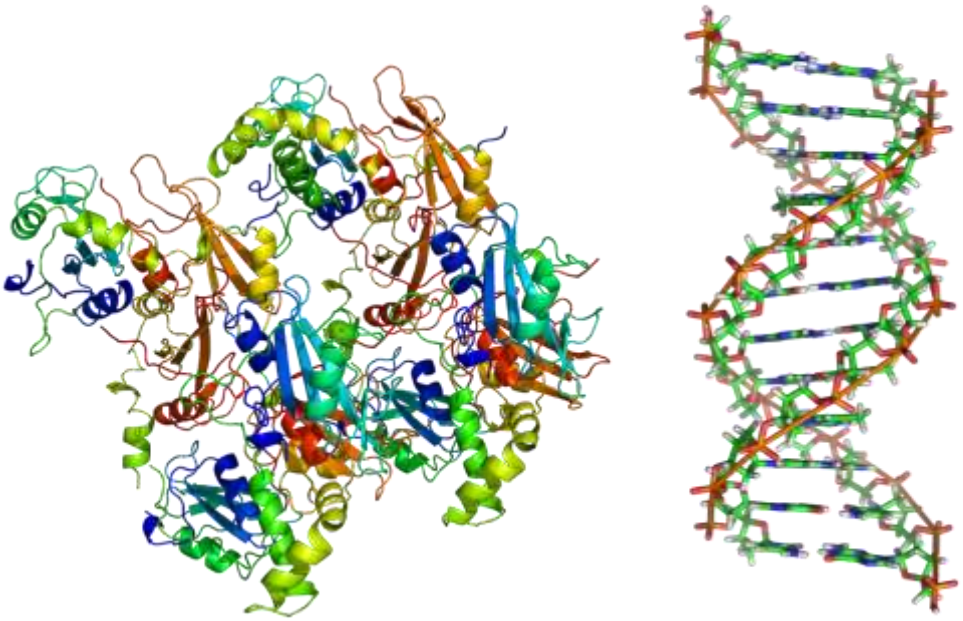
Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za organsku kemiju

Vježbe iz kolegija Kemija prirodnih i sintetskih polimera – I. dio (proteini i nukleinske kiseline)



AUTORI SKRIPTE: dr. sc. Valentina Rep Kaulić, Leon Sačer, *mag. appl. chem.*

Akademska godina, 2026./2027.

SADRŽAJ

1. AMINOKISELINE I PEPTIDI 2
1.1. Kemijska konstitucija 2
1.2. Pojedine aminokiseline 4
1.3. Peptidi i njihova sinteza 8
1.4. Metalni kompleksi aminokiselina 15
2. NUKLEINSKE KISELINE I NUKLEOBAZE 19
2.1. Nukleinske kiseline 19
2.2. Nukleobaze – kemijska građa i svojstva 21
2.3. Kemijska sinteza nukleobaza 24
3. VJEŽBE 27
3.1. Vježba 1 – SINTEZA AMIDA 27
3.2. Vježba 2 - KVALITATIVNA ANALIZA PROTEINA I AMINOKISELINA 28
3.3. Vježba 3 – METALNI KOMPLEKSI AMINOKISELINA 32
3.4. Vježba 4 – DERIVATI DUŠIĆNIH BAZA 33
4. LITERATURA 40

1. AMINOKISELINE I PEPTIDI

Proteini su bitan sastojak svih živih stanica. To su visokomolekulski spojevi izgrađeni od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. Važne funkcije u organizmu ne ispunjavaju samo visokomolekulski proteini već i manji peptidi.

1.1. Kemijska konstitucija

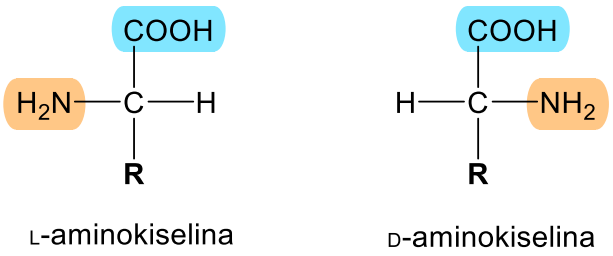
Kao što ime kaže, aminokiseline posjeduju dvije karakteristične funkcionalne skupine: amino-skupinu $–NH_2$ i karboksilnu skupinu –COOH. Kod aminokiselina, koje nas prvenstveno zanimaju kao sastavni dio bjelančevina, amino-skupina je uvijek smještena u α-položaju prema karboksilnoj grupi. **Tablica 1.** daje pregled dvadeset aminokiselina koje redovito dolaze u proteinima. One nose trivijalna imena, koja se često skraćuju na prva tri slova.

Najjednostavniji je predstavnik glicin, $H_2N–CH_2–COOH$. Kod ostalih aminokiselina postoji na α-ugljikovu atomu osim amino-skupine još i alifatski ili aromatski ostatak **R** koji može nositi još daljnje funkcionalne skupine. Opća formula prikazana je sa strane.

Opća formula aminokiseline:

$$HOOC–CH(NH_2)–R$$

L-aminokiselina i D-aminokiselina: razlikuju se prema prostornom rasporedu skupina oko α-ugljikova atoma.



Slika 1. *Razlika u strukturi L- i D- aminokiselina*

Kad u navedenim formulama **R** ne označuje H, već neki alkilni ili arilni radikal, α-ugljikov atom je asimetrično supstituiran. Javlja se optička aktivnost jer se model ne može preklopiti svojom zrcalnom slikom. Razlikujemo dva sterička reda, L-red i D-red. Aminokiseline koje se nalaze u proteinima pripadaju L-redu, pa, prema tome, imaju isti raspored supstituenata na α-C-atomu kao i L-alanin i L-serin (R = CH_3, odnosno $-CH_2OH$). Smjer optičkog skretanja neovisan je o pripadnosti nekom steričkom redu.

Formule dipolarnih iona

Karboksilna skupina može kao kisela grupa disocijacijom osloboditi H^+-ione. Bazična amino-grupa prima H^+-ione analogno amonijaku:

$$NH_3 + H^+ = NH_4^+ \text{ (stvaranje amonijeve soli).}$$

Kad su obje skupine disocirane, dobivamo formulu prikazanu dipolarnim ionom (Zwitterion). U tom obliku nalaze se aminokiseline u vodenoj otopini:

Oblici aminokiselina:

- I. Dipolarni ion: $H_3N^+–CH(R)–COO^-$
- II. Pozitivno nabijeni oblik: $H_3N^+–CH(R)–COOH$
- III. Negativno nabijeni oblik: $H_2N–CH(R)–COO^-$

Dodatkom H^+-iona (kiselina) negativno nabijena karboksilna grupa prima H^+-ione i postaje nenabijena (formula II).

Dodatkom alkalija (OH^--ioni) disociraju H^+-ioni s amino-grupa i spajaju se sa OH^--ionima u vodu, pa dobivamo formulu III. Pojedina molekula aminokiseline može u vodenoj otopini postojati samo u ta tri oblika (nenabijen oblik ne postoji). U otopini aminokiseline, koja sadrži mnoge trilijune molekula, uspostavlja se ravnoteža između I. i II. ili I. i III., pri čemu najčešće jedan oblik preteže. Koji je oblik favoriziran, ovisi o konstantama disocijacije karboksilne, odnosno amino-skupine i o pH otopine, tj. o koncentraciji H^+-iona.

Disocijacija kiselih i bazičnih skupina aminokiselina podložna je zakonu o djelovanju masa jednako kao i disocijacija slabih kiselina i baza. Svaka skupina ima svoju konstantu disocijacije K kojoj negativni logaritam označavamo kao pK-vrijednost. Vrijednost pK-kiselinske skupine jest otprilike 2,2, tj. karboksilna grupa jače je disocirana nego kod octene kiseline (pK = 4,65). Za amino-grupu, koju prema jednadžbi

$$R–NH_3^+ \rightleftharpoons R–NH_2 + H^+$$

možemo smatrati kiselinom, izmjerene su pK vrijednosti od 8,9 do 10,6.

1.2. Pojedine aminokiseline

U proteinima se, u pravilu, nalazi dvadeset različitih aminokiselina koje su kodirane nukleinskim kiselinama. Aminokiseline se razlikuju prema vrsti ostataka **R**. Njihove formule navedene su u **tablici 1.** One su grupirane prema funkciji koju pobočni lanci R imaju prilikom izgradnje prostorne strukture proteina. Tako postoje četiri grupe:

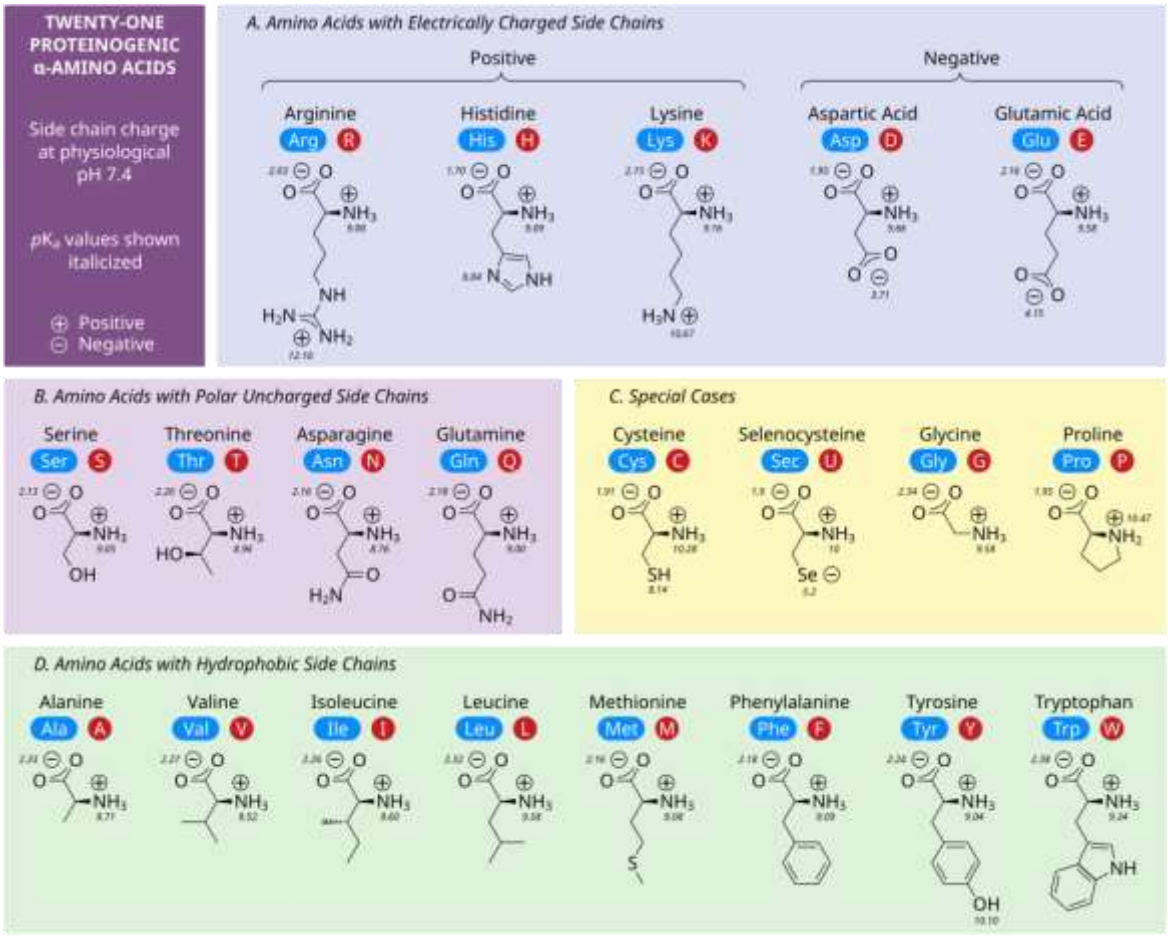
1. Aminokiseline kod kojih je pobočni lanac čisti ugljikovodik: glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin, prolin i fenilalanin. Pobočni lanci tih aminokiselina (osim kod glicina) mogu stvarati hidrofobne veze.
2. Aminokiseline s grupama u pobočnom lancu, koje djeluju polarno a ne ioniziraju (to su: –OH, –SH, $–CO·NH_2$ i neki heterocikli): tirozin, triptofan, serin, treonin, cistein i cistin, kao i metionin. U jače alkalnom području mogu HS-grupe cisteina i fenolna HO-grupa tirozina disocijacijom otpustiti protone. Ovamo pripadaju također asparagin i glutamin, amidi kiselih aminokiselina (grupa 3). Stvaranjem amida izgubila su se kisela svojstva karboksilne grupe. Polarne grupe s pobočnim lancima sudjeluju u stvaranju vodikovih veza između različitih dijelova peptidnog lanca i tako stabiliziraju molekulu proteina.
3. Kisele aminokiseline, monoamino-dikarboksilne kiseline, glutaminska kiselina i asparaginska kiselina sadrže još jednu dodatnu karboksilnu skupinu i daju molekuli proteina negativne naboje.
4. Bazične aminokiseline ili diamino-monokarboksilne kiseline: arginin, lizin i histidin sadrže još jednu dodatnu bazičnu skupinu i daju molekuli proteina pozitivne naboje.

