

# Infracrvena spektroskopija adenina

---

Kalebić, Dea

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:517717>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Dea Kalebić

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Infracrvena spektroskopija adenina**

## **Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kenđel

Zagreb, 2022. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK .....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Infracrvena spektroskopija.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Osnove infracrvene spektroskopije.....	2
2.1.2. IR spektrometar .....	5
2.1.3. FT-IR spektroskopija .....	6
2.1.4. Priprava uzorka.....	7
2.1.5. Analiza IR spektra.....	8
<b>2.2. Adenin.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Infracrveni spektar adenina .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4. Primjena infracrvene spektroskopije adenina.....</b>	<b>15</b>
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>XVIII</b>



## § Sažetak

Za identifikaciju spojeva i njihovu strukturnu analizu koriste se različite analitičke metode. Jedna od metoda je i infracrvena spektroskopija (engl. *infrared spectroscopy*, IR) koja promatra interakciju tvari i infracrvenog zračenja i najčešće se koristi za detekciju funkcijskih skupina u molekulima te tako daje uvid u strukturu molekula analita.

Adenin je jedna od dušičnih baza koja je sastavni dio molekula u organizmu kao što je adenzin-trifosfat, nukleinske kiseline te mnogi drugi spojevi od biološke važnosti.

U ovom radu prikazana je teorijska osnova metode infracrvene spektroskopije, opisani su instrumenti koji se koriste u infracrvenoj spektroskopiji te način kako se pripremaju uzorci za mjerenje. Detaljnije je opisana infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR) te način na koji se interpretiraju dobiveni infracrveni spektri.

Prikazan je i asigniran infracrveni spektar dušične baze adenina. U posljednjem dijelu rada opisano je kako se infracrvena spektroskopija može koristiti kao analitička metoda u karakterizaciji kompleksa adenina i bakra koji je predstavljen kao kompleks s različitim biokemijskim ulogama, među kojima se izdvaja antikancerogeno djelovanje.

## § 1. UVOD

Infracrvena spektroskopija je spektroskopska metoda pomoću koje možemo odrediti molekulsku strukturu nekog spoja, točnije, koje funkcijske skupine spoj sadrži. Apsorpcijom infracrvenog zračenja potiču se prijelazi između vibracijskih i rotacijskih stanja molekule, pri čemu molekula apsorbira IR zračenje samo ako se tijekom vibracije mijenja električni dipolni moment molekule. Dobiveni spektar se dijeli na dva dijela; područje otiska prsta koje je karakteristično za svaku molekulu, i područje funkcijskih skupina koje je vrlo važno jer prema položaju i intenzitetu vrpca u tom dijelu spektra možemo odrediti koje funkcijske skupine sadrži promatrana molekula i tako otkriti njezinu strukturu. IR spektroskopija se pokazala kao moćni analitički alat u proučavanju bioloških molekula uključujući ugljikohidrate, lipide, proteine i nukleinske kiseline.

Adenin je purinska baza koja gradi organske i biološke molekule vrlo bitne za procese kao što su stanični metabolizam i prijenos genetičke informacije. Ima karakterističnu heterocikličku aromatsku strukturu purinskih baza koja se od gvanina razlikuje po položaju amino skupine te nedostatku keto skupinu.

U radu je detaljno analiziran infracrveni spektar adenina te je opisan kompleks adenina s bakrom i način vezanja nastalog kompleksa na nukleinske kiseline te potencijalna primjena u razvoju antitumorskih lijekova.



## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Infracrvena spektroskopija

#### 2.1.1. Osnove infracrvene spektroskopije

Instrumentna metoda koja se temelji na interakciji infracrvenog zračenja i tvari naziva se infracrvena (IR) spektroskopija. Jedna je od važnijih analitičkih metoda koja ima primjenu u identifikaciji spojeva i strukturnoj analizi, odnosno koristi se za identifikaciju odgovarajućih funkcijskih skupina prisutnih u molekuli.<sup>1</sup>

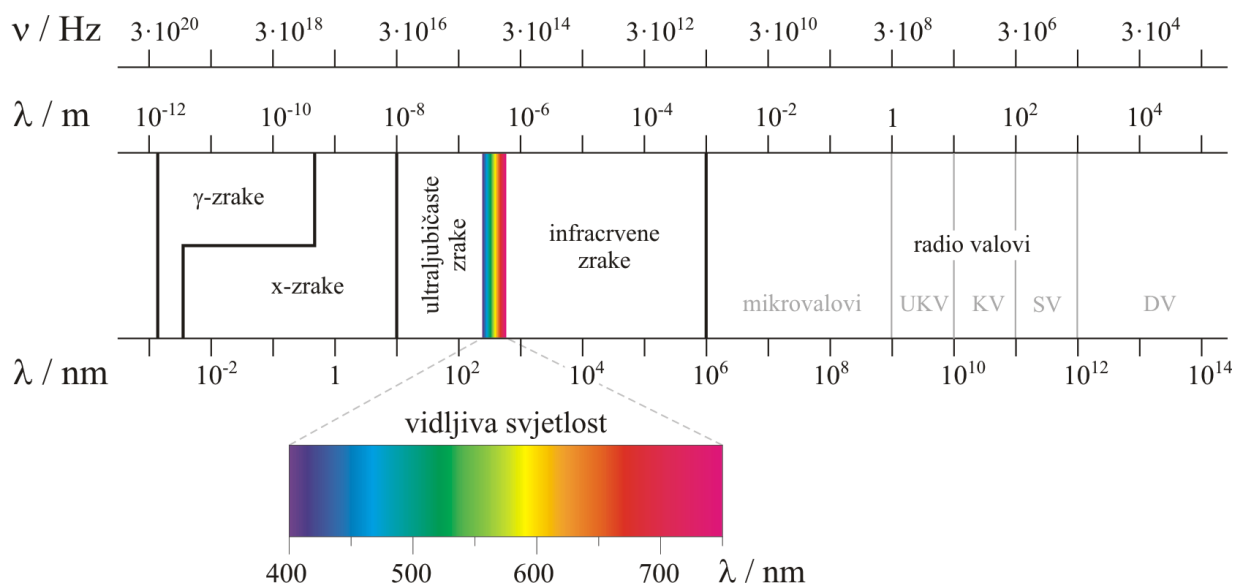
Elektromagnetsko zračenje jest pojava širenja valova elektromagnetskog polja u vakuumu te ima svojstva i valova i čestica koje putuju brzinom svjetlosti. Područja  $\gamma$ -zračenja, X-zračenja, ultraljubičastog, vidljivog, infracrvenog, mikrovalnog i radiovalnog zračenja čine elektromagnetski spektar; skup svih mogućih frekvencija (ili valnih duljina) elektromagnetskog zračenja (slika 1). Dio elektromagnetskog spektra od 1  $\mu\text{m}$  do 1 mm obuhvaća područje infracrvenog zračenja. Prema klasičnoj teoriji zračenje je val, a umnožak valne duljine ( $\lambda$ ) i frekvencije ( $\nu$ ) jednak je brzini svjetlosti ( $c$ ) što ukazuje na obrnutu proporcionalnost navedenih fizikalnih veličina:

$$c = \lambda \times \nu \quad (1)$$

Kvantna teorija opisuje zračenje kao struju čestica (fotona) točno određene energije, a odnos energije ( $E$ ) i frekvencije dan je Planckovom konstantom ( $h = 6,626 \times 10^{-34}$  Js):

$$E = h \times \nu \quad (2)$$

Prema kvantnoj teoriji postoje samo određena dopuštena energijska stanja molekule i ona su kvantizirana. Apsorpcija zračenja rezultira prijelazom iz niže u više energijsko stanje molekule, dok je suprotan proces emisija zračenja, odnosno otpuštanje energije. Obzirom da molekule mogu stvarati interakcije sa zračenjem, foton se emitira ili apsorbira, a uređaj koji mjeri promjenu energiju naziva se spektrometar.

Slika 1. Područja elektromagnetskog spektra<sup>2</sup>

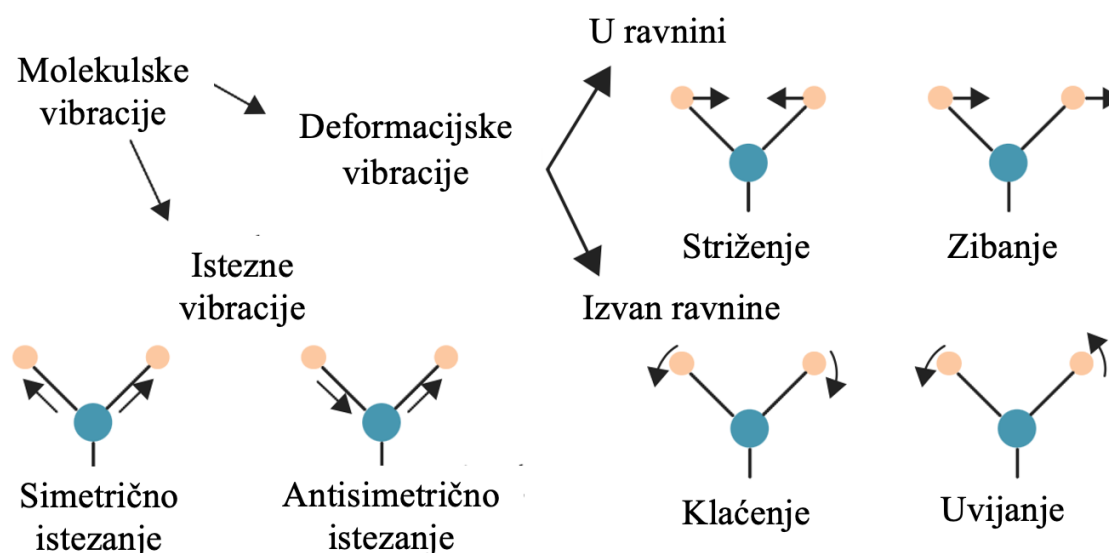
UV/Vis spektroskopija proučava elektronske prijelaze, dok IR spektroskopija promatra prijelaze između vibracijskih stanja.

Molekulske vibracije mogu se opisati pomoću Hookevog zakona koji vezu promatra kao harmonički oscilator, gdje je između dvije mase smještena elastična opruga koja titra, pri čemu je gibanje obje mase sinusno. Izborno pravilo za vibracijske prijelaze harmoničkog oscilatora je da razlika vibracijskog kvantnog broja mora iznositi  $\Delta v = \pm 1$ , a njegov model podrazumijeva djelovanje privlačnih sila između atoma koje su razmjernе odstupanju od stanja mirovanja. Model anharmoničkog oscilatora opisuje kako pri dovoljno velikom razmaku dolazi do pucanja veze te su u tom slučaju izborna pravila za vibracijske prijelaze manje ograničavajuća:  $\Delta v = \pm 1, 2, 3, \dots$ . Rotacijsko i vibracijsko gibanje kod molekula odvija se u isto vrijeme, a izborna pravila za vibracijske prijelaze rotirajućeg oscilatora su  $\Delta v = \pm 0, 1, 2, 3, \dots$ , dok je za rotacijske prijelaze razlika rotacijskog kvantnog broja  $\Delta J = \pm 0, 1$ . Dakle, ako tijekom vibracije dolazi do promjene dipolnog momenta, molekula će apsorbirati infracrveno zračenje te će ta vibracija biti aktivna u IR spektru.

Položaj jednog atoma u sustavu moguće je opisati s tri Kartezijeve koordinate, dok je za opis gibanja molekule koju čini N broj atoma potrebno  $3N$  prostornih koordinata, odnosno  $3N$  stupnjeva slobode. Razlikujemo tri vrste gibanja molekule: translacija, rotacija i vibracija. Za translaciju su potrebna tri stupnja slobode, za rotaciju dva stupnja, dok je za vibracijska gibanja potrebno  $3N - 6$  stupnjeva slobode za nelinearne, odnosno  $3N - 5$  stupnjeva slobode za linearne

molekule. Primjerice, ako promatramo molekulu vode,  $\text{H}_2\text{O}$ , ona ima tri načina vibriranja (N je 3), međutim kod linearnih molekula kao što su cijanovodična kiselina (HCN) i ugljikov dioksid ( $\text{CO}_2$ ) postoje četiri načina vibriranja. Nadalje, višeatomne molekule, kao što je primjerice molekula benzena, molekulske formule  $\text{C}_6\text{H}_6$ , posjeduju velik broj načina vibriranja, u ovom slučaju 30, a opisujemo ih kao deformacija kutova, disanje prstena, istežanje veza C–C, C–H itd.<sup>3</sup>

Vibracije se dijele na istežne (engl. *stretching*,  $\nu$ ) vibracije kod kojih dolazi do promjene duljine veze te vibracije svijanjanja ili deformacije (engl. *bending*,  $\delta$ ) gdje se mijenja kut između veza. Istežne vibracije mogu biti simetrične i antisimetrične. Kod složenijih skupina vibracije svijanjanja dijele se na deformacije u ravnini (engl. *in-plane bending*, ip) te deformacije izvan ravnine (engl. *out-of-plane bending*, oop). U slučaju troatomnih skupina, vibracije u ravnini su striženje (engl. *scissoring*, sc) i zibanje (engl. *rocking*, rc), dok se deformacije van ravnine dijele na klaćenje (engl. *wagging*, wg) i uvijanje (engl. *twisting*, tw). Navedene deformacijske vibracije redom opisuju gibanje atoma koji zatvaraju kut u suprotnom smjeru u ravnini, odnosno istom smjeru u ravnini te u istom smjeru izvan ravnine, tj. u suprotnom smjeru izvan ravnine. Podjela molekulskih vibracija prikazana je na slici 2.



