



# BIOAKTÍV MOLEKULÁK SZERKEZETVIZSGÁLATA KORSZERŰ NMR MÓDSZEREKKEL

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Bokotey Sándor**

DEBRECENI EGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
SZERVES KÉMIA TANSZÉK  
DEBRECEN, 2001

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem TTK Kémia Doktori Iskola K/5 programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem TTK doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2001. ....

.....  
a jelölt aláírása

Tanúsítom, hogy Bokotey Sándor doktorjelölt 1999.február 1 – 2001.június 30 között a fent megnevezett Doktori Iskola K/5 programjának keretében irányítással végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredmények a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2001. ....

.....  
a témavezető aláírása

Őszintén köszönöm témavezetőmnek, Dr. Szilágyi Lászlónak, a kémiai tudományok doktorának a témavezetés során nyújtott önzetlen és sokoldalú támogatását.

Köszönettel tartozom a Chinoin Gyógyszer és Vegyészeti Termékek Gyára RT. szakmai vezetőimnek Dr. Hermecz Istvánnak, Dr. Simon Kálmánnak és Dr. Arányi Péternek, hogy lehetővé tették számomra a Ph.D. képzésben való részvételemet és a dolgozatom elkészítését.

Köszönet illeti a közvetlen szakmai vezetőmet Dr. Podányi Benjaminget, aki maximális támogatást és szakmai segítséget nyújtott számomra a Ph.D. képzésem alatt és aki nélkül sem az értekezés, sem az alapul szolgáló közlemények nem készültek volna el.

Köszönöm Dr. Antus Sándornak, Dr. Litkei Györgynek és Dr. Dinya Zoltánnak az egyetemi éveim alatt nyújtott sokoldalú és önzetlen segítségüket.

Köszönettel tartozom közvetlen munkatársaimnak, Dr. Bátori Sándornak, Dr. Kánai Károlynak, Dr. Böcskei Zsoltnak, Dr. Halász Juditnak, Dr. Horváth Ágnesnek, Dr. Fehér Miklósnak, Dr. Varga Mártonnak, Dr. Keserű Györgynek, Dr. Árvai Gézának, Dr. Korbonits Dezsőnek, Dr. Sipos Juditnak, Dr. Timári Gézának, Kövári-Rádkai Máriaának, Ritz Imolának, Hanusz Miklósnak, Diós Györgynek, Anton Ildikónak, Hajdú Félixnek, Brlik Jánosnak, Grosz Lászlónénak, Simon Attilának, Alattyáni Editnek és Balogh Krisztinának.

Végül, de nem utolsósorban köszönetemet fejezem ki Édesapámnak, Édesanyámnak és Nővéremnek a megértésükért, kitartásukért és biztatásukért. Ezt a munkámat Nekik dedikálom.

# Tartalomjegyzék

<b>1. Bevezetés</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Alkalmazott módszerek</b> .....	<b>5</b>
2.1. Mag Overhauser Effektus (NOE) .....	5
2.2. Sebességi állandó és átlagélettartam meghatározása .....	7
2.3. Az öttagú gyűrű pszeudorotációja .....	7
2.4. Aromás gyűrűáram hatása ("ring current") .....	9
2.5. E.COSY .....	10
2.6. A $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$ spin-spin csatolási állandók meghatározása .....	11
<b>3. A prolin-endopeptidáz (PEP) inhibitorok szerkezetvizsgálata NMR módszerekkel</b> .....	<b>12</b>
3.1. A SUAM-1221 jelű molekula térszerkezetének és oldatkonformációjának meghatározása .....	14
3.1.1. Bevezetés .....	14
3.1.2. A SUAM-1221 molekula $^1\text{H}$ és $^{13}\text{C}$ NMR spektrumok hozzárendelése .....	14
3.1.3. A <i>transz</i> és a <i>cisz</i> rotamerek jelhozzárendelése .....	16
3.1.4. Oldószerhatás tanulmányozása a <i>transz/cisz</i> izomer arányra .....	16
3.1.5. A <i>transz-cisz</i> átalakulási sebességi állandó, <i>transz</i> és <i>cisz</i> rotamerek átlagélettartamának meghatározása .....	17
3.1.6. A prolin gyűrű térszerkezetének meghatározása .....	18
3.1.7. A prolin- és pirrolidin gyűrűk egymáshoz viszonyított térhelyzetének meghatározása .....	18
3.1.8. A fenil-propil oldallánc konformációja és az aromás gyűrűáramok hatása .....	21
3.1.9. Aromás gyűrűáram hatása ("ring current") és Haigh-Mallion egyenlet alkalmazása .....	22
3.1.10. Összefoglalás .....	23
3.2. A hidroxil és fluor tartalmú prolin származékok azonosítása és konformációs vizsgálata .....	30
3.2.1. Bevezetés .....	30
3.2.2. A 4-hidroxil- és 4-fluoroprolin származékok proton és szén-13 NMR hozzárendelése .....	30
3.2.3. A <i>transz</i> és <i>cisz</i> rotamerek hozzárendelése a 4-hidroxil- és 4-fluoroprolin származékokban .....	32
3.2.4. A <i>transz-cisz</i> átalakulási sebességi állandó, <i>transz</i> és <i>cisz</i> rotamerek átlagélettartamának meghatározása .....	33
3.2.5. A $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$ csatolási állandók meghatározása a 2D COSY és NOESY alapján. 1D HETLOC .....	34
3.2.6. A prolin gyűrű térszerkezetének meghatározása .....	34
3.2.7. A $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$ csatolási állandók és a térszerkezet .....	36
3.2.8. Összefoglalás .....	36
3.3. Szulfoxid csoport konfigurációjának meghatározása a szulfoxid tartalmú prolin származékokban ASIS módszer alapján <sup>1</sup> .....	50
3.3.1. Bevezetés .....	50
3.3.2. PEP inhibitor tioprolin szulfoxidok NMR vizsgálata .....	50
3.3.3. A szulfoxid csoport konfigurációjának meghatározása az ASIS értékek alapján .....	52
3.3.4. Összefoglalás .....	54
<b>4. A flavanonok és benzofuranonok vizsgálata NMR módszerekkel</b> .....	<b>56</b>
4.1. Bevezetés .....	56
4.2. 3-Substituíált flavanon származékok szerkezet és térszerkezet vizsgálata NMR módszerek segítségével <sup>2</sup> .....	58
4.2.1. Bevezetés .....	58
4.2.2. Preparatív rész .....	59
4.2.3. Szerkezetigazolási rész .....	60
4.2.4. Összefoglalás .....	64

4.3.	<i>A 3(2H)-Benzofuranon származékok vizsgálata NMR módszerekkel<sup>3</sup></i> .....	71
4.3.1.	Bevezetés .....	71
4.3.2.	Szerkezetigazolási rész .....	72
4.3.3.	Összefoglalás .....	81
<b>5.</b>	<b>Kísérleti rész</b> .....	<b>94</b>
5.1.	<i>Alkalmazott NMR módszerek</i> .....	94
5.2.	<i>A vizsgált minták oxigénmentesítése</i> .....	95
5.3.	<i>3-Szubsztituált flavanon származékok előállítása</i> .....	95
<b>6.</b>	<b>Összefoglalás</b> .....	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Irodalomjegyzék</b> .....	<b>104</b>

## 1. Bevezetés

Az idén ötvenhat éve, hogy az Egyesült Államokban két egymástól független kutatólaboratóriumban is észlelték a mágneses magrezonancia kvantumelméleti számítások által előre megjósolt jelenségét. A felfedezés utáni első évtizedben az NMR főleg a fizikusok vizsgálatának tárgya volt, majd a kémiai alkalmazás lehetőségeit felismerve megjelentek az első kereskedelmi CW-spektrométerek. Ezen igen szerény felbontású spektrométerek segítségével felvett NMR spektrumokból számos olyan információt lehetett nyerni, amit más akkor ismert spektroszkópai módszer (pl. IR, UV, MS) nem nyújtott. Az új technika alkalmazása az említett előnyei mellett komoly nehézségekbe ütközött: egy NMR spektrum felvétele több órát vett igénybe, a módszer érzékenysége, más szóval a jel/zaj viszony gyengének bizonyult.

Az első nagy áttörés az NMR mérések érzékenysége és ez által hatékonysága növelése terén a hatvanas évek végén a nagyobb térerejű szupravezető mágnesek és az új Fourier-transzformációs spektrométerek megjelenése volt. Így az új impulzus Fourier-spektrométereknek köszönhetően lehetőség nyílt arra, hogy nem csak a  $^1\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ , hanem alacsonyabb természetes előfordulású NMR-ben aktív izotópokat ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) is viszonylag rövid időn belül (egy pár óra alatt) lehessen detektálni. A hetvenes évek második felére, a nyolcvanas évek elejére tehető a kétdimenziós NMR módszerek megjelenése és robbanásszerű fejlesztése (COSY (COrelated SpectroscopY), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY), NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY), stb.), ami szintén mérföldkőnek bizonyult az NMR mérési technikák fejlődésében. Így már a nyolcvanas évek elején az NMR, mint szerkezetigazolási módszer méltó helyet foglalt el a többi spektroszkópai módszerek között, sőt, leghatékonyabbnak és szinte nélkülözhetetlennek bizonyult a szerves kis- és középmeretű molekulák oldatbeli szerkezetének meghatározásában.

Az egyre nagyobb térerejű szupravezető mágnesek, több csatornával és egy (Z) vagy három (X, Y, Z) irányú gradiens egységgel felszerelt modernebb NMR spektrométerek megjelenése új korszakot nyitott az NMR spektroszkópia, szerves kémia, szerkezeti biokémia, molekuláris biológia, az orvostudomány vagy akár a virológia számára. Így egyre nagyobb méretű molekulák (polimerek, biopolimerek) szerkezetének meghatározására és oldatbeli konformációjuk felderítésére nyílt lehetőség, ami a szerves illetve biokémia területén új kutatási irányokat indított el. Az impulzusszekvenciák és az NMR módszerek teljesítőképessége hihetetlen gyorsan javult. Hatalmas a megtett út az első 2D COSY spektrumoktól számítva, amelyhez tartozó impulzusszekvencia mindössze két rádiófrekvenciás (RF) impulzusból állt. A fejlődés jól érzékelhető, ha például a COSY szekvenciával összevetjük bármelyik modern heteronukleáris impulzusszekvenciát (pl. HNCA, CBCA(CO)NH, stb.). Ez utóbbi jellegzetesen 20-nál is több RF pulzusból áll, amelyet több csatornán vezetünk, összetett lecsatolások alkalmazása mellett, gradiens szelekcióval ellátva. A növekvő térerőnek és az egyre összetettebb impulzusszekvenciáknak köszönhetően kiderült, hogy a módszer érzékenysége lehetővé teszi, hogy az aminosavakhoz tartozó spinrendszereket elkülönítve lássuk. Mindez azt is jelenti, hogy a szekvenciában szereplő azonos aminosavak jelrendszere elkülönülhet, ha a kémiai környezetük eltérő.

A makromolekulák, s ezen belül a fehérjék NMR spektrumán alapuló szerkezetkutatás számos előnye közül érdemes megemlíteni azt, hogy a mérések vizes oldatban történnek, s így

a módszer nem igényel egykristályt. Így természetesen nincs szükség az úgynevezett “nehézatomból” helyettesítésre sem, amely a szilárdfázisú szerkezetmeghatározás ma is egyik kulcskérdése. Ugyanakkor meg kell említenünk, hogy az NMR-alapú fehérje szerkezetkutatás egyik legsúlyosabb korlátozó tényezője a molekula mérete. Az utóbbi technikával, még a  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$  izotópjelzés esetén is csak a  $\sim 40\text{kDa}$ ,  $\sim 50\text{kDa}$  molekulatömegnél kisebb fehérjék szerkezetének meghatározására van esély. Ráadásul a méretkorlát oka elsősorban a molekula relaxációs tulajdonságaival magyarázható, mely akadály nem tűnik egyszerűen leküzdhetőnek a közeljövőben sem.

Az utóbbi tíz-tizenöt évben egyéb NMR alkalmazások is rohamos fejlődésnek indultak. Ezek közül említésre méltó az MRI (**M**agnetic **R**esonance **I**maging) technika, amely az orvostudomány számára fontos szerepet játszik a daganatok és egyéb fiziológiai rendellenességek diagnosztizálásában. Ez a különleges képalkotó NMR módszer a különböző állati illetve emberi szövetek vizsgálatára hivatott, ami sok esetben kizárja, vagy szükség esetén elősegíti a sebészeti beavatkozás lehetőségét.

Az utóbbi néhány évben, a kombinatorikus kémia erőteljes fejlődésének köszönhetően, nagy erőfeszítéseket tesznek az úgynevezett “kapcsolt” technikák terén. Így az NMR műszergyártó cégek sikeresen kifejlesztették a még újnak nevezhető HPLC-NMR módszert, amely lehetőséget nyújt több komponensű elegyek összetevőinek vizsgálatára.

Mivel az anyagok szilárdfázisú elemzése több kutatási területen egyre fontosabbnak bizonyul, az oldatfázisú NMR módszerek mellett az elmúlt tíz évben egyre nagyobb teret nyert a szilárdfázisú NMR technika alkalmazása. A módszer számos előnnyel bír a többi szilárdfázisú spektroszkópiai módszerekkel szemben, de emellett komoly hátránya is van. Az egyik legfontosabb előnye az, hogy a vizsgálandó szilárd anyag morfológiája vizsgálat szempontjából lényegtelen, azaz az egykristály röntgen diffrakcióval szemben kristályos és amorf (nem vagy csak nehezen kristályosodó) anyagok egyaránt vizsgálhatók. A gyógyszeriparban e módszer alkalmazása kulcsfontosságú lehet, mivel bizonyos esetekben elősegítheti a különböző polimorfok felismerését és megkülönböztetését. Az úgynevezett nagyfelbontású szilárd NMR technika (*pl.* CP-MAS) létezésének ellenére a módszer hátránya hasonló ahhoz, ami korábban a folyadékfázisú NMR spektrométereknél volt - még nem teljesen elegendő érzékenység és a kísérlet relatíve hosszú időtartama.

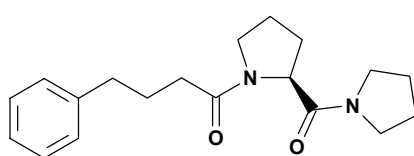
A fentiek alapján egyértelműen látható, hogy napjainkban az NMR spektroszkópia az egyik leggyorsabb és leghatékonyabb módszerek közé sorolható. Ma, a mindennapi munkánkban, a különböző egy-, két- illetve többdimenziós gradienses technikákat már rutinszerűen alkalmazzuk. Az NMR spektroszkópia fontos szerepet játszik a szerkezetigazoláson kívül az új vegyületek relatív konfigurációjának és oldott állapotú konformációjának meghatározásában, valamint többek között a reakciómechanizmus felderítésében. A nagyfelbontású NMR spektroszkópia az ötvenes évek óta a szerves kémia nélkülözhetetlen eszköze. Maga a módszer is hihetetlen fejlődésen ment keresztül, melynek elismerése a kibontakozás egyik legjelentősebb úttörőjének, Richard Ernstnek 1991-ben ítelt kémiai Nobel díj. Az NMR módszer változatos eszköztárával a modern kémia és biokémia szinte minden ágának hatékony vizsgáló módszerévé vált.

A hazai lehetőségek alapján az NMR spektroszkópia szerves kémia alkalmazása a meghatározó, és így a szerves kémikus, valamint az alkalmazott NMR spektroszkópiával foglalkozó szakember együttműködését jelenti. Ennek megfelelően a spektroszkópiás kutatási tevékenysége egyszerre sokoldalú és szerteágazó, az eredmények pedig nehezen, vagy nem is különíthetők el a szerves kémiai vonatkozásoktól, mivel azokkal alapvetően összekapcsolódnak.

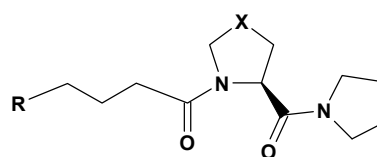
Az értekezésemet egy kutatócsoport tagjaként végzett munkára alapoztam. A dolgozatom "A prolil-endopeptidáz (PEP) inhibitorok szerkezetvizsgálata NMR módszerekkel" és "A 3(2*H*)-benzofuranon származékok vizsgálata NMR módszerekkel" című 3. fejezet 3.1., 3.2., 3.3. alfejezetében illetve 4. fejezet 4.3. alfejezetében szerepelt szerves molekulák előállítását a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.-nél Dr. Batori Sándor, Dr. Horváth Ágnes és Dr. Kánai Károly irányításával végezték. A dolgozatom "3-Szubsztituált flavanon származékok szerkezet és térszerkezet vizsgálata NMR módszerek segítségével" című 4. fejezet 4.2. alfejezetében szerepelt szerves molekulák előállítását a debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén Dr. Litkei György és Dr. Antus Sándor irányítása alatt jómagam végeztem. Ezekbe a témákba bekapcsolódva célkitűzésem az volt, hogy az NMR vizsgálatokra általam szintetizált és a kutatócsoport tagjai által átadott mintákról a rendelkezésemre álló technikai feltételek maximális kihasználásával ne csak a szerves vegyész számára szükséges (sokszor csak szerkezeti igen-nem) információkat szerezzem meg, hanem minél több spektrális adat meghatározásán keresztül a vegyületek konfigurációjára és konformációjára vonatkozóan is adatokat szolgáltatassak. Ezek az eredmények, illetve értelmezésük ugyanakkor bővítik a reakciók mechanizmusára vonatkozó ismereteinket is. A közleményeinkben<sup>1,2,3</sup> leközölt, a vegyületek előállításával kapcsolatos eredményeket, a tényleges munkám bemutatása érdekében, változó részletességgel ismertetem.

Ahogy már az előző bekezdésből is kiderült a dolgozatom érdemi része két fejezetből és öt alfejezetből áll. Az említett fejezetekben a Chinoin RT. K+F Igazgatóságán a prolil-endopeptidáz inhibitorok és a csonttritkulásra ható anyagok témájában, továbbá a debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén flavonoidokkal kapcsolatos témában végzett munkám eredményeiről számolok be.

A prolil-endopeptidáz inhibitorok kutatása során kétfős célt állítottunk magunk elé: - a szubsztrát-inhibitor kölcsönhatás felderítése céljából, a már ismert, PEP inhibitor tulajdonságokkal bíró SUAM-1221 (1) jelű molekula szerkezetének és oldatbeli konformációjának meghatározását, valamint ezzel párhuzamosan - az eddig ismert inhibitor hatással rendelkező molekuláknál hatékonyabb, új molekulák kutatását és fejlesztését (lásd 3. fejezet, 3.1., 3.2., 3.3. alfejezetek).

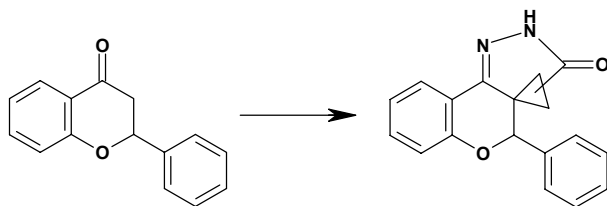


SUAM-1221  
1

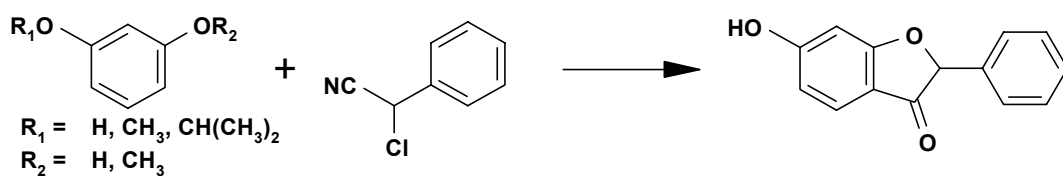


X = C-OH, C-F, S, S=O, S → O  
n = 2 - 10, 12, 14, 16, 18  
R=Ar

A KLTE Szerves Kémiai Tanszékén már régóta foglalkoznak flavonoidkémiai kutatásokkal. 1991-ben Litkei György és munkatársai vizsgálták a flavanon hidroximetilezési lehetőségeit. A dolgozat e részének célja ezen vizsgálatok kiterjesztése, piridazinon származékok flavonoidokból való előállítása és az így előállított vegyületek szerkezetének és térszerkezetének meghatározása NMR módszerek segítségével (lásd 4. fejezet, 4.2. alfejezet).



A csontitkulásra ható szerek kutatása során benzofuranon származékokat kívántunk előállítani az irodalomban leírt módszerek alapján. Mivel a közölt előállítási módszerek megisméltése során számos új, eddig nem ismert benzofuranon származékot is izoláltunk, szükségessé vált az NMR, mint szerkezetfelderítési módszer alkalmazása (lásd 4. fejezet, 4.3. alfejezet).



## 2. Alkalmazott módszerek

### 2.1. Mag Overhauser Effektus (NOE)

Ismert, hogy az NOE hatásért két spin ( $I$  és  $S$ ) esetén a zéró- ( $W_0$ ) és dupla-kvantum ( $W_2$ ) átmeneteken keresztül történő relaxációs folyamat, úgynevezett *kereszt-relaxáció* a felelős. Abban az esetben, amikor a  $W_0$  átmenet, mint lehetséges relaxációs útvonal a domináns (*Solomon* diagramm), a két spin között egyikének telítése során, a másikon az NOE intenzitás csökkenést észlelünk, vagyis más szavakkal  $S$  spin telítése negatív NOE effektust okoz az  $I$  spinen. Ellentétes hatást észlelünk abban az esetben, amikor a  $W_2$  átmenet, mint lehetséges relaxációs útvonal a domináns. Így, az  $S$  spin telítése során, a  $W_2$  útvonalon keresztül az  $I$  spin magasabb energiájú átmenet betöltöttsége (populációja) csökken és emiatt pozitív NOE effektust észlelünk az  $I$  spinen. Természetesen a fentebb említett  $W_0$  és  $W_2$  lehetséges relaxációs főútvonalakon kívül az egy-kvantum ( $W_1$ ) átmenet is létezik, amely valamelyest ellensúlyoz a  $W_0$ -nak és  $W_2$ -nek, mivel a  $W_1$  szempontjából az  $I$  spin átmenetei már egyensúlyi állapotnak felelnek meg. Így az  $I$  spin NOE jelintenzitás változását az  $S$  spin telítése során a következő egyenlet írja le:

$$\eta_i(S) = \frac{W_2 - W_0}{2W_1 + W_2 + W_0} \quad (1)$$

- ahol  $W$  – átmenet valószínűsége

A fentebb említett elméleti levezetések alapján azt lehet látni, hogy az NOE hatás a  $W_2$  és/vagy  $W_0$  folyamatok jelenlétének (úgynevezett kereszt-relaxációnak) köszönhető és hogy az NOE előjeléből el lehet dönteni melyik relaxációs mechanizmus a domináns; a kis molekulák nem viszkózus oldataiban (a körülmények között  $W_2$  folyamat dominál) az NOE effektus pozitív, viszont a makromolekulák vagy viszkózus oldatok esetén ( $W_0$  folyamat dominál) negatív NOE-t észlelünk. Ezen megfigyelésekből azt lehet látni, hogy a relaxáció (kereszt-relaxáció) szoros kapcsolatban van a molekuláris mozgással.

Az NOE közvetett úton információkat szolgáltat a mag-mag dipoláris csatolásokról, amelyek kapcsolatba hozhatók a magok közötti távolságokkal és a relaxációs folyamatok révén ( $W_0$  és  $W_2$  kereszt-relaxációs folyamatok) a molekula egészének mozgásával. Ezen összefüggések megértéséhez egy oldatfázisban lévő molekula mozgásának modelljére lenne szükségünk. A nagy molekulák esetében ez nem okoz nehézséget, mert a molekula egyes részei egymáshoz viszonyítva különböző translációs és rotációs mozgásokra képesek, melyek közül nagyobb része véletlenszerű. Általában ezt a random mozgást durva közelítésben egy *korrelációs idő* ( $\tau_c$ ) paraméterébe szokás összefoglalni. Mivel az oldatfázisban a molekula időről-időre más-más konformációt vesz fel és minden egyes orientációban csak pillanatnyi ideig tartózkodik, a  $\tau_c$  paraméter a két állapot között eltelt időtartamot, a makromolekula mozgásának egészét tekintve a részegységek  $\tau_c$  paramétereinek átlagát jelenti.

A  $\tau_c$  egy összetett paraméter, amely magába foglalja a molekuláris mozgást befolyásoló tényezőket, például a molekula mólsúlya (mérete) (*2 és 3 összefüggések*), az oldat viszkozitása (*2 összefüggés*) és koncentrációja, hőmérséklet (*2 összefüggés*), továbbá specifikusabb tényezők, mint hidrogénkötés és *pH*. Így a nagy molekulák (makromolekulák)

mozgása oldatfázisban lassúbb, mint a kis molekuláké és ebből kifolyólag rájuk hosszabb korrelációs idők jellemzők. Az oldószer viszkozitása és az oldat koncentrációja szintén fontos szempontok, mivel a kis molekulák viszkózus közegben vagy az oldat magas koncentrációja esetén lassabban mozognak és gyakran erős szolvatáló hatás vagy nagy asszociátumok keletkezése következtében nagyobb mólusúlyú molekulaként viselkednek, ami a korrelációs idejük növekedésével jár. További fontos paraméter, mely befolyásolhatja a  $\tau_c$  nagyságát - a hőmérséklet, ennek növekedésével felgyorsul a molekuláris mozgás és a korrelációs idő csökken.

A korrelációs idő becslésére és számítására számos módszer áll rendelkezésre. Debye szerint molekula izotróp mozgása esetén a  $\tau_c$  paraméter hasonlít a rotációs relaxációs időhöz:<sup>4</sup>

$$\tau_c = 4\pi\eta a^3 / 3\kappa T \quad (2)$$

- ahol a  $\eta$  paraméter az oldószer viszkozitását, míg az  $a$  paraméter a vizsgált molekula sugarát jelenti.

Az előbbi közelítést használva és megadva a szerves oldószerek viszkozitását hozzávetőlegesen le lehet írni egy olyan egyenletet, amely segítségével meg lehet becsülni a  $\tau_c$  értékét:

$$\tau_c \approx 10^{-12} W_M \quad (3)$$

- ahol  $W_M$  a vizsgált molekula móltömegét (daltonban) jelenti.

Egy adott spinrendszerben kétféle relaxációs folyamat létezik: a spin-rács és a spin-spin relaxáció. A spin-rács relaxációs mechanizmusban gyakran dipólus-dipólus kölcsönhatás dominál. Ez azt jelenti, hogy a spin-rács relaxációs sebesség ( $1/T_1$ ) egy adott magra első közelítésben a környezetében lévő magok számától és azoktól mért távolságától függ. A fentiek alapján lehet látni, hogy a relaxáció és korrelációs idő szoros kapcsolatban vannak egymással, pontosabban fordítottan arányosak. A korrelációs idő az NMR relaxációs paraméterek (<sup>13</sup>C spin-rács relaxációs idő) segítségével a következő egyenlet alkalmazása mellett határozható meg:

$$\frac{1}{T_1(^{13}\text{C})} = \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \frac{N\gamma_H^2\gamma_C^2\hbar^2}{r_{CH}^6} \tau_c \quad (4)$$

- ahol  $T_1(^{13}\text{C})$  a <sup>13</sup>C spin-rács relaxációs ideje;  $\mu_0$  a vákuum permeabilitása ( $4\pi \times 10^{-7}$  mkg<sup>2</sup>A<sup>-2</sup>);  $N$  az adott szén-13-hoz közvetlenül kapcsolódó protonok száma;  $\gamma_H$  és  $\gamma_C$  a megfelelő mágneses mag giromágneses hányadosa;  $\hbar$  -  $2\pi$ -vel osztott Planck állandó;  $r_{CH}$  - az adott szén-13 és hozzá kapcsolódó proton közötti távolság;  $\tau_c$  - az  $r_{CH}$  távolság-vektor rotációs korrelációs ideje.

## 2.2. Sebességi állandó és átlagélettartam meghatározása

A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó, illetve *transz* és *cisz* rotamerek átlagélettartama a NOESY spektrum keresztcsúcsai segítségével az alábbi képlet alkalmazásával határozható meg<sup>5</sup>:

$$\ln \frac{r+1}{r-1} = k \cdot t_m \quad (5)$$

- ahol  $r = 4X_{trans}X_{cisz}(I_{trans-transz} + I_{cisz-cisz}) / (I_{trans-cisz} + I_{cisz-transz}) - (X_{trans} - X_{cisz})^2$ ;  
 $X_{trans}$  és  $X_{cisz}$  - megfelelő moltiplicitások (a populáció nem egyenlő);  
 $I_{trans-transz}$ ,  $I_{cisz-cisz}$ ,  $I_{trans-cisz}$ ,  $I_{cisz-transz}$  – a megfelelő diagonális és cserélődési keresztcsúcsok térfogati integrál értékek;  
 $k$  - a *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó [ $s^{-1}$ ], amely a *transz-cisz* ( $k_{trans-cisz}$ ) és a *cisz-transz* ( $k_{cisz-transz}$ ) reakció sebességi állandók összege;  
 $t_m$  - keverési idő [s].