U prvu skupinu aminokiselina s ugljikovodičnim pobočnim lancem pripadaju:

Glicin (2-aminooctena kiselina) najjednostavnija je aminokiselina i jedina koja nema asimetrični C-atom. Glicinski ostatak ima vrlo malen volumen, što je važno za izgradnju određenih struktura (npr. kolagen). Metiliranjem amino-grupe glicina nastaje sarkozin koji se nalazi u nekim peptidima. Trimetil-derivat glicina naziva se betainom. Betain postoji samo u dipolarnom obliku ili kao sol, a prema njemu se dipolarne formule nazivaju i betainskim strukturama.

Alanin (2-aminopropionska kiselina) može se formalno shvatiti kao ishodni spoj za sve druge aminokiseline jer zamjenom jednog ili obaju vodika u metilnoj grupi nekim drugim ostatkom nastaju strukturne formule ostalih aminokiselina.

Tablica 1. *Strukture najvažnijih aminokiselina*



Valin (2-aminoizovalerijanska kiselina), leucin (2-amino-4-metil-valerijanska kiselina) i izoleucin (2-amino-3-metil-valerijanska kiselina) imaju razgranat ugljikov skelet. Kemijski su razmjerno slični, osobito leucin i izoleucin.

Prolin je ciklički građen. Dušikov atom u α-položaju uključen je u prsten, pa stoga nije primaran, već sekundaran amin. Prolin, povezan u peptidu, može se hidroksilacijom modificirati u trans-4-hidroksiprolin. Kao što formula prikazuje, u peteročlanom prstenu su hidroksilna i karboksilna grupa u trans-položaju.

Te sekundarne aminokiseline (sistematsko ime pirolidin-karboksilne kiseline) često se nazivaju iminokiselinama. To je u skladu sa zastarjelom kemijskom nomenklaturom. Spojevi R–NH–R, koji su se prije nazivali iminima, ne smiju se zamijeniti stvarnim iminima >C=NH.

Pirolidon-2-karboksilna kiselina ima također peteročlani prsten. Ona nastaje povezivanjem amino-grupe i γ-karboksilne skupine glutaminske kiseline unutar same molekule u amid. Stoga se zove i piroglutaminska kiselina. Katkada čini N-terminalni kraj nekog peptidnog lanca.

Fenilalanin (2-amino-3-fenil-propionska kiselina) sadrži jedan aromatski prsten, pa se stoga ne može sintetizirati u životinjskom organizmu. Ta je aminokiselina u tijesnoj vezi s tirozinom, koji pripada drugoj skupini jer posjeduje (fenolnu) OH-grupu. Fenolna grupa tirozina ima slabo kisela svojstva: iznad pH 9 disocira proton. Heterociklička α-aminokiselina jest triptofan. Ona posjeduje indolski prsten.

Fenilalanin, tirozin i triptofan ubrajaju se često u podskupinu aromatskih aminokiselina.

Serin (2-amino-3-hidroksi-propionska kiselina) sadrži jednu alkoholnu hidroksilnu skupinu koja može ući u uobičajene reakcije, npr. stvaranje estera. Ester s fosfatnom kiselinom fiziološki je važan sastavni dio nekih proteina i fosfatida. Slobodna hidroksilna grupa serina ima posebnu funkciju u nekim enzimima.

Treonin (2-amino-3-hidroksi-maslačna kiselina) idući je viši homolog serina. Ime upućuje na srodstvo sa šećerom treozom. Posjeduje dva asimetrična C-atoma, pa stoga može postojati u četiri stereoizomerna oblika. Po dva se međusobno odnose kao predmet i zrcalna slika: D-treonin i L-treonin, te D-alotreonin i L-alotreonin.

Cistein (2-amino-3-merkapto-propionska kiselina) sadrži sumpor. Sulfhidrilna skupina prilično je reaktivna. Važno je da se cistein (i unutar peptida) može lagano dehidrogenirati. Pri tome iz dvaju cisteinskih ostataka nastaje disulfid. Povezivanje preko S-S-veze nalazimo u mnogim proteinima. I slobodni cistein može se dehidrogenirati. Tako dobivamo teško topljivi cistin, sastojak nekih bubrežnih kamenaca. Lantionin, tioeter nastao od dviju molekula cistina (s jednim S-atomom manje od cistina), bio je izoliran iz hidrolizata vune.

Metionin (2-amino-4-metiltio-maslačna kiselina), esencijalna aminokiselina, jest S-metil derivat homocisteina. Metilna grupa se u metabolizmu može prenijeti na druge molekule.

Asparagin i glutamin, amide »kiselih aminokiselina«, ubrajamo u 2. skupinu. Pri hidrolizi proteina s kiselinom ili lužinom odcjepljuju se amidne grupe i pri tom nastaje amonijak i asparaginska, odnosno glutaminska kiselina.

Asparaginska i glutaminska kiselina (3. skupina) jesu monoamino-dikarboksilne kiseline. Na pobočnom lancu imaju još jednu kiselu skupinu kojoj se proton lagano odcjepljuje disocijacijom. Zbog toga nastaju dodatni negativni naboji (važno za elektrokemijska svojstva proteina). Soli se zovu aspartat i glutamat. U peptidu se glutaminska kiselina može izmijeniti na dva načina. Zatvaranjem prstena između γ-karboksilne i amino-grupe, na aminoterminalnom kraju, može nastati piroglutaminska kiselina. Amino-grupa je ovdje maskirana, pa ne reagira uobičajenim reagencijama za N-terminalne grupe. Druga vrsta promjene je karboksilacija u γ-karboksiglutamat koji u pobočnom lancu sadrži malonsku grupu. Takve karboksilne skupine mogu stvarati komplekse s kalcijem, što je važno za zgrušavanje krvi.

Skupinu 4. čine lizin, **arginin i histidin**. Te aminokiseline imaju po šest C-atoma, što može pomoći pri pamćenju formula. Bazne grupe u pobočnim lancima tih aminokiselina odgovorne su za pozitivne naboje na proteinima. Arginin (2-amino-5-gvanidinovalerijanska kiselina) ima najjača bazična svojstva, slijedi lizin (2,6-diamino-heksan-kiselina) s primarnom amino-skupinom u pobočnom lancu. U mnogim aktivnim centrima enzima nalazi se reaktivna NH_2-skupina lizina.

Na kraju, **histidin** (α-amino-1H-imidazol-4-propionska kiselina) sadrži slabo bazični imidazolski prsten. N-atomi označavaju se grčkim slovima π (od pros = blizu pobočnog lanca) i τ (od tele = udaljen od pobočnog lanca). Kako pK-vrijednost imidazola leži blizu neutralne vrijednosti, histidin može kod enzimske katalize djelovati kao donor, odnosno akceptor protona. Zbog toga se u mnogim aktivnim centrima enzima nalaze histidinski ostaci.

Aminokiseline koje se rijetko nalaze

Osim 20 aminokiselina koje se redovito nalaze u proteinima, u prirodi ima još mnogo drugih aminokiselina. One su većinom slobodne u biljnim i životinjskim tkivima, a često su međuproizvodi metabolizma. Navodimo samo neke od stotinu i više aminokiselina koje su izolirane iz biljaka ili mikroorganizama. Neke aminokiseline koje se ne nalaze u proteinima, već u nekim peptidima, nastaju u metabolizmu na jednostavan način iz običnih aminokiselina.

To su ornitin (iz arginina), β-alanin (iz asparaginske kiseline), koji je, među ostalim, i sastojak pantotenske kiseline (vitamin) i homologna γ-aminomaslačna kiselina, koja u slobodnom obliku dolazi u mozgu.

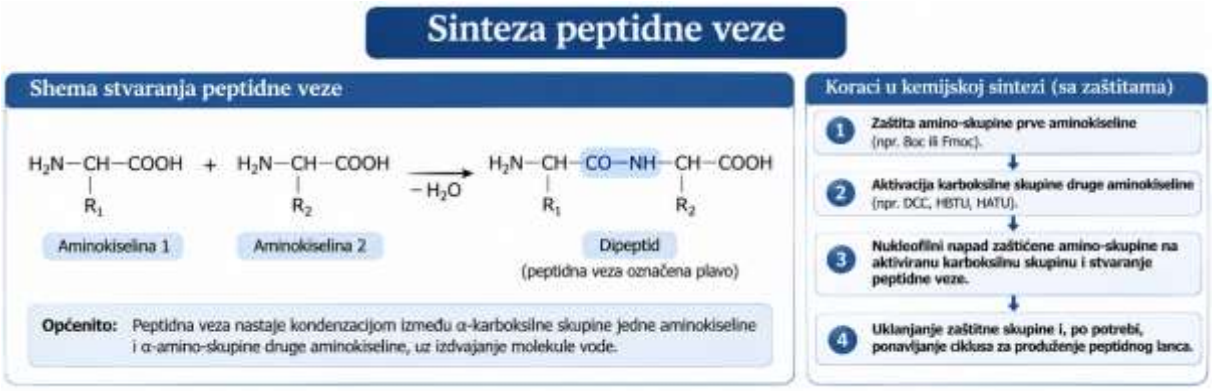
1.3. Peptidi i njihova sinteza

Peptidi su organski spojevi građeni od dvaju ili više aminokiselinskih ostataka međusobno povezanih peptidnim vezama. Peptidna veza nastaje reakcijom između α-karboksilne skupine jedne aminokiseline i α-amino-skupine druge aminokiseline, uz formalno izdvajanje molekule vode. Po svojoj kemijskoj prirodi peptidna veza pripada amidnim vezama, a karakterizira je strukturna skupina –CO–NH–. Prema broju aminokiselinskih ostataka razlikuju se dipeptidi, tripeptidi, oligopeptidi i polipeptidi. Dipeptidi sadrže dva, a tripeptidi tri aminokiselinska ostatka. Oligopeptidi se sastoje od relativno malog broja aminokiselina, dok polipeptidi sadržavaju veći broj aminokiselinskih ostataka povezanih u lanac. Granica između oligopeptida, polipeptida i proteina nije strogo određena. Proteini su makromolekule sastavljene od jednog ili više polipeptidnih lanaca koji zauzimaju određenu trodimenzionalnu strukturu potrebnu za obavljanje biološke funkcije.

Peptidi imaju brojne važne funkcije u živim organizmima. Sudjeluju u regulaciji metaboličkih procesa, prijenosu signala, hormonskoj regulaciji, imunološkim reakcijama i zaštiti stanica od oksidacijskih oštećenja. Njihova biološka aktivnost ovisi o aminokiselinskoj sekvenciji, prostornoj strukturi i kemijskim svojstvima pojedinih aminokiselinskih ostataka. Među biološki važnim peptidima ističe se glutation, tripeptid sastavljen od glutamata, cisteina i glicina, koji ima važnu ulogu u održavanju stanične redoks-ravnoteže i zaštiti stanica od oksidacijskog stresa. Oksitocin i vazopresin peptidni su hormoni građeni od devet aminokiselinskih ostataka. Oksitocin sudjeluje u regulaciji kontrakcija maternice i izlučivanju mlijeka, dok vazopresin regulira ravnotežu vode u organizmu. Angiotenzin II je oktapeptid koji sudjeluje u regulaciji arterijskog krvnog tlaka i ravnoteže elektrolita. Peptidi imaju važnu primjenu i u medicini te farmaceutskoj industriji. Brojni terapijski peptidi koriste se kao hormonski lijekovi, regulatori metaboličkih procesa i biološki aktivne molekule. Razvoj metoda kemijske sinteze omogućio je pripravu peptida točno određene aminokiselinske sekvencije i njihovu strukturnu modifikaciju radi poboljšanja stabilnosti, selektivnosti i farmakoloških svojstava.

Peptidna veza i struktura peptida

Povezivanjem dviju aminokiselina nastaje dipeptid. Pri tome karboksilna skupina prve aminokiseline reagira s amino-skupinom druge aminokiseline, čime nastaje peptidna veza. Nastali dipeptid zadržava jednu slobodnu amino-skupinu i jednu slobodnu karboksilnu skupinu, zbog čega se lanac može dalje produživati povezivanjem s drugim aminokiselinama.



Slika 2. *Shematski prikaz sinteze peptidne veze*

Kraj peptidnog lanca sa slobodnom amino-skupinom naziva se N-terminalni kraj, dok se kraj sa slobodnom karboksilnom skupinom naziva C-terminalni kraj. Aminokiselinska sekvencija peptida prema dogovoru se uvijek zapisuje od N-terminalnog prema C-terminalnom kraju. Redoslijed aminokiselina određuje primarnu strukturu peptida, a time utječe na njegova kemijska svojstva, prostornu organizaciju i biološku aktivnost. Peptidna veza pokazuje posebna strukturna svojstva zbog rezonancije između karbonilne skupine i dušikova atoma amidne skupine. Slobodni elektronski par dušikova atoma djelomično se delokalizira prema karbonilnoj skupini, zbog čega veza između karbonilnog ugljikova i amidnog dušikova atoma poprima djelomičan karakter dvostruke veze. Posljedica toga jest ograničena rotacija oko C–N veze i gotovo planarna građa peptidne skupine. Peptidna veza najčešće se nalazi u trans-konfiguraciji jer je takav raspored sterički povoljniji. Iznimku u određenoj mjeri predstavljaju peptidne veze u kojima sudjeluje prolin, kod kojih je cis-konfiguracija zastupljenija nego kod ostalih aminokiselina. Karbonilni kisikov atom peptidne

veze može djelovati kao akceptor vodikove veze, dok amidna NH-skupina može djelovati kao donor vodikove veze. Takve interakcije imaju važnu ulogu u stabilizaciji sekundarne strukture proteina, osobito α-uzvojnice i β-nabrane ploče.