Slika 2. Molekulske vibracije<sup>4</sup>

Energija vibracija ovisi o dvjema varijablama, a to su konstanta sile ( $k$ ) i reducirana masa ( $\mu$ ) čiji je odnos prikazan jednadžbom (3):

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3)$$

Apsorpcijom, odnosno međudjelovanjem fotona i čestica tvari zaslužne za apsorpciju zračenja, dolazi do prigušivanja intenziteta upadnog zračenja ( $P_o$ ) što rezultira smanjenjem propuštenog zračenja ( $P$ ). Odnos između transmitancije ( $T$ ), apsorbancije ( $A$ ) i snage snopa zračenja opisana je logaritamskom funkcijom:

$$A = \log\left(\frac{P_o}{P}\right) = \log\left(\frac{1}{T}\right) \quad (4)$$

Iz jednadžbe (4) vidljivo je da se porastom vrijednosti transmitancije smanjuje se vrijednost apsorbancije, dok se porastom upadnog intenziteta zračenja vrijednost apsorbancije povećava.

### 2.1.2. IR spektrometar

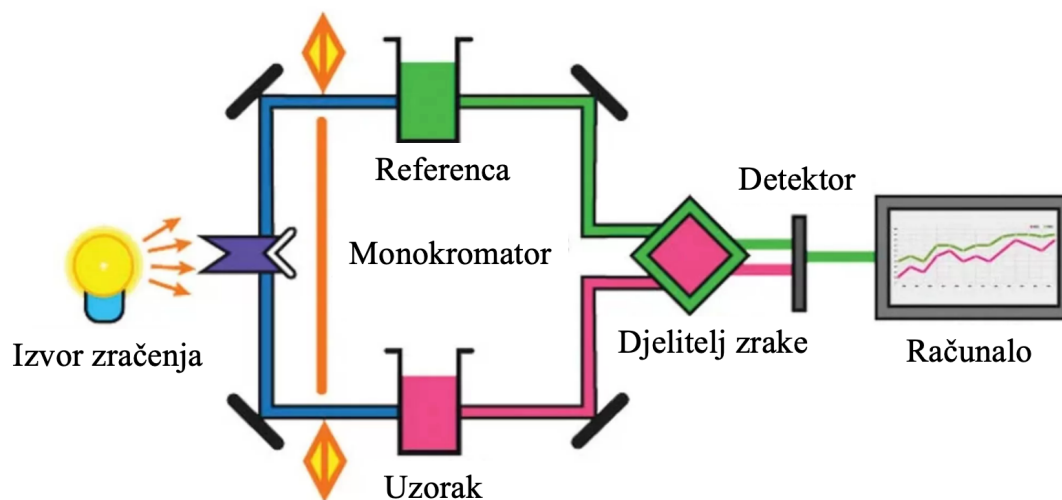
Spektrometar služi za mjerenje propusnosti uzorka za elektromagnetsko zračenje u ovisnosti o valnom broju (ili valnoj duljini). Glavni dijelovi IR spektrometra su: izvor zračenja, spektralni uređaj, komora za uzorak, optički sustav i detektor. Prema izvedbi, IR spektrometri se dijele na nedisperzijske, disperzijske i FT (engl. Fourier transform) spektrometre, a razlikuju se prema spektralnom uređaju.

Kao izvori zračenja u IR spektrometrima koriste se termički izvori, koji zagrijani na određenu temperaturu emitiraju intenzivno zračenje u infracrvenom području. Najčešće korišteni izvori za srednje infracrveno područje su Nernstov štapić i globar, dok zračenje u bliskom infracrvenom području emitira volfram-halogen žarulja, a izvor za daleko infracrveno područje je visokotlačna živina žarulja.

Spektralnim uređajem može se izolirati zračenje iz određenog spektralnog područja. Kod nedisperzijskih spektrometara, spektralni uređaj je interferencijski filtar, dok se u disperzijskim spektrometrima koristi prizma ili rešetka. U FT-IR spektrometru kao spektralni uređaj koristi se interferometar.

Detektori pretvaraju optički signal u električni te razlikujemo termičke detektore i fotodetektore. Kako bi se spektri mogli pohraniti i obraditi, instrumenti moraju biti povezani sa

računalom na kojem je moguće analizirati dobiveni IR spektar. Na slici 3 shematski su prikazani glavni dijelovi disperzijskog IR spektrometra.



Slika 3. Glavni dijelovi disperzijskog IR spektrometra<sup>5</sup>

### 2.1.3. FT-IR spektroskopija

Upotrebu FT-IR (engl. *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*) spektroskopije kao važne analitičke tehnike za analizu uzoraka omogućio je nedavni napredak u području osjetljivosti detektora.<sup>6</sup> Koristeći FT-IR spektroskopiju, infracrvene vrpce koje odgovaraju polisaharidima, proteinima, lipidima, polifosfatnim skupinama i drugim funkcionalnim skupinama ugljikohidrata na bakterijskim stanicama mogu se identificirati i usporediti u različitim uvjetima.<sup>7</sup>

Interferometar jest najznačajniji dio FT-IR spektrometra i sastoji se od djelitelja zrake, pokretnog i nepokretnog zrcala te lasera. Djelitelj zrake svjetlost propušta iz izvora u dva smjera, pri čemu polovica svjetlosti ide prema nepokretnom zrcalu, a druga polovica prema pokretnom zrcalu. Zrake iz pokretnog i nepokretnog zrcala usmjeravaju se natrag na djelitelja zrake, gdje ovisno o razlici prijeđenog puta, odnosno o pomaku pokretnog zrcala, uzrokuju konstruktivne i destruktivne interferencije. Signal u odnosu na položaj zrcala, a time i vrijeme naziva se interferogram. Laser se koristi za određivanje položaja pomičnog zrcala pomoću točno poznate valne duljine lasera. HeNe laseri su iznimno stabilni te omogućuju određivanje položaja pomičnog zrcala u interferometru. Svjetlost se zatim usmjerava kroz uzorak i na

detektor gdje se signal vremenske domene pretvara u frekvencijsku domenu putem Fourierovih transformacija.<sup>6</sup>