## 2.3. Az öttagú gyűrű pszeudorotációja

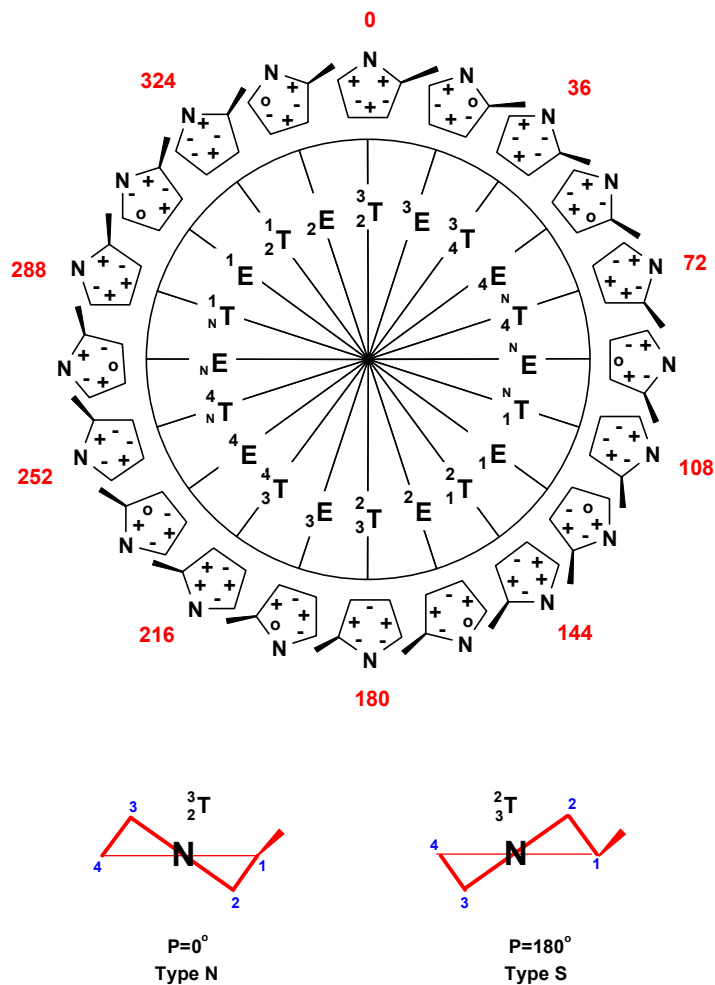
Ismert, hogy az öttagú gyűrű összes konformációs lehetőségeit a pszeudorotációs kör segítségével lehet feltérképezni. Az öttagú gyűrű mozgását a (6) összefüggéssel lehet leírni<sup>6,7</sup>. Az összefüggésben szereplő  $P$  szög  $18^\circ$ -onkénti változtatása egy-egy újabb félszék illetve boríték konformerhez vezet (1. ábra). A  $P$  szöget (7) egyenlet segítségével határozhatjuk meg, az öttagú gyűrű belső torziós szögeiből. A  $0^\circ$ -os  $P$  értékű félszék formát “északi” konformernek (N), a  $180^\circ$ -os félszékét pedig “déli” konformernek (S) nevezik (1. ábra).

$$\theta_j = \theta_m \cos(P + j\delta) \quad (6)$$

- ahol  $j=0-4$ ,  $\delta=144^\circ$ ; ha  $j=0$ , akkor  $\theta_0 = \theta_m \cos P$

$$\operatorname{tg} P = \frac{(\theta_2 + \theta_4) - (\theta_1 + \theta_3)}{2\theta_0 (\sin 36 + \sin 72)} \quad (7)$$

- ahol a  $\theta_{0,1,2,3,4}$  paraméter az öttagú gyűrű belső torziós szög értéke (fokban)



1. ábra

A prolilgyűrű konformációs eloszlása a pszeudorotációs térben. Az "N" és az "S" konformerek jelölése

Haasnoot és munkatársai<sup>8</sup> 4 $\alpha$ -hidroxiprolinban (*Hyp*), 4 $\alpha$ -fluoroprolinban (*Fpro*) és N-acetil-4 $\alpha$ -hidroxiprolinban (*NAcHyp*) meghatározták a prolilgyűrű pszeudorotációs paramétereit ( $P_N$ ,  $\theta_{Nmax}$ ;  $P_S$ ,  $\theta_{Smax}$ ) és ezzel a gyűrű konformációját. A szerzők szerint az öttagú gyűrű konformációja vizes közegben *Hyp* és *Fpro* prolin származékok esetén kizárólag az N konformer családhoz tartozik ( $\chi_N=1$ ;  $P_{N,Hyp}=13^\circ$ ,  $\theta_{Nmax,Hyp}=44^\circ$ ;  $P_{N,FPro}=14^\circ$ ,  $\theta_{Nmax,FPro}=42^\circ$ ). A két vegyület  $P_N$  értékei alapján a gyűrű konformációja a  ${}^\gamma T_\beta$ - ${}^\gamma E$  konformerek tartományába esik. A *transz-NAcHyp* vegyület esetén az N konformer mellett kb. 9% S konformer (N/S~9/1) is jelen van ( $P_{N,transzNAcHyp}=21^\circ$ ,  $\theta_{Nmax,transzNAcHyp}=46^\circ$ ,  $P_{S,transzNAcHyp}=147^\circ$ ,  $\theta_{Smax,transzNAcHyp}=26^\circ$ , rms=0.26 Hz), a *cisz* izomer esetén N/S=3/1 konformer arányt kaptak a következő pszeudorotációs paraméterekkel:  $P_{N,ciszNAcHyp}=23^\circ$ ,  $\theta_{Nmax,ciszNAcHyp}=51^\circ$ ,  $P_{S,ciszNAcHyp}=121^\circ$ ,  $\theta_{Smax,ciszNAcHyp}=27^\circ$ , rms=0.29 Hz. A cikk szerzői szerint a vegyület gyűrű konformációja dominánsan a  ${}^\gamma E$ - ${}^\gamma T_\delta$  konformerek tartományába esik és arra lehet következtetni, hogy az N-acil kötés körüli gátolt rotáció lényegesen nem befolyásolja az öttagú prolilgyűrű konformációját.

## 2.4. Aromás gyűrűáram hatása (“ring current”)

1953-ban Meyer és mtsi<sup>9</sup> megfigyelték, hogy az <sup>1</sup>H NMR spektrumban a benzol protonok kb. 1.5 ppm-mel nagyobb kémiai eltolódással bírnak (gyengébb térnél, illetve nagyobb frekvenciáknál jelentkeznek) mint az etilén protonok. 1956-ban Pople<sup>10</sup> a Pauling  $\pi$ -elektronáram keringéses modellt használva, szintén kimutatta, hogy a  $\pi$ -elektronáram keringése kis mágneses teret hoz létre, amely ellen hat a külső mágneses térnek és ezzel azt a hatást fejtí ki, hogy a benzol protonok nagyobb kémiai eltolódással bírnak az olefin protonokhoz képest. Ugyan abban az évben Pople, Bernstein és Schneider<sup>11</sup> elsőként a különböző kondenzált, fenilgyűrűt tartalmazó szénhidrogének <sup>1</sup>H NMR spektrumait vették fel és kimutatták, hogy az aromás gyűrűáram modell képes megmagyarázni az aromás protonok vártnál magasabb kémiai eltolódások jelenlétét az <sup>1</sup>H NMR spektrumban. A modell alapján azt lehetne feltételezni, hogy azok a protonok, amelyek egy adott molekulában az aromás gyűrű síkja alatt vagy fölött helyezkednek el az aromás gyűrű anizotróp hatásának ki lesznek téve, vagyis pozitív gyűrűáram hatást követően, erősebb tereknél, illetve alacsonyabb kémiai eltolódásoknál jelennek majd meg. Már 1957-ben Waugh és Fessenden<sup>12</sup> az előbb említett feltételezés helyességére vonatkozóan, kísérleti adatokat közöltek le, miszerint az 1,4-polimetilén benzol származékokban azok a metilén protonok, amelyek az aromás gyűrűk közelében, illetve az utóbbiak síkjától eltérően helyezkedtek el, az <sup>1</sup>H NMR spektrumban nagyobb térerőknél, illetve kisebb kémiai eltolódásoknál jelentek meg.

Az aromás gyűrűáram hatása az <sup>1</sup>H NMR spektrum proton kémiai eltolódásokra döntő szerepet játszott az annulének kémiájának és szerkezetének felderítésében. A  $[4n+2]$ -annulének és azok polidehidro- származékok “külső” protonjai a benzol protonjaihoz hasonlóan gyengébb tereknél (magasabb kémiai eltolódásoknál), míg a “belső” protonjai a porfirin protonokhoz hasonlóan, erősebb tereknél, illetve kisebb kémiai eltolódásoknál jelentek meg.

Az aromás gyűrűáram effektus a komplex biológiai molekulák (pl. nukleotidok, vitaminok, koenzimek stb.) konformációs problémák megoldásában széleskörű alkalmazásra talált.<sup>13,14</sup> A polipeptidek és kis proteinek esetén az aminosavak (pl. triptofán, hisztidin, fenilalanin, tirozin) különböző aromás csoportjainak aromás gyűrűáram hatásának vizsgálata, fontos információkat szolgáltat a fehérje terciér struktúrára nézve.<sup>15</sup>

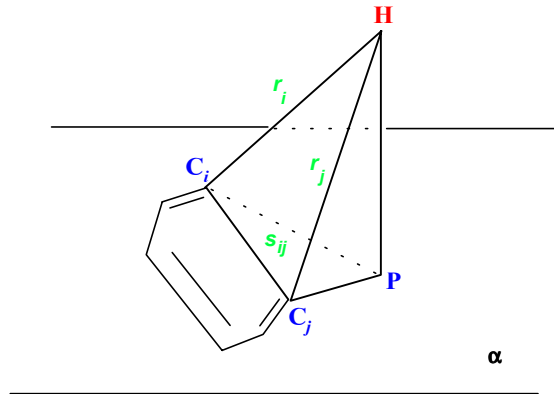
Jelen dolgozatban az aromás gyűrűáram hatás számítására Haigh-Mallion egyenlet<sup>16</sup> David A. Case által parametrizált<sup>17</sup> formájának alkalmazásáról számolunk be. Az aromás gyűrűáram okozta kémiai eltolódás változást a (8) és (9) egyenletek segítségével határozhatjuk meg:

$$\sigma_{rc} = iBG(r) \quad (8)$$

- ahol:  $\sigma_{rc}$  - aromás gyűrű okozta kémiai eltolódás változás, ppm;
- $r$  - a vizsgált proton aromás gyűrűtől való távolsága, Å;
- $G(r)$  - geometriai faktor, ami a vizsgált proton és az aromás gyűrű távolságától és helyzetétől függő szám;
- $i$  és  $B$  - az aromás gyűrű típusától függő állandók (fenilgyűrűre  $i=1$ ,  $B=5.455 \times 10^{-6} \text{Å}$ ).

A geometriai faktort a következő összefüggés írja le:

$$G(r) = \sum_{ij} s_{ij} \left\{ \frac{1}{r_i^3} + \frac{1}{r_j^3} \right\} \quad (9)$$

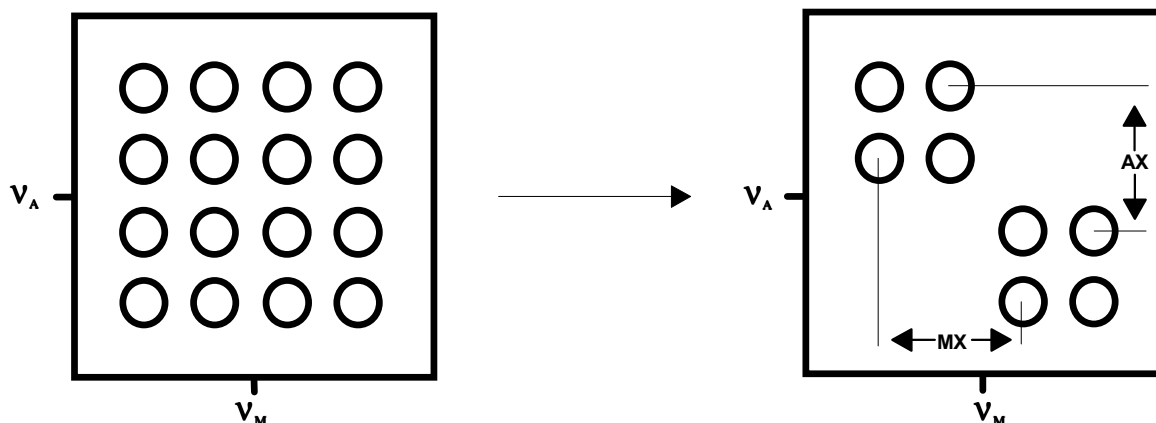


2. ábra

Az aromás gyűrűáram hatás számolásának módja:  $r_i$  és  $r_j$  - távolság az aromás gyűrű szénatomjától a vizsgált protonig, Å;  $s_{ij}$  - a  $C_iC_jP$  háromszög területe, Å<sup>2</sup>

## 2.5. E.COSY

Az AMX típusú spinrendszerek vizsgálata esetén, amikor az A és M magok - protonok és az X mag valamely NMR-ben aktív (1/2 spinű) heteroatom, E.COSY jellegű spektrumok jönnek létre<sup>18</sup>, amelyekben megjelenő keresztcsúcsok multiplicitása egyszerűsödik a standard 2D COSY spektrumokban megjelenő keresztcsúcsok multiplicitásához képest. A 2D COSY spektrumban, abban az esetben, amikor A, M és X magok - protonok, mindhárom mag mágneszettsége kölcsönhatásba lép egymással és egy olyan 2D multiplettet hoz létre, amely a három mag egymás között fellépő csatolása következtében 16 komponensből áll. Abban az esetben, amikor az A és a M magok - protonok, de az X mag NMR-ben aktív heteroatom, a mágneszettség átvitel csak az A-ról M-re történik, mivel az X magot nem gerjesztjük. Így a fentebb említett 16 komponensből álló COSY keresztcsúcs 8 komponensű keresztcsúcsá redukálódik, amely komponensei egymáshoz képest el vannak tolódva az egyik dimenzióban AX, a másikban pedig MX csatolás szerint (3. ábra).



3. ábra

A COSY és E.COSY spektrum "off" diagonális keresztcsúcs multiplicitásának sematikus ábrázolása

## 2.6. A $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$ spin-spin csatolási állandók meghatározása

Az irodalomban már többen próbálkoztak a  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  csatolások és diéderes szögek közötti összefüggés felállításával.<sup>19,20</sup> A szerzők feltételezték, hogy a proton-proton vicinális csatolásokhoz hasonlóan a fluor-proton vicinális csatolások is függenek a diéderes szögtől, a kötéshossztól, a kötésszögtől és a szomszédos atomok elektronegativitásától. Már a 60-as évek végén nagy számú  $^3J_{\text{H,F}}$  csatolást határoztak meg, de a molekulák konformációs flexibilitása miatt nem tudták ezeket az adatokat a diéderes szög függvényében értelmezni. Sok kísérlet irányult arra, hogy merevebb rendszereket állítsanak elő. A telített aliciklikus vegyületekben a szén-szén egyes kötés körüli rotációt és a telített gyűrű rendszerek konformációs átalakulásait a polihalogén származékok képzésével és a hőmérséklet csökkentésével gátolták meg, de a  $^{4,5}J_{\text{H,F}}$  (négy vagy öt kötésen keresztüli) spin-spin csatolások miatt a  $J_{\text{H,F}}$  értékek pontos meghatározása nem volt lehetséges. Williamson és munkatársai<sup>13</sup> a fentebb említett nehézségek kiküszöbölésére a  $^3J_{\text{H,F}}$  csatolásokat olyan biciklusos rendszerekben határoztak meg, amelyekben a diéderes szög értéke rögzített volt. Abraham és Cavalli<sup>21</sup> leírták, hogy a  $^3J_{\text{H,H}}$  csatoláshoz hasonlóan a vicinális  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  csatolás lineárisan függ a szubsztituensek elektronegativitásától, de a  $^3J_{\text{H,F}}$  csatolások csökkenése a szubsztituensek elektronegativitás növekedésével kb. négyszeres a  $^3J_{\text{H,H}}$  csatolásokhoz képest. A közleményekben javasolt egyenletek a következők:

$$\begin{aligned}
 {}^3J_{\text{H,F}} &= A \cos^2 \varphi, & 0^\circ \leq \varphi \leq 90^\circ \\
 {}^3J_{\text{H,F}} &= B \cos^2 \varphi, & 90^\circ \leq \varphi \leq 180^\circ, & B \approx 2A
 \end{aligned}
 \tag{10}$$

### 3. A prolil-endopeptidáz (PEP) inhibitorok szerkezetvizsgálata NMR módszerekkel

#### Bevezetés

A PEP a szerin peptidázok csoportjába tartozó 710 aminosavat tartalmazó monomer szerkezetű fehérje, melynek mérete kb. 80kD, amely a prolin tartalmú oligopeptideket a prolin karboxi terminális helyén hasítja.<sup>22,23</sup> A prolil-endopeptidáz nem mutat szekvencia homológiát a többi ismert szerin peptidázzal (*tripszin (His-Asp-Ser)*, *szubtilizin (Asp-His-Ser)*), különbözik a katalitikus triád sorrendjében (*Ser-Asp-His*), továbbá abban is különbözik a szerin peptidáz család többi tagjától, hogy nem tartalmaz szabad NH csoportot. Így ez az enzim a szerin proteázok egy új családjának képviselője.<sup>24,25</sup> Az enzim mechanizmusának tanulmányozása során Polgár László mutatta ki, hogy a sebesség meghatározó lépés az enzim konformáció változása a szubsztrátum kötődése során.<sup>26</sup>

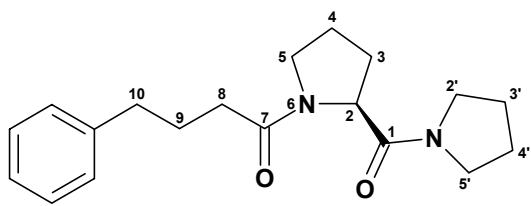
Az 1971-ben felfedezett, prolil-endopeptidáz (PEP) enzim, az *oxytocin* Pro-Lys (prolin-lizin) kötését hasítja.<sup>27</sup> Azóta kimutatták, hogy a PEP az emlős szervezetben számos helyen előfordul, legnagyobb mennyiségben és koncentrációban az agy *hippocampus* és *cerebrális cortex* részében.<sup>28</sup> A prolil-endopeptidáz egyaránt megtalálható a *citoszolban* és membránhoz kötött formában is.<sup>29</sup>

A PEP endogén szubsztrátjaként számos prolin-tartalmú neuropeptid és hormon szerepelhet. A *Substance P (H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>)* és *vasopressin-arginin (NH<sub>2</sub>-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH<sub>2</sub>)* neuropeptidek fontos szerepet játszanak a tanulásban és a memória javításában. E két neuropeptid szintje csökkent az Alzheimer típusú megbetegedésekben szenvedőknél. A TRH (*Thyreotrop-Releasing Hormon: pGlu-His-PRO-NH<sub>2</sub>)* igen fontos szerepet játszik ugyancsak a tanulási folyamatoknál<sup>17b</sup> és a memória javításánál.

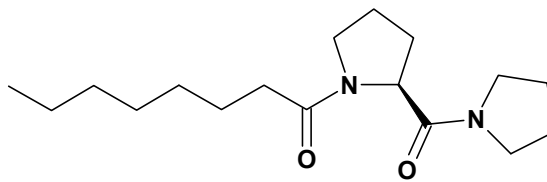
A fentiek alapján feltételezhető, hogy egy hatékony prolil-endopeptidáz gátló értékes farmakón lehet tanulási folyamatok befolyásolására és neurodegeneratív megbetegedések gyógyítására<sup>30</sup>, szerencsésebb esetben megelőzésére. Így a Chinoi Gyógyszer- és Vegészeti Termékek Gyára RT. K+F osztályán 1993-ban új PEP gátlók kutatásába kezdtünk, ami magába foglalta a PEP addig nem ismert háromdimenziós szerkezetének meghatározását. Utóbbi téma 1998-ban sikerrel zárult<sup>31</sup>.

A szakirodalomban két olyan molekulát találtunk, amely kémiai tervünkénél mint *vezérmolekulát* számba vehettünk. Ezek közül a SUAM-1221 (**1**) jelű szerkezetének módosítása mellett döntöttünk, annak ellenére, hogy a szakirodalomban leírt nem peptid típusú piridin származék<sup>32</sup> hatékonyabbnak tűnt. Utólag kiderült<sup>33</sup>, hogy helyesen döntöttünk, mivel amikor a piridin származékot referensként alkalmazták, megállapították, hogy az aktivitása csak töredéke a korábban közölteknek.

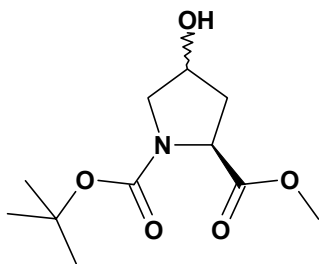
A SUAM-1221 molekula csoportjainak hatását a biológiai rendszerre vizsgálva, számos olyan származékhoz jutottunk, amelyek figyelemre méltó biológiai aktivitást mutattak. A dolgozat **3.** fejezetében a **4. ábrán** látható molekulák szerkezetének és oldatkonformációinak meghatározásáról számolunk be a különböző NMR módszerek segítségével.



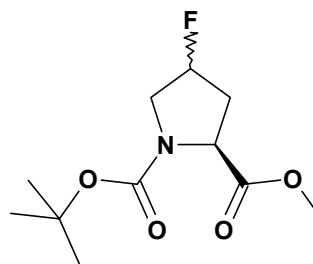
1



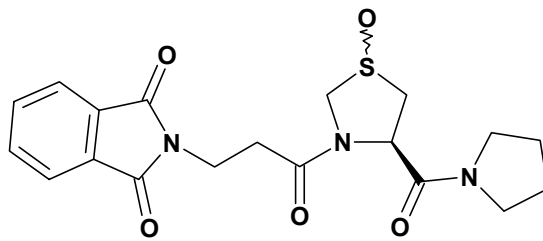
2



3



4



5

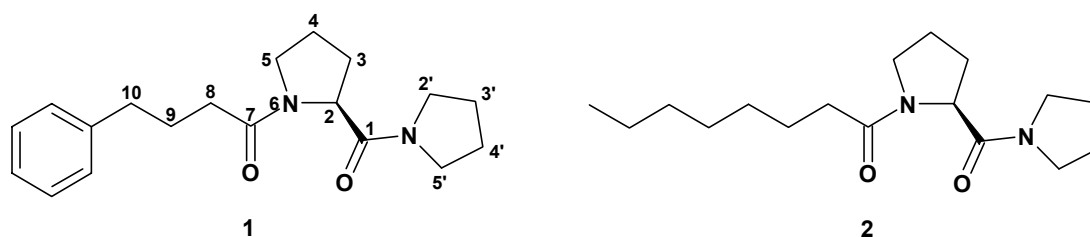
4. ábra

## Saját vizsgálatok

### 3.1. A SUAM-1221 jelű molekula térszerkezetének és oldatkonformációjának meghatározása<sup>34</sup>

#### 3.1.1. Bevezetés

Yoshimoto már tíz évvel ezelőtt kimutatta, hogy a SUAM-1221 kódú inhibitor molekula (**1**) kiküszöböli egerekben a szkopolamin indukálta memória zavarokat.<sup>35</sup> A PEP inhibitorok hatás-szerkezet összefüggésének megértéséhez szükséges e vegyületek konformációs sajátságait ismernünk, ezért korábban elvégeztük **1** (1-(4-fenilbutanoil)-2-(1-pirrolidinilkarbonil)pirrolidin) vegyület konformáció analízisét.<sup>36</sup> Molekulamechanikai és félempirikus kvantum kémiai számításokkal két, külön-külön több száz hasonló energiájú szerkezetet tartalmazó konformer készletet kaptunk. Mindkét módszernél az alacsonyabb energiájú formákban a fenilcsoportot a karbonillal összekötő alifás lánc hajlított, a fenilcsoport a két öttagú gyűrű egyikének közelébe kerül, a konformereket globálisan U-alakkal jellemezhetjük. Ugyanakkor hasonló molekulák egykristály röntgen diffrakciós vizsgálat szerint az alifás lánc nyújtott volt.<sup>37</sup>



#### 3.1.2. A SUAM-1221 molekula <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR spektrumok hozzárendelése

Az **1** vegyületről különböző oldószerben <sup>1</sup>H NMR spektrumokat vettünk fel. A legjobb jelszeparációt deuterált benzolban észleltük és emiatt először ebben az oldószerben végeztünk részletes vizsgálatokat. Az <sup>1</sup>H NMR spektrum egyértelmű asszignációját részben a 2D TOCSY részben pedig 2D NOESY spektrumok alapján végeztük el. Az anyag <sup>1</sup>H NMR spektrumában két jelsorozatot figyeltünk meg 91:9 intenzitásarányban, ami a prolilamid kötés körüli gátolt rotáció következtében az oldatfázisban kialakult *transz* és *cisz* izomerek egyensúlyának eredménye<sup>38,39</sup> (5. ábra).

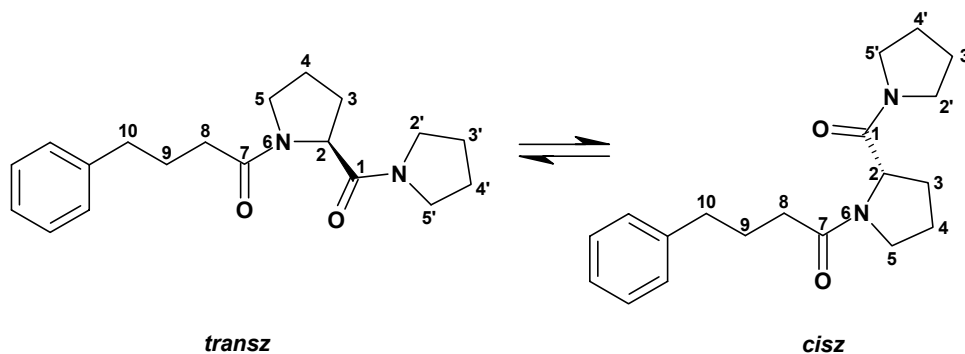
Az **1. táblázatban** (lásd 27. oldal) összefoglalt C-13 relaxációs idők értékei arra utaltak, hogy a SUAM-1221 molekula különböző részeinek mozgását hasonló értékű korrelációs idő ( $\tau_c$ ) jellemzi. A korrelációs idők számításához a vizsgált molekula propil lánc, prolil és pirrolidil gyűrűk mért <sup>13</sup>C spin-rács relaxációs időket használtuk. A (4) összefüggést alkalmazva a következő  $\tau_c$  értékeket kaptunk\*:

$$\tau_{C-9} = \tau_{C-5} = \frac{(1.12)^6 \cdot 10^{-60} m^6}{2 \cdot 1.4 s \cdot 10^{-14} m^2 kg^2 s^{-4} A^{-4} \cdot (26.75)^2 \cdot (6.73)^2 \cdot 10^{28} T^{-4} s^{-4} \cdot (1.055)^2 \cdot 10^{-68} J^2 s^2} = 19.5 \cdot 10^{-12} s^*$$

$$\tau_{C-2} = \frac{(1.12)^6 \cdot 10^{-60} m^6}{1.9 s \cdot 10^{-14} m^2 kg^2 s^{-4} A^{-4} \cdot (26.75)^2 \cdot (6.73)^2 \cdot 10^{28} T^{-4} s^{-4} \cdot (1.055)^2 \cdot 10^{-68} J^2 s^2} = 28.8 \cdot 10^{-12} s$$

A számolásból látható, hogy nem viszkózus oldószerben (deuterált benzolban) a molekula egészének mozgását átlagosan kb. 24 pikoszekundumos korrelációs idő jellemzi. A két-spin közelítést alkalmazva, feltételezve, hogy a dipólus-dipólus relaxáción kívül más relaxációs mechanizmusok (paramágneses és kvadrupólus relaxáció, kémiai eltolódás anizotrópia, skaláris csatolás és spin-rotációs relaxáció) nem játszanak számottevő szerepet lehetővé vált a NOESY keresztcsúcsok kvantitatív értékelése.

A fázisérzékeny 2D NOESY spektrumban diagonális jelekkel ellentétes (negatív) fázissal jelentkeztek a térközelség miatt egymással NOE kölcsönhatásban levő protonoktól, míg azonos (pozitív) fázissal, az egymással kémiai kicserélődésben levő protonoktól származó keresztcsúcsok. A prozilgyűrű diasztereotóp protonjainak hozzárendelését a különböző keverési idők mellett felvett NOESY spektrumokban a negatív jelek térfogati integráljai alapján végeztük el. A térfogati integrál értékeket a keverési idő függvényében ábrázoltunk. A 6. ábrán látható, hogy az NOE felépülés lineáris szakasza 450 msec-os keverési időig tart. Így minden egyes, lineáris szakaszhoz tartozó keresztcsúcs NOE telítési görbéhez illesztettünk egy egyenest és annak a meredekségét (*tga*-ját) határoztunk meg<sup>40</sup>, amely értéke a mag-mag távolságokról információkat szolgáltatott (minél közelebb van a két vizsgált mag egymáshoz, annál nagyobb értékű *tga*-t kapunk). Az így kapott eredményeket a 2. táblázatban (28. oldal) foglaltuk össze.



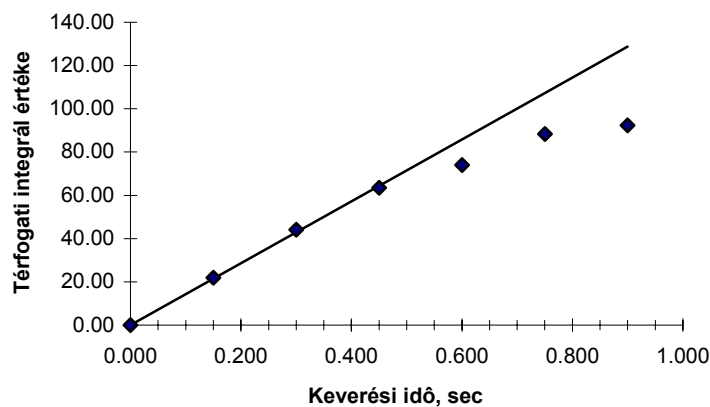
5. ábra

A prozilgyűrűben mért vicinális csatolási állandók értékei (1. táblázat) arra utaltak, hogy az öttagú gyűrűt benzolos oldatban konformációs egyensúly jellemzi, de ilyen rendszerekben is az várható, hogy a gyűrű azonos oldalán található protonok között nagyobb NOE kölcsönhatás lép fel mint az ellentétes oldalakon levők között. Ismerve 2- $H_{\alpha}$  térállását a keresztcsúcs intenzitások arányaiból a 3, 4 és 5- $H_2$  metilén proton párokat rendre hozzárendeltük a fő jelsorozatban. A fő jelsorozat hozzárendelését a minor komponens összes,

\* -  $N=2$  (mivel  $CH_2$ );  $\mu_{\sigma} = 4\pi \times 10^{-7} \text{ kgs}^{-2} \text{ mA}^{-2}$ ;  $\gamma_H = 26.75 \times 10^7 \text{ radT}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\gamma_C = 6.73 \times 10^7 \text{ radT}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $\hbar = 1.055 \times 10^{-34} \text{ Js}$ ;  $T(\text{tesla}) = \text{s}^{-2} \text{ A}^{-1} \text{ kg}$ ;  $J = \text{m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ kg}$

még a fő sorozattal átfedő jeleire is át tudtuk vinni a NOESY spektrumban azonosított kicserélődési csúcsok segítségével (lásd **1. táblázat**).

