trifluoracetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan (**8**) (tTFA-ciklam **8**)*……41
3.1.2.6. *Ciklam-TsC konjugat (**9**)* ……42
3.1.2.7. t*TFA-ciklam-TsC konjugat (**10**)* ……43
3.2. Spektroskopski dio……44
3.2.1. Polazni materijali i metode……44
3.2.1.1 Kemikalije……44
3.2.1.2. Mjerni instrumenti……44
3.2.2. Postupci priprave uzoraka……46
3.2.3.Razvoj metode ESI MS i odabir otapala……47
3.2.3.1. Razvoj metode ESI MS……47
3.2.3.2. Odabir otapala……49
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA……**51**
4.1. Sinteza spojeva……52
4.2. ESI-MS karakterizacija spojeva……58
4.2.1 Karakterizacija liganada (**2** i **3**)……58
4.2.1.1. Karakterizacija liganda 1-(*p*-toluensulfonil)citozin (**2**)……59
4.2.1.1.1. Karakterizacija liganda 1-(*p*-toluensulfonil)citozin (**2**) u pozitivnom načinu rada……59
4.2.1.1.2. Karakterizacija liganda 1-(*p*-toluensulfonil)citozin (**2**) u negativnom načinu rada……61
4.2.1.2. Karakterizacija liganda 1-metansulfonilcitozin (**3**)……64
4.2.1.2.1. Karakterizacija liganda 1-metansulfonilcitozin (**3**) u pozitivnom načinu rada……64
4.2.1.2.2. Karakterizacija liganda 1-metansulfonilcitozin (**3**) u negativnom načinu rada……66
4.2.2 Karakterizacija Cu(II) kompleksa (**5** i **6**)……68
4.2.2.1. Karakterizacija kompleksa [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**)……68
4.2.2.2. Karakterizacija kompleksa [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**6**)……70
4.2.3. Karakterizacija ciklama (**7**)……73
4.2.3.1. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 200,9……74

4.2.3.2. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 437,2…….....75
4.2.3.3. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 459,3…….....75
4.2.3.4. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 481,1…….....76
4.2.4. Karakterizacija tTFA-ciklama (**8**)……...77
4.2.4.1. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 488,2…….....78
4.2.4.2. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 510,1…….....80
4.2.5. Karakterizacija konjugata Ciklam-TsC-konjugat (**9**)……..…81
4.2.5.1. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 476,0…….....82
4.2.5.2. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 839,0…….....85
4.2.6. Karakterizacija konjugata (tTFA-ciklam-TsC ligand) (**10**)……85
4.2.6.1. Određivanje fragmentacijskih putova iona *m/z* 766,2…….....87
4.3. Interakcije liganada (2, 3), kompleksa (5, 6), ciklama i TFA ciklama (7, 8) i konjugata (9, 10) s ionima metala…….....89
4.3.1. Interakcija liganada (**2** i **3**) i kompleksa (**5** i **6**) s ionima metala…….89
4.3.1.1. Interakcija liganada (**2** i **3**) i kompleksa (**5** i **6**) s ionima Na^+i K^+……....90
4.3.1.2 Interakcija liganada (**2** i **3**) i kompleksa (**5** i **6**) s ionima Ca^{2+} i Mg^{2+}……....90
4.3.1.2.1. Interakcija liganada (**2** i **3**) i kompleksa (**5 i 6)** s ionima Ca^{2+}.....91
4.3.1.2.2. Interakcija liganada (**2 i 3)** i kompleksa (**5** i **6**) s ionima Mg^{2+}.....97
4.3.1.3. Interakcija liganada (**2** i **3**) i kompleksa (**5** i **6**) sa ionima Zn^{2+} ……100
4.3.1.4 Interakcija Ciklama i tTFA-ciklama (**8**) sa ionima Cu^{2+} i Zn^{2+}…….....103
4.3.2. Interakcija otopina ciklama : $CuCl_2$: TsC 2……....104
4.3.2.1. Odnos ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** =1:1:1 i odnos ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** = 1:2:1.....105
4.3.3.Interakcija konjugata 9 i 10 s Cu^{2+} i Zn^{2+}…….....107
4.3.3.1. Interakcija konjugata Ciklam-TsC (**9**) s Cu^{2+} i Zn^{2+}……..107
4.3.3.2. Interakcija konjugata Ciklam-TsC (**9**) s Cu^{2+}……107
4.3.3.3. Interakcija konjugata Ciklam-TsC (**9**) s Zn^{2+}……109
4.3.3.4. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsCs (**10**) s Cu^{2+} i Zn^{2+}……112
4.3.3.5. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsCs (**10**) s Cu^{2+}……112
4.3.3.6. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsCs (**10**) s Zn^{2+}……115

§ 5. ZAKLJUČAK 116
§ 6. LITERATURNI IZVOR I19

§ 7. DODATAK XVI
§ 8. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ XXXV
§ 9. ŽIVOTOPIS XXXVIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

Interakcije metalnih iona s konjugatima ciklamskih derivata citozina praćene spektrometrijom masa

VALENTINA KLJUČARIĆ
Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

U ovom doktorskom radu sintetizirani su Cu(II) molekulski kompleksi [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] i [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] biološki aktivnih *N*-sulfonilcitozinskih (C) liganada s tosilom (Ts) i mezilom (Ms) te novi ciklam-TsC konjugati. Mannichova reakcija TsC liganda, paraformaldehida i ciklama u prisutnosti octene kiseline daje C-aminometilirani konjugat u kojem je ciklam vezan preko metilenskog mosta na C5 položaj citozina. Ista reakcija sa zaštićenim ciklamom daje C4 aminometilirani produkt. Pomoću ESI-MS metode provedena je studija stabilnosti i utjecaja biološki važnih metalnih iona (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) na ligande, Cu(II) komplekse, te na poliaza makrocikličke konjugate. U interakciji s ligandima i Cu(II) kompleksima alkalijski metali uslijed elektrostatskih interakcija stvaraju klastere, dok je nastanak bis i tris te miješanih kompleksa uočen u interakciji s Ca^{2+} i Mg^{2+}. Interakcija Zn^{2+} s ligandima i Cu(II) kompleksima rezultira nastankom monometalnih kompleksa kao i dimetalnih kompleksa zbog afiniteta Zn^{2+} prema atomima kisika i dušika koji u strukturu uključuju molekule vode. Novi poliaza makrociklički konjugati u interakciji s $CuCl_2$ stvaraju molekulske komplekse u kojima je $CuCl_2$ u ciklamskom prstenu, a u interakciji s $ZnSO_4$ nastaju ionski kompleksi u kojima je Zn^{2+} smješten u ciklamskom prstenu.

(131 stranica, 68 slika, 16 shema, 3 tablice, 230 literaturna izvora, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici PMF-a, Horvatovac 102A, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Ulica hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: *N*-sulfonilcitozinski derivati, Cu(II) kompleksi; ciklam, metalni ioni Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}; ESI-MS

Mentor: Dr.sc. Biserka Žinić, zn.savj., IRB i naslovni profesor na Sveučilištu u Rijeci
Dr.sc. Renata Kobetić, zn.sur., IRB

Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Ines Primožič, PMF, Zagreb
dr. sc. Biserka Žinić, zn. savj., IRB, Zagreb
dr.sc. Renata Kobetić, zn. sur., IRB, Zagreb
Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević, PMF, Zagreb
Izv. prof. dr. sc. Vesna-Petrović-Peroković, PMF, Zagreb
Zamjena:....dr.sc. Srećko Kirin, zn. sur., IRB, Zagreb

Rad prihvaćen: 7. rujna 2016.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

Metal ions interactions with cyclam derivatives of cytosine investigated by mass spectrometry

VALENTINA KLJUČARIĆ
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

In this doctoral thesis, Cu (II) molecular complexes [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] and [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] of biologically active *N*-sulfonylcytosine ligands (C) with tosyl (Ts) and mesyl (Ms) and new cyclame-TsC conjugates were synthesized. The Mannich reaction of TsC, paraformaldehyde and cyclame in the presence of acetic acid yields C-aminomethylated konjugate in which the cyclame was introduced through a methylene bridge at C5 position of cytosine. The same reaction with protected cyclame gives C4 aminomethylated product. Using ESI-MS method was conducted stability studies and the influence of biologically important metal ions (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}) to ligands, Cu (II) complexes, and polyaza macrocyclic conjugates. The interaction of ligands and Cu (II) complexes with biologically important metal ions results with formation of various metal complex. Alkali metals Na^+ and K^+ formed clusters due to the electrostatic inetractions. Bis, tris and mixed ligand complexes were observed upon mixing with Ca^{2+} or Mg^{2+} salt. Interaction with Zn^{2+} sieed monometal Zn^{2+} complexes and mixed ligand dimetal complexes that includ water molecules in the structures of the complexes because of affinity of Zn^{2+} for both O and N atoms. Both ions Cu^{2+} and Zn^{2+} were located within the cyclamic ring upon their interaction with polyaza macrocyclic conjugates**.** Newly formed Cu^{2+}complexes were molecular while the ionic complexes were formed with zinc ions.

(131 pages, 68 figures, 16 shemes, 3 tables, 230 references, original in Croatian)

Thesis is deposit in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Ulica hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: *N*-sulfonilcytosine derivatives, Cu(II) complexes, cyclam, Metal ions Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}; ESI-MS

Supervisior: Dr. Biserka Žinić, IRB, scientific adviser and honorary professor-University of Rijeka
Dr. Renata Kobetić, IRB, research associate

Reviewers: Dr. Ines Primožič, PMF, associate professor
Dr. Biserka Žinić, IRB, scientific adviser
Dr. Renata Kobetić, IRB, research associate
Dr. Sanda Rončević, PMF, associate professor
Dr. Vesna Petrović-Peroković, PMF, associate professor
Substitute: Dr. Srećko Kirin, IRB, research associate

Thesis is accepted: September 07$^{th,\ 2016.}$

§ 1. UVOD

§.1. UVOD

Na Institutu Ruđer Bošković dizajniran je i sintetiziran veliki broj novih biološki aktivnih spojeva, derivata nukleobaza i nukleozida koji sadrže sulfonamidni farmakofor.[1-8] Najznačajniji rezultati dobiveni su sa serijom *N*-1-sulfonilpirimidinskih derivata koji su pokazali jaku inhibicijsku aktivnost prema tumorskim staničnim linijama u *in vitro* i *in vivo* uvjetima, a napravljena su i dodatna ispitivanja mehanizma djelovanja spojeva kao i toksikološka ispitivanja.[9-15] Poznato je da metalni kompleksi biološki aktivnih spojeva često pokazuju veću aktivnost od matičnog liganda. Kao glavni konstituenti nukelinskih kiselina, heterocikličke nukleobaze su odavno uočene kao potencijalni ambidentatni ligandi za koordinaciju niza različitih metala.[16] Nukleobaze nude čitav spektar potencijalnih koordinacijskih centara i to na imino, amino, amido, okso ili hidroksilnoj skupini. Potaknuti brojnim izvješćima o antitumorskom djelovanju metalnih kompleksa, proučavali smo kompleksiranje biološki aktivnih *N*-sulfonilpirimidinskih spojeva s paladijem i prijelaznim metalima. Pronašli smo da *N*-sulfonilcitozinski derivat s prijelaznim metalima Cu(II), Cd(II), Co(II) stvara mononuklearne komplekse,[17] dok se u slučaju Pd(II) mononuklearni kompleks pregrađuje u različite binuklearne komplekse ovisno o otapalu. U njima ligand postoji u manje zastupljenom imino-okso tautomernom obliku.[18] Proučavana su i svojstva Pd-kompleksa spektrometrijom masa gdje je također dokazana pregradnja mononuklearnog kompleksa u dinuklearne ovisno o primijenjenom otapalu.[19]

Kako bi bolje razumjeli rezultate *in vitro* pokusa *N*-sulfonilcitozinskih liganda i njihovih kompleksa[20] odlučili smo pomoću metode spektrometrije masa s ionizacijom elektroraspršenjem (eng. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry, ESI-MS) napraviti studije utjecaja biološki važnih metalnih iona (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} koji su sastavni dio hranjivih medija na/u kojima rastu tumorske stanice) na ligande i komplekse.

Stoga su u ovom doktorskom radu opisane sinteze liganada 1-tosilcitozin (TsC)[10,12] 1-mesilcitozin (MsC),[10,] Cu(II) molekulskih kompleksa *N*-sulfonilcitozinskih liganda [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] i [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$], te novi poliaza makrocikličkih konjugata s *N*-sulfonilcitozinskim ligandom.

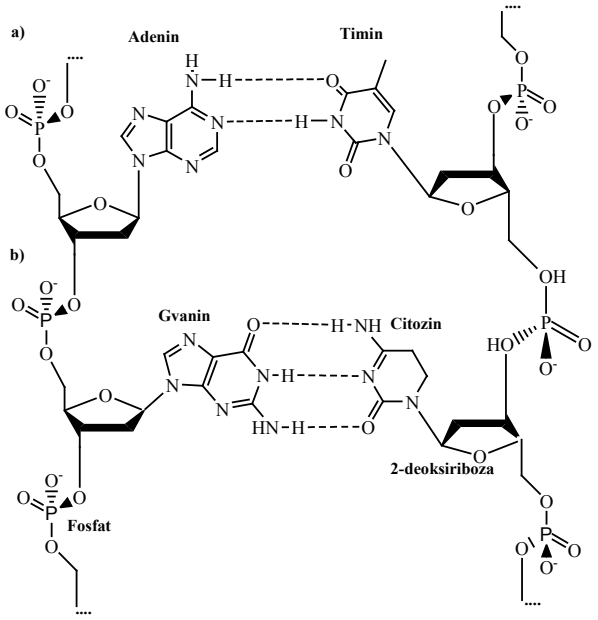
ESI-MS istraživanja provedena su u pozitivnom i negativnom modu. Određene su strukture kompleksa, stabilnost, te glavni putovi nastajanja pojedinih specija. Provedena su detaljnija ispitivanja stabilnosti liganda i selektivnosti vezivanja metalnih kationa u ovisnosti o vremenu i odnosu koncentracija liganda i soli.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Općenito o nukleotidima, nukleozidima i nukleobazama

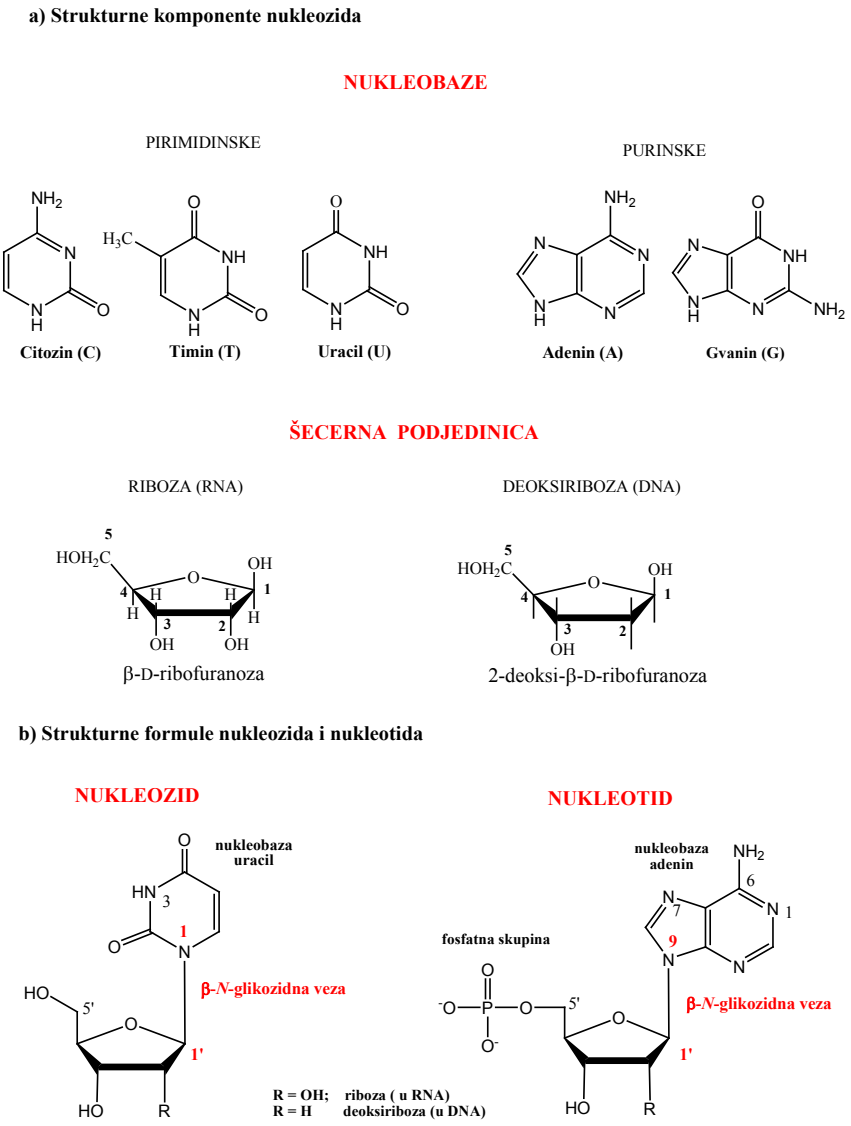
Nukleotodi, nukleozidi i nukleobaze predstavljaju građevne jedinice DNK/RNK i stoga su često predmet znanstvenih istraživanja. U izgradnji molekule DNK sudjeluju nukleobaze adenin (A) i gvanin (G) kao purinske baze, te citozin (C) i timin (T) kao pirimidinske baze. Molekulu RNK isto izgrađuju adenin, gvanin i citozin, a pirimidinska baza timin zamijenjena je uracilom (U). Unutar lanaca nukleinskih kiselina baze su međusobno povezane vodikovim vezama po principu komplementarnosti. Kod DNK komplementarne baze su A i T, te C i G, a kod RNA komplementarne baze su A i U, te C i G. Stabilniji par baza je komplementarni par C i G *(Slika 1b)*, gdje su nukleobaze gvanin i citozin povezane preko tri vodikove veze (G≡C), dok su baze adenin i timin *(Slika 1a)* ili adenin i uracil kod RNK povezane preko dvije vodikove veze (A=T/U).



Slika 1. Prikaz sparivanja komplementarnih baza kod DNK: a) A i T, b) G i C.

Nukleotidi su fosfatni esteri nukleozida, koji se sastoje od purinske ili pirimidinske baze i od šećerne podjedinice, koja je kod RNK riboza (β-D-ribofuranoza), a u molekuli DNK 2-deoksiriboza (2′-deoksi-β-D-ribofuranoza) *(Slika 2a,b)*. Veza između šećerne podjedinice i

nukleobaze jest β-*N*-glikozidna veza između anomernog C-atoma šećera (C1´) i N9 atoma imidazolnog prstena purinske baze, odnosno N1 atoma pirimidinske baze *(Slika 2b)*.



Slika 2. a) Strukturne komponente nukleozida, b) Strukturne formule nukleozida i nukleotida.

Poznato je da su modificirani nukleozidi i nukleobaze predmet brojnih studija zbog svoje potencijalne inhibicijske aktivnosti različitih enzima, što rezultira s evidentnom protutumorskom[21,22] i protuvirusnom[23,24] aktivnosti. S druge strane DNK/RNK, nukleozidi i nukleobaze su korišteni kao dobri modeli za proučavanje interakcije s metalnim kationima.[25]

2.1.1. Interakcija nukleobaza s metalnim ionima

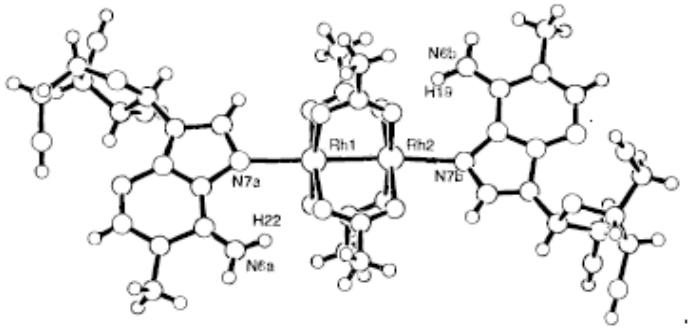
Studije interakcije između metalnih iona i nukleobaza, te nukleinskih kiselina započele su sredinom dvadesetog stoljeća, kada je Katz u svom radu[26] pokazao povezanost reverzibilnih fizičko-kemijskih promjena kod DNK prilikom adicije Hg^{2+} iona, dok je Weser bio prvi koji je pojasnio i izračunao konstantu stabilnosti kompleksa metal-nukleobaza.[27] Za razumijevanje kompleksacije metala i nukleobaza, odnosno nukleinskih kiselina neophodno je poznavanje i primjena koordinacijske kemije.

Proučavanjem načina vezanja $(CH_3)Hg^+$,[28] Cu^{2+},[29] Zn^{2+},[30] s nukleinskim kiselinama uočeno je da se metalni ioni često vežu na fosfatne skupine nukleotida i na nukleobaze.[31] Zapaženo je da niske koncentracije metalnih iona (Mg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, $Mn^{2+,}$ Zn^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}) stabiliziraju strukturu DNK, dok Cd^{2+} i Cu^{2+} u višim koncentracijama dovode do izvijanja DNK uzvojnice. Beauchamp[32] i Tobias[33] istovremeno su istraživali vezanje $(CH_3)Hg^+$ na DNK i nukleobaze, te su uočili višestruko vezanje elektrofila na nukleobazu i laku zamjenu protona nukleobaze s $(CH_3)Hg^+$.

Otkrićem reakcije živinog acetata s nukleobazama uracilom i citozinom na C5 položaju pirimidinskog prstena počinje razvoj organometalne kemije s nukleobazama koja se bazira na vezi metal-ugljik (C iz nukleobaza).[34] Prijašnja istraživanja bazirala su se na vezi metala s N ili O atomima nukleobaza.[35]

Poslijednjih godina raste interes za dinuklearne metalne specije Mo, Re, Zn i Rh s nukleobazama koje su često spojene acetatnim mostovima (*Slika 3*).[36, 37]

Posebno mjesto u proučavanju interakcija metalnih iona s nukleobazama i nukleinskim kiselinama ima ion Zn^{2+}. On je redoks inaktivan metalni ion i ima uravnotežen afinitet za N i O donore prisutne u nukleinskim kiselinama, pa je stoga idealan za vezanje na nukleobaze.[38]



Slika 3. Struktura dinuklearnog metalnog kompleksa Rh i nukleobaze adenina u $[Rh_2(O_2CCH_3)_4(1\text{-metiladenozin})_2]$ kompleksu.[39]

2.1.1.1. Modeli vezanja metala

Nukleinska kiselina pri fiziološkom pH (pH 7) i vrijednostima iznad te vrijednosti postaje polianion, pri čemu od svakog fosfatnog diestera potječe jedan negativan naboj. Stabilizacija strukture nukleinske kiseline postiže se neutralizacijom negativnog naboja. Neutralizaciju negativnog naboja moguće je postići na nekoliko načina: vezanjem metalnog kationa, vezanjem protoniranog amina (spermin, spermidin) ili protoniranog lanca aminokiseline (lizin, arginin).
Interakcija metalnih iona s DNK ostvaruje se uglavnom na dva načina:

a) direktno, putem koordinacije s atomom kisika iz fosfata ili šećera, ili atomima N, C i O iz heterocikličke baze;

b) indirektno, preko drugih liganada kao što su voda, amini, što u kasnijoj fazi interakcije uključuje stvaranje višestrukih vodikovih veza ili π-π interakcija između nukleinske kiseline i metala, kao primjerice kod interkalacija ili vezanja u utore DNK.

Uočeno je da se metalni ioni vežu na nukleobaze gotovo uvijek na iste načine, pa je prema tome definirano nekoliko općih pravila vezanja metala na nukleobaze:

a) vezanje na fosfatnu skupinu. Taj način vezanja je najvažniji za alkalijske i zemnoalkalijske metalne ione, koji su prisutni u stanici;

b) za purinske baze gvanin i adenin, dobro mjesto vezanja za metalne ione (npr. Mg^{2+}, Pt^{2+}) je N7 položaj imidazolnog prstena;

c) vezanje metala obično dovodi do gubitka protona na mjestu vezanja (NH, NH_2, CH), ali to ne mora značiti da je potrebno imati jake bazične uvjete, što bi se dalo zaključiti iz pK_a vrijednosti;

d) vrlo česta je višestruka metalacija nukleobaza, a omogućuje je početno deprotoniranje nukleobaze. Često su mjesta vezanja metala dovoljno blizu pa je moguća i metal-metal interakcija;

e) mogući su metalni kompleksi protoniranih nukleobaza, npr. adenina i gvanina;

f) egzocikličke amino-skupine kod citozina, adenina i gvanina mogu biti mjesta vezanja metala samo u slučaju uklanjanja jednog ili oba protona, dakle poslije deprotonranja i tautomernog pomaka protona s amino-skupine;

g) moguće je stvaranje metalnih kelata s nukleobazom, ali vrlo rijetko.

2.1.1.1.1. Vezanje metala na fosfatnu skupinu

Iz literature je poznato da se kationi teških metala u mononukleotidima i oligonukleotidima vežu na atome kisika fosfatne skupine. Isto tako, veliki broj kristalnih struktura nastalih vezanjem alkalijskih i zemnoalkalijskih metala na fosfatnu skupinu određen je metodom difrakcije rendgenskog zračenja.[40]

2.1.1.1.2. Vezanje metala na šećer

2´- i 3´-hidroksilne skupine ribonukleotida sposobne su vezati metalne ione alkalijskih i zemnoalkalijskih metala npr. Na^+ kation[41] i katione prijelaznih metala, kao što su Cu^{2+} kation,[42] Sn^{IV} kation,[43] ili Os^{IV} kation.[44] Od svih do sada navedenih načina vezanja metala na aminokiselinu, vezanje metala na šećer je najmanje vjerojatno.

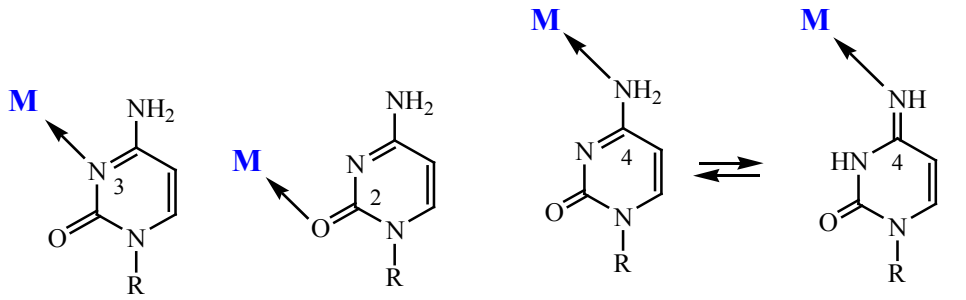
2.1.1.1.3. Vezanje metala na heterocikički dio nukleobaze

Dobri modeli za proučavanje vezanja metala su heterocikličke baze nukleinskih kiselina. U začetcima stvaranja kemije kompleksa metal-nukleinska kiselina, sve do 1970. godine razmatrano je samo nekoliko mjesta vezanja metala na nukleobaze i postojala je kriva percepcija mogućih mjesta vezanja. Tu iskrivljenu sliku dramatično mijenja primjena metode rendgenske difrakcije i NMR spektroskopije.

2.1.1.1.4. Vezanje metala na citozin

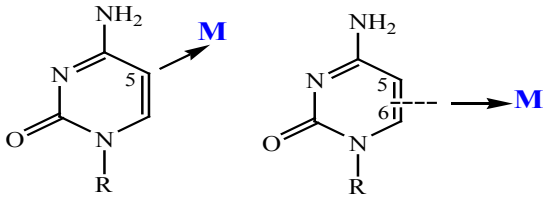
Postoji više mjesta vezanja metala na *N*-1-supstituiranu citozinsku nukleobazu pri čemu nastaju monodentantni kompleksi.[45] Tako je naučestalije vezanje metalnog iona na N3 položaj citozinske baze kod derivata citozina **I**[46] te na karbonilnu skupinu na C2 položaju citozina (O2 položaj, **II**)[47] gdje se najčešće vežu ioni alkalijskih metala[48] (*Slika 4a*).

a) Vezanje metalnog iona na položaje N3, O2 i N4



I **II** **III a** **III b**

b) Vezanje metalnog iona na položaje C5, i C5,C6 dvostruku vezu

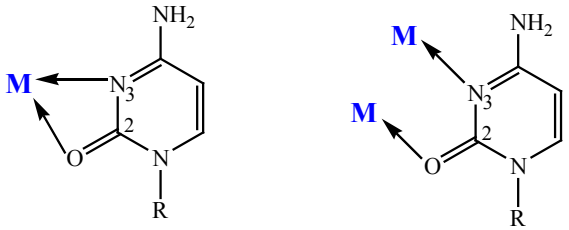


IV **V**

Slika 4. Prikaz modelnih struktura monodetantnih metalnih kompleksa *N*-1-supstituiranih derivata citozina: a) vezanje metalnih iona na položaje N3 (**I**), O2 (**II**) i amino/imino-skupinu na C4 položaju citozina (N4 položaj **IIIa** i **IIIb**), b) vezanje metalnog iona na položaj C5 (**IV**) i na C5, C6 dvostuku vezu (**V**).

Da bi došlo do vezanja iona metala na N4 položaj citozina potrebna je prethodna deprotoniranje amino-skupine, a pošto je protoniranje N3 lako provodljivo, dolazi do nastajanja vrlo rijetkih metaliranih oblika imino-okso tautomera citozina, što je prikazano strukturnim formulama **IIIa** i **IIIb** (*Slika 4a*).[49-53] Struktura **IV** prikazuje mogućnost vezanja metalnog iona na C5 položaj citozina, struktura **V** nastaje vezanjem metalnog iona na C5, C6 dvostruku vezu,[54] preko π-π interakcija (*Slika 4b*).

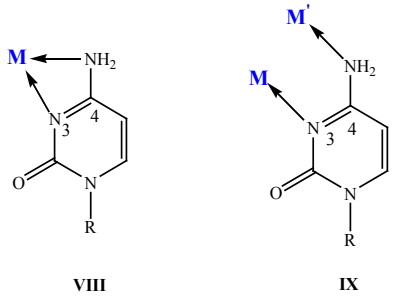
Neutralni citozinski ligandi mogu istovremeno vezati metalne ione preko N3 i O2 položaja i to u obliku kelata ili semikelata što prikazuje struktura citozinskog derivata **VI**,[55] ili u obliku premošćivanja, što je prikazano strukturom citozinskog derivata **VII (***Slika 5).*[56]



VI **VII**

Slika 5. Prikaz struktura citozinskih kompleksa **VI** i **VII** nastalih istovremenim vezanjem metalnih iona na položaje N3 i O2.

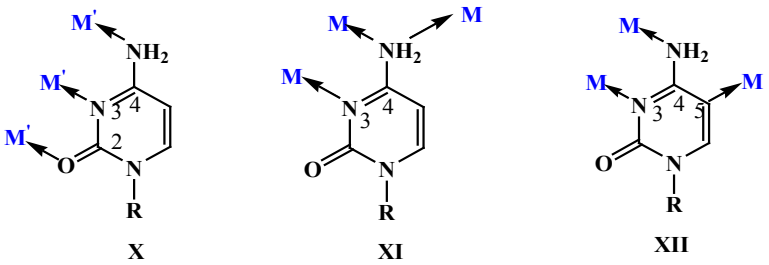
Kada je citozinski ligand anion postoje dodatne mogućnosti stvaranja kompleksa. Tako su potvrđeni N3,N4 kelatni kompleksi derivata citozina vezanjem Pt^{4+},[57] i $(Cp)_2Mo^{4+}$,[58] (struktura **VIII**, *Slika 6*) dok su N3,N4 oblici premošćivanja kod derivata citozina **IX** potvrđeni serijom kompleksa koji sadrže dva ista metalna iona (primjerice dva iona CH_3Hg^+, dva iona Pt^{2+}, dva iona Pt^{3+} ili dva iona Pd^{2+}),[59-64] ili dva različita metalna iona (primjerice Pt^{2+} i Pd^{2+}; Pt^{2+} i Cu^{2+}; Pt^{2+} i Hg^{2+}).[65-67]



VIII **IX**

Slika 6. Struktura **VIII** daje prikaz N3,N4 kelatnog kompleksa citozina, a struktura **IX** prikazuje N3,N4 premošćivanje.

Kod vezanja dva različita iona metala (npr. Pt^{2+} na položaju N3, a Hg^{2+} na položaju N4 kod derivata citozina)[68,69] udaljenost metal–metal (M–M´) ovisi o elektronskoj konfiguraciji oba iona metala (d^8, d^9 ili d^{10}) kao i o geometriji tih iona metala. Kod premošćivanja, ako su d_z^2 i d^8 orbitale metalanih iona okrenute jedna prema drugoj (M=M´) red veze je ≅0 i udaljenost između dva iona metala je relativno velika (2,9-3,04 Å), a u slućaju kada postoji mogućnost uklanjanja elektrona iz d_z^2 orbitale i oksidacije iona metala, ta udaljenost postaje manja (~2,5 Å) npr kod *cis*- $[Pt(NH_3)_2]^{2+}$.[70-72] Primjer vezanja tri metalna iona na *N*-1-supstituiranim derivatima citozina prikazuje struktura **X** (*Slika 7*), gdje se metalni kationi vežu na N3, N4 i O2 položaje citozinske baze.



X **XI** **XII**

Slika 7. Prikaz kompleksa *N*-1-supstituiranih derivata citozina s tri metalna iona.

U literaturi se navode različiti primjeri vezanja tri metalna iona na *N*-1-supstituiranim derivatima citozina, npr. M = Pt^{2+} i M´ = Ag^{+},[73] ili M = Pd^{2+} i M´ = Cu^{2+},[74] te M = Co^{3+} i M´ = Na^{+},[75] koji su strukturno okarakterizirani.

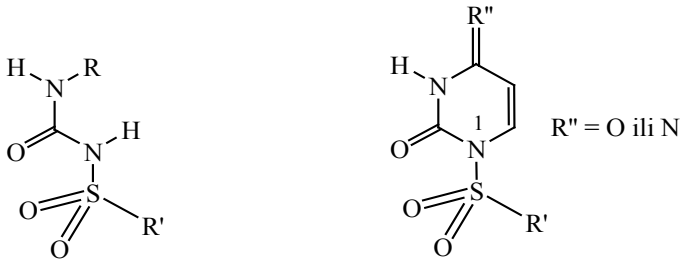
Trinuklearni kompleks *N*-1-supstituiranog derivata citozina **XI** s ionima CH_3Hg^{+},[76] primjer je vezanja tri metalna iona: jednog na N3 položaji i dva na amino-skupinu N4, pri čemu citozin ima ulogu dianiona (*Slika 7*). Moguće je i vezanje metalnih iona u položajima N3, N4 i C5 što prikazuje struktura **XII** (*Slika 7*). U tom slučaju citozin predstavlja dianion, pri čemu je ion Pt^{2+} vezan na položaj N3, a ioni Hg^{2+} na položaje N4 i C5.[77]

2.1.2. *N*-sulfonilpirimidinski derivati

Sulfonamidna skupina je čest farmakofor u različitim biološki aktivnim molekulama,[78-80] enzimskim inhibitorima i receptorskim antagonistima.[81,82] Značajno mjesto zauzimaju biološki aktivne sulfoniluree koje u svojoj strukturi imaju ugrađenu sulfonamidnu komponentu, a posebno zanimljivu skupinu protutumorskih agensa čine arilsulfonamidni spojevi.[83] Pirimidinski sulfonamidi kao što su sulfametoksidiazin, sulfasomidin, sulfadimetoksin i sulfametomidin danas se koriste u kliničkoj terapiji bakterijskih infekcija.[83c] Iz literature je poznato da se biološka aktivnost liganada koji sadrže sumpor pojačava u koordinaciji s metalima.[84] Tako metalni kelati sulfonamida pokazuju puno veći bakteriostatski učinak od samih liganda.[85]

B. Žinić i sur. sintetizirali su do tada nepoznate *N*-sulfonilpirimidinske derivate koji su pokazali jaku antitumorsku aktivnost *in vitro* i *in vivo*.[9-15] Novi derivati pripadaju skupini antimetabolita, karakteriziranoj kemijskom sličnošću prirodnim nukleobazama koje stanica koristi za sintezu nukleinskih kiselina. S aspekta biološke aktivnosti ovi spojevi sadrže kombinaciju dviju zasebno biološki aktivnih komponenti: fragment sulfonilciklouree i pirimidinsku bazu. Stoga ih se s jedne strane može promatrati kao derivate sulfoniluree, a s druge kao modificirane nukleobaze (*Slika 8*).

Ove vrste derivata nukleinskih baza inhibiraju sintezu DNK, RNK i proteina i induciraju apoptozu u stanicama tumora.[86]

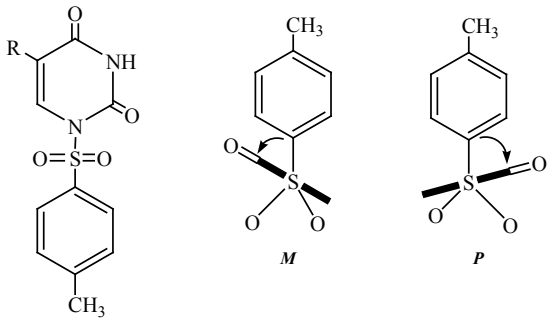


sulfonilurea *N*-1-sulfonilpirimidini

Slika 8. *N*-Sulfonilni derivati sulfoniluree i pirimidinskih baza.

Pored bioloških *in vitro* i *in vivo* pokusa s novim *N*-sulfonilpirimidinskim derivatima proučavana su i njihova fizikalno-kemijska svojstva.

Postoje akiralne organske molekule koje ne posjeduju elemente kiralnosti a koje mogu poprimiti kiralnu konformaciju i zamrznuti je u čvrstom stanju. U takvom slučaju mogu se dobiti konglomerati kiralnih kristala, a ta pojava predstavlja primjer spontanog generiranja kiralnosti.

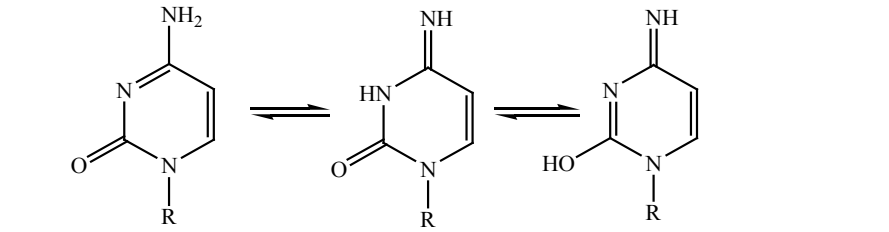


N-sulfonilpirimidin

Slika 9. Kiralne konformacije *N*-sulfonilpirimidina s M- i P-heličnosti.

Pronađeno je da *N*-sulfoniluracilni derivati ovisno o supstituentu na C5 položaju i ovisno o veličini supstituenata na sulfonilnoj skupini kristalizacijom daju racemične sraslace, centrosimetrične dimere ili smjesu enantiomernih kristala (*Slika 9*).[87]

Poznato je da je relativna stabilnost tautomera nukleobaza od velike važnosti za strukturu i funkciju nukleinskih kiselina. Iako su moguća tri tautomera *N*-1-supstituiranog citozina, pronađeno je da amino-okso tautomer dominira u čvrstom stanju, vodenim i DMSO otopinama kao i u nukleinskim kiselinama. Učestalost pojavljivanja imino-okso tautomera je puno manja, dok nije sigurno postojanje imino-hidroksi tautomera (*Slika 10*). U NMR studijama *N*-1-sulfonilcitozinskih derivata u DMSO-d_6 otopinama pokazano je da C5 halogen derivati postoje u rijetkim imino-okso tautomernim oblicima, dok se C5 nesupstituirani derivat pojavljuje u običajenom amino-okso tautomernom obliku.2



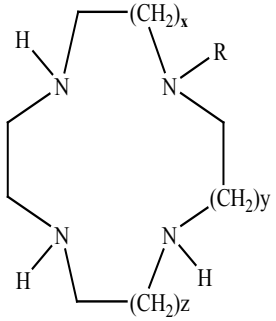
amino-okso-tautomer imino-okso-tautomer imino-hidroksi-tautomer

Slika 10. Tautomeri *N*-1-supstituiranog citozina.

Rendgenskom difrakcijskom analizom pokazano je da *N*-1-sulfonilcitozinski derivati s prijelaznim metalima tvore mononuklearne komplekse tipa $[M(L_2)Cl_2]$ (M = Cu(II), Cd(II)) u kojima ligandi postoje u običajenom amino-okso tautomernom obliku. U slučaju kompleksa *N*-1-sulfonilcitozinskog liganda s $PdCl_2$ prvo nastaje mononuklearni kompleks $[Pd(L_2)Cl_2]$ koji se zatim ovisno o otapalu pregrađuje i nastaju različiti dinuklearni Pd(II) kompleksi s rjeđe zastupljenim imino-okso tautomerom citozina.

2.2. Makrociklički poliamini

Pedersenovim slučajnim otkrićem makrocikličkog polietera 18-kruna-6 kao dobrog liganda za kompleksiranje metala započela je kemija krunskih etera.[88] Amino supstituirani krunski eteri, koje nazivamo i amino krunski eteri ili amino krune, u makrociklu osim kisika sadrže i dušik ili samo dušikove atome.[89] Strukture **XIII**–**XVI** na *Slici 11* prikazuju samo neke od mnogobrojnih struktura makrocikličkih poliamina.



XIII x-2, y -1, z -2, R- H (ciklam)

XIV x=2, y = , z = 1, R = H (izociklam)

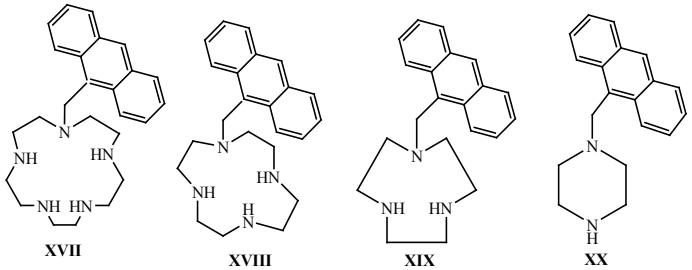
XV x=2, y = 1, z =2, R = $CH_2CH_2NH_2$ (skorpiand)

XVI x-1, y -1, z -1, R- H (ciklen)

Slika 11: Strukture makrocikličkih poliamina.

Poliamini su ambivalentni multidentatni receptori topljivi u vodi sposobni ostvariti interakciju s kationima i anionima. Kod viših vrijednosti pH (u odnosu na fiziološki pH) postoji veći broj slobodnih elektronskih parova što omogućuje interakciju poliamina s metalnim ionima, dok kod nižih vrijednosti pH unutar receptora postoji veliki broj protoniranih amino-skupina što omogućuje elektrostatske interakcija s anionskim ili polarnim vrstama.

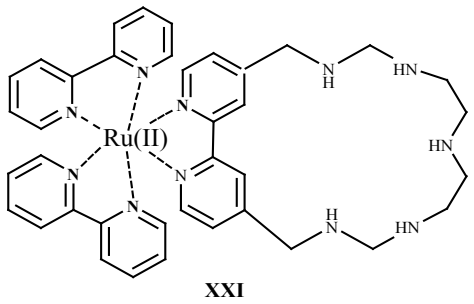
W. Czarnik je 1990. godine izvijestio o prvim fluorescentnim kemosenzorima **XVII**–**XX** koji posjeduju poliaminske makrocikličke receptore vezane na kromofor antracen (*Slika 12*).[90] Prisutnost poliaminskog receptora koji podliježe protoniranja omogućuje senzoru topljivost u vodi. Osim toga protonirani poliaminski receptori predstavljaju anionske senzore, dok su u bazičnim uvjetima neprotonirani poliaminski receptori idealni za kompleksiranje s metalnim ionima.



Slika 12: Strukturne formule fluorescentnih kemosenzora s antracenom.

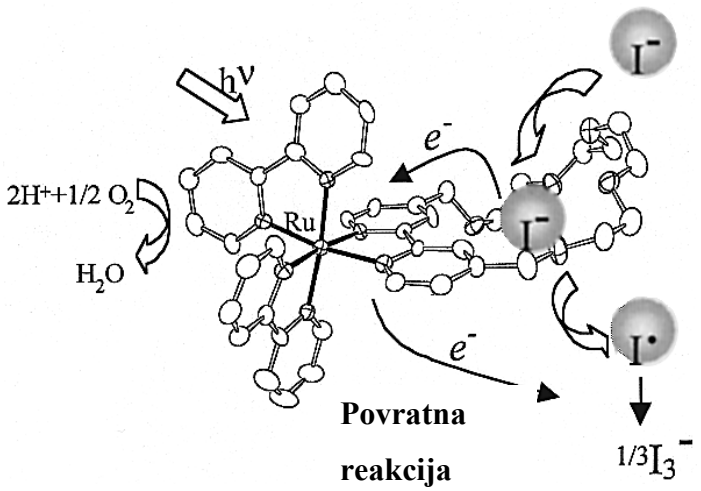
Zanimljiv fotokatalitički efekt uočen je istraživanjem makrocikličke strukture **XXI** (*Slika 13*) sastavljene od makrocikličkog poliamina i rutenijskog kompleksa.[91]

Taj luminescentni makrociklički poliaminski sustav koji sadrži Ru(II) i tri 2,2'-bipiridinske jedinice pokazao se kao odličan receptor za metalne katione i anionske vrste u otopini, ovisno o pH. U fotoinduciranim redoks procesima ovaj receptor pokazuje zanimljiva katalitička svojstva.



Slika 13: Makrociklička struktura **XXI** sastavljena od makrocikličkog poliamina i rutenijskog kompleksa.

Primjer takvog fotokatalitičkog efekta, odnosno fotokatalitičke sposobnosti sustava je adukt nastao povezivanjem makrocikličke strukture **XXI** i jodida (*Slika 14*). Pobuđivanjem navedenog adukta s 436 nm dolazi do prijenosa jednog elektrona s I^- na Ru(II) kompleks, što rezultira nastankom jodidnog radikala i dipiridinskog radikal aniona u rutenijevom kompleksu. Ciklus završava reoksidacijom dipiridinskog radikal-aniona, a jodidni radikal u konačnici daje anion I_3^-.[92]

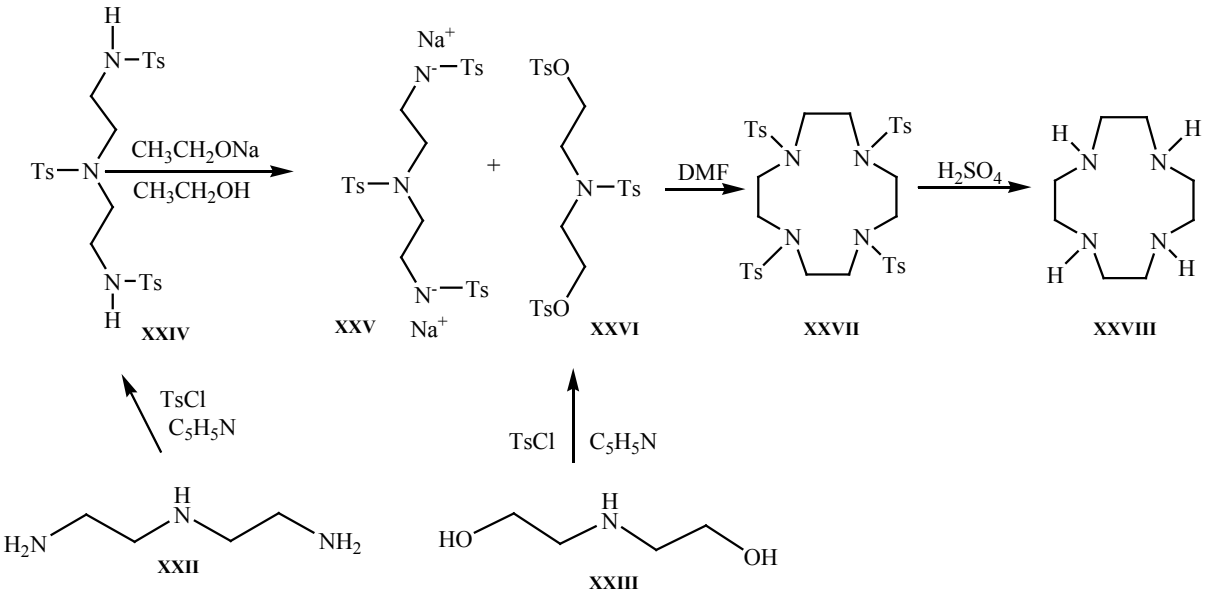


Slika 14: Fotokatalitički efekt adukta **XXI** i jodida.

Makrociklički poliamini predstavljaju ligande u kompleksima s prijelaznim metalima, lantanoidima, aktinoidima, a istovremeno su kemijske i strukturne baze različitih anionskih receptora. Najčešće korišteni makrociklički poliamini su ciklen i ciklam koji se primjenjuju kao kontrastna sredstva u snimanju magnetskom rezonancijom (magnetic resonance imagin, MRI),[93] u optici,[94] u pozitronskoj emisijskoj tomografji (positron emission tomography, PET),[95] te kao radioterapeutici.[96]

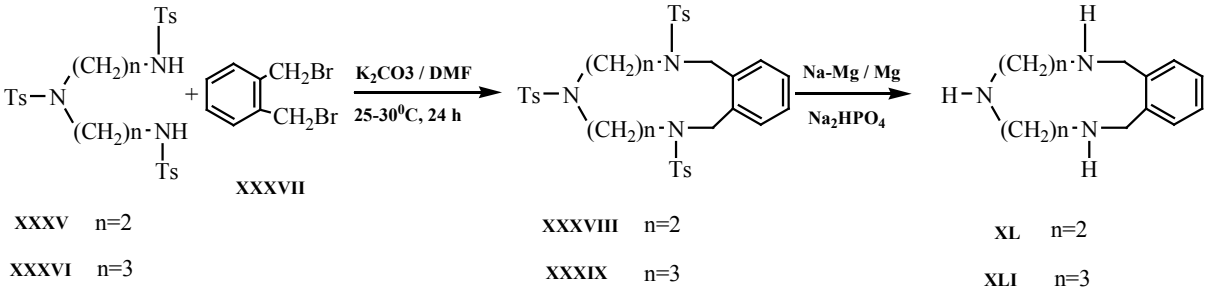
2.2.1. Sinteze makrocikličkih poliamina

Mnogi sintetski putovi makrocikličkih poliamina koriste tehnike visokog razrjeđenja[97] ili templat sinteze.[98] Najčešće korišteni postupak sinteze je Richman-Atkinsov postupak,[99] koji uključuje ciklizaciju natrijeve soli linearnog tosilamida **XXV** s tosilamin-diolom **XXVI** (*Shema 1*). Primjenom tog sintetskog postupka te njegovim daljnjim poboljšavanjem[100] dobiven je pristup širokom spektru potencijalno korisnih makrocikličkih poliamina.



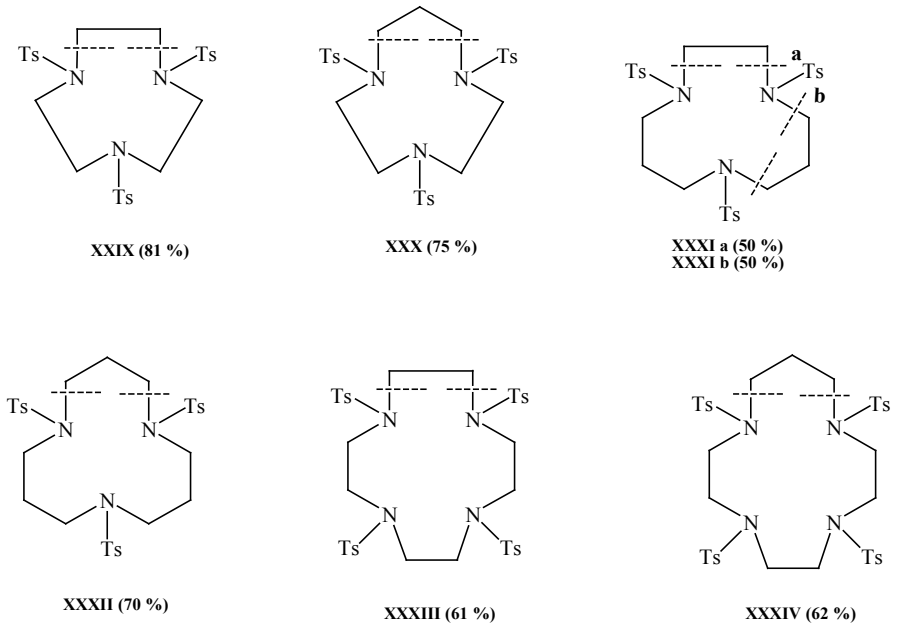
Shema 1: Sinteza ciklena metodom Richman–Atkins.

Primjenom Cs_2CO_3 za deprotoniranje ditosilamida u DMF-u uz polagano dodavanje dibromoalkana[101] sintetizirano je nekoliko velikih makrocikličkih diamina. Osim Cs_2CO_3 za deprotoniranje diamina korišteni su i drugi karbonati Li_2CO_3, Na_2CO_3 ili K_2CO_3. Dobivena su izvanredna iskorištenja za prstenove s 17-28 članova, ali slaba iskorištenja za prstenove s 11-12 članova. Poznato je da je K_2CO_3 odličan deprotonator tosilamida u DMF-u,[102-105] pa su Chavez i Sherry istražili utjecaj K_2CO_3 na ciklizacije makrocikla s 9-15 članova (*Shema 2*).