#### 2.1.4. Priprava uzorka

Uobičajeni način snimanja uzoraka je transmisijska tehnika snimanja gdje zračenje prolazi kroz uzorak i detektira se količina propuštenog infracrvenog zračenja. Ovisno o svojstvima i agregatnom stanju uzorka, koriste se različiti načini priprave uzorka za mjerenje. Za čvrste uzorke koji nisu praškasti, može se koristiti standardni magnetski držač uzorka, koji zahtijeva pripremu uzorka u obliku tankih pločica. Praškasti uzorci pripremaju se suspendirani u ulju (npr. parafinskom), kao filmovi ili u obliku pastile s alkalnim halogenidima: kalijevim bromidom, natrijevim kloridom ili kalijevim jodidom. Najčešće se koristi KBr pastila pri čemu se kruti uzorak miješa se sa KBr u približnom omjeru 1 : 100 (1 mg uzorka i 100 mg KBr), usitnjava i preša se pod tlakom. Kivete, male posude izrađene od prozirnog materijala kao što su staklo, plastika ili kvarc, koriste se za snimanje transmisijskih IR spektara tekućeg ili plinovitog uzorka te se smještaju na put zračenja. Dio kiveta propustan za infracrveno zračenje naziva se prozor kivete, a može biti različitog materijala kao što su npr. KCl, BaF<sub>2</sub>, KBr, CaF<sub>2</sub> koji se razlikuju po svojim svojstvima poput topljivosti u vodi, stabilnosti, osjetljivosti na promjene temperature itd. Bitno je da su tekućine bistre, a otapalo nepolarno, čisto i slabo apsorbira infracrveno zračenje. U plinske kivete stavlja se sami uzorak ili pomiješan s nekim drugim plinom čije su stijenke izrađene od mjedi ili stakla.

S obzirom na nedostatke transmisijskog načina snimanja kod jako koncentriranih uzoraka i uzoraka u vodenim otopinama, navedeni uzorci se mogu analizirati tehnikom prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflection*, ATR). ATR tehnika temelji se na principu totalne refleksije zračenja na granici faza koju čine refleksijski element i uzorak. Infracrvena zraka se nakon ulaska u refleksijski element potpuno reflektira na granici faza između elementa i uzorka kada je kut upada zrake veći od kritičnog kuta. Prije potpune refleksije, zraka dijelom prodire u uzorak, koji apsorbira odgovarajuću energiju i reflektirano zračenje je manje energije od upadnog zračenje, te se naziva prigušeno zračenje. Ova tehnika ne zahtijeva posebnu pripremu uzorka za mjerenje i koristi se za snimanje uzorka koji jako apsorbiraju IR zračenje.<sup>1</sup>

### 2.1.5. Analiza IR spektra

IR spektar jest prikaz transmitancije (ili apsorbancije) kao funkcije valnog broja. Dijeli se na tri područja: bliski IR (engl. *near infrared*, *NIR*), srednji IR (engl. *mid infrared*, *MIR*) i daleki IR (engl. *far infrared*, *FIR*), čiji intervali valnih brojeva redom odgovaraju: 13000–4000  $\text{cm}^{-1}$ , 4000–400  $\text{cm}^{-1}$  i niži od 400  $\text{cm}^{-1}$ .

Za uobičajene strukturne analize koristi se zračenje u srednjem IR području koje se može podijeliti u dva važna područja za analizu; između 4000 i 1100  $\text{cm}^{-1}$  se javljaju vibracije skupina, dok je ispod 1100  $\text{cm}^{-1}$  područje „otiska prsta“. Vibracije skupina podrazumijeva vibracije manjih dijelova molekule – funkcijskih skupina, a u „otisku prsta“ javljaju se vrpce vibracija većih dijelova molekule, ponekad i čitave molekule. Za asignaciju dobivenog spektra, potrebno je poznavati karakteristična vibracije pojedinih funkcijskih skupina te ih pridružiti opaženim vibracijskim vrpčama. Prisutnost vodikovih veza, intermolekulskih i intramolekulskih, utječe na pomak vibracijskih vrpce prema nižim vrijednostima valnih brojeva, a na samu vodikovu vezu imaju utjecaj temperatura, koncentracija i otapalo. U tablici 1 navedene su neke od vibracija funkcijskih skupina te odgovarajuće vrijednosti valnog broja.

Tablica 1. Područja istezanja i svijanja pojedinih funkcijskih skupina u IR spektru<sup>8</sup>

Valni broj / $\text{cm}^{-1}$	Funkcijske skupine
<b>3700–3100</b>	–O–H, –N–H, $\equiv\text{C–H}$
<b>3100–3000</b>	$=\text{C–H}$ , $-\text{CH}_2-$ , $-\text{CH}=\text{CH}-$
<b>3000–2800</b>	–CH, $-\text{CH}_2$ , $-\text{CH}_3$
<b>2800–2600</b>	–CHO
<b>2700–2400</b>	–POH, –SH, –PH
<b>2400–2000</b>	$-\text{C}\equiv\text{N}$ , $-\text{N}=\text{N}^+=\text{N}^-$ , $-\text{C}\equiv\text{C}-$
<b>1870–1650</b>	$\text{C}=\text{O}$
<b>1650–1550</b>	$\text{C}=\text{C}$ , $\text{C}=\text{N}$ , NH
<b>1550–1300</b>	$\text{NO}_2$ , $\text{CH}_3$ , $\text{CH}_2$
<b>1300–1000</b>	$\text{C–O–C}$ , $\text{C–OH}$ , $\text{S}=\text{O}$ , $\text{P}=\text{O}$ , $\text{C–F}$
<b>1100–800</b>	$\text{Si–O}$ , $\text{P–O}$
<b>1000–650</b>	$=\text{C–H}$ , –NH
<b>800–400</b>	–C–halogeni element

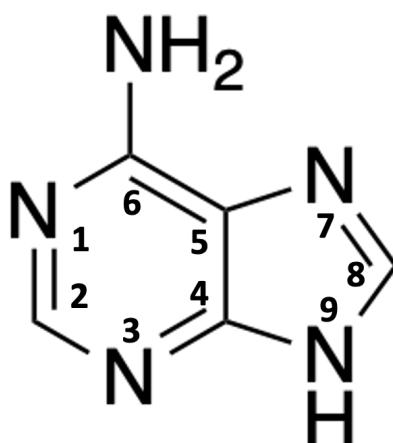
## 2.2. Adenin

Adenin ili 6-aminopurin, molekulske formule  $C_5H_5N_5$ , jedna je od purinskih baza, uz gvanin, koji se razlikuju prvenstveno svojom strukturom. Od svih dušičnih baza, adenin je jedan od najviše proučavanih zahvaljujući svojim oštrim linijama koje pokazuju regije u UV spektru te ograničenom broju dostupnih tautomera i prihvatljivoj lakoći isparavanja.