Az  $^1\text{H}$  NMR jelhozzárendelés alapján 2D HMQC és 2D HMBC mérések segítségével elvégeztük a  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendelést is (**1. táblázat**).



6. ábra

Az NOE felépülése (SUAM-1221,  $5\text{H}_2$ )

### 3.1.3. A *transz* és a *cisz* rotamerek jelhozzárendelése

A peptidkémiai nomenklatúra szerinti *transz* és *cisz* rotamerek jelhozzárendelését több NMR paraméter is igazolja. Először, a fő konformerben a 8- $\text{H}_2$  és 5- $\text{H}_2$  protonok közötti NOE kölcsönhatás utalt rá, hogy benzolos oldatban a többségi izomer a *transz* szerkezetnek felel meg (**2. táblázat**). Másodszor, a prolil  $\beta$  (C(3)) és  $\gamma$  (C(4)) szénatomok (**1. táblázat**) közötti kémiai eltolódás különbség, összhangban az irodalomban leírtakkal,<sup>41</sup> a *transz* izomerben 4.1 ppm, míg a *cisz* formában 9.3 ppm. Egy további jellegzetes különbséget is megfigyeltünk, miszerint a prolil  $\delta$  (C(5)) protonjai közötti  $^2J$  csatolási állandó a *transz* szerkezetnél 9.5 Hz, míg a *cisz* formában 11.5 Hz. Az amid rotamerek hatását a nitrogénnel szomszédos metilén csoport geminális csatolására N-acetil-oktahidroimidazo[1,5- $\alpha$ ]piridinek esetén is leírták<sup>42</sup>, de tudomásunk szerint peptideknél a prolin konformerek azonosítására még nem használták. Ez a megfigyelés lehetőséget nyújtott a 2'- $\text{H}_2$  és 5'- $\text{H}_2$  metilén csoportok megkülönböztetésére, illetve hozzárendelésére, ugyanis a geminális protonok között mért csatolási állandó a két metilén csoport közül az egyikben - 11.8 Hz, ez rendelhető az amid oxigénnel *cisz* helyzetű C(5') metilén csoporthoz, míg a másik csoport jelei a 8.9 Hz-es csatolási állandó alapján a *transz* helyzetű C(2') metilén csoport protonjaihoz tartoznak.

### 3.1.4. Oldószerhatás tanulmányozása a *transz/cisz* izomer arányra

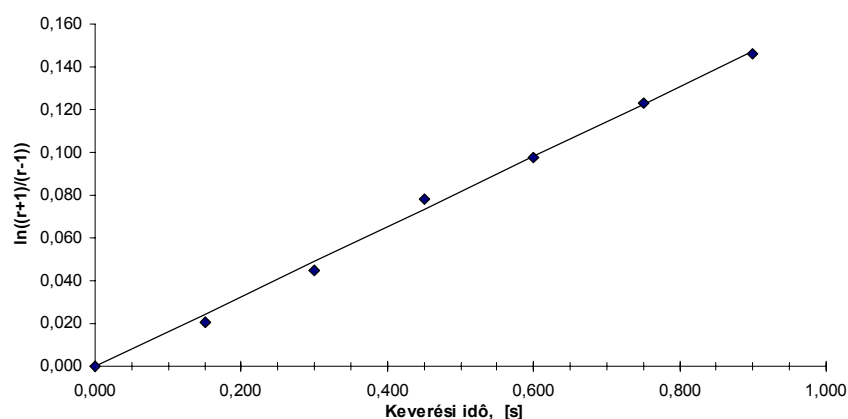
A *transz/cisz* izomerek egyensúlyi arányát az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban a két jelsorozat szeparáltan jelentkező jeleinek intenzitás arányából határoztuk meg. Ezt az eljárást több oldószerben is megismételtük, a kapott eredményeket a **4. táblázatban** (28. oldal) tüntetjük fel a megfelelő spektroszkópai információkkal együtt. A hozzárendelést egyes oldószerekben

a *transz* izomer 5-H<sub>2</sub> és 8-H<sub>2</sub> protonjai között megfigyelt NOE kölcsönhatás, más oldószerekben a C(4) és C(5) <sup>13</sup>C kémiai eltolódás különbsége tette egyértelművé. A **4. táblázatban** adjuk meg a molekulamechanikai és félempirikus kvantumkémiai módszerekkel számított *transz/cisz* izomer arányokat is. Az említett táblázatból látható, hogy az apoláros oldószerektől polárosok felé haladva, a *transz/cisz* izomer arány a *cisz* rotamer javára változik.

### 3.1.5. A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó, *transz* és *cisz* rotamerek átlagélettartamának meghatározása

A *transz-cisz* átalakulás reakciósebességét a NOESY spektrumban megfigyelt cserélődési jelek intenzitásai alapján az (5) összefüggés segítségével számoltuk ki.<sup>5</sup> Ezt az összefüggést a keverési idő függvényében ábrázolva (7. ábra) lineáris regresszióval kaptuk a *transz-cisz* reakciósebességi állandó értékét (0.2 s<sup>-1</sup>), amiből adódik, hogy a *transz* rotamer átlagélettartama 1 perc körüli érték, míg ugyanez a *cisz* izomerre kb. 7 másodperc. Minden egyes keverési időre meghatározott *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó a várakozásnak megfelelően a kísérleti hibahatáron belül azonosnak bizonyult (**3. táblázat**, 28. oldal).

A molekulában a pirrolidilgyűrűhöz is egy amid kötés kapcsolódik. Az e kötés körüli gátolt rotáció azonban a pirrolidilgyűrű szimmetriája miatt nem eredményezi a jelek további megduplázódását. A gátolt rotáció tényét a 2'-H<sub>2</sub> és 5'-H<sub>2</sub> protonok illetve a 3'-H<sub>2</sub> és a 4'-H<sub>2</sub> protonok kémiai eltolódás különbségei jelzik. A NOESY spektrumban az 5'-H<sub>a</sub> és 2'-H<sub>b</sub> valamint 5'-H<sub>b</sub> és 2'-H<sub>a</sub> protonok között cserélődési csúcsok (**1. táblázat**) igazolják, hogy az alkalmazott keverési idők alatt ezen amid C-N kötés mentén is átfordulások történnek. A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandót itt is a NOESY cserélődési keresztcsúcsok integrált intenzitásai alapján határozhatjuk meg. Az (5) egyenlet ebben az esetben egyszerűsödik, mivel a két rotamer moltörtje egyenlő. Számolások szerint a *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó értékei deuterált benzolban és deuterált acetonban 0.3 s<sup>-1</sup>. NOESY cserélődési keresztcsúcsok D<sub>2</sub>O és foszfát puffer oldószerek esetén nem jelentkeztek a spektrumban, ami arra utal, hogy ezekben az oldószerekben a két amid kötés körüli gátolt rotáció sebessége sokkal lassúbb, mint a szerves oldószerekben<sup>43</sup>.



7. ábra

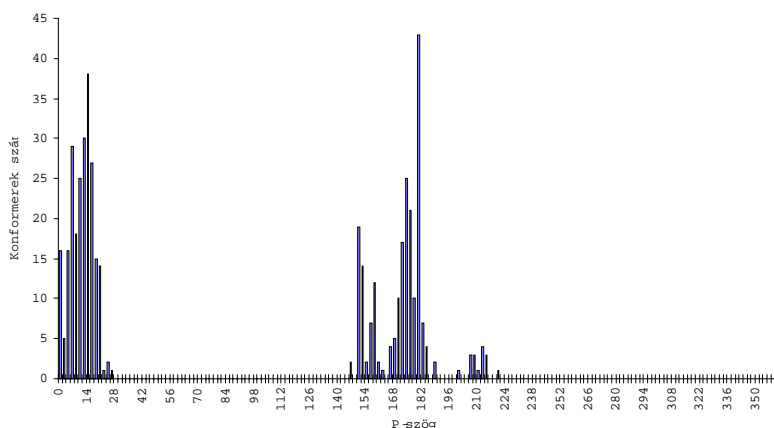
A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó meghatározása (lineáris regresszió, SUAM-1221)

### 3.1.6. A prolilgyűrű térszerkezetének meghatározása

A molekula egy másik konformációs sajátossága a prolilgyűrűhöz kapcsolódik. A következő hisztogramon (8. ábra) adjuk meg a molekulamechanika módszerrel kapott konformerek eloszlását a pszeudorotációs térben a kiszámított  $P$  értékek alapján<sup>6,7</sup>. Az ábrán látható, hogy erre az adatkészletre két konformer család jellemző: az egyik északi ( $P \approx 0-27^\circ$ ), a másik pedig déli ( $P \approx 150-220^\circ$ ). Ez összhangban van az irodalmi adatokkal<sup>8</sup>, miszerint az egykristály röntgen diffrakciós és NMR paraméterek (a prolin származékokra és a prolintartalmú peptidekre) alapján a legtöbb stabil N konformerben a  $P$ -érték  $-10^\circ$  és  $+17^\circ$  között, míg az S konformerekben  $146^\circ$  és  $200^\circ$  között változik, miközben a stabil konformerekben  $\theta_m$  paraméter, amely az öttagú gyűrű síktól való eltérését jellemzi,  $30^\circ$  és  $40^\circ$  között van.

Az oldatban uralkodó konformer egyensúlyról a gyűrűprotonok  $^3J_{H,H}$  vicinális csatolási állandói nyújtanak információt. Az N és a S konformer családok egy-egy jellemző konformerjére a módosított Karplus összefüggés alkalmazásával<sup>44</sup> számolt  $^3J_{H,H}$  értékeket összevetve a mért csatolási állandókkal, lineáris regresszióval N/S arányt határoztunk meg (5. táblázat, 29. oldal). A számolt adatok N/S=1/2 arány mellett közelítették meg legjobban a mért eredményeket. A két konformer család tagjainak számított energiája alapján a Boltzmann összefüggéssel meghatározott N/S arány viszont 4/1-nek adódott. Összefoglalva: az NMR adatokból az oldatfázisban az S, molekulamechanikai számításokkal viszont az N konformáció populációja nagyobb.

A félempirikus kvantumkémiai módszer ettől eltérő eredményt adott, nevezetesen az így kapott konformereloszlás egyenletes volt.



8. ábra

Molekulamechanika módszerrel számolt konformerek eloszlása a pszeudorotációs térben a kiszámított  $P$  értékek alapján

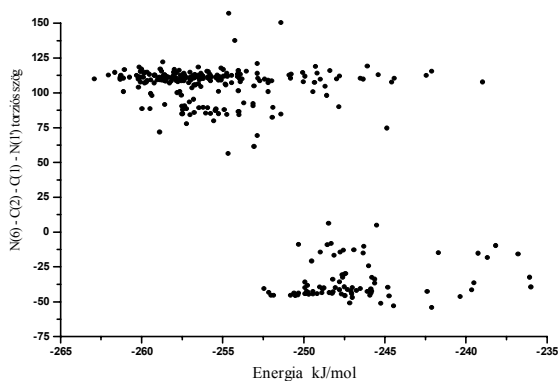
### 3.1.7. A prolil- és pirrolidilgyűrűk egymáshoz viszonyított térhelyzetének meghatározása

A két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzetét a C(1)-C(2) kötés körüli torziós szög meghatározásával lehet megadni. A C(1)-C(2) kötés körüli rotamerek kétféle módszerrel

számított populációját a *transz* amid izomerre a 9. ábrán és 10. ábrán mutatjuk be. A félempirikus kvantumkémia számolások során a  $\varphi(N(6)-C(2)-C(1)-N(1'))$  torziós szög a konformerek energiájától való függés ábrázolása után, két konformer családot kaptunk. A 9. ábrán látható, hogy az egyik családban a  $\varphi$  - szög  $\sim -40^\circ$ -nak a másikban pedig  $\sim 120^\circ$ -nak felel meg. Az ábrán látható, hogy a kisebb populációjú konformer család, amelyet az  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög kb.  $-40^\circ$ -os értéke jellemez igen nagy energiájú konformereket tartalmaz ( $\sim 15$ - $20$  kJ/mol), így csak a kisebb energiájú konformereket vettünk figyelembe: ezek az említett torziós szög kb.  $120^\circ$ -os értékéhez tartoznak.

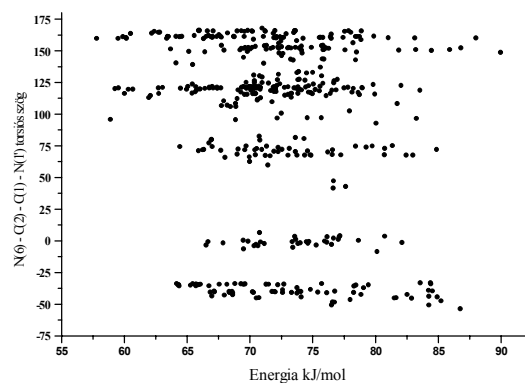
A molekulamechanika módszerrel három konformer családot kaptunk, melyeknél a  $\varphi$ -szög az első két családban  $\sim -40^\circ$  és  $\sim 70^\circ$  körüli, míg a harmadikban  $\sim 120^\circ$  és  $160^\circ$  között változott (10. ábra). Az ábrából látható, hogy az utóbbi konformer család populációja nagyobb.

A számítások szerint tehát az  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög  $120$ - $160^\circ$  között változik, mint ez a legalacsonyabb energiájú *transz* konformer esetére a 11. ábrán bemutatjuk. Fenti torziós szögre vonatkozólag a két gyűrű protonjai között megfigyelt NOE kölcsönhatások adnak információt. A pirrolidilgyűrű N-metilén protonjai között megfigyelt geminális csatolási állandó értéke lehetőséget nyújtott a  $2'$ -H<sub>2</sub> és a  $5'$ -H<sub>2</sub> metilén csoportok megkülönböztetésére, illetve hozzárendelésére, ugyanis a geminális protonok között mért csatolási állandó (11. ábra) a két metilén csoport közül az egyikben 11.8 Hz, ez rendelhető az amid oxigénnel *cisz* helyzetű C(5') metilén csoporthoz, míg a másik csoport jelei a 8.9 Hz-es csatolási állandó alapján a *transz* helyzetű C(2') metilén csoport protonjaihoz tartoznak.



9. ábra

Félempirikus kvantumkémia módszerrel számolt C(1)-C(2) kötés körüli konformerek populációja  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög függvényében

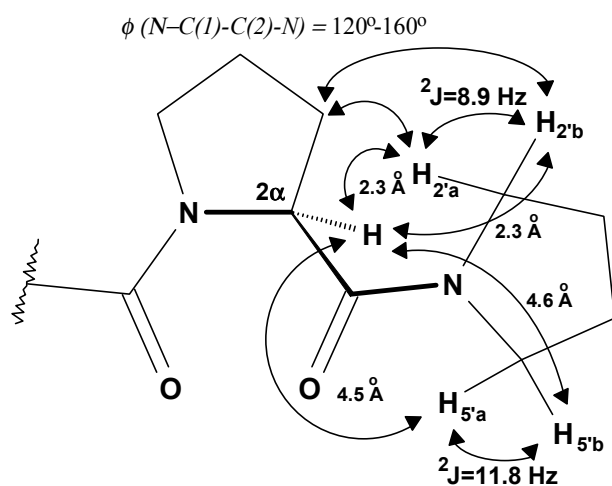


10. ábra

Molekulamechanika módszerrel számolt C(1)-C(2) kötés körüli konformerek populációja  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög függvényében

A két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzetét egy másik módszer segítségével is megvizsgáltunk. Kiválasztva a legkisebb energiájú *transz* rotamert, az  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szöget  $10^\circ$ -ként változtattunk és  $2$ -H<sub>α</sub> -  $2'$ -H<sub>a</sub>,  $2$ -H<sub>α</sub> -  $2'$ -H<sub>b</sub>,  $2$ -H<sub>α</sub> -  $5'$ -H<sub>a</sub> és  $2$ -H<sub>α</sub> -  $5'$ -H<sub>b</sub> protonok közötti távolságokat olvastuk le. Ezen konformerekben, a fentebb említett eljáráshoz hasonló módszerrel kiszámoltuk az NOE meredekségeket, illetve *tga* értékeket (2. táblázat), amelyeket az  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög függvényében ábrázoltunk. A  $2$ -H<sub>α</sub>-  $2'$ -H<sub>a</sub>,  $2$ -H<sub>α</sub> -  $2'$ -H<sub>b</sub> számolt NOE meredekségeket a változó torziós szög függvényében 12. ábra mutatja. Az ábrából egyértelműen kiderül, hogy  $108$ - $123^\circ$  és  $162$ - $178^\circ$  ( $2$ -H<sub>α</sub> -  $2'$ -H<sub>a</sub> protonok esetén) és  $89$ - $122^\circ$  ( $2$ -H<sub>α</sub> -  $2'$ -H<sub>b</sub> protonok esetén) torziós szög tartományokban a számított NOE intenzitások összhangban vannak a mért eredményekkel. Ezek alapján a

megengedett torziós szög  $108^\circ$  és  $122^\circ$  tartományba esik (ahol a két görbe fedi egymást), tehát a két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzete oldatban hasonló lehet ahhoz, amit a számítások alapján kaptunk. A  $2\text{-H}_\alpha$  -  $5'$ - $\text{H}_a$  és  $2\text{-H}_\alpha$  -  $5'$ - $\text{H}_b$  kölcsönhatásokra a torziós szög egész tartományában kis NOE meredekségeket kaptunk, mivel a proton-proton közötti távolságok  $4.5\text{-}5.1 \text{ \AA}$  között változtak. Így a  $2\text{-H}_\alpha$  -  $5'$ - $\text{H}_a$  és  $2\text{-H}_\alpha$  -  $5'$ - $\text{H}_b$  protonok közötti dipólus-dipólus kölcsönhatásokra számolt és a mért eredményeket nem használtuk a C(1)-C(2) kötés körüli konformáció meghatározására.

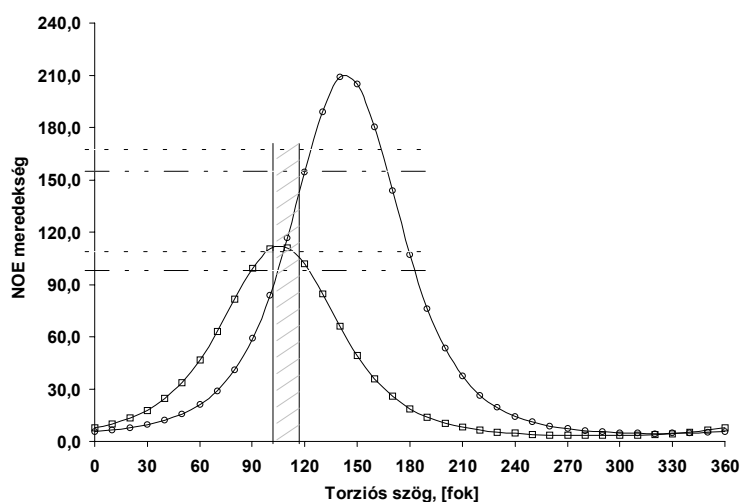


NOE keresztcsúcs	Számított jelintenzitás	Mért jelintenzitás
$2\text{H}_\alpha\text{-}2'\text{H}_a$	122.0	*143.1
$2\text{H}_\alpha\text{-}2'\text{H}_b$	122.0	*130.8
$2\text{H}_\alpha\text{-}5'\text{H}_a$	2.2	6.5
$2\text{H}_\alpha\text{-}5'\text{H}_b$	1.9	7.11

\* - felcserélhető hozzárendelés is lehetséges

11. ábra

A számított és a mért NOE térfogati integrál értékek összehasonlítása



12. ábra

A  $2-H_{\alpha} - 2'-H_{\alpha}$ ,  $2-H_{\alpha} - 2'-H_{\beta}$  számolt NOE meredekségek a változó  $N(6)-C(2)-C(1)-N(1')$  torziós szög függvényében

### 3.1.8. A fenil-propil oldallánc konformációja és az aromás gyűrűáramok hatása

A C(8)-C(10) lánc meghatározható csatolási állandói, 6-7 Hz-es, átlag értékűek, és a protonok közötti kis kémiai eltolódás különbség is azt jelzi, hogy a benzolos oldatban e szerkezeti részt több konformer egyensúlyi elegye jellemzi. Az elméleti számítások szerint a legkisebb energiájú konformerekben ez a lánc hajlított melynek eredményeként a fenilgyűrű a két öttagú gyűrű egyikének közelébe kerül, a molekula U alakú konformációt vesz fel (3.1.1. alfejezet, 13. ábra). A **2. táblázatban** összegyűjtött NOE adatok alapján látható, hogy a fenilgyűrű és az öttagú gyűrűk protonjai között kölcsönhatás nem volt kimutatható. A számított konformerek elemzése kimutatta, hogy az U-alakú konformerekben sem kerülnek 3.5 Å-nél közelebb az aromás protonok az öttagú gyűrűk protonjaihoz. Így az NOE kölcsönhatások hiánya nem zárja ki az U-alakú konformerek jelenlétét oldatban. Ezek kimutatására ezért egy másik NMR paramétert, az aromás gyűrűáramok okozta kémiai eltolódás változást kívántuk felhasználni. Összehasonlítás céljából (deuterált benzolban) megmértük az ugyancsak PEP inhibitor hatással rendelkező<sup>45</sup>, de aromás gyűrűt nem tartalmazó **2** (1-oktanoil-2-(1-pirrolidinilkarbonil)pirrolidin) vegyület <sup>1</sup>H NMR spektrumát.

A spektrumot 2D TOCSY és részben 2D NOESY spektrumok alapján asszignáltuk. A spektrumban szintén két jelsorozatot figyeltünk meg a *transz* és *cisz* konformereknek megfelelően, a *transz* forma domináns, az amid rotamerek aránya e vegyületnél 94:6 volt. A protilgyűrű csatolási állandói a mérési hibahatáron belül megegyeztek az **1** vegyületben talált értékekkel, azaz az öttagú gyűrűnek hasonló az oldat konformációja a két vegyületben. A két molekula megfelelő protonjai közt mért kémiai eltolódás különbségeket (**6. táblázat**) így az aromás gyűrűáramok hatásának tulajdoníthatjuk.

A *transz-cisz* átalakulás reakció sebességét a **2** molekula esetében is kiszámoltuk a NOESY cserélődési keresztcsúcs intenzitások alapján. Azt találtuk, hogy a protilgyűrű *transz-cisz* átalakulás reakció sebességi állandója deuterált benzolban  $0.40 \text{ s}^{-1}$ , míg deuterált

acetonban  $0.04 \text{ s}^{-1}$ ; a pirrolidilgyűrű esetén deuterált benzolban  $0.48 \text{ s}^{-1}$  és deuterált acetonban  $0.39 \text{ s}^{-1}$ .

A mért aromás gyűrűáramok hatása a *transz* illetve *cisz* izomerekre nem volt egyforma. A *transz* rotamer esetén a legnagyobb kémiai eltolódás csökkenést a prolilgyűrű 5- $\text{H}_\alpha$  és 4- $\text{H}_2$  protonjain tapasztaltunk, míg a *cisz* rotamerben a legnagyobb gyűrűáram hatást a 2- $\text{H}_\alpha$ , a 3- $\text{H}_\alpha$  és az egyik 2'-H protonon mértük (14. ábra), ami azt jelenti, hogy az oldatban az aromás gyűrű e protonok fölött vagy alatt helyezkedik el. Ahogyan már említettük, a kisebb energiájú konformerekre molekulamechanikai és félempirikus kvantumkémiai számolások alapján gáz fázisban a hajlított (U-alakú) konformerek populációja nagyobb, míg az egykristály röntgen diffrakciós adatok szerint, szilárd fázisban a molekula inkább lineáris. Ezek után arra a kérdésre kerestünk választ, hogy melyik módszer ad megbízhatóbb eredményt a konformációs viszonyokra nézve.

### 3.1.9. Aromás gyűrűáram hatása ("ring current") és Haigh-Mallion egyenlet alkalmazása

Az aromás gyűrűáram hatás számítására Haigh-Mallion egyenlet<sup>16</sup> David A. Case által parametrizált<sup>17</sup> formájának alkalmazásáról számolunk be. A (8) és (9) egyenletek segítségével meghatároztuk valamennyi számított konformer (molekulamechanika és félempirikus kvantumkémiai konformer készletekre) összes hidrogénjére az aromás gyűrűáram okozta kémiai eltolódás változást. Ezek után távolságokat határoztuk meg minden egyes proton és az aromás gyűrű atomjai, illetve síkja között (2. ábra). Az így kapott adatokból a (9) egyenlet segítségével a geometriai faktort ( $G(r)$ ) és ezt követően minden egyes konformerre a  $\sigma_{rc}$  paramétert határoztuk meg, majd a konformációk populációjával súlyozott átlagot számoltuk mind a molekulamechanikai, mind a kvantumkémiai számításokból kapott konformer készletre. Az így kapott eredményeket a **6. táblázatban** a mért értékek mellett tüntettük fel.

A **6. táblázatban** mért és számított adatok összehasonlításából látható, hogy a kísérletileg meghatározott aromás gyűrűáram hatások mindkét *transz*, illetve *cisz* izomerre sokkal kisebb értékek, mint azt a számolásokból kaptuk. Az is megfigyelhető, hogy a molekulamechanikai számolásból kapott konformerekre az effektus nagyobb, mint a kvantumkémiai módszerrel kapottakra, ami azt jelentheti, hogy az előbbi családban az U-alakú konformerek populációja nagyobb vagy a fenil- és a prolilgyűrűt összekötő alifás lánc nagyobb mértékben hajlított. A konformer készleteket összehasonlítva, arra a következtetésre jutottunk, hogy a döntő szerep az utóbbi feltételezésnek tulajdonítható.

Mivel a konformer családokban a lineáris és az U-alakú konformerek egyaránt előfordulnak és csak a populációik különböznek, a molekulamechanikai konformer készletből kiválasztva egy-egy jellegzetes kis energiájú *transz* U-alakú és lineáris konformert (13. ábra), a fentebb említett módszer alkalmazásával a következő eredményekhez jutottunk (7. táblázat). A számolt eltolódások a *transz* U-alakú konformer esetén jelentősen eltértek a *transz* lineáris konformerre számítottaktól, ami arra utalt, hogy, feltehetően, az aromás gyűrűáramok alapján különbséget tudunk tenni a két jellegzetes konformer között. Annak ellenére azonban, hogy a lineáris konformerben a 3- $\text{H}_2$  és 4- $\text{H}_2$  protonok igen messze vannak az aromás gyűrű közepétől, a számolás 0.2-0.3 ppm-es eltolódás különbséget jelez, miközben 0.1 ppm-nél kisebb eltolódás változásokat mértük. Mivel az összes konformer közül ebben és hozzá hasonló energiaszinten (2 kcal-án belül) levő konformerekben az említett protonok és az aromás gyűrű közepe közötti távolság a legnagyobb, az eredmények arra utalnak, hogy High-Mallion egyenlet túlbecsüli az aromás gyűrűáram hatását. Ezt azzal lehetne magyarázni,

hogy a D. Case által parametrizált egyenlet az aromás gyűrűtől 2.4-4.0Å-re levő protonokra érvényes és 2.8-0.8 ppm-es eltolódásokat okoz. Az U-alakra számolt eltolódások (0.4-1.2 ppm) ebbe a tartományba esnek, vagyis az e konformer protonjaira számított gyűrűáram hatások sokkal valószínűbbek, mint azokra, amelyek messzebb vannak az aromás gyűrűtől. Mivel a lineáris konformerre számított effektus megbízhatatlan eredményeket szolgáltatott, a mért aromás gyűrűáramok okozta kémiai eltolódás különbségeket adott esetben nem lehet kvantitatív célokra használni, vagyis megállapítani a U-alak/lineáris konformerek arányát. Ezen kívül, a C(8)-C(10) lánc meghatározható csatolási állandói, 6-7 Hz-es, kiátlagolt értékűek, és a protonok kis kémiai eltolódás diszperziója is azt jelzi, hogy a benzolos, illetve acetonos oldatban (**7. táblázat**) e szerkezeti részt több konformer egyensúlyi elegye jellemzi, ami az aromás gyűrűáramok hatását kiátlagolja és az utóbbi csak kis mértékű eltolódásokat okoz. Ezek az eredmények kizárják az aromásgyűrű okozta kémiai eltolódás változásának hasznosítását az U-alak/lineáris konformer arány meghatározásában, viszont feltehetően azt lehetne feltételezni, hogy az oldatban alacsonyabb az U-alakú konformerek részaránya mint a két számítási módszerben.

### 3.1.10. Összefoglalás

Az oldószerhatást a *transz/cisz* arányra vizsgálva (**4. táblázat**) arra a következtetésre jutottuk, hogy az apoláros oldószerektől poláros oldószerek felé haladva a *transz/cisz* arány jelentősen változik a *cisz* izomer javára. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy a *cisz* szerkezetben a két karbonil csoport távolabb van egymástól, mint a *transz* szerkezetben, így a poláros oldószer molekulák jobban szolvatálhatják ezeket, ami a *cisz* izomer stabilizálódását eredményezi. A mért izomer aránytól a molekulamechanikai számítással kapott értékek jelentősen eltérnek, míg a kvantumkémiai módszerrel nyert eredmények elfogadható egyezést adnak.