Shema 2: Sinteza makrocikličkih poliamina **XL** i **XLI** po metodi Chavez i Sherry.

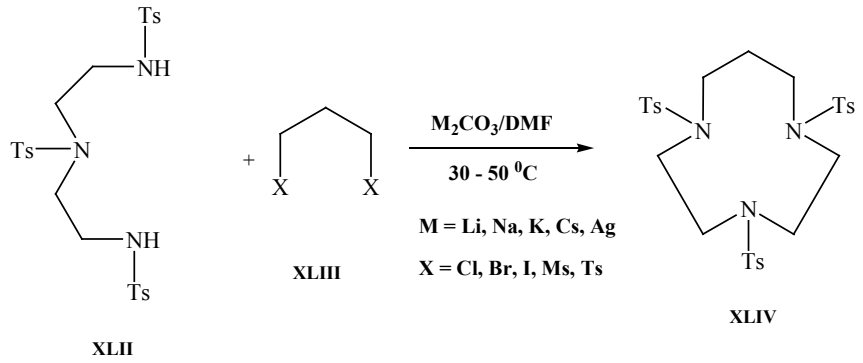
Tako su dobivene serije spojeva, tri, tetra i penta-azamakrocikla (*Slika 15*) Značajno je da se te sinteze mogu provesti u vrlo jednostavnim reakcijskim uvjetima, u jednoj reakcijskoj posudi i pri gotovo sobnoj temperaturi (25–30 ^{o}C).



Slika 15: Prikaz poliaminskih makrocikličkih struktura sintetiziranih upotrebom K_2CO_3/DMF.

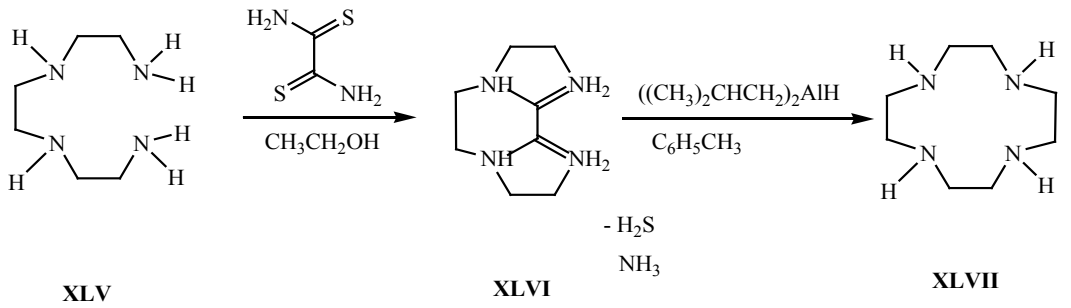
Chavez i Sherry su pokazali da kod ciklizacije i nastanka makrocikličkih poliamina, vrsta reaktivne skupine koja ulazi u reakciju te vrsta karbonata koji sudjeluje u deprotoniranju utječu na brzinu ciklizacije i iskorištenje reakcije (*Shema 3*).

Najveće iskorištenje od 70–75 % dobije se korištenjem bromida i mesilata te K_2CO_3 za deprotoniranje. Korištenjem klorida i tosilata ciklizacija je sporija i iskorištenje je manje, a od korištenja jodida se odustalo, jer nastaje smjesa produkata koju nije moguće odvojiti.



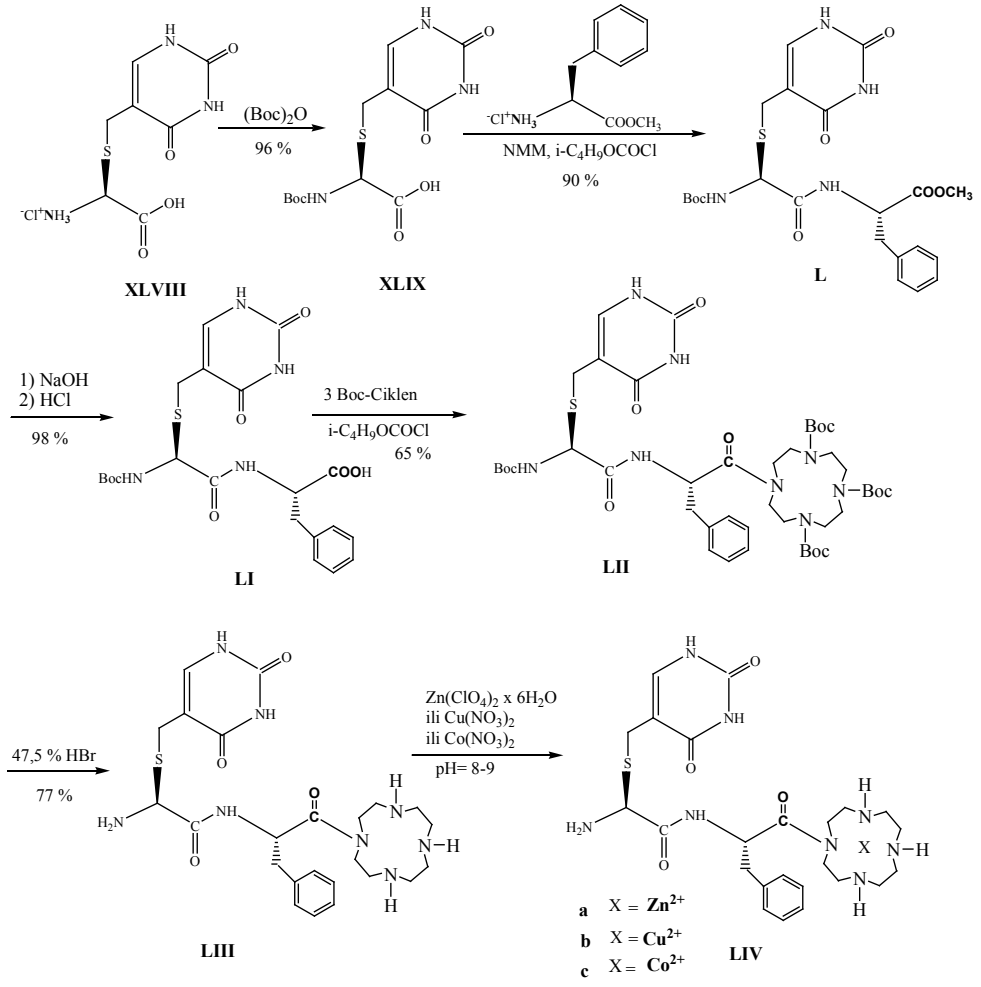
Shema 3: Prikaz intramolekularne ciklizacije i nastajanje makrocikla **XLIV**.

Jedan od mogućih, ali rijeđe korištenih sintetskih puteva je sinteza po ditiooksamidnoj metodi (Shema 4).[106]



Shema 4: Sinteza ciklena po ditiooksamidnoj metodi.

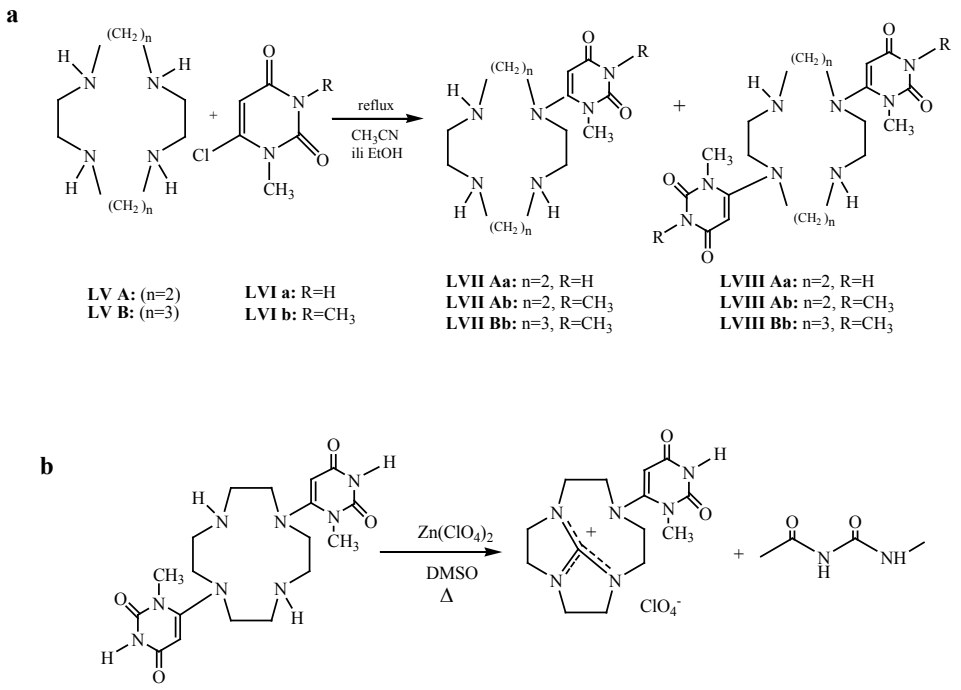
Utvrđeno je da metalni kompleksi ciklena cijepaju DNK.[107-110] Tako su mononuklearni kompleksi Zn(II), Cu(II) i Co(II) konjugata makrocikličkog poliamina ciklena vezanog na peptidne nukleinske kiseline (PNA) **LIV** sintetizirni kao sredstva za DNK cijepanja (*Shema 5*). Pokazalo se da je bakreni kompleks **LIVb** bolji katalizator procesa cijepanja DNK od kompleksa s cinkom i kobaltom.[111] Karakterizacija takvih kompleksa moguća je tehnikama NMR i spektroskopijom masa.



Shema 5: Sinteza PNA–ciklen konjugata i kompleksa.

Osim značajne biološke i medicinske primjene makrocikličkih poliamina, važan segment proučavanja je i primjena tih spojeva u „domaćin-gost“ kemiji.[112] Ciklen je jedan od najvažnijih makrocikla koji se koriste kao metalni kelator.[113, 114] Njegovi derivati su nedavno korišteni u sintezi novih materijala kao kontrastna sredstva u snimanju magnetskom rezonancijom (MRI, eng. magnetic resonance imagin)[115, 116] i upotrebljeni su kao građevne jedinice supramolekula s dobro definiranim strukturama u vodenoj otopini.[117, 118] Opisane su i reakcije između Zn-ciklen kompleksa i nukleobaza,[119,120] a fokus istraživanja stavlja se na učinak veličine prstena, jer je to vrlo važno u kemijskim reakcijama, posebno u „domaćin-

gost“ kemiji.[121] Ciklam je odlična alternativa za ciklen jer ima dva C atoma više, odnosno veću šupljinu prstena. Nedavno sintetizirani monouracil **LVII** i diuracil **LVIII** supstituirani ciklen i ciklam konjugati (*Shema 6a*) koji se pri zagrijavanju u prisustvu kiseline transformiraju u tricikličke guanidinijeve soli (*Shema 6b*).

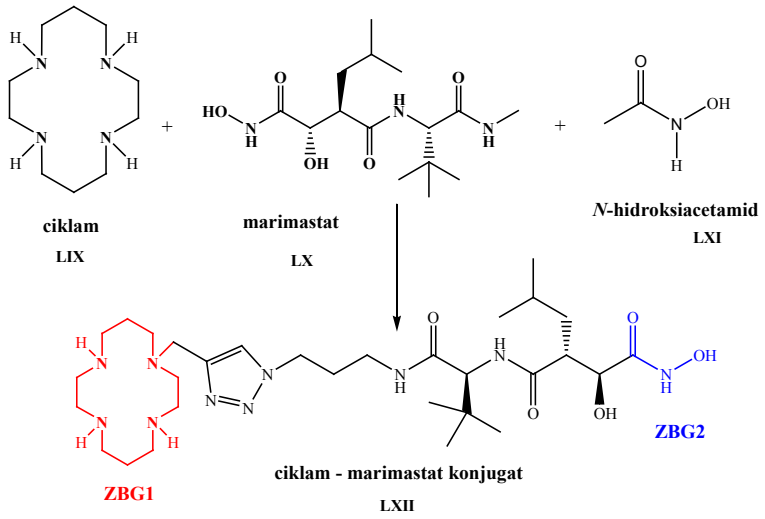


Shema 6: Sinteza a) mono i b) diuracil supstituiranih azamakrocikla.

Medicinska važnost poliaminskih makrocikla, njihovih kompleksa i konjugata dolazi do izražaja i u sintezi inhibitora matrice metaloproteinaze.

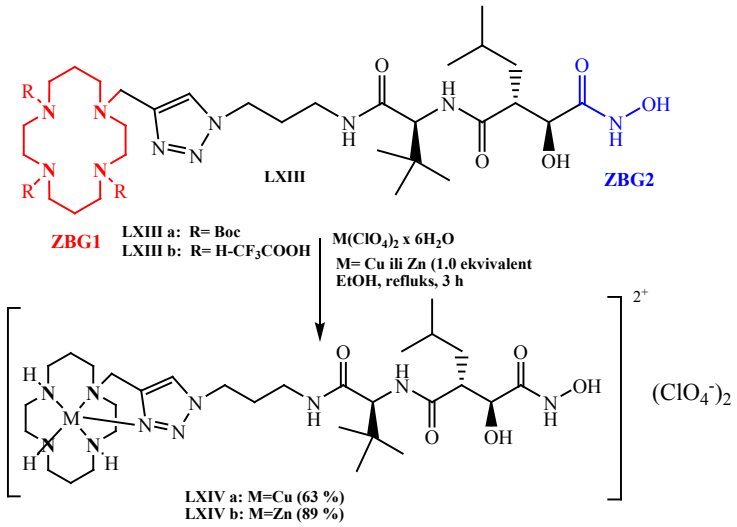
Matrice metaloproteinaze (MMPs) su endopeptidaze koje sadržavaju Zn. Ti enzimi igraju vodeću ulogu u nizu fizioloških procesa, uključujući zacjeljivanje rana, embrionalni razvoj i angiogenezu.[122] Overekspresija MMPs-a implicira različita patološka stanja, uključujući karcinom[123], artritis[124] i kardiovaskularne bolesti[125]. Značaj tih oboljenja dovodi do razvoja velikog broja inhibitora MMPs-a.[126] Mnogi inhibitori MMPs-a (MMPIs) sastoje se od peptida i hidroksamnih derivata kao skupine koja veže cink (ZBG) i na taj način inaktivira MMPs.[127] Nedavno su istraživanja fokusirana na korištenje MMPs inhibitora koji se sastoje od peptida i ciklama,[128] a koji se pokazao kao vrlo učinkovita i selektivna skupina koja veže

cink.[129] Jedan od novih MMPIs-a je ciklam-marimastat konjugat **LXII**, dobiven „klik“ kemijom iz tri segmenta: ciklama **LIX**, marimastata **LX** i *N*-hidroksiacetamida (*Shema 7*).



Shema 7: Sinteza ciklam-marimastat konjugata **LXII**.

Ciklam je idealan za kompleksiranje s marimastatom i stvaranje konjugata, jer zbog veličine svoje šupljine jako dobro veže Zn i Cu. Vezujući Zn u ciklam dolazi do inaktivacije cinka i inhibicije matriks metaloproteinaze (*Shema 8*).



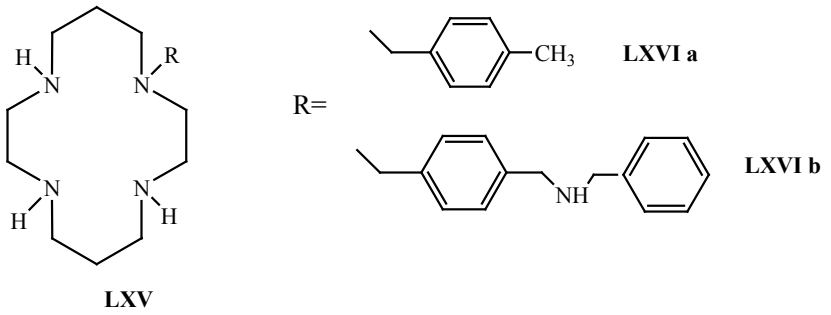
Shema 8: Vezanje Zn u ciklam-marimastat konjugate **LXIIIa** i **LXIIIb**.

Medicinski interes za upotrebu ciklama usmjeren je na kliničku upotrebu biciklama za liječenje sindroma stečene imunodeficijencije SIDA (engl. Acquired Immunodeficiency

Syndrome, AIDS), za mobilizaciju matičnih stanica, te za upotrebu s radionuklidima Tc i Cu u dijagnostici i terapiji.[130]

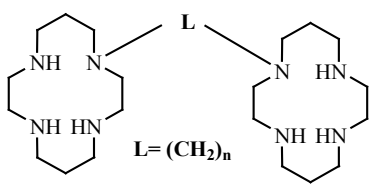
Makrociklički poliamini prisutni su i proučavani u koordinacijskoj kemiji.[131] Uočen je efekt povećanja stabilnosti koordinacijskih kompleksa metala s makrocikličkim poliaminima u odnosu na slične necikličke ligande. Taj efekt je nazvan makrociklički efekt.[132] Zbog visokog afiniteta makrocikličkih struktura za kompleksiranje s metalima, one se koriste kao „nosači" metalnih iona[133] i kisika u biološkim sustavima,[134] kao katalizatori,[135] aktivna strana metalo-enzima,[136] kao agensi koji cijepaju fosfatne estere, uključujući DNK[137] i RNK[138] te kao MMRI kontrasti, za radioaktivnu dijagnostiku[95,96] i kao anti HIV (engl. Human Immunodeficiency Virus) agensi.[116]

Sam ciklam pokazuje jaku anti HIV aktivnost,[139] a povećanje aktivnosti postiže se supstitucijom kao što je u slučaju derivata benzil ciklama **LXVIa** i **LXVIb** (*Slika 16*).[140]

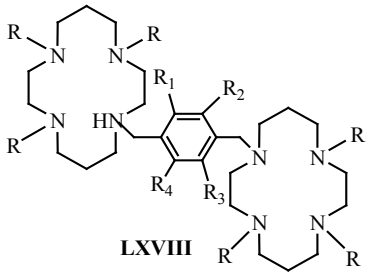


Slika 16: Supstituirani derivati ciklama s anti HIV učinakom.

Kao nova klasa visoko potencijalnih i selektivnih HIV inhibitora sve se više istražuju biciklami.[141] To su molekule koje se sastoje od dva ciklama povezanih lancem (**LXVII**) ili aromatskom poveznicom (**LXVIII**). Biciklami djeluju tako da se vežu na koreceptor (CXCR4) i blokiraju ulazak virusa u stanicu domaćina i tako blokiraju infekciju HIV-om.[142]



LXVII



LXVIII

Slika 17: Strukture biciklama.

Zbog velike mogućnosti primjene makrocikličkih poliamina, njihovih derivata i konjugata, interes za njihovo proučavanje i mogućnosti primjene u sintezama novih spojeva s biološkim učincima je u kontinuiranom porastu.

2.3.Općenito o spektrometriji masa

2.3.1. Spektrometrija masa (MS)

Od ranih četrdesetih godina dvadesetog stoljeća spektrometrija masa se upotrebljava u analitičke svrhe, kada je korištena u petrokemijskoj industriji za kvantitativno određivanje smjese ugljikovodika.[143] Od tada se sukladno razvoju ostalih grana znanosti razvijala i ta tehnika. Danas se spektrometrija masa koristi za određivanje izotopnog omjera atoma u uzorku, elementnog sastava uzorka, kvalitativnog i kvantitativnog sastava smjese, primarne, sekundarne pa čak i tercijarne strukture anorganskih, organskih i bioloških molekula.

Spektrometar masa je instrument u kojem nastaju, razdvajaju se i detektiraju specije na osnovu omjera njihove mase i naboja.[144] Općenito se instrument može opisati kao set modularnih dijelova koji uključuju dio za unos uzorka, izvor ionizacije, analizator masa, detektor i snimač/procesor podataka. U tablici 1 prikazane su samo neke od komponenata koje se koriste kao dijelovi modernog spektrometra masa. Povezivanjem odgovarajućih komponenata dobivaju se konfiguracije koje zadovoljavaju određene analitičke zahtjeve. Raznolikost ionizatora, analizatora i detektora omogućava kreiranje jedinstvenih sustava s obzirom da se pojedine komponente navedene u tablici 1 mogu modularno slagati. Povezivanjem istih analizatora masa nastaju tandemni sustavi, a ukoliko se povezuju različiti analizatori masa nastaju hibridni instrumenti.

Tablica 1: Općeniti prikaz pojedinih modula koji čine spektrometar masa.

Unos uzorka	Izvori ionizacije	Analizatori masa	Detektori iona
• Plinska kromatografija (GC) • Tekućinska kromatografija (LC) • Direktna proba	Vakuum: • Ionizacija elektronima (EI) • Kemijska ionizacija (CI) • Matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) Atmosferski tlak: • Elektroraspršenje (ESI) • Kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (APCI)	•Kvadrupolni filtri masa (Q) •Analizatori masa mjerenjem vremena leta iona (ToF) •Kvadrupolne stupice iona (QIT) •Magnetski sektori	•Fotomultiplikator •Elektronski multiplikator •Višekanalne pločice •Fotografski film

Postoje dva osnovna načina nastanka iona u spektrometru masa. U prvom se uzorak uvodi u spektrometar masa kao neutralna vrsta te se potom ionizira u ćeliji koja je pod vakuumom (EI; CI; MALDI). Drugi način je da se ioni generiraju pri atmosferskom tlaku te se kao nabijene čestice, kroz područje kontroliranog vakuuma, uvode u spektrometar masa. Ovaj proces se naziva ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. atmospheric pressure ionisation, API) i do danas predstavlja najbolje rješenje za povezivanje tekućinskih sustava (poput tekućinske kromatografije, LC i kapilarne elektroforeze, CE) sa spektrometrom masa.

Proces ionizacije može se odvijati na dva osnovna načina: gubitkom ili primanjem elektrona te gubitkom ili primanjem nabijene čestice (poput protona) pri čemu nastaju ioni s neparnim odnosno parnim brojem elektrona.[145] Primjeri ionizacije u kojima nastaju ioni s neparnim brojem elektrona su: ionizacija udarom elektrona (EI) i kemijska ionizacija (engl. chemical ionisation, CI). Ioni s parnim brojem elektrona nastaju gubitkom ili primanjem nabijene čestice i imaju drugačiju masu u odnosu na masu molekule u neioniziranom stanju iz koje su nastali. To su tzv. pseudomolekulski ioni.[146] Primjeri ionizacije u kojima nastaju ioni s parnim brojem elektrona su ionizacije elektroraspršenjem i kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku (ESI, API).

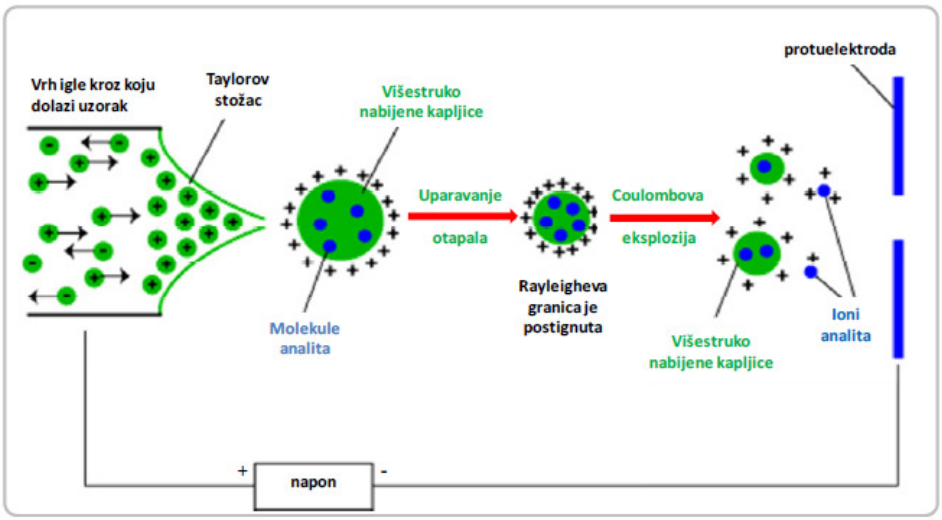
2.3.1.1. Spektrometrija masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (ESI-MS)

Spektrometrija masa koristi se već dugi niz godina, no poseban procvat primjene ove tehnike dogodio se kada su Yamashita i Fenn[147] 1984. godine opisali tehniku ionizacije elektroraspršenjem (engl. electrospray ionisation, ESI). Razvojem i primjenom ionizacije elektroraspršenjem omogućeno je povezivanje dviju tehnika, tekućinske kromatografije i spektrometrije masa. Osim toga, tehnika ionizacije elektroraspršenjem omogućila je analizu velikih, nehlapljivih molekula. Za svoj doprinos u analizi bioloških makromolekula spektrometrijom masa[148] John B. Fenn dobio je 2002. godine Nobelovu nagradu za kemiju.

Elektroraspršenje je blagi način ionizacije koji omogućuje analizu malih i velikih molekula, nekovalentnih kompleksa, nenabijenih ili ionskih spojeva itd.[149] Jedinstveno svojstvo elektroraspršenja je u nastajanju višestruko nabijenih iona, čije se vrijednosti *m/z* mogu detektirati i s analizatorima masa malih vrijednosti *m/z*, a realno ti ioni potječu iz spojeva velike molekulske mase.[150]

Tehnika ESI-MS se dokazala kao pouzdana metoda za određivanje brojnih organskih, organometalnih i anorganskih struktura.[151] U slučaju organometalnih kompleksa (metal-ligand kompleksa) često je korištena za određivanje stehiometrije novih sintetiziranih kompleksa.[152]

Ona omogućuje primjenu spektroskopije masa direktno iz tekućeg uzorka, blaga je metoda, niskih energija što minimalizira fragmentaciju, što je važno za opstanak vrlo osjetljivih (nekovalentno vezanih) specija, koje tako ostaju u otopini. Ovisno o naboju specije, moguće je snimati na dva načina: pozitivan (ES^+) i negativan (ES^-) način (engl. mod) (*Slika 18*) te speciju pratiti obzirom na najbolji odziv (engl. abundance). [153]



*Slika 18:*Shema mehanizma nastajanja iona u ESI-u.

Iz intenziteta signala molekulskog iona moguće je u otopini odrediti količinu i konstantu stabilnosti za promatranu speciju (interni standard). Metoda ESI-MS je vrlo primjenjivana i zbog niskog praga detekcije od 10^{-6} mol dm^{-3}, kao i male količine uzorka koja je potrebna za analizu. Zbog niskog praga detekcije i niskih energija ta metoda je pogodna i za biološke uzorke. Ako je usporedimo s NMR-om, koja je najprimjenjenija metoda u instrumentalnoj analizi, ESI-MS ima nekoliko prednosti: omogućuje analiziranje specija u otopini neovisno o nuklearnom spinu građevnih atoma, omogućuje promatranje individualnih iona u otopini te identifikaciju paramagnetičnih i diamagnetičnih specija.[154]

Jačina odziva ovisna je o koncentraciji i pH vrijednosti otopine.[155] Agnes, Stewart i Holrick[156] ističu dva ključna problema na koje se nailazi kod primjene ESI-MS za otopine u ravnoteži. Tijekom procesa ionizacije dolazi do narušavanja ravnotežnih uvjeta obzirom na sastav otopine[157,1] npr. stehiometrijski broj ili reaktivnu količinu specije. Kao posljedica toga kvalitativni i kvantitativni rezultati dobiveni ESI-MS možda neće predstavljati realni prikaz stanja u otopini koja se analizira.[6] Praćenje promjena sastava otopine moguće je napraviti samo u slučaju kada je vrijeme potrebno za promjenu sastava otopine manje od vremena za ESI-MS analizu (vrijeme od prevođenja otopine u sprej do evaporacije iona je 10^{-2} sekundi).[157]

Razlika koja se uočava u koncentraciji specije u otopini i onoj koja se uočava u ESI-MS uvjetima ovisi o pH vrijednostima i ESI-MS nije pogodna metoda za studije kiselo-baznih ravnoteža.[158,7]

Nastali ionski produkti podvrgnuti su reakcijama u plinskoj fazi prije nego što stignu do analizatora.

Učestalost reakcija u plinskoj fazi ovisi o naponu izvora instrumenta. Pri nižim naponima mogu se vidjeti više nabijene specije i važno je napomenuti da kompozicija specija i jačina signala značajno ovise o primjenjenom otapalu.[159]

Fizikalno-kemijska svojstva otapala, kao što su: isparljivost, površinska napetost, viskoznost, dielektrična konstanta, pH i reaktivnost u plinskoj fazi, utječu na ionizaciju analiziranog uzorka te na odziv i jačinu signala. Polarna otapala, kao što je voda, imaju veliku viskoznost što ima za posljedicu manju mobilnost iona i u konačnici nedovoljno odvajanje iona, odnosno ne dolazi do nastanka stabilnog spreja. U slučaju takvih polarnih otapala, zbog njihove manje isparljivosti u odnosu na organska otapala, kao i izražene solvatacije analiziranih iona dolazi do nastanka klastera s otapalom.[160] U nepolarnim organskim otapalima (npr. acetonitril) ili u smjesi otapala (npr. DMSO/MeOH ili DMSO/ACN) jači je odziv signala za pojedinačne ione, kao i za više nabijene specije.

Puno je teže predvidjeti reakcije u plinskoj fazi, nego promjene u otopini, jer se specije u plinskoj fazi ponašaju drugačije. Tako npr. specije koje su stabilne u otopini ne moraju biti stabilne u plinskoj fazi i obrnuto. Zbog toga se primjenjuje opći postulat po kojem specija koja zahtijeva veliku energiju za fragmentaciju u MS/MS spektrometriji postoji u otopini, ali se ne formira u plinskoj fazi, uz rijetke iznimke.[161]

Nadalje, postoje još neke činjenice koje mogu utjecati na primjenu ESI-MS metode za studije otopina, kao što su:

a) tijekom procesa ionizacije može doći do nastanka adukta s molekulama otapala u koordinaciji s metalnim centrom. Ti adukti često postoje u otopini, ali mogu nastati i kao ESI artefakti;

b) kao posljedica procesa ionizacije mogu nastati ionski adukti (npr. s Na^+ koji je u stvari onečišćenje, a potječe od staklene kapilare ili staklenog posuđa u kojem je otopina) koji inače nisu prisutni u otopini, ali su vrlo česti kod ESI-MS nastaju kao artefakti kod ESI-a.[162]

Unatoč „mekoći“ metode, odnosno malim energijama koje se koriste u ionizaciji, uočava se fenomen fragmentacije i polimerizacije, a posebno je to izraženo kod alifatskih i velikih makrocikličkih molekula.

U slučaju metal-ligand kompleksa ne može se odrediti broj „kiselih“ protona. Adicija ili gubitak protona je vrlo brzi proces, pa je pomoću ove metode moguće detektirati specije koje nose obično jedan negativan ili jedan pozitivan naboj (npr. $[MLH_2]^+$ i $[ML]^-$).[163] Ta karakteristika ESI-MS može biti i njena prednost, jer adicija ili gubitak protona omogućuje dobru detekciju.

Kompozicija opaženih specija osjetljiva je na parametre instrumenta, kao što su : napon spreja, temperatura kapilare, napon kapilare i posebno napon konusa. U slučaju da navedeni parametri nisu dobro definirani i kontrolirani, dobiveni rezultati mogu biti netočni.[164, 165] Da bi se to riješilo uvode se interni standardi ili metoda direktne kalkulacije ionskog faktora odgovora, što je primijenjeno na nekovalentnim kompleksima velikih biomolekula.[166]

Sastav otopine, koja se može analizirati, podvrgnut je značajnim ograničenjima: ne može se koristit visoka ionska jakost i prije analize potrebno je dodavanje organskog otapala u vodenu otopinu.

Cjelokupna ionizacija elektroraspršenjem (ESI) je vrlo složen proces i ovisan je o utjecaju svojstava otapala na sam proces ionizacije, a samim tim i na odziv signala. Na ESI utječe površinska napetost, viskoznost, ionska napetost, dielektrična konstanta, koncentracija elektrolita, pH, konduktivnost, kao i reakcije u plinskoj fazi. Visoke koncentracije elektrolita se ne mogu koristiti jer dolazi do supresije signala analita.[167]

Bolji spektri se dobiju u organskim otapalima (metanol, acetonitril) ili u njihovim smjesama s vodom. Čista voda bez dodatka organskog otapala može uzrokovati narušavanje odnosa signal-šum.[168]

2.3.1.1.1. Metoda ESI-MS za proučavanje slabih nekovalentnih (interakcijskih) veza

Prvi radovi o korištenju metode ESI-MS za proučavanje nekovalentnih slabih interakcijskih veza između ciljanih molekula (DNK, RNK, proteina) i liganada (proteini, metalni ioni) pojavili su se početkom 1990-tih.[169] Poznato je da takve interakcije imaju značanju ulogu u mnogim biokemijskim procesima u stanici.[170] U literaturi se navodi primjena nekovalentnih

interakcija pručavanih MS-om, kao što su praćenje nastajanja ciljane molekule-liganda,[171] kod funkcionalne proteomike,[172] kod određivanje 3D struktura (proteinska dinamika)[173] i kompetitivnog vezanja liganada.[174.] Nekolicina autora navode ESI MS tehniku kao važan alat u studijama određivanja strukture derivata nukleobaza**.**[175] Rezultati istraživanja Cooka[176] podupiru ESI-MS tehniku kod proučavanja slabih interakcija prilikom agregacije između bioloških molekula i kationa.[177] U slučajevima u kojima je moguća usporedba, postoji izrazito velika podudarnost rezultata dobivenih u praćenju plinske i tekućinske faze, odnosno otopine iz koje nastaje plinska faza.

2.3.1.1.2. Primjena metode ESI-MS za studije organo-metalnih kompleksa

Ubrzo nakon što su Fenn i suradnici predstavili metodu ESI kao blagu ionizacijsku tehniku za polarne nepromjenjive molekule[178-180], ista je primjenjena kao tehnika za proučavanje plinske faze metalnih kompleksa.

Ionski kompleksi s velikim molekulama (proteini, nukleinske kiseline) također su ispitivani pomoću ESI metode u plinskoj fazi.[181,182] Oni se mogu prevesti u plinovitu fazu kao ioni, ali treba paziti da energije budu male, kako ne bi došlo do pucanja slabih veza.

ESI-MS metodom proučavani su kompleksi alkalijskih metala s različitim organskim ligandima, uključujući polietilengljkol, ugljikohidrate, ionofore, antibiotike, peptide i nukleotide, pri čemu je provedena korelacija plinske faze sa stanjem u otopini, čime su dobivene informacije o molekulskoj težini i strukturi. Metalni kompleksi prijelaznih metala s biološkim molekulama, aminokiselinama, peptidima, proteinima i ugljikohidratima transformirani su pomoću ESI iz otapala u plinsku fazu, uz korelaciju plinske faze i otopine.

Značajna prednost ESI tehnike, kada je uspoređujemo s drugim ionizacijskim tehnikama (FAB, laser desorpcija, itd.) je da metalni kompleks može biti uzorkovan u otapalu u kojem nastaje i u kojem je stabilan. Iz istog otapala mogu se odrediti svojstva drugim spektroskopskim metodama, kao što su NMR ili UV-VIS. To minimalizira utjecaj otapala, redukciju metala, demetalaciju kompleksa i daje vjerodostojnost predloženoj strukturi iona iz plinske faze.

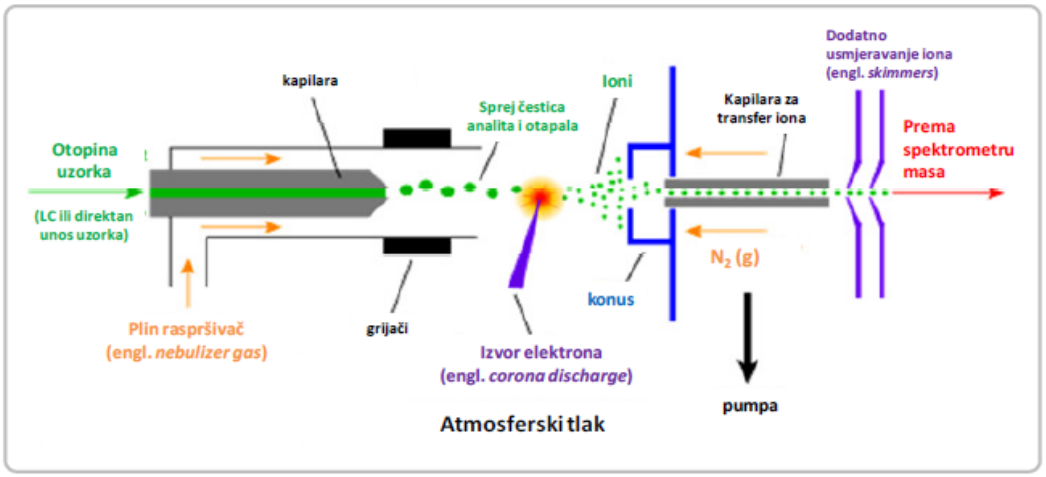
2.3.1.1.3. Stvaranje plinske faze metalnih kompleksa elektroraspršenjem

Stvaranje plinske faze iz vodeno-organskih otopina metalnih soli pomoću elektroraspršenja rezultira nastajanjem metal-otapalo klasterskih iona $M(S)_n^{y+}$. Broj molekula otapala u kompleksima u plinskoj fazi ovisi o prirodi iona metala, otapala te o ESI uvjetima, kao što su tlak, temperatura ili elektrostatski potencijal u sučelju ESI. Kebarle i suradnici[183] su proučavali formaciju klastera u plinskoj fazi $M(H_2O)_n^{y+}$ u posebnoj komori u kojoj je ion metala formiran pomoću ESI te uravnotežen vodenom parom u struji dušika:

$$M(H_2O)\ n\text{-}1^{y+} + H_2O\ (g) \longrightarrow M(H_2O)\ n^{y+}$$

Pod tim uvjetima, ioni alkalijskih metala formiraju nekoliko $M(H_2O)_n^+$ klastera čiji intenzitet signala ovisi o vrijednosti n, koja se kreće od n = 4 za Li^+, do n = 1 za Rb^+.

U plinskoj fazi teško je producirati višestruko nabijeni „goli“ metalni ion, jer ionizacija liganda (redukcija naboja[184]) započinje potpunim gubitkom liganda pošto sfera otapala ne može više stabilizirati naboj metala. Ionizacijski potencijal (IP) metala (M^+) i liganda (L) su indikativni parametri. Kad je IP(M^+) veći od IP(L) nastat će specije reduciranog naboja.



*Slika 19:*Nastajanje iona elektroraspršenjem**Error! Bookmark not defined.**

2.3.1.1.4. Primjena na sustave metal–ligand

Katta, Chowdhury i Chait[185] su prvi autori koji su koristili ESI-MS za studiju koordinativnih kompleksa nastalih u otopini, a koji sadrže metalni ion i ligand koji nije polimer. Predložili su korištenje te tehnike za proučavanje ionskih kompleksa prijelaznih metala. U korištenju te tehnike za studije sistema metal-ligand potrebno je uzeti u obzir nekoliko važnih podataka, kao što su: pH, koncentracije metala, liganda te količinski omjer metal-ligand.

ESI-MS se u većini studija koristi za kvalitativno određivanje, odnosno za određivanje broja i stehiometrije specija koje su nastale su otopini. U manjem broju studija ta tehnika se koristi u kvantitativnom smislu, odnosno za izračun koncentracije kompleksa nastalih u otopini i određivanja njihove konstante stabilnosti[186]

U studijama metal-ligand otopina, posebno mjesto zauzimaju studije domaćin-gost interakcija između metalnih iona (posebno alkalijski i zemnoalkalijski) te krunastih etera kao liganada. U domaćin-gost interakcijama obično je formiran jedan kompleks s poznatom stehiometrijom. Osim potvrde očekivane stehiometrije, zadatak domaćin-gost studija je kvantitativno odrediti čimbenike selektivnosti liganda za niz metalnih iona, te konstante stabilnosti njihovih kompleksa.

ESI-MS je metoda koja ima neke prednosti za studije domaćin-gost interakcija u odnosu na tradicionalne metode kao što su potenciometrija, spektrofotometrija ili NMR, što se očituje kroz lakšu interpretaciju spektra otopina s više domaćin-gost parova, potrebu za manjom količinom uzorka za analizu i vrlo kratkim vremenom analize.[187] Uočeno je da distribucija kompleksa u plinskoj fazi ima dobru podudarnost s ravnotežnom distribucijom kompleksa u otopini,[188] što omogućuje istraživanje selektivnosti domaćina.

Odziv iona je povezan s njegovom energijom solvatacije, što znači da kompleks (koji sadrži molekulu domaćina, kao što je npr. makrocikl) i gostujući ion (npr. metalni ion istog naboja), imaju slične odzive pri kontroliranim i konstantnim eksperimentalnim uvjetima.[189] U takvim uvjetima relativni intenzitet signala je u korelaciji s relativnom koncentracijom analiziranog uzorka u otopini. Williams, Brodbelt i Bartsch[190] analizirali su selektivnost vezanja metalnih iona nekoliko alkalijskih i prijelaznih metala na makrocikle. Zaključili su da relativni afinitet metala ovisi o vrsti, broju i rasporedu heteroatoma (N,O) u makrociklu, o veličini šupljine makrocikla i o prisutnosti aromatskih supstituenata.

2.3.1.2. Usporedba ESI-MS i tradicionalnih tehnika za proučavanje nekovalentnih interakcija

2.3.1.2.1. Kvalitativna usporedba

U većini studija signali dobiveni ESI-MS tehnikom su u korelaciji s podacima dobivenim drugim tehnikama (osim u slučajevima prisutnosti Na^+ adukta, nastalog uslijed utjecaja otapala ili kod različitog broja kiselih protona). Takvu korelaciju su prikazali Burns i suradnici,[191] kod proučavanja klastera u plinskoj fazi za koordinacijske komplekse *tris* (2,2´-bipiridil)željzo(II) i rutenij(II) kompleks u metanolu. Razlike između rezultata ESI-MS-a i drugih tradicionalnh tehnika su uočavanje kompleksa (specija) koji nastaju kao artefakti[192] ili koji nastaju kao posljedica polimerizacije i fragmentacije kod ESI-MS.[193]

2.3.1.2.2. Kvantitativna usporedba

U većini slučajeva ne postiže se značajna kvantitativna komparacija rezultata ESI-MS i drugih tehnika. Tako je uočen učinak pH vrijednosti na distribuciju specija, odnosno pronađene su iste specije, ali u različitim koncentracijama.

Ross i suradnici[194] proučavali su distribuciju nekoliko metalnih iona, pri različitim pH vrijednostima u otopinama voda/acetonitril (1:1) i voda/metanol (1:1) u prisutnosti različitih liganada. Zaključili su da se porastom pH vrijednosti povečava afinitet pojedinih liganada za metalne ione, kao i tendencija da metalni ioni vežu više liganada.

Tablica 2:Usporedba mogućnosti ESI-MS i tradicionalnih tehnika

Tehnika	Broj detektiranih specija	Prepoznavanje stehiometrije	Izračun konstante ravnoteže	Granica detekcije (mol dm^{-3})
Potenciometrija	nije idealno	nije idealno	izvrsno	10^{-4}
UV-Vis	nije idealna	dostatno	dobro	10^{-3}
NMR	dostatno	dostatno	nije idealno	10^{-3}
ESI-MS	dobro	izvrsno	ne(?)	10^{-6}

U konačnici može se zaključiti da je ESI-MS vrlo dobra tehnika za kvalitativno, a manje za kvantinativno određivanje specija. Njena posebna vrijednost očituje se kod analize vrlo razrijeđenih uzoraka i studija ravnotežne u otopinama, a u kombinaciji s ostalim tradicionalnim tehnikama omogućuje bolje razumijevanje analiziranih sustava.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Sinteza

3.1.1. Materijali i metode

Sve kemikalije (otapala, soli i ostale kemikalije) koje su korištene u izradi ovog doktorata, njihovi proizvođači i čistoća, navedene su u prilogu A-1.
Otapala su destilirana s odgovarajućih agensa za sušenje kratko vrijeme prije upotrebe.
Sinteza u mikrovalnom reaktoru provedena je pomoću instrumenta Monowave 300® (Anton Paar) u zatvorenom sustavu.

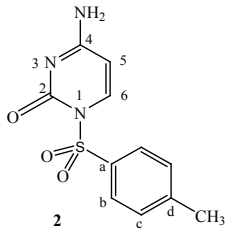
Tankoslojna kromatografija (TLC) rađena je na folijama silikagela DC-plastikfolien Kieselgel 60 F_{254} (Merck), a spojevi su detektirani UV lampom pri 254 i 365 nm. Flash kromatografija provedena je na stupcu primjenom silikagela Kieselgel 60, p.a, veličina pora 60 Å, 35–75 μm veličina čestica (Fluka). Preparativna kromatografija provedena je na staklenim pločama (20 × 20 cm) sa slojem silikagela debljine 2 mm Kieselgel 60 HF_{254} (Merck) ili na staklenim pločama (20 × 20 cm) sa slojem silikagela debljine 2 mm SIL G-200 UV_{254} (Macherey-Nagel). Ploče su aktivirane 2 h pri 100 ^{o}C.

Spektri ^{1}H NMR i ^{13}C NMR snimljeni su na Bruker Avance DPX 300 i 600 (300/75 Hz i 600/150 MHz) u DMSO-d_6. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm u odnosu na DMSO-d_6 kao unutrašnji standard, a konstante sprege (J) u hercima (Hz). U NMR spektrima za proširene signale protona i atoma ugljika upotrebljena je oznaka br = broad (brs = prošireni singlet).

Spektri masa snimljeni su pomoću više instrumenta, ovisno o potrebama analize, odnosno je li se radilo o identifikacijskim spektrima ili spektrima ESI-MS^n (n>2) . Uzorci su ionizirani elektroraspršenjem u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) načinu rada na svim spektrometrima. Opisi metoda, kao i uvjeti snimanja opisani su u eksperimentalnom dijelu koji se odnosi na spektroskopski dio.

3.1.2. Priprava spojeva

3.1.2.1. 1-(*p*-Toluensulfonil)citozin (**2**) [TsC **2**][10,12]

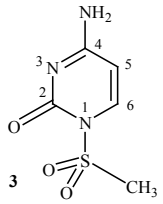


2

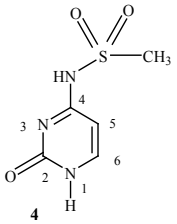
Suspenzija citozina **1** (7 g, 63 mmol) i *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) (46,62 mL, 189 mmol) u suhom acetonitrilu (140 mL), pod argonom, refluksirana je 30 minuta. Dobivena otopina ohlađena je pri 0 °C i dodan je TsCl (14,42 g, 75,6 mmol). Nakon 45 minuta refluksiranja bezbojna otopina je uparena pod sniženim pritiskom. Ostatku je dodan metanol i nastali talog je odfiltriran i prekristaliziran iz vrućeg metanola. Izolirano je 13,3 g (80 %) produkta **2** u obliku bijelih kristala:

^{1}H NMR (DMSO-d$_6$) δ/ppm: 8,14 (d, 1H, $J_{6,5}$ = 7,8 Hz, H-6), 7,95 (brs, 2H, NH_2), 7,87 (d, 2H, J = 8,1 Hz, Ts-b), 7,46 (d, 2H, J = 8,1 Hz, Ts-c), 5,98 (d, 1H, $J_{5,6}$ = 7,8 Hz, H-5), 2,42 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d$_6$) δ/ppm: 166,27 (s, C-4), 151,22 (s, C-2), 145,61 (s, Ts-d), 139,73 (d, C-6), 134,47 (s, Ts-a), 129,80 (d, Ts-c), 129,02 (d, Ts-b), 97,50 (d, C-5), 21,20 (q, CH_3). HRMS: *m/z*: 265,0401 $[M]^+$; izračunato $C_{11}H_{11}N_3O_3S$: 265,0515.

3.1.2.2. 1-Metansulfonilcitozin (**3**) [MsC **3**] i 4-*N*-metansulfonilcitozin (**4**) [MsC **4**][10,17]



3



4

Smjesa citozina **1** (500 mg, 4,50 mmol) i BSA (3,3 mL, 13,50 mmol) zagrijana je uz refluks u suhom acetonitrilu (15 mL) 30 minuta. Bezbojna otopina je ohlađena na 0 °C i dodan je MsCl (0,42 mL, 5,40 mmol). Otopina je zagrijavana uz refluks tijekom noći. Otapalo je potom upareno, a ostatak se čisti flash kromatografijom (CH_2Cl_2:CH_3OH 9:1). Izolirani su 1-

metansulfonilcitozin (**3**) (91 mg, 11,5 %) i 4-*N*-metansulfonilcitozin (**4**) (226 mg, 26,5 %) u obliku bijelih kristala. Ukupno iskorištenje reakcije je 38 %.

1-Metansulfonilcitozin (**3**): ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,92 (d, 2H, NH_2, J = 8,7 Hz), 7,86 (d, 1H, H-6, J = 7,8 Hz), 5,91 (d, 1H, H-5, J = 7,8 Hz), 3,64 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 166,23 (s, C-4), 152,20 (s, C-2), 139,26 (d, C-6), 96,76 (d, C-5), 41,16 (q, CH_3).

Analiza izračunatog masenog udjela elemenata, w/%, za $C_5H_7N_3O_3S$ (M_r = 189,20) je: C 31,74, H 3,73, N 22,21; nađeno: C 31,92, H 4,01, N 22,02.

4-*N*-Metansulfonilcitozin (**4**): ^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 11,64 (s, 2H, NH-SO_2- i NH), 7,60 (d, 1H, H-6, J = 7,6 Hz), 6,35 (d, 1H, H-5, J = 7,6 Hz), 2,95 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 160,37 (s, C-4), 149,70 (s, C-2), 144,13 (d, C-6), 95,48 (d, C-5), 42,21 (q, CH_3).

Analiza izračunatog masenog udjela elemenata, w/%, za $C_5H_7N_3O_3S$ (M_r = 189,20) je: C 31,74, H 3,73, N 22,21; nađeno: C 31,92, H 3,71, N 22,12.

3.1.2.3. [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**)

U zagrijanu otopinu 1-(*p*-toluensulfonil)citozina (**2**) (245 mg, 0,92 mmol) u metanolu (20 mL) doda se otopina $CuCl_2$ x 2 H_2O (78 mg, 0,46 mmol) u metanolu (9 mL). Hlađenjem otopine dolazi do kristalizacije i kristali kompleksa **5** su odfiltrirani i sušeni u vakuumu. Dobiveno je 230 mg (75 %) plavo-zelenih kristala kompleksa **5**.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 8,25 (brs, 1H, H-6), 7,89 (brs, 2,5H, Ph-b + dio od NH_2), 7,42 (brs, 3,5H, Ph-c + dio od NH_2), 2,34(brs, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 143,22 (s, Ph-d), 132,13 (s, Ph-a), 127,58 (d, Ph-c), 126,75 (d, Ph-b), 19,27 (q, CH_3).

HRMS: *m/z*: 362,9494 (3,3 ppm) $[M\text{-}TsC\text{-}Cl]^+$; izračunato $C_{11}H_{11}N_3O_3SCuCl$: 362,9506; *m/z*: 627,9995 (5,1 ppm) $[M\text{-}Cl]^+$; izračunato $C_{22}H_{22}N_6O_6S_2CuCl$: 628.0027; *m/z*: 893,0547 (0,1 ppm) $[M+TsC\text{-}Cl]^+$; izračunato $C_{33}H_{33}N_9O_9S_3CuCl$: 893,0548.

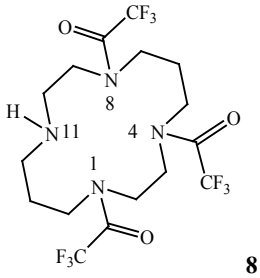
3.1.2.4. [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**6**)

U zagrijanu otopinu 1-metansulfonilcitozina (**3)** (267 mg, 1,41 mmol) u metanolu (20 mL) doda se otopina $CuCl_2$ x $2H_2O$ (120,3 mg, 0,71 mmol) u metanolu (10 mL). Nakon hlađenja

dolazi do kristalizacije i kristali kompleksa **6** su odfiltrirani i sušeni u vakumu. Dobiveno je 308 mg (85 %) tamno zelenog praha **6**.

^{1}H NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 7,97 (brs, 2H, NH_2), 7,32 (brs, 1H, H-6), 3,67 (s, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (DMSO-d_6) δ/ppm: 136,06 (d, C-6), 39,01 (q, CH_3).
HRMS: *m/z*: 475,9388 (2,7 ppm) $[M\text{-}Cl]^+$; izračunato $C_{10}H_{14}N_6O_6S_2CuCl$: 475,9401.

3.1.2.5. 1,4,8-Tris(trifluoracetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan (**8**)[195] [tTFA-ciklam **8**]



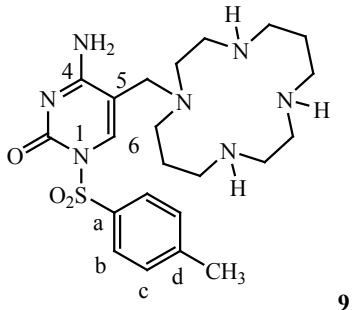
8

Etil-trifloracetat (18,0 mL, 150,3 mmol) dokapava se na sobnoj temperaturi u smjesu ciklama (**7)** (7,53 g, 37,58 mmol) i trietilamina (5,20 mL, 37,58 mmol) u metanolu (30 mL) kroz 5 minuta. Nakon toga reakcijska smjesa se ohladi u ledenoj kupelji da bi se nadzirala blaga egzotermna reakcija. Nakon miješanja od 5 sati otapalo se upari, a sirovi produkt se filtrira kroz kolonu sa silikagelom (25 g) uz eluiranje s etil-acetatom (EtOAc). Nakon uparavanja otapala i sušenja dobiven je zaštićeni ciklam **8** u obliku bijele pjene (17,05 g, 93 %).