Sa pirimidinima, koji također spadaju u skupinu dušičnih baza, čine građevne jedinice deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA). Adenin (A) se veže sa svojom komplementarnom pirimidinskom bazom timinom (T) što doprinosi stabilizaciji dvostruke zavojnice DNA, za razliku od RNA gdje se sparuje s uracilom (U). Osim nukleinskih kiselina koje sadrže genetske upute za biološki razvoj staničnih oblika života i velikog broja virusa, adenin je sadržan u molekuli adenzin trifosfata (ATP), koja je ključna molekula za prijenos energije u svim metaboličkim putevima. Nikotinamid adenin dinukleotid ( $NAD^+$ ), flavin adenin dinukleotid (FAD), kao i koenzim A, derivati su adenina koji spadaju u skupinu energetski bogatih kofaktora i sudjeluju u procesu zvanom stanično disanje. Adenin i gvanin nastaju u biosintezi purinskih nukleotida iz zajedničke preteče inozinata (IMP, inozin monofosfat). *De novo* metabolički put sinteze započinje na riboza-5-fosfatu, a postupnom izgradnjom nastaje inozinat uz donore dušikovih atoma kao što su aminokiseline aspartat, glicin i glutamin te donore ugljikovih atoma ugljikov dioksid i format, točnije prijenosom formilne skupine  $N^{10}$ -formil-tetrahidrofolata (THF).<sup>9</sup>

Molekula adenina sastoji se od 15 atoma stoga posjeduje 39 načina vibriranja ( $3N-6$ ). Zbog svog purinskog aromatskog heterocikličkog sustava može postojati u 14 različitih tautomernih oblika: četiri amino tautomera 9H, 7H, 3H i 1H, osam imino tautomera, 1H/7H, 9H, 3H/7H i 9H. Svaki od ova posljedna oblika posjeduje i dva stereoisomera Z i E. Najstabilniji i najčešće izoliran oblik je kanonski 9H tautomer kod kojeg je atom dušika N9 vezan je za šećer u adenzinu (nukleotidu).<sup>10</sup> Na slici 4 prikazana je struktura molekule adenina s numeriranim atomima koja je nacrtana u programu ChemDraw.





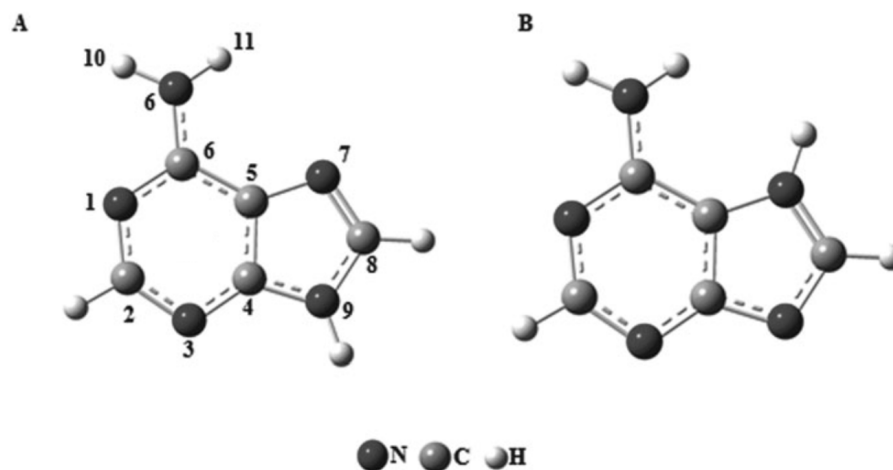
Slika 4. Struktura adenina

Adenin gradi i sekundarne glasnike, male molekule koje imaju ulogu prenositelja signala od jednog mjesta (receptora) do drugog (ciljne molekule), čiji je jedan od najpoznatijih predstavnika cAMP (3'-5'- ciklički adenozin monofosfat). cAMP, uz molekulu cGMP (3'-5'- ciklički gvanozin monofosfat), često su uključeni u mutacije koje dovode do karcinogeneze stoga je iznimno bitno poznavati njihovu strukturu. U strukturalnoj analizi dušičnih baza kao što su adenin i gvanin, svoju primjenu nalazi infracrvena spektroskopija.

### 2.3. Infracrveni spektar adenina

Molekule kao što je adenin koje posjeduju kompleksniju strukturu, imaju veći broj vibracijskih vrpca te je asignacija njihovog IR spektra zahtjevnija. Prema tome, u ovom radu vibracije pridružene navedenim vibracijskim vrpcoma preuzete su iz znanstvenog članka čiji je spektar adenina detaljno analiziran primjenom računalnih metoda.<sup>11</sup>

FT-IR spektar bezvodnog adenina, pripravljenog u obliku KBr pastile, snimljen je pomoću Bruker Optics Vertex 70 FT-IR spektrometra uz detektor Mercury Cadmium Telluride (MCT) hlađenog tekućim dušikom. Spektri su snimljeni u rasponu od 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . Spektri su sakupljani 2 minute (otprilike 140 skeniranja), s rezolucijom od 2  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>11</sup>



Slika 5. Strukturni prikaz N9H-amino (A) i N7H-amino (B) tautomernih oblika adenina, u plinovitoj fazi<sup>11</sup>

Infracrveni spektar adenina (slika 6) može se podijeliti u tri glavna područja: vrpce niskih valnih brojeva (do 950  $\text{cm}^{-1}$ ), vrpce u srednjem području (950 do 1700  $\text{cm}^{-1}$ ) i vrpce visokih valnih brojeva (2700 do 3400  $\text{cm}^{-1}$ ). Vrpce u području do 950  $\text{cm}^{-1}$  često su povezane s kretnjama koje uključuju sve atome u molekuli, a uglavnom su prisutne deformacije izvan ravnine. Vrpce ispod 350  $\text{cm}^{-1}$  uglavnom se pripisuju skeletnim deformacijama kao što su torzija prstena i vibracijama kristalne rešetke. Vrpcoma u srednjem području između 950 i 1700  $\text{cm}^{-1}$  doprinosi svijanjanje atoma prstena u ravnini te istezanja C–N i C–C veza. Pri višim valnim brojevima, između 2700 i 3400  $\text{cm}^{-1}$  javljaju se vrpce istezanja veza koje uključuju atome vodika. Valni brojevi i pripadajuće vibracije navedeni su u tablici 2.