Kemijska svojstva peptida

Kemijska svojstva peptida određena su peptidnim vezama, slobodnim terminalnim skupinama i funkcionalnim skupinama aminokiselinskih pobočnih lanaca. Peptidi su amfoterni spojevi jer mogu sadržavati kisele i bazične skupine sposobne za primanje ili otpuštanje protona. Njihov ukupni električni naboj ovisi o pH otopine i vrijednostima konstanti disocijacije pojedinih ionizirajućih skupina. U kiseloj sredini dolazi do protoniranja bazičnih skupina, pa peptidi mogu poprimiti pozitivan ukupni naboj. U lužnatoj sredini dolazi do deprotoniranja kiselih skupina, zbog čega prevladavaju negativno nabijeni oblici. Vrijednost pH pri kojoj je prosječni ukupni električni naboj peptida jednak nuli naziva se izoelektrična točka, odnosno pI.

Topljivost peptida u vodi ovisi o njihovoj veličini, aminokiselinskom sastavu, ukupnom naboju i rasporedu polarnih i nepolarnih skupina. Peptidi bogati polarnim i nabijenim aminokiselinskim ostacima u pravilu pokazuju veću topljivost u vodi, dok prisutnost većeg broja hidrofobnih ostataka može smanjiti topljivost i pogodovati međumolekulskom povezivanju. Peptidna veza relativno je stabilna pri fiziološkim uvjetima. Njezina hidroliza termodinamički je povoljna, ali se u odsutnosti katalizatora odvija vrlo sporo zbog visoke aktivacijske energije. Hidroliza se može ubrzati djelovanjem jakih kiselina ili lužina pri povišenoj temperaturi, kao i djelovanjem specifičnih proteolitičkih enzima.

Kemijska sinteza peptida

Kemijska sinteza peptida temelji se na postupnom povezivanju aminokiselina u unaprijed određenom redoslijedu. Iako se peptidna veza formalno može prikazati kao produkt kondenzacije karboksilne i amino-skupine uz izdvajanje vode, izravna reakcija slobodnih aminokiselina nije prikladna za kontroliranu sintezu peptida. Razlog tome jest prisutnost više reaktivnih funkcionalnih skupina koje mogu međusobno reagirati i dovesti do nastajanja smjese različitih produkata. Za uspješnu sintezu potrebno je osigurati selektivno povezivanje karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino-skupinom druge aminokiseline. To se postiže primjenom zaštitnih skupina i aktivacijom karboksilne skupine. Zaštitne skupine

privremeno blokiraju reaktivnost pojedinih funkcionalnih skupina aminokiselina i sprječavaju neželjene reakcije tijekom sinteze. Nakon stvaranja željene peptidne veze zaštitne se skupine mogu selektivno ukloniti, čime se omogućuje nastavak izgradnje peptidnog lanca.

Za zaštitu amino-skupina najčešće se primjenjuju tert-butiloksikarbonilna skupina (Boc) i 9-fluorenilmetoksikarbonilna skupina (Fmoc). Boc-skupina uklanja se djelovanjem kiselina, dok se Fmoc-skupina uklanja djelovanjem baza, najčešće piperidina. Različita kemijska stabilnost ovih skupina omogućuje njihovu selektivnu primjenu tijekom višestupanjske sinteze. Karboksilne skupine mogu se zaštititi pretvorbom u estere, dok se funkcionalne skupine pobočnih lanaca, poput hidroksilnih, amino-, karboksilnih i sulfhidrilnih skupina, prema potrebi zaštićuju odgovarajućim zaštitnim skupinama. Izbor zaštitnih skupina mora omogućiti njihovo uklanjanje bez narušavanja već nastalih peptidnih veza i bez značajnijih sporednih reakcija.

Osim zaštite funkcionalnih skupina, za stvaranje peptidne veze potrebna je aktivacija karboksilne skupine. Karboksilna skupina u slobodnom obliku nije dovoljno reaktivna za učinkovito stvaranje amidne veze u blagim uvjetima. Zbog toga se primjenjuju aktivacijski reagensi koji omogućuju nastajanje reaktivnijih derivata karboksilnih kiselina. Među klasičnim reagensima za aktivaciju nalaze se karbodiimidi, primjerice dicikloheksilkarbodiimid (DCC) i diizopropilkarbodiimid (DIC). U suvremenoj sintezi koriste se i različiti uronijevi i fosfonijevi reagensi, poput HBTU-a i HATU-a. Njihovom primjenom olakšava se nukleofilni napad amino-skupine na aktiviranu karboksilnu skupinu, nakon čega nastaje peptidna veza. Važan problem tijekom kemijske sinteze peptida predstavlja racemizacija, odnosno djelomična promjena konfiguracije kiralnog α-ugljikova atoma aminokiseline. Racemizacija može dovesti do nastajanja neželjenih stereoizomera i smanjenja čistoće konačnog produkta. Zbog toga se reakcijski uvjeti i aktivacijski reagensi odabiru tako da se mogućnost racemizacije svede na najmanju moguću mjeru.



Slika 3. *Česti reagensi korišteni pri sintezi peptida*

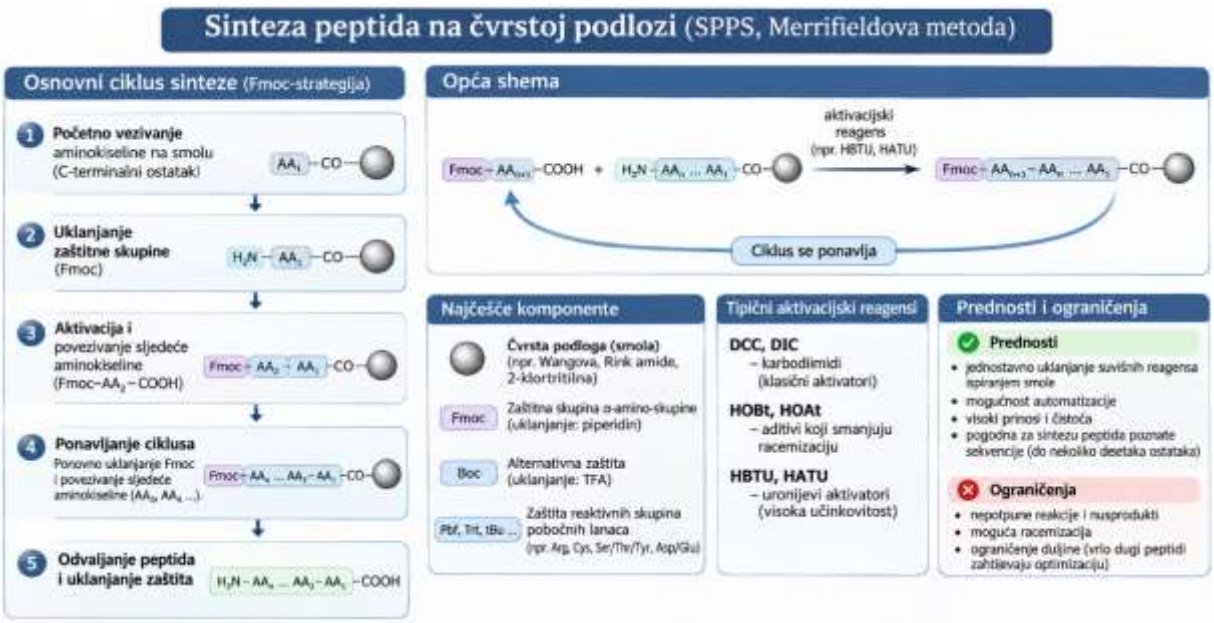
Sinteza peptida u otopini

Klasična sinteza peptida provodi se u otopini postupnim povezivanjem odgovarajuće zaštićenih aminokiselina ili kraćih peptidnih fragmenata. Nakon svake reakcije potrebno je izolirati i pročistiti nastali produkt prije nastavka sinteze. U prvom koraku odabiru se aminokiseline s odgovarajuće zaštićenim funkcionalnim skupinama. Karboksilna skupina jedne aminokiseline aktivira se prikladnim reagensom, nakon čega reagira sa slobodnom amino-skupinom druge aminokiseline. Nastali zaštićeni dipeptid može se dalje modificirati selektivnim uklanjanjem zaštitne skupine i povezivanjem sa sljedećom aminokiselinom. Postupak se ponavlja sve dok se ne dobije peptid željene aminokiselinske sekvencije. Na završetku sinteze uklanjaju se preostale zaštitne skupine i provodi pročišćavanje produkta. Glavni nedostatak sinteze u otopini jest potreba za izolacijom i pročišćavanjem međuprodukata nakon pojedinih reakcijskih koraka. S povećanjem duljine peptidnog lanca povećava se broj potrebnih reakcija, a ukupni prinos može se znatno smanjiti zbog nepotpune učinkovitosti svakog pojedinog koraka. Unatoč tim ograničenjima, sinteza u otopini i dalje se primjenjuje, osobito za pripravu kraćih peptida, pojedinih peptidnih fragmenata i u određenim industrijskim postupcima.

Sinteza peptida na čvrstoj podlozi

Značajan napredak u kemijskoj sintezi peptida predstavlja razvoj sinteze na čvrstoj podlozi, koju je uveo Robert Bruce Merrifield. Ova metoda omogućuje postupnu izgradnju peptidnog lanca dok je on kovalentno vezan na netopljivi polimerni nosač, najčešće odgovarajuću funkcionaliziranu smolu.

Sinteza započinje vezivanjem C-terminalne aminokiseline na čvrstu podlogu. Amino-skupina vezane aminokiseline zaštićena je odgovarajućom zaštitnom skupinom. Nakon uklanjanja te zaštitne skupine oslobođena amino-skupina reagira s aktiviranom karboksilnom skupinom sljedeće zaštićene aminokiseline, pri čemu nastaje nova peptidna veza. Nakon povezivanja aminokiselina suvišni reagensi i nusprodukti uklanjaju se ispiranjem smole odgovarajućim otapalima. Zatim se ponovno uklanja privremena zaštitna skupina s N-terminalnog kraja i provodi sljedeća reakcija povezivanja. Na taj se način peptidni lanac postupno produžuje u smjeru od C-terminalnog prema N-terminalnom kraju. U suvremenoj sintezi na čvrstoj podlozi često se primjenjuje Fmoc-strategija. Fmoc-skupina privremeno štiti α-amino-skupinu, dok su reaktivne skupine pobočnih lanaca zaštićene skupinama koje su stabilne tijekom uklanjanja Fmoc-skupine. Nakon završetka sinteze peptid se odvaja od smole, a preostale zaštitne skupine uklanjaju se odgovarajućim reakcijskim postupkom, često primjenom trifluoroctene kiseline. Prednost sinteze na čvrstoj podlozi jest jednostavno odvajanje topljivih reagensa i nusprodukata od peptida vezanog na nosač. Time se izbjegava potreba za izolacijom međuprodukata nakon svakog reakcijskog koraka. Postupak je pogodan za automatizaciju, što omogućuje relativno brzu i reproducibilnu pripravu peptida poznate sekvencije. Ipak, tijekom sinteze mogu nastati neželjeni produkti zbog nepotpunog povezivanja aminokiselina, nepotpunog uklanjanja zaštitnih skupina ili sporednih reakcija. Zbog toga se nakon završetka sinteze provodi pročišćavanje, najčešće tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC), te analitička karakterizacija dobivenog peptida.



Slika 4. *Shematski prikaz sinteze peptida na čvrstoj podlozi*

1.4. Metalni kompleksi aminokiselina

Aminokiseline predstavljaju važnu skupinu organskih spojeva koji, osim svoje temeljne biološke uloge, imaju značajno mjesto u koordinacijskoj kemiji. Zahvaljujući prisutnosti funkcionalnih skupina koje sadrže donorske atome, aminokiseline mogu djelovati kao ligandi i koordinirati se na različite metalne ione, pri čemu nastaju koordinacijski spojevi različitih struktura, stabilnosti i fizikalno-kemijskih svojstava. Proučavanje metalnih kompleksa aminokiselina važno je za razumijevanje interakcija metalnih iona s biološkim molekulama, transporta i raspodjele metala u organizmima te razvoja novih spojeva s potencijalnom primjenom u medicini, farmaciji, katalizi i znanosti o materijalima.

Strukturna posebnost aminokiselina proizlazi iz istodobne prisutnosti amino skupine ($–NH_2$) i karboksilne skupine (–COOH), koje mogu sudjelovati u koordinaciji metalnih iona. U vodenim otopinama aminokiseline se, ovisno o pH-vrijednosti, nalaze u različitim protonacijskim oblicima. Pri pH-vrijednostima bliskima njihovoj izoelektričnoj točki prevladava zwitterionski oblik, u kojem je amino skupina protonirana ($–NH_3^+$), a karboksilna skupina deprotonirana ($–COO^–$). Promjenom pH-vrijednosti mijenja se stupanj protonacije funkcionalnih skupina, a time i njihova sposobnost koordinacije metalnih iona.