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ/ppm: 3,85–3,25 (m, 12H), 2,90–2,80 (m, 2H), 2,74–2,50 (m, 2H), 2,30–1,90 (m, 2H), 1,85–1,63 (m, 2H), 1,25–0,60 (m, 1H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$): δ/ppm: 158,7–157,3 (m, C=O), 122,1 (q, CF_3, $J_{C,F}$~264 Hz, dalje podijeljen zbog konformera), 51,2–46,2 (m, CH_2-N), 29,4–27,8 (m, CH_2). ^{13}C NMR je kompliciran zbog postojanja C-F veze i postojanjem konformera na sobnoj temperaturi.

ESI-MS: *m/z*: 489,30 $[MH]^+$; izračunato $C_{16}H_{21}F_9N_4O_3 \cdot H^+$: 489,20.

3.1.2.6. Ciklam-TsC konjugat (**9)**



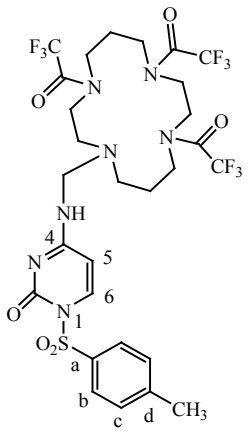
9

1-(*p*-Toluensulfonil)citozin (**2**) (200,5 mg, 0,75 mmola), 1,4,8,11–tetraazaciklotetradekan (**7)** (300,5 mg, 1,50 mmol) i paraformaldehid (46,3 mg, 1,54 mmol) suspendirani su u etanolu (5 mL), u epruveti za mikrovalni reaktor. U suspenziju se dokapa koncentrirana octena kiselina (171,8 μL, 3,00 mmol). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju pri 100 °C u trajanju od 30 min. Dobivena žuta otopina upari se pod sniženim pritiskom, a uljasti ostatak čisti se preparativnom kromatografijom u sustavu CH_2Cl_2/MeOH (3:1). Izolirano je 54 mg (15 %) spoja **9** u obliku bijelog praha.

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 8,45 (s, 1H, H-6), 7,62 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ts-b), 7,14 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ts-c), 4,26–3,20 (m, prsten-NH + NH_2 + H_2O), 3,16 (s, 2H, C5-CH_2-N), 2,95–2,66 (m, 12H, prsten-CH_2-NH), 2,30 (m, 4H, prsten-CH_2), 2,04 (s, 3H, CH_3), 1,86 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1,69 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ/ppm: 167,90 (s, C-4), 162,37 (s, C-2), 144,26 (s, Ts-d), 138,91 (s, Ts-a), 131,43 (d, C-6), 128,04 (d, Ts-c), 126,63 (d, Ts-b), 72,41 (s, C-5), 68,87 (t, C5-CH_2-N), 53,30 (t, prsten -CH_2), 52,54 (t, prsten -CH_2), 51,62 (t, prsten -CH_2), 50,79 (t, prsten -CH_2), 49,01 (t, prsten -CH_2), 48,58 (t, prsten -CH_2), 46,54 (t, prsten -CH_2), 45,46 (t, prsten -CH_2), 25,87 (t, $CH_2\underline{C}H_2CH_2$), 23,62 (t, $CH_2\underline{C}H_2CH_2$), 20,89 (q, CH_3).

ESI-MS: *m/z*: 476,10 $[M-H]^-$; izračunato $C_{22}H_{35}N_7O_3S$-H^+: 476,25.

3.1.2.7. tTFA-ciklam-TsC konjugat (**10)**



10

1-(*p*-Toluensulfonil)citozin (**2**) (200,5 mg, 0,75 mmola), tTFA-ciklam **8** (732,2 mg, 1,50 mmol) i paraformaldehid (46,3 mg, 1,54 mmol) suspendiraju se u epruveti za mikrovalni reaktor u etanolu (5 mL). U suspenziju se doda koncentrirana octena kiselina (171,8 μL, 3,00 mmol). Tako pripremljena smjesa podvrgava se mikrovalnom zračenju pri 100 °C u trajanju od 30 min. Reakcijska smjesa se filtrira pri čemu se dobije bijeli prah (TsC) i žuta otopina. Dobivena otopina se upari pod sniženim pritiskom, a uljasti ostatak čisti se preparativnom kromatografijom u sustavu CH_2Cl_2/MeOH (3:1). Izoliran je spoj **10** u obliku bijelog praha (76 mg, 27 %).

Ista metoda s istim molarnim omjerima reaktanata ponovljena je uz produljeno vrijeme reakcije u mikrovalnom reaktoru (100 ºC, 90 minuta), te je tako izolirano 17,01 mg (6 %) spoja **10**. S druge strane ovisno o brzini izolacije konjugat **10** izoliran je u 21–51 %-tnom iskorišenju.

^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 9,03–8,49 (brs, 1H, NH), 8,30–7,99 (m, 1H, H-6), 7,97–7,70 (m, 2H, Ts-b), 7,46–7,41 (m, 2H, Ts-c), 6,12–5,93 (m, 1H, H-5), 4,27–3,94 (brd, 2H, C5-CH_2-N), 3,86–3,21 (m, prsten-CH_2-NH+H_2O), 2,66–2,64 (m, 2H, prsten-CH_2), 2,46–2,31 (brs, 3H, CH_3), 1,98 (m, 2H, CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2), 1,84–1,55 (m, 2H, CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm: 164,56 (brs, C-4), 157,07–155,43 (m, CF_3-$\underline{C}$=O), 150,77 (brs, C-2), 145,37 (brs, Ts-d), 138,94 (brd, C-6), 133,92 (brs, Ts-a), 129,48 (d, Ts-c), 128,99–128,80 (m, Ts-b), 121,61–113,98 (q, CF_3, $J_{C,F}$~260 Hz, dalje podijeljen zbog konformera), 97,52 (brd, C-5), 58,66–56,93 (m, N-CH_2-N), 52,88–43,53 (m, CH_2-N), 28,38–

23,38 (m, CH_2-$\underline{CH_2}$-CH_2), 21,04 (q, CH_3). NMR spektri su kompliciranizbog postojanja C-F veze i konformera na sobnoj temperaturi.
ESI-MS: *m/z*: 766,20 $[M+H]^+$; izračunato $C_{28}H_{32}F_9N_7O_6S+H^+$: 766,25.

3.2. Spektroskopski dio

3.2.1. Polazni materijali i metode

3.2.1.1 Kemikalije

Sve kemikalije (otapala, soli i ostale kemikalije) koje su korištene navedene su u prilogu A-1. Otapala korištena za spektroskopska mjerenja bila su HPLC ili GC stupnja čistoće (Sigma – Aldrich) i korištena su bez dodatnih pročišćavanja. Soli koje su korištene: $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, $MgSO_4 \times 6\ H_2O$, $CuCl_2 \times 2\ H_2O$, NaCl, KCl, i $CaCl_2$ (Sigma - Aldrich, Merck i Kemika) korištene su bez dodatnih pročišćavanja.

3.2.1.2. Mjerni instrumenti

Analiza spektrometrijom masa provedena je pomoću nekoliko instrumenata, a kod svih je ionizacija uzoraka provedena elektroraspršenjem u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) načinu rada, uz konačnu koncentraciju uzoraka, c = 0,05 mg/mL.

Mase analiziranih kompleksa koji nastaju u reakciji korištenih soli s ispitivanim ligandima i kompleksima liganada, jesu mase koje sadrže stabilne izotope elemenata vezanih u komplekse.[196] Spektri oba liganda, 1-(*p*-toluensulfonil)citozina (**2)** i 1-metansulfonilcitozina (**3**) kao i bakrenih kompleksa tih liganada $[Cu(1\text{-}TsC\text{-}N3)_2Cl_2]$ **(5)** i $[Cu(1\text{-}MsC\text{-}N3)_2Cl_2]$ (**6**) snimani su i analizirani pri istim MS uvjetima.

1. Identifikacijski spektri masa su snimljeni pomoću spektrometra Agilent 6410 Triple Quad tvrtke Agilent Technologies s elektronskim multiplikatorom kao detektorom. Ionizacija uzoraka vršila se elektroraspršenjem u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) načinu rada. Uzorci su pripremljeni otapanjem u DMSO ili DMF te razrjeđeni s MeOH do konačne koncentracije mjerenja od 0,05 mg/ml. Spektar je sniman u rasponu *m/z* 10-2000. Brzina injektiranja uzorka bila je 3 μL/min. Dušik se koristio

kao pomoćni i zaštitni plin. Temperatura kapilare bila je u rasponu 150-300 °C. Napon izvora bio je 4,5 kV dok je napon kolizijske ćelije iznosio 80-180 V. U sustavu tekućinske kromatografije - masene spektrometrije (LC-MS) pomoću DAD detektora sniman je UV/VIS spektar u rasponu valnih duljina od 190 do 600nm. Za pregled i analizu spektara korišten je program Mass Hunter (Agilent Technologies, Inc. 2006-2007). Mase su izolirane u rasponu od ±2 amu (Da).

2. Spektri masa snimljeni su i pomoću masenog spektrometra LCQ Deca s ion trap detektorom tvrtke ThermoFinnigan (San Jose, CA, USA). Ionizacija uzoraka vršila se elektroraspršenjem u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) načinu rada. Brzina injektiranja bila je 5 μL/min. Dušik se koristio kao pomoćni i zaštitni plin. Helij je korišten kao kolizijski plin u ion trap detektoru. Brzina protoka zaštitnog plina bila je 85 jedinica a pomoćnog plina 30 jedinica (arbitrarne jedinice). Napon izvora bio je 4.5 kV, napon kolizijske ćelije iznosio je 17 V, a temperatura kapilare 250 °C. Spektar je sniman u rasponu *m/z* 150–2000. Za MS/MS karakterizaciju molekulskog iona, odnosno za fragmentaciju istog korištene su različite kolizijske energije (CE). Mase su izolirane u rasponu od ±1 amu (Da).
3. Tandemske ESI-MS^n (n>2) studije su provedene pomoću ion trap spektrometra masa amaZon ETD (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) uz ionizaciju elektroraspršenjem. Prilikom snimanja spektara masa pozitivnih iona kapilara za unos uzorka bila je uzemljena dok je napon na ulaznoj metaliziranoj staklenoj kapilari instrumenta bio –/+ 4500 V. Plin za pospješivanje raspršenja (dušik) uveden je u ionski izvor pod tlakom od 8,0 psi jedinica. Plin za desolvataciju (dušik) je pri protoku od 5,0 L/min i temperaturi od 250 °C usmjeren kroz ionski izvor nasuprot puta iona koji su uslijed dodatnog pada napona za 500 V na kraju staklene kapilare fokusirani i uvedeni u područje sniženog tlaka u instrumentu te daljim gradijentom tlaka i napona odvedeni u analizator masa. Snimani su spektri masa u rasponu od *m/z* 70-1500, a otopine uzorka su direktno uvođene u instrument pomoću infuzijske pumpe uz stalni protok od 1 μL/min. Koncentracija otopine snimanih uzoraka bila je 0,5 pmol/μL. Prilikom snimanja tandemnih ili višestupanjskih fragmentacijskih spektara MS^n izoliran je signal iona koji se fragmentira, a mase su izolirane u rasponu od ±1 amu (Da), dok su relativne kolizijske energije bile od 0,2-1 eV.

4. Spektri masa visoke rezolucije snimljeni su pomoću Micromass Q-Tof2 hybrid kvadroplolnog analizatora masa s vremenom leta (time-of-flight) masenom sa Z-sprej sučeljem, koji detektira ione u intervalu 100-2000 Da, u kontinuiranom modu. Kao vanjski kalibracijski standardi korišteni su reserpin i sulfadimetoksin definirane mase ($[M+H]^+$ = 609,2812 Da i $[M+H]^+$ = 311,0814 Da). Ionizacija uzorka vršila se elektroraspršenjem uz napon izvora od 3.5 kV i kolizijske ćelije od 30 V. Spektri su snimani u rasponu *m/z* 10-1000 Da. Brzina injektiranja uzorka bila je 5-10 µL/min, a protok desolvatacijskog plina bio je 500 L/h. Temperatura kapilare bila je 100 °C, a desolvatacijska temperatura održavana je na 150 °C.

3.2.2. Postupci priprave uzoraka

Izvorne otopine svih analiziranih spojeva (ligandi **2** i **3**, Cu kompleksi liganada **5** i **6**, te konjugat s ciklamom **9** i konjugat sa zaštićenim ciklamom **10**) pripremljene su otapanjem uzoraka u otapalima DMSO ili DMF, u masenoj koncentraciji 1 mg/mL. Daljnje razjeđenje otopina bilo je u volumnom omjeru 1:100 s određenim otapalom, ovisno o provedenoj analizi (MiliQ H_2O, ACN, MeOH). Za svaki analizirani spoj (**2**, **3**, **5**, **6**, **9** ili **10**), masa spoja u izvornoj otopini je preračunata u količinu tvari (*n*) (*Tablica 3*). Sukladno tim količinama tvari napravljene su izvorne otopine soli za svaki analizirani spoj, što znači da su količine npr. 1-(*p*-toluensulfonil)citozina **2** u ishodnoj otopini i količine soli ($MgSO_4 \times 6\ H_2O$, $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$, $CaCl_2$, KCl, NaCl ili $CuCl_2 \times 2\ H_2O$) u njihovim ishodnim otopinama bile iste).

Tablica 3: Primjer pripreme izvornih otopina **2** i NaCl

m(**2**)	*n* (**2**)	*n*(NaCl)	*m*(NaCl)	*V*(otapala za izvornu otopinu)
1 mg	0,0037mmol/mL	0,0037mmol/mL	0,22 mg	1 mL

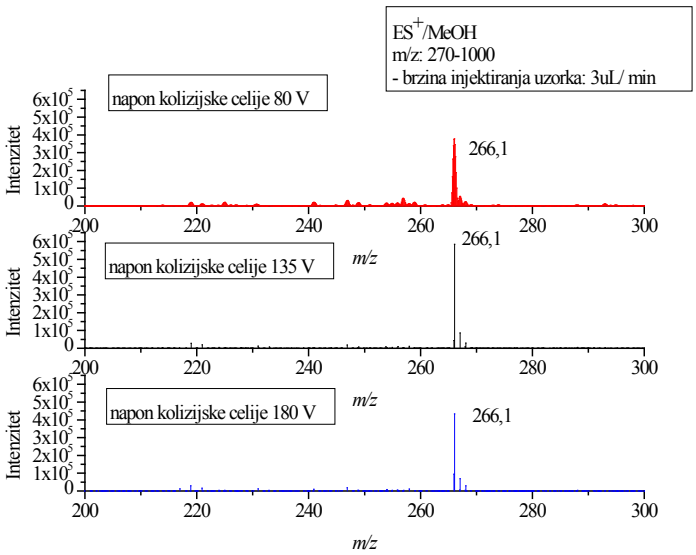
Otopine soli pripremljene su otapanjem u MeOH, a daljnje razrjeđenje otopina bilo je u volumnom omjeru 1:100 s MeOH. Kod pripreme „miješanih otopina“, odnosno otopina liganda **2** i **3** te Cu kompleksa liganada **5** i **6** sa solima, pripremljene su otopine u količinskim

omjerima ligandi/soli, odnosno Cu kompleksi/soli: M^+=1:1 do 5:1. Uzorci za MS mjerenja pripremljeni su u konačnim koncentracijama ($c=10^{-5}$ mol dm^{-3} i direktno uneseni u spektrometar masa.

3.2.3.Razvoj metode ESI-MS i odabir otapala

3.2.3.1. Razvoj metode ESI- MS

Metoda ESI-MS se pokazala kao dobra metoda za karakterizaciju metalnih kompleksa kao i za dobivanje informacija o molekulskoj masi, naboju i izotopnoj raspodjeli molekula.[151,152] Ima blagi način ionizacije koji je stoga vrlo pogodan za proučavanje kompleksa prijelaznih metala u različitim otapalima. Stoga smo i mi odlučili upotrijebiti tu tehniku ali je trebalo pronaći najbolje uvjete i parametre. Snimajući u pozitivnom i negativnom načinu rada u navedenim otapalima mijenjali smo temperaturu kapilare od 150 do 300 °C, napon kolizijske ćelije od 80 do 180 V i napon izvora od 4,0 kV do 4,5 kV prateći pritom očekivane signale uzoraka kompleksa i njihove fragmente, primjerice za kompleks [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**) signal kod *m/z* 628 asigniran kao [(1-TsC)$_2$CuCl]$^+$.



Slika 20. Cjeloviti spektri [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**) u metanolu i sustavu otapala MeOH/DMSO (100/1) pri različitim vrijednostima napona kolizijske ćelije masenog instrumenta: 80 V, 135 V i 180 V

Razvoj metode krenuo je s podešavanjem napona kolizijske ćelije jer je to prvi podešivi parametar s kojim se regulira energija cijepanja (engl. source fragmentation). Asigniranjem i detaljnom analizom spektara, (*Slika16*), i drugih spektara koje smo također snimali mijenjajući parametre instrumenta primjetili smo da je pri višem naponu kolizijske ćelije (*Slika 20a*) jedini vidljivi signal liganda **2** opažen kod *m/z* 266,1 i asigniran kao vodikov adukt **[**M(+H)**]**$^+$ vrlo malog intenziteta. Signali kompleksa su izostali. Nakon snižavanja napona kolizijske ćelije (*Slika 20b*), signal liganda **2** na *m/z* 266,1 vidljivo je manji nego na spektru prikazanom na *Slici 20a*. Osim toga spektar je kompleksniji, ali i dalje izostaju signali kompleksa. Promjenom napona na 135 V (*Slika 20c*) uočili smo da je signal kod *m/z* 266,1 velikog intenziteta, a pojavio se i signal protoniranog dimera na *m/z* 531,1, te signali malog intenziteta na *m/z* 593,0 i 628,0 koji odgovaraju molekulskim vrstama kompleksa **5** asigniranih kao $[(TsC)_2Cu(-H)]^+$ i $[(TsC)_2CuCl]^+$.

Nakon analize snimljenih spektara odlučili smo daljnja istraživanja nastaviti primjenom dolje navedene metode pomoću masenog spektrometra Agilent 6410 Triple Quad tvrtke Agilent Technologies s elektronskim multiplikatorom kao detektorom te ionizacijom pomoću elektroraspršenja s radom u pozitivnom (ES^+) i negativnom (ES^-) načinu rada. Za fragmentaciju produkt iona po potrebi je mijenjana kolizijska energija.

Metoda:

Raspon *m/z* 10-2000.

Brzina injektiranja uzorka 3 μL/min.

Temperatura kapilare 300 °C.

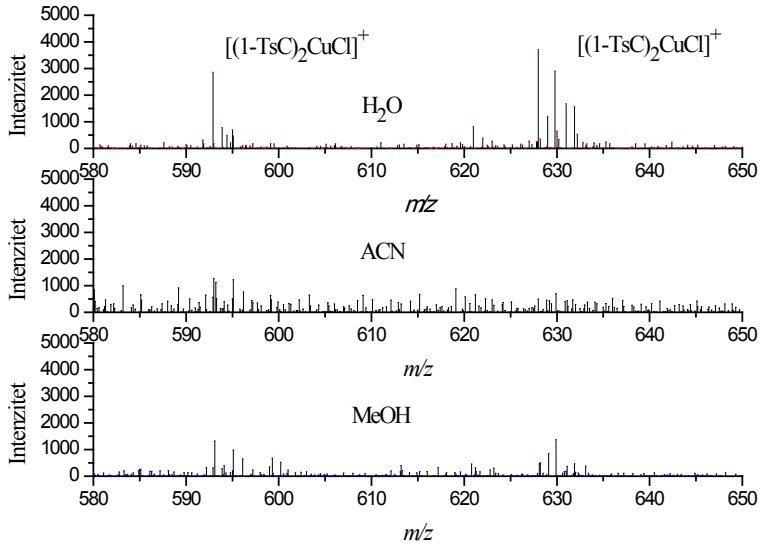
Napon izvora 4,5 kV

Napon kolizijske ćelije 135 V.

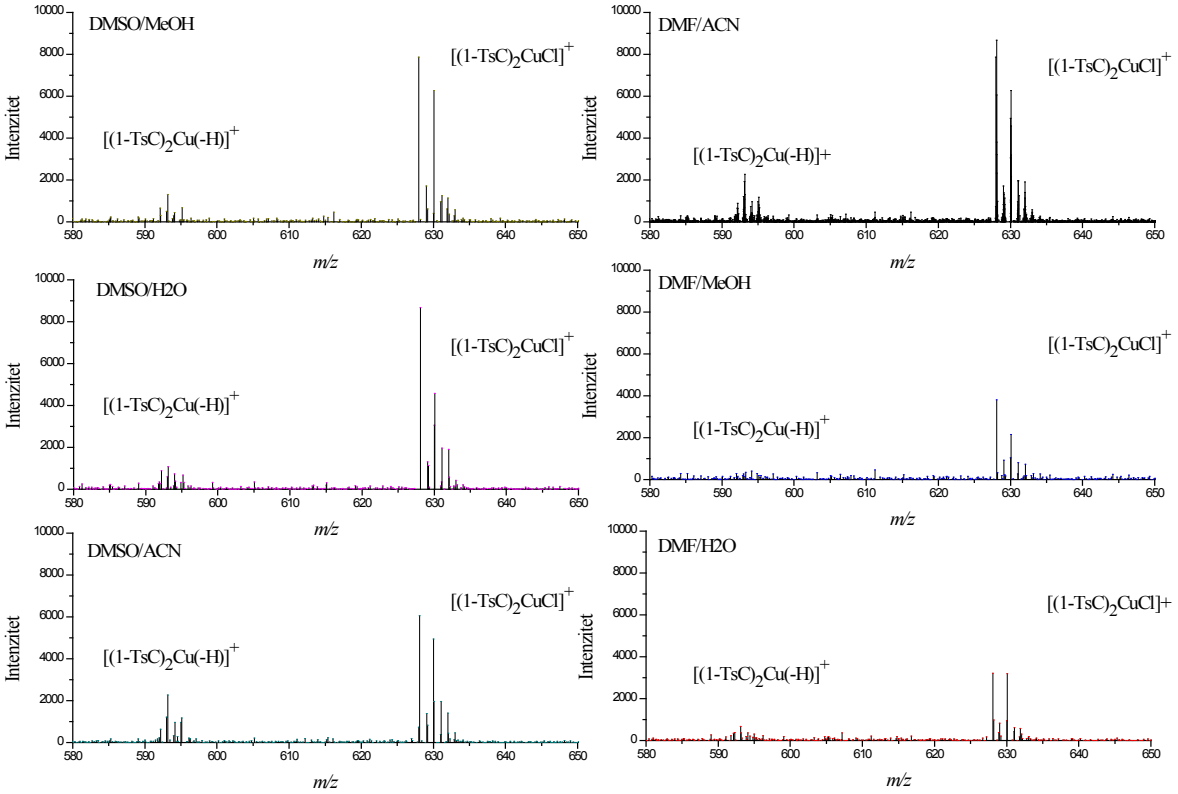
3.2.3.2. Odabir otapala

Kako bismo odredili koje nam je najpogodnije otapalo za daljnja istraživanja miješanih otopina kompleksa bakar(II) i soli koristili smo ultra čistu H_2O (MiliQ), acetonitril (ACN), MeOH i te miješane otopine otapala DMSO/MeOH, H_2O (MiliQ), ACN te DMF/MeOH H_2O, ACN.

Signal na *m/z* 628,0 asigniran kao $[(TsC)_2CuCl]^+$ odabran je kao referentni signal prisutnosti kompleksa i najbolje se uočava kod spektara snimljenih u smjesi otapala. Zbog toga smo u daljnjim istraživanjima pripremili uzorke u smjesi otapala DMSO/MeOH, osim u slučaju ciklamskih konjugata koji su otopljeni u čistom MeOH.



Slika 21a: Cjeloviti spektri $[Cu(1\text{-}TsC\text{-}N3)_2Cl_2]$ (***5***) snimljenih u različitim otapalima: voda, ACN i MeOH.



Slika 21b; Cjeloviti spektri [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**) snimljenih u različitim smjesama otapala: DMSO/MeOH, DMSO/H_2O, DMSO/ACN, te DMF/MeOH, DMF/H_2O i DMF/ACN.

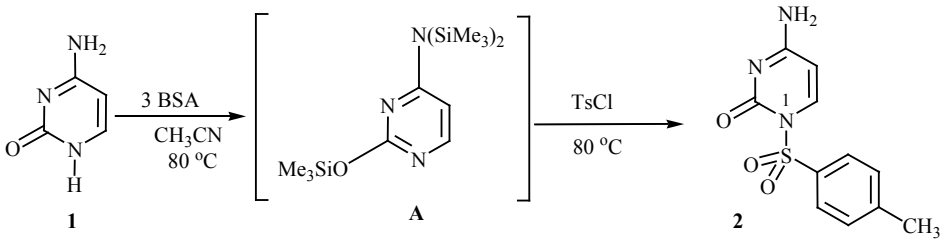
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

U nastavku istraživanja novih biološki aktivnih *N*-sulfonilpirimidinskih derivata i proučavanju njihovih bioloških i fizikalno kemijskih-svojstava, a u okviru ove doktorske disertacije sintetizirani su prema našim poznatim metodama[10,12] *N*-sulfonilcitozinski ligandi i njihovi Cu(II) kompleksi te novi konjugati *N*-sulfonilcitozinskog liganda i ciklama. Stabilnost navedenih spojeva i selektivnost vezivanja metalnih kationa proučena je pomoću tehnika ESI-MS/MS.

4.1. Sinteza spojeva

Primjenom metode razvijene u našem laboratoriju provedena je reakcija kondenzacije citozina **1** s *p*-toluensulfonil-kloridom (TsCl) (*Shema 9*).[10,12] Za aktivaciju nukleobaze upotrijebljen je *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamid (BSA) u acetonitrilu pri čemu prvo nastaje sililirani međuprodukt **A** koji zatim reagira s TsCl dajući 1-(*p*-toluensulfonil)citozin (**2**) (TsC **2**) u 80 %-tnom iskorištenju.



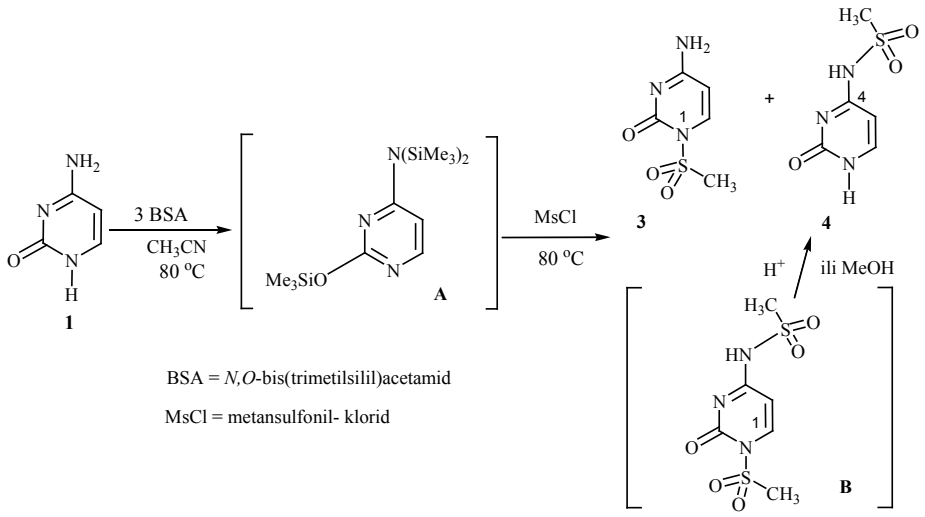
BSA = *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamid

TsCl = *p*-toluensulfonil- klorid

Shema 9. Sintetski put priprave liganda TsC **2** BSA metodom.

Istu BSA metodu primjenili smo u reakciji citozina **1** s metansulfonil-kloridom (MsCl) (*Shema 10*). Međutim ova reakcija nije selektivna pa nastaje smjesa *N*-1 i *N*-4 supstituiranog produkta: 11,5 % 1-metansulfonilcitozina (MsC **3**) i 26,5 % 4-*N*-metansulfonilcitozina (**4**).[10,17] U reakciji s MsCl prvo nastaje *N*-1 izomer MsC **3** i zatim *N*-1,*N*-4-disupstituirani produkt **B** koji je u kiselim uvjetima reakcije nestabilan (u reakciji dolazi do oslobađanja HCl) i dolazi

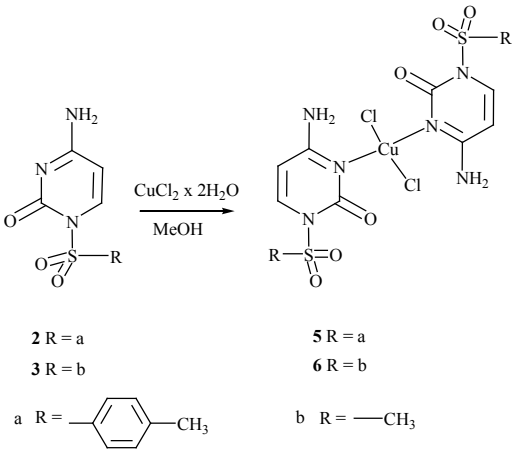
do hidrolize N(1)-SO_2 veze te nastaje *N*-4 izomer MsC **4**. Produkti se mogu odvojiti kromatografskim metodama.



Shema 10. Reakcija kondenzacije citozina **1** s MsCl.

Dokaz da je *N*-1,*N*-4-disupstituirani produkt **B** međuprodukt u reakciji kondenzacije BSA metodom slijedi iz činjenice da je međuprodukt **B** (dobiven na drugi način u reakciji citozina **1** s MsCl u piridinu) stabilan u kristalnom obliku dok stajanjem u metanolu s vremenom dolazi do hidrolize N(1)-SO_2 veze pri čemu nastaje *N*-4 izomer **4**.

Cu(II) kompleksi *N*-sulfonilcitozinskim liganda TsC **2** i MsC **3** sintetizirani su uz malu modifikaciju naše metode iz koncentriranijih metanolnih otopina. Tako su reakcijom 1 mola $CuCl_2$ x 2 H_2O uz 2 mola *N*-sulfonilcitozinskih liganda TsC **2** i MsC **3** iz vrućih otopina metanola (*Shema 11*) kristalizirali Cu(II) kompleksi u nešto boljim iskorištenjima: [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$$Cl_2$] (**5**, 75 %) i [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$$Cl_2$] (**6**, 95 %).



Shema 11. Priprava Cu(II) kompleksa [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**) i [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**6**).

Dobiveni kompleksi **5** i **6** su 10 puta bolje topljivi u alkoholnim otopinama nego sami *N*-sulfonilcitozinski ligandi TsC **2** i MsC **3**. Bolja topljivost kompleksa **5** sigurno je doprinjela većem/bržem ulasku spoja kroz staničnu membranu u biološkim pokusima. To sve je rezultiralo s više od 100 puta većom *in vitro* aktivnošću kompleksa **5** u odnosu na ligand TsC **2**, na stanicama leukemije (K562).[197]

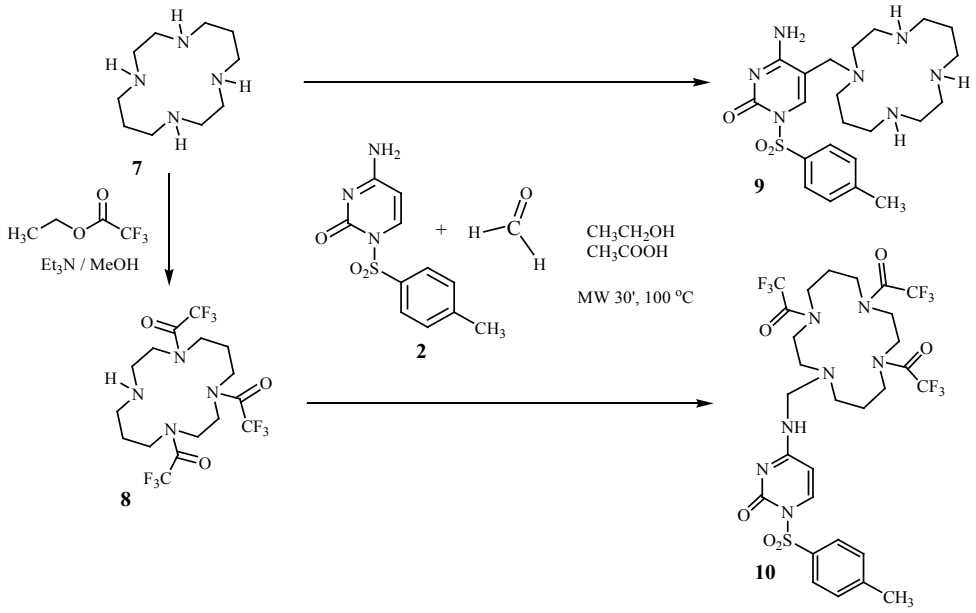
S druge strane, u literaturnom pregledu je naglašeno da makrociklički poliamini predstavljaju važne ligande u kompleksiranju prijelaznih metala i da su najčešće korišteni makrociklički poliamini ciklen i ciklam. Ciklam je idealan za kompleksiranje i stvaranje konjugata, jer zbog veličine prstena jako dobro veže Cu i Zn.

Potaknuti tim rezultatima odlučili smo supstituirati ligand TsC **2** s makrocikličkim poliaminom ciklamom i tako uvesti jedinicu sposobnu za kompleksiranje različitih metalnih kationa. Od prije smo znali da je N(1)-SO$_2$ veza u *N*-sulfonilcitozinskim ligandima relativno nestabilna u jako kiselim odnosno bazičnim uvjetima. Zbog toga smo za sintezu ciklam-*N*-sulfonilcitozinskih konjugata odlučili koristiti Mannichovu reakciju.

Mannichova reakcija predstavlja dobru metodu za tvorbu C-C veze. Ona se uglavnom sastoji od kondenzacije aldehida (najčešće formaldehida) i amina sa supstratom koji posjeduje kisele vodikove atome. Većina primjera opisanih u literaturi govori o arilamino derivatima koji se ponašaju istovremeno kao amini i kao supstrati sposobni za *C*-aminometiliranje. Tako je Prukała u svom radu pokazala da *C*-aminometiliranjem u reakciji citozina, paraformaldehida i cikličkih sekundarnih amina (morfolina, piperidina, pirolidina) u prisutnosti octene kiseline nastaju C5 supstituirani citozinski derivati, primjerice 5-(morfolinometil)citozin.[198]

Međutim, postoje i primjeri *N*-aminometiliranja. U nastojanju da se priprave aminometil analozi lijekova koji sadrže egzocikličke amino-skupine, Mannichovom reakcijom sintetizirani su amino-metilirani derivati adenina, citozina i gvanina.[199] Tako su u reakcijama adenina uz ekvimolarne količine reagensa s formaldehidom i manje bazičnim aminima kao što je morfolin i *N*-metilpiperazin, dobiveni monoalkilirani N^6-(aminometil) derivati, a bis-N^6,*N*-9-aminometilirani derivati nastaju uz više bazične amine i to neovisno o stehiometriji reagensa. S druge strane, pod tim uvjetima citozin i gvanin daju samo bis-aminoalkilirane produkte bez obzira na sekundarni amin ili molarne omjere koji se koriste u reakciji.

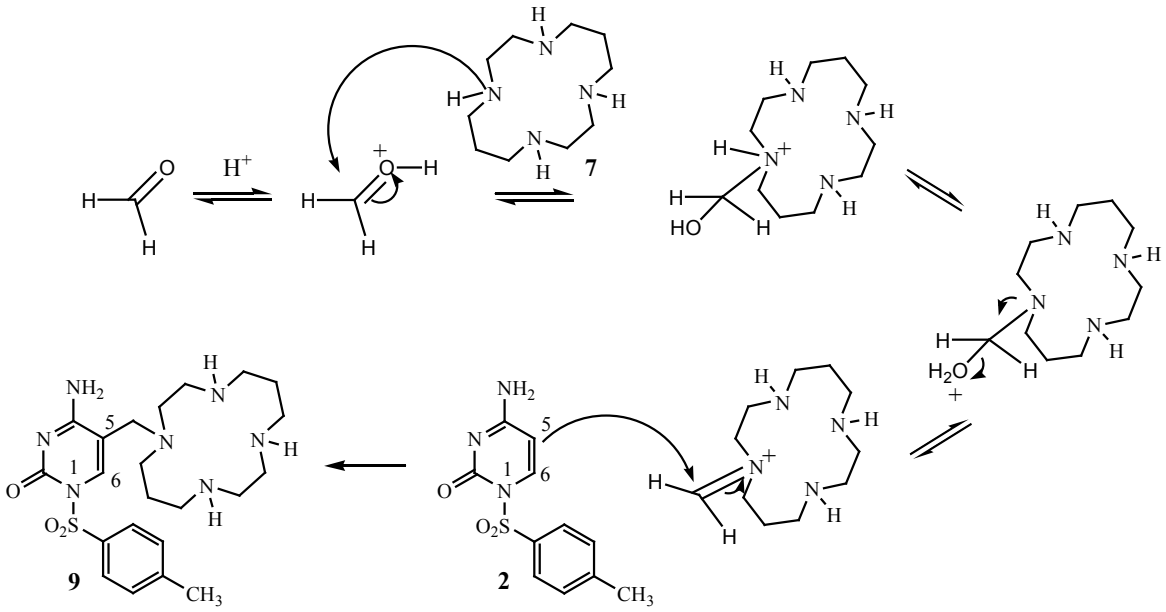
Ciklam-TsC konjugat **9** i tTFA-ciklam-TsC konjugat **10** sintetizirani su pod uvjetima Prukała-Mannichove reakcije iz TsC **2**, paraformaldehida, a kao sekundarni amin upotrebljeni su nezaštićeni ciklam **7** i zaštićeni ciklam 1,4,8-tris(trifluoracetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan (tTFA-ciklam, **8**) uz prisustvo octene kiseline (*Shema 12*).



Shema 12. Sinteza ciklam-TsC konjugata **9** i tTFA-ciklam-TsC konjugata **10** Mannichovom reakcijom.

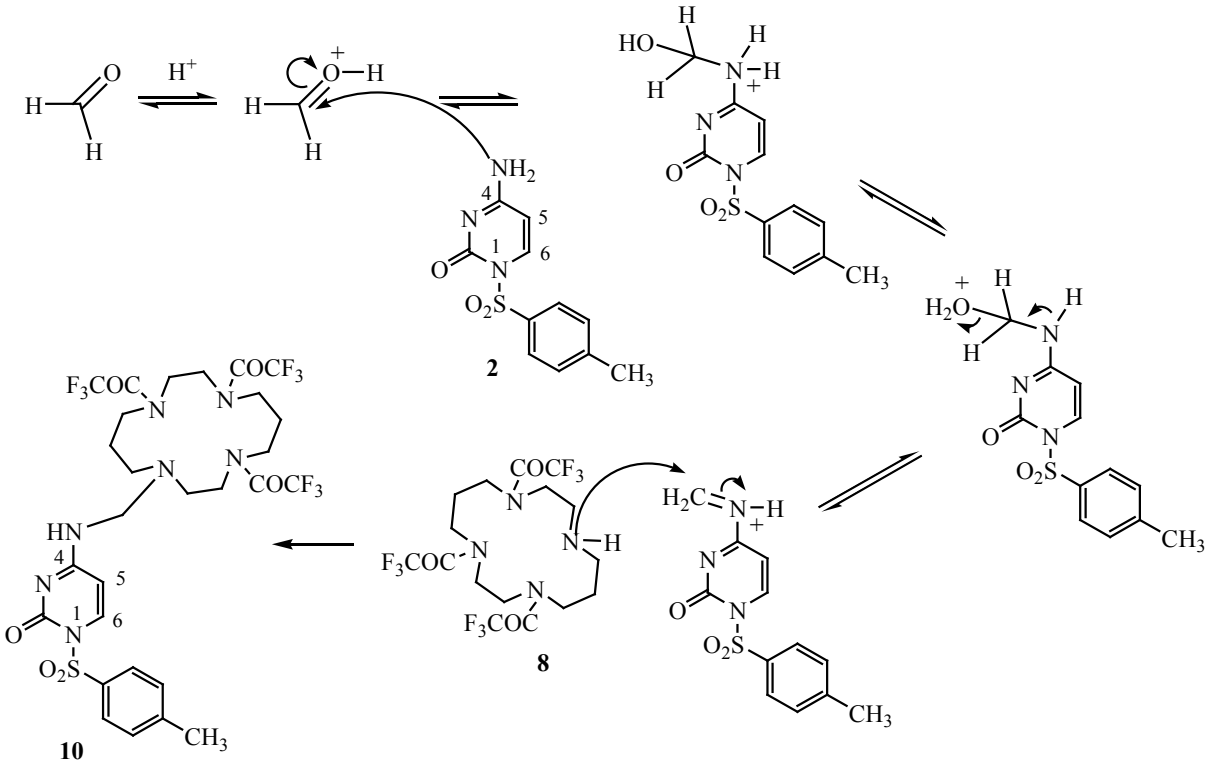
Reakcije su provedene u mikrovalnom reaktoru. Zaštićeni ciklam tTFA-ciklam **8** priređen je u 93 %-tnom iskorištenju nukleofilnom supstitucijom etil-trifloracetata s ciklamom **7** uz trietilamin u metanolu. Ispitivanjem uvjeta Mannichove reakcije pronađena je optimalna temperatura reakcije 100 °C i vrijeme reakcije 30 minuta, prilikom čega su izolirani ciklam-TsC konjugat **9** u 15 %-tnom iskorištenju i tTFA-ciklam-TsC konjugat **10** u 51 %-tnom

iskorištenju. Kada je ista metoda s istim molarnim omjerima reaktanata ponovljena uz produljeno vrijeme reakcije (mikrovalni reaktor, 100 ºC, 90 min) iskorištenje se drastično smanjilo te je izolirano oko 6 % spoja **10**.



Shema 13. Pretpostavljeni mehanizam *C*-aminometiliranja i nastajanje ciklam-TsC konjugata **9**.

Prilikom reakcije TsC **2**, formaldehida i ciklama **7** nastaje produkt *C*-aminometiliranja u C5 položaju citozinske baze, ciklam-TsC konjugat **9** (*Shema 13*). S druge strane reakcijom TsC **2**, formaldehida i zaštićenog tTFA-ciklama **8** dolazi do *N*-aminometiliranja egzocikličke amino-skupine i nastaje tTFA-ciklam-TsC konjugat **10** (*Shema 14*).



Shema 14. Pretpostavljeni mehanizam *N*-aminometiliranja i nastajanje tTFA-ciklam-TsC konjugata **10**.

To je vidljivo iz njihovih NMR spektara gdje se u ^{1}H NMR spektrima samo kod spoja **10** vidi signal protona H5 na δ 6,12–5,93 ppm. U ^{13}C NMR spektrima u slučaju spoja **9** signal C5 atoma dolazi na 72,41 ppm kao singlet, a kod spoja **10** signal C5 se pojavljuje na 97,52 ppm kao dublet.

Točan odgovor zašto u slučaju Mannichove reakcije TsC **2** s nezaštićenim ciklamom **7** nastaje produkt *C*-aminometilacije **9**, a uz zaštićeni ciklam **8** produkt *N*-aminometiliranja **10** zahtjeva dodatna fizikalno-organska i računska ispitivanja.

4.2. **Karakterizacija spojeva metodom ESI-MS**

Unatoč činjenici da su prve MS studije pirimidinskog prstena proveli Bienmann i McClosky[200] 1962. godine, ta metoda još uvijek ima značajnu ulogu u karakterizaciji i analizi pirimidinskih spojeva u otopini.

Stoga je spektrometrija masa uz elektroraspršenje korištena za karakterizaciju i proučavanje fragmentacijskih putova građevnih blokova (liganada TsC **2**, MsC **3**, ciklama **7** i zaštićenog ciklama tTFA **8 [**1,4,8-Tris(trifluoracetil)-1,4,8,11-tetraazaciklotetradekan (**8**)**]** s ciljem lakšeg praćenja i asignacije opaženih signala kod novonastalih kompleksa metala s ligandima, te konjugata i novonastalih specija uslijed njihovih interakcija s ionima metala.

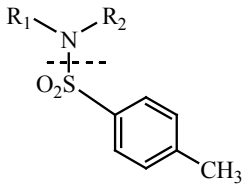
4.2.1 Karakterizacija liganada TsC **2** i MsC **3**

Da bi u daljnjoj raspravi bilo lakše objasniti strukture novosintetiziranih konjugata **9** i **10** potrebno je provesti karakterizaciju liganada **2** i **3** u pozitivnom (ES^+)i negativnom (ES^-)načinu rada.

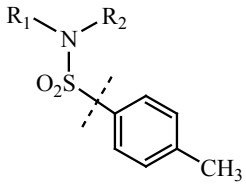
Ligandi **2** i **3** su *N*-sulfonamidi za koje je iz literature[201-205] poznato da pri cijepanju pod utjecajem kolizije (CID, engl. Collision induced dissociation) u plinskoj fazi, u pozitivnom i negativnom načinu rada dolazi do eliminacije SO_2 što dovodi do pregradnje i nastanka novih specija. Uočeno je da prisutnost elektron-akceptora (primjerice klor, odnosno halogenidi), u *orto* položaju aromatskog prstena povećava mogućnost cijepanja C-S veze. Takav oblik fragmentacije je kod MS-a pri atmosferskom tlaku vrlo česta reakcija.

David Q. Liu i suradnici[206] zaključili su da se fragmentacija aromatskih sulfonamida u spektrometriji masa s ESI tehnikom ionizacije u oba načina rada, pozitivnom i negativnom, odvija na tri načina:

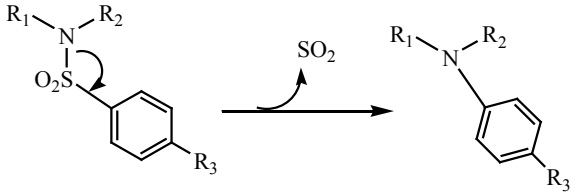
1. direktnim cijepanjem S-N veze



2. direktnim cijepanjem C-S veze



3. eliminacijom SO_2



Uzevši u obzir te činjenice proučili smo fragmentaciju liganada **2** i **3** i uočili da dominira prvi način cijepanja tj. cijepanje S-N veze, ali su i ostali opaženi u reakcijama kolizijski induciranih fragmentacija ciklamskih derivata.

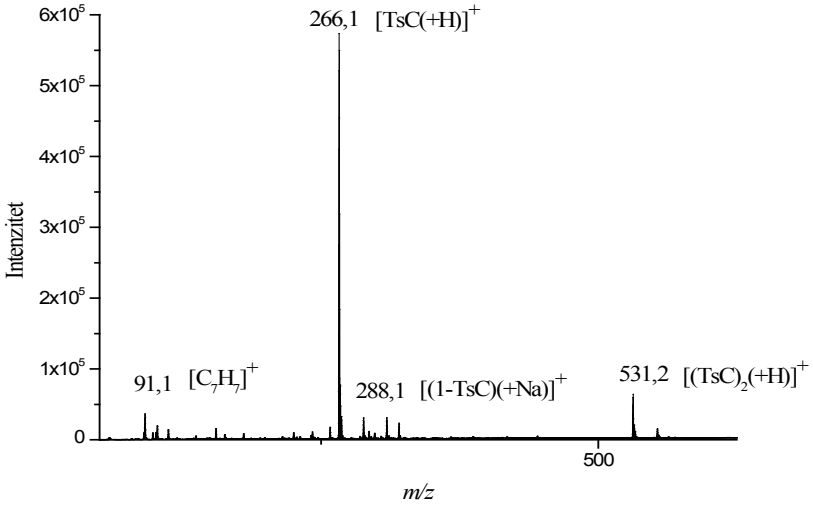
4.2.1.1. Karakterizacija liganda 1-(*p*-toluensulfonil)citozin (**2)**

4.2.1.1.1. Karakterizacija liganda **2** u pozitivnom načinu rada.

Detaljna MS analiza liganda **2** opisana je ranije, a sada je potvrđeno ranije opažanje, tj. analizom MS spektara u pozitivnom načinu rada pri koncentraciji uzorka od 10^{-5} mol dm^{-3} uočena su dva glavna signala (*Slika 23*): signal na *m/z* 266,1 asigniran je kao protonirani ligand **2** $[TsC(+H)]^+$, a signal na *m/z* 531,2 asigniran je kao njegov protonirani dimer $[(TsC)_2(+H)]^+$. U spektrima se vide i signali adukata liganda i njegovog dimera s natrijem, signal na *m/z* 288,1 asigniran kao $[(1\text{-}TsC)(+Na)]^+$ i signal na *m/z* 553,2 asigniran kao $[(1\text{-}TsC)_2(+Na)]^+$.

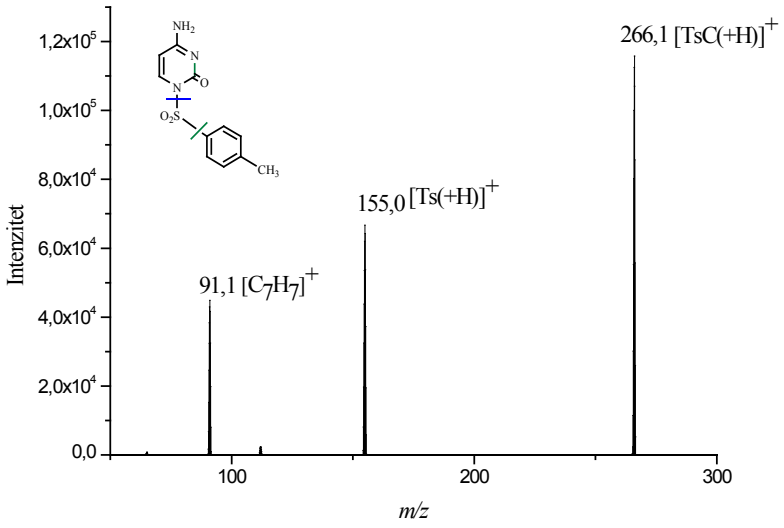
Fragmentacija signala na *m/z* 531,2 daje samo signal *m/z* 266,1 što je potvrda da se radi o protoniranom dimeru liganda **2** (dodatak B-1), dok signal na *m/z* 266,1 daje tri signala, na *m/z* 112,1, *m/z* 155,0 i *m/z* 91,1 (*Slika 24c*).

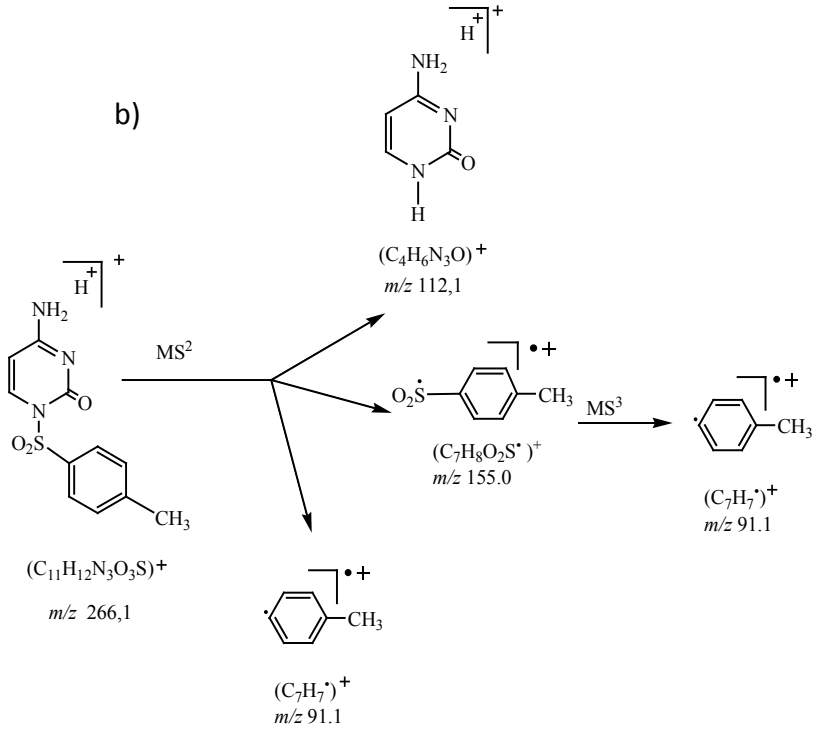
Kao posljedica cijepanja N-S veze nastaju signali na *m/z* 112,1 asigniran kao protonirani citozin [Cyt(+H)]$^+$ i na *m/z* 155,0 asigniran kao tosilni dio liganda. Signal na *m/z* 91,1 odgovara tropilium ionu $[C_7H_7]^+$, odnosno nastaje cijepanjem S-C veze i odvajanjem toluenskog od tosilnog fragmenta. Stoga možemo zaključiti da je N-S veza labilnija od S-C veze.