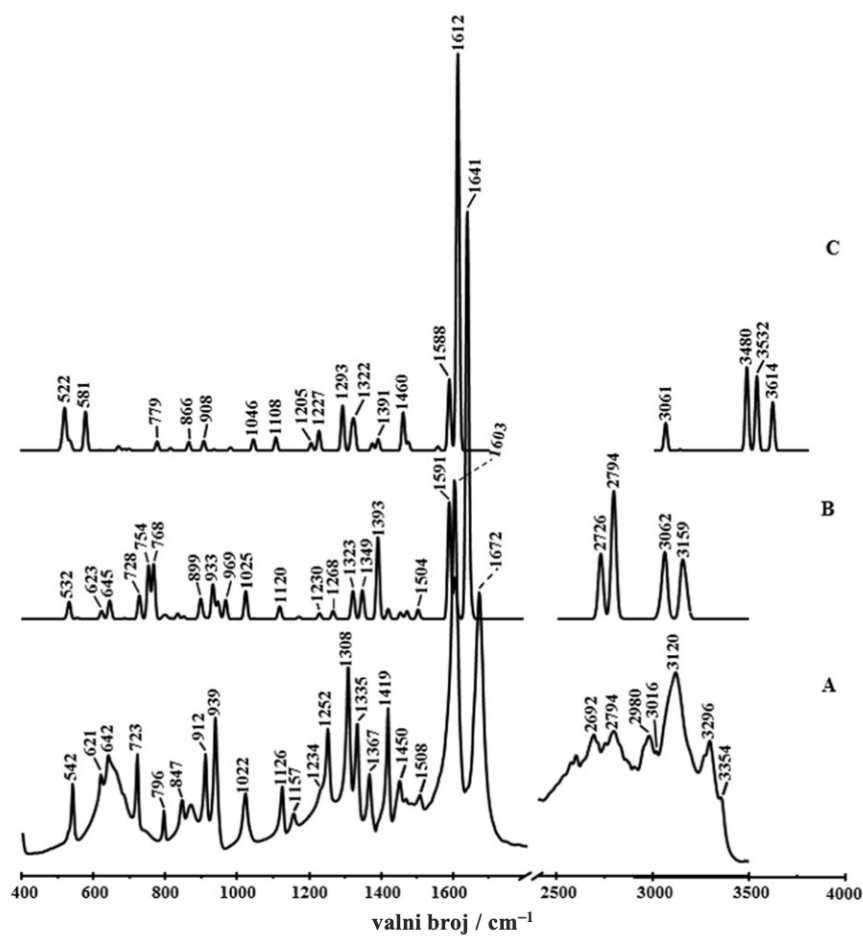
Tablica 2. Asignacija vibracijskih vrpci adenina<sup>11</sup>

Valni broj / cm <sup>-1</sup>	Vibracija
542	$\Delta(N6-C6-C5) + \Delta(C6-C5-C4) + \Delta(N3-C4-N9) - \Delta(C6-C5-N7) - \Delta(N1-C6-N6)$
621	$\Delta(C4-C5-N7) - \Delta(C4-N9-C8) + \Delta(N1-C6-N6)$
642	$\Gamma(N7-C8-N9); \Gamma(C8-N7-C5); \Gamma(C8-N9-C4); \gamma(C8-H)$
723	Pyr + Im disanje prstena
796	$\omega(NH_2)$
847	$\gamma(C8-H); \tau(NH_2)$
872	$\tau(NH_2)$
912	$\gamma(C2-H)$
939	$\Delta(N7-C8-N9); \gamma(N9-H)$
1022	$\tau(NH_2); \nu(C6-N1)$
1126	$\delta(C8-H); \nu(C3-N3) + \nu(C4-N9) - \nu(C5-C6) - \nu(C5-N7)$
1157	$\delta(C8-H) - \delta(N9-H); \nu(C8-N9) + \nu(C5-N7) - \nu(C4-N9) - \nu(C4-N3) - \nu(C2-N3)$
1234	$\omega(NH_2); \nu(C5-N7) + \nu(C8-N7) - \nu(C6-N1); \delta(C8-H); d(C2-H); d(N9-H)$
1252	$\delta(C8-H) + \delta(N9-H); \nu(C2-N3) + \nu(C8-N7) + \nu(C2-N1) - \nu(C5-N7) - \nu(C4-N9)$
1308	$\delta(C2-H); \nu(C2-N3) + \nu(C5-N7) - \nu(C8-N7) - \nu(C4-N9)$
1335	
1367	$\delta(N9-H); \delta(C8-H); \nu(C8-N9) + \nu(C4-C5) + \nu(C2-N3) + \nu(C6-N1) - \nu(C5-C6) - \nu(C2-N1) - \nu(C4-N3) - \nu(C8-N7)$
1419	$\nu(C4-N9) + \nu(C8-N7) + \nu(C6-N1) - \nu(C4-C5) - \nu(C4-N3) - \nu(C8-N9)$
1450	$\delta(N9-H) - \delta(C8-H) + \delta(C2-H); \nu(C8-N9) + \nu(C2-N1) + \nu(C6-N1) - \nu(C2-N3) - \nu(C8-N7) - \nu(C6-N6)$
1508	$\alpha(NH_2); \delta(N9-H) - \delta(C8-H) + \delta(C2-H); \nu(C4-C5) + \nu(C2-N1) + \nu(C6-N1) + \nu(C8-N9) - \nu(C2-N3) - \nu(C4-N9) - \nu(C8-N9)$
1603	$\alpha(NH_2); \delta(N9-H); \nu(C4-C5) + \nu(C2-N1) - \nu(C5-C6) - \nu(C6-N1) - \nu(C4-N3) - \nu(C2-N3)$
1672	$\alpha(NH_2) - \nu(C6-N6) + \nu(C4-C5) + \nu(C2-N1) - \nu(C5-C6) + \nu(C6-N1)$
2692	Kombinacijske vrste
2794	Kombinacijske vrste
2980	Kombinacijske vrste
3016	$\nu(N9-H)$
3120	$\nu(C2-H)$
3267	$\nu_s(NH_2)$
3296	$\nu(C8-H)$
3354	$\nu_a(NH_2)$

$\delta$ - deformacija u ravnini,  $\Delta$ - deformacija prstena u ravnini,  $\gamma$ - deformacija izvan ravnine,  $\Gamma$ - deformacija prstena izvan ravnine,  $\alpha$ - striženje,  $\tau$ - torzija,  $t$ - uvijanje,  $\nu_s$ - simetrično istežanje,  $\nu_a$ - antisimetrično istežanje.

U IR spektru javljaju se karakteristične vrpce adenina. Tako se vrpca na  $621\text{ cm}^{-1}$ , u području niskih valnih brojeva, pripisuje deformaciji piridinskog prstena u ravnini, dok vrlo široka vrpca na  $642\text{ cm}^{-1}$  odgovara deformacijama imidazolnog prstena izvan ravnine. Intenzivna vrpca pri  $796\text{ cm}^{-1}$  i šira vrpca pri  $847\text{ cm}^{-1}$  pripisuju se deformacijama izvan ravnine koja uključuju vodikove atome –  $\gamma(\text{C8-H})$  i  $\text{NH}_2$  klaćenje. Deformacija ( $\text{N1-C2-N3}$ ) i ( $\text{C8-N9-C5}$ ) rezultiraju vrpcom pri  $912\text{ cm}^{-1}$ . Navedene simetrične vibracije u ravnini ne uključuju značajne pomake. S druge strane, vibracijska vrpca visokog intenziteta pri  $939\text{ cm}^{-1}$  pripisuje se deformacijama izvan ravnine ( $\text{C2}$ )H i ( $\text{N9}$ )H. Budući da je ova skupina uključena u interakcije vodikovih veza – kretanje ( $\text{N9}$ )H posebno je zanimljivo to što pokazuje veliko odstupanje uzimajući u obzir izoliranu molekulu (slika 6 (C)). U području vrpca srednjih frekvencija, ( $\text{C8}$ )H deformacija u ravnini u kombinaciji s uvijanjem  $\text{NH}_2$  i C–N istežanjem daju vrpcu na  $1252\text{ cm}^{-1}$ . Istaknuta vibracijska vrpca na  $1308\text{ cm}^{-1}$ , kao i ona na  $1335\text{ cm}^{-1}$  posljedica su kombinacije C–N istežanja i ( $\text{C2}$ )H deformacije u ravnini. Dodatna vibracija izvan ravnine koja uključuje pomake vodikovih atoma ima utjecaj na navedene značajke. Takvo gibanje odgovara  $\text{NH}_2$  strižnoj deformaciji, zajedno s doprinosima N–H i C–H deformacija u ravnini. Striženje  $\text{NH}_2$  dovodi do intenzivne vrpce na  $1672\text{ cm}^{-1}$  kojoj doprinosi i istežanje C–N veze.