Koordinacija aminokiselina na metalne centre najčešće se ostvaruje preko dušikova atoma amino skupine i kisikova atoma karboksilatne skupine. Takav način vezanja omogućuje nastajanje peteročlanog kelatnog prstena, koji pridonosi stabilnosti nastalog kompleksa. Osim bidentatnog načina koordinacije, aminokiseline mogu djelovati i kao monodentatni ili premošćujući ligandi, ovisno o prirodi metalnog iona, strukturi aminokiseline, reakcijskim uvjetima i prisutnosti drugih liganada.

Posebnu skupinu čine aminokiseline čiji bočni ogranci sadrže dodatne donorske atome. Primjerice, histidin može koordinirati metalne ione preko dušikova atoma imidazolnog prstena, cistein preko sumporova atoma tiolne skupine, a aspartat i glutamat preko dodatnih karboksilatnih skupina. Takve aminokiseline omogućuju nastajanje složenijih koordinacijskih struktura, uključujući polinuklearne komplekse i koordinacijske polimere.

Koordinacijsko ponašanje aminokiselina određeno je njihovom strukturom, protonacijskim stanjem i elektronskim svojstvima metalnog centra. Najčešći način koordinacije α-aminokiselina jest bidentatno vezanje preko amino i karboksilatne skupine, pri

čemu aminokiselina djeluje kao N,O-donorski ligand. Pri bidentatnoj koordinaciji nastaje kelatni prsten sastavljen od metalnog iona, dušikova atoma amino skupine, α-ugljikova atoma, ugljikova atoma karboksilatne skupine i kisikova atoma karboksilatne skupine. Nastajanje takvog prstena povezano je s kelatnim učinkom, zbog kojeg su mnogi kompleksi s polidentatnim ligandima termodinamički stabilniji od usporedivih kompleksa s monodentatnim ligandima.

Karboksilatna skupina može se koordinirati na nekoliko načina. Osim monodentatne koordinacije preko jednog kisikova atoma, moguća je i bidentatna koordinacija preko oba kisikova atoma te premošćujuća koordinacija između dvaju ili više metalnih centara. Premošćujući način koordinacije osobito je važan pri nastajanju polinuklearnih kompleksa i koordinacijskih polimera.

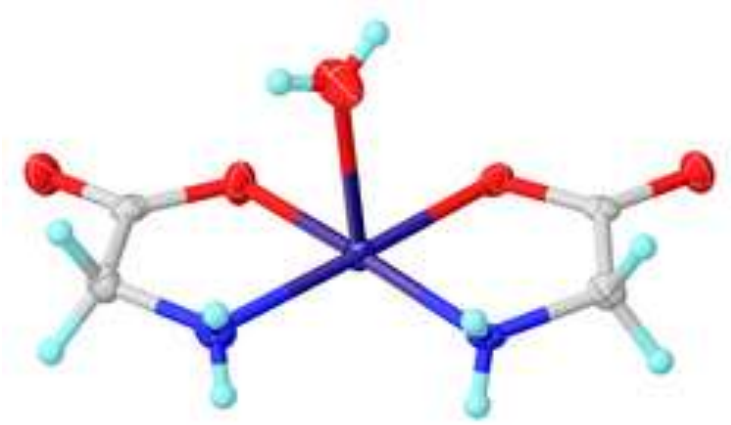
Geometrija nastalih kompleksa ovisi o koordinacijskom broju i elektronskoj konfiguraciji metalnog iona. Kompleksi prijelaznih metala s aminokiselinama često pokazuju oktaedarsku, tetraedarsku ili kvadratno-planarnu koordinacijsku geometriju. Pritom dodatne molekule vode ili drugi ligandi mogu zauzimati preostala koordinacijska mjesta oko metalnog centra.

Glicin (NH_2CH_2COOH) najjednostavnija je proteinogena aminokiselina, čija se struktura razlikuje od ostalih α-aminokiselina po tome što je bočni ogranak zamijenjen vodikovim atomom. Zbog male molekulske veličine, odsutnosti kiralnog centra i relativno jednostavne strukture, glicin predstavlja jedan od najčešće proučavanih modelnih liganada u koordinacijskoj kemiji aminokiselina. U vodenim otopinama glicin se može nalaziti u trima glavnim protonacijskim oblicima: kationskom ($H_3N^+CH_2COOH$), zwitterionskom ($H_3N^+CH_2COO^-$) i anionskom ($H_2NCH_2COO^-$). Njihova relativna zastupljenost ovisi o pH-vrijednosti otopine. Vrijednosti konstanti disocijacije glicina pri sobnoj temperaturi iznose približno $pK_{a1} = 2{,}35$ za karboksilnu skupinu i $pK_{a2} = 9{,}78$ za amino skupinu, pri čemu točne vrijednosti ovise o temperaturi i ionskoj jakosti otopine. Deprotonacijom glicina nastaje glicinatni anion (gly^-), koji se može koordinirati na metalni ion preko dušikova atoma amino skupine i kisikova atoma karboksilatne skupine. Takav način koordinacije omogućuje nastajanje stabilnog peteročlanog kelatnog prstena. Za razliku od aminokiselina s funkcionaliziranim bočnim ograncima, glicin nema dodatne donorske skupine, što olakšava proučavanje osnovnih čimbenika koji određuju nastajanje i stabilnost metalnih kompleksa.

Metalni glicinati predstavljaju koordinacijske spojeve u kojima je glicinatni anion vezan na metalni centar. Njihov sastav, struktura i stabilnost ovise o oksidacijskom stanju metala, omjeru metala i liganda, pH-vrijednosti, otapalu i drugim reakcijskim uvjetima. U takvim kompleksima dva glicinatna liganda mogu zauzimati četiri koordinacijska mjesta oko metalnog centra. Ovisno o metalu, preostala koordinacijska mjesta mogu biti popunjena molekulama vode ili drugim ligandima. Zbog toga se kompleksi istog stehiometrijskog sastava mogu razlikovati po koordinacijskoj geometriji i kristalnoj strukturi. Kompleksi glicina s prijelaznim metalima, osobito bakrom(II), niklom(II), kobaltom(II), cinkom(II) i manganom(II), intenzivno se proučavaju zbog njihove strukturne raznolikosti i važnosti u bioanorganskoj kemiji.

Bakrov(II) glicinat

Kompleksi bakra(II) s glicinom među najpoznatijim su metalnim glicinatima. Bis(glicinato)bakrov(II) kompleks, $[Cu(gly)_2]$, može se pojavljivati u različitim strukturnim oblicima, uključujući *cis* i *trans* raspored donorskih atoma liganada. Koordinacijska okolina bakra(II) često je pod utjecajem Jahn–Tellerova učinka.



Slika 5. *Kristalna struktura cis-bakrova(II) glicinata*

Cinkov(II) glicinat

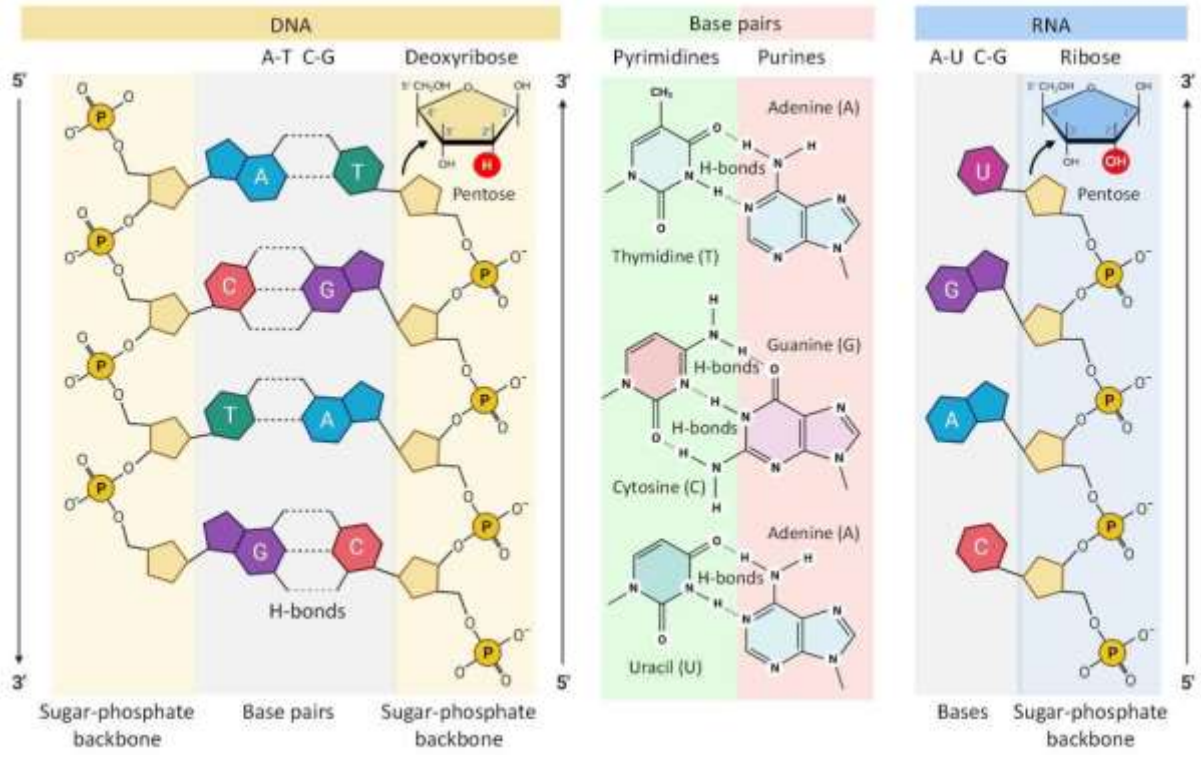
Cink(II) ima popunjenu d-podljusku, zbog čega njegovi glicinatni kompleksi ne pokazuju d–d elektronske prijelaze karakteristične za mnoge druge prijelazne metale. Mogu ostvarivati različite koordinacijske geometrije, a važni su i u istraživanjima vezanja biološki relevantnih metalnih iona.

Metalni glicinati zanimljivi su zbog svoje relativno jednostavne strukture, mogućnosti prilagodbe koordinacijske okoline te raznovrsnih kemijskih i fizikalnih svojstava. U bioanorganskoj kemiji služe kao modelni sustavi za proučavanje interakcija metalnih iona s aminokiselinama i drugim biološkim ligandima. Takva istraživanja pridonose razumijevanju načina na koje metalni ioni sudjeluju u biološkim procesima. Pojedini metalni glicinati, osobito spojevi cinka, magnezija i drugih esencijalnih elemenata, istražuju se i primjenjuju kao izvori minerala u prehrambenim i farmaceutskim formulacijama. Međutim, njihova biološka raspoloživost, sigurnost i učinkovitost ovise o točnom kemijskom sastavu, stabilnosti kompleksa i uvjetima primjene te se ne mogu generalizirati na sve metalne glicinate. Metalni glicinati također se istražuju kao prekursori za pripravu metalnih oksida i drugih funkcionalnih materijala. Kontroliranom toplinskom razgradnjom određenih kompleksa moguće je dobiti materijale različitih morfoloških i strukturnih svojstava.

2. NUKLEINSKE KISELINE I NUKLEOBAZE

2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline biološke su makromolekule koje imaju ključnu ulogu u pohranjivanju, prijenosu i ostvarivanju genetičke informacije. Prisutne su u svim živim stanicama, a njihova kemijska struktura omogućuje očuvanje nasljednih svojstava i regulaciju brojnih bioloških procesa. Zajedno s proteinima, ugljikohidratima i lipidima čine osnovne skupine biomolekula potrebnih za normalno funkcioniranje živih organizama. Prema kemijskoj građi i biološkoj funkciji razlikuju se dvije osnovne vrste nukleinskih kiselina: deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA). DNA predstavlja osnovni nositelj nasljedne informacije u staničnim organizmima, dok RNA sudjeluje u prijenosu i ekspresiji genetičke informacije, sintezi proteina i regulaciji staničnih procesa. U određenih virusa RNA može predstavljati genetički materijal.