Slika 23: Cjeloviti spektar liganda **2**, snimljen u ES$^+$ načinu rada, uzorak je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), c=10^{-5} mol dm^{-3} te snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ.

a)

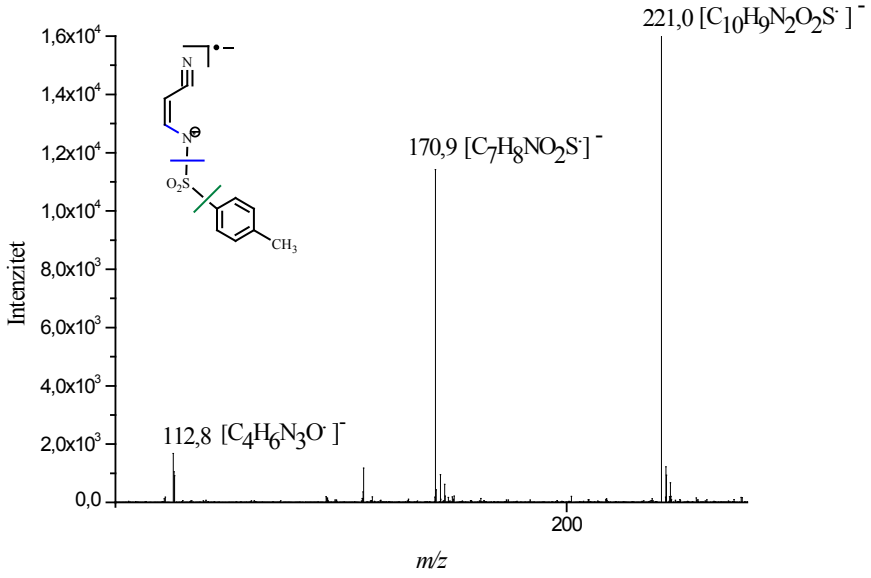




Slika 24. a) MS/MS spektar signala *m/z* 266,1 snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u pozitivnom načinu rada u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=10^{-5} mol dm^{-3} i kolizijsku energiju od 10 eV te struktura liganda **2** i mjesta cijepanja, gore lijevo na spektru, b) shematski prikaz fragmentacijskog puta liganda **2** u otapalu DMSO/MeOH (1:100) određen pomoću ESI MS^n spektara snimljenih uz @cid 0,5 na c=$5 \cdot 10^{-7}$ mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na ion trap spektrometru masa amaZon ETD, izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

4.2.1.1.2. Karakterizacija liganda **2** u negativnom načinu rada.

Spektroskopija masa u negativnom načinu rada (ES^-) je vrlo korisna upravo zbog činjenice da su u većini slučajeva spektri jednostavniji od spektara snimljenih u pozitivnom načinu rada (ES^+). Mješovita organsko-vodena otapala mogu dati klastere $M(H_2O)_x(MeOH)_y^{n+}$, koji dodatno kompliciraju spektre. Taj problem moguće je umanjiti korištenjem MX^{n-} (X je haligenid), uz dovoljno jake kolizijske uvjete (engl. declastering potential) za uklanjanje molekula otapala. Wang i Cole, za osnovnu studiju ES^- procesa, koristili su ione $(M_nX_{n-1})^+$ i $(M_nX_{n+1})^-$ te pokazali prednosti i nedostatke svakog pojedinog načina rada (ES^+ ili ES^-).[207] Houk i suradnici opisuju primjenu nagativnog načina rada, kao alata za identifikaciju metalnih kationa, metalnih kompleksa i aniona.[208]

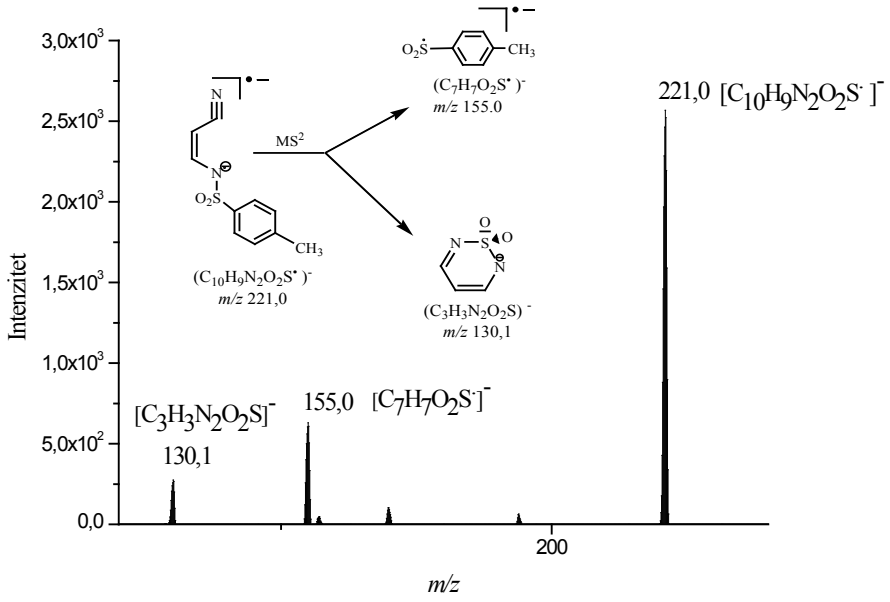


Slika 25: Cjeloviti spektar liganda **2,** snimljen u ES^- načinu rada, uzorak je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), $c=10^{-5}$ mol dm^{-3} snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ. Struktura fragmenta liganda **2** i mjesta cijepanja, gore lijevo na spektru.

Snimanjem u negativnom načinu rada nismo uočili signal cjelovitog i negativno nabijenog liganda $[TsC(-H)]^-$, već uočavamo signal na *m/z* 220,9 koji predstavlja njegov fragment, što znači da u negativnom načinu rada dolazi odmah do fragmentacije. U ES^- cjelovitom spektru liganda **2** uočavamo tri signala (*Slika 25*), na *m/z* 220,9 koji je asigniran kao radikal-anion $[C_{10}H_9N_2O_2S^{\bullet}]^-$, a nastaje karakterističnim cijepanjem citozinskog prstena i izlaska jednog njegovog dijela *m/z* 42,0 što odgovara radikal-anionu $[CNO^{\bullet}]^-$.

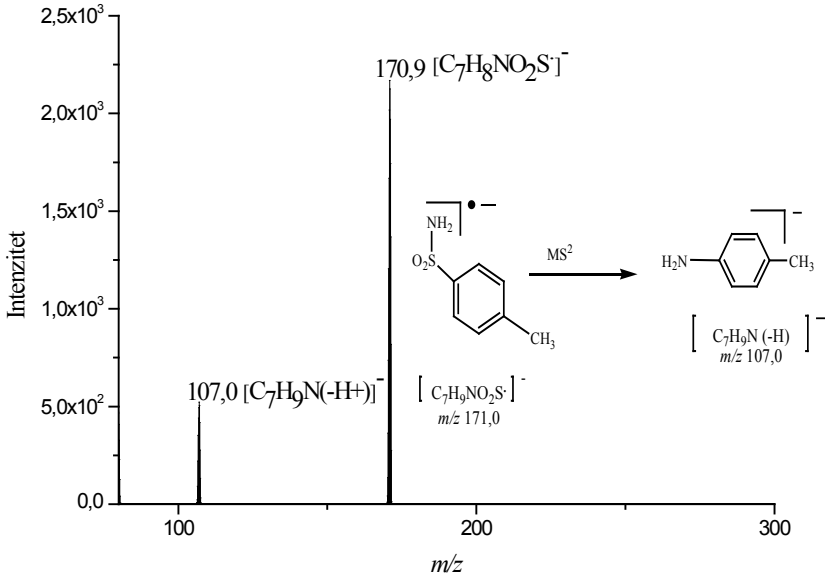
Signal na *m/z* 170,9 asigniran je kao $[C_7H_8NO_2S^{\bullet}]^-$ odnosno tosilni dio liganda na koji je ostao vezan dušik iz pocijepanog citozinskog prstena i signal *m/z* 112,8 asigniran je kao citozinski radikal-anion $[C_4H_6N_3O^{\bullet}]^-$. Pretpostavljamo da nastanak tog citozinskog radikal-aniona $[C_4H_6N_3O^{\bullet}]^-$ ide u dva koraka, odnosno prvo dolazi do redukcije jednog od tri tautomerna oblika citozina i potom do njegovog cijepanja.

Fragmentacijom signala na *m/z* 221,0 nastaju dva signala, na *m/z* 155,0 i na *m/z* 130,1 (*Slika 26*). Signal na *m/z* 155,0 nastaje odvajanjem tosilnog dijela liganda pri čemu nastaje radikal-anion $[C_7H_7O_2S^{\bullet}]^-$, a signal na *m/z* 130,1 asigniran kao $[C_3H_3N_2O_2S]^-$ predstavlja fragment koji nastaje cijepanjem veze u tosilnom segmentu između SO_2 i toluenskog dijela, odnosno cijepanja S-C veze.



Slika 26. MS/MS spektar za signal na *m/z* 221,0 snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u negativnom načinu rada u otapalu DMSO/MeOH (1:100), $c=10^{-5}$ mol dm^{-3} i kolizijsku energiju od 10 eV te pretpostavljen shematski prikaz fragmentacijskog puta signala opaženog kod *m/z* 221,0 prikazan u središnjem dijelu spektra**.**

Fragmentacija signala na *m/z* 170,9 daje jedan signal opažen kod *m/z* 107,0 koji je asigniran kao $[C_7H_9N(-H^+)]^-$, odnosno dolazi do izlaska SO_2 iz strukture (*Slika 27*).

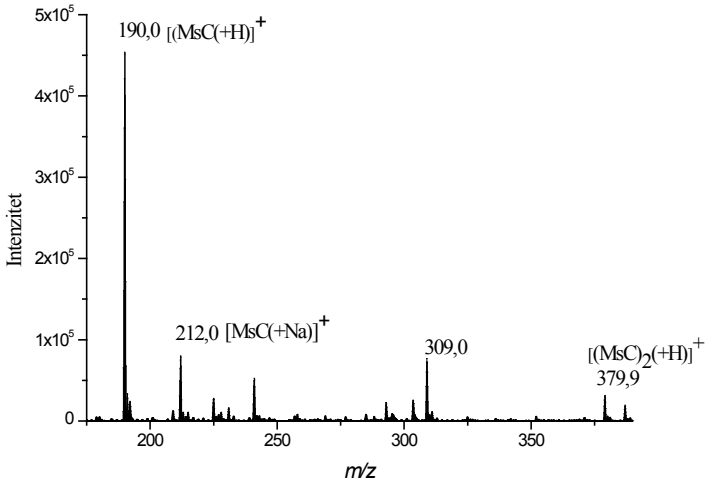


Slika 27. MS/MS spektar za signal na *m/z* 170**,**9 snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u ES^- u otapalu DMSO/MeOH (1:100), $c=10^{-5}$ mol dm^{-3} i kolizijsku energiju od 15 eV te shematski prikaz fragmentacijskog puta i vjerojatne strukture fragmenta u desnom dijelu spektra**.**

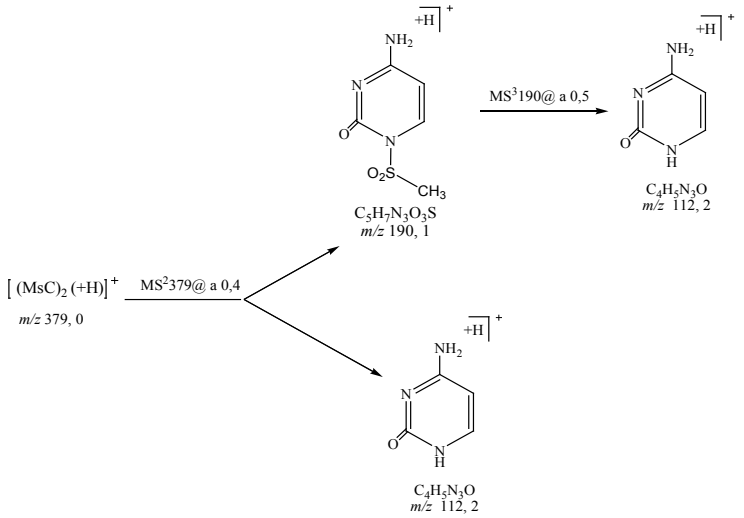
4.2.1.2. Karakterizacija liganda 1-metansulfonilcitozin (**3**)

4.2.1.2.1. Karakterizacija liganda **3** u pozitivnom načinu rada.

U cjelovitom spektru liganda **3** otopljenog u DMSO/MeOH (1:100) snimljenog u pozitivnom načinu rada uočeno je nekoliko signala od kojih je najintenzivniji signal protoniranog molekulskog iona opaženog na *m/z* 190,0 asigniranog kao protonirani ligand **3** $[(MsC(+H)]^+$, signal na *m/z* 212,0 asigniran je kao adukt liganda **3** s Na^+ $[MsC(+Na)]^+$, a signal na *m/z* 379,1 asigniran je kao protonirani dimer liganda **3** $[(MsC)_2(+H)]^+$ (*Slika 28*).



Slika 28. Cjeloviti spektar liganda **3**, snimljen u ES^+ načinu rada, uzorak je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), $c=10^{-5}$ mol dm^{-3} te snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ.



Slika 29. Shematski prikaz fragmentacijskih puteva i pretpostavljenih struktura fragmenata. Uzorak liganda **2** je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} te snimljen na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u pozitivnom načinu rada, uz @cid 0,4 i @cid 0,5, izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).(MS^n spektri fragmentacija nalaze se u dodatku B-2).

Fragmentacija signala opaženog kod *m/z* 379,1 asigniranog kao protonirani dimer liganda **3** $[(MsC)_2(+H)]^+$ odvija se kroz dva fragmentacijska kanala. U prvom slučaju dolazi do cijepanja N-S veze, pri čemu nastaje *m/z* 112,2, koji je asigniran kao protonirani citozin i

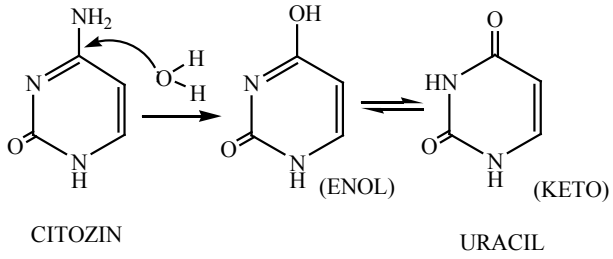
odvaja se sulfonilni dio. Drugi fragmentacijski kanal, koji je ujedno i glavni kanal, rezultira cijepanjem dimera i nastanak najintenzivnijeg signala na *m/z* 190,1, koji je asigniran kao protonirani ligand **3** $[MsC(+H)]^+$, čijom fragmentacijom nastaje signal na *m/z* 112,2, odnosno protonirani citozin $[Cyt(+H)]^+$.

Možemo zaključiti da su za oba liganda, **2** i **3** uočene iste analogije cijepanja, odnosno prvo dolazi do cijepanja N-S veze, pri čemu nastaje citozinski dio i sulfonilni dio, a potom dolazi i do cijepanja unutar samog citozinskog prstena i nastanka karakterističnih fragmenata

Promatranjem stabilnosti oba liganda **2** i **3** ovisno o utjecaju otapala, kao i vremena, uočeno je da su ligandi stabilni u otopini kroz duže vrijeme i da odabrani sustav otapala DMSO/MeOH (1:100) nema značajan utjecaj na njihovu stabilnost.

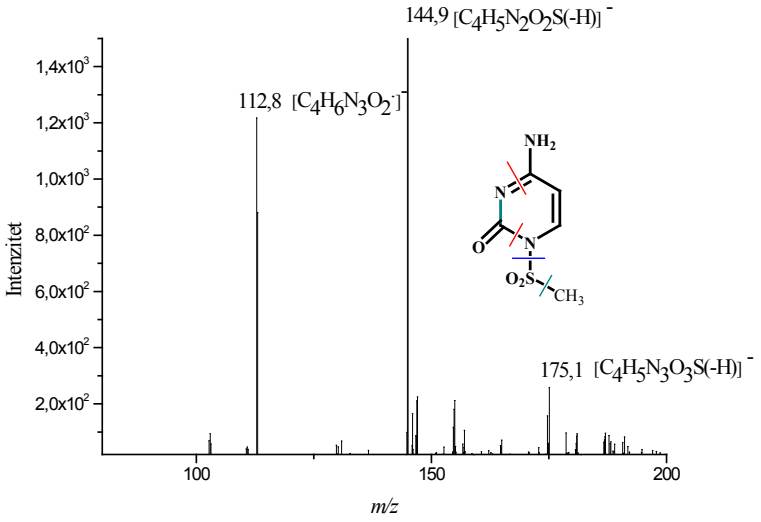
4.2.1.2.2. Karakterizacija liganda **3** u negativnom načinu rada

Kako je vidljivo iz spektra (*Slika 30a*) u negativnom načinu rada uočavamo fragmente koji nastaju direktnim cijepanjem liganda **3** pri čemu nastaju anioni (*m/z* 175,1 i *m/z* 144,9), ali nastaje i fragment *m/z* 112,8 čiji nastanak ide u dva koraka, odnosno prvo dolazi do redukcije jednog od tri poznata tautomerna oblika citozina, te dolazi do izlaska mezilnog dijela liganda **3**. Pretpostavljamo da potom dolazi do konverzije citozina u uracil i nastanka uracilnog radikal aniona *m/z* 112,8. Kim i suradnici[209] pokazali su da u plinskoj fazi MS instrumenta u prisutnosti vodene pare dolazi do konverzije citozina u uracil. Voda nukleofilno napada C4 položaj citozina na koji je vezana amino-skupina, pri čemu nastaje enolni oblik, koji prelazi u keto-oblik, što je u konačnici uracil (*Shema 15*).

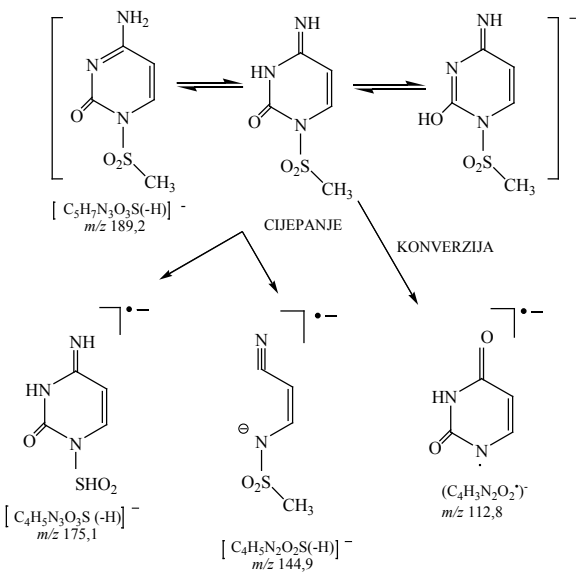


Shema 15: Konverzija citozina u uracil u plinskoj fazi u prisutnosti vode pare.

a)



b)



Slika 30. a) Cjeloviti ES$^-$ spektar liganda te struktura liganda **3** i moguća mjesta cijepanja, b) shematski prikaz mogućih struktura fragmenata liganda **3**. Uzorak je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), c=10^{-5} mol dm^{-3} te snimljen na spektrometru Agilent 6410 Triple QQQ u negativnom načinu rada.

Fragment na *m/z* 175,1 nastaje cijepanjem veze S-C između SO_2 i metila u mezilnom dijelu liganda **3**, pri čemu dolazi do izlaska metilne skupine, a SO_2 ostaje vezan na citozinski dio (*Slika 30*).

Fragment na *m/z* 144,9 nastaje karakterističnim cijepanjem citozinskog prstena što je već opisano u literaturi i spomenuto kod cijepanja liganda **2** te izlaska jednog njegovog dijela *m/z* 42,0 što odgovara ($CNO^{\bullet}$).

Pri fragmentaciji liganada **2** i **3** došli su do izražaja prethodno spomenuti načini cijepanja poznati kod aromatskih sulfonamida i uočena je analogija s literaturnim podacima. Fragmentacije ESI MS^n kod oba liganda **2** i **3** potvrdile su naša očekivanja da će bez obzira na način rada (ES^+ ili ES^-) prvo doći do cijepanja N-S veze i nastanka citozinskog dijela i sulfonilnog dijela. Daljnja fragmentacija citozinskog dijela daje fragmente koji su karakteristični za cijepanje N-1 supstituiranih citozina.

4.2.2 Karakterizacija Cu(II) kompleksa (**5** i **6)**

Karakterizacijom liganada u pozitivnom i negativnom načinu rada uočeno je da u negativnom načinu rada dolazi do cijepanja liganada (cijepanja citozinskog dijela) već na samom izvoru. Stoga je karakterizacija svih kompleksa liganada rađena u pozitivnom načinu rada.

Analizirajući snimljene spektre kompleksa **5** i **6** u negativnom načinu rada uočili smo da nastaju isti signali neovisno o otapalu i proučavanom kompleksu. U svim spektrima je prisutan signal na *m/z* 134,5 koji odgovara radikal anionu $[CuCl_2]^-$ te signali specija većih vrijednosti *m/z*, asigniranih kao adukti $CuCl_2$ s kloridnim ionom. Stoga je karakterizacija komplesa i njihova daljnja studija provedena u pozitivnom načinu rada.

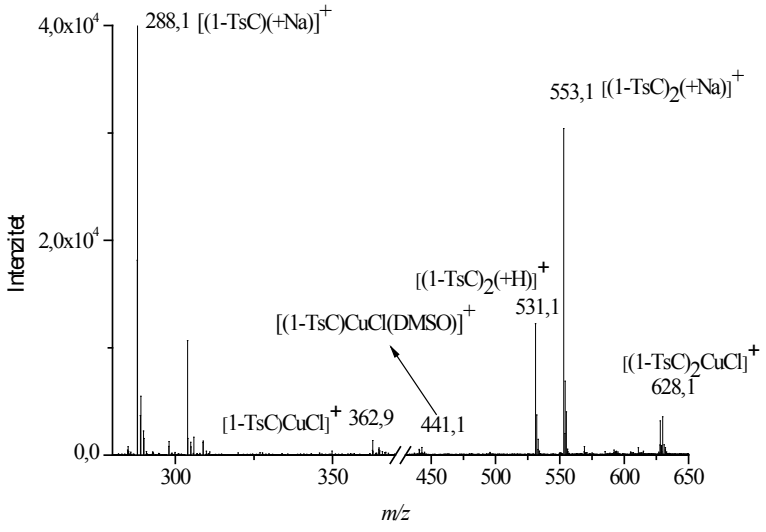
4.2.2.1. Karakterizacija kompleksa $[Cu(1\text{-}TsC\text{-}N3)_2Cl_2]$ (**5)**

Cjeloviti spektar $[Cu(1\text{-}TsC\text{-}N3)_2Cl_2]$ (**5)** snimljen je u pozitivnom načinu rada na više instrumenata i svugdje je potvrđeno prisutnost signala specije na *m/z* 628,1 koji odgovara kompleksnom ionu, a njegov signal je korišten za potvrdu HRMS-om (dodatak B-3). Osim tog signala utvrđena su i asigniran još četiri signala.

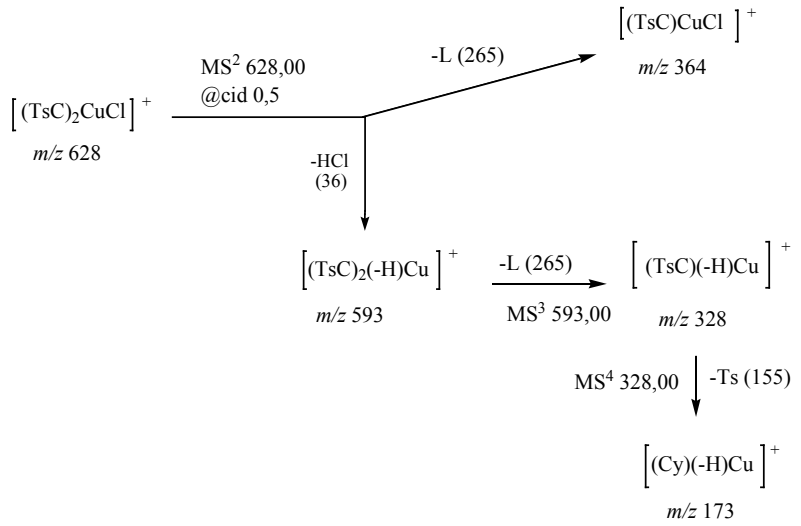
Signal na *m/z* 288,1 asigniran je kao $[(1\text{-}TsC)(+Na)]^+$, signal na *m/z* 362,9 asigniran je kao$[1\text{-}TsC)CuCl]^+$, signal na *m/z* 531,1 asigniran je kao $[(1\text{-}TsC)_2(+H)]^+$, signal na *m/z* 553,1 asigniran je kao $[(1\text{-}TsC)_2(+Na)]^+$, i signal na *m/z* 628,1 asigniran je kao $[(1\text{-}TsC)_2CuCl]^+$

(*Slika 31a*). Na osnovu predloženog fragmentacijskog puta i teoretskog spektra izotopne raspodjele dokazana je struktura opaženih specija (*Slika 31b*). Teoretski spektar izotopne raspodjele[210] nalazi se u prilogu B-3.

a)



b)



Slika 31. a) Cjeloviti spektar ESI-MS kompleksa Cu(1-TsC-N_3)$_2$Cl$_2$ (**5**) snimljen na spektrometru Agilent 6410 Agilent 6410 QQQ u ES$^+$ načinu rada, uzorak je otopljen u DMSO/MeOH (1:100), c=10^{-5} mol dm^{-3}, b) fragmentacijski put kompleksa **5** određen pomoću ESI MS^n spektara snimljenih uz @cid 0.5, c=10^{-7} mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na ion trap spektrometru masa amaZon ETD, izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Fragmentacijski put signala na *m/z* 628,1 $[(1\text{-TsC})_2\text{CuCl}]^+$ odvija se kroz dva kanala. U jednom slučaju dolazi do gubitka HCl i nastanka $[(1\text{-TsC})_2(\text{-H})\text{Cu}]^+$, a u drugom slučaju uz gubitak jednog liganda **2** nastaje $[(1\text{-TsC})\text{CuCl}]^+$. Daljnom fragmentacijom signala opaženog kod *m/z* 328,1 (asigniranog kao kompleksni ion $[(1\text{-TsC})_2(\text{-H})\text{Cu}]^+$) u MS^3 otcjepljuje se ligand **2** i nastaje ion $[(1\text{-TsC})(\text{-H})\text{Cu}]^+$. Cijepnjem N-S veze u samom ligandu preostaje kompleksni ion sastavljen od citozina i Cu(II), $[(\text{Cy})(\text{-H})\text{Cu}]^+$ (*Slika 31b*).

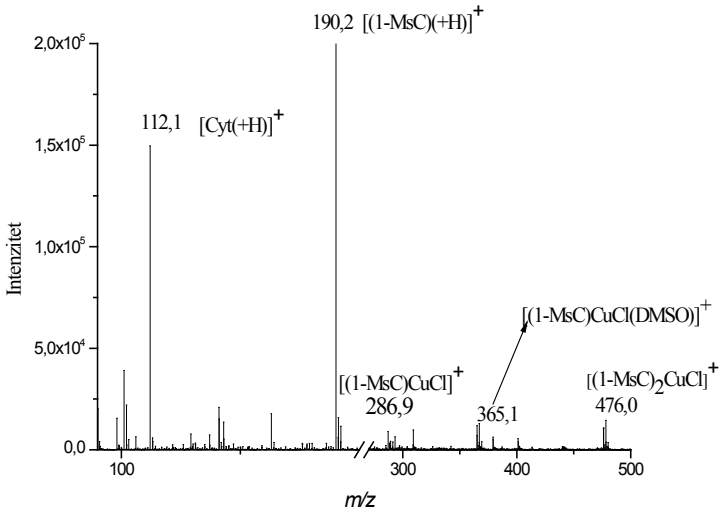
4.2.2.2. Karakterizacija kompleksa $[\text{Cu}(1\text{-MsC-}N3)_2\text{Cl}_2]$ (**6**)

Cjeloviti spektar $[\text{Cu}(1\text{-MsC-}N3)_2\text{Cl}_2]$ (**6)** snimljen je u pozitivnom načinu rada na više instrumenata i svugdje je potvrđeno prisutnost signala specije na *m/z* 476,0 koji odgovara kompleksnom ionu, a njegov signal je korišten za potvrdu HRMS-om (dodatak B-4). Osim tog signala utvrđena su i asignirana još četiri signala, a to su dijelovi liganda, slobodni ligand i ioni koji potječu od kompleksa.

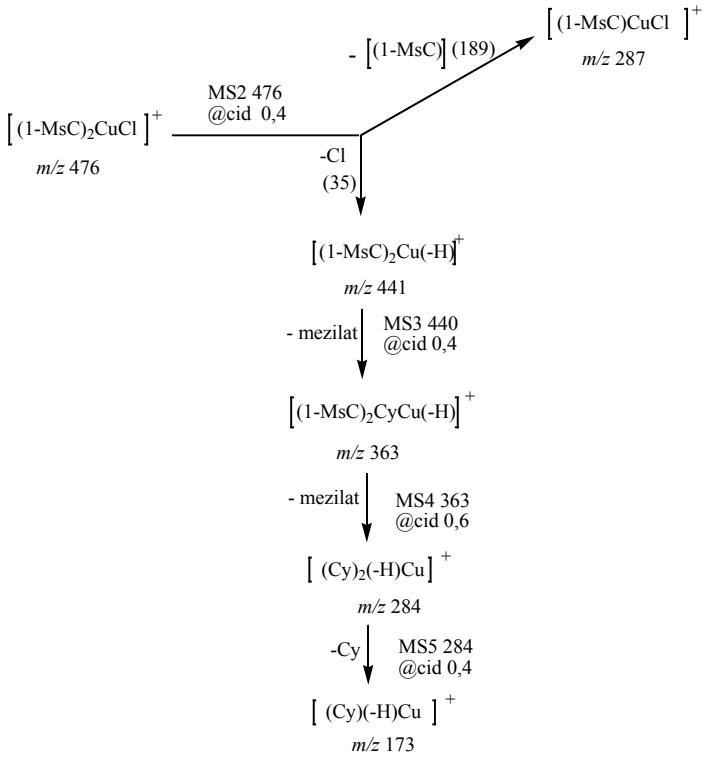
Signal na *m/z* 112,1 asigniran je kao $[\text{Cyt}(+\text{H})]^+$, signal na *m/z* 190,2 asigniran je kao $[(1\text{-MsC})(+\text{H})]^+$, signal na *m/z* 286,9 asigniran je kao $[(1\text{-MsC})\text{CuCl}]^+$, signal na *m/z* 441,1 asigniran je kao $[(1\text{-MsC})_2\text{Cu}(\text{-H})]^+$ i signal na *m/z* 476,0 asigniran je kao $[(1\text{-MsC})_2\text{CuCl}]^+$ (*Slika 32a*).

Na osnovi predloženog fragmentacijskog puta i teoretskog spektra izotopne raspodjele dokazana je struktura opaženih specija (*Slika 32b*).

a)



b)



Slika 32. a) Cjeloviti spektar kompleksa [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**6**) snimljen na spektrometru Agilent 6410 Agilent 6410 QQQ u ES$^+$ načinu rada u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=10^{-5} mol dm^{-3}, b) shematski prikaz fragmentacijskog puta kompleksa **6** snimljen u ES$^+$ načinu rada u otapalu DMSO/MeOH (1:100) pri c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, uz @cid 0,4, mase su izolirane u rasponu od ±2 amu (Da).

Fragmentacijski put signala na *m/z* 476,0 asigniranog kao $[(1\text{-MsC})_2CuCl]^+$ odvija se kroz dva kanala. U prvom slučaju uz gubitak jednog liganda **2** nastaje signal *m/z* 286,9 $[(1\text{-MsC})_2Cu(-H)]^+$. MS^3 signala *m/z* 441,1 daje signal na *m/z* 363,0 koji je asigniran kao**[**(1-MsC)CyCu(-H)**]**$^+$, a predstavlja gubitak mezilata. MS^4 signala *m/z* 363,0, uz gubitak i drugog mezilata, rezultira nastankom signala na *m/z* 28,0 koji je asigniran kao **[**(Cy)2(-H)Cu**]**$^+$. U konačnici signal na *m/z* 284,0 u MS^5 daje signal na *m/z* 173,0 koji je asigniran kao **[**(Cy)Cu(-H)**]**$^+$(*Slika 32b*).

Kod fragmentacije kompleksa **5** i **6** potvrđena je ista analogija fragmentacije. Primarno dolazi do gubitka HCl i liganda, a pomoću fragmentacijskog puta potvrđena je i struktura kompleksa **5** i **6**. Naime, pri fragmentaciji kompleksa **5** prvo je uočen odlazak liganda, a potom cijepanje S-N veze i odvajanje tosilnog dijela od citozinskog dijela, dok kod kompleksa **6** dolazi do stupnjevitog cijepanja mesilnog dijela oba liganda (N-S veze), a potom tek odlazi ligand (citozinski dio). Stoga je zaključeno da je N-S veza u mezilatu labilnija od N-Cu koordinativno kompleksne veze.

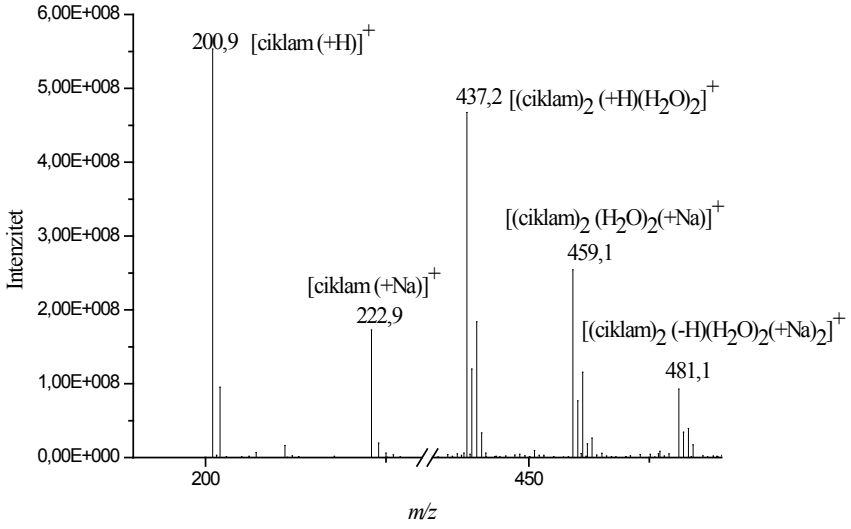
Kompleksi **5** i **6** su slabo topljivi u otapalima kao što su MeOH, ACN ili H_2O. Dodatkom DMSO ili DMF u navedena otapala, u omjeru npr. DMSO/MeOH 1:100 povečava se topljivost kompleksa (*vidi slike 21a i b*). No problem je što se istovremeno dodatkom DMSO i DMF-a potiče se i proces izmjene ligand-otapalo. Stoga je stabilnost kompleksa **5** i **6** smanjena upravo zbog izmjena ligand-otapalo, pri čemu se uočava čitav niz miješanih kompleksa s otapalom, npr. s DMSO-om. Kod kompleksa $[Cu(1\text{-TsC-}N3)_2Cl_2]$ (**5**) (spektar u dodataku B-3), pojavljuje se signal na *m/z* 441,1 koji je asigniran kao [(1-TsC)CuCl(DMSO)]$^+$, a kod kompleksa $[Cu(1\text{-MsC-}N3)_2Cl_2]$ (**6**) (spektar u dodataku B-4) uočavamo signal kod *m/z* 365,1 koji je asigniran kao [(1-MsC)CuCl(DMSO)]$^+$. Ti signali uočavaju se već u svježim otopinama, a s vremenom se pojačavaju (*Slike 31a i 32a*).

4.2.3. Karakterizacija ciklama **7**

Cilj ove doktorske disertacije bio je i sinteza novih poliazamakrocikličkih konjugata, njihova karakterizacija, te praćenje interakcije s metalima Cu^{2+} i Zn^{2+}. Obzirom da se novosintetizirani spojevi sastoje od građevnih blokova (liganada TsC **2**, ciklama **7** i zaštićenog ciklama **8**), bilo je potrebno provesti karakterizaciju svih građevnih blokova u našim spektoskopskim uvjetima rada tehnikom ESI-MS jer je pogodna za analizu makrocikla i njihovih metalnih kompleksa.[211]

Detaljna analiza induciranih fragmentacijskih reakcija ciklama i njegovih metalnih kompleksa u plinskoj fazi prikazana je u samo nekoliko radova.[212,213] Pri analizi spektara ciklama **7** snimljenih u pozitivnom načinu rada asignirano je pet glavnih signala i potvrđena je njegova struktura što je u skladu s već ranije objavljenim literaturnim podacima.[200,201]

Cjeloviti ES^+ spektar sadrži pet zanačajnih signala: signal *m/z* 200,9 asigniran je kao protonirani ciklam **[**ciklam $(+H)]^+$, a signal *m/z* 437,1 asigniran je kao protonirani dimer ciklama s dvije molekule vode $[(ciklam)_2\ (+H)(H_2O)_2]^+$, signal kod *m/z* 459,1 asigniran je kao Na^+ adukt dimera ciklama s dvije molekule vode $[(ciklam)_2\ (H_2O)_2(+Na)]^+$i signal kod *m/z* 481,1 asigniran je dimer ciklama s dvije molekule vode i dva iona Na^+ $[(ciklam)_2\ (-H)(H_2O)_2(+Na)_2]^+$(*Slika 33*).

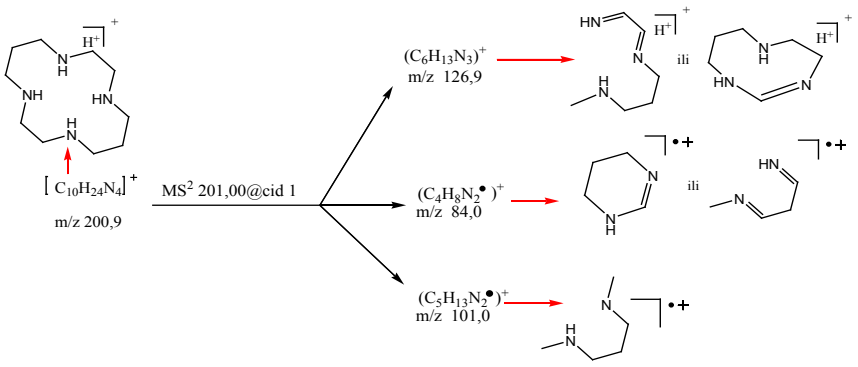


Slika 33: Prikaz cjelovitog spektra ciklama **7** otopljenog u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} snimljenog u ES^+ načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD.

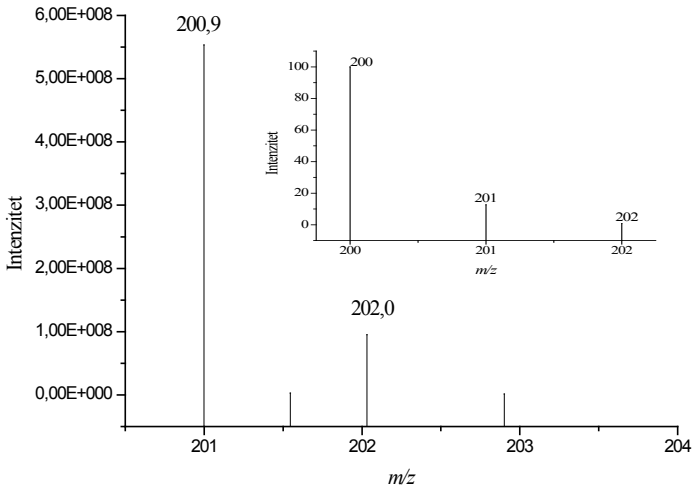
4.2.3.1. Određivanje fragmentacijskih putova signala kod *m/z* 200,9

Fragmentacija signala na *m/z* 200,9 asigniranog kao [ciklam (+H)]$^+$, odvija se kroz tri fragmentacijska kanala. Prvim fragmentacijskim kanalom nastaje signal na *m/z* 126,9 koji je asigniran kao $(C_6H_{13}N_3)^+$, a drugim kanalom nastaje signal na *m/z* 84,0 koji je asigniran kao $(C_4H_8N_2)^+$. Ti fragmenti nastaju kolizijom induciranim cijepanjem ciklamskog prstena, a kod oba signala (*m/z* 126,9 i *m/z* 84,0) uz cijepanje prstena moguća je i ciklizacija nastalog fragmenta, te su predložene dvije moguće strukture (*Slika 34a*). Treći fragmentacijski kanal rezultira nastankom signala na *m/z* 101,0, koji je radikal-kation asigniran kao $(C_5H_{13}N_2\cdot)^+$, a nastaje cijepanjem ciklamskog prstena. (Spektar ESI-MS^2 signala *m/z* 200,9 snimljen u pozitivnom načinu rada nalazi se u dodatku B-5)

a)



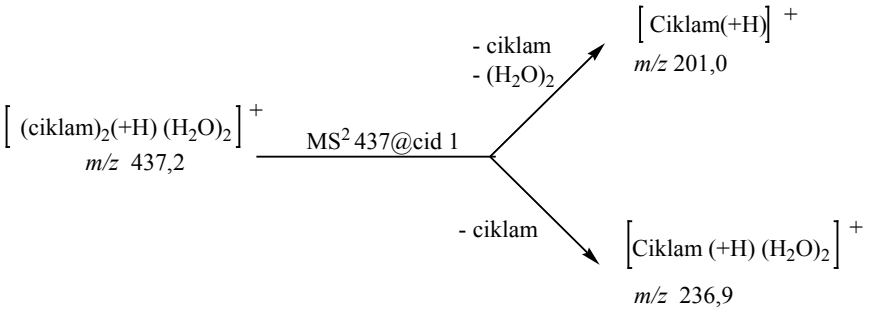
b)



Slika 34: a) Shematski prikaz fragmentacijskog puta signala na *m/z* 200,9, te predložene strukture fragmenata, izrađenene na osnovi ESI-MS^2 spektara snimljenih u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 na uzorku ciklama u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD (dodatak B-5), izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da). b) razvučeni spektar signala *m/z* 200,9 i umetnuti teoretski spektar izotopne raspodjele signala *m/z* 200.[214]

4.2.3.2. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 437,2

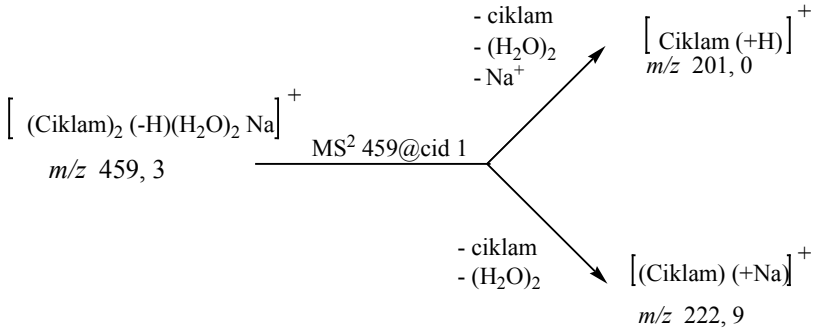
Fragmentacijom signala na *m/z* 437,2 koji je asigniran kao protonirani dimer ciklama s dvije molekule vode **[**$(ciklam)_2$ $(+H)(H_2O)_2]^+$ nastaju dva signala na*: m/z* 201,0 koji je asigniran kao protonirani ciklam i *m/z* 236,9, koji je asigniran kao protonirani ciklam s dvije molekule vode. Pretpostavljamo da su dvije molekule vode vezane na isti ciklam, pa stoga pri cijepanju nastaju fragmenti kod navedenih *m/z* vrijednosti (*Slika 35*).



Slika 35: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala *m/z* 437,2 te predložene strukture fragmenata. Fragmentacijski putovi izrađeni su na osnovi ESI-MS^2 spektara snimljenih uz @cid 1 na uzorku ciklama, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da). Spektar ESI-MS^2 signala *m/z* 437,2 nalazi se u dodatku B-6).

4.2.3.3. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 459,3

Fragmentacijom signala na *m/z* 459,3 koji je asigniran kao Na^+ adukt dimera ciklama s dvije molekule vode **[**$(ciklam)_2$ $(-H)(H_2O)_2Na]^+$ nastaju dva signala: jedan na *m/z* 201,0 koji je asigniran kao protonirani ciklam **[**ciklam $(+H)]^+$ i drugi na *m/z* 222,9, koji je asigniran kao adukt ciklama s Na^+ **[**ciklam $(+Na)]^+$.

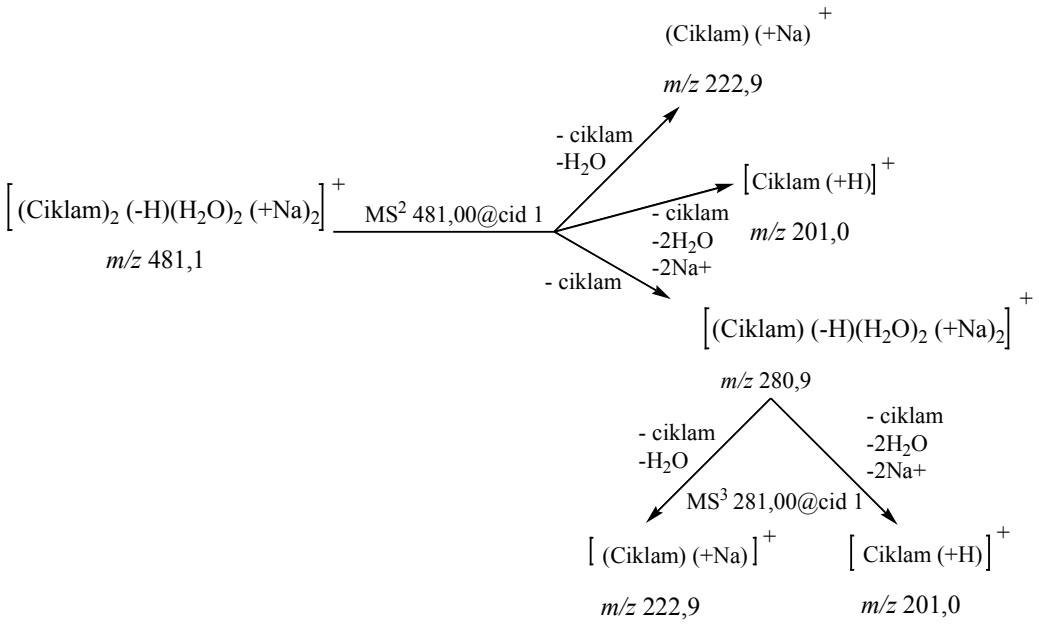


Slika 36: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala *m/z* 459,3 te predložene strukture fragmenata. Fragmentacijski putovi izrađeni su na osnovi spektara ESI-MS^2 snimljenih uz @cid 1 na uzorku ciklama, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da). (Spektar ESI-MS^2 *m/z* 459,3 u dodatku B-7).

Pri fragmentaciji dolazi do gubitka dvije molekule vode i nastanka protoniranog ciklama i adukta ciklama s ionom natrija Na^+ (*Slika 36*). Iz literature je poznato da alkalijski metali preferiraju vezanje na O i N, stoga je pretpostavka da je i u slučaju nastalog signala na *m/z* 222,9 ion natrija vezan na jedan od dušika u ciklamskom prstenu (*Slika 36*).

4.2.3.4. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 481,1

Fragmentacijski put signala na *m/z* 481,1 koji je asigniran kao dimer ciklama s dvije molekule vode i dva iona Na^+ $[(ciklam)_2(-H)(H_2O)_2(+Na)_2]^+$ odvija se kroz tri kanala. U jednom slučaju nastaje signal na *m/z* 222,9 koji je asigniran kao adukt ciklama s Na^+, **[**ciklam (+Na)**]**$^+$, u drugom slučaju nastaje signal *m/z* 201,0 koji je asigniran kao protonirani ciklam **[**ciklam (+H)**]**$^+$ i u trećem slučaju nastaje signal na *m/z* 280,9, koji je asigniran kao $[(ciklam)(-H)(H_2O)_2(+Na)_2]^+$. Njegovim daljnjim cijepanjem nastaju dva fragmenta, jedan na *m/z* 222,9 koji je asigniran kao adukt ciklama s Na^+ **[**ciklam (+Na)**]**$^+$, pri čemu dolazi do gubitka dvije molekule vode i jednog Na^+ i signala na *m/z* 201,0 koji je asigniran kao protonirani ciklam **[**ciklam (+H)**]**$^+$. Kolizijska energija koja je korištena za određivanje fragmentacijskih puteva u vrijednostima od @cid 0,5 do @cid 1 očito je i više nego dovoljna za cijepanje slabe veze H_2O s ciklamom, pa stoga uvijek prvo dolazi do gubitka vode i nastanka fragmenata u vidu adukata s H^+ ili Na^+.

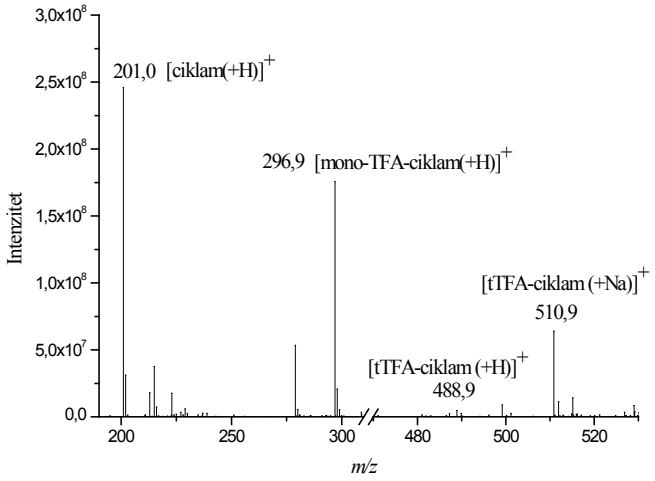


Slika 37: Shematski prikaz fragmentacijskih putova za signal opažen na *m/z* 481,1 te predložene strukture fragmenata. Fragmentacijski putovi izrađeni su na osnovi spektara ESI-MS^n snimljenih uz @cid 1 na uzorku ciklama, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).(Spektar ESI-MS^2 signala *m/z* 481,1 u dodatku B-8).

4.2.4. Karakterizacija tTFA-ciklama **8**

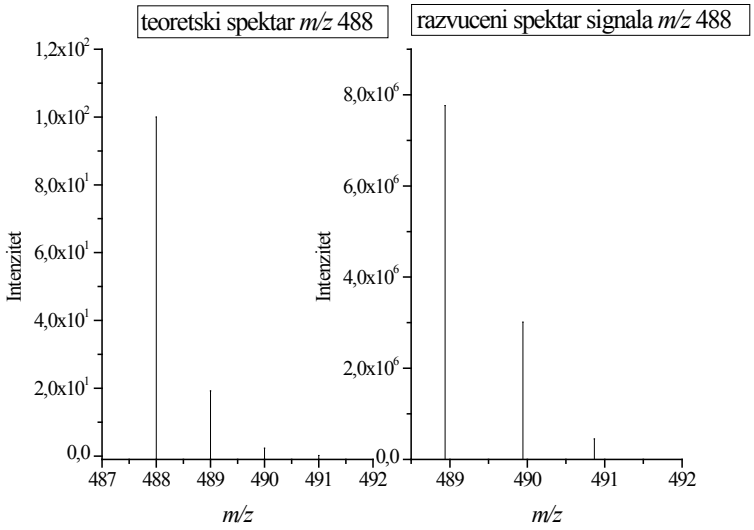
Pri analizi spektara tTFA-ciklama **8** snimljenih u pozitivnom načinu rada asignirana su četiri glavna signala *m/z* 201,0 *m/z* 296,9 *m/z* 488,9 i ion *m/z* 510,9. Pri analizi opaženih signala uočena je analogija cijepanja ciklamskog prstena našeg zaštićenog ciklama **8** i zaštićenih ciklama koji se spominju T. Felder i suradnici.[215,216].