U području visokih valnih brojeva javljaju se vrpce slabog intenziteta pri 2692, 2794 i 2980  $\text{cm}^{-1}$  koje se pripisuju kombinacijskim vrpcama, odnosno vrpcama koje nisu u korelaciji sa poznatim vibracijama te su rezultat preklapanja više različitih vrpca. Osim kombinacijskih vrpca, opažene su i vrpce na 3016 i 3120  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju načinima istežanja N9–H i C2–H veza. Slično kao i kod deformacija izvan ravnine ( $\text{C2}$ )H i ( $\text{N9}$ )H, postoji utjecaj vodikovih veza (intermolekulskih) na istežanje N9–H veze, što se može uočiti u spektru za izoliranu molekulu čija je dobivena vrijednost valnog broja 3532  $\text{cm}^{-1}$ . Istežanje ( $\text{C2}$ )–H odgovara vrpca na 3120  $\text{cm}^{-1}$ , a istežanju C8(H) pripisuje se vrpca 3296  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>11</sup>

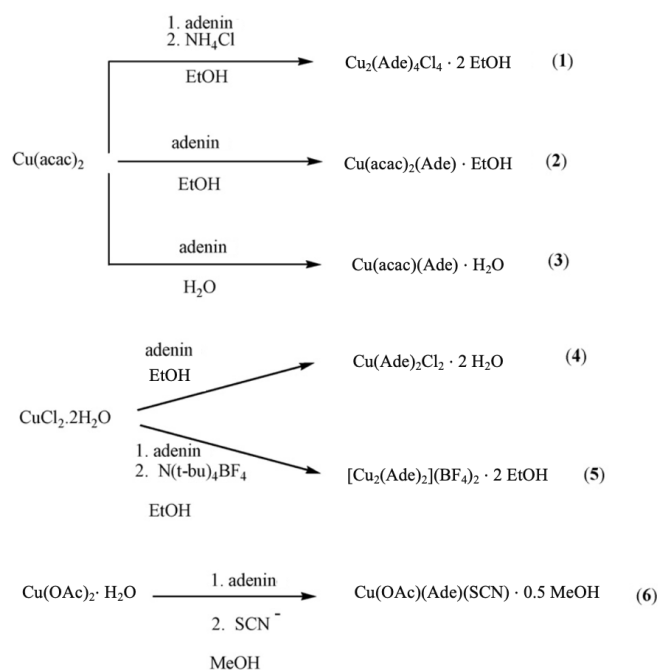


Slika 6. Infracrveni spektri bezvodnog adenina (u krutom stanju). Eksperimentalni (A); izračunato, za kondenzirano stanje (B) i za izoliranu molekulu (C) (Vrpca na  $1603 \text{ cm}^{-1}$  u (A) korištena je kao referenca za okomito skaliranje.)<sup>11</sup>

## 2.4. Primjena infracrvene spektroskopije adenina

Općenito, infracrvena (IR) spektroskopija, zbog svoje široke primjene, od velike je važnosti znanstvenicima u različitim područjima kao što su kvalitativna analiza i identifikacija spojeva, interakcije među molekulama, biokemijskim analizama, karakterizacija proteina i DNA, analiza poluvodiča i mnoge druge. IR spektroskopijom metalnih koordinacijskih kompleksa koji se koriste kao inhibitori enzima (antibakterijskih, antivirusnih ili antikancerogenih) moguće je odrediti citotoksični učinak na različite stanice.

Metali kao što su željezo, zlato, platina, molibden, kositar, galij, vanadij i još poneki, imaju stukturu ulogu u mnogim enzimima što ih čini odličnim metama u liječenju. Ometanje katalitičkog ciklusa ili blokiranje vezanja supstrata za enzim odvija se pod utjecajem koordinacije metala unutar (ili izvan) aktivnog mjesta enzima. S obzirom da je potraga za novim lijekovima za specifične proteine koji se u stanicama različito eksprimiraju vrlo aktivno područje istraživanja, bitno je napomenuti da su metalni koordinacijski kompleksi korišteni i u liječenju raka. Posebno je zanimljiv ion bakra čije vezanje na određena mjesta može modificirati konformacijske strukture proteina, polinukleotida i DNA. Ispitivana je toksičnost na različitim staničnim kulturama koordinacijskih kompleksa bakra sintetiziranog s adeninom (ligandom) počevši od različitih otapala i liganada. Istraživanje je provedeno na šest različitih bakar–adenin kompleksa čija je priprema shematski prikazana na slici 7.



Slika 7. Shema priprema različitih bakar–adenin kompleksa<sup>12</sup>

Od šest pripremljenih kompleksa, samo je spoj  $\text{Cu}_2(\text{adenin})_4\text{Cl}_4 \cdot 2\text{EtOH}$  (1) pokazao citotoksični učinak, vezao genomsku DNA i rezultirao staničnom smrću u mnogim staničnim kulturama. Infracrvenom spektroskopijom moguće je odrediti pojedine ligande, kao i strukturne komponente, uz toplinsku i elementarnu analizu. Karakteristične vrpce u infracrvenim spektrima različitih kompleksa 1–6 navedene su u tablici (slika 8).