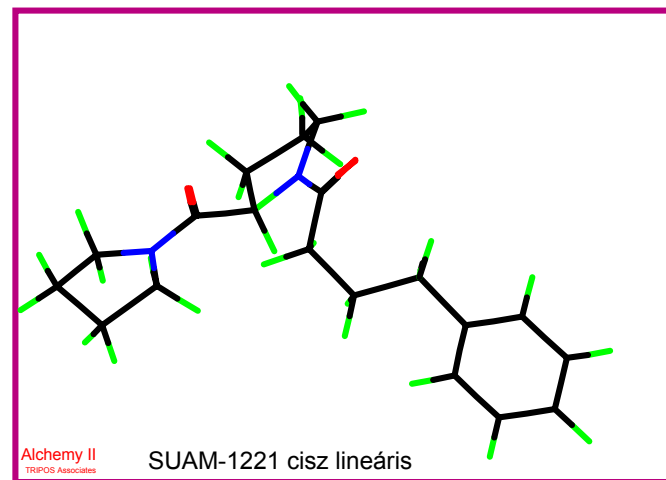
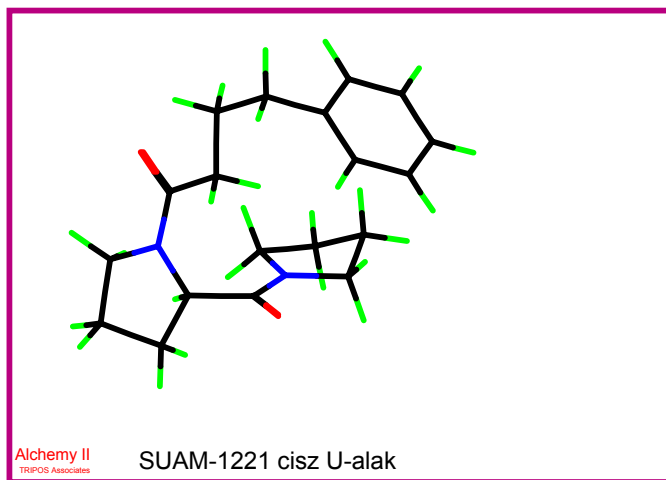
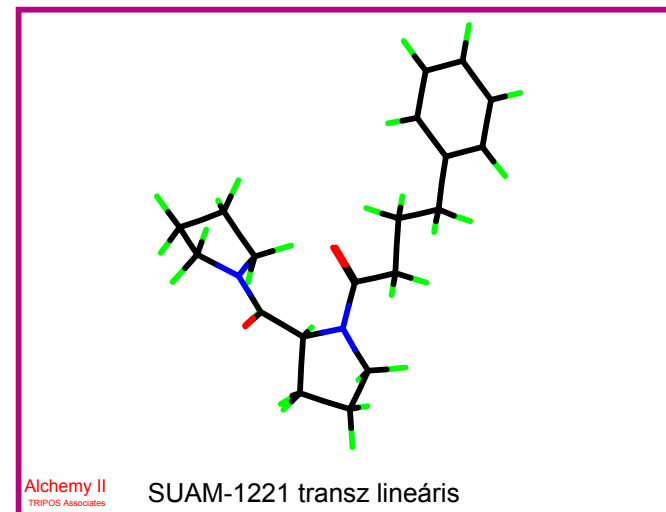
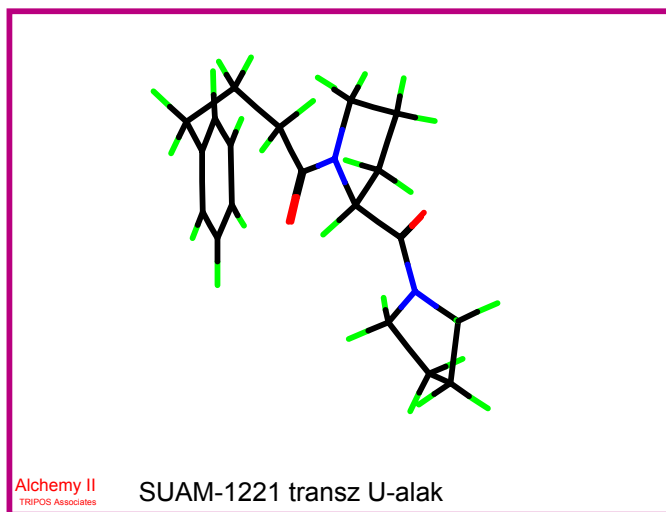
A prolil- és pirrolidilgyűrű amid csoportjainak gátolt rotációja az NMR időskálán lassú folyamat, azaz, lehetőség nyílt a *transz-cisz* reakció átalakulási sebességi állandó meghatározására az **1** és a **2** vegyületekben. Így deuterált benzolban a SUAM-1221 prolilgyűrű amid körüli *transz-cisz* átalakulás sebessége  $0.2 \text{ s}^{-1}$ , míg a **2** vegyület esetén  $0.4 \text{ s}^{-1}$ . A pirrolidilgyűrű szimmetriája és a pirrolidil amid kötés körüli gátolt rotáció miatt a gyűrű nitrogén atommal  $\alpha$  illetve  $\delta$  helyzetben lévő metilén protonok egymással cserélődnek. Így deuterált benzolban a SUAM-1221 pirrolidilgyűrű amid körüli *transz-cisz* átalakulás sebessége  $0.3 \text{ s}^{-1}$ , míg a **2** molekula esetén  $0.5 \text{ s}^{-1}$ . Azt is megfigyeltük, hogy a polárosabb oldószerek felé haladva a *transz-cisz* átalakulás sebessége egyre lassabb folyamat lesz.

A prolilgyűrű térszerkezetét vizsgálva, arra a következtetésre jutottuk, hogy a molekulamechanikai számításokból kapott N/S=4/1 aránnyal szemben, oldatfázisban az N/S arány 1/2-nek bizonyult.

A két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzetét az *N(6)-C2-C1-N(1')* torziós szöggel és a két gyűrű protonok között fellépő dipólus-dipólus NOE kölcsönhatással határozhatjuk meg. A számolások alapján az *N(6)-C2-C1-N(1')* torziós szög  $120^\circ$ - $160^\circ$  között változik. Az NOE térfigati integrál értékek és az atom távolságokból számolt elméleti NOE intenzitások összhangban voltak egymással, tehát a két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzete oldatban megfelel a számításokból kapott konformációknak.

A Haigh-Mallion egyenlet (*9, 10*) David A. Case által parametrizált formájának alkalmazásával a molekula mechanikai és kvantum kémiai konformer készlet összes

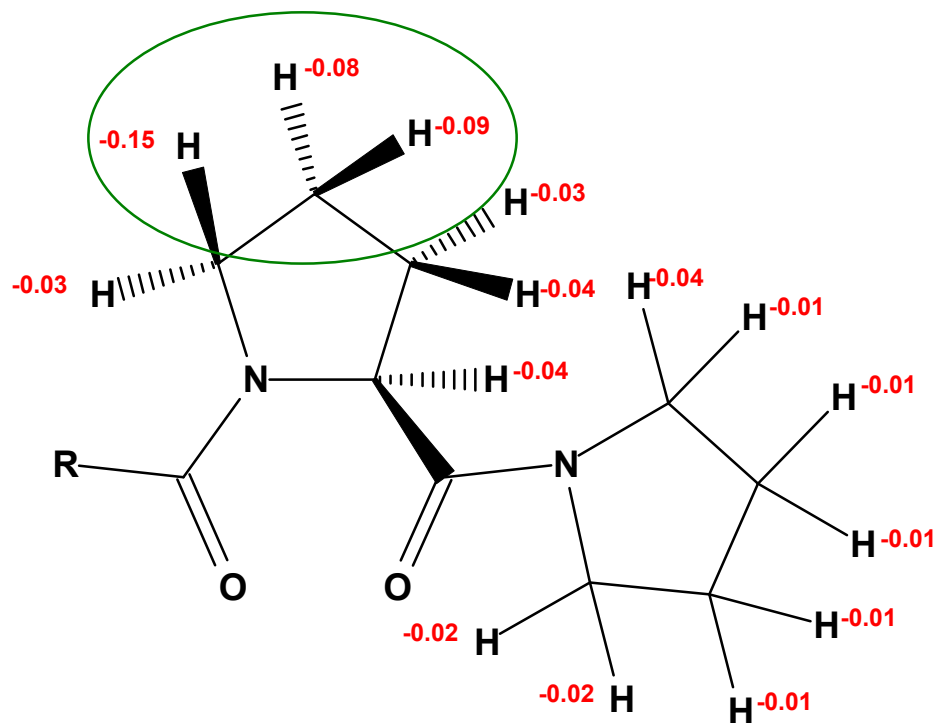
protonjára (6., 7. táblázatok) meghatároztuk az aromás gyűrűáram okozta kémiai eltolódás változást. A konformerek relatív energiái alapján a Boltzmann összefüggés alkalmazásával kiszámítottuk az egyes konformerek populációját és ezekkel súlyozva, már ismertetett módon súlyozott átlagot számoltunk mind két adatkészletre. Azt találtuk, hogy a High-Mallion egyenlet David A. Case által parametrizált formájának alkalmazása adott esetben alkalmatlan a számolt konformerek az aromás gyűrűáram okozta kémiai eltolódás változásának kvantitatív értékelésére, így az U-alakú/lineáris konformer arány meghatározása lehetetlenné vált. A mért és számított adatok alapján, feltételeztük, hogy az oldatban az U-alakú konformerek részaránya, feltehetően, kisebb, mint a gáz fázisban.



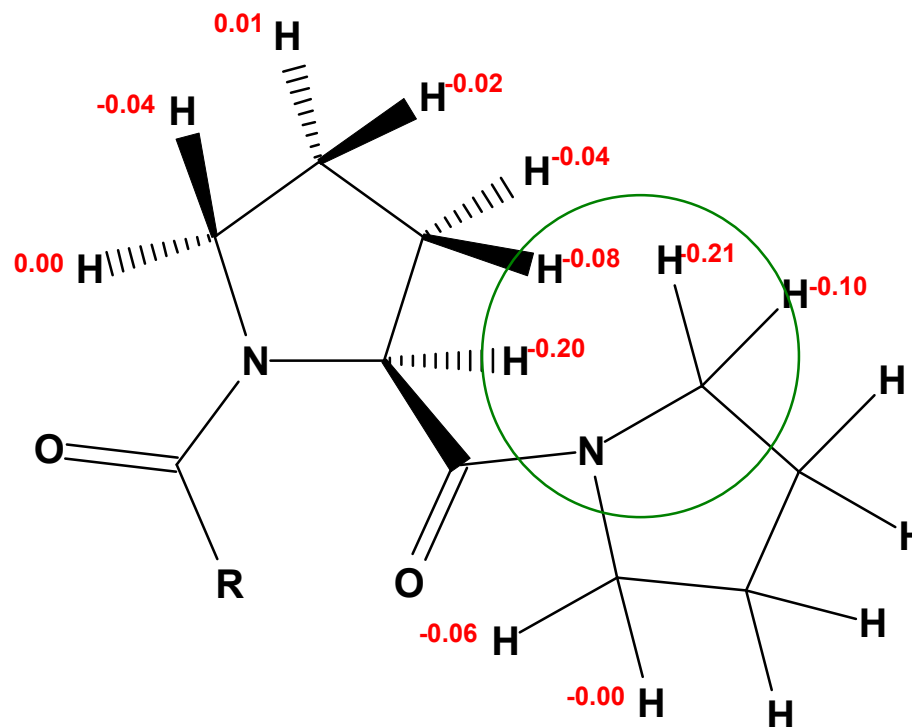
13. ábra

A molekulamechanika konformer készletből kiválasztott egy-egy jellegzetes kis energiájú *transz*, illetve *cisz* U-alakú és lineáris konformer

1 – 2 kémiai eltolódás különbség (ppm-ben) a *transz* izomerben



1 – 2 kémiai eltolódás különbség (ppm-ben) a *cisz* izomerben



14. ábra

A várható (mért) gyűrűáram hatások a *transz* és a *cisz* rotamerekben

1. táblázat. A mért  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódások,  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$   $T_1$  relaxációs idők és NOESY cserélődési protonok SUAM-1221 vegyületben (t: *transz* izomer; c: *cis* izomer)

N <sup>o</sup>	<i>transz</i> $\delta$ , ppm				<i>cis</i> $\delta$ , ppm		NOESY cserélődési protonok
	$^1\text{H}$ , ppm	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ $T_1$ relax. idő, sec	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	
*10-H <sub>a,b</sub>	2.04	-	34.1	1.4	-	36.0	-
*9-H <sub>a,b</sub>	2.04	-	27.3	1.4	-	28.2	-
8-H <sub>a,b</sub>	2.63	1.3	36.1	1.5	2.53	36.2	-
5-H <sub><math>\alpha</math></sub>	2.82	1.0	47.6	1.2	3.65	47.8	t5-H <sub><math>\alpha</math></sub> - c5-H <sub><math>\alpha</math></sub> ;
5-H <sub><math>\beta</math></sub>	3.32	-			3.93		t5-H <sub><math>\beta</math></sub> - c5-H <sub><math>\beta</math></sub>
4-H <sub><math>\alpha</math></sub>	1.38	1.6	25.6	1.3	1.30	23.4	-
4-H <sub><math>\beta</math></sub>	2.04	-			1.75		-
3-H <sub><math>\alpha</math></sub>	1.54	1.7	29.7	1.4	1.91	31.7	-
3-H <sub><math>\beta</math></sub>	1.68	1.3			1.44		-
2-H <sub><math>\alpha</math></sub>	4.56	1.7	58.3	1.9	3.80	59.3	t2-H <sub><math>\alpha</math></sub> - c-2H <sub><math>\alpha</math></sub>
5'-H <sub>a</sub>	3.53	1.2	46.8	1.4	3.32	46.8	t5'-H <sub>a</sub> - t2'-H <sub>b</sub> , t5'-H <sub>a</sub> - c2'-H <sub>b</sub> , c5'-H <sub>a</sub> - c2'-H <sub>b</sub> , c5'-H <sub>a</sub> - t2'-H <sub>b</sub> ;
5'-H <sub>b</sub>	3.27	1.1			3.26		t5'-H <sub>b</sub> - t2'-H <sub>a</sub> , c5'-H <sub>b</sub> - c2'-H <sub>a</sub>
4'-H <sub>a</sub>	1.19	1.7	26.9	-	-	27.0	-
4'-H <sub>b</sub>	1.19	1.7			-		-
3'-H <sub>a</sub>	1.39	-	24.6	-	-	24.3	-
3'-H <sub>b</sub>	1.30	1.5			-		-
2'-H <sub>a</sub>	3.68	1.0	46.8	1.4	2.55	46.1	t2'-H <sub>a</sub> - t5'-H <sub>b</sub> , t2'-H <sub>a</sub> - c2'-H <sub>a</sub> , c2'-H <sub>a</sub> - c5'-H <sub>b</sub> ;
2'-H <sub>b</sub>	2.88	-			2.55		

Csatolási állandók a *transz* rotamerben:  $^3J_{8\text{H}_{ab}-9\text{H}_{ab}}=7.4$  Hz;  $^2J_{5\text{H}_{\alpha}-5\text{H}_{\beta}}=9.5$  Hz;  $^2J_{4\text{H}_{\alpha}-4\text{H}_{\beta}}=12.0$  Hz;  $^2J_{3\text{H}_{\alpha}-3\text{H}_{\beta}}=12.2$  Hz;  $^2J_{5'\text{H}_a-5'\text{H}_b}=11.8$  Hz;  $^3J_{5'\text{H}_a-4'\text{H}_a}=6.9$  Hz;  $^3J_{5'\text{H}_a-4'\text{H}_b}=6.9$  Hz;  $^3J_{5'\text{H}_b-4'\text{H}_a}=6.9$  Hz;  $^3J_{5'\text{H}_b-4'\text{H}_b}=6.9$  Hz

$^3J_{3'\text{H}_a-2'\text{H}_a}=7.2$  Hz;  $^3J_{3'\text{H}_b-2'\text{H}_b}=7.2$  Hz;  $^3J_{3'\text{H}_a-2'\text{H}_b}=6.4$  Hz;  $^3J_{3'\text{H}_b-2'\text{H}_a}=6.4$  Hz;  $^2J_{2'\text{H}_a-2'\text{H}_b}=8.9$  Hz

Csatolási állandók a *cis* rotamerben:  $^3J_{8\text{H}_{ab}-9\text{H}_{ab}}=6.7$  Hz;  $^3J_{5\text{H}_{\beta}-4\text{H}_{\alpha}}=4.5$  Hz;  $^3J_{5\text{H}_{\beta}-4\text{H}_{\beta}}=8.2$  Hz;  $^3J_{2\text{H}_{\alpha}-3\text{H}_{\alpha}}=8.4$  Hz;  $^3J_{2\text{H}_{\alpha}-3\text{H}_{\beta}}=3.2$  Hz;  $^2J_{5\text{H}_{\alpha}-5\text{H}_{\beta}}=11.5$  Hz

**2. táblázat.** A NOESY keresztcsúcsok hozzárendelése és térfogati integrál értékek a SUAM-1221 molekulára

proton	<i>transz</i> + NOE
2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> (104,7), 3-H <sub>β</sub> (33.5), 4-H <sub>α</sub> (14.9), 4-H <sub>β</sub> (6.3), <b>2'-H<sub>α</sub> (143.1), 2'-H<sub>β</sub> (130.7), 5'-H<sub>α</sub>, 5'-H<sub>β</sub> (7.1)</b>
3-H <sub>α</sub>	2-H <sub>α</sub> (104.7), 3-H <sub>β</sub> , 4-H <sub>α</sub> , 4-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> (20.5), 2'-H <sub>β</sub> (6.6)
3-H <sub>β</sub>	2-H <sub>α</sub> (33.5), 3-H <sub>α</sub> , 4-H <sub>α</sub> , 4-H <sub>β</sub> (48.9), 5-H <sub>α</sub> (24.9), 5-H <sub>β</sub> (8.6)
4-H <sub>α</sub>	2-H <sub>α</sub> (14.9), 3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 4-H <sub>β</sub> (425.3), 5-H <sub>α</sub> (176.2), 5-H <sub>β</sub> (6.3)
4-H <sub>β</sub>	2-H <sub>α</sub> (6.3), 3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> (48.9), 4-H <sub>α</sub> (425.3), 5-H <sub>α</sub> (19.8), 5-H <sub>β</sub> (87.8)
5-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> (20.5), 3-H <sub>β</sub> (24.9), 4-H <sub>α</sub> (176.2), 4-H <sub>β</sub> (19.8), 5-H <sub>β</sub> (504.1), <b>8-H<sub>ab</sub></b>
5-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> (8.6), 4-H <sub>α</sub> (6.3), 4-H <sub>β</sub> (87.8), 5-H <sub>α</sub> (504.1), <b>8-H<sub>ab</sub></b>
8-H <sub>a,b</sub>	9-H <sub>ab</sub> , <b>5-H<sub>α</sub>, 5-H<sub>β</sub></b>
9-H <sub>a,b</sub>	8-H <sub>ab</sub> , 10-H <sub>ab</sub>
10-H <sub>a,b</sub>	9-H <sub>ab</sub>
5'-H <sub>a</sub>	<b>2-H<sub>α</sub></b> , 2'-H <sub>a</sub> , 3'-H <sub>a</sub> (6.4), 3'-H <sub>b</sub> , 4'-H <sub>ab</sub> , 5'-H <sub>b</sub> (455.0)
5'-H <sub>b</sub>	<b>2-H<sub>α</sub> (7.1)</b> , 2'-H <sub>b</sub> (63.7), 3'-H <sub>a</sub> , 3'-H <sub>b</sub> (8.6), 4'-H <sub>ab</sub> , 5'-H <sub>a</sub> (455.0)
4'-H <sub>a,b</sub>	2'-H <sub>a</sub> , 2'-H <sub>b</sub> , 5'-H <sub>a</sub> , 5'-H <sub>b</sub>
3'-H <sub>a</sub>	2'-H <sub>a</sub> (71.5), 2'-H <sub>b</sub> , 3'-H <sub>b</sub> , 5'-H <sub>a</sub> (6.4), 5'-H <sub>b</sub>
3'-H <sub>b</sub>	2'-H <sub>a</sub> , 2'-H <sub>b</sub> , 3'-H <sub>a</sub> , 5'-H <sub>a</sub> , 5'-H <sub>b</sub> (8.6)
<b>2'-H<sub>a</sub></b>	<b>2-H<sub>α</sub> (143.1)</b> , 2'-H <sub>b</sub> (531.4), 3'-H <sub>a</sub> (71.5), 3'-H <sub>b</sub> , 4'-H <sub>ab</sub> , 5'-H <sub>a</sub>
<b>2'-H<sub>b</sub></b>	<b>2-H<sub>α</sub> (130.7)</b> , 3-H <sub>α</sub> (6.6), 2'-H <sub>a</sub> (531.4), 3'-H <sub>a</sub> , 3'-H <sub>b</sub> , 4'-H <sub>ab</sub> , 5'-H <sub>b</sub> (63.7)

-() - számított  $tg\alpha$  értékek

**3. táblázat.** A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandók és élettartamok

Mixing time, msec	K	<i>transz</i> , [s]	<i>cisz</i> , [s]
150	$1.4 \times 10^{-1}$	82.04	8.11
300	$1.5 \times 10^{-1}$	74.10	7.33
450	$1.7 \times 10^{-1}$	63.95	6.33
600	$1.6 \times 10^{-1}$	68.14	6.74
750	$1.6 \times 10^{-1}$	67.63	6.69
900	$1.6 \times 10^{-1}$	68.34	6.76

**4. táblázat.** A mért és számított *transz/cisz* arányok SUAM-1221 vegyületben

Oldószer / Számítási módszer	<i>transz/cisz</i> arány	NMR
C <sub>2</sub> D <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	94:6	<sup>1</sup> H
CDCl <sub>3</sub>	91:9	<sup>1</sup> H
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	91:9	<sup>13</sup> C; NOESY; <sup>2</sup> J <sub>SH</sub>
DMSO-d <sub>6</sub>	76:24	<sup>1</sup> H
Aceton	73:27	<sup>13</sup> C
DMF	71:29	<sup>13</sup> C
D <sub>2</sub> O	70:30	<sup>13</sup> C; NOESY
Puffer (D <sub>2</sub> O) pH=7.5	65:35	<sup>13</sup> C; NOESY
Molekula mechanika	8/92	-
Kvantum kémia	64/36	-

**5. táblázat.** A számolt és a mért csatolási állandók összehasonlítása és az N/S arány meghatározása

Csatolási állandó	N konformer, Hz	S konformer, Hz	1/3N+2/3S, Hz	Mért, Hz	Error, Hz
${}^3J(5-H_\alpha - 4-H_\alpha)$	6.3	6.9	6.7	<b>7.4</b>	0.7
${}^3J(5-H_\alpha - 4-H_\beta)$	1.0	11.3	7.5	<b>7.4</b>	-0.1
${}^3J(5-H_\beta - 4-H_\alpha)$	12.2	0.8	5.0	<b>4.9</b>	-0.1
${}^3J(5-H_\beta - 4-H_\beta)$	5.5	7.7	6.9	<b>8.3</b>	1.4
${}^3J(4-H_\alpha - 3-H_\beta)$	13.2	1.1	5.6	<b>7.2</b>	1.6
${}^3J(4-H_\beta - 3-H_\beta)$	6.1	5.6	5.8	<b>4.9</b>	-0.9
${}^3J(3-H_\alpha - 2-H_\alpha)$	6.4	7.8	7.3	<b>8.2</b>	0.9
${}^3J(3-H_\beta - 2-H_\alpha)$	11.4	0.7	4.6	<b>3.6</b>	-1.0

**6. táblázat.** A mért és számolt aromás gyűrűáram hatások mindkét (prolil és pyrrolidil) öttagú gyűrű protonjaira

N <sup>o</sup> ( <sup>1</sup> H)	<i>transz</i>			<i>cisz</i>		
	Mért, ppm	Kvantumkém., ppm	Molmechan., ppm	Mért, ppm	Kvantumkém., ppm	Molmechan., ppm
5-H <sub>α</sub>	0.15	0.51	0.67	0.03	0.38	0.52
5-H <sub>β</sub>	0.03	0.57	0.60	0.00	0.38	0.44
4-H <sub>α</sub>	0.09	0.29	0.48	0.02	0.26	0.50
4-H <sub>β</sub>	0.08	0.29	0.44	0.01	0.25	0.30
3-H <sub>α</sub>	0.04	0.31	0.74	0.08	0.32	0.37
3-H <sub>β</sub>	0.03	0.30	0.46	0.04	0.31	0.27
2-H <sub>α</sub>	0.03	0.46	0.94	0.20	0.55	0.74
2'-H <sub>a</sub>	0.04	0.34	0.76	0.21	0.37	0.44
2'-H <sub>b</sub>	0.01	0.35	0.58	0.10	0.38	0.48
5'-H <sub>a</sub>	0.02	0.36	0.48	0.06	0.34	0.54
5'-H <sub>b</sub>	0.02	0.35	0.38	0.01	0.34	0.89

**7. táblázat.** A mért és számolt aromás gyűrűáram hatások a legkisebb energiájú *transz* U-alakú és lineáris konformerekben

N <sup>o</sup> ( <sup>1</sup> H)	<i>transz rotamer</i>			
	Mért Δδ, ppm		Számolt Δδ, ppm	
	Benzol-d <sub>6</sub>	Aceton-d <sub>6</sub>	Lineáris	U-alak
5-H <sub>α</sub>	0.15	-	0.52	0.50
5-H <sub>β</sub>	0.03	-	0.41	1.18
4-H <sub>α</sub>	0.09	0.01	0.12	0.43
4-H <sub>β</sub>	0.08	0.02	0.30	0.83
3-H <sub>α</sub>	0.04	-	0.23	0.44
3-H <sub>β</sub>	0.03	-	0.25	0.53
2-H <sub>α</sub>	0.03	0.03	0.33	0.74
2'-H <sub>a</sub>	0.04	0.00	0.27	0.73
2'-H <sub>b</sub>	0.01	0.02	0.20	1.27
5'-H <sub>a</sub>	0.02	0.03	0.36	0.77
5'-H <sub>b</sub>	0.02	0.02	0.23	0.73

### 3.2. *A hidroxil és fluor tartalmú prolin származékok azonosítása és konformációs vizsgálata*

#### 3.2.1. *Bevezetés*

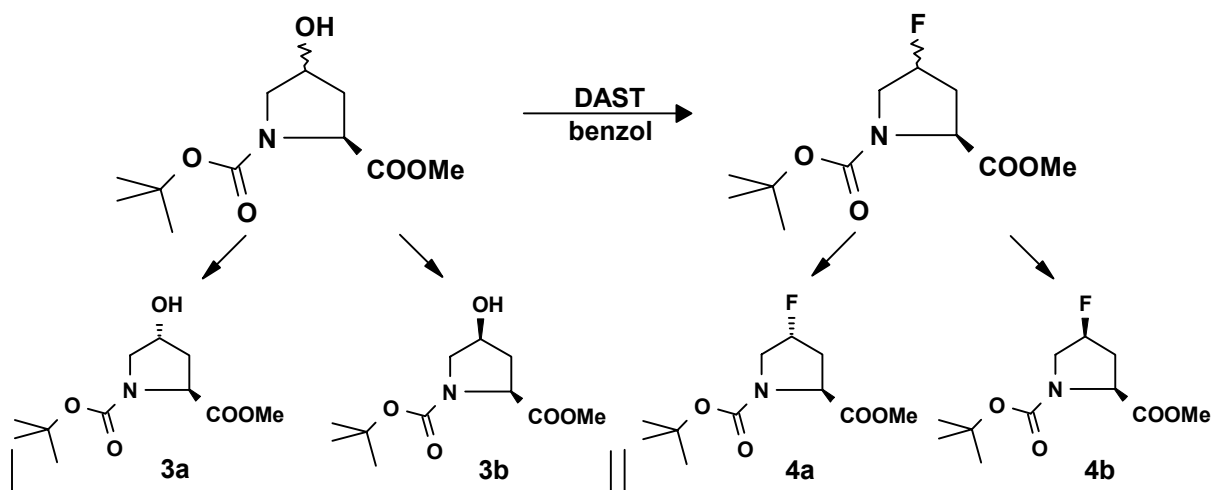
A munkánk során, egyéb prolin származékok mellett<sup>34</sup> fluor tartalmú, feltehetően inhibitor hatással rendelkező molekulákat kívántunk előállítani. A fluoratom bevitele a prolin gyűrű négyes pozíciójába a kiindulási 4 $\alpha$ , $\beta$ -hidroxiprolin származékok és DAST (DietilAmino-SulfurTrifluorid) reakciójával történt (15. ábra). A reakció mechanizmusát illetően ellentmondásos publikációk jelentek meg.<sup>46,47</sup> Egyes cikk szerzői azt közölték, hogy az alábbi reakció retencióval és inverzióval együtt, mások szerint<sup>48</sup> pedig kizárólag  $S_N^2$  mechanizmussal, vagyis kizárólag inverzióval megy végbe. Jelen munkában beszámolunk a reakció sztereoselektivitásának tisztázásáról és az elektronegativ szubsztituens hatásáról az öttagú prolin gyűrű konformációjára. Ehhez szükség volt a 4-es helyzetű elektronegativ szubsztituens térállásának egyértelmű meghatározása.