Tako je signal kod *m/z* 201,0 asigniran je kao protonirani ciklam $[ciklam(+H)]^+$, signal kod *m/z* 296,9 asigniran je kao protonirani monozaštićeni ciklam $[mono\text{-}TFA\text{-}ciklam\ (+H)]^+$, signal kod *m/z* 510,3 asigniran je kao adukt s Na^+ $[tTFA\text{-}ciklam\ (+Na)]^+$ te signal kod *m/z* 488,9 asigniran je kao protonirani tTFA-ciklam **[**tTFA-ciklam (+H)**]**$^+$ (*Slika 38*) (analogija s literaturom).[215, 216]



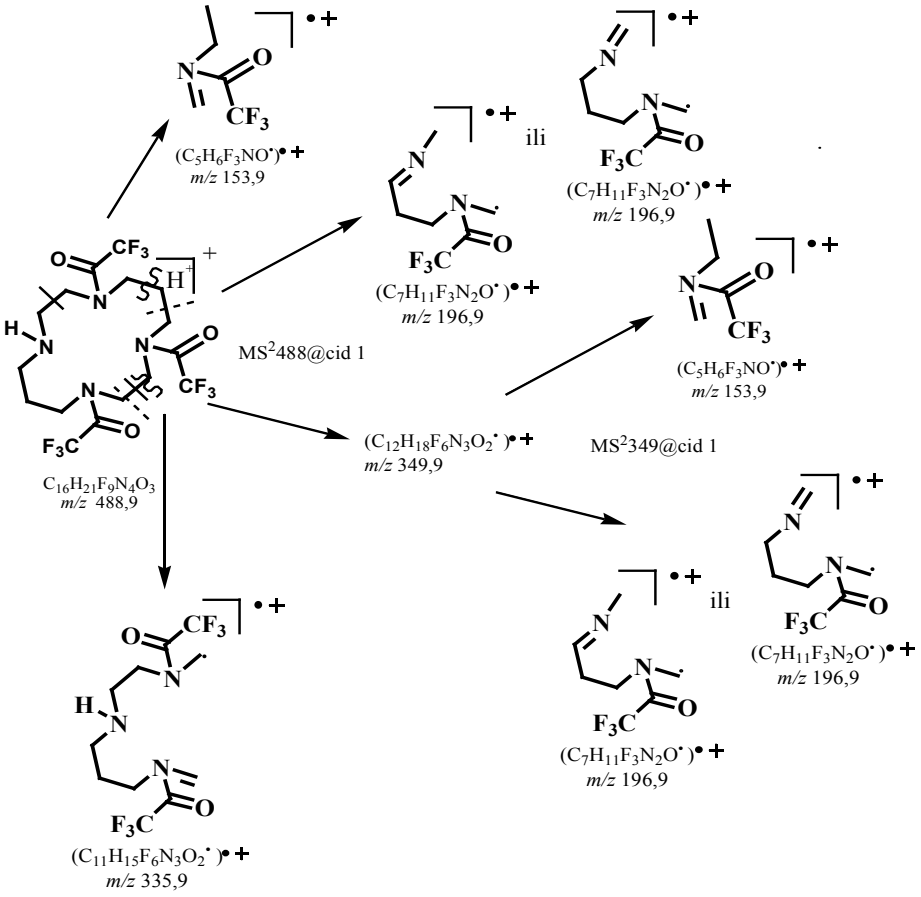
Slika 38: Prikaz cjelovitog spektra tTFA ciklama **8** snimljenog u pozitivnom načinu rada u MeOH pri $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD

4.2.4.1. Određivanje fragmentacijskih putova signala na *m/z* 488



Slika 39: Usporedba teoretskog spektra izotopne raspodjele signala *m/z* 488 i razvučenog spektra signala na *m/z* 488,9 snimljenog na uzorku ciklama **8** u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD

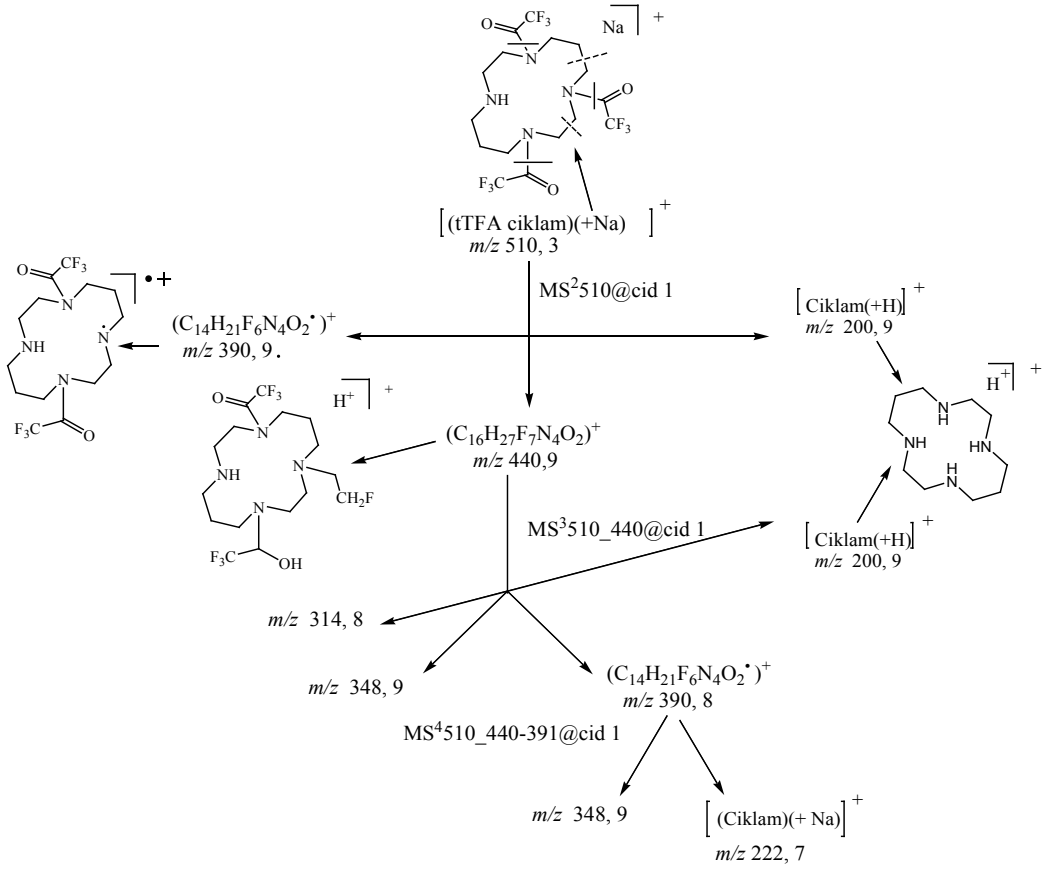
Kao što je vidljivo iz cjelovitog spektra za spoj **8** glavni signali su oni za protonirani ciklam i monozaštićeni ciklam. Budući da se kolizijski induciranom fragmentacijom odmah pojavljuju fragmenti pocijepanog ciklamskog prstena za pretpostaviti je da ne dolazi do skidanja zaštite na izvoru (eng. source) već da su kao takvi bili prisutni u otopini i prije dolaska u instrument. Fragmentacija signala na *m/z* 488,9 u ESI-MS^n odvija se kroz četiri fragmentacijska kanala (*Slika 40*).



Slika 40: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 488,9 te predložene strukture fragmenata, uz označena mjesta cijepanja. Spektri ESI-MS^n signala *m/z* 488,9 snimljenog u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da). (Spektri se nalaze u dodatku B-9).

4.2.4.2. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 510

Fragmentacija signala na *m/z* 510,3 u ESI-MS^n odvija se kroz tri fragmentacijska kanala, od kojih drugi kanal glavni fragmentacijski kanal (*Slika 41*).



Slika 41: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 510,3 te predložene strukture fragmenata uz označena mjesta cijepanja. ESI-MS^n spektri signala *m/z* 510,3 snimljenog u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).
(Spektri ESI-MS^n nalaze se u dodatku B-10).

Sve fragmentacije za glavne signale (*m/z* 488,9 i *m/z* 510,3) koje su provedene i prikazane u shematskim prikazima (*Slika 40* i *Slika 41*) ne slijede istu analogiju cijepanja zbog elektrostatskih interakcija s ionima Na^+. Fragmentacije je moguće promatrati kroz dvije osnovne vrste reakcija koje se događaju unutar ciklamskog prstena, a to su reakcije deprotoniranja i reakcije 1,2-eliminacije. Kolizijski inducirana fragmentacija dovodi do cijepanja N-C veze i izlaska zaštitnih skupina ciklama, ali kao dominantne reakcije u nastanku

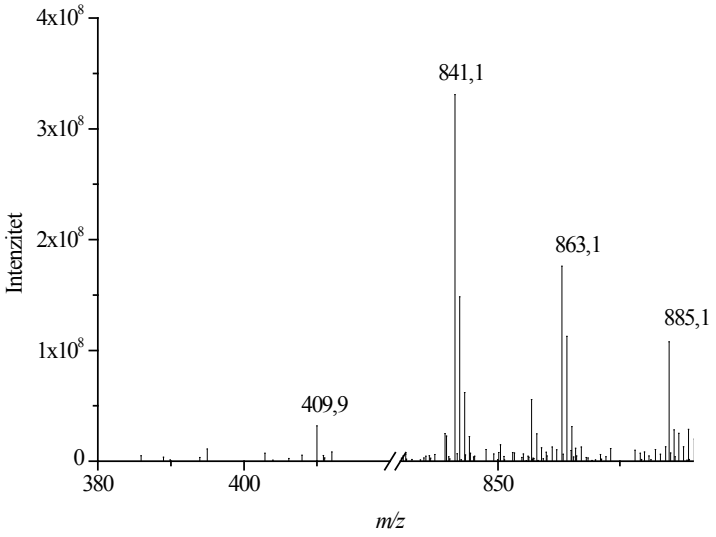
fragmenata su reakcije cijepanja unutar samog ciklamskog prstena. Kada jednom dođe do nastanka radikal-kationa na atomu dušika unutar ciklamskog prstena, dolazi do porasta reakcija α-cijepanja i daljnje fragmentacije ciklamskog prstena.[215,217] U slučaju fragmentacije tTFA-ciklama preferiran je tip radikal-kation fragmentacijskih reakcija.

4.2.5. Karakterizacija konjugata Ciklam-TsC-konjugat **9**

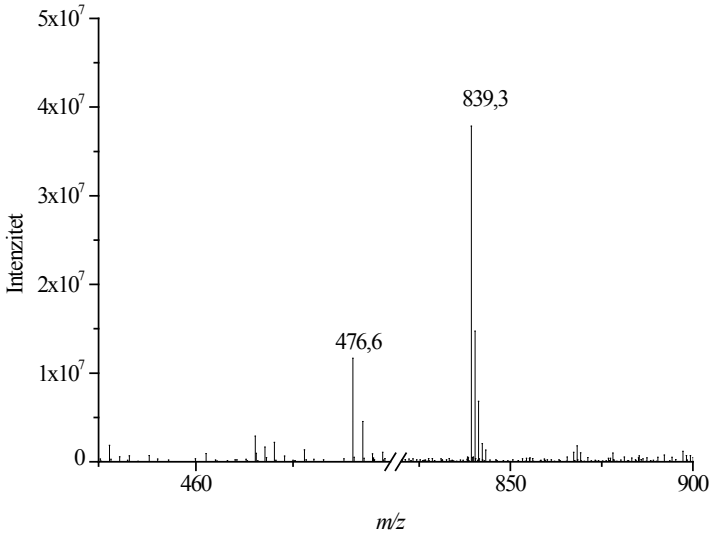
Prilikom snimanja cjelovitog spektra u pozitivnom načinu rada nisu uočeni signali koji bi odgovarali molekularnom ionu (vodikov ili Na adukt), već samo njegovi fragmenti. Dominira fragment nastao cijepanjem ciklamskog prstena opažen kao signal *m/z* 409,9 i njegovi adukti s natrijevim ionom, na *m/z* 841,1, *m/z* 863,1 i *m/z* 885,1 (*Slika 42 a*). Dolazi do cijepanja na izvoru u pozitivnom načinu rada, dok je u negativnom načinu rada opažen molekulski ion i stoga je kompletna asignacija načinjena u negativnom načinu rada.

Pri analizi spektara konjugata **9** snimljenih u negativnom načinu rada uočena su dva glavna signala: *m/z* 476,6 koji je asigniran kao molekulski ion konjugata te *m/z* 839,3 koji je asigniran kao dimerni natrijev adukt fragmenta nastalog cijepanjem ciklamskog prstena (opaženom u pozitivnom načinu rada na *m/z* 409,9 i u negativnom načinu rada *m/z* 408,5 s Na^+ $[(C_{18}H_{28}N_6O_3S_2)_2(-H)_2(+Na)]^-$ (*Slika 42b*).

a)



b)

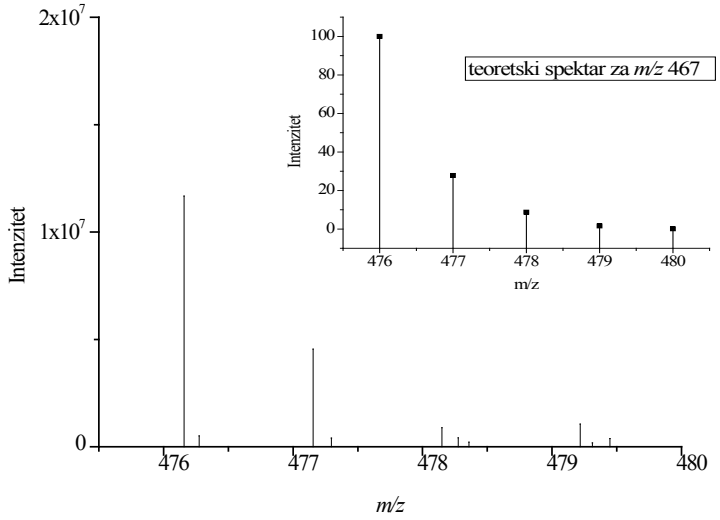


Slika 42: a) Prikaz cjelovitog spektra konjugata **9** snimljenog u ES^+ načinu rada u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, b) prikaz cjelovitog spektra konjugata **9** u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} snimanog u ES^- načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD.

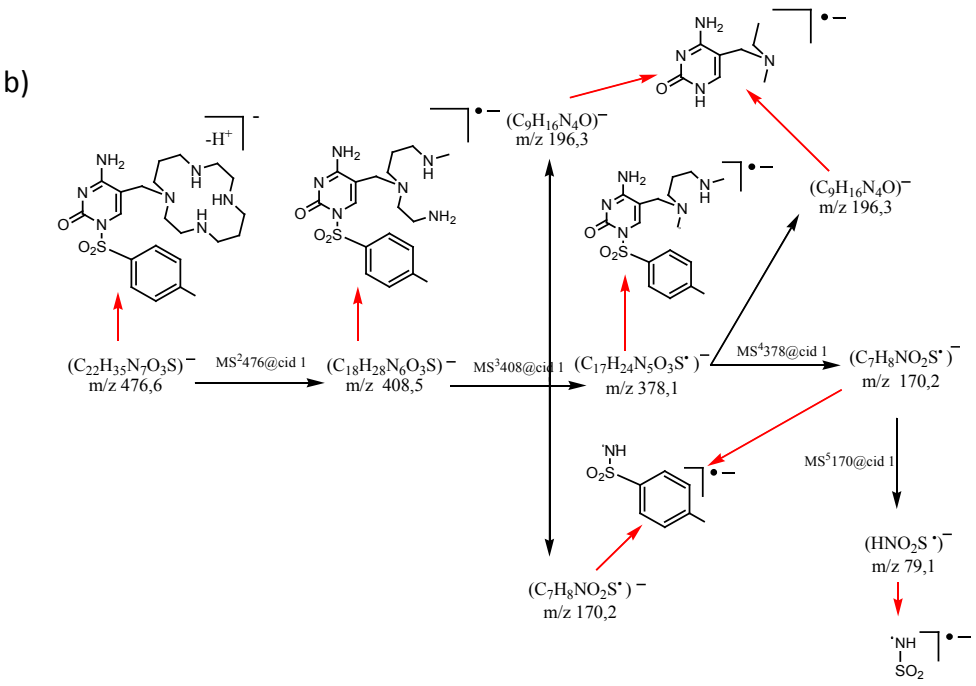
4.2.5.1. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 476

Da bi se potvrdila asignacija signala na *m/z* u ES^- načinu rada 476,6 kao deprotoniranog molekulskog iona provedena je kolizijski inducirna fragmentacija i utvrđeno je postojanje jednog fragmentacijskog kanala, čak i pri @cid 1, dajući samo signal *m/z* 408,5, a čija se fragmentacija nastavlja kroz tri fragmentacijska kanala (*Slika 43* i *44*).

a)

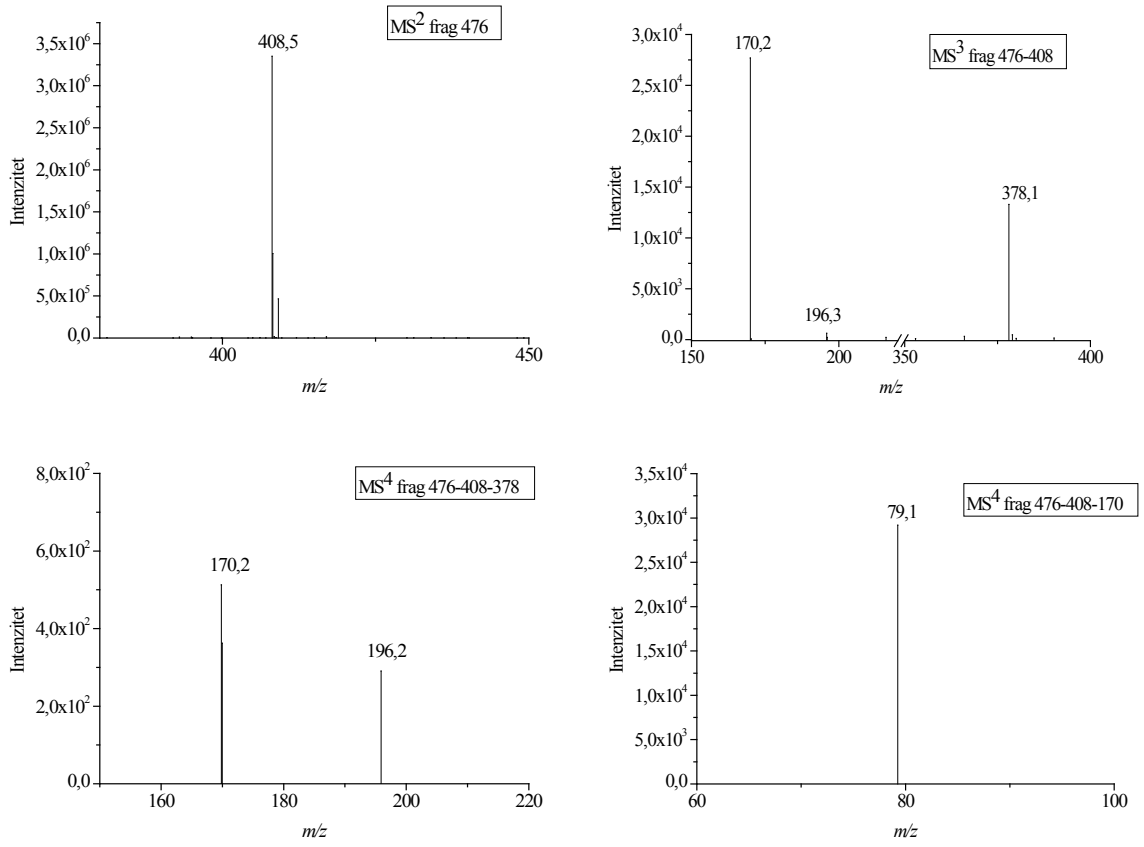


b)



Slika 43: a) Razvučeni spektar signala na *m/z* 476,6 snimljenog u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD i umetnuti teoretski spektar izotopne raspodjele signala *m/z* 476,6, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da), b) Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala *m/z* 476,6.

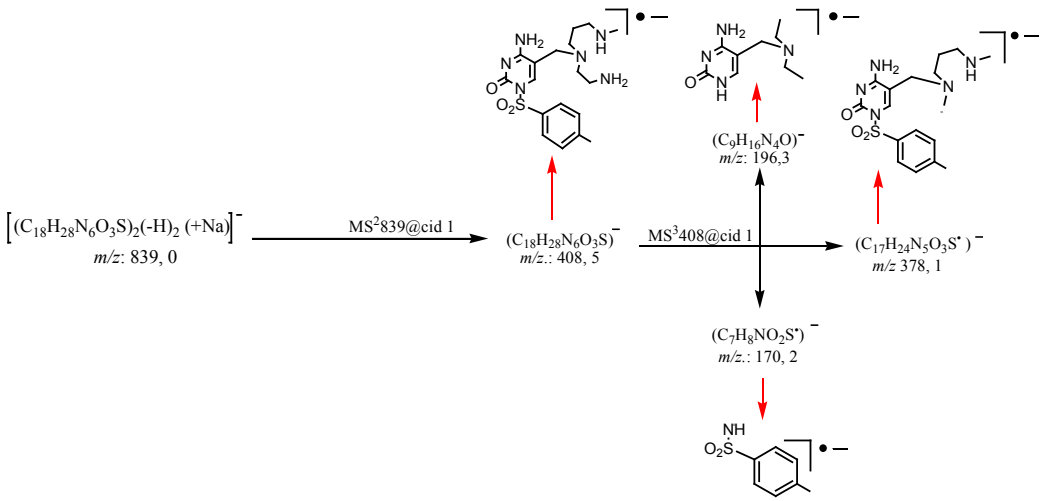
Fragmentacijski put signala *m/z* 476,6 koji je asigniran kao molekulski ion konjugata **9,** daje samo jedan signal *m/z* 408,5 koji je asigniran kao $[C_{18}H_{28}N_6O_3S(-H^+)]^-$. Naime, dolazi do pucanja ciklamskog prstena, pri čemu nastaje stabilna struktura signala *m/z* 408,5. Cijepanje signala *m/z* 408,5 nastavlja se kroz tri kanala, pri čemu nastaju fragmenti opaženi kao signali na *m/z* 196,3 i na *m/z* 378,1 koji predstavljaju fragmente nastale daljnjim cijepanjem ciklamskog prstena. Signal na *m/z* 170,2 koji predstavlja radikal-anion nastao je cijepanjem unutar citozinskog prstena.



Slika 44: Prikaz spektara ESI-MS^n signala na *m/z* 476,6 snimljenog u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u ES^- načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

4.2.5.2. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 839,0

Fragmentacija signala na *m/z* 839,0 koji je asigniran kao natrijev dimerni adukt $[(C_{18}H_{28}N_6O_3S_2)_2(+Na)]^-$, odvija se kroz jedan kanal kao i monomernog aduka, pri čemu nastaje isti signal kod *m/z* 408,5 asigniran kao $[C_{18}H_{28}N_6O_3S(-H^+)]^-$. Dolazi do pucanja ciklamskog prstena i opet nastaje stabilna struktura signala *m/z* 408,5 koja se dalje induciranom kolizijom cijepa analogno opažanju opisanom za monomer (vidi 4.2.5.1.).

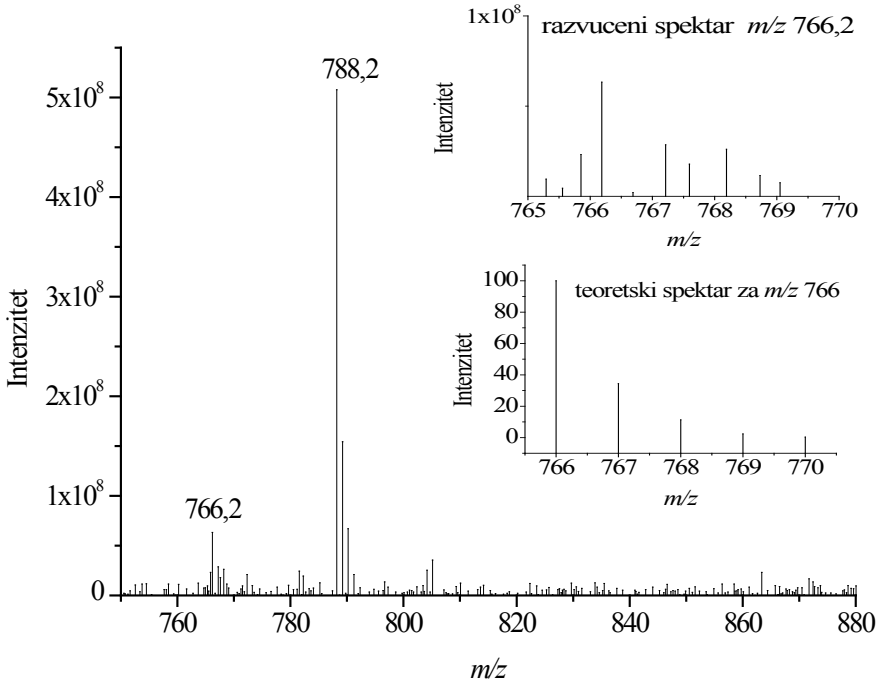


Slika 45: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 839,0, koji su izrađeni na osnovi ESI-MS^n spektara snimljenih u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u negativnom načinu rada na ion trap spektrometru masa amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da). (Spektari ESI-MS^n signala *m/z* 839,0 nalaze se u dodatku B-11).

4.2.6. Karakterizacija konjugata (tTFA-ciklam-TsC ligand) **10**

Karakterizacija konjugata **10,** kao i njegovog građevnog bloka **8**, provedena je u pozitivnom načinu rada, u kojem uočavamo signal protoniranog molekulskog iona, za razliku od konjugata **9** čija je karakterizacija provedena u negativnom načinu rada.

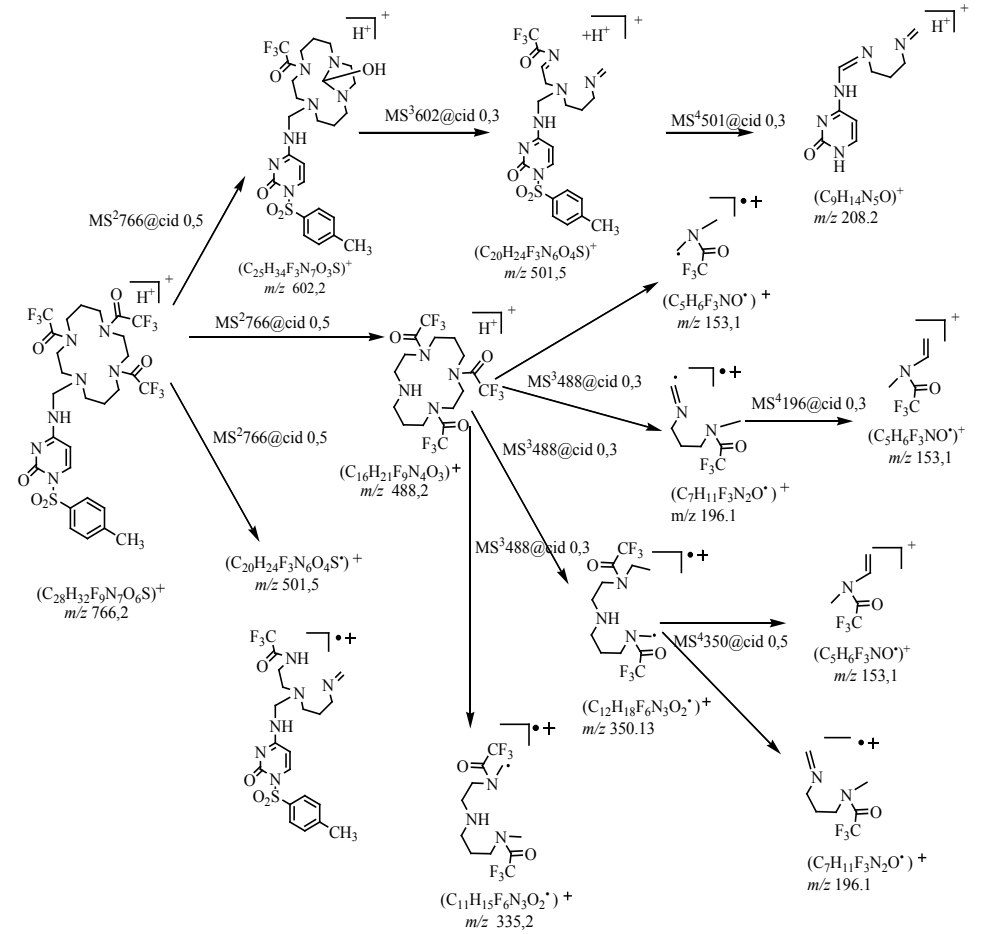
Pri analizi spektara konjugata **10** snimljenih u pozitivnom načinu rada uočena su dva signala asignirana kao adukt ioni konjugata s H^+ (*m/z* 766,2) i s Na^+ (*m/z* 788,2), kojima je struktura potvrđena detaljnom ES^+ studijom (*Slike 46, 47* i *48*).



Slika 46: Prikaz razvučenog cjelovitog spektra tTFA-ciklama-TsC-konjugata **10** u MeOH, $c=10^{-7}$ mol dm^{-3} snimanog u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD. U spektar su umetnuti prikazi razvučenog spektra signala na *m/z* 766,2 snimanog u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u MeOH, $c=10^{-7}$ $moldm^{-3}$ i teoretskog spektra izotopne raspodjele signala *m/z* 766.

4.2.6.1. Određivanje fragmentacijskih putova signala *m/z* 766,2

a)

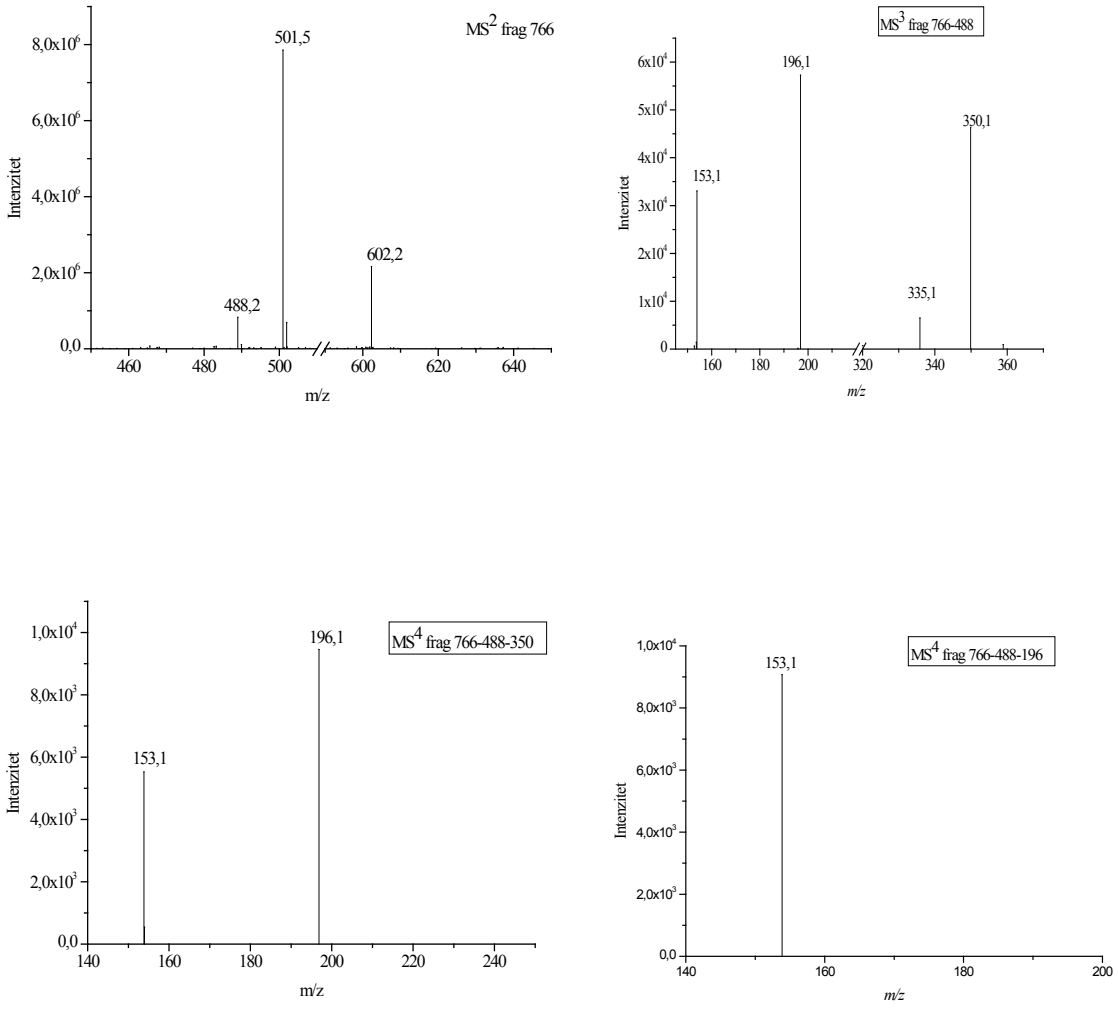


Slika 47: Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 766,2, koji su izrađeni na osnovi spektara ESI-MS^n snimljenih u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 0,5 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Fragmentacija signala na *m/z* 766,2 asigniranog kao vodikov adukt konjugata **10** odvija se kroz tri fragmentacijska kanala. U prvom slučaju nastaje fragment sa signalom *m/z* 602,2 $(C_{25}H_{34}F_9N_7O_3S)^+$ uslijed izlaska zaštitne skupine i potom najvjerojatnije nukleofilnog napada s nezaštićenog dušika na karbonilnu skupinu susjedne zaštitne skupine uzrokujući izlaz CF_3^+ skupine te formiranjem stabilnog peteročlanog prstena. Fragmentacija signala na *m/z* 602,2 daje samo jedan signal na *m/z* 501,5 U drugom slučaju nastaje signal na *m/z* 488,1 $(C_{16}H_{24}F_9N_4O_3)^+$, koji je asigniran kao [tTFA–ciklam(+H$^+$)], a u trećem slučaju nastaje *m/z*

501,5, koji je asigniran kao $(C_{20}H_{24}F_3N_6O_4S^-)^+$ i koji nastaje cijepanjem ciklamskog prstena na isti način koji je uočen kod konjugata **9** pri nastanku fragmenta *m/z* 408,5.

Fragmentacija signala na *m/z* 488,1 istovjetna je prethodno provedenoj fragmentaciji tTFA-ciklama, odnosno nastaju fragmenti istih *m/z*. Pri tome je uočena analogija cijepanja ciklamskog prstena opisana u malobrojnim radovima.[217, 215]



Slika 48: Prikaz spektara ESI-MS^n signala *m/z* 766,2 u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} snimanih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

4.3. Interakcije liganada (2, 3), kompleksa (5, 6), ciklama i tTFA ciklama (7, 8) i konjugata (9, 10) s ionima metala

Kako će novosintetizirani spojevi poslužiti za ispitivanje njihovih biološki aktivnosti, postavilo se pitanje jesu li podložni interakcijama s biološki važnim metalnim ionima koji su sastavni dio hranjivih medija na/u kojima rastu tumorske stanice.

Metoda ESI-MS korištena je za potvrdu struktura spojeva, određivanje stabilnosti u otopinama i u prisutnosti metalnih iona (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) te praćenje interakcija metalnih iona sa spojevima. Interakcije su praćene u ovisnosti o vremenu i različitim koncentracijama spojeva i soli.

4.3.1 Interakcija liganada **2** i **3** te kompleksa **5** i **6** s ionima metala

Svi kationi teže stvarati klastere u plinskoj fazi, ali priroda interakcije ovisi o strukturi klastera i veličini kationa. Alkalijski i zemnoalkalijski metali favoriziraju elektrostatske interakcije s citidinom i broj moklekula citidina ovise o naboju kationa [218]. Kada je metalni ion Zn^{2+}, koordinacija je određena njegovom 3d orbitalom, koja može stavarati kompleksni ion preko koordinacije s ligandom. Upravo zbog toga stoga je stvaranje klastera kod iona Zn^{2+} daleko rjeđe.

N-sulfonilcitozinski ligandi **2** i **3** su derivati citozina kod kojih je tosil ili mezil vezan na citozin putem N-S veze u položaju N1. Iz literature je poznato da se vezanje iona metala na N1 zaštićeni citozin odvija na nekoliko načina: preko N3, preko O2, N4, C5 ili vezanjem metalnog iona na C5=C6 dvostruku vezu, preko preko π-π interakcija. Preferirano je vezanje iona metala u položaju N3 ili O2, a moguće je istovremeno vezanje iona metala na položajuma N3 i O2 u vidu kelata (semikelata) ili premošćivanja.

4.3.1.1. Interakcija liganada **2** i **3** i kompleksa **5** i **6** s ionima Na^+ i K^+

Alkalijski metali Na^+, K^+ nemaju značajan utjecaj na stabilnost sulfonilnih liganada i njihovih Cu(II) kompleksa izuzevši Mg^{2+}. Na^+ i K^+ uslijed elektrostatskih interakcija, kroz duže vrijeme i uz veće koncentracije soli stvaraju klastere. Nastajanje klastera uglavnom je određeno nabojem kationa, a najefikasniji u stvaranju klastera je Mg^{2+}. MsC ligand ne stvara ni jednu preferiranu strukturu s Na^+i K^+, dok TsC ligand preferira stvaranje dimera s Na^+, a nije uočena niti jedna preferirana struktura s K^+. Iz literature je poznato da dimeri citozina su dominantan adukt za ione Li^+, Na^+, K^+ i da najveći afinitet za vezanje na nukelobaze ima Li^+, potom Na^+, a najmanji K^+.[219]

Uočeno je da kod Cu(II) kompleksa liganada (**5** i **6**) prisutnost iona Na^+i K^+ dovodi do raspada kompleksa uz istovremeno nastajanje klastera slobodnih liganada i to kod tek daleko većih količina iona soli u odnosu na komplekse.

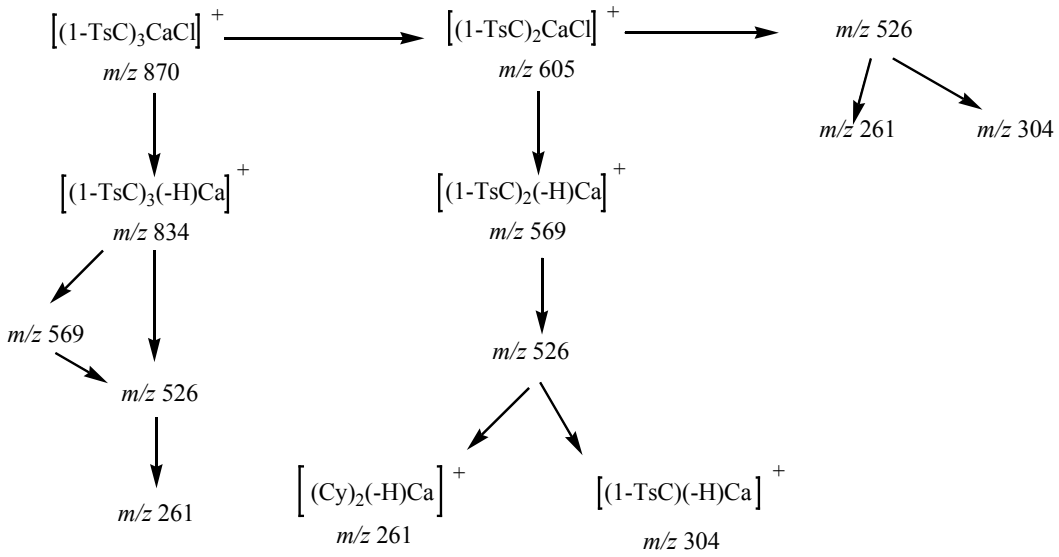
4.3.1.2 Interakcija liganada **2** i **3** i kompleksa **5** i **6** s ionima Ca^{2+} i Mg^{2+}

Zemnoalkalijski ioni metala (Mg^{2+} i Ca^{2+}) učinkovitiji su u stvaranju klastera od ostalih metalnih iona. Uočili smo da naši derivati citozina (ligandi **2** i **3** i kompleksi **5** i **6**) reagiraju sasvim drugačije s ionima Mg^{2+} i Ca^{2+} . Naime Mg^{2+} ioni uzrokuju cijepanje liganada **2** i **3**, kao i njihovih Cu(II) kompleksa. Ioni Mg^{2+} i Ca^{2+} stvaraju klastere na sličan način, ali ioni Mg^{2+} lako cijepaju ligande i njihove bakrene komplekse što je moguće objasniti korištenjem saznanja do kojih je došao Russo u svom radu.[220] On je pokazao da je B3LYP vrijednost apsolutnog afiniteta za Mg^{2+} (187.1 kcal/mol) veća nego za Ca^{2+} (140.1 kcal/mol), što indicira da je ion Mg^{2+} favoriziran u reakciji s citozinom u odnosu na ion Ca^{2+}. Njegovi proračuni geometrijskih parametara za stabilne adukte citozina i iona metala pokazuju da su veze s kisikom obično kraće od veza s atomima dušika.

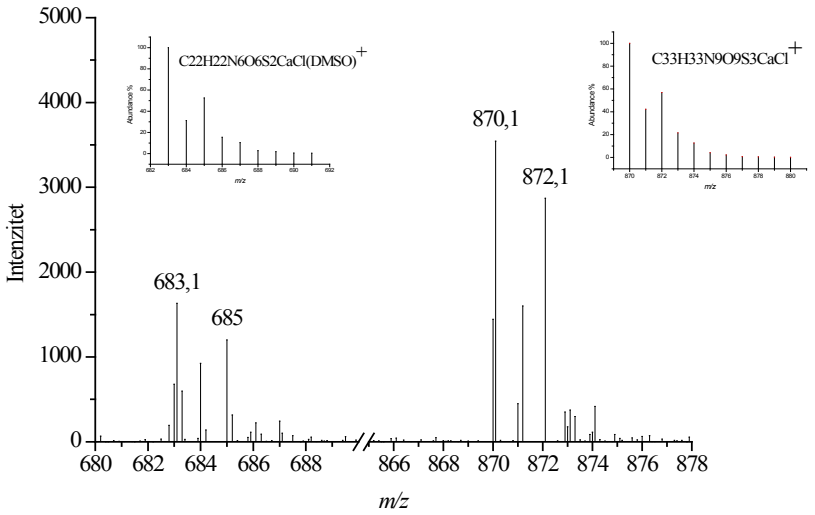
4.3.1.2.1. Interakcija liganada **2** i **3** i kompleksa **5** i **6** s ionima Ca^{2+}

Interakcija 1-TsC liganda **2** s Ca^{2+} ionom rezultira nastankom niza kompleksnih iona. Uočene su specije na*: m/z* 870,0 asignirana kao tris kompleks$[(1\text{-TsC})_3CaCl]^+$ i na *m/z* 683,1 asignirana kao $[(DMSO)(1\text{-TsC})_2CaCl]^+$.*(Slika 51b)* Strukture navedenih specija određene su kolizijski induciranom fragmentacijom, pri čemu signal na *m/z* 870,0 daje samo jedan signal na *m/z* 605,3 koji je asigniran kao $[(1\text{-TsC})_2CaCl]^+$.*(Slika 51a)* Fragmentacija signala na *m/z* 683,1 pri nižim kolizijskim energijama (CE=15 eV; MS/MS na Agilent QQQ) ide u dva fragmentacijska kanala, pri čemu u prvom slučaju dolazi do gubitka molekule otapala (DMSO) i nastanka signala *m/z* 605,3 a u drugom slučaju dolazi do gubitka jednog liganda, što daje signal na *m/z* 417,0. Pri jačim kolizijskim energijama fragmentacija završava nastankom citozin-kalcij kompleksa $[Cy_2(-H)Ca]^+$ (*m/z* 261,1) (*Slika 51c*).

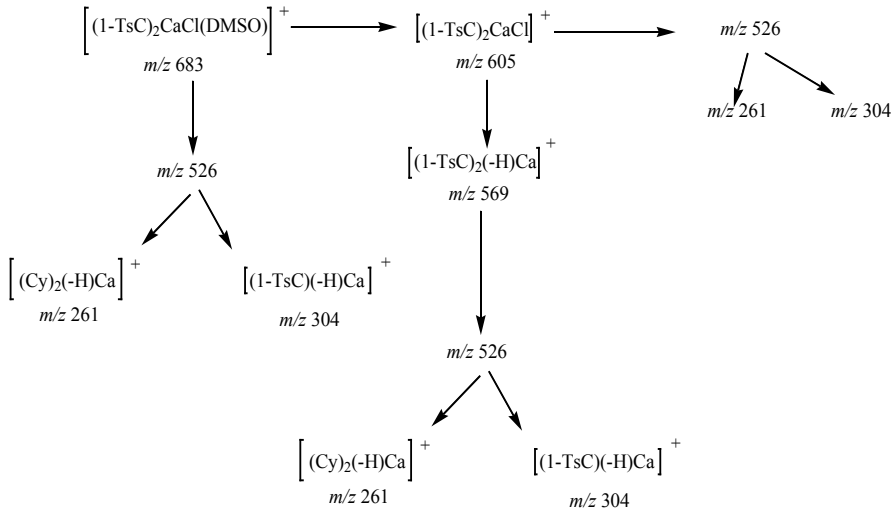
a)



b)



c)



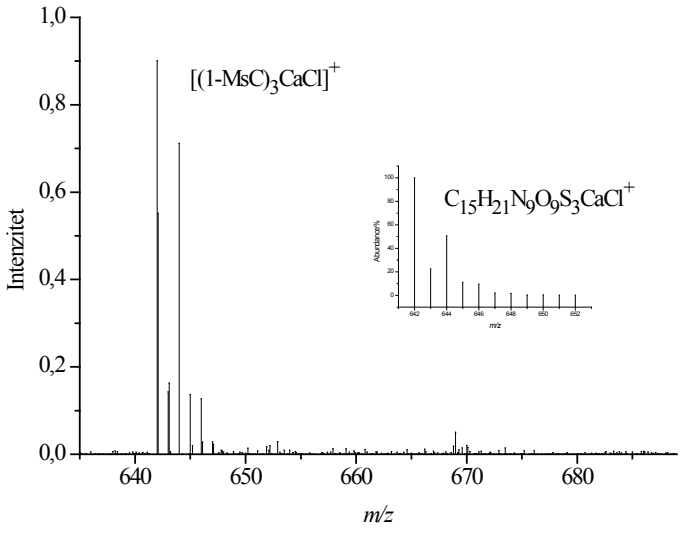
Slika 51: a) Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 870,0 asigniranog kao tris kompleks $[(1\text{-TsC})_3\text{CaCl}]^+$, b) Razvučeni spektar ESI-MS signala na *m/z* 683,1 i na *m/z* 870,0 snimljenih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD uz koncentraciju uzorka (ligand **2** s Ca^{2+}), $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, u otapalu DMSO/MeOH (1/100), u sredini spektara su teoretski spektri za navedene *m/z*, c) Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 683,1 asigniranog kao $[(\text{DMSO})(1\text{-TsC})_2\text{CaCl}]^+$. Fragmentacijski putovi signala na *m/z* 870,0 i *m/z* 683,1 određeni su pomoću spektara ESI-MS^n snimljenih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD uz koncentraciju uzorka (ligand **2** s Ca^{2+}), $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Interakcija 1-MsC liganda **3** s ionom Ca^{2+} rezultira nastankom niza kompleksnih iona. Detektirani su mono, bis i tris kompleksni ioni, ali i miješani kompleksni ioni, npr. signal: *m/z* 642,1 odgovara tris kompleksu $[(1\text{-MsC})_3CaCl]^+$, *m/z* 453,1 *bis* kompleksu $[(1\text{-MsC})_2CaCl]^+$, i *m/z* 264,1 mono kompleksu $[(1\text{-MsC})CaCl]^+$. Asignacija kompleksnih iona je određena pomoću ESI-MS^n.

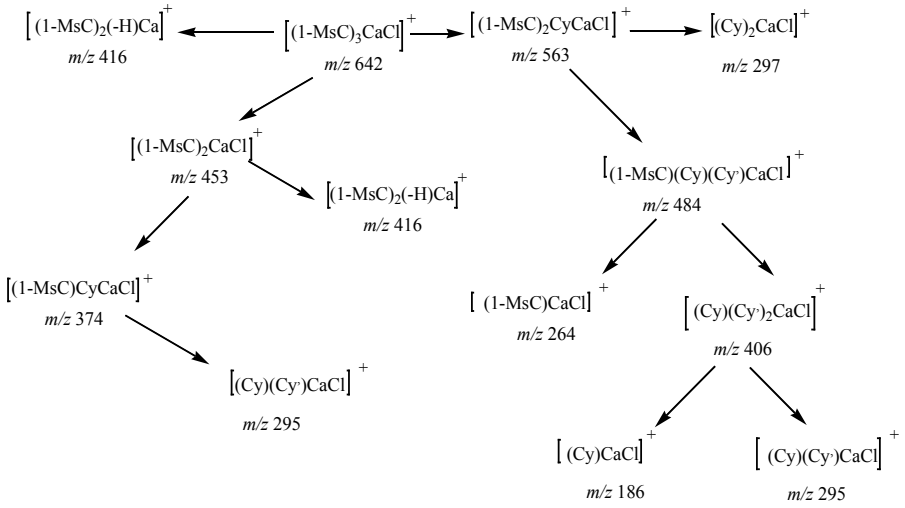
Zanimljivo je da sva tri fragmentacijska kanala završavaju asignacijom citozin-kalcij kompleksa u kojima broj citozina varira od 1-3 $[Cy_{1\text{-}3}CaCl]^+$, odnosno kao mono, bis ili tris kompleksi citozina i kalcija, a koji nastaju zbog cijepanja N-S veze u ligandu. Uočeno je da uz prisutnost vodene pare u plinskoj fazi, u nekim fragmentacijskim kanalima, citozin gubi dva vodikova iona i podliježe konverziji u uracil (Cy´).(*Slika 52b*).

Određeni su fragmentacijski putovi signala *m/z* 642,0 asigniranog kao tris kompleks$[(1\text{-MsC})_3CaCl]^+$ (*Slika 52b*).

a)

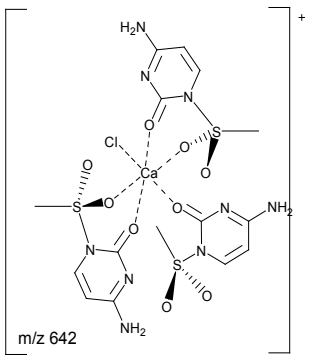


b)



Cy′= signal na *m/z* 109 nastao dehidrogenacijom citozina u prisutnosti vodene pare

Slika 52: a) MS spektar signala na *m/z* 642,0 snimljen u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD uz koncentraciju uzorka (ligand **3** s Ca^{2+}), $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, u otapalu DMSO/MeOH (1/100), u sredini spektra je teoretski spektar za signal na *m/z* 642,0, b) Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 642,0. Fragmentacijski putovi signala *m/z* 642,0 određeni su pomoću spektara ESI-MS^n snimljenih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD uz koncentraciju uzorka (ligand **3** s Ca^{2+}), $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, mase su izolirane u rasponu od ±2 amu (Da).



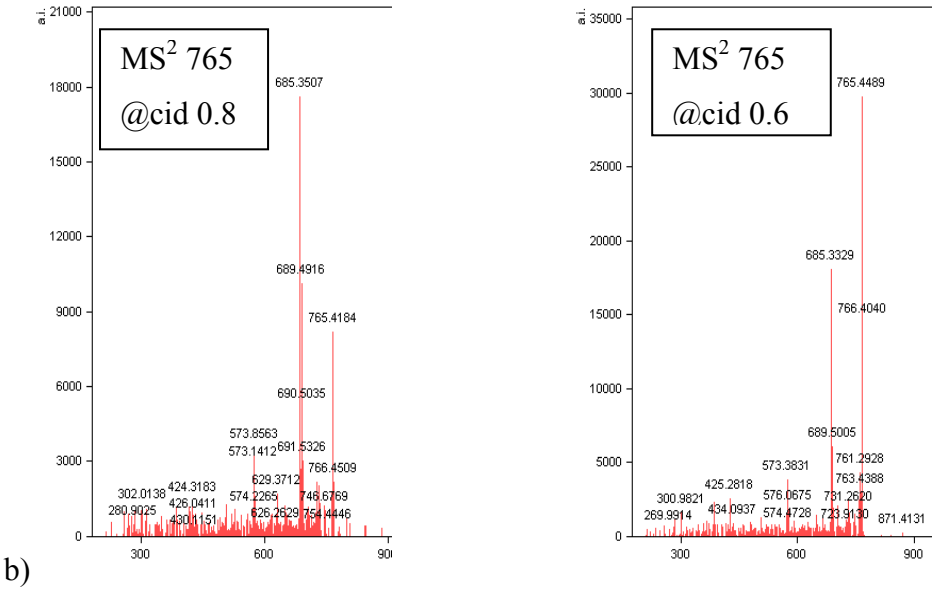
Slika 53. Prikaz moguće strukture za signal na *m/z* 642.1 koji je asigniran kao $[(1\text{-MsC})_3CaCl]^+$

Uočen je veći broj signala specija koje u strukturi sadrže molekule otapala (DMSO ili DMF). Tako su uočene specije na: *m/z* 342,1 koja je asignirana kao $[(DMSO)(1\text{-MsC})CaCl]^+$, na *m/z*

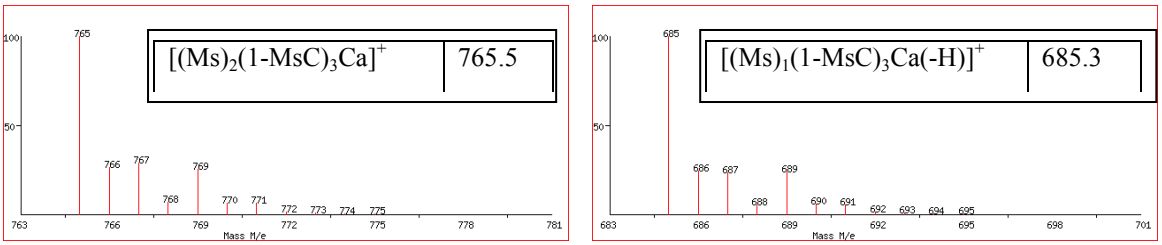
531,1 koja je asignirana kao $[(DMSO)(1\text{-}MsC)_2CaCl]^+$ i na *m/z* 231,0 koja je asignirana kao $[CaCl(DMSO)_2]^+$. Ca^{2+} ion stvara i miješane komplekse s 1-MsC ligandom **3** i mezilatnim dijelom liganda, što pokazuje da kalcij preferira vezanje na O s mezilatnog dijela liganda **3.** Mezilatni dio kompleksa je podložniji cijepanju od stabilnijeg tosilatnog dijela kompleksa što otvara put direktnom vezanju Ca^{2+} iona na kisik mezilatnog dijela.