Slika 6. *Kemijska struktura DNA i RNA*

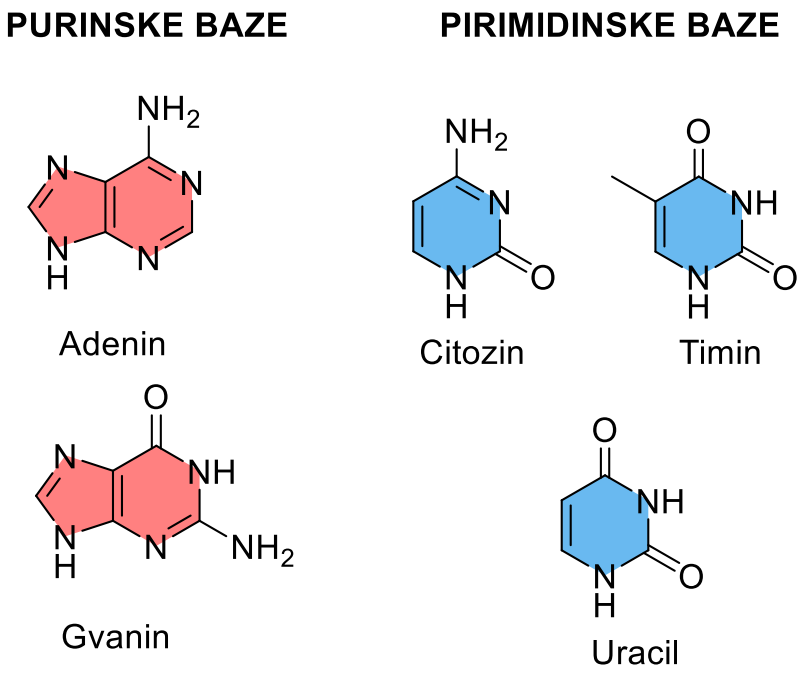
Nukleinske kiseline građene su od velikog broja nukleotidnih jedinica međusobno povezanih fosfodiesterskim vezama, zbog čega se ubrajaju u polinukleotide. Svaki nukleotid

sastoji se od dušikove baze, pentoznog šećera i jedne ili više fosfatnih skupina. Dušikove baze nazivaju se nukleobazama, a prema svojoj kemijskoj strukturi dijele se na purinske i pirimidinske baze. U sastavu DNA nalazi se deoksiriboza, dok RNA sadržava ribozu. Razlika između tih šećera proizlazi iz prisutnosti hidroksilne skupine na drugom ugljikovu atomu riboze, koja u deoksiribozi nedostaje. Povezivanjem nukleobaze s pentoznim šećerom nastaje nukleozid, dok vezanjem fosfatne skupine na nukleozid nastaje nukleotid. Nukleobaza i šećer povezani su β-N-glikozidnom vezom, koja nastaje između anomernog ugljikova atoma C1′ pentoze i odgovarajućeg dušikova atoma baze. U purinskih baza veza se ostvaruje preko atoma N9, a u pirimidinskih preko atoma N1. Nukleotidi se međusobno povezuju 3′,5′-fosfodiesterskim vezama, pri čemu fosfatna skupina povezuje hidroksilnu skupinu na trećem ugljikovu atomu jedne pentoze s hidroksilnom skupinom na petom ugljikovu atomu sljedeće pentoze. Na taj način nastaje šećerno-fosfatna okosnica nukleinske kiseline, dok su nukleobaze vezane na šećerne ostatke. Polinukleotidni lanac ima određenu usmjerenost, a njegov se slijed prema dogovoru zapisuje od 5′-kraja prema 3′-kraju. Fosfatne skupine nukleinskih kiselina pri fiziološkim uvjetima uglavnom su negativno nabijene, zbog čega nukleinske kiseline imaju svojstva polianiona. Negativni naboji omogućuju interakcije s metalnim kationima i pozitivno nabijenim skupinama proteina, što je osobito važno za stabilizaciju njihove prostorne strukture i organizaciju genetičkog materijala unutar stanice. Primarna struktura nukleinskih kiselina određena je redoslijedom nukleotida u polinukleotidnom lancu. Sekundarna i tercijarna struktura nastaju zahvaljujući međusobnim interakcijama nukleobaza, ponajprije vodikovim vezama i interakcijama slaganja aromatskih prstenova. Specifičnost sparivanja nukleobaza omogućuje komplementarnost nukleotidnih slijedova, koja predstavlja kemijsku osnovu prijenosa i očuvanja genetičke informacije. DNA je najčešće organizirana u obliku dvostruke uzvojnice sastavljene od dvaju antiparalelnih polinukleotidnih lanaca. U takvoj strukturi adenin se sparuje s timinom preko dviju vodikovih veza, dok se gvanin sparuje s citozinom preko triju vodikovih veza. RNA je uglavnom jednolančana, ali može stvarati složene sekundarne i tercijarne strukture zahvaljujući intramolekulskom sparivanju komplementarnih baza. Biološka važnost nukleinskih kiselina prvenstveno se očituje u procesima replikacije, transkripcije i translacije. Replikacija omogućuje umnažanje DNA i prijenos genetičke informacije na stanice kćeri. Transkripcijom se na temelju DNA sintetizira RNA, dok se tijekom translacije informacija sadržana u glasničkoj RNA prevodi u aminokiselinski slijed proteina. Nukleinske kiseline također sudjeluju u regulaciji ekspresije gena, održavanju stabilnosti genoma i brojnim drugim staničnim procesima. Osim što izgrađuju nukleinske kiseline, nukleotidi imaju i samostalne

metaboličke funkcije. Adenozin-trifosfat (ATP) jedan je od najvažnijih prijenosnika slobodne energije u stanici, dok drugi nukleotidi sudjeluju u biosintetskim reakcijama, staničnoj signalizaciji i građi koenzima. Zbog toga su nukleinske kiseline i njihovi sastavni dijelovi neophodni za održavanje i regulaciju životnih procesa.

2.2. Nukleobaze – kemijska građa i svojstva

Nukleobaze su heterociklički aromatski organski spojevi koji sadržavaju atome dušika unutar prstenaste strukture. Predstavljaju osnovne strukturne komponente nukleozida i nukleotida, a njihova kemijska svojstva određuju specifičnost sparivanja baza, stabilnost nukleinskih kiselina i mogućnost prijenosa genetičke informacije. Prema građi heterocikličkog sustava nukleobaze se dijele na purinske i pirimidinske baze.



Slika 7. *Strukture purinskih i pirimidinskih baza*

Purinske baze građene su od dvaju kondenziranih heterocikličkih prstenova, šesteročlanog pirimidinskog i peteročlanog imidazolskog prstena. Osnovni purinski sustav sadržava četiri dušikova atoma, a najvažniji njegovi derivati u nukleinskim kiselinama jesu adenin i gvanin. Pirimidinske baze imaju jednostavniju strukturu koja se sastoji od jednog šesteročlanog heterocikličkog prstena s dva dušikova atoma. Najvažnije pirimidinske baze jesu citozin, timin i uracil. Aromatski karakter nukleobaza proizlazi iz delokalizacije π-

elektrona unutar heterocikličkog sustava. Takva elektronska struktura omogućuje relativnu stabilnost prstenova i sudjelovanje u nekovalentnim interakcijama. Atomi dušika i kisika, kao i amino-skupine vezane na prstenove, mogu djelovati kao donori ili akceptori vodikovih veza, ovisno o njihovoj kemijskoj okolini i protonacijskom stanju. Nukleobaze su slabo bazični spojevi, a njihova protonacija ovisi o pH vrijednosti otopine. U neutralnim fiziološkim uvjetima prevladavaju oblici koji omogućuju karakteristično Watson-Crickovo sparivanje baza. Promjene protonacijskog stanja mogu utjecati na raspored vodikovih veza i stabilnost nukleinskih kiselina. Važno kemijsko svojstvo nukleobaza jest tautomerija, odnosno mogućnost postojanja različitih strukturnih oblika koji se međusobno razlikuju položajem protona i dvostrukih veza. Najznačajnije su keto-enolna i amino-imino tautomerija. Pri fiziološkim uvjetima prevladavaju amino-oblici adenina i citozina te keto-oblici gvanina, timina i uracila. Rijetki tautomerni oblici mogu promijeniti specifičnost sparivanja baza i tako pridonijeti nastanku mutacija tijekom replikacije DNA.

Purinske baze

Adenin je purinska baza kemijske formule $C_5H_5N_5$, a prema sustavnoj nomenklaturi naziva se 6-aminopurin. Njegova struktura sastoji se od purinskog heterocikličkog sustava s amino-skupinom vezanom na šesti ugljikov atom. Adenin je sastavni dio DNA i RNA, a prisutan je i u brojnim biološki važnim nukleotidima i koenzimima. U nukleinskim kiselinama adenin se povezuje s pentoznim šećerom preko dušikova atoma N9 purinskog prstena. U DNA se sparuje s timinom, dok se u RNA najčešće sparuje s uracilom. Adenin također ulazi u sastav adenozinskih nukleotida, među kojima ATP ima osobito važnu ulogu u energetskom metabolizmu stanice.

Gvanin je purinska baza kemijske formule $C_5H_5N_5O$, a prema sustavnoj nomenklaturi naziva se 2-amino-6-oksopurin. Od adenina se razlikuje prisutnošću amino-skupine na drugom ugljikovu atomu i oksoskupine na šestom ugljikovu atomu purinskog prstena. Gvanin je prisutan u DNA i RNA, gdje se specifično sparuje s citozinom. Takav par baza može ostvariti tri vodikove veze. Gvanin također sudjeluje u građi gvanozinskih nukleotida, osobito GTP-a, koji ima važnu ulogu u biosintezi proteina i prijenosu unutarstaničnih signala.

Osim adenina i gvanina, u metabolizmu purina pojavljuju se i drugi purinski derivati. Hipoksantin, odnosno 6-oksopurin, nastaje deaminacijom adenina i prisutan je u određenim metaboličkim međuproduktima. Ksantin, odnosno 2,6-dioksopurin, nastaje tijekom razgradnje purinskih spojeva i predstavlja međuprodukt u nastajanju mokraćne kiseline. Mokraćna

kiselina završni je produkt razgradnje purina u čovjeka. Njezina relativno slaba topljivost, osobito u kiselijim uvjetima, može dovesti do nastajanja kristala urata. Povišena koncentracija urata u organizmu povezana je s razvojem gihta i određenih oblika mokraćnih kamenaca.

Pirimidinske baze

Citozin je pirimidinska baza kemijske formule $C_4H_5N_3O$, a prema sustavnoj nomenklaturi naziva se 4-amino-2-oksopirimidin. U njegovoj strukturi nalazi se amino-skupina na četvrtom ugljikovu atomu i oksoskupina na drugom ugljikovu atomu pirimidinskog prstena. Citozin je prisutan u DNA i RNA, gdje se sparuje s gvaninom. U DNA može biti podvrgnut enzimskim modifikacijama, među kojima je osobito važna metilacija na petom ugljikovu atomu, pri čemu nastaje 5-metilcitozin. Takva modifikacija ima važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji ekspresije gena. Citozin može spontano deaminirati, pri čemu nastaje uracil. Ako se takva promjena dogodi u DNA i ne bude popravljena, može dovesti do promjene nukleotidnog slijeda tijekom sljedeće replikacije.

Timin je pirimidinska baza kemijske formule $C_5H_6N_2O_2$, a kemijski predstavlja 5-metiluracil, odnosno 5-metil-2,4-dioksopirimidin. Njegova struktura sadržava dvije oksoskupine na drugom i četvrtom ugljikovu atomu te metilnu skupinu na petom ugljikovu atomu pirimidinskog prstena. Timin je karakteristična nukleobaza DNA i u standardnom Watson-Crickovu sparivanju povezuje se s adeninom preko dviju vodikovih veza. Prisutnost metilne skupine razlikuje timin od uracila i omogućuje sustavima popravka DNA lakše prepoznavanje uracila nastalog spontanom deaminacijom citozina.

Uracil je pirimidinska baza kemijske formule $C_4H_4N_2O_2$, a prema sustavnoj nomenklaturi naziva se 2,4-dioksopirimidin. Od timina se razlikuje po tome što na petom ugljikovu atomu nema metilnu skupinu. Uracil je jedna od četiriju osnovnih nukleobaza RNA, u kojoj se najčešće sparuje s adeninom. U DNA se uracil u pravilu ne nalazi kao standardna baza, ali može nastati kemijskim promjenama citozina ili pogrešnom ugradnjom tijekom sinteze DNA. Takve promjene prepoznaju i uklanjaju odgovarajući enzimski sustavi popravka DNA.

2.3. Kemijska sinteza nukleobaza

Kemijska sinteza nukleobaza temelji se na reakcijama izgradnje dušikovih heterocikličkih sustava, pri čemu se odgovarajućim odabirom polaznih spojeva i reakcijskih uvjeta omogućuje dobivanje purinskih i pirimidinskih derivata. Osnovu njihove priprave čine reakcije kondenzacije, ciklizacije, nukleofilne supstitucije te naknadne funkcionalizacije heterocikličkog prstena. Posebnu važnost imaju postupci koji omogućuju selektivno uvođenje amino-, okso- i metilnih skupina, budući da njihov položaj određuje kemijska i biološka svojstva pojedinih nukleobaza. Purinske i pirimidinske baze razlikuju se po načinu izgradnje heterocikličkog sustava. Pirimidinski prsten može se relativno jednostavno sintetizirati kondenzacijom odgovarajućih troatomnih fragmenata, dok priprava purinskih baza najčešće uključuje izgradnju imidazolskog prstena na prethodno sintetiziranoj pirimidinskoj jezgri.

Kemijska sinteza pirimidinskih baza

Pirimidinske baze derivati su pirimidina, šesteročlanog aromatskog heterocikla koji sadržava dva dušikova atoma u položajima 1 i 3. Jedan od klasičnih pristupa sintezi pirimidinskog prstena temelji se na kondenzaciji spojeva koji sadržavaju odgovarajuće elektrofilne ugljikove atome s ureom, tioureom ili amidinima. Takve reakcije omogućuju nastajanje šesteročlanog prstena uz stvaranje novih veza između ugljikovih i dušikovih atoma.

Sinteza uracila može se provesti kondenzacijom uree s odgovarajućim derivatima nezasićenih karboksilnih kiselina. Jedan od klasičnih postupaka uključuje reakciju uree s jabučnom kiselinom u prisutnosti koncentrirane sumporne kiseline. U reakcijskim uvjetima dolazi do dehidracije i kondenzacije, nakon čega ciklizacijom nastaje pirimidinski sustav uracila. Uracil je 2,4-dioksopirimidin, a njegova struktura sadržava dvije karbonilne skupine na položajima C2 i C4. U vodenoj otopini i pri fiziološkim uvjetima prevladava njegov diketo, odnosno laktamski tautomerni oblik. Mogućnost keto-enolne tautomerije važna je za razumijevanje njegove reaktivnosti i stvaranja vodikovih veza.