#### 3.2.2. *A 4-hidroxil- és 4-fluoroprolin származékok proton és szén-13 NMR hozzárendelése*

A vegyületekről különböző oldószerekben <sup>1</sup>H NMR spektrumokat vettük fel. Az <sup>1</sup>H NMR spektrumokban két jelsorozatot figyeltük meg, melyek a prolin amid kötés körüli gátolt rotáció következtében az oldatfázisban kialakult *transz* és *cisz* izomerek egyensúlyának eredménye (16. ábra). A legjobb jelszeparációt deuterált benzolban és deuterált piridinben észleltük és emiatt ezekben az oldószerekben végeztünk részletes vizsgálatokat.

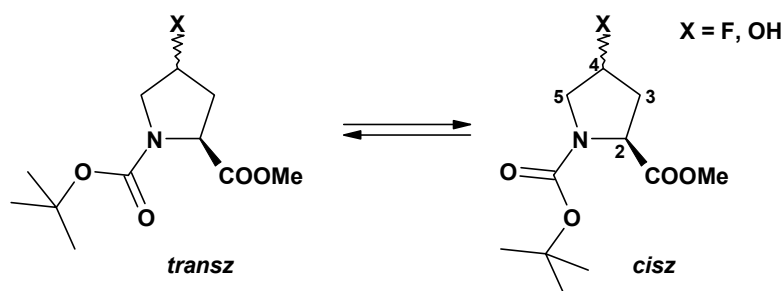
Az <sup>1</sup>H NMR spektrum egyértelmű asszignációját 1D TOCSY (gradiens változat), 2D COSY, NOESY spektrumok és <sup>1</sup>H-<sup>19</sup>F geminális és vicinális spin-spin csatolási állandók alapján végeztük el.

A fázisérzékeny NOESY spektrumban diagonális jelekkel ellentétes (negatív) fázissal jelentkeztek a NOE kölcsönhatásban levő protonoknak megfelelő keresztcsúcsok, míg azonos (pozitív) fázissal, az egymással kémiai kicserélődésben levő protonoknak megfelelő keresztcsúcsok. Mivel az öttagú telített gyűrűs rendszerekben várható, hogy a gyűrű azonos oldalán található hidrogén atomok között nagyobb NOE kölcsönhatás lép fel mint az ellentétes oldalakon lévő hidrogének között, a **3a** és **3b** jelzésű molekulákban ismerve 2-H $\alpha$  térállását a keresztcsúcs intenzitások arányaiból a 3- és 5-H $_2$  metilén proton párokat rendre hozzárendeltük a major jelsorozatban (**9.**, **10. táblázatok**, 40-41 oldal).



15. ábra

4 $\alpha$ , $\beta$ -hidroxiprolin származékok és DAST (DiethylAmino-SulfurTrifluorid) reakciója



16. ábra

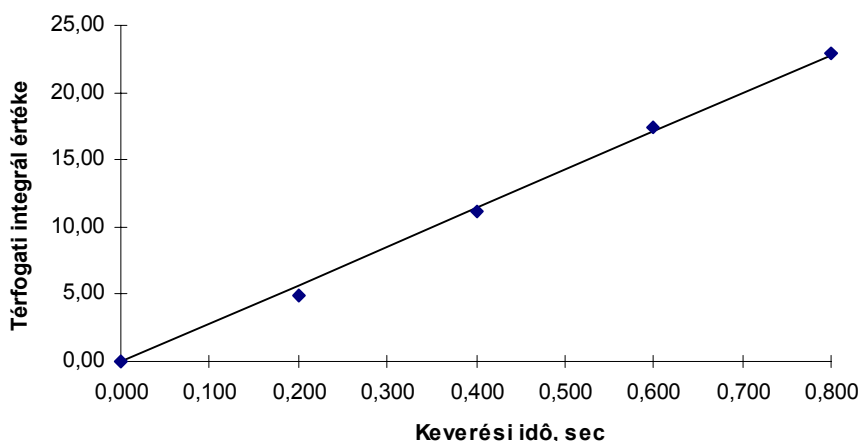
A különböző keverési időkkel készített NOESY spektrumokban a negatív jelek térfogati integráljai alapján ellenőriztük az NOE felépülést. A térfogati integrál értékeket a keverési idő függvényében ábrázoltunk. A 17. ábrán látható, hogy a geminális 5-H<sub>2</sub> protonokra az NOE felépülés lineáris szakasza legalább 0.8sec -ig tart.

A major jelsorozat így felderített asszignációját a minor jelsorozatnak még a majorról átfedő jeleire is át tudtuk vinni a NOESY spektrum (14.,15.,16.,17. táblázatok) pozitív keresztcsúcsai segítségével, ugyanis az alkalmazott keverési idő (0.2-0.9 sec) alatt megtörténik az amid kötés körüli rotáció, így a cisz és transz protonok egymással kicserélődnek.

A 4b fluoroprolin származék protilgyűrű diasztereotóp protonjainak hozzárendelése és 4-H térhelyzete a NOESY spektrumból nem volt egyértelmű. Azok a keresztcsúcsok, amelyek segítséget nyújtottak volna e problémák megoldásához, hiányoztak a spektrumból. Ismerve, hogy a NOESY keresztcsúcsok a magok közötti dipólus-dipólus kölcsönhatás eredménye, a dipólus-dipólus relaxáción kívüli más relaxációs folyamatokat el kell nyomni. Ezek közül a legfontosabb az oldatban lévő paramágneses oxigén molekulákkal való kölcsönhatás, ezért az oldat oxigénmentesítését hajtottuk végre.

A T<sub>1</sub> relaxációs időket az oxigénmentesítés előtt és után is megmértük. A 12. táblázatban összefoglalt eredményeket összehasonlítva, arra a következtetésre jutottunk,

hogy az oxigén jelenléte az oldatban kb. 30%-kal lecsökkentette az  $^1\text{H}$  relaxációs időket. Az oxigénmentesítés után felvett NOESY spektrumban megjelent egy 2- $\text{H}_\alpha$  - 5-H negatív NOE keresztcsúcs (**17. táblázat**), ami az előző felvételnél nem jelentkezett. Ismerve a 2- $\text{H}_\alpha$  proton térállását a két 5-H hidrogén közül az NOE kölcsönhatást mutató 3.06 ppm-es eltolódását az  $\alpha$ -térálláshoz rendeltük hozzá. A 4-H proton térhelyzetét a 4-H - 5- $\text{H}_\alpha$  és a 4-H - 5- $\text{H}_\beta$  keresztcsúcsok intenzitásainak összehasonlításából határoztuk meg. A 4-H protont  $\alpha$ -hoz rendeltük, mivel az 5- $\text{H}_\alpha$ -val intenzívebb keresztcsúcsot adott, mint 5- $\text{H}_\beta$ -val.



17. ábra

Az NOE felépülése (3a, 5H<sub>2</sub>)

A **4a** fluoroprolin származék esetén hasonló problémába ütköztünk, a megfelelő NOESY jelek (keresztcsúcsok) hiánya vagy átfedése miatt (**16. táblázat**). Így e hidrogének hozzárendelését arra alapoztuk, hogy a megfelelő hidroxil izomerben mértékhez hasonló kémiai eltolódás és csatolási állandó különbségeket tapasztaltunk a diasztereotóp protonpárok jelein (lásd később). Ezen kívül, mivel a **4b** szerkezetnél sikerült meghatározni a fluor csoport térállását, feltételeztünk, hogy  $\alpha$ -fluoroprolin származékról van szó.

A proton asszignáció ismeretében 2D HMQC és 2D HMBC spektrumok segítségével átvittük a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumra (**9.,10.,11.,12. táblázatok**).

### 3.2.3. A *transz* és *cisz* rotamerek hozzárendelése a 4-hidroxi- és 4-fluoroprolin származékokban

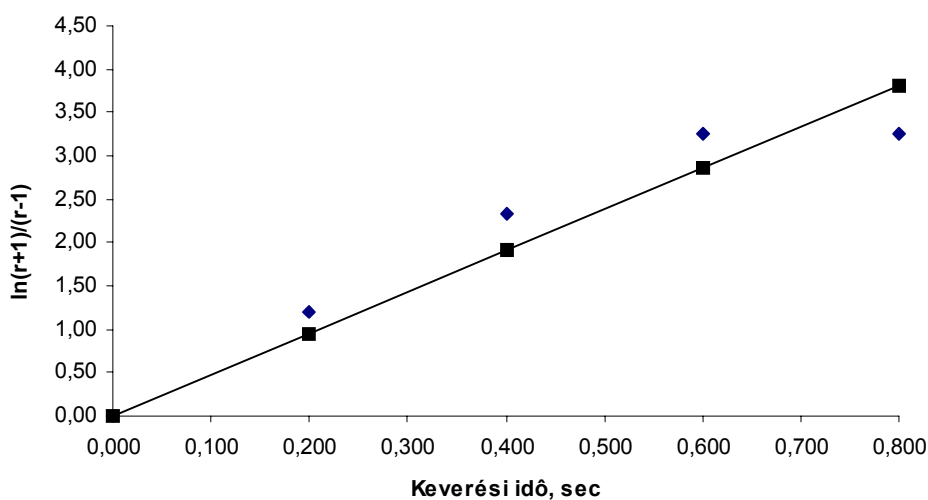
Ahogy a 3.1.3. pontban már említettük, a rotamerek hozzárendelését több NMR paraméter segítségével lehetett igazolni. Azonban a vizsgált négy vegyületben a SUAM-1221 molekulával szemben a prolingyűrű nitrogén atomjához alifás lánc nem kapcsolódik, így a korábban gyakran használt megközelítés, mely az 5- $\text{H}_2$  és 8- $\text{H}_2$  protonok közötti NOE kölcsönhatáson alapult a *transz* rotamerben, lehetetlenné vált. Az 5- $\text{H}_2$  protonok geminális csatolási állandók alapján sem tudtuk megbízható eredményt elérni, mivel a korábban vizsgált SUAM-1221 (*transz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=9.5\text{ Hz}$ , *cisz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=11.5\text{ Hz}$ )<sup>34</sup>, tioprolin (*transz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=8.8\text{ Hz}$ , *cisz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=10.9\text{ Hz}$ ) és sulfoxid<sup>1</sup> (*transz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=12.0\text{ Hz}$ , *cisz*:  $^2J_{5\text{H}_2}=13.0\text{ Hz}$ ) molekulákhoz képest, a 4-hidroxi- illetve 4-fluoroprolin származékokban a C(5) protonok közötti  $^2J_{gem}$  csatolási

állandó nagysága a *transz* és a *cisz* rotamerekben közel azonosnak bizonyult; a **4b** *transz* vegyületben  $^2J_{5H_2} = 13.3$  Hz, míg a *cisz* formában 12.9 Hz csatolást mértük. Ugyanez a tendencia megfigyelhető a **3a**, **3b** és **4a** szerkezetű molekulák esetében is (**13. táblázat**). Tehát a négyes helyzetben elektronegatív szubsztituenst tartalmazó prolin származékokban az 5-H<sub>2</sub> protonok geminális csatolási állandója alapján nem lehet a *cisz* és *transz* rotamereket megkülönböztetni.

A C(3) és C(4) szénatomok kémiai eltolódás különbsége a major jelsorozatban kisebb, mint a minorban. Ismert, hogy a *transz* prolin rotamerekben a *cisz* izomerekben mértékhez képest kisebb ez az érték<sup>41</sup>, így a major jelsorozatot a *transz* formához rendeltük. Ezt a hozzárendelést támasztja alá az is, hogy azt várjuk, hogy az apoláros oldószerben a polároshoz képest a *transz* izomer mennyisége nő meg. A **3a** származék esetében az oldószerfüggő *transz/cisz* arány változása nem annyira erőteljes, mint a korábban vizsgált molekulákban<sup>34</sup> ennek oka feltehetően a proliigyűrű négyes helyzetű elektronegatív szubsztituense (**8. táblázat**).

#### 3.2.4. A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó, *transz* és *cisz* rotamerek átlagélettartamának meghatározása

A *cisz* és a *transz* rotamerek átlagos élettartama és *transz-cisz* átalakulási sebességi állandók meghatározása mind a négy molekulában a NOESY cserélődési keresztcsúcsok térfogati integrálással történt<sup>5</sup>. Az adatokat **18. táblázatban** foglaltunk össze. A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandót lineáris regresszióval az (5) egyenletből határoztuk meg (**18. ábra**).



18. ábra

A *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó meghatározása (lineáris regresszió, **4b**)

A **18. táblázat** alapján látható, hogy a *transz-cisz* átalakulási sebességi állandó értéke az  $\alpha$ -szubsztituált prolin származékok esetén  $3.4 \text{ s}^{-1}$  és  $3.3 \text{ s}^{-1}$ -nak, míg a  $\beta$ -szubsztituált prolin származékoknál  $4.8 \text{ s}^{-1}$ -nek adódott. Ez az eredmény arra a következtetésre vezetett, hogy a proliigyűrű 4-es helyzetű elektronegatív szubsztituens térállása befolyásolja a *transz-cisz* átalakulás sebességi állandó értékét. Összehasonlítva a *transz-cisz* átalakulási sebességi

állandó értékét a korábban vizsgált SUAM-1221 molekula *transz-cisz* átalakulás sebességi állandóval, egy nagyságrenddel nagyobb értéket kaptunk. Ez arra utal, hogy a *transz-cisz* izomerizáció átalakulási energiája kisebb, mint azt a SUAM-1221 esetén találtunk, feltehetően amiatt, hogy az amid karbonil melletti elektronegatív oxigén atom csökkenti az amid C-N kettős kötés jellegét.

### 3.2.5. $A^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$ csatolási állandók meghatározása a 2D COSY és NOESY alapján. 1D HETLOC

A **4a** és **4b** jelzésű anyagoknál a NOESY és COSY spektrumok keresztcsúcsainak szerkezete megfelel az E.COSY spektrumból kapható jelek struktúrájának (3. ábra). Így a NOESY és COSY spektrumokból egyértelműen meghatározhatók a  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  geminális és vicinális csatolási állandók, jó egyezésben (6-7%-os hibahatáron belül) az 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrumból meghatározott  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  csatolási állandókkal (19. táblázat). Ezen kívül az öttagú prolin gyűrű hidrogénjeinek jelhozzárendelését a *transz* illetve *cisz* izomerekhez, az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  és  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  vicinális és geminális csatolási állandók meghatározását 1D szelektív gradiens TOCSY kísérlet segítségével végeztünk el (11.,12.,13. táblázatok). Az egyik izomer jelének szelektív gerjesztése következtében az 1D TOCSY spektrumban csak azon protonok jelei jelentkezték, amelyek egy spinrendszerbe tartoztak a szelektíven besugárzott protonnal. Így lehetővé vált a spin-spin csatolás leolvasása olyan multiplettekben is, amelyeknél az 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrumban a *transz* és *cisz* rotamerek jelei átfedtek.

Egy érdekességet is megfigyeltünk az 1D gradiens TOCSY alkalmazásánál a 4-fluoroprolin származékok esetében. A proton frekvencián szelektíven besugározva a *transz* rotamer 4-H proton fluor csatolás szerinti dublett jelének egyik komponensét a 20. ábrán látható spektrumot kaptunk. Megfigyeltük, hogy az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban látható (20. ábra) jelmultiplicitásokhoz képest az utóbbiak változást szenvedtek a TOCSY spektrumban úgy, hogy a proton multipletteknek csak az egyik fele jelent meg. Erre az lehet a magyarázat, hogy a TOCSY spin-lockba a fluormag csak az egyik spinállapotának (pl.  $\alpha$ -spinállapotának) megfelelő mágnesezettséget visszünk be, így a TOCSY spektrumban csak annak a spinállapotnak megfelelő proton jelek jelentkezték. Ez a módszer analóg a 2D HETLOC kísérlettel, illetve annak az 1D változata. A fentebb említett eljárás hasznos lehet a spin-spin csatolások meghatározásakor azokban az esetekben, amikor az 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrum jelei jelentősen átfednek egymással; egy másik előnye a kísérlet rövidsége.

### 3.2.6. A prolin gyűrű térszerkezetének meghatározása

Az NMR módszerek alkalmazása mellett a prolin gyűrűben a fluor és az OH csoport térállásának meghatározására molekulamechanikai ( $\text{MM}^+$ ) számításokat végeztünk a HyperChem programcsomag segítségével. Ismert, hogy az öttagú gyűrű összes konformációs lehetőségeit a pszeudorotációs kör segítségével lehet feltérképezni. A prolin gyűrű konformációs eloszlásait a pszeudorotációs térben “északi” (N) és “déli” (S) konformer családokkal jellemzik<sup>6,7,19,47</sup>. Egy-egy jellemző *transz-N* és *transz-S* konformert (21. ábra), amelyekben a 4-es helyzetű fluor illetve hidroxil csoport  $\alpha$  vagy  $\beta$  térállású, molekulamechanika  $\text{MM}^+$  módszerrel energiamentesítettük. A konformer elegy összetételéről oldatban a gyűrűprotonok  $^3J_{\text{H,H}}$  vicinális csatolási állandói nyújtanak

információt. Az így kapott konformerekben meghatároztuk az öttagú gyűrű proton-proton torziós szögeit és módosított Karplus összefüggés alkalmazásával kiszámoltuk a protilgyűrű protonjai között várható vicinális spin-spin csatolási állandókat. Ezeket összevetve a mért csatolási állandókkal meg tudtuk határozni a fluor illetve hidroxil csoportok térállását és az öttagú gyűrű domináns konformációját a négy molekulában.

A **3a** származékban a hidroxil csoport  $\beta$  térállása esetén egyetlen konformerre sem kaptunk egyezést a számított csatolásokkal, és a konformerek elegyével sem értelmezhetők a mért értékek. Ugyanakkor az  $\alpha$  térállás esetén az N konformerre számított csatolási állandók jó egyezést adnak a mért értékekkel. (**20.,21. táblázatok**). A piridines oldat mért  $^1\text{H}$  NMR spektrumokból kapott proton-proton vicinális spin-spin csatolási állandók jó egyezést mutattak a benzolos oldatban nyert csatolási állandókkal, így a két oldószerben a molekula konformációja hasonló, az N ( $P_N = -6^\circ$ ) konformer családhoz tartozik (*21. ábra*) és dominánsan  $E_\beta\text{-}^{\gamma}\text{T}_\beta$  konformer tartományba esik (N/S konformer arány kb. 6/1).

A **3b** jelzésű *transz* 4-hidroxi-prolin származék feltehetően  $\beta$  térállású hidroxil csoportot tartalmaz, mivel kiderült, hogy a **3a** molekula hidroxil csoportja  $\alpha$  térállású. A **22. és 23. táblázatokban** feltüntetett mért és számolt adatok azt bizonyítják, hogy a hidroxil csoport  $\beta$  térállású, az S ( $P_S = 186^\circ$ ) konformer családhoz tartozik és  $^{\beta}\text{T}_\gamma\text{-}E_\gamma$  tartományba esik (*21. ábra*). Mivel a proton spektrumokból a *cisz* rotamer jelsorozatban is meg tudtuk határozni az öttagú gyűrűben a proton-proton spin-spin csatolási állandókat, arra a kérdésre kerestük a választ, hogy milyen lehet a *cisz* izomer domináns konformációja. A **24. és 25. táblázatokból** látható, hogy a mért és számolt csatolási állandók jó egyezésben vannak a *transz* rotamer mért és számolt csatolási állandóival, ami azt jelenti, hogy egy molekulán belül a *cisz* illetve *transz* rotamerek öttagú gyűrűjének konformációja hasonló, vagyis az oldatfázisban adott esetben az izomerek egymásba való átalakulása nem befolyásolja a protilgyűrű konformációját.

A harmadik, **4a** jelzésű vizsgált anyagnál a mért csatolási állandók a fluor  $\beta$  térállása esetén nem egyeznek a *transz* rotamer egyik konformerére számított csatolásokkal, és a konformerek elegyével sem értelmezhetők a mért értékek. Ugyanakkor  $\alpha$  térállás esetén, ahogyan ezt a *transz* 4 $\alpha$ -hidroxi-prolin származéknál is kaptunk, az N ( $P_N = 6^\circ$ ;  $^{\gamma}\text{T}_\beta\text{-}^{\gamma}\text{E}$ ) konformerre számított csatolási állandók jó egyezést adnak a mért értékekkel. (**26.,27. táblázatok**). A *cisz* izomerre mért csatolási állandók értékei azt bizonyítják, hogy a *cisz* rotamer öttagú gyűrűjének oldatbeli konformációja ennél az anyagnál is hasonló a *transz* rotamer konformációjához.

A negyedik, **4b** jelzésű molekulaszervezet esetében a számolt és a mért csatolási állandókat összevetve az  $\alpha$  térállás esetében egyetlen konformerre számított csatolásokkal sem kaptunk egyezést, és a konformerek elegyével sem értelmezhetők a mért értékek. Ugyanakkor a  $\beta$  térállás esetén az S ( $P_S = 175^\circ$ ;  $^{\beta}\text{E}\text{-}^{\beta}\text{T}_\gamma$ ) konformerre számított csatolási állandók jó egyezést adnak a mért értékekkel, a 4 $\beta$ -hidroxi-prolin származékhoz hasonlóan. (**28.,29. táblázatok**).

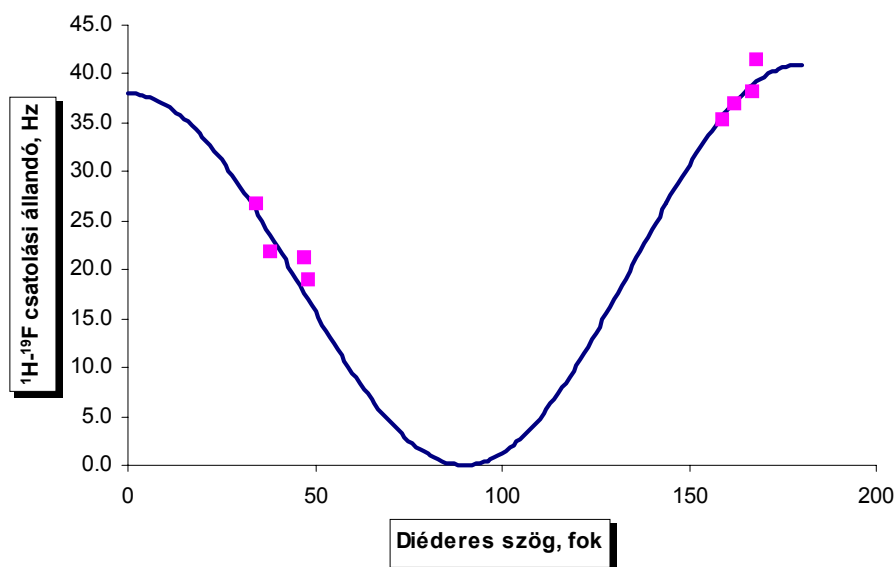
Megvizsgáltuk, hogy a csatolási állandók analíziséből kapott szerkezetek összhangban vannak-e az NOE adatokkal. Ezért az izolált kétszín közelítés alapján a NOESY keresztcsúcsok térfogati integráljaiból (abszolút integrálértékeket használtuk) kiszámítottuk a protonpárok magtávolságait (**30. táblázat**) és ezeket a modellekkel összehasonlítva, elfogadható egyezést kaptunk.

### 3.2.7. $A^{19}\text{F}-^1\text{H}$ csatolási állandók és a térszerkezet

Megvizsgáltuk, hogy a mért  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  spin-spin vicinális csatolási állandók felhasználhatók-e az eddigiekben részletezett sztereokémiai problémák megoldásában.

A molekulamechanikával energiaminimalizált  $\text{N-F}_\alpha$  és  $\text{S-F}_\beta$  konformerekben leolvastunk az  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  torziós szögeket (**19. táblázat**) és azt vettük észre, hogy ezek  $\cos^2$ -es összefüggést mutattak a négy mért  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  vicinális csatolási állandóval. A (10) egyenletek segítségével kiszámoltuk a várt  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  vicinális csatolási állandókat és összevetve ezeket a mért adatokkal a legkisebb négyzetek módszer alapján meghatároztuk az A és B paramétereket; ezek rendre 41 és 39 Hz-nek adódtak. A  $4\beta$ -fluoroprolin származék esetén az A és B optimalizált paraméterek értékei 40 és 41 Hz voltak. Az így parametrizált Karplus összefüggést a  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  csatolásokra a 19. ábra mutatja ( $A=38$ ;  $B=41$ ). Az összefüggés a csatolási állandónak csak a diéderes  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  szögtől való függését tartalmazza.

A  $^{13}\text{C}$  spektrumokból a  $J_{\text{C,F}}$  csatolási állandók meghatározhatók. A C(2) szénatomon nem detektáltunk felhasadást, azaz  $^3J_{\text{C(2),4F}}$  értéke kb. 0 Hz (**11., 12. táblázatok**). Mivel valószínű, hogy a C-F vicinális csatolási állandók a diéderes szögtől való függését is  $\cos^2$ -es összefüggés írja le, ez összhangban van a molekulamechanikai számításokból a  $4\text{F-C(4)-C(3)-C(2)}$  diéderes szögre kapott  $76^\circ$ -os értékkel.



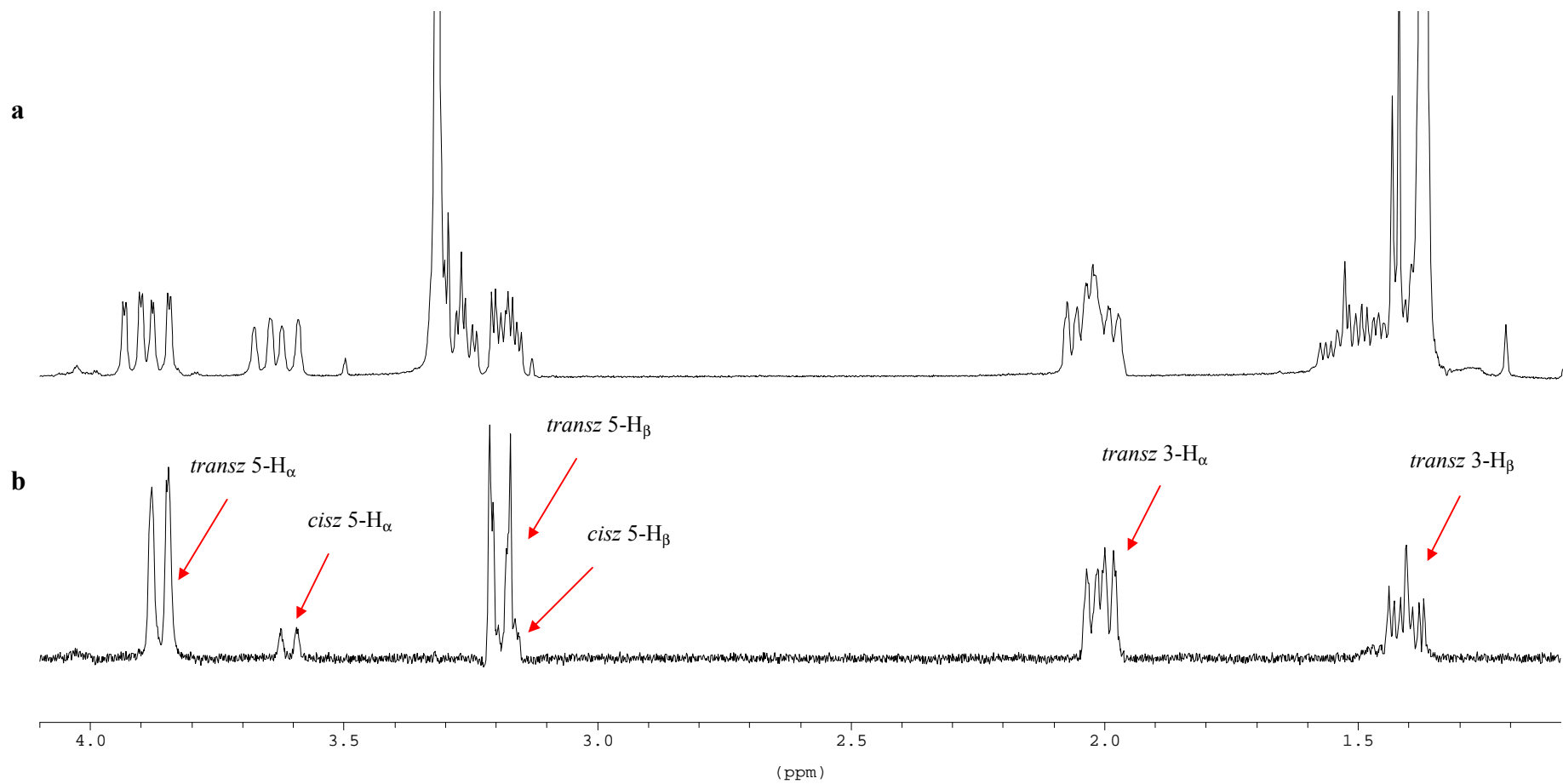
19. ábra

$^1\text{H}-^{19}\text{F}$  vicinális spin-spin csatolásra parametrizált Karplus összefüggés ábrázolása. Az összefüggés a csatolási állandónak csak a diéderes  $^1\text{H}-^{19}\text{F}$  szögtől való függését tartalmazza

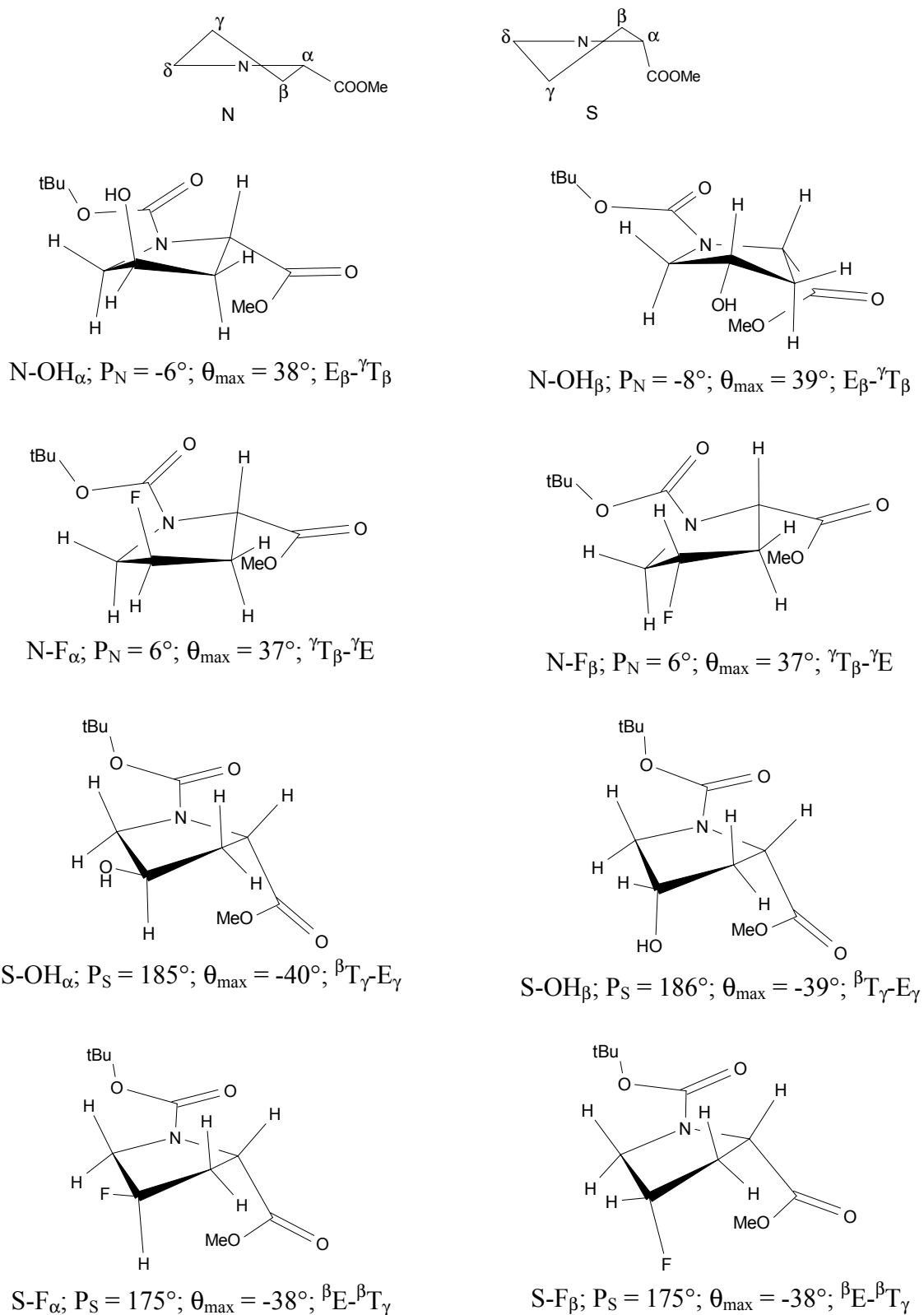
### 3.2.8. Összefoglalás

Összefoglalva, a vizsgált négy vegyületben az NOE adatok és a csatolási állandók igazolták a hidroxil és fluor csoportok relatív térállását. A  $4\alpha$ -hidroxil- illetve  $4\alpha$ -fluoro-prolin származék esetében, összhangban az irodalmi adatokkal<sup>46,47,48</sup>, a prolin gyűrű N konformációja a domináns térszerkezet oldatban, míg a  $4\beta$ -hidroxil- illetve  $4\beta$ -fluoro-prolin származék esetén

az S konformáció dominál. Így az oldatban a prolin gyűrű konformációja erősen függ a négyes helyzetben lévő szubsztituens térhelyzetétől, míg az amid gátolt rotáció következtében kialakult *transz* illetve *cisz* rotamerek egymásba való átalakulása lényegesen nem befolyásolja a gyűrű konformációját. Megfigyeltük, hogy a prolin gyűrű 4-es helyzetű elektronegatív szubsztituensének térállása hatással van a *transz-cisz* átalakulás sebességére: a  $4\alpha$ -szubsztituált származékokban a *transz-cisz* átalakulás lassúbb, mint a  $4\beta$ -szubsztituált származékok esetében, feltehetően a szterikus effektus miatt. Ezek az eredmények igazolják, hogy N-tercier-butoxikarbonil- $4\alpha$ -, illetve N-tercier-butoxikarbonil- $4\beta$ -hidroxiprolinmetilészter és DAST reakciója inverzióval megy végbe, más vegyületek irodalomban leírt viselkedéséhez hasonlóan.