Povećanje kolizijske energije kod fragmentacije kompleksnih iona koji kao ligand imaju mezilat dovodi do jačeg odziva (eng. abundance) za one ione koji nastaju kao posljedica cijepanja mezilata, kao npr. signali: *m/z* 765,4 koji je asigniran kao $[(Ms)_2(1\text{-}MsC)_3Ca]^+$ i signal *m/z* 685,3 koji je asigniran kao $[(Ms)1(1\text{-}MsC)3Ca(-H)]^+$(*Slika 54*).

a)

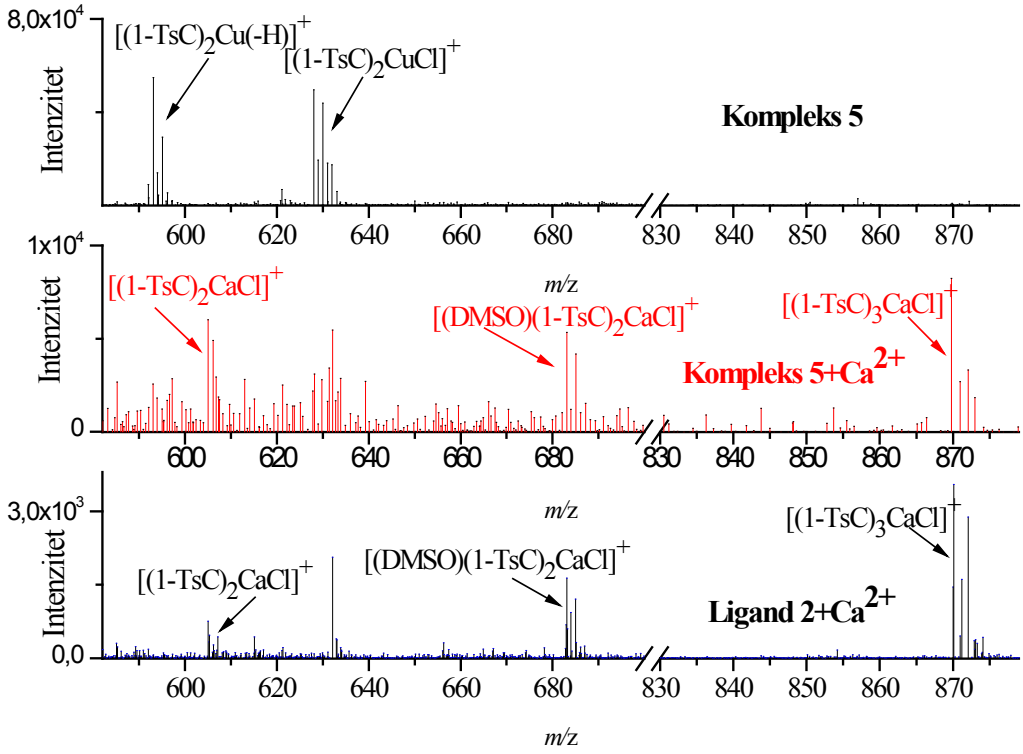


b)



Slika 54: a) Spektri ESI-MS za signal na *m/z* 765,4 koji je asigniran kao $[(Ms)_2(1\text{-}MsC)_3Ca(-H)]^+$ kod @cid 0,6 i @cid 0,8 u otapalu DMSO/MeOH (1/100), snimljenih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD uz koncentraciju uzorka (ligand **3** s Ca^{2+}) $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}, b) teoretski spektri za signale na *m/z* 76,5 i *m/z* 685,3.

U interakciji Cu(II) kompleksa (**5** i **6**) s Ca^{2+} ionom nastaju specije kao i u interakciji samih liganada s Ca^{2+} (*Slika 54*). Nastaje npr. kompleks$[(1\text{-TsC})_3CaCl_2]$ koji je asigniran i u interakciji liganda s Ca^{2+} ionom. Uočeni su tris kompleksi s kalcijem, a također dolazi do nastanka miješanih kompleksa iona Ca^{2+}s ligandima (**2** i **3**) i citozinom (*Slika 55*). Vidljivo je da se signal koji odgovara kompleksu **5** (*m/z* 628,1) kod dodatka Ca^{2+} smanjuje i nestaje, a da se pojavljuje signal kod *m/z* 870,0 koji je asigniran kao tris kompleks$[(1\text{-TsC})_3CaCl]^+$. Nastanak ovih kompleksnih iona može se objasniti interakcijom slobodnih liganada nastalih zbog raspada Cu(II) kompleksa (**5** i **6**) u otopini (izmjena otapalo-ligand) radije nego uslijed metal-metal ligand izmjene.

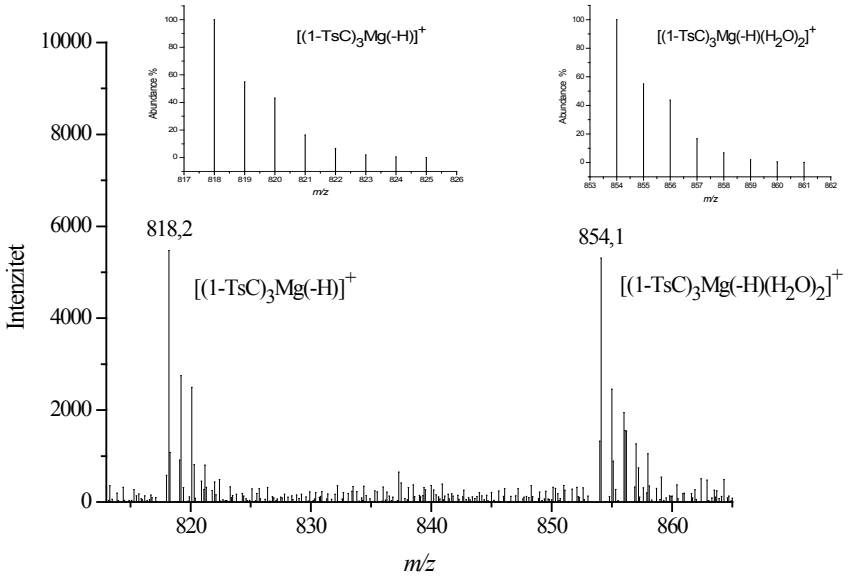


Slika 55: Usporedba spektara kompleksa **5**, otopine kompleksa **5** uz miješanje s Ca^{2+} i otopine liganda **2** uz miješanje s Ca^{2+}, otapalo je DMSO/MeOH (1/100).

4.3.1.2.2. Interakcija liganada **2** i **3** i kompleksa **5** i **6** s ionima Mg^{2+}

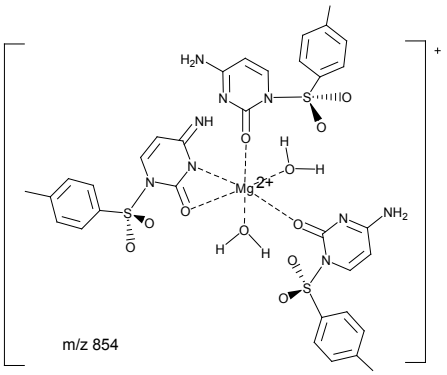
Kod promatranja interakcije iona Mg^{2+} s ligandima **2** i **3**, uočeno je da je interakcija liganada i iona magnezija vrlo brza i rezultira nastankom različitih kompleksa.

Interakcijom Mg^{2+} iona i liganda 1-TsC **2** nastaju miješani kompleksi liganda i citozina, kao i kompleksa s ligandom **2** i tri ili četiri molekule vode. Tijekom studije interakcije Mg^{2+} iona i liganda 1-TsC **2** asignirana su dva glavna signala: na *m/z* 818,2 tris kompleks liganda i iona Mg^{2+} asigniran kao $[(1\text{-TsC})_3Mg(\text{-H})]^+$ i na *m/z* 854,1 tris kompleks koji sadrži i dvije molekule vode, $[(1\text{-TsC})_3Mg(\text{-H})(H_2O)_2]^+$ (*Slika 56*).



Slika 56: Razvučeni cjeloviti spektar, snimljen u ES^+ načinu rada, za signale na *m/z* 818,2 koji je asigniran kao $[(1\text{-TsC})_3Mg(\text{-H})]^+$ i na *m/z* 854,1 koji je asigniran kao $[(1\text{-TsC})_3Mg(\text{-H})(H_2O)_2]^+$) u uzorku (ligand **2** i Mg^{2+}) u otapalu DMSO/MeOH (1/100), uz $c=10^{-5}$ mol dm^{-3} te snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ.

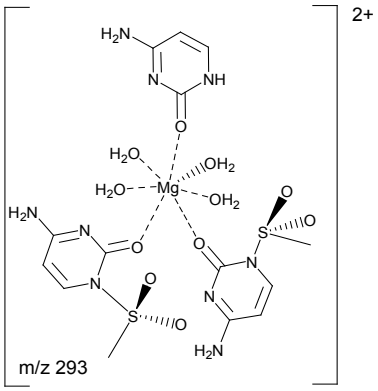
Iz literature je poznato da ion Mg^{2+} preferira vezanje na kisik i dušik.[221] Mg^{2+} ion u plinskoj fazi i vodenim otopinama preferira oktaedarsku koordinaciju i vezanje na kisik.[222]. Poznato je da postoje dva načina vezanja 1- metilcitozina i iona Mg^{2+}: preko vodikovih veza iz vode i direktno ili kombinacijom vezanja u unutarnje ili vanjske sfere (*Slika 57*). Ligandi 1-TsC **2** i 1-MsC **3** mogu teoretski tvoriti komplekse na oba spomenuta načina.



Slika 57: Prikaz moguće strukture za ion na *m/z* 854,1 asigniranog kao $[(1\text{-TsC})_3\text{Mg}(\text{-H})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$.

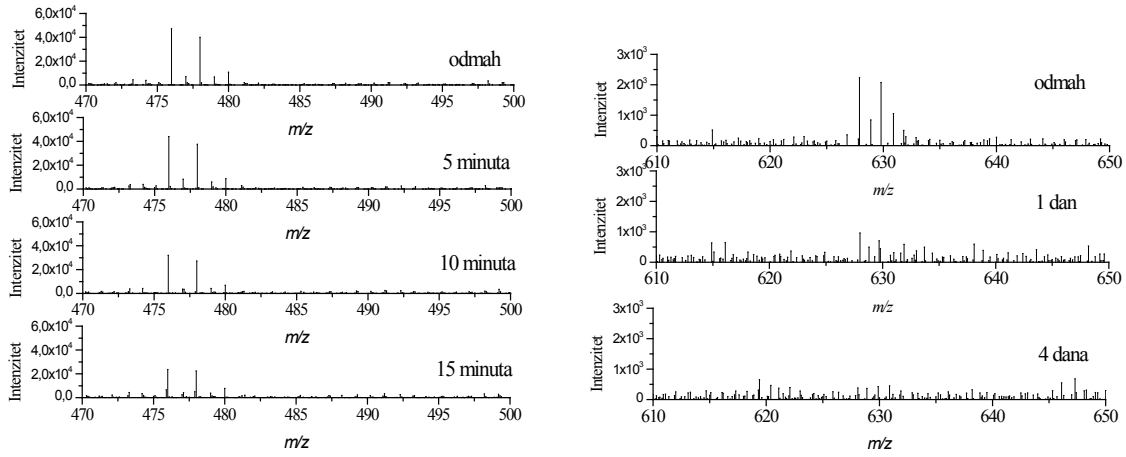
Interakcija liganda 1-MsC **3** s ionima Mg^{2+} rezultira nastankom miješanih kompleksa s citozinom i ligandom **3**. Sve interakcije se događaju vrlo brzo, tako da odmah nakon miješanja liganda **3** i iona Mg^{2+} nastaje signal na *m/z* 212,0 koji je asigniran kao dvostruko nabijeni ion $[(1\text{-MsC})\text{Mg}(\text{-H})]^+$. Uočen je i signal na *m/z* 293,0, koji je asigniran kao $[1\text{-MsC})_2\text{CyMg}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$ i za koji je predložena struktura (*Slika 58*).

Zapaženo je da Mg^{2+} ion kod 1-MsC liganda **3** u pozitivnom načinu rada uzrokuje cijepanje na citozinski dio (signal na *m/z* 112,2) i mezilni dio (signal na *m/z* 79,0). Ligand 1-TsC **2** je stabilniji i teže dolazi do cijepanja N-S veze te raspada liganda u pozitivnom načinu rada (ES^+) na tosilni dio (signal na *m/z* 155,0) i citozinski dio (signal na *m/z* 112,2)



Slika 58: Prikaz moguće strukture za signal na *m/z* 293,0 asigniran kao $[(1\text{-MsC})_2\text{CyMg}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$.

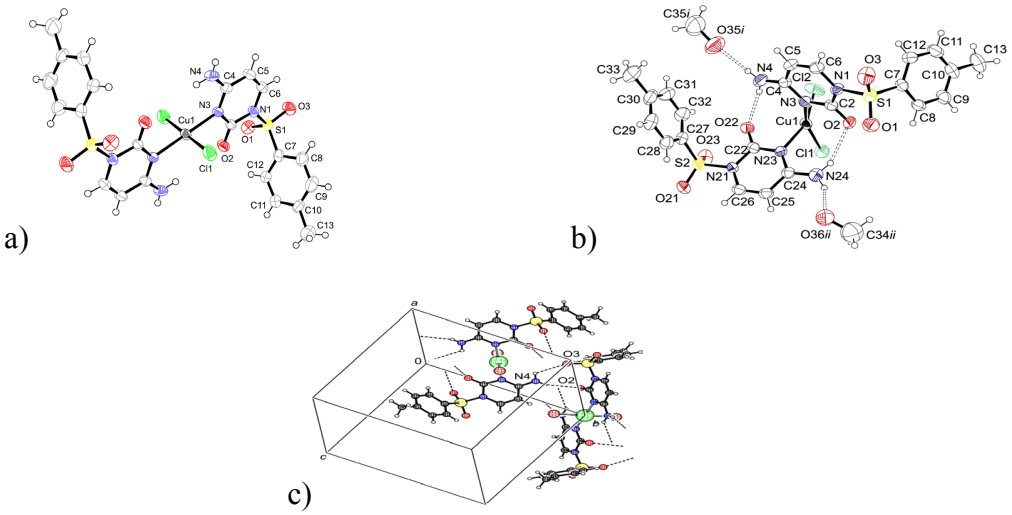
Osim što ioni Mg^{2+} dovode do cijepanja N-S veze u ligandu 1-MsC **3,** isto tako utječu i na cijepanje iste veze u kompleksu **]**Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$], **6**. Kao što je ligand 1-TsC **2** stabilniji i kod njega ne dolazi do cijepanja N-S veze, isto se ponaša i njegov Cu(II) kompleks **5**. Uočeno je da kompleks **6** koji kao ligand sadrži mezilatni derivat, nestaje (raspada se) za nekoliko sati, dok je kompleks **5** koji sadrži tosilni derivat kao ligand postojan nekoliko dana (*Slika 59*). Postojanost Cu(II) kompleksa **5** i **6** u otopini ovisi o vrsti otapala, koncentraciji magnezijeve soli, kao i o kristalnom obliku samog kompleksa.



Slika 59: Usporedba stabilnosti kompleksa **5** (a) i **6** (b) u otapalu DMSO/H_2O (1:100): a) razvučeni MS spektar miješane otopine **[**Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$**]** **6** i Mg^{2+}iona u omjeru 1:1 a stabilnost je praćena po signalu na *m/z* 476,6, b) razvučeni MS spektar miješane otopine **[**Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$**]** **5** i Mg^{2+}iona u omjeru 1:1, a stabilnost je praćena po signalu na *m/z* 628,1.

Rostov i suradnici[223] u radu o interakciji metalnih kationa i citozina navode kao ključni čimbenik za interakciju ulogu korištenog otapala. Na osnovu te činjenice, uočili smo da se reaktivnost kompleksa **[**Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$**]** **5** s ionima Mg^{2+}može ubrzati ako su u kristalnoj rešetci kompleksa prisutne molekule MeOH. Naime, kompleks **5** može se pripremiti na dva načina: brzom i sporom kristalizacijom, pri čemu nastaju dva pseudopolimorfa. U slučaju kompleksa [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] **5** to podrazumijeva ugradnju molekula metanola u kristalnu rešetku kompleksa, pri čemu ostaje sačuvan kristalni oblik kompleksa. Primjećeno je da je razlika samo u kristalizaciji kompleksa u kristalnoj rešetci, odnosno da nastaju plavi kristali (s MeOH) i zeleni kristali (bez MeOH) (*Slika 60*). Upravo ta činjenica stvara razliku u

reaktivnosti kompleksa. Kompleks bez MeOH u kristalnoj rešetci reagira znatno sporije s ionima Mg^{2+}u odnosu na kompleks s MeOH. Kompleks koji je sporiji u reaktivnosti korišten je za daljnja antitumorska istraživanja.



Slika 60. a) ORTEP crtež pseudopolimorfa kompleksa **5,** zelenog kompleksa; b) ORTEP crtež pseudopolimorfa kompleksa **5,** plavog kompleksa; c) kristalna rešetka zelenog kompleksa. Slika je iz rada S. Višnjevac.

Naši rezultati pokazuju da oba liganda **2** i **3**, kao i njihovi Cu(II) kompleksi **5** i **6** stvaraju vrlo slične klastere s ionima Mg^{2+} i Ca^{2+}, jer oba metalna iona preferiraju vezanje na kisik.[224,225] Predložene vjerojatne strukture kompleksa s ionima Mg^{2+} i Ca^{2+} (*Slike 53, 58, 57*) izrađene su na osnovu naših rezultata i usporedbe s poznatim eksperimentalnim[226,227] ili i teoretskim podacima[228].

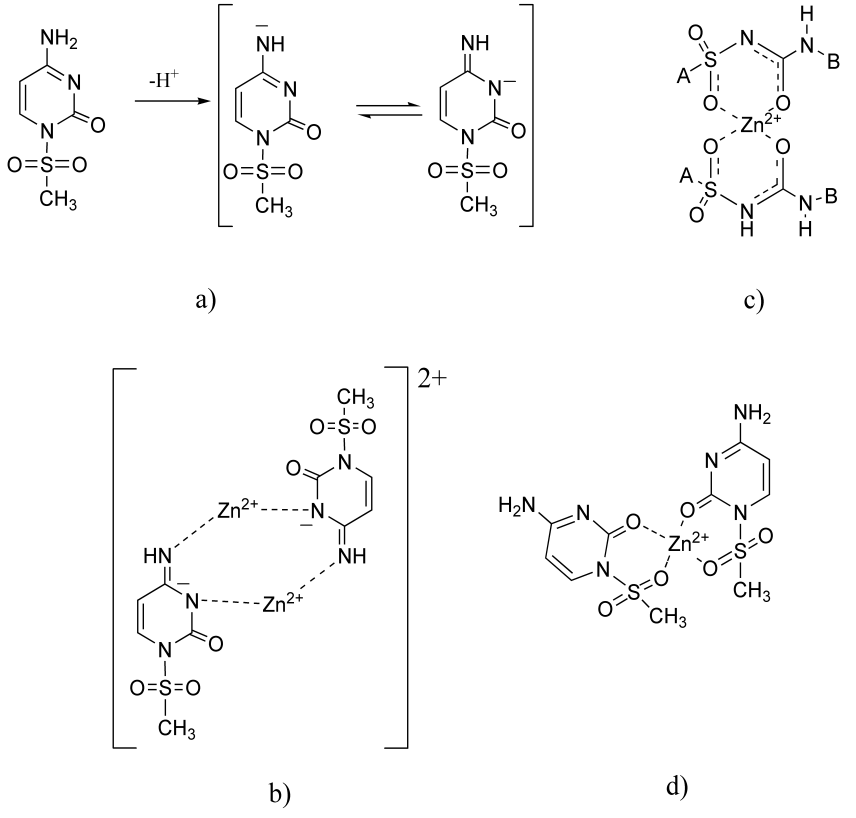
4.3.1.3. Interakcija liganada **2**, **3** i kompleksa **5**, **6** s ionima $\mathbf{Zn^{2+}}$

Za razliku od alkalijskih i zemnoalkalijskih metala koji preferiraju vezanje na O i N, ioni Zn^{2+} preferirju vezanje na N ili S. Dok alkalijski i zemnoalkalijski metali preferiraju elektrostatske interakcije, Zn^{2+} svara koordinacijske komplekse s ligandom.

Interakcija 1-MsC liganda **3** i iona Zn^{2+} rezultira nastankom većeg broja kompleksa. Zn^{2+} u interakciji s ligandima (**2** i **3**) i Cu(II) kompleksima (**5** i **6**) daje monometalne komplekse, a kroz duže vrijeme i miješane dimetalne komplekse uključujući i molekule vode u strukture. U

interakciji 1-TsC liganda **2** s Zn^{2+} dolazi do nastanka sličnih specija koje su uočene kod liganda **3**. Iako su dominantne specije koje su asignirane kao bis ili tris kompleksi, uočene su i specije koje u strukturu uključju ligand **2**, citozin te molekule otapala (DMF ili DMSO).

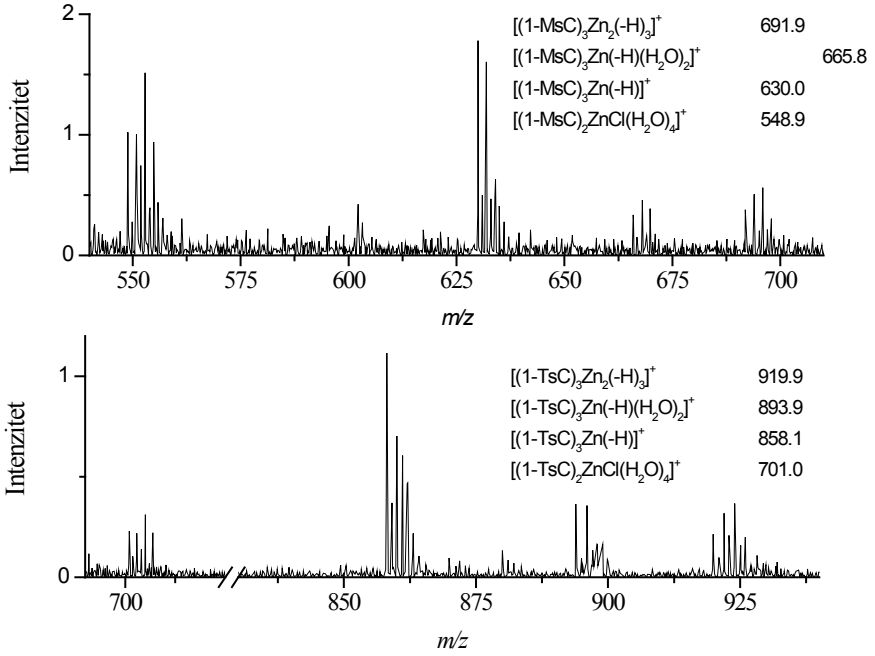
Obzirom da je ligande (**2** i **3**) i komplekse (**5** i **6**) moguće usporediti s citozinom i tienilsulfonil ureom, jer u strukturi sadrže obje navedene komponente, u interakciji s ionima Zn^{2+}, ligandi (**2** i **3**) i kompleksi (**5** i **6**) ponašaju se dvojako, kao bidentatni O ligad i kao bidentatni N ligad za Zn^{2+}, (*Shema 16*). Naime, Orosz i suradnici[229] opisuju da se tienilsulfonil urea ponaša kao bidentatni O ligad za Zn^{2+}, dok se citozin ponaša kao bidentatni N ligand za Zn^{2+}. Poznato je da citozin ima sposobnost premošćivanja dva iona Zn^{2+}. Kobetić i suradnici uočili su sposobnost premošćivanja za ligand **2** u dinuklearnom Pd^{2+} kompleksu, što je dokazano MS-om za plinsku fazu, kao i difrakcijom X zraka za kondenziranu fazu.



Shema 16: a) deprotonirani citozinski derivat, ligand **3**, b) moguće interakcije deprotoniranog lihanda **3** s dva Zn^{2+} iona, c) interakcija s ionima Zn^{2+} po modelu tienilsulfonil uree, d) primjer moguće interakcije po modelu tienilsulfonil uree između liganda 1-MsC **3** i Zn^{2+}.

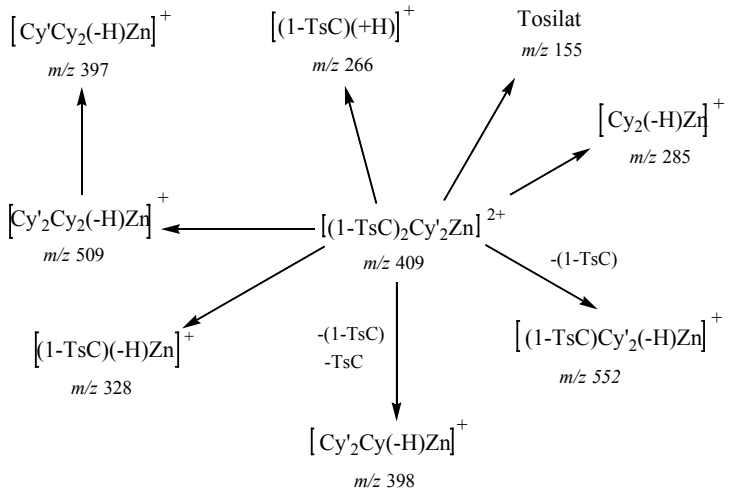
Premda dinuklearni klasteri mogu nastati putem vodikovih veza N-H···O ili O···H-OH, naša zapažanja su da najvjerojatnije citozin premošćuje dva iona Zn^{2+}, jer je uočen nastanak dinuklearnih kompleksa samo uz prisutnost citozina.

Bencini[230] u svom radu govori o velikoj stabilnosti citozinskih adukata, sugerirajući da se radi o premošćivanju s dva iona Zn^{2+}. Imajući to na umu uočene signale na na *m/z* 919,9 $[(1\text{-}TsC)_3Zn_2(\text{-}H)_3]^{2+}$ i *m/z* 691,9 $[(1\text{-}MsC)_3Zn_2(\text{-}H)_3]^{2+}$.koji su asignirani kao dimetalni Zn^{2+} kompleksi asignirali smo određivanjem fragmentacijskih puteva za iočene signale, te usporedbom s teoretskim podacima (*Slika 61*).



Slika 61: Spektri ESI-MS i asignacije glavnih signala uočenih kod interakcije liganada **2** i **3** i iona Zn^{2+} (omjer ligand: Zn^{2+}=3:1) u otapalu DMSO/H_2O (1/100), snimljenih u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}.

Određivanje fragmentacijskih puteva za komplekse liganada **2** i **3** s ionom Zn^{2+} bazira se na cijepanju N-S veze u ligandima, bez obzira o kojem se ligandu radilo. Jedan od primjera je način cijepanja prikazan na *slici 62* za signal na *m/z* 409,0 koji je asigniran kao $[(1\text{-}TsC)_2Cy'_2Zn]^{2+}$. Slično kao i kod kompleksa s Ca^{2+} uočeno je i pregrađivanje citozina u plinskoj fazi.



Slika 62: Shematski prikaz fragmentacijskog puta signala na *m/z* 409,0 (MS^2 409 @cid 1) asigniranog kao $[(1\text{-TsC})_2Cy'_2Zn]^{2+}$. Spekar je snimljen u otapalu DMSO/MeOH (1:100) uz @cid 1, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da) Citozin (označen kao Cy') je u nekim fragmentacijskim kanalima, uz prisutnost vodene pare podvrgnut konverziji u uracil.

Cu(II) kompleksi lignada (**5** i **6**) u interakciji s ionima Zn^{2+} najvjerojatnije daju slične produkte (*Slika 61*).

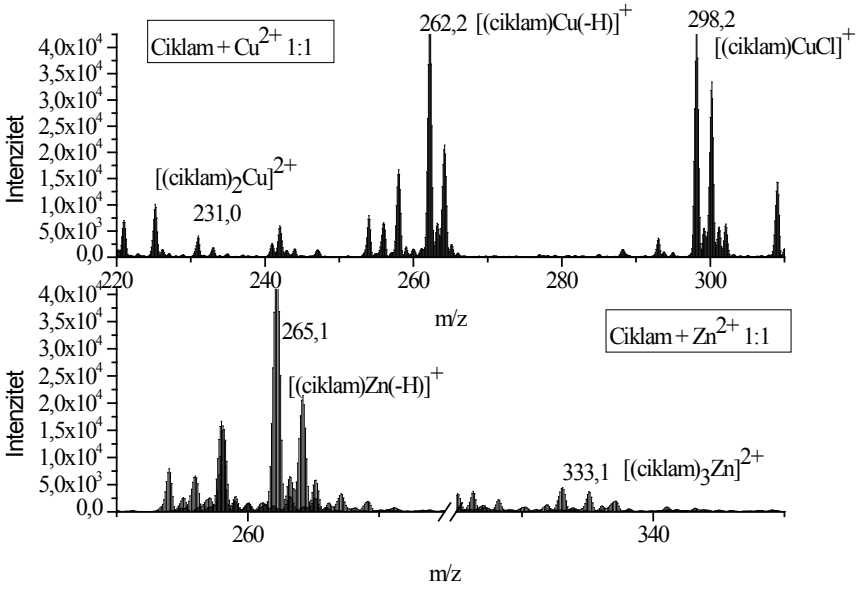
4.3.1.4 Interakcija ciklama **7** s ionima $\mathbf{Cu^{2+}}$ i $\mathbf{Zn^{2}}$

U literaturi su studirani ciklam[212,213] i supstituirani ciklam[215,216] kao ligandi za kompleksiranje s ionima metala. Uspješnost kompleksiranja uvelike ovisi o veličini kationa i mogućnosti njegova „sjedanja“ u šupljinu makrocikla. Najbolju interakciju s ciklamom ostvaruju prijelazni metali: Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} i Cu^{2+}.

Obzirom da su uz ligande **2** i **3** i ciklam **7** građevni blokovi od kojih su građeni konjugati **9** i **10**, bilo je potrebno proučiti interakciju ciklama **7** s ionima Cu^{2+} i Zn^{2+}, kako bi si olakšali karakterizaciju kompleksa koji nastaju interakcijom konjugata **9** i **10** s ionima Cu^{2+} i Zn^{2+}.

Kod interakcije ciklama **7** s ionima Cu^{2+} i Zn^{2+} u pozitivnom načinu rada uočena su četiri signala: *m/z* 332 koji je asigniran kao $[(\text{ciklam})_3Cu]^{2+}$, signal *m/z* 231,0 koji je asigniran kao

[(ciklam)$_2$Cu]$^{2+}$, signal *m/z* 333,1 koji je asigniran kao [(ciklam)$_3$Zn]$^{2+}$ i signal *m/z* 265,1 koji je asigniran kao [(ciklam)(-H)Zn]$^{+}$.(*Slika 63*) U negativnom načinu rada nisu pronađeni karakteristični signali za kompleksne ione s Cu^{2+} i Zn^{2+}.



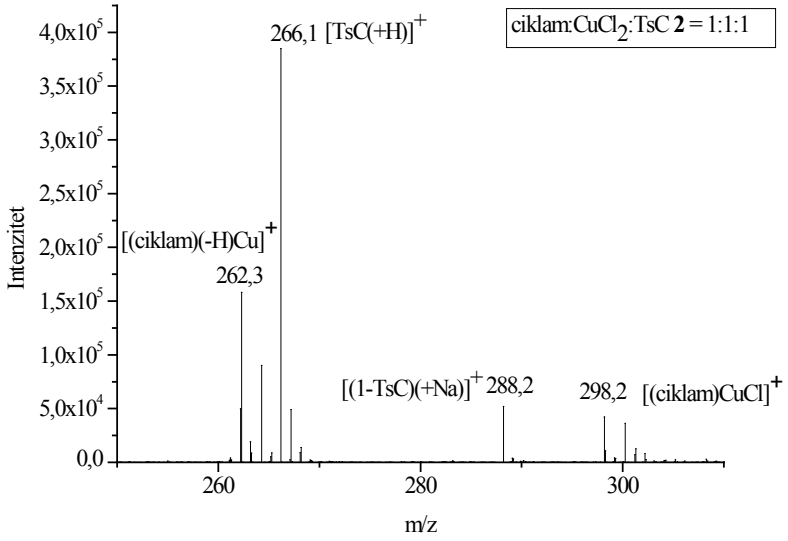
Slika 63. a) Razvučeni cjeloviti spektar ESI-MS, specija nastalih miješanjem otopina ciklama **7**, c=10^{-5} mol dm^{-3} i Cu^{2+}, c=10^{-5} mol dm^{-3} u omjeru 1:1, u otapalu DMSO/MeOH (1:100), b) razvučeni cjeloviti spektar ESI-MS, specija nastalih miješanjem otopina ciklama **7**, c=10^{-5} mol dm^{-3} i Zn^{2+}, c=10^{-5} mol dm^{-3} u omjeru 1:1, u otapalu DMSO/MeOH (1:100). Spektar je snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u ES^{+} načinu rada.

4.3.2. Interakcija otopina ciklama : $CuCl_2$: TsC **2**

Miješanjem otopina ciklama, $CuCl_2$ i TsC **2** željeli smo odrediti koje mjesto vezanja u kojugatu preferira Cu^{2+}. Iz literaturnih podataka[212,213] poznato je da je ciklam vrlo dobar ligand za kompleksiranje s ionima Cu^{2+}. Pretpostavili smo da će pri manjim koncentracijama soli Cu^{2+} preferirati vezanje u šupljinu ciklama, a pri većim koncentracijama soli doći će i do vezanja Cu^{2+} na ligand 1-TsC **2**.

4.3.2.1. Odnos ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** =1:1:1 i odnos ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** = 1:2:1

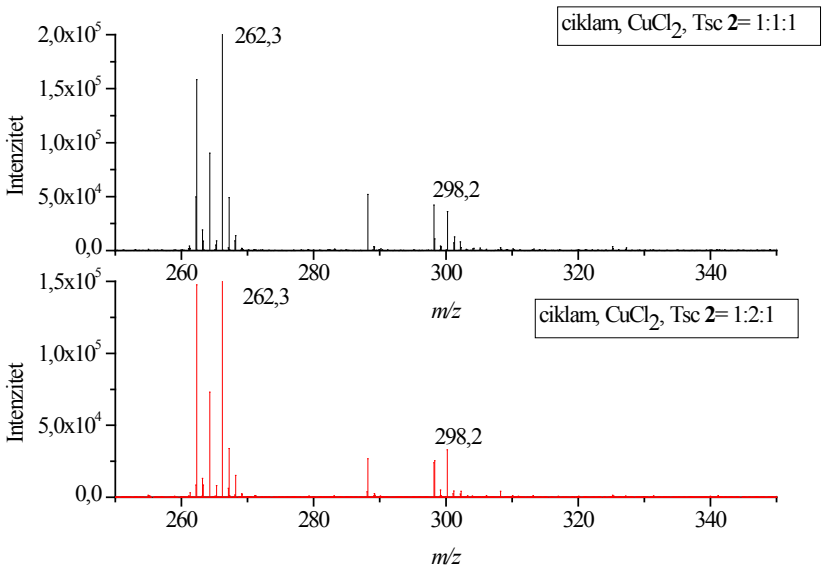
Kod miješanja otopina ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** u omjerima 1:1:1 i promatranih kroz tri dana u pozitivnom načinu rada uočeno je da nastaju nove specije: na *m/z* 262,3 koja je asignirana kao **[**(ciklam)(-H)Cu**]**$^+$ te specija na *m/z* 298,2 koja je asignirana kao **[**(ciklam)CuCl**]**$^+$. Već prvog dana nije ostalo slobodnog ciklama, već se sav kompleksirao. U tom omjeru reaktanata nije uočen signal na *m/z* 628,1 što odgovara Cu(II) kompleksu **5** (*Slika 64*).



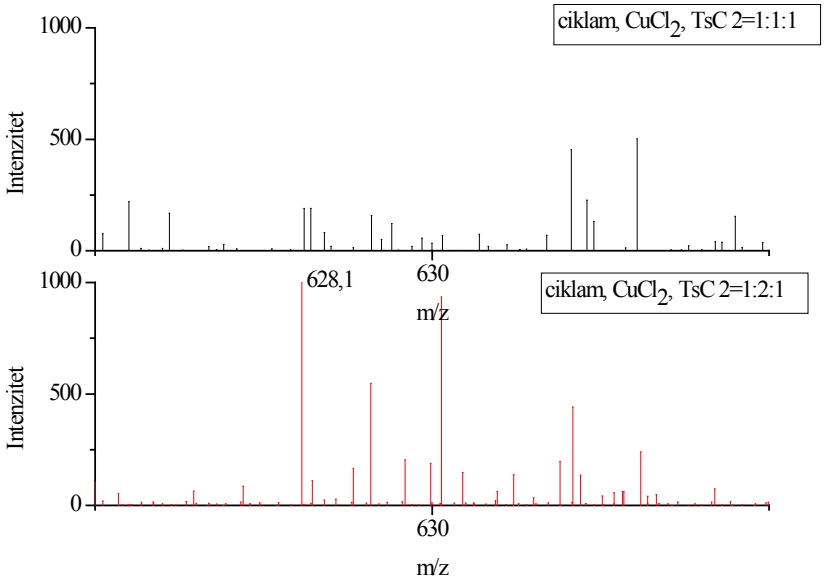
Slika 64. Spektar ESI-MS otopina ciklama, c=10^{-5} mol dm^{-3} : $CuCl_2$, c=10^{-5} mol dm^{-3} : TsC **2**, c=10^{-5} mol dm^{-3} u omjerima 1:1:1 u MeOH s vidljivim specijama na *m/z* 262,3 te na *m/z* 298,2. Spektar je snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u ES^+ načinu rada.

Kod miješanja otopina ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** u omjerima 1:2:1 i promatranih kroz tri dana u pozitivnom načinu rada uočeno je da nastaju nove specije na *m/z* 262,3 što odgovara **[**(ciklam)(-H)Cu**]**$^+$, te specije na *m/z* 298,2 što odgovara **[**(ciklam)CuCl**]**$^+$, dakle uočavamo signale istih *m/z* kao i kod omjera 1:1:1. (*Slika 65a*). Ciklam se sav kompleksirao, ali pri tom omjeru reaktanata (1:2:1) uočen je signal na *m/z* 628,1 što odgovara Cu(II) kompleksu **5** (*Slika 65b*).

a)



b)



Slika 65. a) Spektar ESI-MS otopina ciklama, c=10^{-5} mol dm^{-3} : $CuCl_2$, c=10^{-5} mol dm^{-3} : TsC, c=10^{-5} mol dm^{-3} : u omjerima 1:1:1 i 1:2:1 u MeOH sa vidljivim specijama na *m/z* 262,3 te na *m/z* 298, koje nastaju kod oba navedena omjera reaktanata, b) spektar ESI-MS otopina ciklama, c=10^{-5} mol dm^{-3} : $CuCl_2$, c=10^{-5} mol dm^{-3} : TsC, c=10^{-5} mol dm^{-3}, u omjerima 1:1:1 i 1:2:1 u MeOH, pri čemu je vidljivo da se kod omjera 1:2:1 pojavljuje signal na *m/z* 628,1 što odgovara Cu(II) kompleksu **5**. Spektar je snimljen na spektrometru Agilent 6410 QQQ u ES^+ načinu rada.

Time smo potvrdili našu pretpostavku da će kod manjih koncentracija soli Cu^{2+} preferirati vezanje u ciklamski prsten, a tek kod omjera reaktanata 1:2:1 dolazi do vezanja i na TsC ligand.
Taj način ponašanja pri kompleksiranju primjenjiv je i na novosintetizirane poliaza makrocikličke konjugate.

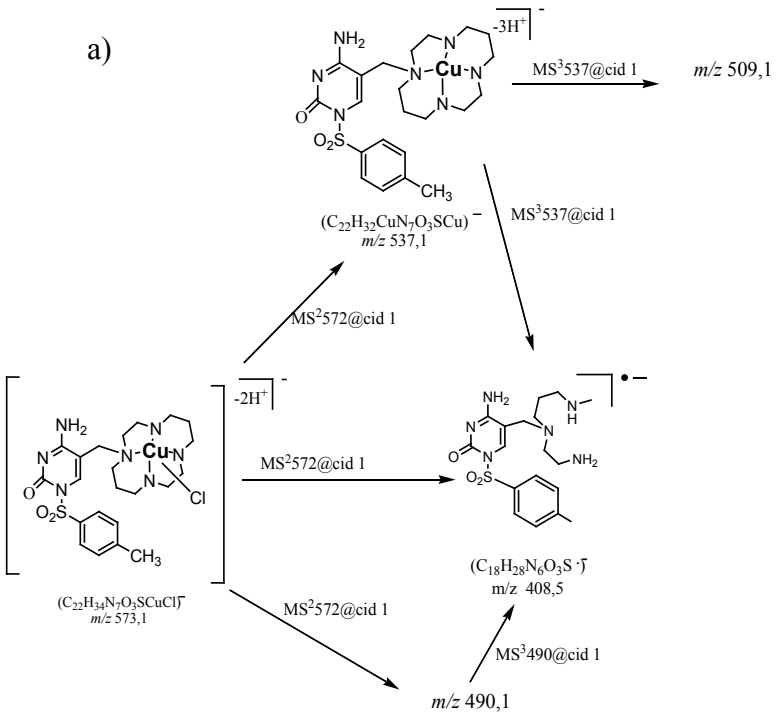
4.3.3.Interakcija konjugata **9** i **10** s Cu^{2+} i Zn^{2+}

4.3.3.1. Interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** s Cu^{2+} i Zn^{2+}
4.3.3.2. Interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** s Cu^{2+}

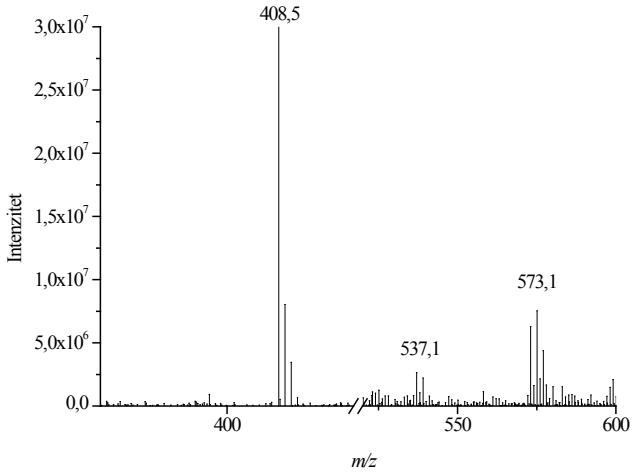
Uočeno je ranije (poglavlje 4.2.5.) da je u pozitivnom načinu rada dolazi do cijepanja konjugata, pa je analiza rađena u negativnom načinu rada.

Pri analizi cjelovitog spektara ESI-MS^n konjugata Ciklam-TsC **9** s $CuCl_2$ snimljenog u negativnom načinu rada uočena su tri signala (*Slika 66b*). Kompleks konjugata Ciklam-TsC **9** s $CuCl_2$ je opažen kao glavni signal na *m/z* 573,1 koji je asignirn kao **[**(Ciklam-TsC **9**)(-$H)_2$CuCl)**]**$^-$. Uočen je isto tako i kompleksni ion bez klorida kao signal na *m/z* 537,1 (*Slika 66b*). Treći i četvrti od važnijih signala su oni koji odgovaraju kompleksnim ionima nastalim kao posljedica cijepanja već formiranih bakrenih kompleksa ciklamskog derivata na izvoru ili od prethodnog pocijepanog ciklamskog derivata koji kompleksira naknadno s $CuCl_2$ čiji su signali na *m/z* 466,2 i 504,2. Signal na *m/z* 466,2 asigniran je kao monometalni kompleks fragmenta opaženog ranije (*vidi sliku 43*) kao signal *m/z* 408,5 i Cu^{2+}, **[**$C_{18}H_{28}N_6O_3S$(-$H^+)_3$Cu**]**$^-$. Nastao je i kompleks tog istog fragmnta (signal na *m/z* 408,5) koji uključuje i kloridni ion kao signal na *m/z* 504,2 asigniran kao **[**$C_{18}H_{28}N_6$O3S(-$H)_2$CuCl**]**$^-$. Kompleksiranjem s $CuCl_2$ nastaju kovalentni kompleksi, jer je protuion Cl^-. Analizom spektara ESI-MS uočeno je da dolazi do cijepanja konjugata i dominantni fragment *m/z* 408,5 stvara dimer s Na^+ (vidi odjeljak 4.2.5. *Slika 42b*).

a)



b)



Slika 66:, a) Shematski prikaz fragmentacijskog puta signala na *m/z* 573,1 za uzorak Ciklam-TsC **9** s $[CuCl]^+$ snimanog u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}) i @cid 1, b) Prikaz razvučenog cjelovitog spektra Ciklam-TsC **9** s $[CuCl]^+$ snimanog u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3}. (Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 573,1 nalaze se u dodatku B-12).

Fragmentacija signala na *m/z* 573,1 koji je asigniran kao kompleks konjugata Ciklam-TsC **9** s CuCl ide u tri fragmentacijska kanala. U prvom nastaje fragment *m/z* 537,1, koji je asigniran kao kompleks konjugata Ciklam-TsC **9** s Cu^{2+}, uz gubitak klorida i tri vodikova iona. Taj se signal dalje fragmentira na *m/z* 509,1 i poznati signal *m/z* 408,5.

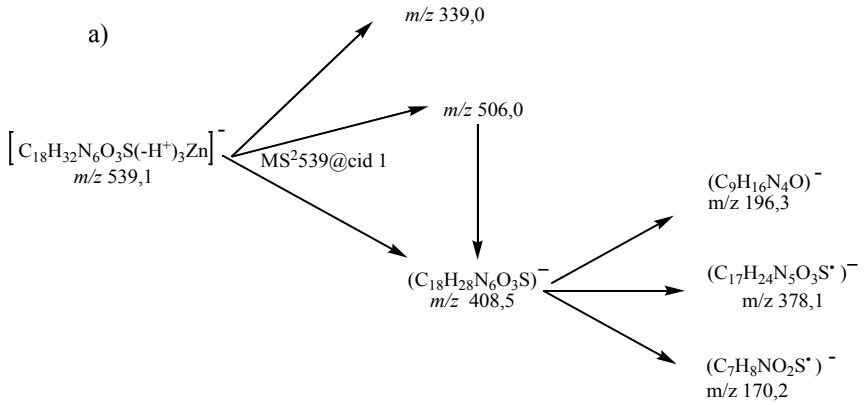
U drugom slučaju nastaje signal *m/z* 408,5, a u trećem nastaje *m/z* 490,1 koji daljnjom fragmentacijom isto daje signal *m/z* 408,5. Fragmentacije slijede analogiju cijepanja samog konjugata Ciklam-TsC **9** (*Slika 66b*).

4.3.3.3. Interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** s Zn^{2+}

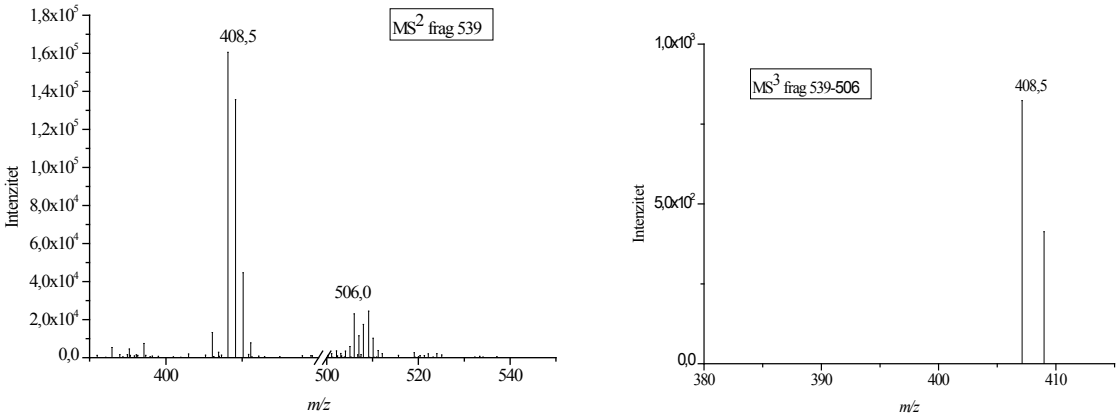
Pri analizi spektara konjugata Ciklam-TsC **9** s $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ snimljenih u negativnom načinu rada uočene su specije koje su uglavnom dvostruko nabijene i formiraju ionske komplekse jer su protuioni SO_4^{2-} koji ne sudjeluju u kompleksaciji.
Analizom cjelovitog ES^+ spektra uočen je između ostalog signal na *m/z* 539,1 koji je asigniran kao kompleks konjugata Ciklam-TsC **9** i Zn^{2+}. Prisutni su osim toga još i signali koji odgovaraju fragmentima kompleksnog iona konjugata **9** s Zn^{2+}, npr. *m/z* 237,1 koji je asigniran kao dvotruko nabijeni ion nastao vezanjem *m/z* na 408,5 i Zn^{2+} te *m/z* 441,0 koji je asigniran kao dvotruko nabijeni ion nastao vezanjem Zn^{2+} na dimer na *m/z* 408.

Da bi se odredila struktura opaženog signala na *m/z* 539,1 provedena je inducirana kolizijska fragmentacija koja se odvija kroz tri fragmentacijska kanala. U prvom nastaje signal *m/z* 506,0 koji daljnjom fragmentacijom daje signal *m/z* 408,5. Drugi fragmentacijski kanal daje signal *m/z* 408,5 koji daljnjom fragmentacijom daje već poznate fragmente, odnosno cijepanje je analogno cijepanju fragmenta *m/z* 408,5 kod karakterizacije konjugata Ciklam-TsC **9**. Trećim fragmentacijskim kanalom nastaje signal na *m/z* 339,0 (*Slika 67 a i b*).

a)



b)



Slika 67:, a) Shematski prikaz fragmentacijskih kanala signala *m/z* 539,1 b) spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 539,1 snimljenih u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a mase su izolirane u rasponu od ±2 amu (Da).

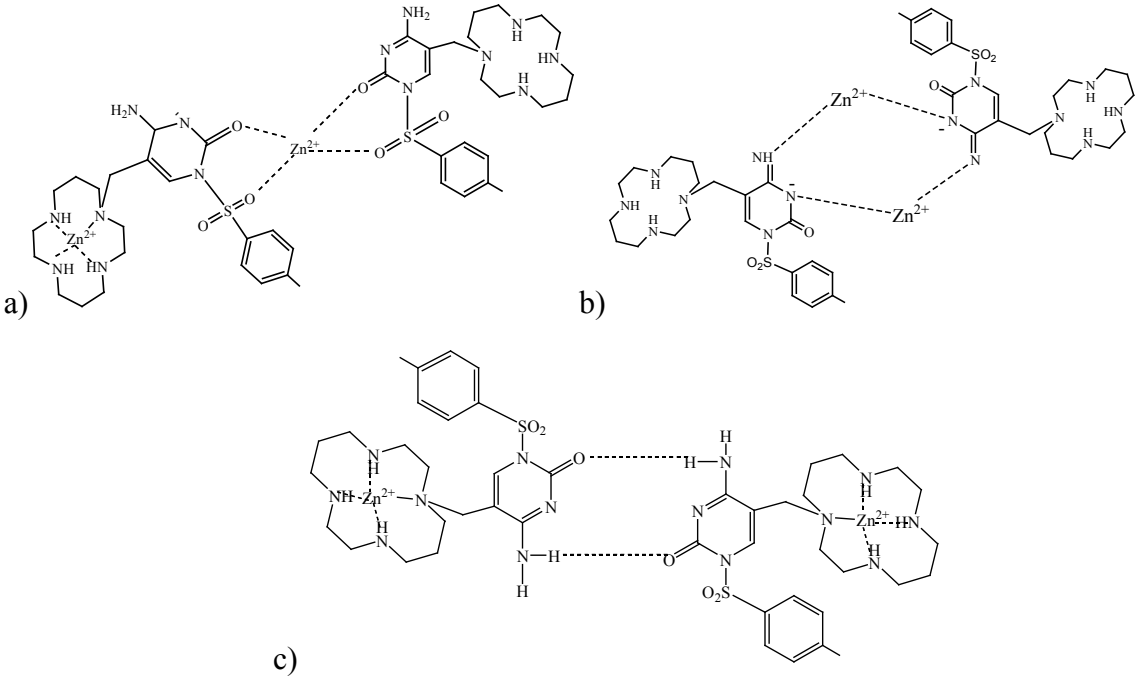
Na osnovu dobivene izotopne raspodjele za signal *m/z* 539,1 zaključili smo da se radi o speciji koja ima dva iona cinka. Pretpostavili smo tri moguća načina vezanja cinka s konjugtom (*Shema 16*). Prva ideja je bila da se cink veže preko citozinskih dijelova dvaju konjugata analogno našim opažanjima već opisanim u interakciji TsC liganda **2** i Zn[2,18,19] (*Shema 16a*). Drugi način je opažen za ureine derivate koji imaju isti motiv kao naš konjugat pa otuda isto onda takva mogućnost interakcije[229] (*Shema 16b*). No međutim treći način (*Shema 16c*) po nama je ipak najvjerojatniji iz nekoliko razloga:

Prvi - cijepanjem signala na *m/z* 539,1 nastaju tri signala na *m/z* 506,0, *m/z* 408,5 i na *m/z* 339,0. Signali na *m/z* 506,0 i na *m/z* 339,0 sadrže ione cinka i dvostruko su nabijeni te njihova izotopna raspodjela odgovara za *m/z* 339,0 **[**(Ciklam-TsC **9**)$(Zn^{2+})_2(H_2O)_4(-H)_6]^{2-}$, te za *m/z* 506,0 **[**(Ciklam-TsC 9)$(Zn^{2+})(-H)_4]^{2-}$.