Sinteza timina temelji se na pripravi 5-metiliranog derivata uracila. Jedan od klasičnih sintetskih pristupa uključuje kondenzaciju uree s odgovarajućim derivatima metiliranih nezasićenih karboksilnih kiselina. Primjerice, reakcijom uree s α-formilpropionskom kiselinom može se izgraditi pirimidinski prsten koji već sadržava metilnu skupinu na položaju C5. Timin se može dobiti i odgovarajućom funkcionalizacijom prethodno sintetiziranih

pirimidinskih derivata. Prisutnost metilne skupine na položaju C5 razlikuje timin od uracila te utječe na njegova fizikalno-kemijska svojstva i biološku funkciju.

Sinteza citozina može se provesti iz odgovarajućih 2,4-disupstituiranih pirimidinskih derivata. Jedan od pristupa temelji se na pretvorbi uracila u reaktivni 4-klor-2-alkoksipirimidinski derivat, nakon čega se klorov atom zamjenjuje amino-skupinom reakcijom s amonijakom. Naknadnim uklanjanjem alkilne zaštite s položaja C2 dobiva se citozin.

Takav postupak temelji se na nukleofilnoj aromatskoj supstituciji u elektronski siromašnom pirimidinskom prstenu. Atomi dušika unutar heterocikla smanjuju elektronsku gustoću pojedinih ugljikovih atoma i olakšavaju napad nukleofila na položaje koji sadržavaju odgovarajuću odlazeću skupinu. Citozin je 4-amino-2-oksopirimidin, a prisutnost amino-skupine na položaju C4 omogućuje karakterističnо sparivanje s gvaninom u nukleinskim kiselinama.

Kemijska sinteza purinskih baza

Purinske baze imaju složeniju bicikličku strukturu sastavljenu od kondenziranog pirimidinskog i imidazolskog prstena. Njihova kemijska sinteza najčešće se temelji na postupnoj izgradnji purinskog sustava iz odgovarajućih supstituiranih pirimidinskih derivata. Jedan od najvažnijih klasičnih pristupa jest Traubeova sinteza purina, koja se temelji na pripravi 4,5-diaminopirimidinskih derivata i njihovoj naknadnoj ciklizaciji.

U prvom dijelu sinteze pripravlja se odgovarajući supstituirani pirimidinski spoj koji sadržava amino-skupine na susjednim ugljikovim atomima C4 i C5. Takvi derivati mogu se dobiti nizom reakcija koje uključuju kondenzaciju, uvođenje dušikovih funkcionalnih skupina i redukciju. U sljedećem koraku 4,5-diaminopirimidinski derivat reagira s odgovarajućim donorom jednoga ugljikova atoma, primjerice mravljom kiselinom ili njezinim derivatima. Formilacijom jedne amino-skupine i naknadnom intramolekulskom ciklizacijom nastaje peteročlani imidazolski prsten, čime se dovršava izgradnja purinske jezgre. Ovisno o supstituentima prisutnima na početnom pirimidinskom prstenu, takvim se postupkom mogu dobiti različiti purinski derivati.

Sinteza adenina može se provesti iz odgovarajućih kloriranih purinskih derivata. Primjerice, 6-kloropurin može reagirati s amonijakom, pri čemu dolazi do nukleofilne

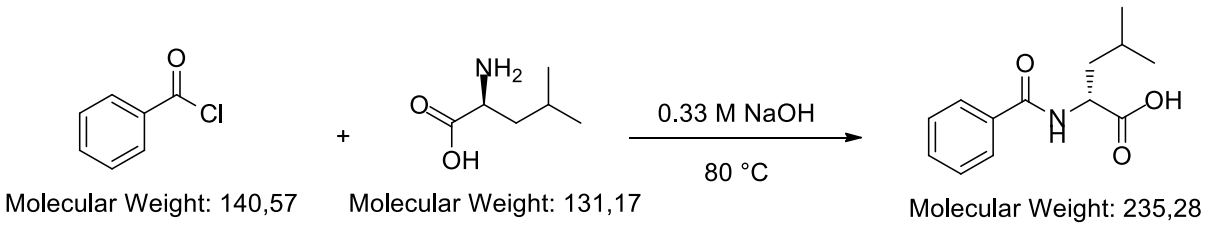
supstitucije klorova atoma amino-skupinom i nastaje adenin, odnosno 6-aminopurin. Reakcija je omogućena elektronskom strukturom purinskog prstena, u kojem prisutnost dušikovih atoma pogoduje nukleofilnoj supstituciji na određenim položajima. Takav pristup omogućuje uvođenje amino-skupine nakon što je purinski heterociklički sustav već izgrađen. Povijesno je važna i sinteza adenina iz cijanovodika, koja se temelji na reakcijama oligomerizacije i ciklizacije molekula HCN-a. Ukupni atomski sastav adenina odgovara pet molekula cijanovodika, iako se stvarni reakcijski put sastoji od više međukoraka i može dovesti do nastajanja različitih produkata. Ova reakcija posebno je zanimljiva u istraživanjima prebiotičke kemije i mogućih putova nastanka organskih spojeva važnih za razvoj života.

Sinteza gvanina također se može provesti iz odgovarajućih supstituiranih pirimidinskih derivata primjenom Traubeova pristupa. Jedan od mogućih putova uključuje pripravu 2,4,5-triamino-6-hidroksipirimidina, koji se zatim formilira i ciklizira u purinski sustav. Tijekom ciklizacije nastaje imidazolski prsten, dok amino-skupina na položaju C2 i oksoskupina na položaju C6 ostaju prisutne u konačnom produktu. Dobiveni spoj jest gvanin, odnosno 2-amino-6-oksopurin. Kemijska sinteza gvanina zahtijeva kontrolu reakcijskih uvjeta zbog mogućnosti nastanka različitih tautomernih oblika i sporednih produkata. Njegova relativno slaba topljivost u vodi i mnogim organskim otapalima također može otežavati izolaciju i pročišćavanje.

3. VJEŽBE

3.1. Vježba 1 – SINTEZA AMIDA

(R)-2-benzamido-4-metilpentanska kiselina



Molecular Weight: 140,57 Molecular Weight: 131,17 Molecular Weight: 235,28

Kemikalije:

- L-leucin (1 ekv) – 1.00 g
- benzoil klorid (1.13 ekv, ρ = 1.211 g/mL) – 1 mL
- 75 mL 0.33 M NaOH
- 2 M HCl
- aparatura za refluks, CaCl cijev, boca sisaljka, Büchnerov lijevak

Postupak:

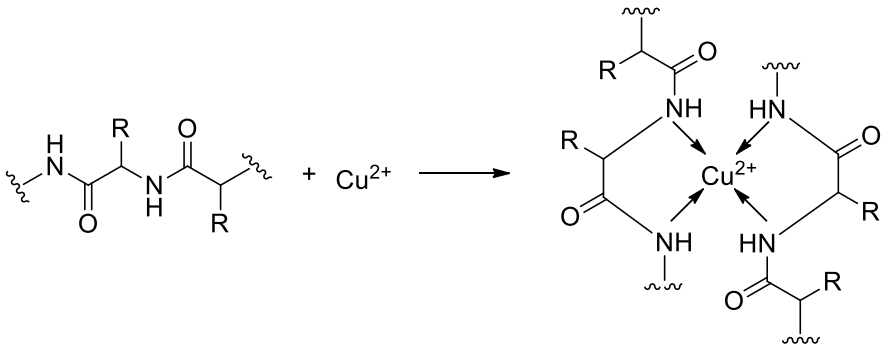
U okruglu tikvicu od 100 mL (široko grlo) izvagati 1.00 g L-leucina, te dodati 75 mL 0.33 M NaOH. Zagrijati reakcijsku smjesu 10 min na 50 °C. Polako dokapati benzoil klorid (1 mL) kroz period od 5 minuta, te nakon toga grijati reakcijsku smjesu 2 sata na temperaturi od 80 °C. Po završetku reakcije, reakcijsku smjesu ohladiti na 0 °C, i zakiseliti do pH = 2 sa otopinom 2 M HCl. Nastali talog profiltrirati preko Büchnerovog lijevka i malo isprati destiliranom vodom.

3.2. Vježba 2 - KVALITATIVNA ANALIZA PROTEINA I AMINOKISELINA

Taložne reakcije dokazivanja proteina temelje se na koloidnim svojstvima otopine proteina. U vodi se proteinske molekule otapaju stvarajući koloide. Pod utjecajem različitih čimbenika dolazi do razaranja nativne konformacije proteina, što dovodi do gubitka njihove biološke funkcije te do procesa taloženja proteina. Taj proces nazivamo denaturacija. Potpuno denaturirani protein poprima različite nasumične konformacije koje su biološki inaktivne. Do denaturacije proteina najčešće dolazi povišenjem temperature, promjenom pH (pri ekstremno niskim i visokim vrijednostima pH), dodatkom organskih otapala, pri povećanoj koncentraciji soli, dodatkom teških metala (Hg^{2+}, Pb^{2+}, Ag^{+} , Cd^{2+}) te dodatkom različitih oksidansa i reducensa.

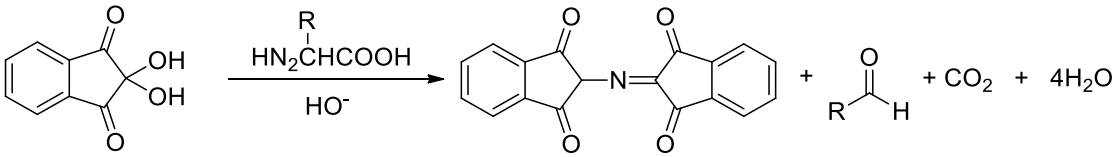
Obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina temelje se na dokazivanju peptidne (amidne) veze ili na dokazu pojedinih aminokiselina, odnosno funkcionalnih skupina koje sadržava pojedina aminokiselina. Najpoznatije su sljedeće obojene reakcije na proteine:

- **biuret reakcija** - dokaz peptidne veze, otopina bakra(II) mijenja boju iz plave u ljubičastu jer dolazi do kompleksiranja bakra(II) na peptidnu vezu. Koristi se u medicini i kliničkim laboratorijima za određivanje ukupnih proteina u biološkim uzorcima (poput krvnog seruma, plazme ili cerebrospinalne tekućine)

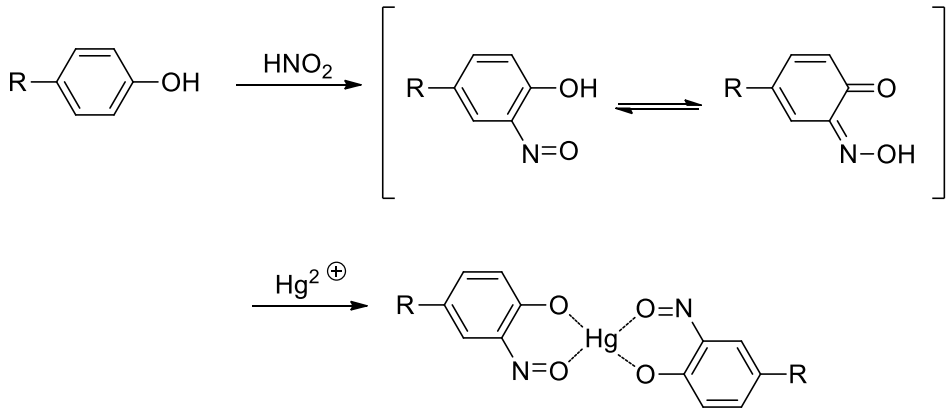


- **reakcija s olovnim(II) acetatom** - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline sa sumporom (cistein, metionin), Zagrijavanjem proteina ili aminokiselina s jakim bazom (npr., NaOH) oslobađa se organski vezan sumpor iz skupina -SH ili -S-S-, čime nastaje natrijev sulfid (Na_2S). Dodatkom olovnog acetata, ioni olova (Pb^{2+}) reagiraju sa sulfidnim ionima i stvaraju talog olovnog sulfida (PbS).

- **ksantoproteinska reakcija** - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aromatske aminokiseline (npr. tirozin), usred zagrijavanaj dolazi do nitriranja aromatskog prstena čime nastaje žuta otopina ili talog.
- **ninhidrinska reakcija** - sve aminokiseline i proteini pokazuju pozitivnu ninhidrinsku reakciju, ona dokazuje prisutnost amino skupine



- **Hopkin-Colova reakcija** - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s indolnim prstenom (npr. triptofan)
- **reakcija s Millonovim reagensom** - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiseline s fenolnim prstenom (npr. tirozin), Test se temelji na reakciji između Millonovog reagensa (otopine živinih nitrata, Hg^{2+} i Hg^{+}, u koncentriranoj dušičnoj kiselini) i fenolne skupine (-OH) koja se nalazi na bočnom lancu tirozina. Dušična kiselina iz reagensa najprije nitrira fenolni prsten tirozina. Tako nitrirani tirozin reagira s ionima žive, stvarajući karakteristični živin kompleks crvene boje.