20. ábra  
1D TOCSY gradiens spektrum



21. ábra

A molekulamechanika MM<sup>+</sup> módszerrel energiaminimalizált egy-egy jellemző transz-N és transz-S konformer (a megfelelő pszeudorotációs paraméterekkel)

**8. táblázat.** A 4-hidroxirolin származék (**3a**) *transz/cisz* aránya különböző oldószerekben

Oldószer	<i>transz/cisz</i> arány
C6D6	63/37
Aceton	63/37
MeOD	62/38
DMF	62/38
C5ND5	58/42

**9. táblázat.** A 4-hidroxirolin származék (**3a**) <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR kémiai eltolódások benzolban

N <sup>o</sup>	<i>transz</i> $\delta$ , ppm		<i>cisz</i> $\delta$ , ppm	
	<sup>1</sup> H, ppm	<sup>13</sup> C, ppm	<sup>1</sup> H, ppm	<sup>13</sup> C, ppm
5-H <sub><math>\alpha</math></sub>	3.57	55.2	3.37	55.0
5-H <sub><math>\beta</math></sub>	3.48		3.48	
4-H	3.88	69.2	3.98	70.0
3-H <sub><math>\alpha</math></sub>	2.00	39.2	1.91	38.6
3-H <sub><math>\beta</math></sub>	1.70		1.74	
2-H <sub><math>\alpha</math></sub>	4.47	58.5	4.60	58.2
OMe	3.34	51.5	3.37	51.8
t-Bu-Me	1.38	28.3	1.41	28.4
t-Bu-C	-	80.0	-	79.9
Amid-C=O	-	154.3	-	154.9
Észter C=O	-	173.7	-	173.5

**10. táblázat.** A 4-hidroxirolin származék (**3b**)  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódások és  $T_1$  relaxációs idők benzolban

N <sup>o</sup>	<i>transz</i> $\delta$ , ppm			<i>cisz</i> $\delta$ , ppm		
	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec
5-H <sub><math>\alpha</math></sub>	3.10	55.5	1.33	3.23	55.9	1.36
5-H <sub><math>\beta</math></sub>	3.57		1.26	3.69		1.26
4-H	3.82	69.8	2.16	3.71	71.1	2.11
3-H <sub><math>\alpha</math></sub>	1.48	38.7	1.32	1.55	37.8	1.32
3-H <sub><math>\beta</math></sub>	1.68		1.24	1.75		1.24
2-H <sub><math>\alpha</math></sub>	4.03	58.2	3.24	4.26	58.1	3.33
OMe	3.27*	51.8*	-	3.26*	52.1*	-
OH	3.36	-	2.34	2.74	-	2.55
t-Bu-Me	1.45	28.4*	-	1.45	28.3*	-
t-Bu-C	-	79.7	-	-	79.8	-
Amid-C=O	-	153.7	-	-	154.5	-
Észter C=O	-	174.7	-	-	175.4	-

\* - felcserélhető hozzárendelés is lehetséges

**11. táblázat.** A 4-fluoroprolin származék (**4a**)  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódások benzolban

N <sup>o</sup>	<i>transz</i> $\delta$ , ppm		<i>cisz</i> $\delta$ , ppm	
	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm
5-H <sub><math>\alpha</math></sub>	3.89	53.3	3.64	53.3
5-H <sub><math>\beta</math></sub>	3.24		3.23	
4-H	4.29	91.0	4.41	92.0
3-H <sub><math>\alpha</math></sub>	2.05	37.4	2.03	36.4
3-H <sub><math>\beta</math></sub>	1.46		1.50	
2-H <sub><math>\alpha</math></sub>	4.36	57.8	4.57	57.7
OMe	3.32	51.5	3.32	51.7
t-Bu-Me	1.39	28.2	1.41	28.3
t-Bu-C	-	79.9	-	80.0
amid-C=O	-	153.5	-	154.1
észter C=O	-	173.0	-	172.8

$^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$  csatolási állandók a *transz* rotamerben:  $^1J_{4\text{C-F}}=178.6\text{ Hz}$ ;  $^2J_{3\text{C-F}}=22.6\text{ Hz}$ ;  $^2J_{5\text{C-F}}=23.2\text{ Hz}$ ;

$^3J_{2\text{C-F}}\approx 0\text{ Hz}$

$^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$  csatolási állandók a *cisz* rotamerben:  $^1J_{4\text{C-F}}=178.9\text{ Hz}$ ;  $^2J_{3\text{C-F}}=22.5\text{ Hz}$ ;  $^2J_{5\text{C-F}}=23.2\text{ Hz}$ ;

$^3J_{2\text{C-F}}\approx 0\text{ Hz}$

**12. táblázat.** Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR kémiai eltolódások; a mért  $^1\text{H}$   $T_1$  relaxációs idők a **4b** minta oxigén mentesítés előtt és után

N <sup>o</sup>	<i>transz</i> $\delta$ , ppm				<i>cisz</i> $\delta$ , ppm			
	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec (ox. mentesítés. előtt)	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec (ox. mentesítés után)	$^1\text{H}$ , ppm	$^{13}\text{C}$ , ppm	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec (ox. mentesítés előtt)	$^1\text{H}$ $T_1$ relax. idő, sec (ox. mentesítés után)
5-H <sub><math>\alpha</math></sub>	3.22	53.0	1.7	2.2	3.06	51.6	1.8	2.3
5-H <sub><math>\beta</math></sub>	3.83		1.6	1.8	3.62		1.6	2.0
4-H	4.26	91.0	-	-	4.34	92.0	-	-
3-H <sub><math>\alpha</math></sub>	1.64-1.28	37.3	-	-	1.64-1.28	36.3	-	-
3-H <sub><math>\beta</math></sub>	2.08		1.5*	1.9*	2.08		1.5*	1.9*
2-H <sub><math>\alpha</math></sub>	4.18	57.9	-	-	4.47	57.7	3.7	5.6
OMe	3.35	51.6	2.7	3.9	3.32	51.7	2.8	3.9

- a *transz* és *cisz* 3H <sub>$\alpha$</sub>  és 3H <sub>$\beta$</sub>  protonok jelátfedése miatt a mért  $T_1$  relaxációs idők a két rotamer relaxációs idejük átlagának felel meg

**Geminális  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandók a *transz* rotamerben:**  $^2J_{5\text{H}\alpha-5\text{H}\beta}=13.3$  Hz;  $^2J_{3\text{H}\alpha-3\text{H}\beta}=14.8$  Hz

**Geminális  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandók a *cisz* rotamerben:**  $^2J_{5\text{H}\alpha-5\text{H}\beta}=12.9$  Hz;  $^2J_{3\text{H}\alpha-3\text{H}\beta}=14.3$  Hz

**$^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$  csatolási állandók a *transz* rotamerben:**  $^1J_{4\text{C-F}}=176.9$  Hz;  $^2J_{3\text{C-F}}=21.4$  Hz;  $^2J_{5\text{C-F}}=^3J_{2\text{C-F}}\approx 0$  Hz

**$^{13}\text{C}$ - $^{19}\text{F}$  csatolási állandók a *cisz* rotamerben:**  $^1J_{4\text{C-F}}=177.9$  Hz;  $^2J_{3\text{C-F}}=22.4$  Hz;  $^2J_{5\text{C-F}}=^3J_{2\text{C-F}}\approx 0$  Hz

13. táblázat.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  és  $^1\text{H}$ - $^{19}\text{F}$  vicinális és geminális csatolási állandók (deuterált benzolban)

Csatolás típusa	4-hidroxirolin, 3a anyag		4-hidroxirolin, 3b anyag		4-fluoroprolin, 4a anyag		4-fluoroprolin, 4b anyag	
	<i>transz</i> , Hz	<i>cisz</i> , Hz	<i>transz</i> , Hz	<i>cisz</i> , Hz	<i>transz</i> , Hz	<i>cisz</i> , Hz	<i>transz</i> , Hz	<i>cisz</i> , Hz
$^2J_{5\text{H}2}$	11.6	11.5	11.4	11.9	13.3	12.8	13.2	12.9
$^2J_{3\text{H}2}$	12.9	12.7	14.2	14.3	14.2	14.6	14.8	14.3
$^2J_{4\text{H-F}}$	-	-	-	-	52.6	52.6	53.0	53.1
$^3J_{5\text{H}\alpha-4\text{H}}$	2.3	2.8	4.4	4.9	2.1	2.1	4.5	4.6
$^3J_{5\text{H}\beta-4\text{H}}$	4.4	4.4	1.4	1.4	3.4	3.5	$\approx 1$	$\approx 1$
$^3J_{3\text{H}\alpha-4\text{H}}$	2.3	2.8	4.9	4.8	$\sim 2$	1.8	4.4	4.3
$^3J_{3\text{H}\beta-4\text{H}}$	4.5	4.5	3.5	4.0	4.0	4.5	$\approx 1$	$\approx 1$
$^3J_{2\text{H}\alpha-3\text{H}\alpha}$	8.0	7.6	9.8	9.8	7.9	7.9	9.9	9.8
$^3J_{2\text{H}\alpha-3\text{H}\beta}$	8.0	7.6	2.1	1.9	9.3	8.7	1.6	1.6
$^3J_{4\text{H-OH}}$	-	-	10.5	8.6	-	-	-	-
$^3J_{5\text{H}\alpha\text{F}}$	-	-	-	-	21.9	22.3	35.4	34.2
$^3J_{5\text{H}\beta\text{F}}$	-	-	-	-	37.1	35.2	26.8	27.0
$^3J_{3\text{H}\alpha\text{F}}$	-	-	-	-	21.3	20.1	-	-
$^3J_{3\text{H}\beta\text{F}}$	-	-	-	-	38.3	36.8	19.1	18.8

**14. táblázat.** A NOESY spektrum keresztcsúcsai a **3a** jelzésű 4-hidroxirolin származékban. A c: *cisz* forma; t: *transz* forma

	<i>transz</i> NOE	<i>transz</i> cserélődési	<i>cisz</i> NOE	<i>cisz</i> cserélődési
2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , t-Bu, c3-H <sub>α</sub>	c2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , t-Bu, t3-H <sub>α</sub>	t2-H <sub>α</sub>
3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub> , c2-H <sub>α</sub>	-	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub> , t2-H <sub>α</sub>	-
3-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>β</sub>	-	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>β</sub>	-
4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub> , t-Bu	c4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub> , t-Bu	t4-H
5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>α</sub> , c4-H, t-Bu	c5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>α</sub> , t4-H, t-Bu	t5-H <sub>α</sub>
5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 4-H, c4-H, t-Bu	c5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 4-H, t4-H, t-Bu	t5-H <sub>β</sub>

**15. táblázat.** A NOESY spektrum keresztcsúcsai **3b** jelzésű 4-hidroxirolin származékban. A c: *cisz* forma; t: *transz* forma

	<i>transz</i> NOE	<i>transz</i> cserélődési	<i>cisz</i> NOE	<i>cisz</i> cserélődési
2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , c5-H <sub>α</sub> , t-Bu	c2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , t5-H <sub>α</sub> , t-Bu	t2-H <sub>α</sub>
3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 4-H	c3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 4-H	t3-H <sub>α</sub>
3-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	c3-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	t3-H <sub>β</sub>
4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	c4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	t4-H
5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>α</sub> , c5-H <sub>β</sub> , c4-H, t-Bu	c5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , t5-H <sub>β</sub> , t4-H, t-Bu	t5-H <sub>α</sub>
5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, c5-H <sub>α</sub> , c4-H, t-Bu	c5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, t5-H <sub>α</sub> , t4-H, t-Bu	t5-H <sub>β</sub>
4-OH	3-H <sub>β</sub>	c4-OH	3-H <sub>β</sub>	t4-OH

**16. táblázat.** A NOESY spektrum keresztcsúcsai **4a** jelzésű 4-fluoroprolin származékban. A c: *cisz* forma; t: *transz* forma

	<i>transz</i> NOE	<i>transz</i> cserélődési	<i>cisz</i> NOE	<i>cisz</i> cserélődési
2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub>	c2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub>	t2-H <sub>α</sub>
3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-
3-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>β</sub>	-	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H, 5-H <sub>β</sub>	-
4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	c4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	t4-H
5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, c4-H	c5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, t4-H	t5-H <sub>α</sub>
5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, c5-H <sub>α</sub> , c4-H, 3-H <sub>β</sub>	c5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, t5-H <sub>α</sub> , t4-H, 3-H <sub>β</sub>	t5-H <sub>β</sub>

**17. táblázat.** A NOESY spektrum keresztcsúcsai **4b** jelzésű 4-fluoroprolin származékban. A c: *cisz* forma; t: *transz* forma

	<i>transz</i> + NOE	<i>transz</i> cserélődési	<i>cisz</i> + NOE	<i>cisz</i> cserélődési
2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , c5-H <sub>α</sub> , c4-H	c2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub>	t2-H <sub>α</sub>
3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-	3-H <sub>β</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-
3-H <sub>β</sub>	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-	3-H <sub>α</sub> , 2-H <sub>α</sub> , 4-H	-
4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	c4-H	3-H <sub>α</sub> , 3-H <sub>β</sub> , 5-H <sub>α</sub> , 5-H <sub>β</sub>	t4-H
5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , c5-H <sub>β</sub> , c4-H	c5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub> , 4-H, 2-H <sub>α</sub> , t5-H <sub>β</sub> , t4-H	t5-H <sub>α</sub>
5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, c5-H <sub>α</sub> , c4-H	c5-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub> , 4-H, t5-H <sub>α</sub> , t4-H	t5-H <sub>β</sub>

**18. táblázat.** A *transz-cisz* átalakulás sebességi állandó és *transz* illetve *cisz* rotamerek élettartama a **3a**, **3b**, **4a**, és **4b** jelzésű vegyületeknél

Vegyület kódja	K, s <sup>-1</sup>	<i>transz</i> , s	<i>cisz</i> , s
<b>3a</b>	3.4	0.8	0.5
<b>3b</b>	4.8	0.4	0.4
<b>4a</b>	3.3	0.7	0.5
<b>4b</b>	4.8	0.4	0.3

**19. táblázat.** 1D <sup>1</sup>H NMR és 2D NOESY, COSY NMR spektrumokból meghatározott <sup>1</sup>H-<sup>19</sup>F geminális és vicinális spin-spin csatolási állandók összehasonlítása a *transz* és *cisz* rotamerekben

<b>4a</b>				
	<i>transz</i>		<i>cisz</i>	
<sup>1</sup> H- <sup>19</sup> F diédres szögek	1D <sup>1</sup> H NMR	NOESY, COSY	1D <sup>1</sup> H NMR	NOESY, COSY
FC(4)C(5)H <sub>α</sub> =-38.36°	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 21.9 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 22.3 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 22.3 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 22.3 Hz
FC(4)C(5)H <sub>β</sub> =-162.31°	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 37.1 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 37.8 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 35.2 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 37.6 Hz
-	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>β</sub>-F</sub> = 52.6 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>β</sub>-F</sub> = 52.4 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>β</sub>-F</sub> = 52.6 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>β</sub>-F</sub> = 51.4 Hz
FC(4)C(3)H <sub>β</sub> =166.74°	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 38.3 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 35.9 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 36.8 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 35.0 Hz
FC(4)C(3)H <sub>α</sub> =46.69°	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 21.3 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 23.1 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 20.1 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 22.0 Hz
<b>4b</b>				
FC(4)C(5)H <sub>α</sub> =158.7°	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 35.4 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 36.1 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 34.2 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>α</sub>-F</sub> = 34.5 Hz
FC(4)C(5)H <sub>β</sub> =34.3°	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 26.8 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 26.9 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 27.0 Hz	<sup>3</sup> J <sub>5H<sub>β</sub>-F</sub> = 27.0 Hz
-	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>α</sub>-F</sub> = 53.0 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>α</sub>-F</sub> = 52.9 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>α</sub>-F</sub> = 53.1 Hz	<sup>2</sup> J <sub>4H<sub>α</sub>-F</sub> = 52.9 Hz
FC(4)C(3)H <sub>β</sub> =-48.0°	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 19.1 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 18.9 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 18.8 Hz	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>β</sub>-F</sub> = 18.9 Hz
FC(4)C(3)H <sub>α</sub> =-167.8°	-	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 41.6 Hz	-	<sup>3</sup> J <sub>3H<sub>α</sub>-F</sub> = 40.8 Hz

**20. táblázat.** A proliigyűrűben mért és molekulamechanikával számolt <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a hidroxil csoport β-térállása esetén

Torziós szög	N	N <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz	S	S <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz	Mért <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz
2-H <sub>α</sub> -C(2)-C(3)-3-H <sub>α</sub>	-34.89°	<b>6.6</b>	36.34°	<b>7.0</b>	<b>8.0</b>
2-H <sub>α</sub> -C(2)-C(3)-3-H <sub>β</sub>	-156.27°	<b>10.6</b>	-84.28°	<b>1.1</b>	<b>8.0</b>
3-H <sub>α</sub> -C(3)-C(4)-4-H <sub>α</sub>	45.10°	<b>6.4</b>	-41.31°	<b>4.5</b>	<b>2.3</b>
3-H <sub>β</sub> -C(3)-C(4)-4-H <sub>α</sub>	165.86°	<b>10.5</b>	78.45°	<b>1.8</b>	<b>4.5</b>
4-H <sub>α</sub> -C(4)-C(5)-5-H <sub>α</sub>	-37.27°	<b>7.7</b>	31.76°	<b>5.2</b>	<b>2.4</b>
4-H <sub>α</sub> -C(4)-C(5)-5-H <sub>β</sub>	-161.90°	<b>9.8</b>	-92.44°	<b>1.4</b>	<b>4.4</b>

**21. táblázat.** A proliigyűrűben mért és molekulamechanikával számolt <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a hidroxil csoport α-térállása esetén

Torziós szög	N	N <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz	S	S <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz	Mért <sup>3</sup> J <sub>H-H</sub> , Hz
2-H <sub>α</sub> -C(2)-C(3)-3-H <sub>α</sub>	-35.96°	<b>6.4</b>	36.18°	<b>7.0</b>	<b>8.0</b>
2-H <sub>α</sub> -C(2)-C(3)-3-H <sub>β</sub>	-156.65°	<b>10.0</b>	-84.98°	<b>1.1</b>	<b>8.0</b>
3-H <sub>α</sub> -C(3)-C(4)-4-H <sub>β</sub>	-76.67°	<b>1.9</b>	-167.30°	<b>10.6</b>	<b>2.3</b>
3-H <sub>β</sub> -C(3)-C(4)-4-H <sub>β</sub>	43.27°	<b>4.2</b>	-46.96°	<b>6.1</b>	<b>4.5</b>
4-H <sub>β</sub> -C(4)-C(5)-5-H <sub>α</sub>	84.13°	<b>1.5</b>	157.09°	<b>9.2</b>	<b>2.4</b>
4-H <sub>β</sub> -C(4)-C(5)-5-H <sub>β</sub>	-39.76°	<b>4.0</b>	32.17°	<b>8.3</b>	<b>4.4</b>

**22. táblázat** A prolilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a hidroxil csoport  $\beta$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-34.89°	6.6	36.34°	7.0	9.8
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.27°	10.6	-84.28°	1.1	2.1
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	45.10°	6.4	-41.31°	4.5	4.9
3 $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	165.86°	10.5	78.45°	1.8	3.5
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	-37.27°	7.7	31.76°	5.2	4.4
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-161.90°	9.8	-92.44°	1.4	1.4

$$-^3 J_{\text{H}\alpha\text{-OH}} = 10.5 \text{ Hz}$$

**23. táblázat.** A prolilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a hidroxil csoport  $\alpha$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-35.96°	6.4	36.18°	7.0	9.8
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.65°	10.0	-84.98°	1.1	2.1
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	-76.67°	1.9	-167.30°	10.6	4.9
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	43.27°	4.2	-46.96°	6.1	3.5
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	84.13°	1.5	157.09°	9.2	4.4
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-39.76°	4.0	32.17°	8.3	1.4

$$-^3 J_{\text{H}\alpha\text{-OH}} = 10.5 \text{ Hz}$$

**24. táblázat.** A prolilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *cisz* konformerekben, a hidroxil csoport  $\beta$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-35.3°	6.6	34.9°	7.1	9.8
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.7°	10.7	-85.8°	1.1	1.9
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	44.9°	6.4	-40.9°	4.5	4.8
3 $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	165.8°	10.5	79.0°	1.7	4.0
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	-36.9°	7.7	32.4°	5.1	4.9
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-161.6°	9.8	-91.6°	1.4	1.4

$$-^3 J_{\text{H}\alpha\text{-OH}} = 8.6 \text{ Hz}$$

**25. táblázat.** A prolilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *cisz* konformerekben, a hidroxil csoport  $\alpha$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3 J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-37.3°	6.3	34.1°	7.3	9.8
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-158.1°	10.8	-87.1°	1.1	1.9
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	-76.4°	2.0	-166.8°	10.6	4.8
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	43.8°	4.1	-46.4°	6.3	4.0
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	84.8°	1.5	158.1°	9.3	4.9
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-39.2°	4.2	33.4°	8.2	1.4

$$-^3 J_{\text{H}\alpha\text{-OH}} = 8.6 \text{ Hz}$$

**26. táblázat.** A proliilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) konformerekben, a fluor csoport  $\beta$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	transz mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	cisz mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-34.84°	6.6	33.84°	7.3	7.9	7.9
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.02°	10.6	-87.17°	1.1	9.3	8.7
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	46.69°	6.6	-45.29°	3.1	~2	1.8
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	166.74°	10.3	74.51°	2.1	4.0	4.5
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	-38.35°	8.2	36.53°	3.7	2.1	2.1
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-162.31°	9.4	-87.89°	1.1	3.4	3.5

**27. táblázat.** A proliilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) konformerekben, a fluor csoport  $\alpha$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	transz mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	cisz mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-34.84°	6.6	33.88°	7.3	7.9	7.9
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.02°	10.6	-87.13°	1.1	9.3	8.7
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	-75.87°	2.0	167.76°	10.5	~2	1.8
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	44.17°	3.2	-47.96°	6.5	4.0	4.5
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	83.89°	1.3	158.63°	9.0	2.1	2.1
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-40.07°	3.2	34.21°	8.6	3.4	3.5

**28. táblázat.** A proliilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a fluor csoport  $\beta$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-34.84°	6.6	33.84°	7.3	9.9
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.02°	10.6	-87.17°	1.1	1.6
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	46.69°	6.6	-45.29°	3.1	4.4
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\alpha$	166.74°	10.3	74.51°	2.1	~1
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	-38.35°	8.2	36.53°	3.7	4.5
4- $\text{H}_\alpha$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-162.31°	9.4	-87.89°	1.1	~1

-  $^4J_{5\text{H}\beta-3\text{H}\beta} \sim 2$  Hz

**29. táblázat.** A proliilgyűrűben mért és molekulamechanikával számolt  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vicinális spin-spin csatolási állandók az északi (N) és déli (S) *transz* konformerekben, a fluor csoport  $\alpha$ -térállása esetén

Torziós szög	N	$N^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	S	$S^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	Mért $^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\alpha$	-34.84°	6.6	33.88°	7.3	9.9
2- $\text{H}_\alpha$ -C(2)-C(3)-3- $\text{H}_\beta$	-156.02°	10.6	-87.13°	1.1	1.6
3- $\text{H}_\alpha$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	-75.87°	2.0	-167.76°	10.5	4.4
3- $\text{H}_\beta$ -C(3)-C(4)-4- $\text{H}_\beta$	44.17°	3.2	-47.96°	6.5	~1
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\alpha$	83.89°	1.3	158.63°	9.0	4.5
4- $\text{H}_\beta$ -C(4)-C(5)-5- $\text{H}_\beta$	-40.07°	3.2	34.21°	8.6	~1

-  $^4J_{5\text{H}\beta-3\text{H}\beta} \sim 2$  Hz

**30. táblázat.** A NOESY spektrumokból meghatározott proton-proton távolságok mind a négy molekulában

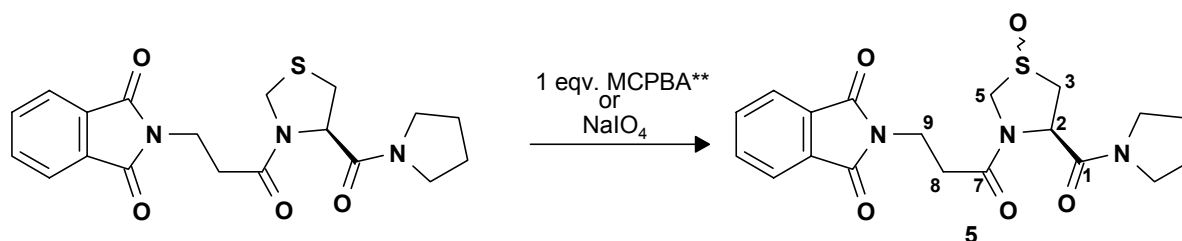
	<b>3a</b>		<b>3b</b>		<b>4a</b>		<b>4b</b>	
	NMR, Å	Modellezés, Å	NMR, Å	Modellezés, Å	NMR, Å	Modellezés, Å	NMR, Å	Modellezés, Å
2-H <sub>α</sub> -3-H <sub>α</sub>	2.3	2.5	-	2.4	2.4	2.5	-	2.4
2-H <sub>α</sub> -3-H <sub>β</sub>	2.9	3.1	3.0	2.8	2.7	3.1	-	2.8
2-H <sub>α</sub> -4-H	-	4.0	-	4.2	-	4.0	-	4.3
2-H <sub>α</sub> -5-H <sub>α</sub>	-	3.8	3.4	3.7	-	3.8	3.2	3.7
2-H <sub>α</sub> -5-H <sub>β</sub>	-	4.0	-	4.2	-	4.0	-	4.2
3-H <sub>α</sub> -4-H	2.8	2.8	-	2.4	2.9	2.7	2.1	2.5
3-H <sub>α</sub> -5-H <sub>α</sub>	-	4.3	2.8	2.8	-	4.3	-	2.9
3-H <sub>α</sub> -5-H <sub>β</sub>	-	4.0	-	3.9	-	4.0	-	3.9
3-H <sub>β</sub> -4-H	2.2	2.5	3.1	2.7	2.5	2.5	2.8	2.7
3-H <sub>β</sub> -5-H <sub>α</sub>	-	3.9	-	4.0	-	3.9	-	4.0
3-H <sub>β</sub> -5-H <sub>β</sub>	-	2.8	-	4.3	-	2.8	-	4.3
4-H-5-H <sub>α</sub>	-	2.8	2.6	2.4	2.9	2.8	2.3	2.5
4-H-5-H <sub>β</sub>	2.2	2.5	3.2	2.8	2.5	2.5	2.8	2.8

### 3.3. Szulfoxid csoport konfigurációjának meghatározása a szulfoxid tartalmú prolin származékokban ASIS módszer alapján<sup>1</sup>

#### 3.3.1. Bevezetés

A PEP inhibitorok kutatása során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy vajon egy inhibitor molekulán belül melyik az a részegység, amely a biológiai hatásért (aktivitásáért) felelős. Számos hasonló összetételű inhibitor hatással rendelkező molekulát vizsgáltuk meg és arra a következtetésre jutottunk, hogy az enzim felismeréséért, feltételezhetően, a prolin-pirrolidin vagy tioprolin-pirrolidin részegységük a felelős. Ezen kívül az inhibitor molekulának egy hidrofób részt is kell tartalmaznia, amely, feltehetően, az enzim "hidrofób zsebével" lép kölcsönhatásba.<sup>49</sup> A legtöbb ismert PEP inhibitornál az említett hidrofób részt, egy aromás gyűrűt tartalmazó szubsztituens jelenti, amely a prolin N-terminális atomjához kapcsolódik különböző számú metilén csoporton keresztül.<sup>50</sup> Így a fentebb felsorolt részeket változtatva végezve olyan származékokhoz jutottunk, amelyek a prolin gyűrű C(4)-es atom helyén egy kénatomot tartalmaztak. A kénatom beépítése a prolin gyűrűbe a biológiai hatás gyengüléséhez vezetett, amelyet az oxidációs fok növelése kompenzált. Ezen kívül a változás csökkentette a vegyületek metabolikus stabilitását, mivel a szerkezetben fellépő oxidációs folyamatoknak köszönhetően szulfoxid és szulfon származékok is képződhetnek. Ezért terveztük a szulfoxid származékok előállítását és tesztelését.