Drugi - studij interakcije konjugata s ionima bakra preferira ciklamski prsten a tek u suvišku bakra je opaženo vezanje i na citozinski dio konjugata (odjeljak 4.3.2.1., *Slika 64 i 65*).

Treći - stvaranje dimera u plinskoj fazi derivata citozina je vrlo često i mi smo ga opazila za naše slobodne ligande. I konačno ispitali smo vezanje Zn^{2+}na sami ciklam i vidjeli da se veže i da se to dobro može detektirati u našim uvjetima snimanja (odjeljk 4.3.1.4 na *slici 62 i 63*).

Valja napomenuti da nastajanje kompleksnog iona s vodom opaženog na *m/z* 339,0 nije iznenađenje jer su opaženi i signali na *m/z* 547,1 tj. s jednom vodom ali i dvije, no obirom da se radi o dvostruko nabijenim ionima intezitet im je nizak.



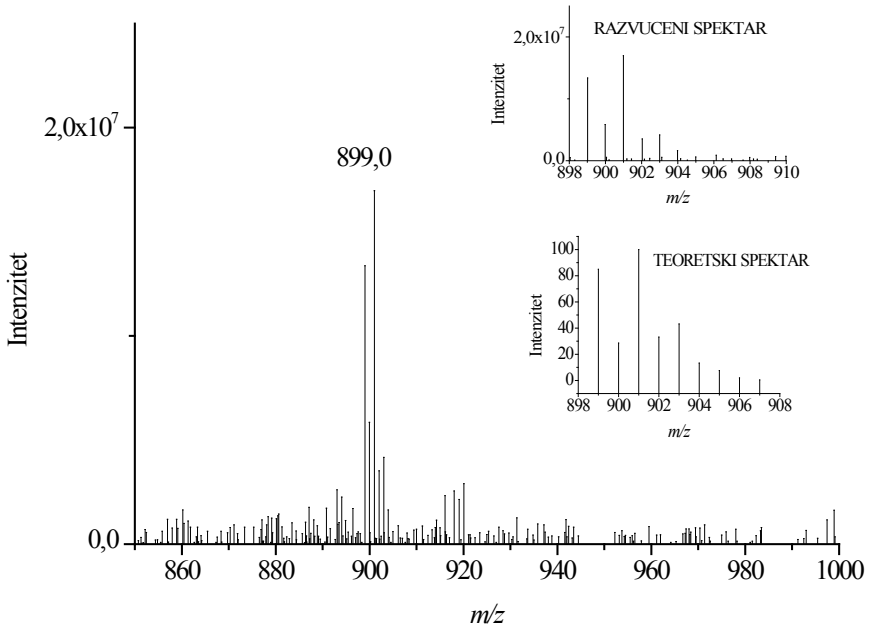
Shema 16: a) interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** i dva iona Zn^{2+} po modelu tienilsulfonil uree[222], b) interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** i dva iona Zn^{2+} po modelu premošćenja[19], c), interakcija konjugata Ciklam-TsC **9** i dva iona Zn^{2+} pri čemu je cink smješten u šupljinu ciklamskog prstena.

4.3.3.4. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsC **10** s Cu^{2+} i Zn^{2+}

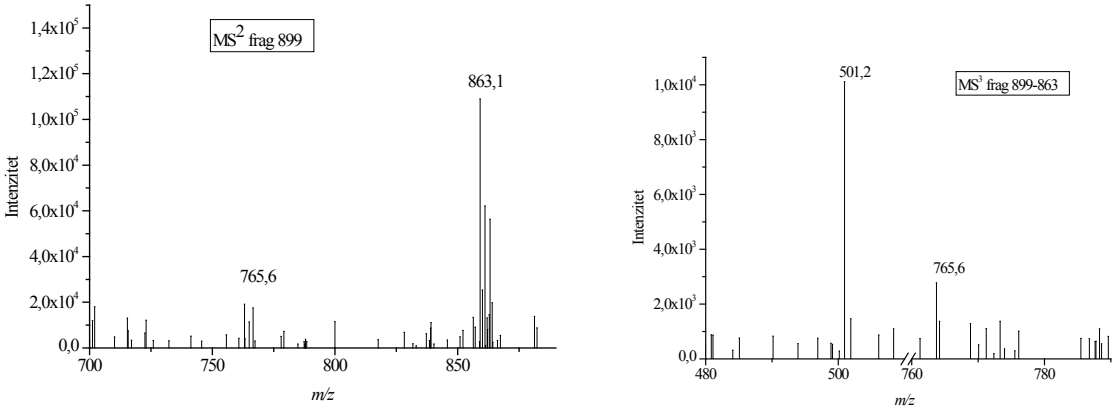
4.3.3.5. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsC **10** s Cu^{2+}

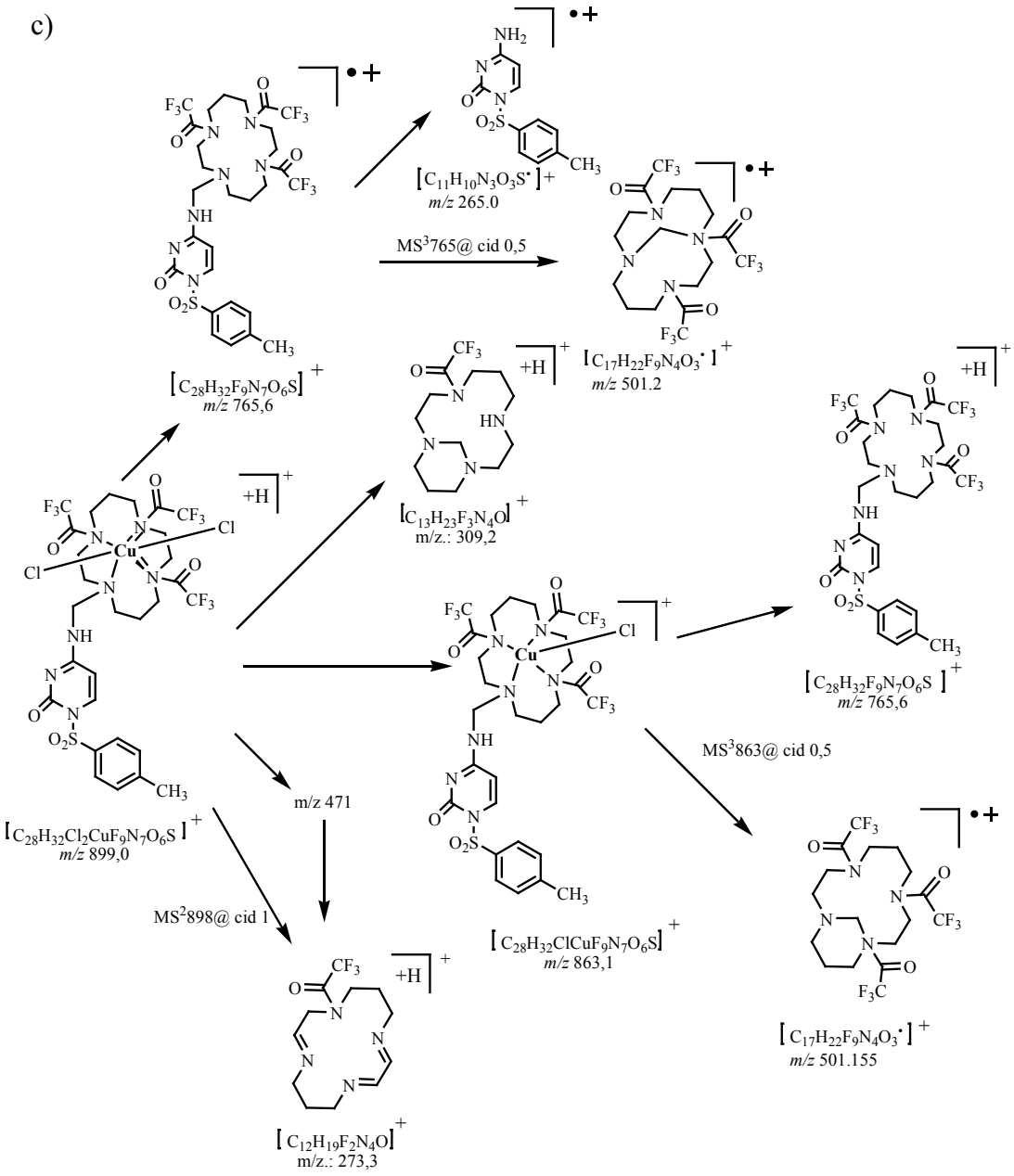
Pri analizi spektara konjugata tTFA-ciklam-TsC **10** s $CuCl_2$ snimljenih u pozitivnom načinu rada uočena su dva signala, *m/z* 898,0 asigniran kao monometalni kompleks konjugata (tTFA-ciklama-TsC **10**) s $CuCl_2$ (*Slika 65a,b,c*) te signal *m/z* 488,9 koji je asigniran kao adukt zaštićenog ciklama s Na^+ a koji se cijepao na identičan način kao kod određivanja fragmentacijskih putova za signal *m/z* 488,9 za TFA-ciklam **9**. Provedena je fragmentacija iona opaženog kod signala *m/z* 898,0 i određeni su fragmentacijski putovi. (*Slika 68*). Uočeno je da signal *m/z* 898,0 asigniran kao monometalni kompleks konjugata (tTFA-ciklama-TsC **10**) s $CuCl_2$ u usporedbi s nekompleksiranim konjugatom tTFA-ciklam-TsC **10,** ima različiti fragmentacijski put. Fragmentacija nekompleksiranog konjugata **10** ide kroz tri fragmentacijska kanala, pri čemu u jednom slučaju dolazi do gubitka zaštitne skupine i pregradnje unutar ciklamskog prstena, u drugom slučaju dolazi do cijepanja ciklamskog prstena, a u trećem slučaju dolazi do cijepanja veze između tTFA-ciklama i TsC liganda, pa daljnja fragmentacija slijedi analogiju kako je prikazano za tTFA-ciklam u 4.2.4. Fragmentacija kompleksiranog konjugata (tTFA-ciklama-TsC **10**) s $CuCl_2$ ide kroz pet fragmentacijskih kanala. U glavna tri fragmentacijska kanala dolazi do gubitka Cl^- iona ili do gubitka $CuCl_2$, tako u prvom slučaju uslijed gubitka jednog Cl^- iona nastaje signal na *m/z* 863,1, u drugom slučaju uslijed gubitka dva Cl^- iona nastaje signal na *m/z* 828,2, a u trećem slučaju uslijed gubitka $CuCl_2$ nastaje signal na *m/z* 765,6. Dakle, prvo dolazi do gubitka iona Cl^- i izlaska iona Cu^{2+} iz prstena ciklama, a tek potom dolazi do fragmentacija koje su uočavane kod nekompleksiranog konjugata **10**, odnosno do gubitka zaštitnih skupina i cijepanja ciklamskog prstena.

a)


2,0x10^7
899,0
Intenzitet
0,0
860
880
900
920
940
960
980
1000
m/z
RAZVUCENI SPEKTAR
2,0x10^7
Intenzitet
0,0
898 900 902 904 906 908 910
m/z
TEORETSKI SPEKTAR
100
80
60
40
20
0
Intenzitet
898 900 902 904 906 908
m/z

b)


MS2 frag 899
1,4x10^5
1,2x10^5
1,0x10^5
8,0x10^4
6,0x10^4
4,0x10^4
2,0x10^4
0,0
Intenzitet
863,1
765,6
700
750
800
850
m/z
MS3 frag 899-863
1,0x10^4
8,0x10^3
6,0x10^3
4,0x10^3
2,0x10^3
0,0
Intenzitet
501,2
765,6
480
500
760
780
m/z



Slika 68: a) Razvučeni spektar signala na *m/z* 899,0 snimljen u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon, u spektar su umetnuti razvučeni spektar signala na *m/z* 899,0 i teoretski spektar izotopne raspodjele signala *m/z* 899,0[214,] b) spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 899,0 snimljenih u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon, izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da), c) Shematski prikaz fragmentacijskih putova signala na *m/z* 899,0.

4.3.3.6. Interakcija konjugata tTFA-ciklam-TsCs **10** s Zn^{2+}

Pri analizi spektara konjugata tTFA-ciklam-TsCs **10** s $ZnSO_4$ x $7H_2O$ snimljenih u pozitivnom načinu rada uočene su specije koje su dvostruko nabijene ali su bile premalog intenziteta i nije ih bilo moguće detaljno fragmentirati.

Uočen je signal na *m/z* 831 koji je asigniran kao kompleks konjugata tTFA-ciklam-TsCs **10** i Zn^{2+}. Njegovom fragmentacijom nastaje signal *m/z* 565,3 koji je asigniran kao kompleks fragmenta na *m/z* 501,1 i $Zn^{2+.}$ Tu se uočava analogija u kompleksiranju kod konjugata **9** i **10**. Kod oba konjugta, cijepanjem ciklamskog prstena na istom mjestu nastaju signali *m/z* 408,5 i *m/z* 501,1. To su stabilni fragmenti koji kompleksiraju s ionima Zn^{2+} i daju metalne komplekse, koji se fragmentacijom vraćaju u ionske oblike *m/z* 408,5 i *m/z* 501.

§ 5. ZAKLJUČAK

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije sintetizirani su Cu(II) molekulski kompleksi [Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**5**) i [Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$] (**6**), biološki aktivnih *N*-sulfonilcitozinskih liganada TsC **2** i MsC **3** te novi poliaza makrociklički konjugati **9** i **10** *N*-sulfonilcitozinskog liganada **2** da bi se provjerilo njihovo antitumorsko djelovanje.

I. Supstitucijom liganda TsC **2** s ciklamom (**7**) i tTFA ciklamom (**8**) uvedena je u strukturu jedinica sposobna za kompleksiranje različitih metalnih kationa. Sinteza je provedena prema Mannichovoj reakciji uz dobivanje dva produkta:

- reakcijom TsC **2**, formaldehida i ciklama **7** nastaje produkt *C*-aminometiliranja ciklam-TsC konjugat **9**,
- reakcijom TsC **2**, formaldehida i zaštićenog tTFA-ciklama **8** dolazi do *N*-aminometiliranja egzocikličke amino-skupine i nastaje tTFA-ciklam-TsC konjugat **10.**

II. U drugom dijelu istraživanja variranjem radnih uvjeta instrumentalne analize razvijena je ESI-MS osjetljiva i pouzdana metoda za određivanje naših spojeva i praćenje njihove interakcije s ionima metala.

III. Promatranjem topljivosti i stabilnosti u otopini za ligande **2** i **3** i njihove Cu(II) komplekse **5** i **6** ovisno o vrsti otapala, kao i vremena, uočeno je:

- ligandi su dobro topljivi u sustavu otapala DMSO/MeOH (1/100), stabilni su u otopini kroz duže vrijeme i odabrani sustav otapala nema značajan utjecaj na njihovu stabilnost,
- kompleksi **5** i **6** su slabo topljivi u otapalima kao što su MeOH, ACN ili H_2O, pa dodatkom DMSO ili DMF u navedena otapala, u omjeru npr. DMSO/MeOH 1:100 povećava se topljivost kompleksa. Istovremeno dodatkom DMSO i DMF-a potiče se i proces izmjene ligand-otapalo, stoga je stabilnost kompleksa **5** i **6** smanjena upravo zbog izmjena ligand-otapalo, pri čemu se uočava čitav niz miješanih kompleksa s otapalom, primjerice s DMSO-om.

IV. Tehnikom spektrometrije masa uz ionizaciju elektroraspršenjem provedena su detaljnija ispitivanja stabilnosti sintetiziranih spojeva u otopinama i u prisustvu metalnih iona (Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}) u ovisnosti o vremenu i odnosu koncentracija liganda i soli. Određene su strukture kompleksa, stabilnost, te glavni putovi nastajanja pojedinih specija. Studijom interakcije naših spojeva i iona metala uočeno je slijedeće:

- pronađeno je da Na^+, K^+, Ca^{2+} i Zn^{2+} ioni nemaju značajan utjecaj na stabilnost *N*-sulfonilcitozinskih liganada TsC **2** i MsC **3** i njihovih Cu(II) kompleksa Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$ (**5**) i Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$ (**6**) do 72 sata.
- kroz duže vrijeme i uz veće koncentracije soli alkalijskih metala (Na^+ i K^+) uslijed elektrostatskih interakcija stvaraju klastere, a zemnoalkalijski metali (Ca^{2+}, Mg^{2+}) daju bis i tris te miješane komplekse.
- Mg^{2+} ioni ovisno o koncentraciji u kratkom vremenu uzrokuju velike promjene i dolazi do nastanka novih specija. Uočeno je da je stabilnost (Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$) (**6**) znatno manja od stabilnosti (Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$) (**5**) u prisutnosti Mg^{2+} iona. Cu(II) kompleks **6** nestaje kroz nekoliko sati, dok Cu(II) kompleks **5** postoji i nekoliko dana.
- interakcija Zn^{2+} s ligandima **2** i **3** te Cu(II) kompleksima **5** i **6** rezultira nastankom mononometalnih kompleksa i dimetalnih miješanih kompleksa koji u strukturu uključuju molekule vode.
- novi poliaza makrociklički konjugati **9** i **10** u interakciji s Cu^{2+} daju monometalne molekulske komplekse u kojima je $CuCl_2$ u ciklamskom prstenu, a u interakciji s $ZnSO_4$ nastaju ionski kompleksi u kojima je Zn^{2+}smješten u ciklamskom prstenu, te se uočavaju dvostruko nabijene specije.
- u interakciji novog poliaza makrocikličkog konjugata **9** s $ZnSO_4$ nastaju specije koje imaju dva iona cinka, a za koje su pretpostavljena tri moguća načina vezanja cinka s konjugtom, te su predložene strukture.
- miješanjem otopina ciklama : $CuCl_2$: TsC **2** u omjerima 1:1:1 i 1:2:1, uočeno je da se kod omjera 1:1:1 bakar veže samo u ciklamski prsten, dok kod omjera reaktanata 1:2:1 dolazi i do vezanja na citozinsku jezgru.

§ 6. LITERATURNI IZVORI

[1] B. Kašnar, I. Krizmanić i M. Žinić, *Nucleoides Nucleotides* **16** (1997) 1067.

[2] B. Žinić, I. Krizmanić, D. Vikić-Topić i M. Žinić, *Croat. Chem. Acta* **72** (1999) 957.

[3] B. Žinić, I. Krizmanić, D. Vikić-Topić, D. Srzić i M. Žinić, *Croat. Chem. Acta* **74** (2001) 399.

[4] I. Krizmanić, A. Višnjevac, M. Luić, Lj. Glavaš-Obrovac, M. Žinić i B. Žinić; *Tetrahedron* **59** (2003) 4047.

[5] B. Žinić, I. Krizmanić, Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner i M. Žinić, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **22** (2003) 1623.

[6] Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, M. Pavlak, M. Radačić, J. Kašnar-Šamprec i B. Žinić, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acid* **24** (2005) 557.

[7] S. Kraljević Pavelić, S. Bratulić, K. Hock, D. Jurišić, M. Hranjec, G. Karminski-Zamola, B. Žinić, M. Bujak i K. Pavelić, *Biomed. Pharmacother.* **63** (2009) 577.

[8] D. Saftić, R. Vianello i B. Žinić, *Eur. J. Org. Chem.* (2015) 7695.

[9] Lj. Glavaš-Obrovac, I. Karner, B. Žinić i K. Pavelić, *Anticancer Res.* **21** (2001) 1979.

[10] B. Žinić, M. Žinić i I. Krizmanić, (2003) Synthesis of the Sulfonylpyrimidine Derivatives with Anticancer Activity. EP 0 877 022 B1 (Bulletin 1003/16).

[11] M. Pavlak, R. Stojković, M. Radačić-Aumiler, J. Kašnar-Šamprec, J. Jerčić, K. Vlahović, B. Žinić i M. Radačić, *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* **131** (2005) 829.

[12] J. Kašnar-Šamprec, Lj. Glavaš-Obrovac, M. Pavlak, N. Štambuk, P. Konjevoda i B. Žinić, *Croat. Chem. Acta* **78** (2005) 261.

[13] F. Supek, M. Kralj, M. Marjanović, L. Šuman, T. Šmuc, I. Krizmanić i B. Žinić, *Invest. New Drugs* **26** (2008) 97.

[14] M. Pavlak, M. Radačić, R. Stojković i B. Žinić, *Veterinarski arhiv* **80** (2010) 311.

[15] J. Kašnar-Šamprec, I. Ratkaj, K. Mišković, M. Pavlak, M. Baus-Lončar, S. Kraljević Pavelić, Lj. Glavaš-Obrovac i B. Žinić, *Invest. New Drugs* **30** (2012) 981.

[16] L. G. Marzilli, *Adv. Inorg. Biochem*. **3** (1981) 47.

[17] A.Višnjevac, N. Biliškov i B. Žinić, *Polyhedron*, **28** (2009) 3101.

[18] A. Višnjevac, M. Luić, R. Kobetić, D. Gembarovski i B. Žinić, *Polyhedron* **28** (2009) 1057.

[19] R. Kobetić, D. Gembarovski, A. Višnjevac, B. Žinić i V. Gabelica-Marković, *J. Mass Spectrom.* **45** (2010**)** 51.

[20] B. Žinić, R. Kobetić, Lj. Glavaš-Obrovac, D. Saftić, V. Ključarić: Metal Ion Interferences with *N*-1-Sulfonylcytosine Cu(II) Complex and Antiproliferative Activities *in vitro,* neobjavljeni rad.

[21] M. MacCoss i M. J. Robins u: *Chemistry of Antitumor Agents*, D. E. V. Wilman (ed) Blackie and Son, Glasgow, Scotland, 1990, str. 261.

[22] R. K. Robins i G. D. Kirin u: *Chemistry of antitumor agents*, D. E. V. Wilman (ed) Blackie and Son, Glasgow, Scotland, 1990, str. 299.

[23] R. K. Robins i G. R. Revankar u: *Antiviral drug development*, E. De Clercq i R. T. Walker (eds) Plenum, New York, 1988, str. 11.

[24] E. de Clercq, *Design of Anti-AIDS Drugs*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1990, str. 1.

[25] B. Lippert, *Coordin. Chem. Rev.* **200-202** (2000) 487.

[26] S. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* 7**4** (1952) 2238.

[27] U. Weser, *Struct. Bonding* **5** (1968) 41.

[28] R. B. Simpson, *J. Am. Chem. Soc*. **86** (1964) 2059.

[29] G. L. Eichhorn, *Nature* **194** (1962) 474.

[30] J. J. Butzow i G.L. Eichhorn*, Biopolymers* **3** (1965) 97.

[31] G. L. Eichhorn i Y.A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **90** (1968) 7323.

[32] (a) J. P. Charland, M. T. P. Viet, M. St-Jacques i A. L. Beauchamp, *J. Am. Chem. Soc*. **107** (1985) 8202; (b) J. P. Charland, M. Simard i A .L. Beauchamp, *Inorg. Chem. Acta* **80** (1983) L 57.

[33] S. Mansy, T. E. Wood, J. C. Sprowles i R. S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc*. **96** (1974) 1762.

[34] R. M. K. Dale, D. C. Livingston i D. C. Ward, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70** (1973) 2238.

[35] B. Lippert, *Prog*. *Inorg. Chem.* **37** (1989) 1.

[36] (a) E. F. Day, C. A. Crawford, K. Folting, K. R. Dunbar i G. Christou, *J. Am. Chem. Soc*. **116** (1994) 9339; (b) K. V. Catalan, D. J. Mindiola, D. L. Ward i K. R. Dunbar, *Inorg. Chem*. **36** (1997) 2458.

[37] C. A. Crawford, E. F. Day, V. P. Saharan, K. Folting, J. C. Huffman, K. R. Dunbar i G. Christou, *Chem. Commun.* (1996) 1113.

[38] E. C. Fusch i B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc*. **116** (1994) 7204.

[39] K. V. Catalan, D. J. Mindiola, D. L. Ward i K. R. Dunbar, *Inorg. Chem.* **36** (1997) 245.

[40] (a) K. Aoki, *Met. Ions. Biol. Syst*. **32** (1996) 91; (b) K. Aoki i J. M. Lehn (Ed.) *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, **5** (1995) 249.

[41] T. J. Kistenmacher, C. C. Chiang, P. ChalilpoyiI i L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **10** (1979) 1143.

[42] (a) Y.Y. H. Chao i D. R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc*. **99** (1977) 6425; (b) J. Galy, A. Mosset, I. Grenthe, I. Puigdomenech, B. Sjoberg i F. Hulten, *J. Am. Chem. Soc.* **109** (1987) 380.

[43] A. Jancso, L. Nagy, E. Moldrheim i E. Sletten, *J. Chem. Soc. Dalton. Trans* (1999) 1587.

[44] J. F. Conn, J. J. Kim, F. L. Suddath, P. Blattmann i A. Rich, *J. Am. Chem. Soc*. **96** (1974) 7152.

[45] B. Lippert, u: J. R. Lusty (Ed.), Handbook of Nucleobase Complexes, CRC Press, Boca Raton, **1**, (1990) 9.

[46] (a) D. Tran Qui i E. Palacios, *Acta Crystallogr*. C**46** (1990) 1220; (b) D. Tran Qui i M. Bagieu, *Acta Crystallogr*. **C46** (1990) 1645; (c) G. Trovo, G. Valle i B. Longato, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1993) 669.

[47] G. Cervantes, J. J. Fiol, A. Terron, V. Moreno, J. R. Alabart, M. Aguilo , M. Gomez, i X. Solans, *Inorg. Chem*. **29** (1990) 5168.

[48] M. A. Young, B. Jayaram, i D. L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc*. **119** (1997) 59.

[49] B. Lippert, H. Schollhorn i U. Thewalt, *J. Am. Chem. Soc*. **108** (1986) 6616.

[50] J. Muller, E. Zangrando, N. Pahlke, E. Freisinger, L. Randaccio i B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **4** (1998) 397.

[51] (a) R. Beyerle-Pfnur, H. Schollhorn, U. Thewalt i B. Lippert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. (1985) 1510; (b) H. Schollhorn, R. Beyerle-Pfnur, U. Thewalt i B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 3680.

[52] B. J. Graves i D. J. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc*. **101** (1979) 5608.

[53] (a) F. Pichierri, D. Holthenrich, E. Zangrando, B. Lippert i L. Randaccio, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1** (1996) 439; (b) L. Randaccio, E. Zangrando, A. Cesa´ro, D. Holthenrich i B. Lippert, *J. Mol. Struct.* **440** (1998) 221.

[54] S. Zhang, L. A. Holl i R. E. Shepherd, *Inorg. Chem.* **29** (1990) 1012.

[55] (a) M. Authier-Martin i A. L. Beauchamp, *Can. J. Chem*. **55** (1977) 1231; (b) C. Gagnon, A. L. Beauchamp i D. Tranqui, *Can. J. Chem*. **57** (1979) 1372; (c) O. Renn, H. Preut i B. Lippert, *Inorg. Che. Acta* **188** (1991) 133.

[56] (a) T. .J. Kistenmacher, M. Rossi i L. G. Marzilli, *Inorg. Chem*. **18** (1979) 240.

(b) H. Schollhorn, U. Thewalt i B. Lippert, *Inorg. Chem. Acta* **135** (1987) 155.

(c) B. Lippert, U. Thewalt, H. Schollhorn, D. M. L. Goodgame i R. W. Rollins, *Inorg. Chem*. **23** (1984) 2807.

[57] (a) R. Beyerle-Pfnur, H. Schollhorn, U. Thewalt, B. Lippert, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1985) 1510; (b) H. Schollhorn, R. Beyerle-Pfnur, U. Thewalt, B. Lippert*, J. Am. Chem. Soc*. **108** (1986) 3680.

[58] L.Y. Kuo, M. G. Kanatzidis, M. Sabat, A. L. Tipton i T. J. Marks, *J. Am. Chem. Soc*. **113** (1991) 9027.

[59] L. Prizant, R. Rivest i A. L. Beauchamp, *Can. J. Chem.* **59** (1981) 2290.

[60] a) G. Trovo, G. Bandoli, U. Casellato, B. Corain, M. Nicolini i B. Longato, *Inorg. Chem*. **29**(1990) 4616; (b) L. Schenefti, G. Bandoli, A. Dolmella, G. Trovo i B. Longato, *Inorg. Chem.* **33** (1994) 3169.

[61] R. Faggiani, B. Lippert, C. J. L. Lock i R. A. Speranzini, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 1111.

[62] M. Krumm, I. Mutikainen i B. Lippert, *Inorg. Chem*. **30** (1991) 884.

[63] T. Wienkotter, M. Sabat, G. Fusch i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **34** (1995) 1022.

[64] S. Cosar, M. B. L. Janik, M. Flock, E. Reisinger, E. Farkas i B. Lippert, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1999) 2329.

[65] (a) M. Krumm, B. Lippert, L. Randaccio i E. Zangrando, *J. Am. Chem. Soc*. **113** (1991) 5129; (b) M. Krumm, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **32** (1993) 700.

[66] C. Mealli, F. Pichierri, L. Randaccio, E. Zangrando, M. Krumm, D. Holthenrich i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **34** (1995) 3418

[67] F. Pichierri, E. Chiarparin, E. Zangrando, L. Randaccio, D. Holthenrich i B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta* **264** (1997) 109.

[68] J. Muller, E. Zangrando, N. Pahlke, E. Freisinger, L. Randaccio i B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **4** (1998) 397.

[69] M. Krumm, E. Zangrando, L. Randaccio, S. Menzer, A. Danzmann, D. Holtenrich i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **32** (1993) 2183.

[70] R. Faggiani, B. Lippert, C.J.L. Lock i R.A. Speranzini, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 1111.

[71] M. Krumm, I. Mutikainen i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **30** (1991) 884.

[72] T. Wienkotter, M. Sabat, G. Fusch i B. Lippert, *Inorg. Chem.* **34** (1995) 1022.

[73] D. Holthenrich, M. Krumm, E. Zangrando, F. Pichierri, L. Randaccio i B. Lippert, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1995) 3275.

[74] D. Holthenrich, E. Zangrando, E. Chiarparin, B. Lippert i L. Randaccio, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1997) 4407.

[75] A. Hegmans, E. Zangrando, E. Freisinger, F. Pichierri, L. Randaccio, C. Mealli, M. Gerdan, A. X. Trautwein i B. Lippert, *Chem. Eur. J.* **5** (1999) 3010.

[76] J. P. Charland, M. Simard i A. L. Beauchamp, *Inorg. Chem. Acta* **80** (1983) L 57.

[77] H. Rauter, I. Mutikainen, M. Blomberg, C. J. L. Lock, P. Amo-Ochoa, E. Reisinger, L. Randaccio, E. Zangrando, E. Chiarparin i B. Lippert, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **36** (1997) 1296.

[78] a) H. J Warshakoon, M. R Burns i S. A. David, *Antimicrob. Agents Chemother*. **53 (**2009) 57; b) F Zani, M Incerti, R. Ferretti i P Vicini, *Eur. J. Med. Chem.* **44** (2009) 2741; c) G Patrick, An Introduction to Medicinal Chemistry 2nd ed. OUP: 2001; p 13.

[79] a) A. K. Tiwari, A. K Mishra, A. Bajpai, P. Mishra, R. K. Sharma, V. K. Pandey i V. K Singh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16** (2006) 4581; b) C. T Supuran, A. Innocenti, A Mastrolorenzo i A. Scozzafava, *Mini-Rev. Med. Chem.* **4 (2) (**2004**)** 189.

[80] a) D. A. Fidock, P. J. Rosenthal, S. L. Croft, R. Brun i S. Nwaka, *Nat. Rev. Drug Disc.* **3** (2004) 509; b) A. Yokoi, J. Kuromitsu, T. Kawai i T. Nagasu, *Molecular Cancer*

Therapeutics **1** (2002) 275; c) Z. Huanga, L. Zhaoliang i H. Junlian, *Eur. J. Med. Chem.* **36** (2001) 863.

[81] a) C. T. Supuran, A. Scozzafava, B. C. Jurca i M. A. Iiies, *Eur. J. Med. Chem.* **33** (1998) 83; b) G. Renzi, A. Scozzafava i C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10(7)** (2000) 673.

[82] a) A. S. Frame, R. H. Wightman i G. Mackenzie, *Tetrahedron* **52** (1996) 9219.; b) A. S. Frame, G. Mackenzie i R. H. Wightman, *Tetrahedron Lett.* **35** (1994) 7469; c) C. Wu, M. F. Chan, F. Stavros, B. Raju, I. Okun i R. S. Castillo, *J. Med. Chem.* **40** (1997) 1682.

[83] a) A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo i C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10** (2000) 1887; b) T. Owa, H. Yoshino, T. Okauchi, K. Yoshimatsu, Y. Ozawa, N. H. Sugi, T. Nagasu, N. Koyanagi i K. Kitoh, *J. Med. Chem.* **42** (1999) 3789; c) D. J. Brown, *Pyrimidines and their Benzo Derivatives*, Comprehensive Heterocyclic chemistry, **Vol**. **3**, A. R. Katritzky i C. W. Rees (Eds.), Pergamon Press, Oxford, (1984) str. 150-151.

[84] M. Jain i R.V Singh, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2006), 1.

[85] a) K. K. Chaturvedi, R. V. Singh i J. P. Tandon, *J. Pract. Chem.* **1** (1985) 327; b) K. Singh, *Indian J. Chem.* **30A** (1991) 283.

[86] Lj. Glavaš-Obrovac, I Karner, M. Štefanić, J Kašnar-Šamprec i B Žinić, *Il Farmaco* **60** (2005) 479.

[87] A. Višnjevac, M. Žinić, M. Luić, D. Žiher, T. Kajfež Novak i B. Žinić, *Tetrahedron* **63** (2007) 86.

[88] a) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc*. **89** (1967) 2595; b) C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc*. **89** (1967) 7017.

[89] a) J. J. Christensen, D. J. Eatough i R. M. Izatt, *Chem. Rev*. **74** (1974) 351; b) R. M. Izatt, J. S. Bradshaw, S. A. Nielsen, J. D. Lamb, J. J. Christensen i D. Sen, *Chem. Rev.* **85** (1985) 271; c) R. M. Izatt, K. Pawlak, J.S. Bradshaw i R. L. Bruening, *Chem. Rev.* **91** (1991) 1721; d) J. S. Bradshaw, K. E. Krakowiak, i R. M. Izatt, Aza-Crown Macrocycles, Joh Wiley & Sons, Inc., New York (1993), e) R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw i L. R. Bruening, *Chem. Rev*. **95** (1995) 2529.

[90] E. U. Askaya, M. E. Huston i A. W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 7054.

[91] C. Lodeiro, F. Pina, A. J. Parola, A. Bencini, A. Bianchi, C. Bazzicalupi, S. Ciattini, C. Giorgi, A. Masotti, B. Valtancoli i J. S. De Melo, *Inorg. Chem*. **40** (2001) 6813.

[92] F. Pina, M. Ciano, L. Moggi i V. Balzani, *Inorg. Chem*. **24** (1985) 844.

[93] A. Merbach, L. Helm i E. Toth, Eds., The Chemistry of Contrast Agents in Medicinal Magnetic Resonance Imaging, John Wiley&Sons, Chichester, UK (2013)

[94] G. P. Montgomery, B. S. Murray, E. J. New, R. Pal, D. Parker i D. Cell, *Acc. Chem. Res*. **42** (2009) 925.

[95] W. Krause, Contrast Agents III, Radiopharmaceuticals–From Diagnosticts to Therapeutics, Ed.; Springer: Heidelberg, Germany (2005).

[96] M. F. Tweedle, *Acc. Chem. Res*. **42** (2009) 958.

[97] L. Rossa, i F. Vogtle, *Top. Curr. Chem*. **1** (1983) 113

[98] D. A. Laidler i J. F. Stoddart, In the Chemistry of Functional Groups; S. Patai, Ed.; Wiley, New York (1980) Suppl. E. Part 1.

[99] T. J. Atkins, J. E. Richman i F. W. Oettle, *Org. Synth.* **58** (1978) 86.

[100] F. Chavez, i A. D. Sherry, *J. Org. Chem.* **54** (1989) 2990.

[101] B. K. Vriesema, J. Buter i M. R. Kellogg, *J .Org. Chem.***49** (1984) 110.

[102] H. Koyama i T. Yoshino, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **45** (1972) 481.

[103] B. Diertich, W. M. Hosseini, J. M. Lehn i B. R. Session, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 1282.

[104] W. M. Hosseini i J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1982) 3225.

[105] B. Diertich, W. M. Hosseini, J. M. Lehn i B. R. Session, *Helv. Chim. Acta* **66** (1983) 1262.

[106] D. P. Reed i G. R. Weisman, *Org. Synth.Coll.* **10** (2004) 667.

[107] Q.-X. Xiang, J. Zhang, P.-Y. Liu, C.-Q. Xia, Z.-Y. Zhou, R.-G. Xie i X.-Q. Yu, *J. Inorg. Biochem.* **99** (2005) 1661.

[108] W. Peng, P. Y Liu, N. Jiang, H. H. Lin, G.-L. Zhang, i X. Q. Yu, *Bioorg. Chem.* **33** (2005) 374.

[109] S.-Y. Chen, Y. Huang, G.-L. Zhang, H. Cheng, C.-Q. Xia, L.-J. Ma, H. Yu i X.-Q. Yu. *Synthesis* **6** (2005) 888.

[110] Q.-L. Li, J. Huang, Q. Wang, N. Jiang, C.-Q. Xia, H.-H. Lin, j. Wu i X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 4151.

[111] X.-Y Wang, J. Zhang, L. Kun, J. Ning, S.-Y. Chen, H.-H. Lin, Y. Huang, L.-J. Ma i X.-Q. Yu, *Bioorg. § Medicinal Chem.* **14** (2006) 6745.

[112] R. Delgado, V. Felix, P. M. L. Lima i W. D. Price, *Dalton Trans.* (2007) 2734.

[113] N. F. Curtis, A. McCleverty, A. Thomas, T. J. Eds. Elsevier, *Comprehensive Coord. Chem. II,* **1** (2004) 447.

[114] V. Alexander. *Chem. Rev.* **95** (1995) 273.

[115] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurray i R. B. Lauffer, *Chem. Rev.* ***99*** (1999) 2293.

[116] A.Bianchi, L. Calabi, F. Corana, S. Fontana, P. Losi, A. Maiocchi, L. Paleari i B. Valtancoli, *Coord. Chem. Rev***. 204** (2000) 309.

[117] S. Aoki, M. Shiro i E. Kimura, *Chem.Eur. J.* **8** (2002) 929

[118] S. Aoki, M. Zulkefeli, M. Shiro i E. Kimura, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (2002) 4894.

[119] S. Aoki, M. Shiro i E. Kimura, *Chem. Rev***. 104** (2000) 769.

[120] C.-Q. Xia, N. Jiang, J. Zhang, S.-Y. Chen, H.-H. Lin, X.-Y. Tan, Y. Yue i X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 5756.

[121] S. Watanabe, A. Komori, S. Masayuki i A. Uchida, *Tetrahedron* **66** (2010) 1196.

[122] H. Nagase i J.F. Woessner Jr., *J. Bio. Chem.* **274** (1999) 21491.

[123] C. M. Overall i O.Kleifeld, *Nat. Rev. Cancer* **6** (2006) 227; b) L. M. Coussens, B. Fingleton i L. M. Matrisian, *Sciense* **295** (2002) 2387.

[124] T. Itoh, H. Matsuda, M. Tanioka, K. Kuwabara, S. Itohara i R. Suzuki, *J. Immunol.* **169** (2002) 2643.

[125] J. Hu, P. E. Van den Steen, Q. X. A. Sang i G. Opdenakker, *Nat. Rev. Drug. Discovery* **6** (2007) 480.

[126] a) J. A. Jacobsen, J. L. Major Jourden, M. T. Miller i S. M. Cohen, *BBA-Mol. Cell. Res.* **2803** (2010) 72; b) E. Nuti, T. Tuccinardi i A. Rossello, *Curr. Pharm. Des.* **13** (2007) 2087; c) B. G. Rao, *Curr. Pharm. Des.* **11** (2005) 295.

[127] M. Whittaker, C. D. Floyd, P. Brown i A. J. H. Gearing, *Chem. Rev*. **99** (1999) 2735.

[128] J. A. Jacobsen, J. L. Major Jourden, M. T. Miller i S. M. Cohen, *BBA-Mol. Cell. Res.* **2803** (2010) 72.

[129] F. E. Jacobsen, J. A. Lewis i S. M. Cohen, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 3156.

[130] X. Liang i P. J. Sadler, *Chem. Soc. Re.* **33** (2004) 246.

[131] K. P.Wainwright, *Coord. Chem. Rev.* **166** (1997) 35.

[132] D. K. Cabbiness i D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.* **91** (1969) 6540.

[133] E. Kimura, *Tetrahedron* **48** (1992) 6175.

[134] E. Kimura, M. Sasada, M. Shionoya, T. Koike, H. Kurosaki i M. Shiro, *J. Bioinorg. Chem.* **2** (1997) 74.

[135] A. Genz, S.Ceccarelli i C. Bolm, *Chem. Commun.* (2001) 1726.

[136] W.B. Tolman, *Acc. Res. Chem.* **30** (1997) 277.

[137] C. Sissi, P. Rossi, F. Felluga, F. Formaggio, M. Palumbo, P. Tecilla, C. Toniolo i P. Scrimin, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 3169.

[138] M. J. Young, J. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **117** (1995) 10577.

[139] G. J. Bridger, R. T. Skerlj, D. Thornton, S. Padmanabhan, S. A. Martellucci, G. W. Henson, M. J. Abrams, N. Yamamoto, K. De Vreese, R. Pauwels i E. De Clercq., *J. Med. Chem.* **38** (1995) 366.

[140] J. A. Este, *Acta. Biomed. Lovaniesia.* **190** (1999) 1.

[141] D. Schols, J. A. Este, G. Hensson i E. De Clercq., *Antiviral Res*. **35** (1997) 147.

[142] B. Labrosse, A. Brelot, N. Heveker, N. Sol, D. Schols, E. De Clercq i M. Alizon, *J. Virol* **72** 1998) 6381.

[143] E. de Hoffmann i V. Stroobant, Mass Spectrometry - Principles and Applications, John Wiley & sons, Ltd., Chichester, (2007).

[144] D. T Rossy i M. W. Sinz, Mass Spectrometry in Drug Discovery, Marcel Dekker Inc, New York, USA, (2002).

[145] F. W. McLafferty i F. Tureček, Interpretation of Mass Spectra, 4th Ed., University Science Books, CA, USA, (1993).

[146] .D. T Rossy i M. W. Sinz, Mass Spectrometry in Drug Discovery, Marcel Dekker Inc, New York,USA, (2002).

[147] M. Yamashita i J. B. Fenn, *J. Phys. Chem*. **88** (1984) 4451.

[148] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong i C. M. Whitehouse, *Science* **246** (1989) 64.

[149] N. Galić, *Kem. Ind*. **53** (2004) 117.

[150] W. F. Smyth, *Anal. Chim. Acta* **492** (2003) 1.

[151] a) M. Yamashita i J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 4451; b) P. Kebarle i L. Tang, *Anal. Chem.* **65** (1993) 972 A.

[152] a) R. Colton, A. D Agnostino i J.C. Traeger, *Mass Spectrom Rev* **14** (1995) 79; b) C. L. Gatlin i F. Turesek, *Electorspray Ion Mass Spectrom* (1997) 527; c) W. Handerson, B. K. Nicholson i L. J. McCaffrey, *Polyhedron* **17** (1998) 4291.

[153] http://www.chem.briac.uk/ms/theory

[154] V. B. Di Marco i G. G. Bombi, *Mass Spectrom. Rev.* **25** (2006) 347.

[155] I. Spasojevic, H. Boukhalfa, R. D. Stevens i A. L. Crumbliss, *Inorg. Chem.* **40** (2001) 49.

[156] G. R. Agnes, I. I. Stewart i G. Holrick, *Appl. Spectrosc* **48** (1994) 1347.

[157] H. J. Wang i G. R.Agnes, *Anal. Chem.* **71** (2007) 3785.

[158] G.D. Wang i R.B. Cole, *Org. Mass Spectrom.* **29** (1994) 419.

[159] R.Kostiainen i A.P. Bruins, *Rapid. Commun. Mass Spectrom*. **10** (1996) 1393.

[160] S. R. Needham, P. R. Brown, K. Duff i D. Bell, *J. Chromatogr. A* **869** (2000) 159.

[161] a) F. Dallavalle i M. Tegoni, *Polyhedron* **20** (2001) 2697; b) M Careri, F. Dellavalle, M. Tegoni i I. Zagoni, *J. Inorg. Biochem.* **93** (2003) 174.

[162] P. Pan, H. P. Gunawardena, Y. Xia i S. A. McLuckey, *Anal. Chem* **76** (2004) 1165.

[163] C. E. Easterly, D. M. Hercules i M. Houalla, *Appl. Spectrosc*. **55** (2001) 1671.

[164] R. Pankiewicz, G. Schroeder, B. Brzezinski i F. Bartl, *J. Mol. Struct* **699** (2004) 53.

[165] P. Przybylski, G. Schroeder i B. Brzezinski, *J. Phys. Org. Chem.* **16** (2004) 289.

[166] V Gabelica, N. Galic, F. Rosu, C. Houssier i E. De Pauw, *J. Mass Spectrom* **38** (2003) 491.

[167] R. D. Smith, J. H. Wahl, D. R. Goodlett i S. A. Hofstadler, *Anal. Chem*. **65** (1993) 574A.

[168] S. R. Needham, P. R. Brown, K. Duff i D. Bell, *J. Chromatogr. A*, **869** (2000) 159.

[169] a) B. Ganem, Y.Tsyr Li i J. D. Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **113 (16)** (1991) 6294.

b) B. Ganem, Y. Tsyr Li i J. D. Henion *J. Am. Chem. Soc.* **113 (20)** (1991) 7818.

[170] a) J. A. Loo, *Mass Spectrom.Rev.* **16** (1997) 1; b) J. L. Beck , M. L. Colgrave , S. F. Ralph i M. M. Sheil, *Mass Spectrom.Rev.* **20 (**2001) 61.

[171] M. Wigger, J. R Eyler, S. A Benner, W. Li, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **13 (**2002) 1162.

[172] A. C. Gavin et all*, Nature*. **415 (**2002) 141.

[173] E. T. van den Bremer , W. Jiskoot , R. James , G. R. Moore , C. Kleanthous , A. J. Heck i C. S. Maier , *Protein. Sci.* **11** (2002) 1738

[174] S. Zhang, C. K. van Pelt i D. B. Wilson, *Anal. Chem.* **75 (**2003) 3010.

[175] K. M. Keller, i J. S. Brodbelt, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **16 (**2005) 28.

[176] Aggerholm, S. C. Nanita, K.J. Koch i R.G. Cooks., *J. Mass Spectrom*. **38** (2003) 87.

[177] a) K. Fukushima i H. Iwahashi. *Chem. Commun.* **11 (**2000) 895; b) I. Manet, L. Francini, S. Masiero, S. Pieraccini, G. P. Spada i G. Gottarelli, *Helv. Chim. Acta* **84 (**2001) 2096; c) M. Cai, X. Shi, V. Sidorov, D. Fabris, Y. Lam i J.T. Davis. *Tetrahedron*; **58 (**2002) 661.

[178] M. Yamashita i J. B. Fenn, *J. Phys. Chem.***88** (1984) 4451.

[179] C. M. Whitehouse, R. N.Dreyer, M. Yamashita i J. B. Fenn, *Anal. Chem.* **57** (1985) 675.

[180] S. F. Wong, C. K. Menz i B. J. Fenn, *J. Phys. Chem.***92** (1988) 54.

[181] B. Genem i Y.T. Li, J.D.Henion, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991) 6294.

[182] D. L. Smith i Z. Zhang, *Mass Spectrom* **13** (1994) 411.

[183] A. T. Blades, P. Jayaweera, M. G. Ikonomou i P. Kebarle, *J, Chem. Phys.* **92** (1990) 5900.

[184] A. T. Blades, P. Jayaweera, M. G. Ikonomou i P. Kebarle, *Int. J. Mass. Pectrom. Ion. Processes.* **102** (1990) 251.

[185] V. Katta, S. K. Chowdhury i B. T. Chait*, J. Am. Chem. Soc*. **112** (1990) 5348.

186 V. B. Di Marco i G. G. Bombi, *Mass Spectrom. Rev.* **25** (2006) 347.

187 S. M. Williams, J. S. Brodbelt i R. A. Bartsch, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **14** (2003) 1215.

[188] E. C. Kempen i J. S. Brodbelt, *Anal. Chem*. **72** (2000) 5411.

[189] E. Leize, A. Jaffrezic i A. VanDorsselaer, *J. Mass Spectrom.* **31** (1996) 537.

[190] S. M. Williams, J. S. Brodbelt i R. A. Bartsch, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **14** (2003) 1215.

[191] T. D. Burns, T. G. Spence, M. A. Mooney i L. A. Posey, *Chem. Phys. Lett*. **258** (1996) 669.

[192] M ShaHgholi, J. H. Callahan, B. J. Rappoli i D. A. Rowley, *J. Mass Spectrom*. **32** (1997) 1080.

[193] Mj. J. Deery, T. Ernandez, O. W. Howarth i K. R. Jennings, *J. Chem. Soc. Dalton Trans* (1998) 2177.

[194] A. R. S. Ross, M. G. Ikonomou i K. J. Orians, *J. Mass Spectrom.* **35** (2000) 981.

[195] W. Yang, C. M. Giandomenico, M. Sartori i D. A. Moore, *Tetrahedron Lett.* **44** (2003) 2481.

[196] www.alchemistmatt.com/mwthelp/isotopicdistribution.htm (06.10.2014.)

[197] Lj.Glavaš-Obrovac, M. Jukić, K. Mišković, D. Saftić, Ž. Ban, J. Matić i B. Žinić, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,* (2016) -predan, pod revizijom.

[198] D. Prukała*; Tetrahedron Lett.* **47** (2006) 9045.

[199] K. B. Sloan i K. G. Siver, *Tetrahedron* **40** (1984) 3997.

[200] K. Bienmann i J.A. McClosky, *J. Am. Chem. Soc.* **84 (**1962) 2005; Bienmann K. *Mass spectrometry: Organic chemical applications.* McGraw-Hill, New York, (1962), p.351-354.

[201] Z. Wang, C. E. C. A. Hope, M. S Kim, S. E. W. Huskey, T. A. Baillie i Z. Guan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 81.

[202] J. A van Rhijin, J. J. P. Lasaroms, B. J. A. Berendsen i U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* , **960** (2002) 121.

[203] R. W. Binkley, T. W. Flechtner, M. J. S. Tevesz, W. Winnik i B. Zhong, *Org. Mass Spectrom.* **28** (1993) 769.

[204] P. N. Reddy, R. Srikanth, N. Venkateswarlu, Rna Rao i R. Srinivas, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **19** (2005) 72.

[205] D. Srzić, M. Rožman, I. Krizmanić, B. Žinić, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17** (2003) 377.

[206] M. Sun, D. Wenning i D. Liu, *J. Mass Spectrom.* **43** (2008) 383.

[207] G. Wang i R. B. Cole, *Anal. Chem*. 70 (1998) 873.

[208] S. Mollah, A. D. Priss, S. K. Johnson, A. B. Gwizdala i R. S. Houk, *Anal. Chem*. **72** (2000) 985.

[209] S. K. Kim, W. Lee i D. R. Herschbach, *J. Phys. Chem,* **100** (1996) 7933..

[210] program za obradu podataka: Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, SAD)

[211] R. D. Smith, J. E. Bruce, Q. Wu i Q. Lei, *Chem. Soc. Rev.* **26** (1997) 191.

[212] I. K. Chu, T. C. Lau i K. W. M. Siu, *J. Mass Spectrom.* **33** (1998) 811.

[213] D. Schroder, H. Schwarz, N. Aliaga-Alcalde i F. Neese, *Eur. J. Inorg. Chem.* **6** (2007) 816.

[214] http://www.sisweb.com/mstools/isotope.htm (10.10.2014.)

[215] T. Felder, A. Rohrich, H. Stephan i C. A. Schalley, *J. Mass Spectrom.* **43** (2008) 651.

[216] S. Banerjee, H. Prakash i S. Mazumdar, *J. Am. Soc. Mass Sprctrom.* **22** (2011) 1707.

[217] F. Tureček, *J. Jap Soc. Mass. Spectrom.* **2**, (2013) 1-7.

[218] S. Mochizuki i A. Wakisaka, *J. Phys. Chem. B* **107,** (2003) 5612.

[219] T. Fujii, *Mass. Spectrom. Rev*. **19** (2000) 111-138.

[220] N. Russo, M. Toscano i A. Grand, *J. Phys. Chem. A* **107** (2003) 11533.

[221] T. Dudev i C.L. Principles, *Chem. Rev.* **103** (2003) 773.

[222] M. A. Geday, M. Medaglia, J. Anastassoupoulou i T. Theophanides, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.,* **36** (1997) 511.