- **reakcija prema Sakaguchiju** - dokaz proteina koji u svojoj strukturi sadržavaju aminokiselinu s gvanidino skupinom (arginin). U uzorak se dodaju α-naftol i natrijev hipobromit (NaBrO) ili natrijev hipoklorit (NaOCl) u izrazito bazičnim uvjetima (uz dodatak natrijeva hidroksida, NaOH). α-naftol u bazičnom mediju reagira s gvanidinskom skupinom arginina, a hipobromit (ili hipoklorit) služi kao jako oksidacijsko sredstvo. Ako je arginin prisutan u uzorku, razvija se karakteristična intenzivno crvena boja.

Pribor:

stalak s epruvetama, kapaljke, plamenik, vodena kupelj

Kemikalije :

- Koncentrirana HCl
- Etanol
- NaOH (c = 2 mol/ L)
- otopina $CuSO_4$ (c = 0,05 mol/ L)
- konc. HNO_3
- otopine olovo(II) acetata (w = 10%)
- UZORAK: otopina bjelanjka

Priprema koloidne otopine albumina: bjelanjak se u čaši odvoji od žutanjka, te se doda dvostruki volumen demineralizirane vode. Nakon miješanja staklenim štapićem, otopina se profiltrira preko Buchnerovog lijevka kako bi se dobila koloidna otopina bjelanjka (albumina) koja mora biti bistra. Umjesto bjelanjka (albumin) može se koristiti i želatina (kolagen) ili mlijeko (kazein 80%, whey (proteini sirutke) 20%).

Tablica 2. *Udio pojedinih aminokiselina u albuminu*

ESENCIJALNE AMINOKISELINE	Udio (%)	NEESENCIJALNE AMINOKISELINE	Udio (%)
Leucin (BCAA)	7,6%	**Glutaminsku kis. + Glutamin**	11,9%
Valin (BCAA)	6,5%	**Aspartansku kis. + Asparagin**	9,5%
Lizin	6,3%	**Serin**	6,2%
Fenilalanin	5,4%	**Alanin**	5,4%
Izoleucin (BCAA)	4,7%	**Arginin**	5,1%
Treonin	4,0%	**Prolin**	3,3%
Metionin	3,2%	**Glicin**	3,2%
Histidin	2,1%	**Cistein**	2,2%
Triptofan	1,4%	**Tirozin**	2,0%
UKUPNO ESENCIJALNE	**41,5%**	**UKUPNO NEESENCIJALNE**	**58,5%**

Postupak:

U šest epruveta pomoću kapaljke uliti oko 2 mL prethodno pripremljene koloidne otopine albumina te tretirati na slijedeći način:

1. epruveta – dodati nekoliko kapi koncentrirane HCl, zabilježiti opažanja

2. epruveta – dodati nekoliko kapi otopine NaOH, zabilježiti opažanja

3. epruveta - dodati nekoliko kapi etanola i protresti, zabilježiti opažanja

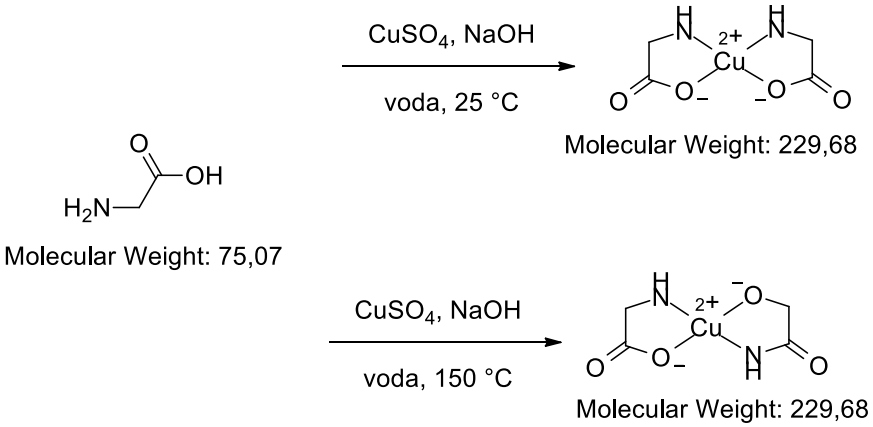
4. epruveta - Otopinu bjelanjka zalužiti s nekoliko kapi NaOH (c = 2 mol/ L) i dodati nekoliko kapi razrijeđene $CuSO_4$ (c = 0,05 mol/ L), otopina se promiješa i ostavi stajati nekoliko minuta, zabilježiti promjenu boje – **biuret reakcija**

5. epruveta – u otopinu bjelanjka dodati nekoliko kapi konc. HNO_3 i smjesu zagrijavati 5-10 minuta na vodenoj kupelji. Kad se otopina ohladi dodati NaOH do lužnate reakcije, zabilježiti promjenu boje – **ksantoproteinska reakcija**

6. epruveta - u otopinu bjelanjka dodati 1-2 mL NaOH (c = 2 mol/ L) i smjesu zagrijavati na vodenoj kupelji 10 minuta, zatim u otopinu dodati nekoliko kapi otopine olovo(II) acetata (w = 10%), zabilježiti opažanja. – **reakcija s olovnim(II) acetatom**

3.3. Vježba 3 – METALNI KOMPLEKSI AMINOKISELINA

Sinteza *cis* i *trans* bakrova(II)glicinata



Kemikalije:

- Glicin (2 ekv) – 1.0 g
- Bakrov (II) sulfat (1 ekv, M = 159.6 g/mol) – 1.06 g
- NaOH (2 ekv, M= 40.0 g/mol) – 533 mg
- aparatura za refluks, okrugla tikvica 100 mL, boca sisaljka, Büchnerov lijevak

Postupak A:

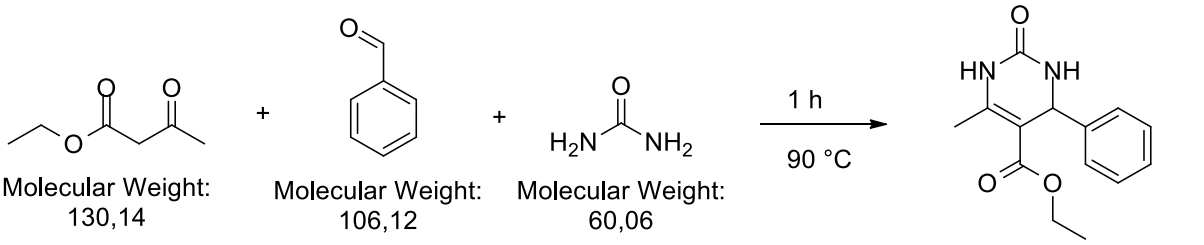
Vodenoj otopini (10 mL) bakrova sulfata (1.06 g) i glicina (1.0 g) dodan je natrijev hidroksid (533 mg), te je reakcijska smjesa miješana 60 minuta na sobnoj temperaturi. Otopina je zatim razrijeđena hladnim etanolom (35 mL), a produkt je izdvojen filtracijom preko Büchnerovog lijevka.

Postupak B:

Vodenoj otopini (10 mL) bakrova sulfata (1.06 g) i glicina (1.0 g) dodan je natrijev hidroksid (533 mg), te je reakcijska smjesa miješana 60 minuta na 150 °C. Otopina je zatim ohlađena na sobnu temperaturu, te razrijeđena hladnim etanolom (35 mL), a produkt je izdvojen filtracijom preko Büchnerovog lijevka.

3.4. Vježba 4 – DERIVATI DUŠIĆNIH BAZA

Sinteza dihidropirimidinona (Biginellieva reakcija)

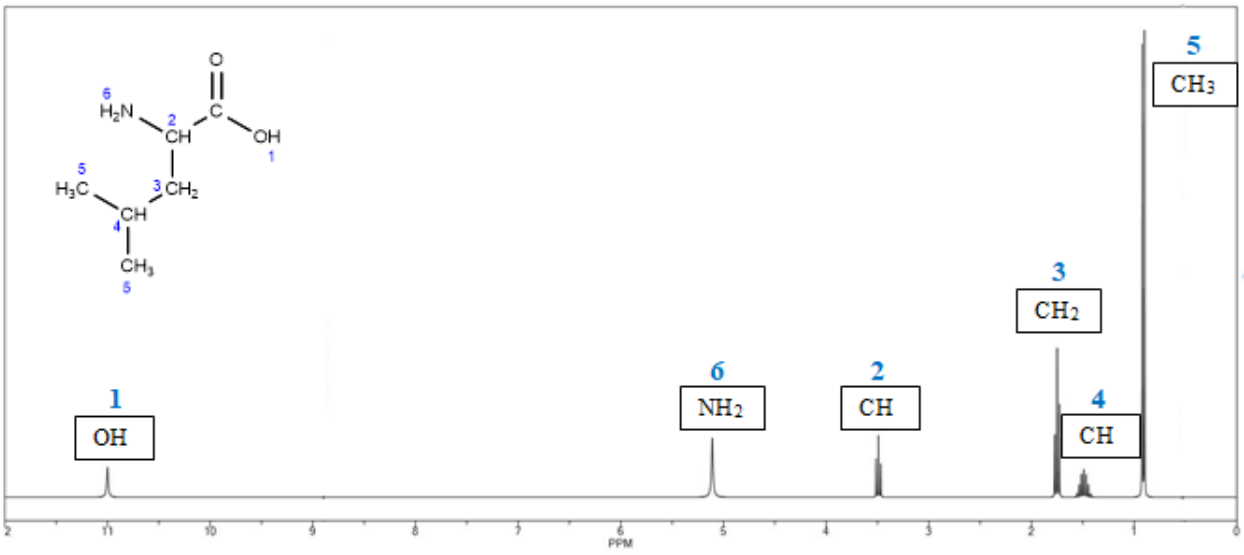


Kemikalije:

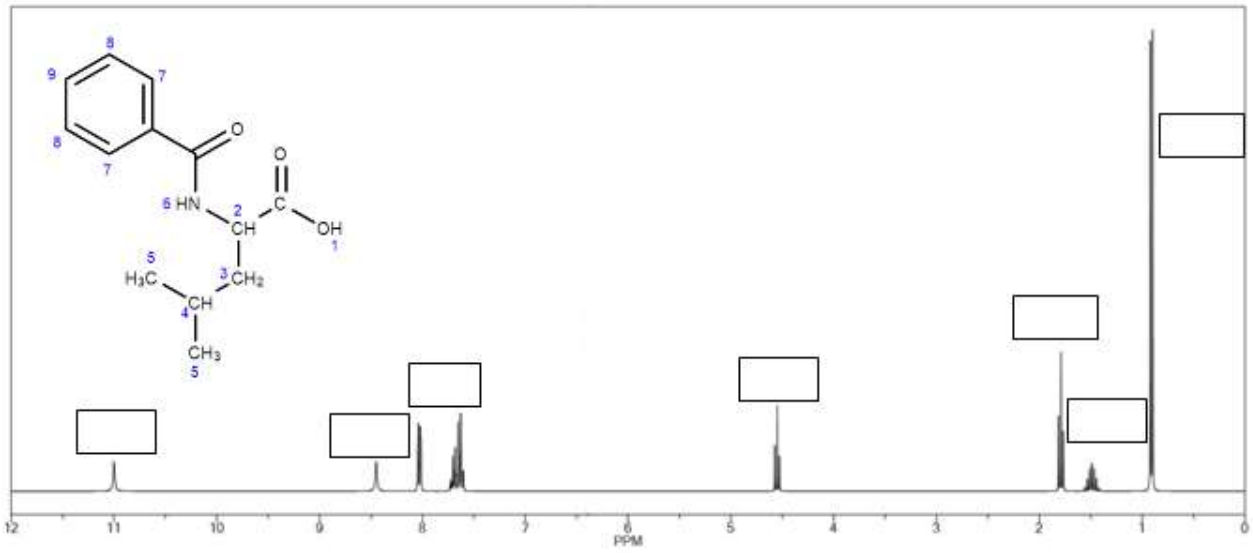
- etil-acetoacetoat (1 ekv, ρ = 1.025 μg/μL) – 650 mg
- benzaldehid (1.11 ekv, ρ = 1.05 μg/μL) – 600 mg
- urea (1.15 ekv.) – 350 mg
- conc. HCl – 2-3 kapi, EtOH
- aparatura za refluks, boca sisaljka, Büchnerov lijevak

Postupak:

U okrugloj tikvici (25 mL ili 50 mL) pomiješaju se benzaldehid, etil-acetoacetoat i urea. Reakcijska smjesa miješa se na sobnog temperaturi 5 minuta, nakon čega se u smjesu doda 2-3 kapi koncentrirane HCl. Reakcijska smjesa se zatim zagrijava u vodenoj kupelji 1 sat na temperaturi od 90 °C pri čemu dolazi do taloženja produkta. Nakon 1 sat, u reakcijsku smjesu ulije se 15 mL hladnog etanola, te se nastali talog profiltrira vakumskom filtracijom preko Büchnerovog lijevka i ispere sa hladnim etanolom.