Vibracija	Adenin	1	2	3	4	5	6
$\nu(\text{OH}), \nu_{\text{NH}_2}$		3327	3332	3390	3356	3398	3415
$\nu_{\text{NH}_2}, 2\delta_{\text{NH}_2}$	3294	3186	3267	3290	3171	3300	3338
$\nu(\text{C8-H}), \nu(\text{C2-H}), \nu_{\text{NH}_2}$	3118	3112	3080	3095	3111	3130	3200
$\delta_{\text{NH}_2}$	1668	1652	1653	1650	1657	1666	1653
$\nu(\text{C=O})$			1582	1578	–	–	1583
$\nu(\text{C4-C5}), \nu(\text{C8-N9}) + \delta(\text{C8-H})$	1558	1558	1556	1558	1558	1575	1544
$\delta(\text{N1-H})$	1489	1489	1474	1489	1480	1489	1489
$\delta(\text{C2-H}), \nu(\text{C8-N9}) + \delta(\text{C8-H})$	1450	1458	1451	1458	1458	1452	1464
$\nu(\text{N1-C6N6})$	1420	1437	1415	1398	1408	1404	1425
$\nu(\text{C5-N7-C8})$	1335	1335	1337	1335	1348	1346	1344
$\nu(\text{N9-C8}) + \nu(\text{N3-C2}) + \delta(\text{C-H})$	1308	1317	1300	1305	1319	1312	1308
$\nu_{\text{prsten}}, \delta(\text{C-H})$	1252	1278	1256	1272	1246	–	1281
$\delta(\text{C8-H}) + \nu(\text{N7-C8})$	1232	1211	1236	1236	1215	1215	1209
$\delta(\text{C8-N7}) + \delta(\text{C6-N6-H})$	1157	1145	1157	1151	1147	1172	1153
$\nu(\text{C2-N3})$	1125	1138	1126	–	1118	1110	–
$\rho_{\text{NH}_2}$	1024	1020	1020	1020	1018	1083	1031
$\rho_{\text{NH}_2} + \nu_{\text{N1-C6}}$	939	928	934	935	937	929	949
$\delta(\text{N1-C2-N3}) + \nu(\text{C5-N7}) + \nu(\text{N9-H})$	870	866	800	860	–	–	858
$\nu_{\text{NH}_2}$ deformacija prstena	640	654	656	657	684	665	638
deformacija izvan ravnine N9-H	621	617	619	611	611	594	623
$\gamma_{\text{R}} + \gamma(\text{N9-H})$	666	680	680	670	672	665	671
$W_{\text{NH}_2} + \delta_{\text{NH}_2}$	542	575	540	547	547	550	554
$\delta(\text{C=O})$	–	–	557	561	–	–	579

Slika 8. Podaci infracrvenog spektra za adenin i njegove komplekse s bakrom<sup>12</sup>

Analizom pomaka vrpca u IR spektru moguće je definirati strukturne razlike između pojedinih kompleksa. Poznato je da je u području  $3500\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$  moguće opaziti istežanja –OH skupine prisutne u molekulama vode ili alkohola poput etanola ili metanola. Dakle, vrpca na  $3390\text{ cm}^{-1}$  mogao bi se pripisati OH skupini vode u rešetki kompleksa 3, a na  $3415\text{ cm}^{-1}$  OH podrijetlom iz metanola u kompleksu 6. Acetilacetone (pentan-2,4-dion) je organski spoj koji spada u skupinu 1,3-diketona stoga je istežanje  $\text{C=O}$  veze karbonilne skupine uočeno pri  $1582$  i  $1578\text{ cm}^{-1}$  u kompleksima 2 odnosno 3, a  $\text{C=O}$  istežanje kod acetata javlja se pri  $1583\text{ cm}^{-1}$  u kompleksu 6. Istežanja amino skupina ( $-\text{NH}_2$ ) adenina smještena u području  $3290\text{--}3118\text{ cm}^{-1}$  malo su pomaknuta uslijed kompleksiranja adenina s bakrom. Očekivano istežanje amino skupine adenina koji nije u sklopu kompleksa – slobodnog adenina je na  $1668\text{ cm}^{-1}$  što je u dobrom slaganju sa dobivenim vrijednostima od otprilike  $1650\text{ cm}^{-1}$  za N–vezane adenin komplekse. Iz toga se može zaključiti da je  $-\text{NH}_2$  skupina u kompleksima 1–4 i 6 koordinirana sa metalnim ionom – bakrom. Pomaci unutar intervala za vrijednosti valnog broja  $1605\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju povremenim  $\text{C=C}$  i  $\text{C=N}$  cijepanjima aromatskih heterocikličkih prstenova,

vibracijama prstena liganda i dušika koji je sadržan u prstenu sa značajnim pomacima. Kod kompleksa 1 i 4–6 vidljiv je pomak valnog broja prema nižim vrijednostima u odnosu na slobodni adenin pri  $1232\text{ cm}^{-1}$  što ukazuje na vezanje adenina preko dušika u prstenu.

Usporedbom IR spektara kompleksa 2–6, s elementarnom i termičkom analizom, potvrđene su strukturne komponente Cu–Ad. Dobiveni rezultati prikazuju koordinacijski kompleks bakra s adeninom kao spoj s potencijalnim antikancerogenim djelovanjem i s nekoliko biokemijskih ciljeva jer, osim što je pokazao toksičnost na različitim staničnim kulturama, inhibirao je reakcije katalizirane Taq polimerazom, mitohondrijsku oksidaciju NADH *in vitro* i vezanje transkripcijskog faktora na DNA. Također, povećao je stvaranje ROS-a (engl. *Reactive Oxygen Species*) i smanjio razinu ATP-a što može biti jedan od mogućih mehanizama njegove citotoksičnosti.<sup>12</sup>



## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. N. Cindro, Đ. Škalamera, I. Biljan, A. Ramić, Ž. Car, V. P. Peroković, *Praktikum organske kemije I i II* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2021.
2. E.Generalic, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=spektar+elektromagnetskog+zra%C4%8Denja> (datum pristupa 10. srpnja 2022.)
3. T. Cvitaš, *Fizikalna kemija* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, Pogl. 9: Molekularna spektroskopija, str 2.
4. <https://www.chegg.com/learn/chemistry/organic-chemistry/ir-spectroscopy> (datum pristupa 29. srpnja 2022.)
5. <https://microbiologynote.com/infrared-ir-spectroscopy-principle-instrumentation-application/> (datum pristupa 7. srpnja 2022.)
6. J. S. Gaffney, N. A. Marley, D. E. Jones, *Fourier-Transform Infrared Spectroscopy*, 2012.
7. M.B. Binish, P. Binu, V.G. Gopikrishna, M. Mohan, *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 2. izdanje, Elsevier, 2022, str. 305-326.
8. C. Yuen, S. Ku, P. Choi. C. Kan, S. Tsang, *Determining Functional Groups of Commercially Available Ink-Jet Printing Reactive Dyes Using Infrared Spectroscopy*, *Res. J. Text. Apparel* **9** (2005) 26-38.
9. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7. izdanje, Freeman, 2017.
10. J.-P. Schermann, *Spectroscopy and Modeling of Biomolecular Building Blocks*, 2008, str. 217.
11. R. P. Lopes, R. Valero, J. Tomkinson, M. P. M. Marques, L. A. E. Batista de Carvalho, *Applying vibrational spectroscopy to the study of nucleobases – adenine as a case-study*, *New J. Chem.*, 2013, **37**, 2691-2699.
12. H. H. Hammud, G. Nemer, W. Sawma, J. Touma, P. Barnabe, Y. Bou-Mouglabey, A. Ghannoum, J. El-Hajjar, J. Usta, *Copper-adenine complex, a compound, with multi-biochemical targets and potential anti-cancer effect*, *Chem.-Biol. Interact.* **173** (2008) 84-96.