[223] I. V. Rostov i R. Kobayashi, *Phys. Chem. Chem. Phys*. **15** (2013) 12930.

[224] T. Dudev, C. Lim, *Chem. Rev.* **103** (2003) 773.

[225] N. Marino, D. Armentano, C. Zanchini i G. De Munno, *Cryst. Eng. Comm.* **16** (2014) 8286.

[226] B. Lippert, *Coord. Chem. Rev*. **200-202**, (2000) 487.

[227] J. Anastassopoulou, *J. Mol. Struct.* **19** (2003).**651**

[228] M. A. S. Prado, E. Garcia, J. B i .L. Martins, *Chem. Phys. Lett*. **418** (2006) 264.

[229] G. Orosz, I. Laszlo, E. Dudar, G. Kocsis, J. Szo, I. Kovacs i I. Bodnar, **HU Pat.** 68473A2920330

[230] A. Bencini, *Inorg. Chim. Acta* **317**, (2001) 259.

§ 7. DODATAK

DODATAK A

A-1 Popis kemikalija

U ovom istraživanju korištene su slijedeće kemikalije:

1-metansulfonilcitozin, $C_5H_7N_3O_3S$, IRB, Zavod za organsku kemiju i biokemiju (ZOKB)

1-(*p*-toluensulfonil)citozin, $C_{11}H_{11}N_3O_3S$, IRB, (ZOKB)

Diklorobis(1-metansulfonilcitozin)bakar(II), $(C_5H_7N_3O_3S)_2CuCl_2$, IRB, (ZOKB)

Diklorobis[1-(*p*-toluensulfonil)citozin]bakar(II) $(C_{11}H_{11}N_3O_3S)_2CuCl_2$, IRB, (ZOKB)

Željezov(II) sulfat heptahidrat, $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$, Kemika; p.a. (>99,0 %)

Cinkov klorid, $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$, Kemika; p.a. (> 99,5 %)

Natrijev klorid, NaCl, Kemika; p.a. (> 99,0 %)

Kalijev klorid, KCl, Kemika; p.a. (>99,5 %)

Kalcijev klorid, $CaCl_2$, Kemika; p.a. (>99,0 %)

Magnezijev klorid heksahidrat, $MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$, Sigma–Aldrich; p. a. (98,0-99,9 %)

Bakrov(II) klorid dihidrat, $CuCl_2 \times 2H_2O$, Sigma–Aldrich; p. a. (99,9 %)

Dimetil-sulfoksid, $(CH_3)_2SO$, Sigma–Aldrich, GC (99,5 %)

Metanol, CH_3OH, Sigma–Aldrich; HPLC (> 99,9 %)

Acetonitril, CH_3CN, Sigma–Aldrich; HPLC (> 99,9 %)

Etanol, $CH_3\ CH_2OH$, Sigma–Aldrich; HPLC (> 99,8 %)

Etil-acetat, Sigma–Aldrich; (99,8 %)

N,*N* –dimetilmetanamid, Fischer Chemical; r. g. (> 98,0 %)

MiliQ H_2O, IRB

1,4,8,11–tetraazaciklotetradekan (Ciklam), Sigma–Aldrich; GC (98 %)

4-amino-1-H-pirimidin-2-on (Citozin), Sigma–Aldrich, r. g.(99)

N,O-bis[(trimetilsilil)-acetamid] (BSA), Sigma–Aldrich; synthesis grade (> 95 %)

p-toluensulfonil klorid, Alfa Aesar; r. g. (> 99,0 %)

p-metansulfonil klorid, Alfa Aesar; r. g. (> 99,0 %)

Paraformaldehid, Sigma–Aldrich; prah (95,0 %)

Trietilamin, Sigma–Aldrich; r. g. (>99,5 %)

Etil-trifloroacetat, Sigma–Aldrich; r. g. (99,9 %)

konc. octena kiselina, Sigma–Aldrich; r. g. (99,0 %)

DODATAK B
ESI-MS SPEKTRI

Slike:

Slika B-1: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 531,0 u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} te @cid 0,4 i @cid 0,5 snimljeni na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u pozitivnom načinu rada, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-2: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 379,0 u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} te @cid 0,4 i @cid 0,5 snimljeni na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u pozitivnom načinu rada, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-3: Cjeloviti spektar ESI-MS kompleksa **[**$Cu(1\text{-}TsC\text{-}N3)_2Cl_2$**]** (**5**) u DMSO/MeOH (1:100) i teoretski spektar predložene strukture $[(1\text{-}TsC)_2CuCl]^+$. Teoretski izračun (gornji) i eksperimentalni (donji) primjer signala asigniranog kao $(C_{22}H_{22}N_6O_6S_2CuCl)^+$ izmjereno je 627.9995; izračunato 628.0027, odstupanje je -5.1 ppm. Korišten je program za obradu podataka: Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, SAD).

Slika B-4 Cjeloviti spektar ESI-MS kompleksa **[**$Cu(1\text{-}MsC\text{-}N3)_2Cl_2$**]** (**6**) u DMSO/MeOH (1:100) i teoretski spektar predložene strukture $[(1\text{-}MsC)_2CuCl]^+$. Teoretski izračun (gornji) i eksperimentalni (donji) primjer signala asigniranog kao $(C_{10}H_{14}N_6O_6S_2CuCl)^+$ izmjereno je 475.9388; izračunato 475.9401; odstupanje je -2,7 ppm. Korišten je program za obradu podataka: Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, SAD).

Slika B-5: Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 201 snimljen u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-6: Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 437,2 snimljen u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-7 : Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 459 snimljen u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-8: Spektri ESI-MS^2 i ESI-MS^3 signala na *m/z* 481 snimljeni u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

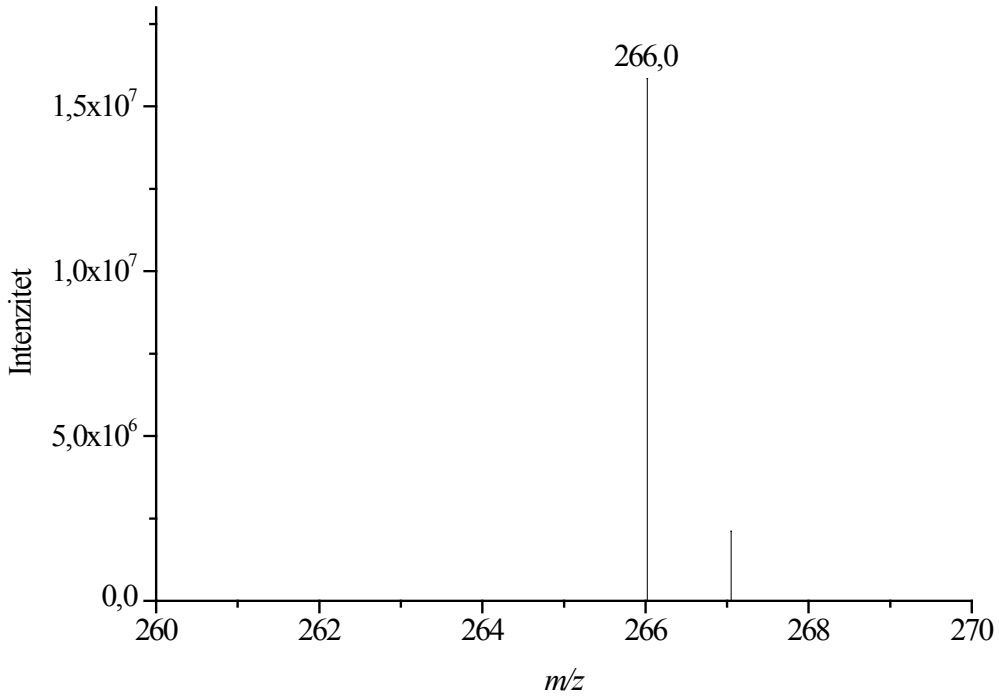
Slika B-9: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 488,9 snimljeni u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-10: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 510,3 snimljeni u MeOH, c=$5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

Slika B-11: Prikaz spektara ESI-MS^n signala na *m/z* 839,0 snimljenih u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

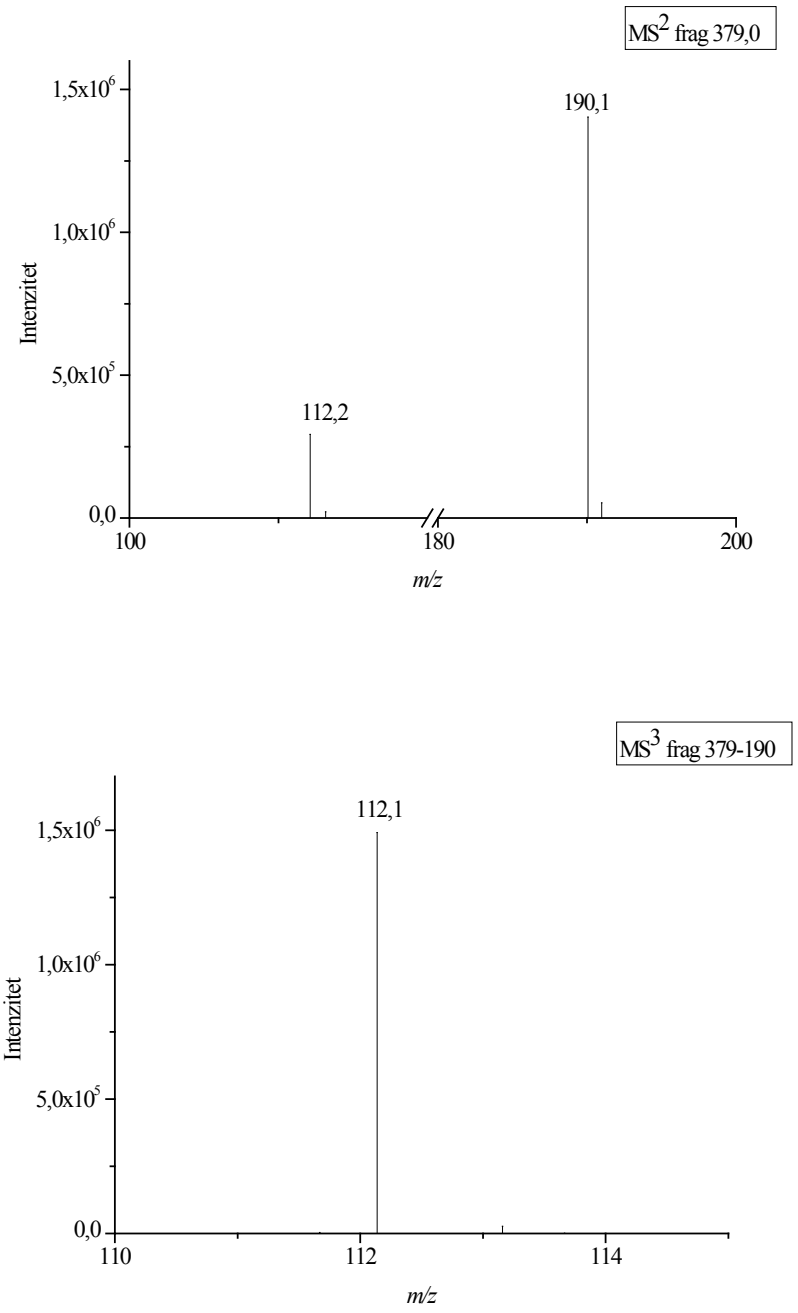
Slika B-12: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 573,1 za uzorak konjugata Ciklam-TsC **9** s $[CuCl]^+$ snimljeni u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da

DODATAK B-1



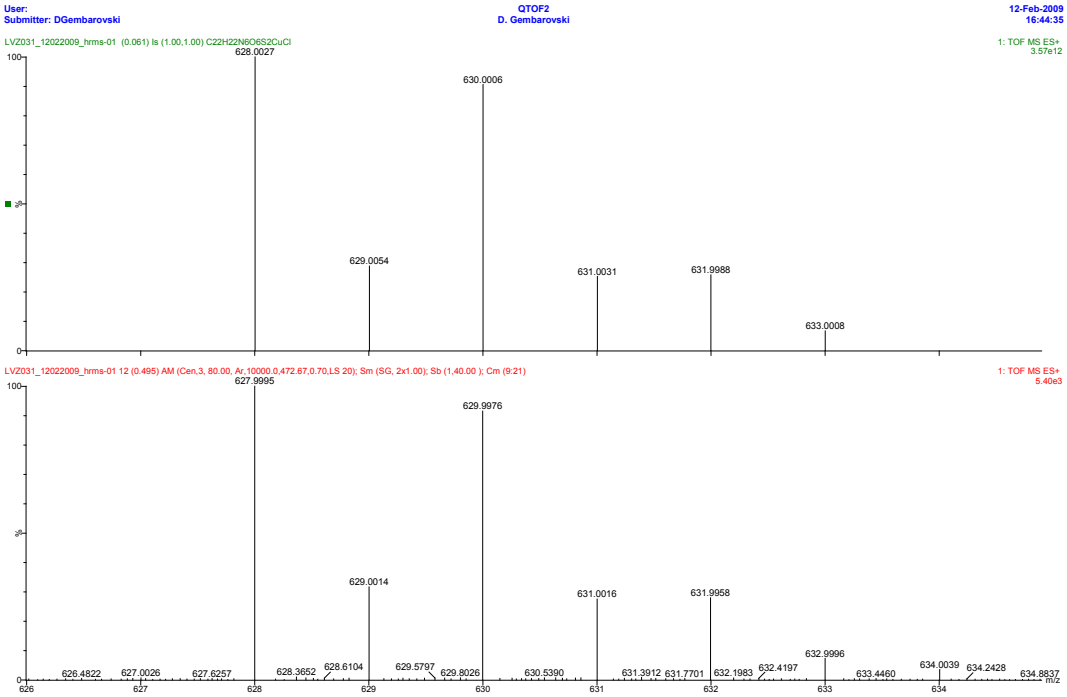
Slika B-1: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 531,0 u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=5·10^{-7} mol dm^{-3} te @cid 0,4 i @cid 0,5 snimljeni na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u pozitivnom načinu rada, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da)..

DODATAK B-2



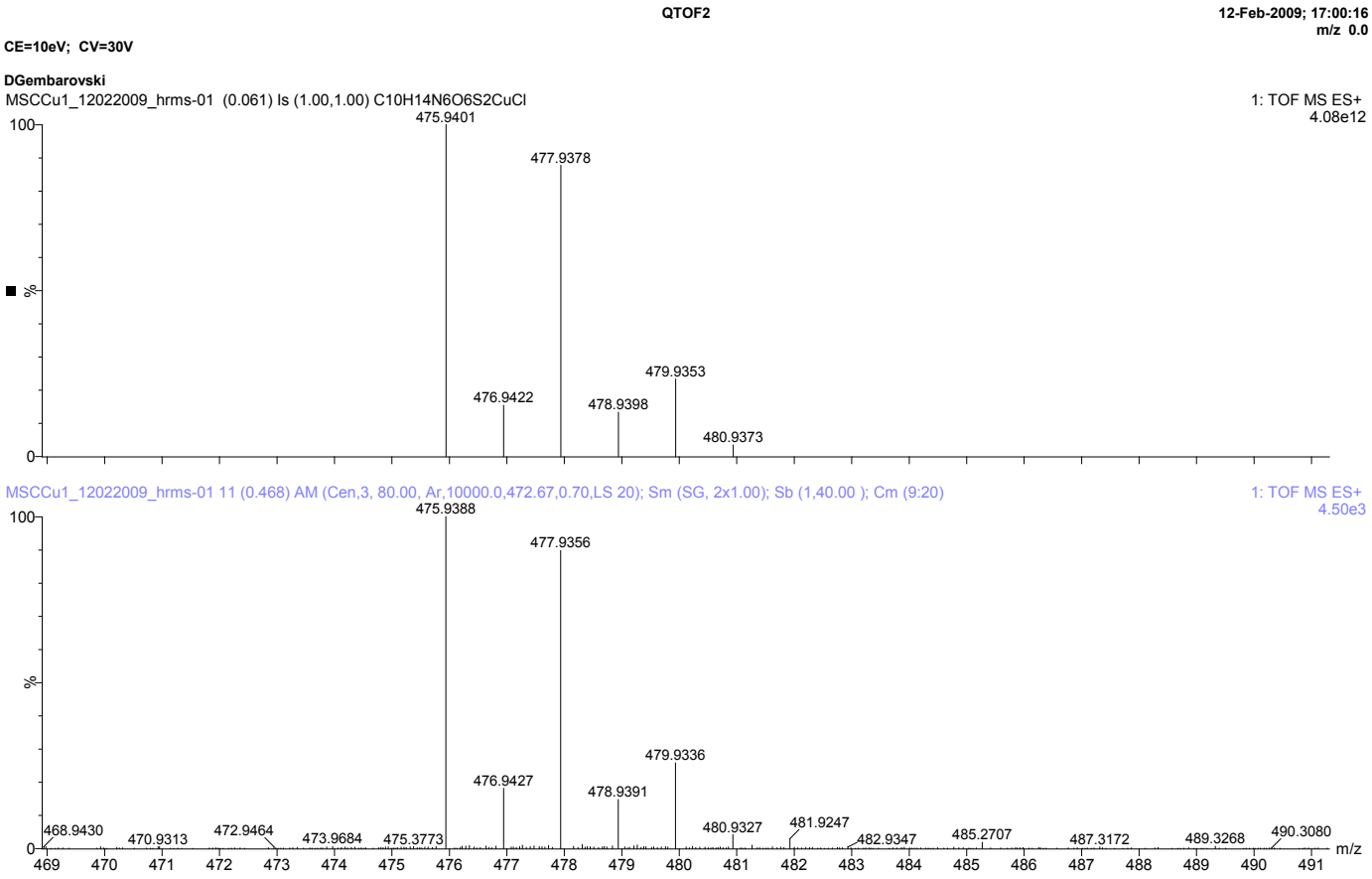
Slika B-2: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 379,0 u otapalu DMSO/MeOH (1:100), c=5·10^{-7} mol dm^{-3} te @cid 0,4 i @cid 0,5 snimljeni na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD u pozitivnom načinu rada, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-3



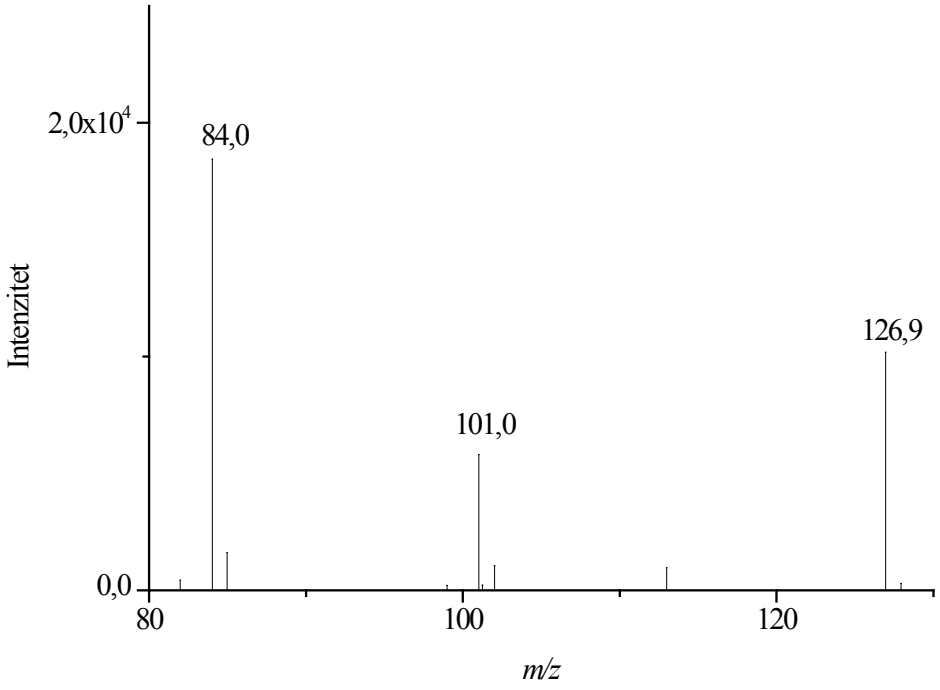
Slika B-3: Cjeloviti spektar ESI-MS kompleksa **[**Cu(1-TsC-*N*3)$_2$Cl$_2$**]** (**5**) u DMSO/MeOH (1:100) i teoretski spektar predložene strukture [(1-TsC)$_2$CuCl]$^+$. Teoretski izračun (gornji) i eksperimentalni (donji) primjer signala asigniranog kao $(C_{22}H_{22}N_6O_6S_2CuCl)^+$ izmjereno je 627.9995; izračunato 628.0027, odstupanje je -5.1 ppm. Korišten je program za obradu podataka: Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, SAD).

DODATAK B-4



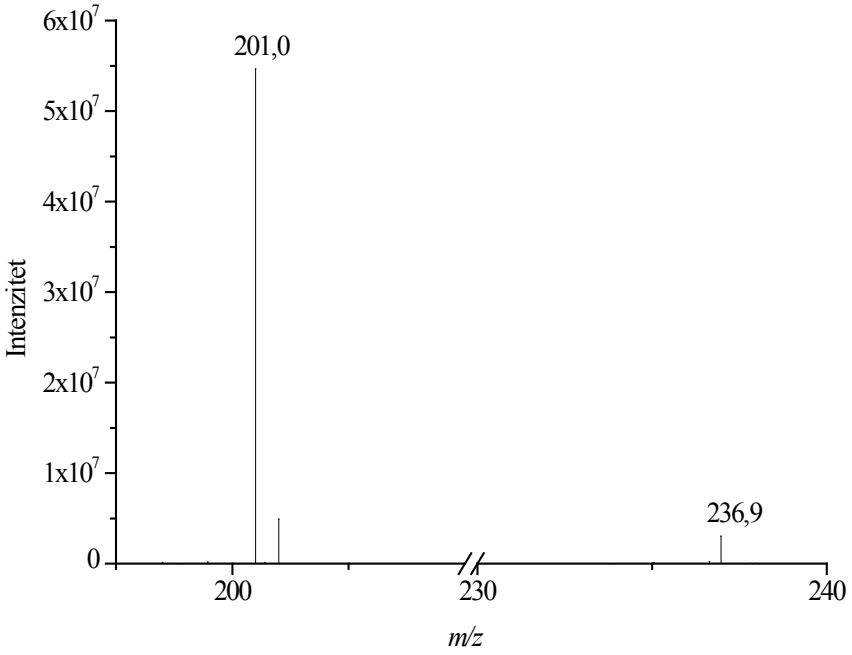
Slika B-4: Cjeloviti spektar ESI-MS kompleksa **[**Cu(1-MsC-*N*3)$_2$Cl$_2$**]** (**6**) u DMSO/MeOH (1:100) i teoretski spektar predložene strukture [(1-MsC)$_2$CuCl]$^+$. Teoretski izračun (gornji) i eksperimentalni (donji) primjer signala asigniranog kao (C$_{10}$H$_{14}$N$_6$O$_6$S$_2$CuCl)$^+$ izmjereno je 475.9388; izračunato 475.9401; odstupanje je -2,7 ppm. Korišten je program za obradu podataka: Xcalibur 2.0 SR2 (Thermo Finnigan, San Jose, CA, SAD).

DODATAK B-5



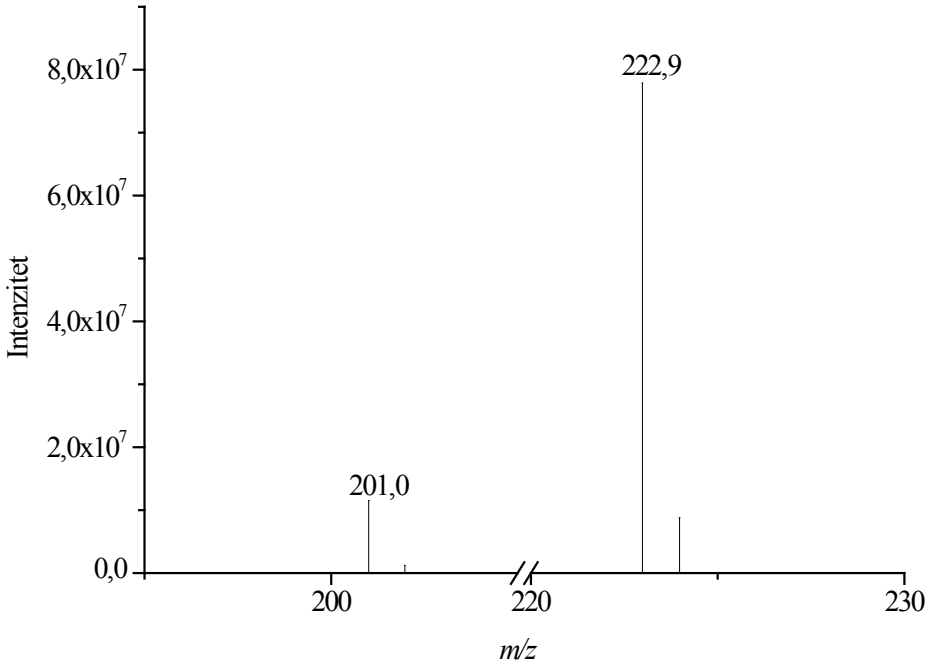
Slika B-5: Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 201 snimljen u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-6



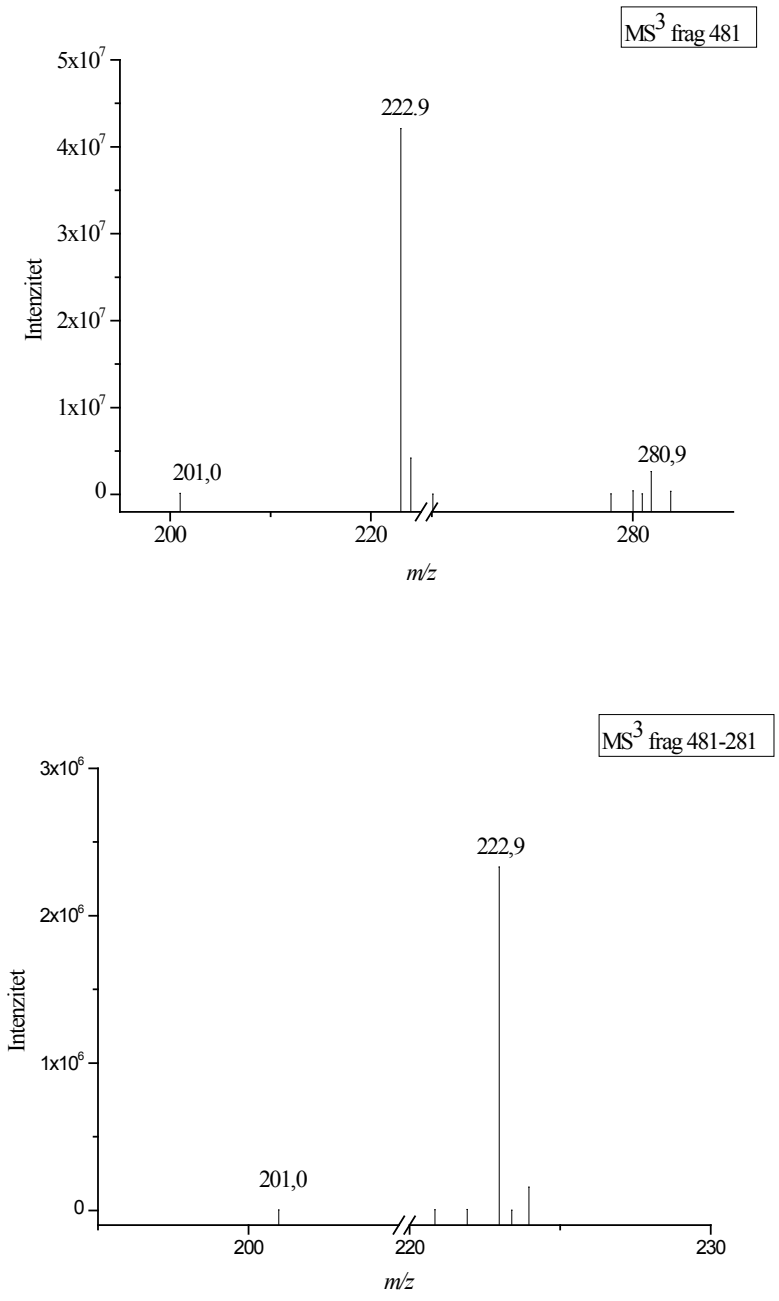
SlikaB-6: Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 437,2 snimljen u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-7



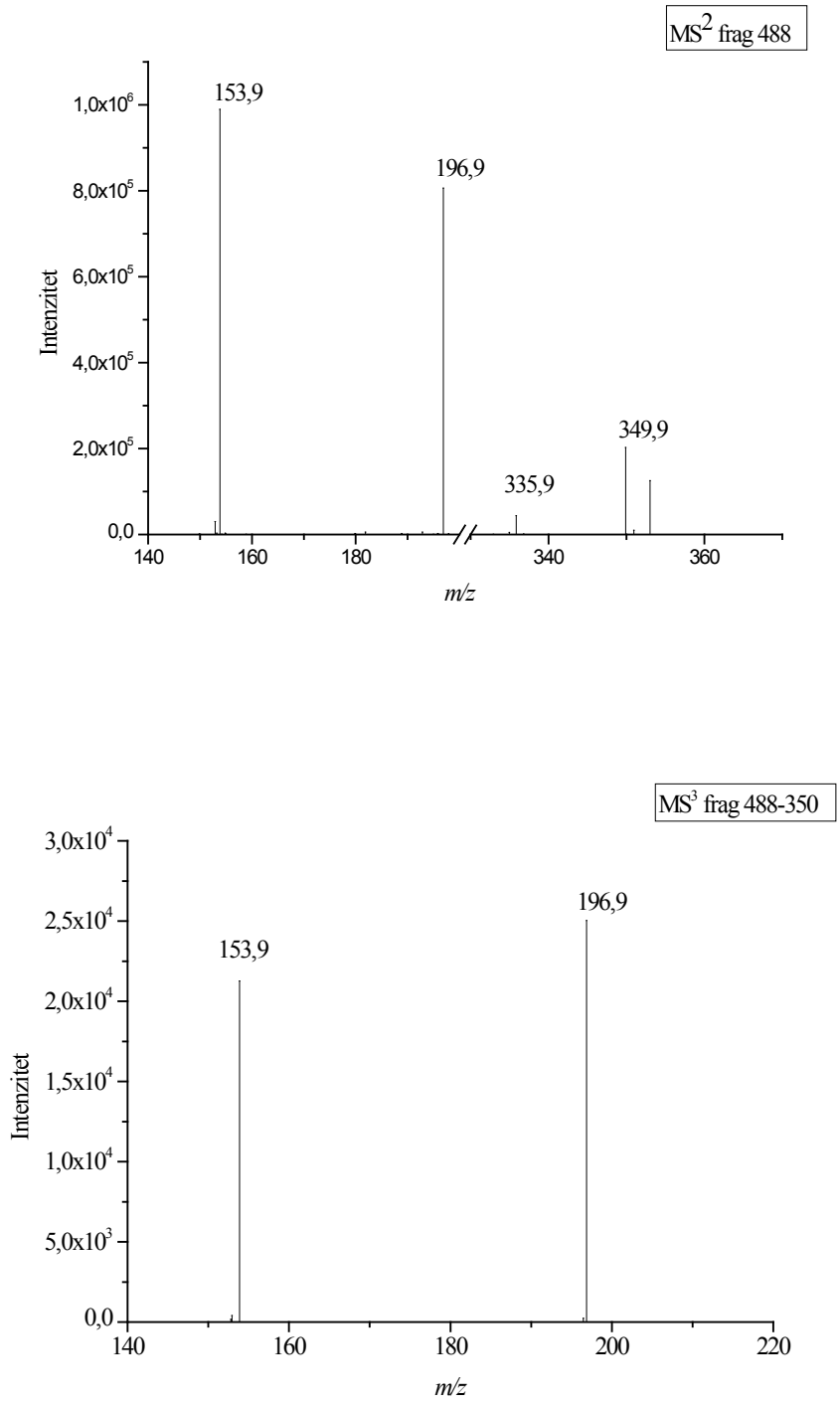
Slika B-7 : Spektar ESI-MS^2 signala na *m/z* 459 snimljen u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-8



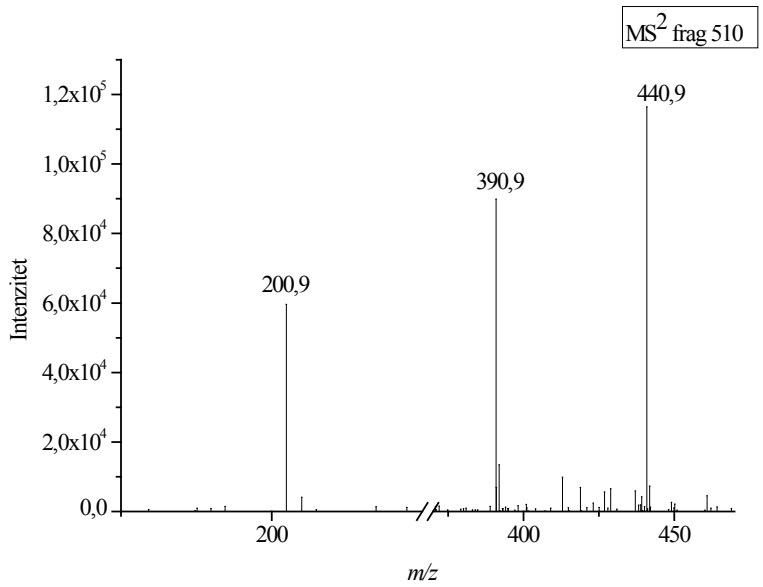
Slika B-8: Spektri ESI-MS^2 i ESI-MS^3 signala na *m/z* 481 snimljeni u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

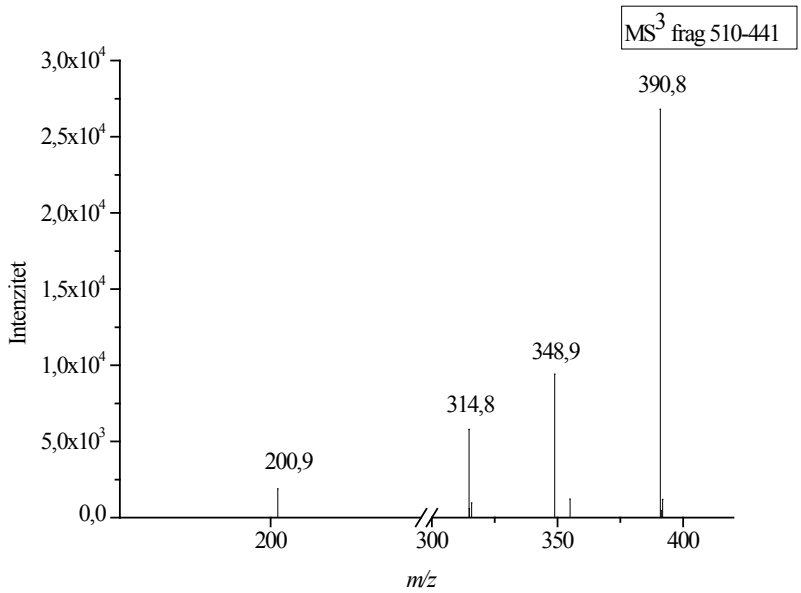
DODATAK B-9

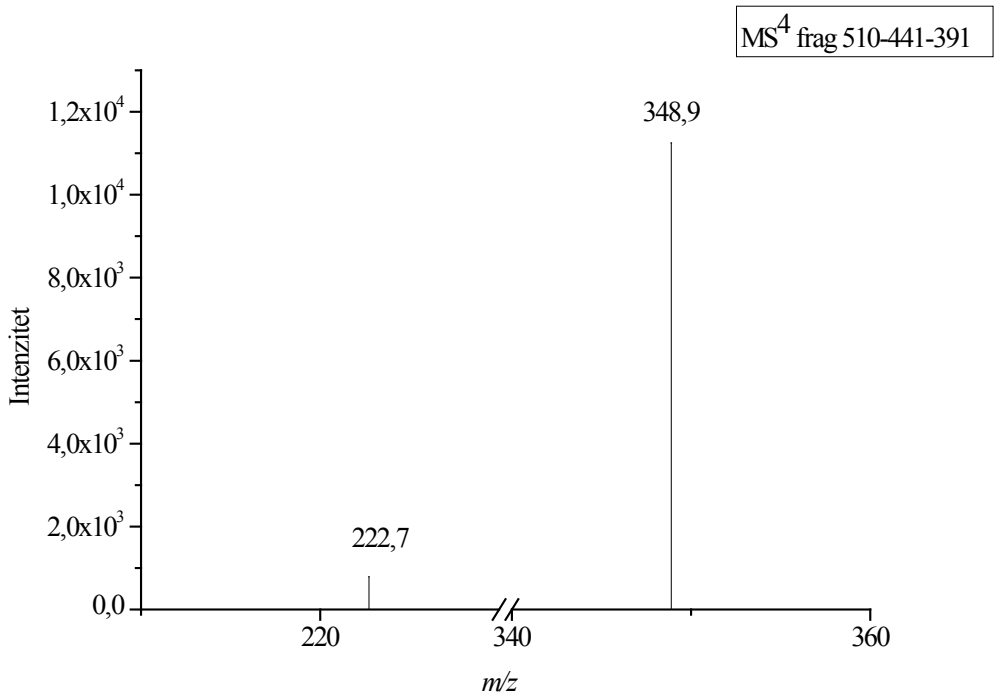


Slika B-9: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 488,9 snimljeni u MeOH, c=5·10^{-7} mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-10

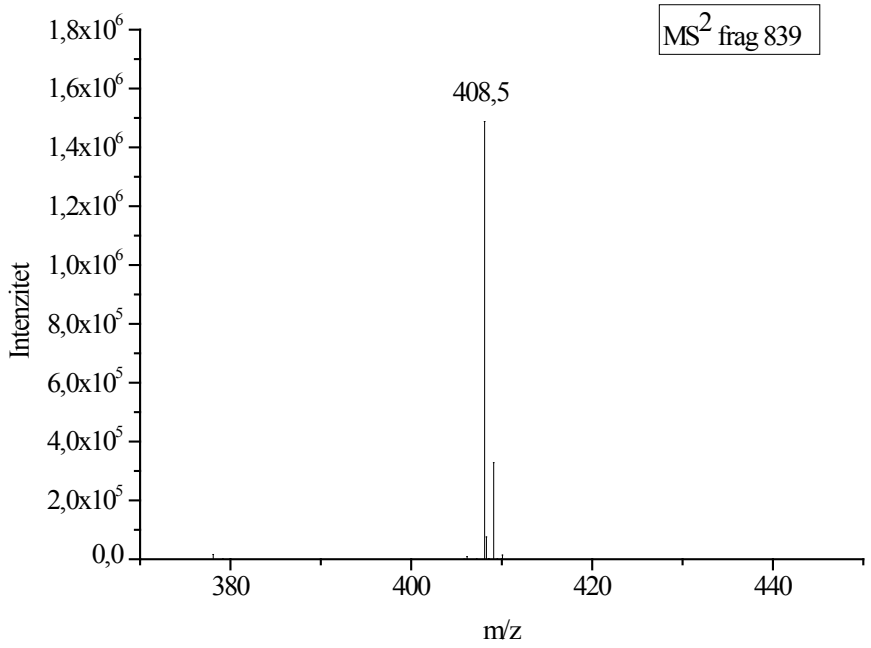

MS2 frag 510
1,2x10^5
1,0x10^5
8,0x10^4
6,0x10^4
4,0x10^4
2,0x10^4
0,0
Intenzitet
200,9
390,9
440,9
200
400
450
m/z

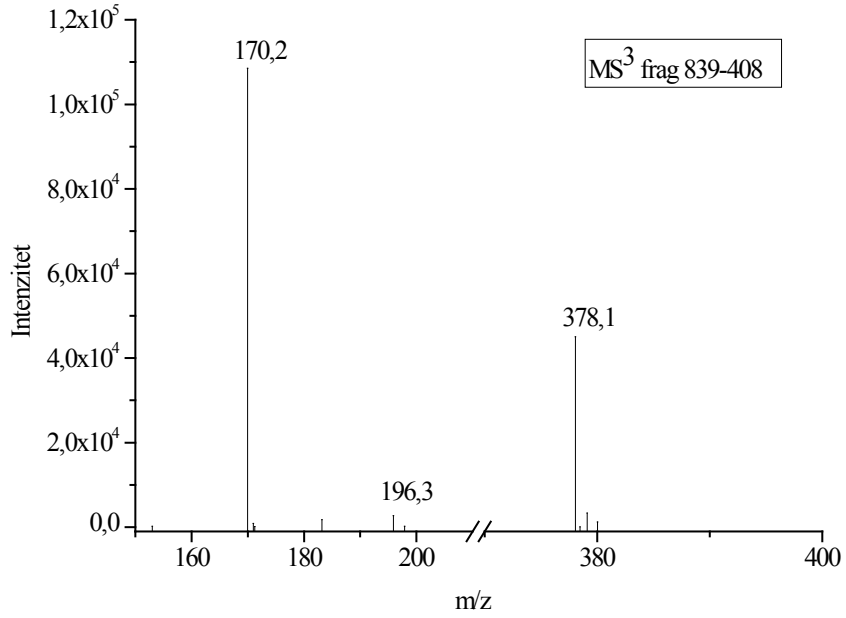

MS3 frag 510-441
3,0x10^4
2,5x10^4
2,0x10^4
1,5x10^4
1,0x10^4
5,0x10^3
0,0
Intenzitet
200,9
314,8
348,9
390,8
200
300
350
400
m/z



Slika B-10: Spektri ESI-MS^n signala na *m/z* 510,3 snimljeni u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

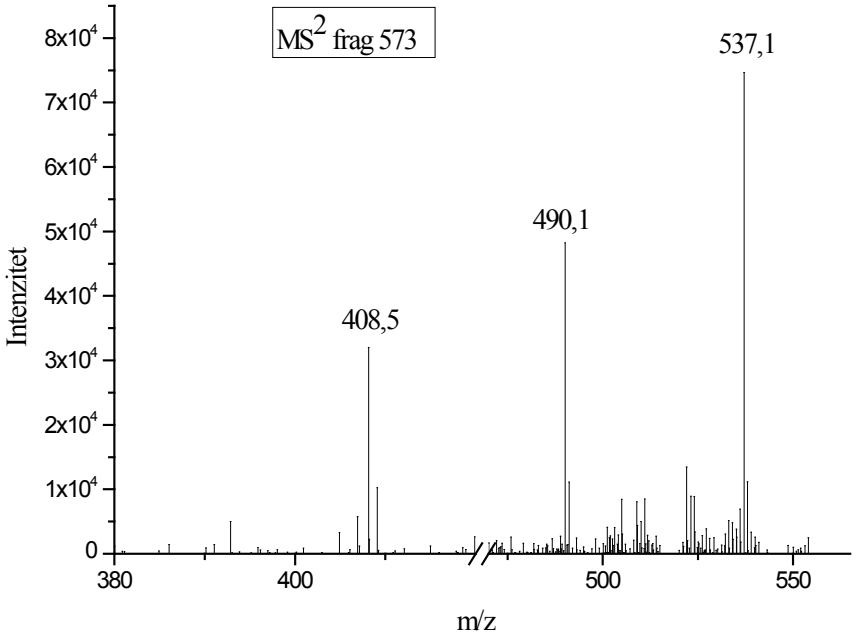
DODATAK B-11

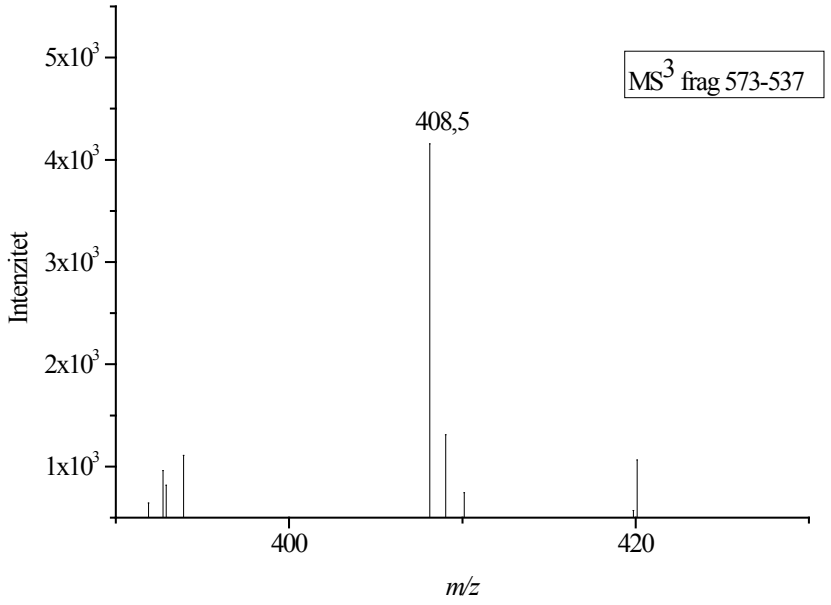


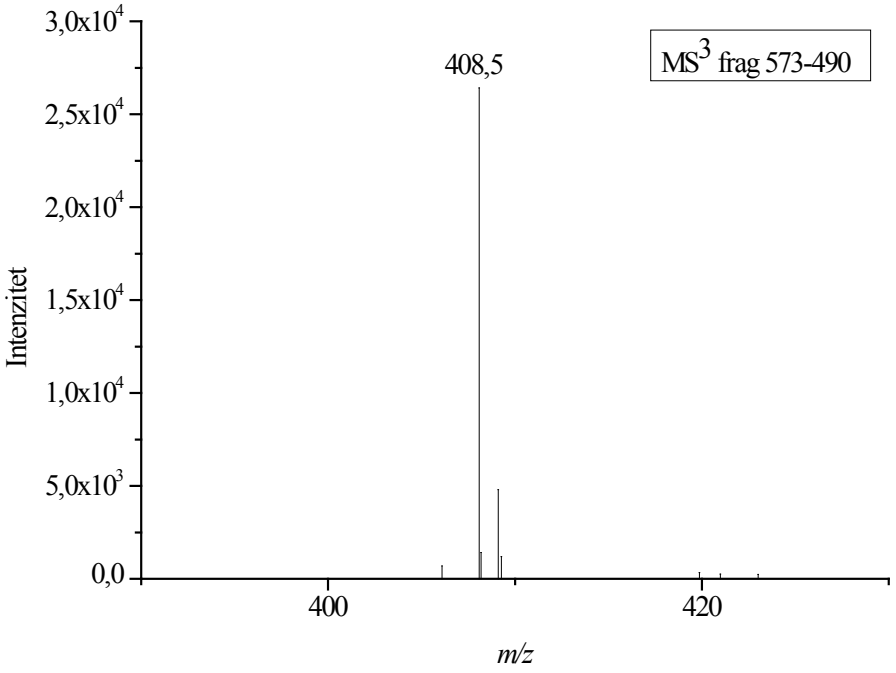


Slika B-11: Prikaz spektara ESI-MS^n signala na *m/z* 839,0 snimljenih u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u pozitivnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon ETD, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da).

DODATAK B-12


MS2 frag 573
537,1
490,1
408,5
Intenzitet
8x10^4
7x10^4
6x10^4
5x10^4
4x10^4
3x10^4
2x10^4
1x10^4
0
380
400
500
550
m/z


MS3 frag 573-537
408,5
Intenzitet
5x10^3
4x10^3
3x10^3
2x10^3
1x10^3
400
420
m/z



Slika B-12: Spektri ESI-MS ^{n} signala na *m/z* 573,1 za uzorak konjugata Ciklam-TsC **9** s $[CuCl]^{+}$ snimljeni u MeOH, $c=5\cdot10^{-7}$ mol dm^{-3} i @cid 1 u negativnom načinu rada na spektrometru masa s ionskom stupicom amaZon, a izolirane mase su u rasponu od ±2 amu (Da

§ 8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

§ 8. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ACN-acetonitril

APCI-eng. Atmospheric pressure chemical ionisation, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku

API-engl. atmospheric pressure ionisation, ionizacija pri atmosferskom tlaku

br-eng. broad-široki

CE-eng. capilary electroforesis, kapilarne elektroforeza

CI-engl. chemical ionisation, kemijska ionizacija

CID-eng. Collision induced dissociation, kolizijom izazvana disocijacija

d-dublet

dd-dublet dubleta

Da-Dalton

DMF-*N,N*-dimeti-formamid

DMSO-dimetil-sulfoksid

DNA-deoksiribonukleinska kiselina

EI-eng. Electron impact ionisation, ionizacija udarom elektrona

Et_3N-trietilamin

EtOH-etanol

Es MS (ESI-MS)–eng. ElectroSpray Mass Spectrometry, spektrometrija masa s ionizacijom elektroraspršenjem

GC–MS-eng. Gas Chromatography - Mass Spectrometry, plinska kromatografija - masena spektrometrija

HIV-eng.Human Immunodeficiency Virus, virus humane imunodeficijencije

HRMS-eng. High Resolution Mass Spectrometry, spektrometrija masa visoke rezolucije

IT-eng. Ion trap, analizator masa stupica iona

K562-kronična mijeloidna leukemija u blastičnoj krizi

LC–MS-eng. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, tekućinska kromatografija - masena spektrometrija

m-eng. medium, srednje jak, multiplet

M-mol dm^{-3}

MALDI-matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zrač enjem

MeOH-metanol

MRI-eng. magnetic resonance imagin, magnetska slika rezonancije

MS-eng. Mass Spectrometry, spektrometrija masa

MsCl-mesil-klorid

MsC-1-metansulfonilcitozin, 1-mezilcitozin

MsCCu-diklorobis(1-metansulfonilcitozin)bakar(II), diklorobis(1-mezilcitozin)bakar(II)

m/z-eng. Mass-to-charge ratio, omjer mase i naboja iona

PNA-eng. peptide nucleic acid, peptidna nukleinska kiselina

PET-eng. positron emission tomography, pozitronska emisijska tomografija

Rf-eng. retention factor, vrijeme zadržavanja

RNA-ribonukleinska kiselina

s-eng. strong, jak, singlet

QqQ-eng. Triple quadropole, trestruki kvadropolni analizator masa

t-triplet

TsCl-tosil-klorid

TsC-1-(*p*-toluensulfonil)citozin, 1-tosilcitozin

TsCCu-diklorobis(1-(*p*-toluensulfonil)citozin)bakar(II), diklorobis(1-tosilcitozin)bakar(II),

t.t.-točka tališta

δ-kemijski pomak

§ 9. ŽIVOTOPIS

§ 9. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime	VALENTINA KLJUČARIĆ
Adresa	MORH, GS OS RH, HVU „Dr. Franjo Tuđman“ NBK laboratorij, Ilica 256b, Zagreb
Datum i mjesto rođenja	23. 05.1970. Čakovec
Narodnost	Hrvatica
Školovanje	1985. završila O.Š „Maršal Tito“–Bjelovar 1989. završila medicinsku školu–smjer sanitarno-laboratorijski tehničar, Srednjoškolski obrazovni centar-Bjelovar
Diplomirala	1994. godine, PMF, smjer kemije, Sveučilište u Zagrebu, Naziv diplomskog rada „ Selektivna redukcija cikloheksanona s $NaBH_4$ u β ciklodekstrinu, PEG-400 i miceli“ (mentorstvo Prof.dr.sc. Dionis Sunko)
Doktorski studij upisala	2011. godine prelazi s poslijediplomskog studija po starom programu (magisterij) na 3. godinu doktorskog studija.
Radno iskustvo	01. prosinca 1994. djelatnik OS RH, kao DVO (djelatna vojna osoba).
Područje rada	Nuklearno-biološko-kemijska obrana
Jezik	Engleski i Njemački
Vještine i kompetencije	Predavačko iskustvo – nastavnik NBKO-a Vojne vještine i kompetencije Suradnik na Vojnim studijskim programima, smjer vojno kemijsko inženjerstvo na predmetima(Kemija, Org. kemija, Instrumentalne metode analize, RBK detekcija, identifikacija i monitoring i Krizni menagment u NBKO) Rad sa software -ima s primjenom u org. kemiji i u MS analizi spektara
Znanstveni radovi	-R Kobetić, V. Petrović Peroković, V. Ključarić, B. Juršić, D. Sunko, *Supramolecular Chemistry“* **20, Issue 4,** (2008) - V. Ključarić, R. Kobetić, Jasmina Rinkovec, S. Kazezić, D. Gamberovski, D. Saftić, J. Matić, Ž. Ban, B. Žinić, *Journal of Mass Spectrometry*, „ESI-MS studies of the non-covalent interactions between biologically important metal ions and n-sulfonylcytosine derivatives“–rad je u postupku objavljivanja
Stručni radovi	-V. Ključarić, A. Vučemilović, „Biotehnološko oružje“, *Hrvatski vojnik,* lipanj 2006.
Posterska pripoćenja	2016. Simpozij doktoranada PMF-a, na temu: „Interakcija metalnih iona s konjugatima ciklamskih derivata citozina praćene spektrometrijom masa“
Vođenje stručne prakse	Voditelj stručne prakse kadetima Vojnih studija, smjer vojno kemijsko inženjerstvo
Aktivnosti i članstvo	Član sam HKD-a Predstavnik GS OS RH u Nacionalnom povjerenstvu za suzbijanje širenja oružja za masovno uništenje, Uprave za Multilateralne poslove i globalna pitanja, Ministarstva vanjskih i europskih poslova, Republike Hrvatske.