Slika 8. ^{1}H NMR spektar L-leucina



Slika 9. ^{1}H NMR spektar (R)-2-benzamido-4-metilpentanske kiseline

Referat:

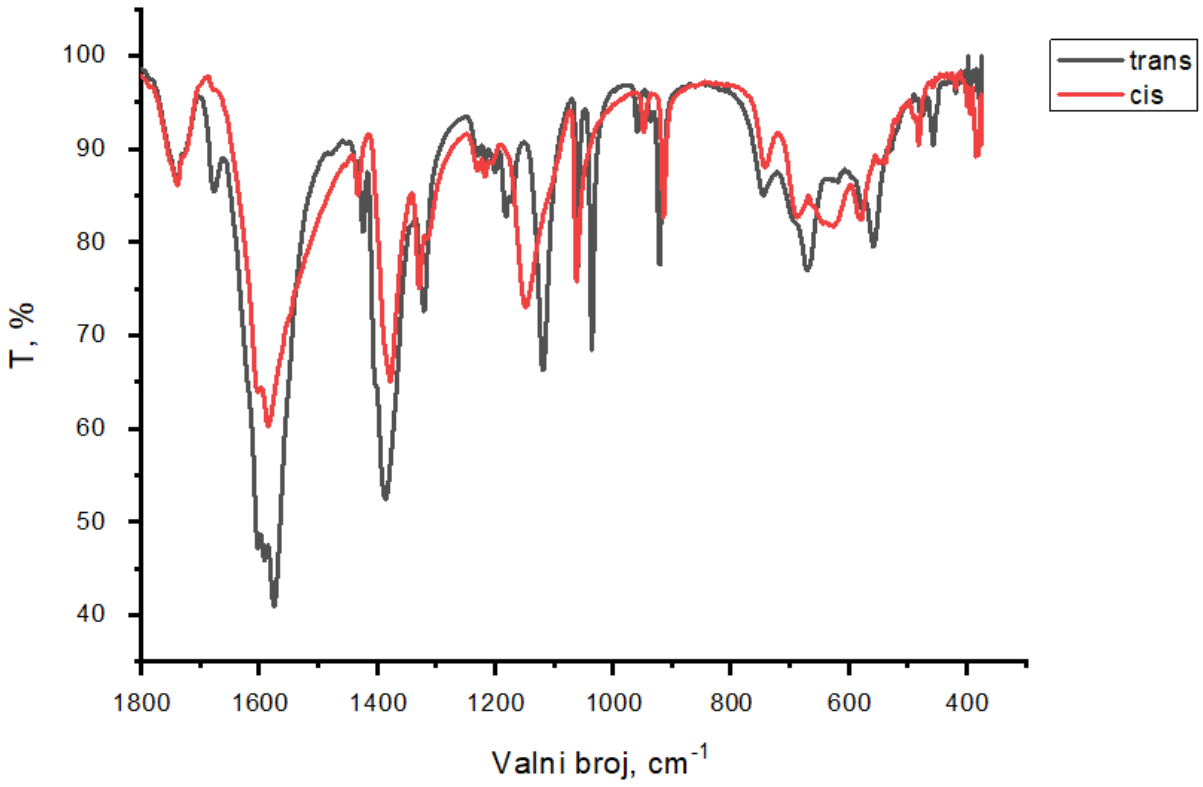
1. Napišite jednadžbu kemijske reakcije i izračunajte iskorištenje reakcije.
2. Koje reakcijske uvjete bi mogli koristit za sintezu produkta ako bi reakciju provodili sa benzojevom kiselinom umjesto s benzoil kloridom? Kod navedenih reakcijskih uvjeta je li bolje koristiti L-Leucin ili Boc-L-Leucin? Objasni.
3. Komentirajte kako iz ^{1}H NMR spektara možemo zaključiti da je sinteza produkta uspješno provedena?

Referat – Vježba 2 : KVALITATIVNA ANALIZA PROTEINA I AMINOKISELINA

Referat:

1. Zabilježite opažanja za svaku epruvetu te prokomentirajte
2. Što je kvaterna struktura proteina, a što tercijarna?
3. Što je denaturacija proteina?
4. Na čemu se temelje obojene reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina?
5. Koji je princip biuret reakcije i što se njome dokazuje?
6. Koji je princip ksantoproteinske reakcije i što se njome dokazuje?
7. Koji je princip reakcije s olovnim(II) acetatom i što se njome dokazuje?

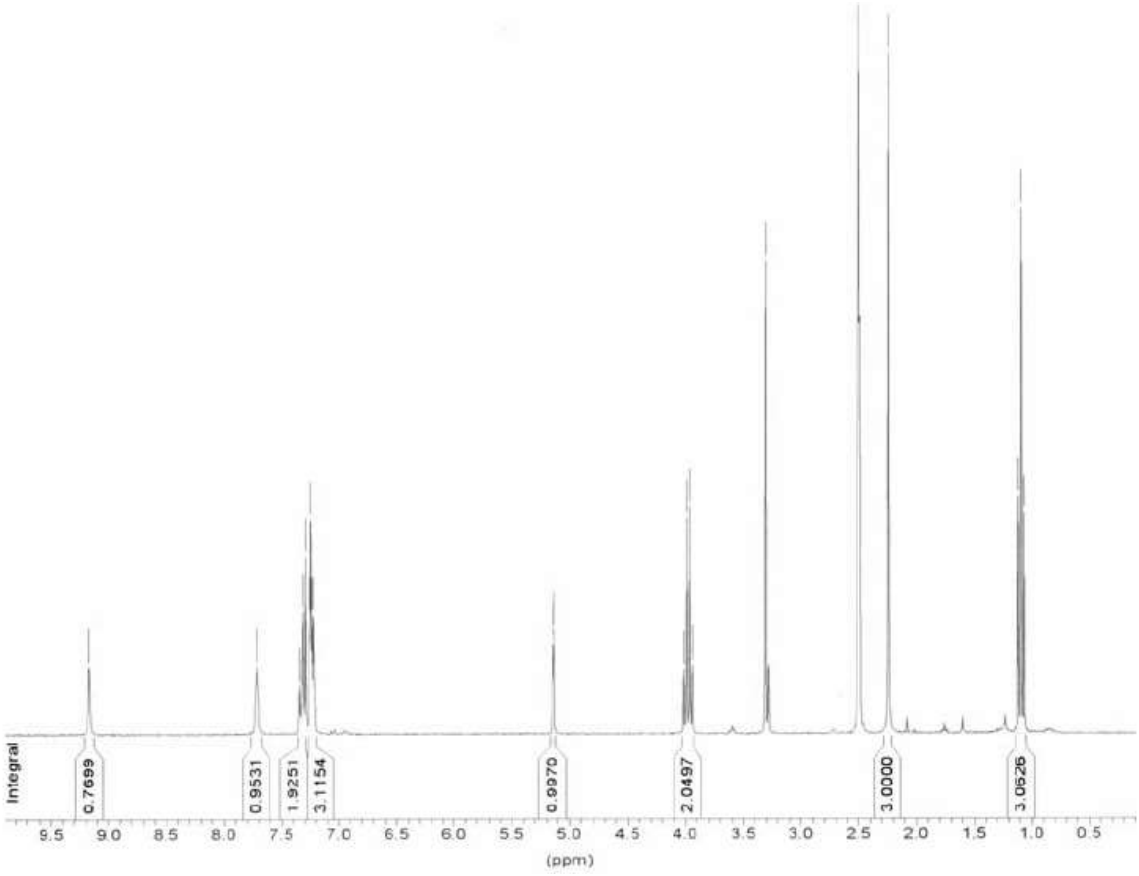
Referat – Vježba 3 : SINTEZA *cis* I *trans* BAKROVA(II)GLICINATA



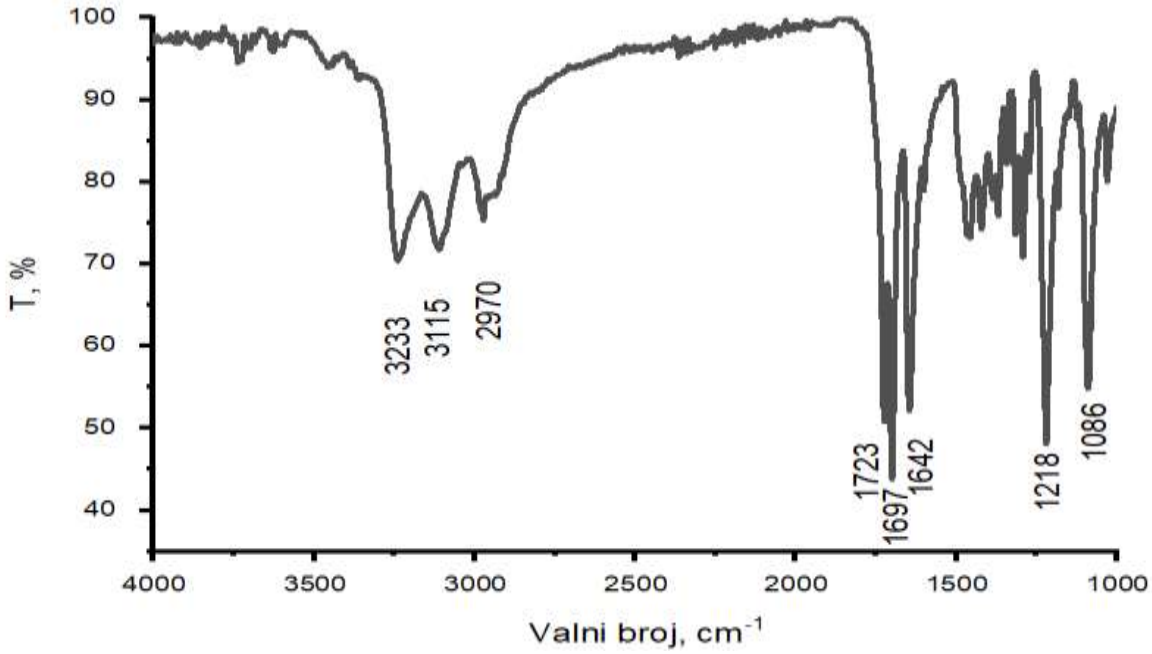
Slika 10. IR spektar *cis* (crveno) i *trans* (crno) bakrova(II)glicinata

Referat:

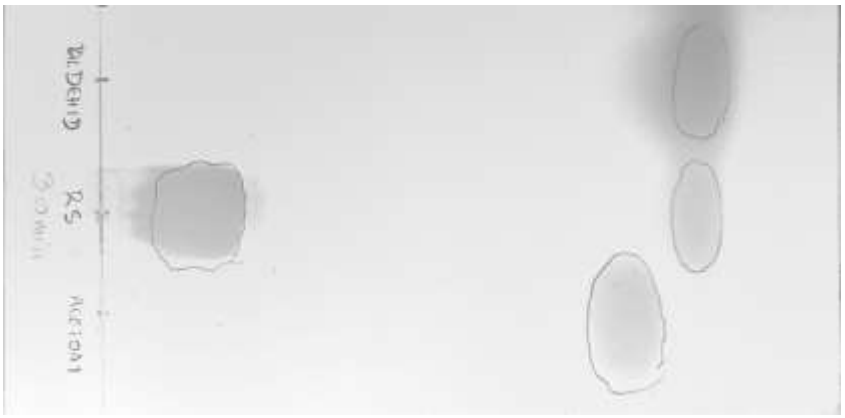
1. Napišite jednadžbu kemijske reakcije i izračunajte iskorištenje reakcije.
2. Kojim spektroskopskim metodama bi mogli odredili strukturu dobivenih metalnih kompleksa?
3. Koji izomer bakrova(II)glicinata je kinetički dobiven izomer, a koji termički dobiven izomer?
4. Objasnite razliku u signalima u IR spektru *cis* i *trans* produkta? Kod kojeg izomera je u IR spektru prisutno više signala u regiji 200-1200 cm^{-1}? Objasni.



Slika 11. ^{1}H NMR dihidropirimidinona



Slika 12. IR spektrar dihidropirimidinona



Slika 13. TLC reakcijske smjese nakon 30 min u sustavu heksan : etil acetat (1 : 1)

Referat:

1. Napišite jednadžbu kemijske reakcije i izračunajte iskorištenje reakcije.
2. U ^{1}H NMR spektru koji signali pripadaju NH protonima, a koji signali pripadaju protonima -OCH_2CH_3?
3. U IR spektru koji signali odgovaraju amidnim N–H i C=O istezanjima, a koji signali odgovaraju esterskim C=O istezanjima?
4. Izračunajte R_f vrijednost benzaldehida, etil-acetoacetoata i dobivnog produkta.

   Obrazložite dobivene R_f vrijednosti.

4. LITERATURA

1. Karlson, P. (1993). Biokemija: za studente kemije i medicine. 8. izdanje. Zagreb: Školska knjiga.

2. Nelson, D. L., Cox, M. M. i Hoskins, A. A. (2021). Lehninger Principles of Biochemistry. 8. izdanje. Macmillan Learning.

3. Clayden, J., Greeves, N. i Warren, S. (2012). Organic Chemistry. 2. izdanje. Oxford: Oxford University Press.

4. Housecroft, C. E. i Sharpe, A. G. (2018). Inorganic Chemistry. 5. izdanje. Harlow: Pearson.

5. Shimazaki, Y., Takani, M. i Yamauchi, O. (2009). Metal complexes of amino acids and amino acid side chain groups. Structures and properties. Dalton Transactions, 7854–7869. https://doi.org/10.1039/B905871K

6. Deck, K. E. V. i Brittain, W. D. G. (2024). Synthesis of metal-binding amino acids. Organic & Biomolecular Chemistry, 22, 9283–9318. https://doi.org/10.1039/D4OB01326C

7. Recent advances in the synthesis, reaction, and bio-evaluation potential of purines as precursor pharmacophores in chemical reactions: a review. (2025). RSC Advances, 15, 3607–3645. https://doi.org/10.1039/D4RA08271K