A lentebb látható reakció segítségével (22. ábra) a kívánt **5** termékhez jutottunk. A HPLC vizsgálat alapján a termék két komponensből (major és minor) állt, amelyek aránya változott az alkalmazott oxidációs körülmények függvényében. Így fontos volt a szulfoxid csoport konfigurációjának meghatározása a kapott **5** termékben.



22. ábra

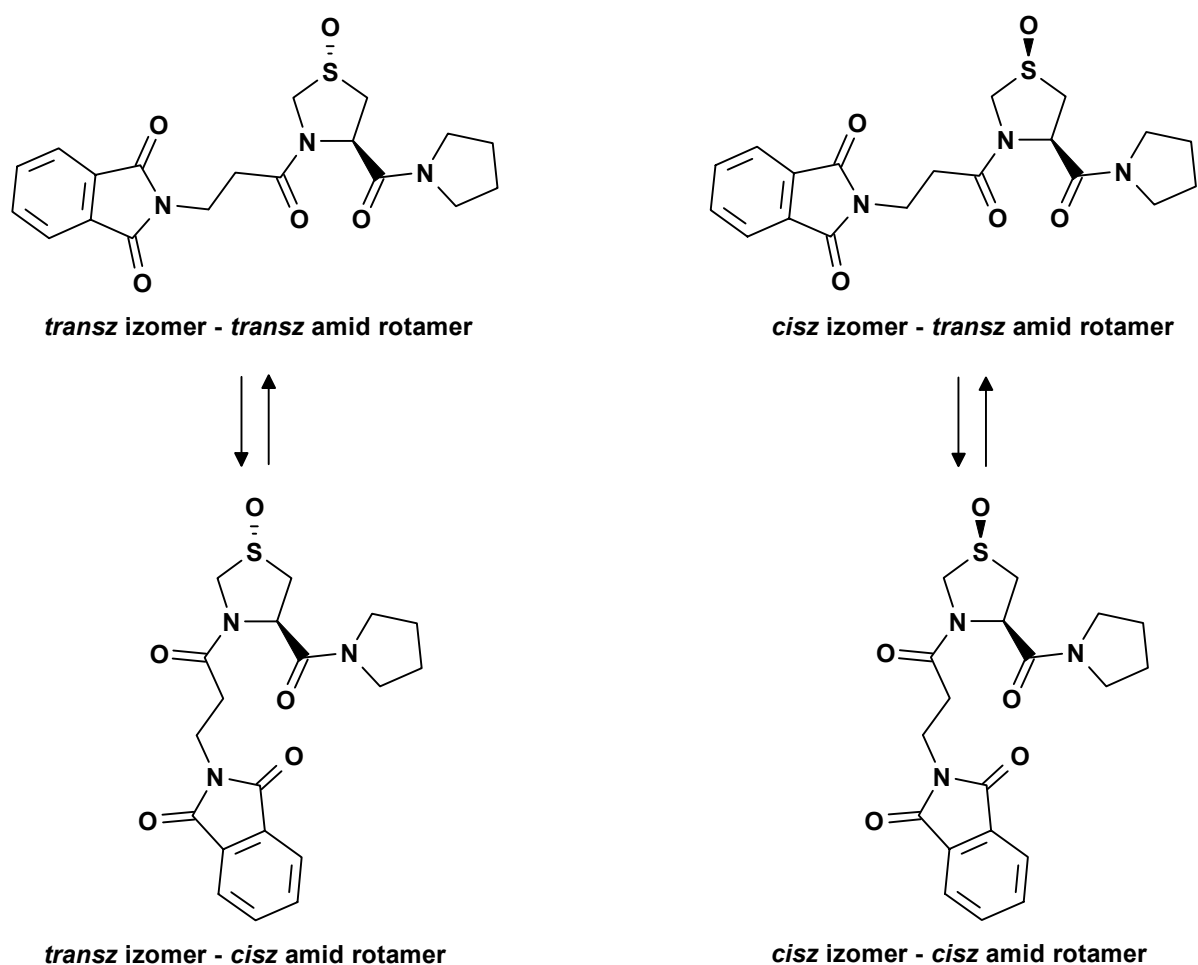
#### 3.3.2. PEP inhibitor tioprolin szulfoxidok NMR vizsgálata

Az **5** termék DMSO- $d_6$  oldószerben szobahőmérsékleten felvett  $^1\text{H}$  NMR spektrumában négy jelsorozat volt látható, melyek a  $110^\circ\text{C}$ -on felvett spektrumban részben összeolvadtak. Azok a jelsorozatok, amelyek a hőmérséklet növelésével összeolvadtak tehát a tioprolin *transz-cisz* amid rotamerektől származnak, míg a  $110^\circ\text{C}$ -on is különálló jelek azoktól a *transz-cisz* diasztereomer szerkezetektől, melyekben a szulfoxid oxigén az öttagú pirrolidilgyűrű karbonil csoportjához képest azonos illetve ellentétes oldalán helyezkedik el (23. ábra).

\*\* -Metaklorperbenzoesav (MetaChlorPerBenzoic Acid)

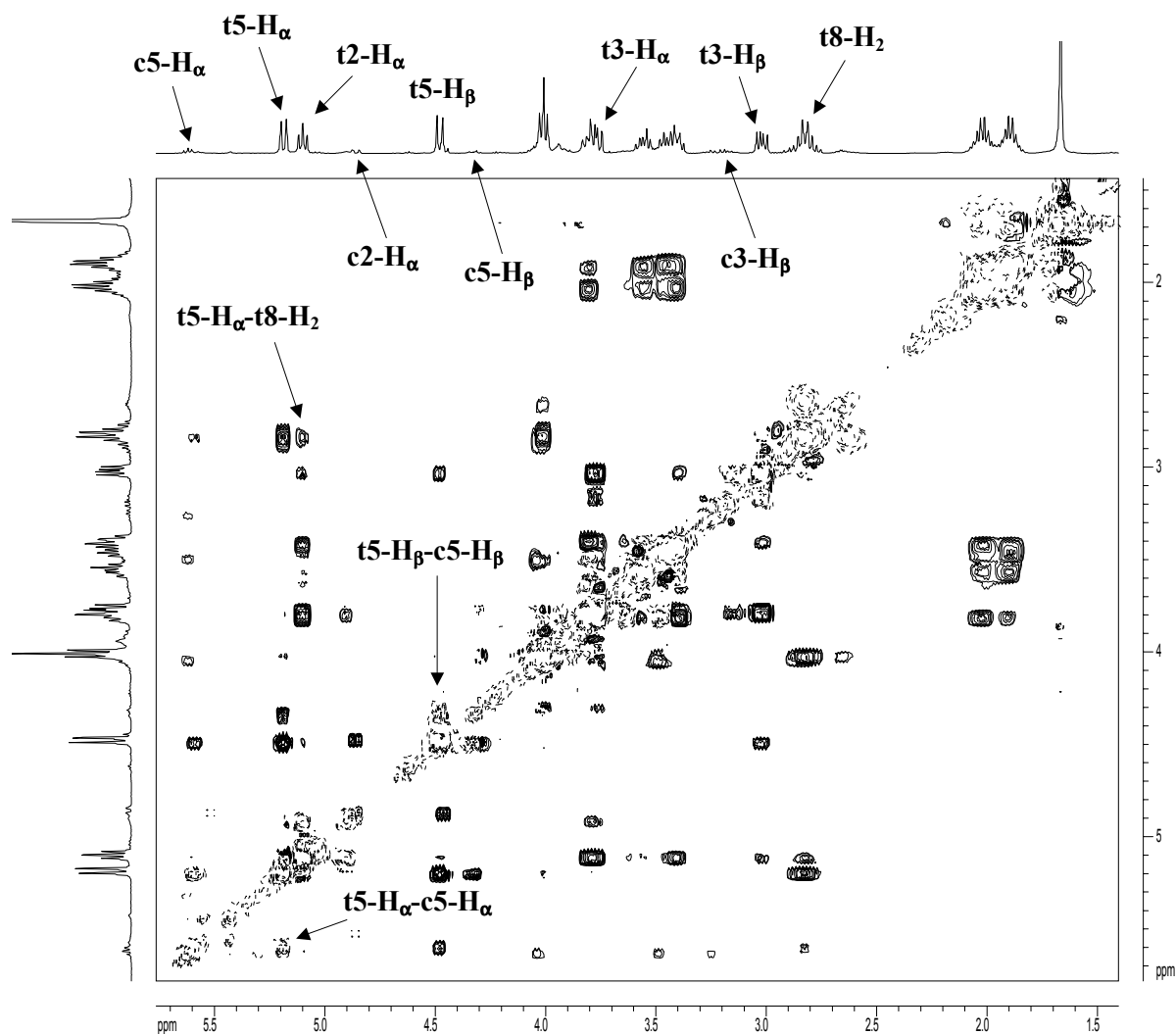
A szulfoxid csoport térállásának azonosítására használható az NMR spektroszkópiában az ASIS (Aromatic Solvent Induced Shifts) érték<sup>51</sup>, ugyanis ismert, hogy a benzol oldószer szolvotálás során elkerüli a poláros molekulák negatívan töltött részét, így a szulfoxiddal az öttagú gyűrű azonos oldalán levő protonokra kisebb kémiai eltolódás csökkenést várunk benzolban, a kloroformban meghatározott értékekhez képest, mint az ellentétes oldalon levő protonokra. Az ASIS értékek meghatározásához szükséges mind benzolban, mind kloroformban ismerni a protonok kémiai eltolódásait. Ezt megnehezíti az a tény, hogy e két oldószerben a *transz*/*cisz* amid rotamer arány nagymértékben eltolódik a *transz* forma irányába (lásd 3.1. fej. 4. táblázat és 3.2. fej. 8. táblázat) (31. táblázat).

Az egyértelmű <sup>1</sup>H NMR jelhozrendelést, a sulfoxid izomerek oszlop kromatográfiaszétválasztása után, a 2D NOESY spektrumok felvétele tette lehetővé. E spektrumokban ugyanis a diagonális csúcsokkal ellentétes fázisú keresztcsúcsok az egymással térközelségben levő atomokról adnak információt. Így a t5-H<sub>α</sub> - t8-H<sub>2</sub> keresztcsúcs segítségével (24. ábra) mindkét izomer major jelsorozatát a *transz* rotamerhez rendeltük hozzá. Ismerve 2-H<sub>α</sub> térállását a *transz* amid rotamerekben megkaptuk a diasztereotóp metilén protonok (3-H<sub>2</sub> és 5-H<sub>2</sub>) hozzárendelését. A 2D NOESY spektrumban a diagonális jelekkel azonos fázisú keresztcsúcsok a kémiai kicserélődéstől származnak, és mivel az alkalmazott keverési idő alatt a *transz*-*cisz* amid rotamerek egymásba alakulása többször is lejátszódik, a megfelelő keresztcsúcsokból leolvashatók az 1D spektrumban kiszélesedés vagy jelátfedés miatt detektálhatatlan *cisz* amid rotamerektől származó jelek kémiai eltolódásai (24. ábra).



23. ábra

A NOESY spektrum keresztcsúcsait a **32. táblázatban**, a tioprolilgyűrű protonjainak hozzárendelését együtt az ASIS értékekkel pedig a **33. táblázatban** foglaltuk össze.



24. ábra

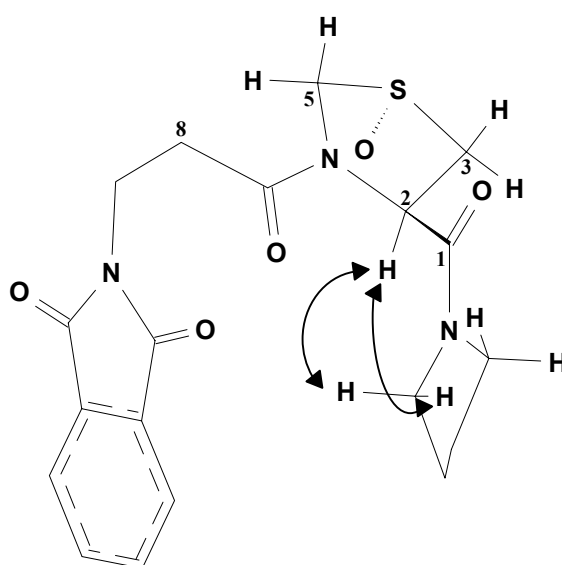
Az 5 vegyület 2D NOESY spektruma. A folytonos vonalakkal a negatív, míg megszakított vonalakkal a pozitív (diagonális + cserélődési) keresztcsúcsokat jelöltük

### 3.3.3. A szulfoxid csoport konfigurációjának meghatározása az ASIS értékek alapján

A szulfoxid csoport térállása a két metilén csoport  $\alpha$  és  $\beta$  helyzetű protonjaira számolt ASIS értékek összehasonlításából állapítható meg. A minor izomer *transz* illetve *cisz* rotamerekre számított ASIS értékek egyértelműen bizonyítják, hogy a szulfoxid csoport  $\beta$ -térállású (**33. táblázat**), mivel a kémiai eltolódás különbségek a  $\beta$ -protonokra kisebb értékek, mint az  $\alpha$ -protonokra. A 2- $H_\alpha$  és 2'- $H_a$  illetve 2'- $H_b$  protonok között fellépő intenzív NOE kölcsönhatás azt mutatja, hogy a korábban vizsgált SUAM-1221 molekulához hasonlóan, ebben az esetben is a domináns konformerben az N(6)-C(1)-C(2)-N(1') torziós szög  $120^\circ$

körüli érték (lásd 3.1.7. fej. 9. ábra és 12. ábra). Így a benzol molekulák jobban hozzáférnek illetve szolvatálják a prolilgyűrű  $\alpha$ -protonjait, mivel igyekeznek kikerülni az S(4) és C(1) atomokhoz kapcsolódó oxigénnel való kölcsönhatást, ami azt jelenti, hogy a szulfoxid és a C(1)-hez kapcsolódó karbonil csoportok a prolilgyűrű  $\beta$ -térfelén helyezkednek el.

A major izomer *cisz* amid rotamerben az  $\alpha$  helyzetű protonokra kisebb ASIS értékek adódtak, mint a  $\beta$  térállásúakra. Ez azt valószínűsíti, hogy a szulfoxid oxigén  $\alpha$  térállású, azaz a major komponens *transz* izomernek felel meg, melyben a szulfoxid oxigén és a C(1)-ez kapcsolódó karbonil oxigén a prolilgyűrű ellentétes oldalán található. A *transz* amid rotamerben az ASIS értékek az  $\alpha$ - és  $\beta$ -protonokra jelentősen nem különböztek egymástól (33. táblázat), vagyis a *transz* amid rotamerben a prolilgyűrű egyik oldala sem preferált szolvatálás szempontjából. Ezt azzal lehetne magyarázni, hogy a *cisz* rotamerhez képest, a C(7) atomhoz kapcsolódó karbonil a *transz* rotamer esetén nem befolyásolja az 5-H<sub>2</sub> protonok szolvatálását, így ezekre a protonokra közel egyforma ASIS hatást észlelünk (25. ábra).



25. ábra

A *transz* sulfoxid izomer *transz* amid rotamer domináns konformerje. A nyillak a jelölt protonok közötti NOE kölcsönhatást mutatják

Az ASIS hatást az öttagú gyűrű konformációja is befolyásolhatja. Az izomerek oldat konformációjára a csatolási állandók adnak információt. A benzolban és kloroformban mért csatolási állandók jó egyezése igazolja, hogy a két oldószerben hasonló a konformációs egyensúlyban résztvevő szerkezetek populációja, tehát a mért ASIS értékek valóban csak a szolvatálástól erednek. A 2-H <sub>$\alpha$</sub>  protonnak a 3-H<sub>2</sub> protonokkal mért csatolási állandói mutatják, hogy az izomerek oldatban több konformer egyensúlyi elegyként fordulnak elő. Jellegzetes különbség a két izomer között, hogy a major izomerben 2 Hz körüli távolható csatolás mérhető az 5-H <sub>$\alpha$</sub>  és 3-H <sub>$\alpha$</sub>  protonok között, míg a minor izomerben nem detektálható az ennek a kölcsönhatásnak megfelelő jelfelhasadás. Ugyanezt figyelték meg a belga szerzők az N-acetil-4-karboxi-1,3-tiazolidin-1-oxidban<sup>52</sup> és észter származékaikban. Az izomer szerkezetet egy vegyület esetén egykristály röntgendiffrakciós vizsgálatokkal is igazolták.<sup>53</sup> Így az említett eredmények is alátámasztják az ASIS értékek alapján tett megállapításunkat, miszerint a major komponens a *transz* izomernek felel meg.

### 3.3.4. Összefoglalás

Az  $^1\text{H}$  NMR spektrumokban megjelenő major és minor jelsorozatokat a 2D NOESY módszer segítségével hozzárendeltünk a *transz* illetve a *cisz* szulfoxid izomerekhez, amelyekben a szulfoxid csoport konfigurációját az ASIS értékek alapján határoztunk meg.

A két szulfoxid izomer egyértelmű hozzárendelése és konfiguráció megállapítása után, az oxidációs reakció (22. ábra) körülményeit változtatva, HPLC módszer segítségével meghatároztunk a *transz/cisz* (major/minor) izomerek arányát. Ahogyan ez a **34. táblázatból** is kiderül, az oxidációs reakció sztereoselektivitása erősen függ az alkalmazott reakció körülményeitől. Az MCPBA reagenst alkalmazva, gyakorlatilag csak a *transz* illetve  $\alpha$ -szulfoxid izomer keletkezik (>99%), miközben a  $\text{NaIO}_4$  a *transz* és a *cisz* izomerek keverékéhez vezet. A **34. táblázat** adataiból azt is lehet látni, hogy a reakció hőmérséklet növelése a sztereoselektivitás csökkenéséhez vezet.

**31. táblázat.** A *transz/cisz* izomer arányok meghatározása különböző oldószerekben

Oldószer	<i>transz/cisz</i> arány
DMSO-d <sub>6</sub>	77/23
CDCl <sub>3</sub>	94/6
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	96/4

**32. táblázat.** A két sulfoxid izomer tioprolin protonjainak a NOESY spektrumban azonosított keresztcsúcsai (t: *transz*, c: *cisz*)

Jel	A diagonális jelekkel ellentétes fázisú keresztcsúcs	A diagonális jelekkel megegyező fázisú keresztcsúcs
t8-H <sub>a</sub>	t5-H <sub>α</sub> ; t8-H <sub>b</sub>	-
t8-H <sub>b</sub>	t5-H <sub>α</sub> ; t8-H <sub>a</sub>	-
t5-H <sub>α</sub>	t5-H <sub>β</sub> ; c5-H <sub>β</sub> ; t8-H <sub>a</sub> ; t8-H <sub>b</sub>	c5-H <sub>α</sub>
t5-H <sub>β</sub>	t5-H <sub>α</sub> ; c5-H <sub>α</sub> ; t3-H <sub>β</sub>	c5-H <sub>β</sub>
t3-H <sub>α</sub>	t3-H <sub>β</sub> ; t2-H <sub>α</sub>	c3-H <sub>α</sub>
t3-H <sub>β</sub>	t3-H <sub>α</sub> ; t5-H <sub>β</sub>	c3-H <sub>β</sub>
t2-H <sub>α</sub>	t3-H <sub>α</sub> ; 2'-H <sub>a</sub> ; 2'-H <sub>b</sub>	c2-H <sub>α</sub>

**33. táblázat.** Az <sup>1</sup>H NMR kémiai eltolódások tioprolilgyűrűben és mért ASIS értékek a major és minor izomerekben, ppm

Oldószer/ASIS	Izomer	Rotamer	2-H <sub>α</sub>	3-H <sub>α</sub>	3-H <sub>β</sub>	5-H <sub>α</sub>	5-H <sub>β</sub>
CDCl <sub>3</sub>	<i>major</i>	<i>transz</i>	5.63	3.26	3.19	4.86	4.47
		<i>cisz</i>	5.30	3.56	2.97	5.52	4.19
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>		<i>transz</i>	5.43	2.60	2.60	4.18	3.79
		<i>cisz</i>	5.02	2.83	2.06	5.42	3.65
ASIS		<i>transz</i>	<b>0.20</b>	<b>0.66</b>	<b>0.59</b>	<b>0.68</b>	<b>0.68</b>
		<i>cisz</i>	<b>0.28</b>	<b>0.73</b>	<b>0.91</b>	<b>0.10</b>	<b>0.54</b>
CDCl <sub>3</sub>	<i>minor</i>	<i>transz</i>	5.10	3.77	3.02	5.18	4.47
		<i>cisz</i>	4.90	3.79	3.15	5.60	4.30
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>		<i>transz</i>	4.69	3.06	2.73	4.54	4.27
		<i>cisz</i>	4.50	3.09	2.90	5.36	4.27
ASIS		<i>transz</i>	<b>0.41</b>	<b>0.71</b>	<b>0.29</b>	<b>0.64</b>	<b>0.20</b>
		<i>cisz</i>	<b>0.40</b>	<b>0.70</b>	<b>0.25</b>	<b>0.24</b>	<b>0.03</b>

**34. táblázat.** Az α-, β-sulfoxid izomerek aránya a különböző reakció körülmények alatt

			α-sulfoxid ( <i>transz</i> )	β-sulfoxid ( <i>cisz</i> )
NaIO <sub>4</sub>	MeOH/víz	0°C	89.5	10.5
		25°C	86.7	13.3
		50°C	85.5	14.5
MCPBA	CHCl <sub>3</sub>	0°C	99.8	0.2
		25°C	99.5	0.5
		50°C	99.3	0.7
	MeOH	25°C	99.8	0.2

## 4. A flavanonok és benzofuranonok vizsgálata NMR módszerekkel

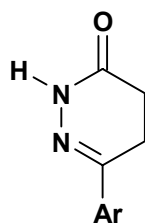
### 4.1. Bevezetés

A természetben a növények színpompáját létrehozó anyagok *flavonoid* összefoglaló néven ismertek. Kémiailag a flavonoidok a hidroxil csoportokat tartalmazó fenilkromon- és fenil-4-kromanon származékai.

A flavonoidok a növényi eredetű természetes anyagok közül talán a legelterjedtebb vegyületcsaládhoz sorolhatók; a természetben glikozidként és aglikonként egyaránt megtalálhatók. Eddig több mint 200 flavonoidot izoláltak különféle növények virágszirmából, leveléből, szárából, gyökeréből és terméséből, fákból (a fák rügyeiből, bimbóiból) és fakéregből. Ezek közül a leggyakoribbak a *quercetin* (86 kultúra), a *luteolin* (45 kultúra), *hesperidin* (13 kultúra), *hesperitin* és *pelargonidin*.<sup>54</sup> Különböző flavonoidokat a *propolisz* is tartalmaz, amely jelentős antibakteriális, antivirális, gombaölő, fájdalomcsillapító, fekély ellenes, immunostimulációs, hipotenzív és citosztatikus tulajdonságokkal bír.<sup>55</sup> A flavonoidok az azonos alapvegyületből levezethető aglikonok fenolos hidroxil csoportok számában és helyzetében különböznek egymástól, továbbá abban, hogy egyes hidroxil csoportok helyett metoxi csoportok is szerepelhetnek.

A flavonoidokat biológiai fontosságuk miatt az utóbbi évtizedekben számos kutatócsoport tanulmányozta. Szent-Györgyi és iskolája vizsgálta először részletesen ezen növényi anyagok biológiai és farmakológiai hatását.<sup>56</sup> Több szintetikus származék viszont már egyértelmű hatással rendelkezik (Venoruton, ipriflavanon, flavanon-8-ecetsav, stb).

A Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén évtizedek óta tanulmányozzák különböző flavonoidok előállításai lehetőségeit, amelyek nemcsak elméleti szempontból jelentősek, hanem új farmakonok előállítása céljából is. Az 1970-es évektől intenzív kutatómunka folyik a 6-aryl-piridazinonok előállítására, mivel az alapváz többféle farmakológiai hatással rendelkezik (26. ábra). Így a vérnyomáscsökkentő hatás<sup>57,58</sup> mellett figyelemre méltó a szívglikozidokhoz hasonló pozitív inotrop hatásuk.<sup>59</sup> Több szintetikus gyógyszer is forgalomban van (Amrinon, Mibrinon<sup>60</sup>, Imadozon<sup>61</sup>). Újabban kinolinon<sup>62,63</sup>, tetralon és kromanon<sup>64</sup> származékokból is előállították piridazinon származékokat. Jelen dolgozat 4.2., 5.3. alfejezetekben a flavanononokból való piridazinon származékok előállítását és azok szerkezetének, illetve térszerkezetének meghatározását tárgyalom.

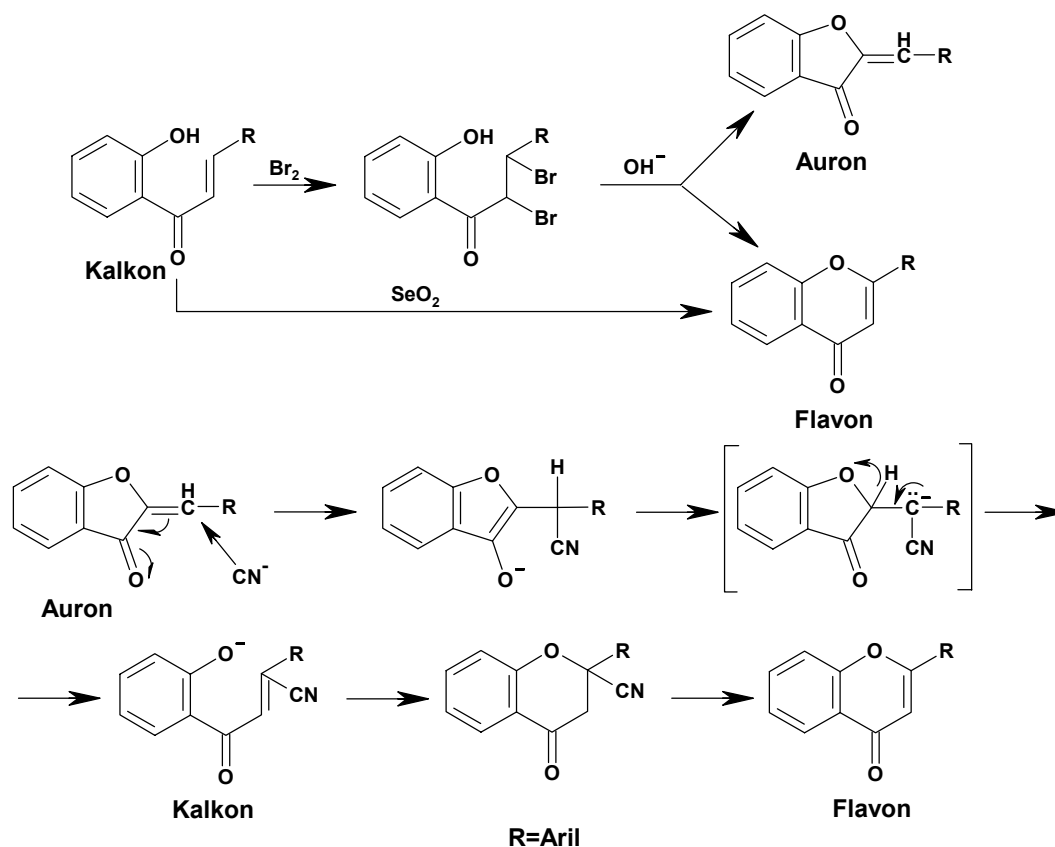


26. ábra

Flavonoidokon kívül a növények színpompáért felelős anyagok közül fontos a *kalkonok* ( $C_6H_x-CO-CH=CH-C_6H_y$ ) és az *auronok* (2-benziliden-kumaranon-(3) származékok) szerepe, amelyek úgynevezett *athochlor* pigmentként főleg a sötétsárga

(*Amtirrhinum*, *Linaria*, *Calceolaria*), narancssárga (*Oxalis cernua*, *Coreopsis grandiflora*) és piros (*Carthamus tinctorius*) szirmú virágokban vannak jelen.<sup>65</sup> Mivel a legtöbb sárgaszínű virág a színét gyakran a *caratinoid* pigmentnek köszönheti, a kalkonok és auronok jelenlétét úgynevezett *ammónia teszttel* lehet bizonyítani, miszerint utóbbiak ammónia hatására a virágszirom sárga színét pirosra változtatják.<sup>66</sup> A természetben, a különböző növényekben, e három vegyületsalád (flavonoidok, kalkonok és auronok) képviselői gyakran együtt fordulnak elő és szerkezeti hasonlóságuknak köszönhetően szintetikus körülmények között egymásba is átalakíthatók (27. ábra).

A természetes bioaktív flavonoidok és a rokonszerkezetű molekulák kutatása során, növekvő gyógyászati alkalmazásuk miatt, egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a szintetikus úton előállított származékaiknak. Az újonnan szintetizált molekulák szerkezetében olyan aromás heterociklusos részegységek találhatók, amelyek a természetben is gyakran előfordulnak. A furán és benzofurán alegységként a már említett különböző auron származékokban, szegfű olajban, krizantém és hortenzia virág magjaiban, citrus félékben és néhány alkaloidban is megtalálható. Ezen kívül a benzofurán egységet az izoflavonoidok családjához tartozó *kumesztán* és a *pterokarpán* származékok is tartalmazzák<sup>67</sup> (28. ábra).

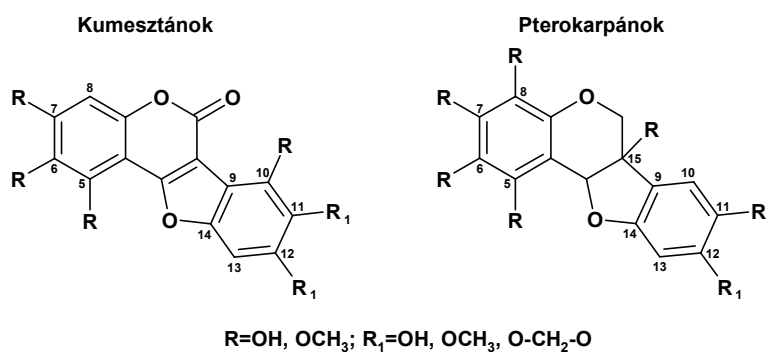


27. ábra

*Kalkonok, flavonok és auronok szintetikus körülmények között egymásba való átalakulása*

A szintetikus *izoflavonoidok* családjába tartozó *ipriflavont* a csontritkulás (osteoporosis) terápiában már évtizedek óta alkalmazzák<sup>68,69,70,71,72</sup>. Az ipriflavon a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.-nek *Osteochin*<sup>®</sup> márkanéven forgalomba került eredeti készítménye<sup>73</sup>. Az ipriflavon megváltoztatja a sejtek mitokondriális oxidációs foszforilációját, azaz javítja a sejtek oxigén felhasználását.<sup>74</sup> Az ipriflavon feltételezhetően

gátolja a csont leépülését, de emellett növeli a csontsejtek kalcium visszatartását, azaz hat a csontképződésre is.<sup>75,76</sup> Így a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.-nél az Osteochin kutatás-fejlesztési téma keretében már évtizedek óta folyik az új izoflavon vázú vagy azzal rokonszerkezetű molekulák kutatása. Mivel számos izoflavonoid molekula (28. ábra) az auronokhoz hasonlóan alegységként benzofuránt vagy annak származékait tartalmazza, célul tűztünk ki a 3(2*H*)-benzofuranon származékok előállítását, szerkezetük és térszerkezetük meghatározását különböző NMR módszerek segítségével. Az eredményeinket jelen dolgozat 4.3. alfejezetében tárgyalom.



28. ábra

## Saját vizsgálatok

### 4.2. 3-Substituált flavanon származékok szerkezet és térszerkezet vizsgálata NMR módszerek segítségével<sup>2</sup>

#### 4.2.1. Bevezetés

1991-ben Gy. Litkei és munkatársai<sup>77</sup> vizsgálták a flavanon hidroximetilezési lehetőségeit. A dolgozat e részének célja ezen vizsgálatok kiterjesztése, piridazinon származékok flavonoidokból való előállítása és így előállított vegyületek szerkezet és térszerkezet meghatározása NMR módszerek segítségével. Az előzetes vizsgálatok szerint<sup>78</sup> a reakciók során sztereoizomerek képződtek és azok egyértelmű sztereokémiájának megállapításához nélkülözhetetlen volt az NMR technikák alkalmazása.

Az előállított vegyületeket NMR-spektroszkópai módszerekkel vizsgáltuk. Részletesebben a 3-(2-ciano-ciklopropil)-flavanon származékoknak a szerkezetét és térszerkezetét tanulmányoztuk, feltételezve, hogy az ezt követő reakciók során nem történik semmiféle sztereokémiai változás. A szerkezet és térszerkezet meghatározására a következő NMR méréseket végeztük el:

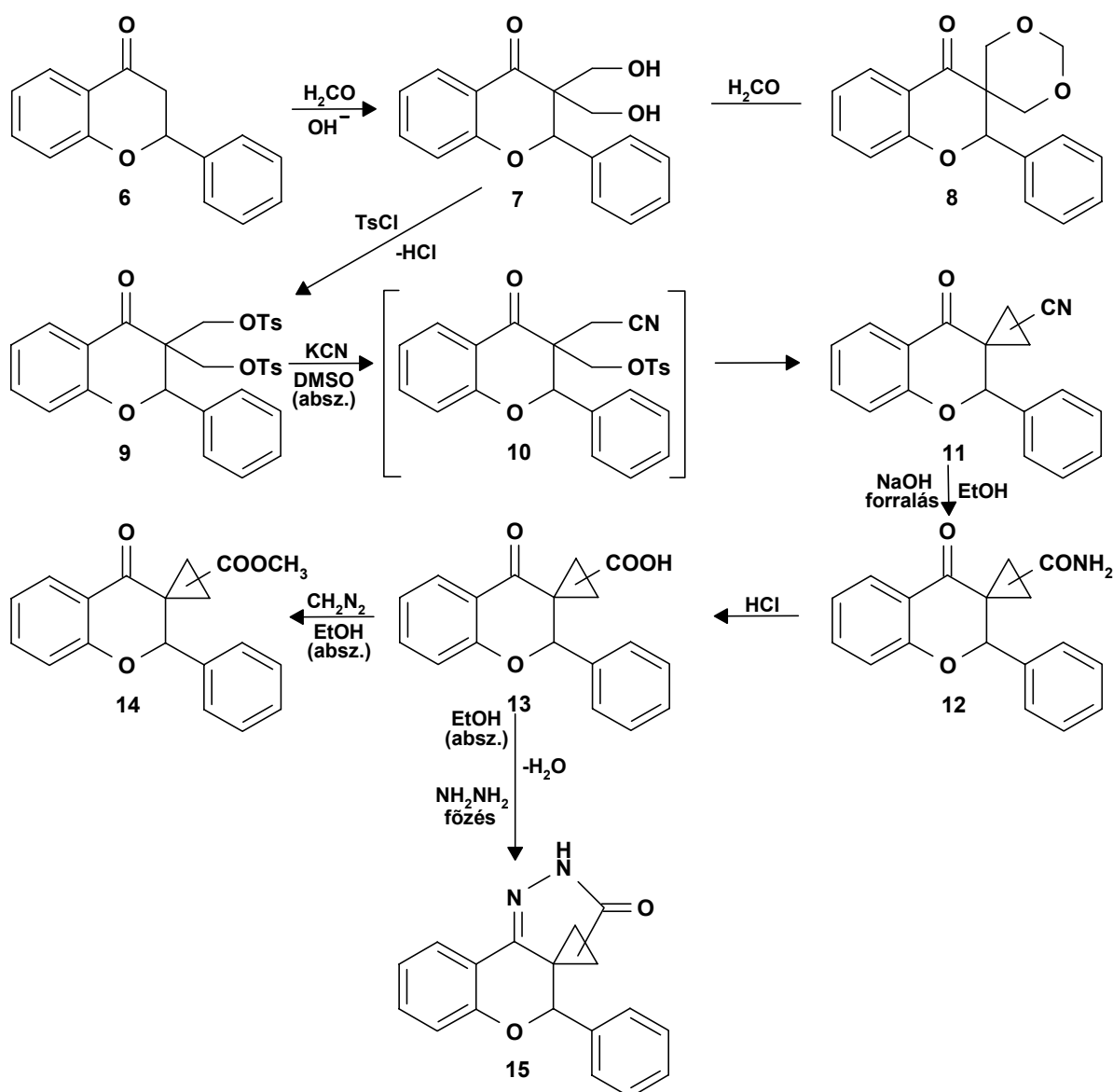
1. <sup>1</sup>H NMR spektrumok felvétele, az eltolódások és spin-spin csatolási állandók meghatározása.
2. <sup>13</sup>C NMR spektrumok felvétele, az eltolódások meghatározása.
3. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOE mérések.
4. 2D J-spektrumok (csatolási állandó modulált) felvétele, a <sup>2</sup>J<sub>C,H</sub>, <sup>3</sup>J<sub>C,H</sub> spin-spin csatolási állandók meghatározása.

A vizsgálatok során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy van-e összefüggés az egyes NMR paraméterek és a térszerkezet között. E célból a következő méréseket hajtottuk végre:

1.  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolt NMR spektrumok felvétele, a  $^1J_{\text{C,H}}$  csatolási állandók meghatározása.
2.  $^{13}\text{C}$  spin-rács relaxációs idők mérése.

#### 4.2.2. Preparatív rész

A 6 flavanon vegyületből kiindulva, a következő molekulákat állítottuk elő (29. ábra):



29. ábra

A piridazinon származékok előállítása

Az ábrán látható vegyületek előállításáról szóló rövid összefoglalót a kísérleti részben adom meg<sup>77</sup>.

#### 4.2.3. Szerkezetigazolási rész

##### 4.2.3.1. A nitrilek (11) szerkezet és térszerkezet vizsgálata

Részletes szerkezetigazolást a 2''-ciano-(flavanon-3-spiro-1''-ciklopropán) izomerekkel végeztük, mivel ezek a származékok alapvegyületek a további átalakulásokban. Az <sup>1</sup>H kémiai eltolódásokat a **35. táblázatban** foglaltuk össze.

Elvileg négy diasztereomer racemát képződése várható, mivel a 2''-ciano-(flavanon-3-spiro-1''-ciklopropán) molekula három királis centrumot tartalmaz. A négy diasztereomert a flavanon illetve ciklopropilgyűrű *transz* és *cisz* szubsztitúciója szerint *transz-transz*, *transz-cisz*, *cisz-transz* és *cisz-cisz* elnevezésekkel különböztethetjük meg. Ezen kívül minden egyes izomer esetén két konformáció lehetséges (a 2-*H* proton axiális vagy ekvatoriális térállású), mivel a flavanon származék dihidropirán-gyűrűje félszék konformációjú.

A kémiai eltolódás értékek (DMSO-*d*<sub>6</sub> és CDCl<sub>3</sub>-ban) közvetlenül értékelhető információt nem nyújtanak a konformációra nézve. A proton-proton vicinális csatolási állandókból (<sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub>) sok esetben nyerhetünk a molekulák térszerkezetére vonatkozó információkat a Karplus összefüggés segítségével. Csak a <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> alapján teljes szerkezetek nem határozhatók meg, mivel a ciklopropilgyűrűben a szubsztitúció helyzetétől függetlenül mindig egy geminális, egy *cisz* és egy *transz* vicinális csatolást tudunk mérni. Ciklopropil származékok esetén a <sup>3</sup>*J*<sub>H,H</sub> állandókra következő sorrend állítható fel<sup>79</sup>:

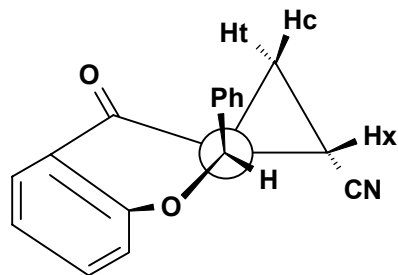
$${}^3J_{H,H\ cisz} > {}^3J_{H,H\ transz} > {}^2J_{H,H\ gem}$$

Így az <sup>1</sup>H NOE méréseket is végeztük proton-proton távolságok meghatározása céljából.

Az NOE önmagában sem nyújt minden esetben lehetőséget a térszerkezet felderítéséhez. Ezért a következő elővizsgálatokat végeztük el. A HyperChem program segítségével meghatároztuk a nyolc említett térszerkezetre a ciklopropilgyűrűn illetve a 2-es szénatomon lévő protonok közötti távolságokat (34. ábra), és azt találtuk, hogy a lehetséges konfigurációk száma leszűkíthető. Tekintettel arra, hogy az <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOE effektus gyakorlatilag az 5Å-nél kisebb magtávolságokra érzékeny csupán (τ<sup>-6</sup> függés), a 2-*H* proton és az egyik geminális proton távolsága minden esetben “nagy” (>4.0Å) a 2-*H* proton és a másik geminális proton illetve a *Hx* távolsága lehet “kicsi” vagy “nagy”. Az eredményeket a **36. táblázat** tartalmazza.

A **36. táblázatban** a vastagon kiemelt számok esetén jelentős, a dőlt számok esetén kisebb, a normál számok esetén pedig igen gyenge NOE vagy annak hiánya várható. Az NOE mérések eredményeit (%-ban kifejezve) az **37.**, **38.**, **39. táblázatokban** foglaltuk össze.

Ha a **36. táblázat** kiemelt soraiban (félkövér szedés) szereplő variációk állnak fenn, akkor a konfiguráció egyértelműen megadható. A többi esetben csak csökkenhető a szóba jöhető szerkezetek száma. Az NOE mérések alapján és a **38. táblázat** adatait figyelembe véve a **11A** izomer térszerkezete egyértelműen meghatározható, tehát *transz-cisz*-nek felel meg:

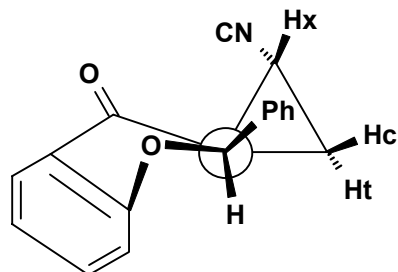


30. ábra 11A (transz-cisz)

A fentebb látható szerkezeti hozzárendelést a **14A3** metilészter származékon végzett NOE kísérlet adatai is alátámasztanak (**40. táblázat**):

A **37. táblázatban** a **11K** izomerre négyszeres választási lehetőséget enged meg. A négy lehetőség közül azonban hármát ki lehet zárni a mért NOE adatok (2-H proton *Hc*-vel ad NOE-t), valamint a dolgozat preparatív része alapján. A preparatív részben bemutattuk, hogy a **13K2** kitűnő hozammal (91.8%) ad **15** gyűrűzárt terméket, ami csak akkor lehetséges, ha a ciklopropilgyűrű -COOH és a flavanon C=O csoportja azonos térfélen helyezkedik el, vagyis *cisz* helyzetűek. Mivel a **11A** izomernek a *transz-cisz* diasztereomer felel meg, akkor a **11K**-nak a *cisz-cisz*, amelynek a 2-H protonja axiális térállású (**41. táblázat**).

A **11F** diasztereomer térállásának meghatározása bonyolultabb. A gyűrűzárási reakció nem ad megbízható információt az **15F4** termék alacsony hozama miatt (11.5%), tehát egyelőre a négy lehetőség nyitva marad (*lásd 36. táblázatot*).



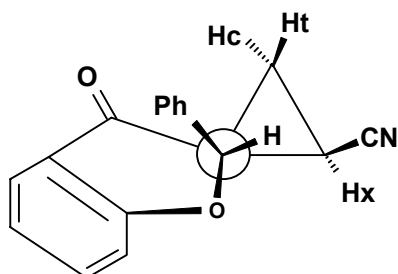
31. ábra 11K (cisz-cisz 2- $H_{ax}$ )

A lehetséges szerkezetek számának szűkítésére végeztünk egy újabb kísérletet végeztünk el, amelynek célja a C(2) fenilcsoport térállásának meghatározása volt. A kétdimenziós *J*-spektrum lehetőséget ad a háromkötéses proton-szén-13 csatolási állandók meghatározására, amelyek ugyanúgy, mint a háromkötéses proton-proton csatolási állandók a Karplus-összefüggésnek engedelmeskednek. A 2D *J*-spektrumból nyert  ${}^3J_{2-H, C}$  állandók értékei lehetőséget adnak az izomerek térszerkezetének, illetve a 2-H térállásának meghatározására. Fentebb említett NMR technika alkalmazása során egyértelműen kiderült, hogy a **11F**-ben C(2)-fenilcsoport axiális térállású (**41. táblázat**), illetve a C(8a) és 2-H atomok *anti-transz* állásúak ( ${}^3J_{2-H, C(8a)}=7.5$  Hz). Ez a megállapítás az alábbi megfontolásokon alapul.

A vicinális  ${}^{13}C$ - ${}^1H$  csatolásokra vonatkozó Karplus-összefüggésből<sup>80</sup> látható, hogy a  ${}^3J_{2-H, C(8a)}=7.5$  Hz érték esetén (**41. táblázat**) csaknem 180°-os diéderes szögről van szó, ami a 2-H és C(8a) antiállásának felel meg. Ezek szerint a 2-H proton ekvatoriális, míg a C(2)-fenilcsoport axiális helyzetű. Így a **11F** szerkezetére vonatkozó lehetőségek száma kettőre csökkent (*cisz-transz* vagy *transz-transz*).

A **14F3** metilészteren elvégzett NOE kísérletek (**42. táblázat**) eredményei a  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  heteronukleáris csatolási állandók elemzésével együtt egyértelművé tették a **35. táblázatban** látható *Hc* és *Ht* protonok hozzárendelését a **11A** és **11F** vegyületekben.

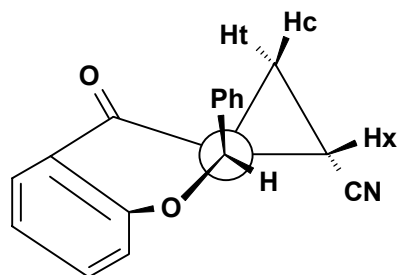
A **11A** és **11F** izomerekben *Hc* illetve *Ht* protonok kémiai eltolódását vizsgálva, észre lehet venni, hogy a két proton kémiai eltolódás értéke felcserélődik: a *Hc* és *Ht* protonok eltolódása a **11A** diasztereomerben 1.45 és 2.19 ppm, míg a **11F** izomerben 2.56 és 1.47 ppm. Ezek alapján azt lehet állítani, hogy a **11F** vegyület a nitrilcsoport térállásában különbözik a **11A**-tól, vagyis a két izomer a C(x) szén konfigurációban tér el egymástól. Ezt az a preparatív tapasztalat is alátámasztja, miszerint a **15F4** gyűrűzárt termék keletkezése nehezen képzelhető el, hacsak a reakció során valami, eddig nem ismert átrendeződés be nem következik. Így a gyenge kitermelésért leginkább a **11A** izomer - amely kis mennyiségű szennyeződésként volt jelen a **11F** diasztereomerben - felelős. A Dreiding-modell alapján a *cisz-transz* 2- $\text{H}_{\text{ekv}}$  izomer kevésbé valószínű, a 2-es helyzetű fenilcsoport és az azonos térfélen helyet foglaló CN-csoport szterikus gátlása miatt. Így a leírtak szerint a **11F** sztereoizomernek a *transz-transz* 2-H ekvatoriális szerkezet felel meg:



32. ábra **11F** (*transz-transz* 2- $\text{H}_{\text{ekv}}$ )

A **11K** izomerben mért háromkötéses proton-szén-13 csatolási állandók kisebbek, mint a **11F** izomerben (lásd **41. táblázatot**). A Karplus összefüggés<sup>80</sup> alapján látható, hogy a  $^3J_{2-\text{H}, \text{C}(8a)}=1.0$  Hz érték esetén csaknem 60°-os diéderes szögről van szó, ami a 2-H proton C(8a)-hoz képest *szűn-(gauche)* helyzetének felel meg. Ezek alapján a 2-H proton axiális, illetve a C(2) melletti fenilgyűrű ekvatoriális helyzetűek.

A **11A** izomerben a C(2) szénatomnak a proton- illetve a fenilgyűrű térállását axiális-ekvatoriálisnak (ax/ekv) jelöltük mert, ahogy az a **41. táblázatból** is látható, a  $^3J_{2-\text{H}, \text{C}(8a)}$  értéke a **11F** és a **11K** megfelelő  $^3J_{2-\text{H}, \text{C}(8a)}$  értékei között van. Tehát a C(2)-fenilgyűrű gyors konformációs egyensúlyban van az ekvatoriális és axiális térállás között:



33. ábra **11A** (*transz-cisz* 2- $\text{H}_{\text{ax/ekv}}$ )

A fentebb említett diasztereomerek szerkezet és térszerkezet igazolását egy másik módszer alkalmazásával is alá lehet támasztani. Tanulmányoztuk az LSR (Lantanide Shift

Reagent) által okozott változásokat a **11(A,K,F)** vegyületek  $^1\text{H}$  NMR jelek kémiai eltolódásaira. Az eredmények azt mutatták (**43. táblázat**), hogy a **11F** (*transz-transz* 2- $\text{H}_{\text{ekv}}$ ) izomer sokkal könnyebben képez  $\text{Eu}(\text{hfbc})_3$  komplexet, mint a két másik izomer.

Az azonos szubsztrát-LSR arány mellett 1:1 komplexre extrapolált LIS (Lantanide-Induced Shift) értékek **11F** vegyület protonjaira szignifikánsan nagyobbak, mint a **11A** és **11K** izomerek esetében (a **11F** izomerben 2-H és kromanonyűrű 5- $\text{H}_2$  protonok esetén a LIS értékek 4.3 ppm és 8.8 ppm, míg a **11A** molekulában 2.8 ppm és 3.3 ppm, a **11K** anyagban 1.9 ppm illetve 2.8 ppm voltak). Legnagyobb LIS értékek azokon a protonokon figyelhetők meg, melyek a kromanon karbonil közelében vannak. Ebből az következik, hogy a vizsgált anyagokban valószínűleg éppen ez az atom koordinálódik az *Eu* ionhoz. Ismert, hogy a vizsgált molekula LSR-hez való kötődése elsősorban a koordinációs centrum körüli sztérikus effektusoktól függ, azaz minél nagyobb a sztérikus gátlás, annál kisebb a komplex kialakulásának valószínűsége. A vizsgált izomerekben csak a ciklopropilgyűrű nitril csoportjának térhelyzete befolyásolhatja az LSR-reagens koordinációját. Abban az esetben, amikor ez a csoport és a kromanon karbonil csoportja azonos térfélen helyezkednek el várható, hogy az LSR-rel való kölcsönhatás gyengébb lesz (**11A** és **11K** izomereknél), mint abban az esetben, amikor e két említett csoport egymással ellentétes térfélen helyezkedik el (**11F** izomer). Így a LIS értékek is alátámasztják a ciklopropilgyűrű nitril csoportjának térhelyzetét mindhárom izomerben.

#### 4.2.3.2. A gyűrűzárt termékek **15(A4,K4,F4)** szerkezet és térszerkezet vizsgálata

A nitrilekkel **11(A,K,F)** számos átalakítást végeztük. Az észtereken **14(A3,K3,F3)** elvégzett NOE mérések alapján azt tudtuk megállapítani, hogy a ciklopropilgyűrű szeneinek konfigurációja nem változott. Az NOE értékek gyakorlatilag megegyeztek a CN-származékokban mért NOE-kal<sup>77</sup>.

A savak **13(A2,K2,F2)** hidrazin-hidráttal való reakciójától azt vártuk, hogy a gyűrűzárt termékeket **15(A4,K4)** csak a **13A2** és **13K2** fognak képezni, mivel mindkét karboxilcsoport a négyes helyzetben lévő karbonilcsoporttal azonos térfelében van. Az **15F4** termék képződését egyáltalán nem vártunk, mert a kiindulási **13F2** sav karboxilcsoportja és a flavanonváz négyes helyzetű karbonilcsoportja ellenkező térfeleken vannak. A proton spektrumok alapján (*lásd* **35. táblázat**) látható, hogy a 11.07-11.10 ppm-nél megjelenik egy jel, ami a gyűrűben lévő -NH protontól származik. A proton spektrumok vizsgálata során kiderült, hogy az **15A4** és **15F4** anyagok spektrumai azonosak.

A  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok is a gyűrűzáródásra utaltak (**44. táblázat**). A táblázatból látható, hogy a flavanon váz C(4) karbonil jele (190.0 ppm-nél) eltűnik a spektrumból és helyette 140.7 és 164.1 ppm-nél megjelennek a C=N- és az amid szénnek megfelelő jelek.

A fentebb leírtak szerint azt lehet feltételezni, hogy a gyűrűzárási reakció közben a **15F4** termék a **15A4** származékká izomerizálódik, vagy, ami valószínűbb, a kiindulási **13F2** izomert kis mennyiségben **13A2** izomer szennyezte. Sajnos alacsony kitermelés miatt (11.5%) ezeket a feltevéseket nem lehetett egyértelműen bizonyítani.

A  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok hozzárendeléséhez a flavanonra megadott irodalmi értékeket vettük alapul<sup>81</sup>. A ciklopropil C(a,b) és C(x) (x=CN) szének megkülönböztetését a csatolt  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  spektrumok és a  $^{13}\text{C}$  spin-rács relaxációs idők alapján végeztünk el. A csatolt

spektrumokból (**45. táblázat**) a szenek rendűsége könnyen meghatározható. Ismert, hogy a terciér szénatomok  $^1J_{C,H}$ -ja 7-9 Hz-el nagyobb, mint a szekunder szeneké. Így a nitrilek esetében ez az eredmény az utóbbiak elektronszívó sajátosságával értelmezhető.

A  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolt spektrumból nyert adatokat a **45. táblázatban** foglaltuk össze. Az  $sp^3$  hibridállapotú szenek  $^1J_{C,H}$  csatolási állandóinak értéke általában kisebb, mint az  $sp^2$  illetve  $sp$  hibridállapotúaké<sup>82</sup>. A C(2) és  $\underline{CH}(x)$  ( $x = \text{CN}$ ) egykötéses  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandókat összehasonlítva (**45. táblázat**), látható, hogy a ciklopropil  $\underline{CH}(x)$  csatolási állandója kb. 18-25 Hz-el nagyobb, mint az  $sp^3$  hibridállapotú C(2)-é, ami azt mutatja, hogy a ciklopropilgyűrűt alkotó szénatomok közelebb állnak az  $sp^2$  hibridállapothoz.

A  $\underline{CH}(a,b)$  és  $\underline{CH}(x)$  egykötéses  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandóit összehasonlítva, azt tapasztaljuk, hogy a  $\underline{CH}(a,b)$  csatolási állandója 7-9 Hz-el kisebb, mint a  $\underline{CH}(x)$ -é, ami a CN-csoport elektronszívó sajátosságának következménye. Ellenben, ha  $x = \text{CONH}_2$ ,  $\text{COOH}$ , akkor a  $\underline{CH}(a,b)$  egykötéses csatolási állandója nagyobb, mint a  $\underline{CH}(x)$ -é.

#### 4.2.3.3. A $^{13}\text{C}$ spin-rács relaxációs idők

A spin-rács relaxációs sebességet a **2.1.** alfejezetben megadott (4) összefüggés írja le. A (4) egyenlet alapján könnyen belátható, hogy minél nagyobb a  $\tau_c$  korrelációs idő, annál nagyobb a spin-rács relaxációs sebessége, illetve kisebb a spin-rács relaxációs idő és fordítva.

A flavanon váz  $^{13}\text{C}$   $T_1$  értékei közel azonosak (1.2-1.5 s). Ez arra utal, hogy a rotációs korrelációs idők is közel azonosak. Kivételt a 2' és 3' szenek képeznek, amelyeknek a  $T_1$  értéke 60-80%-kal nagyobb. Ez a flavanon 2-es helyzetű fenilcsoportjának belső rotációjának következménye ( $\tau_c$  érték csökken). Ez lehetővé teszi a 2' és 3' szenek pontos hozzárendelését (lásd. **46. táblázatot**).

A spin-rács relaxációs idők mérése segítségével könnyen meg lehet különböztetni a ciklopropil C(a,b) és C(x) ( $x = \text{CN}$ ,  $\text{CONH}_2$ ,  $\text{COOH}$ ) szeneket. A fentebb említett (4) egyenletből látható, hogy a spin-rács relaxációs sebessége egyenesen arányos az adott  $^{13}\text{C}$  atomhoz kapcsolódó protonok számával, ez azt jelenti, hogy minél több proton kapcsolódik egy szénatomhoz, annál kisebb a mért relaxációs idő. Tehát a C(a,b) relaxációs ideje kb. kétszer kisebb, mint a C(x)-é.

A **46. táblázatból** kitűnik, hogy a **13A2** vegyület esetén a mért relaxációs idők értékei kb. fele a nitrilekben és savamidokban mértékhez képest. Ezek szerint a **13A2** rotációs korrelációs ideje kisebb, mint a többi származékoké. Ezt úgy lehet magyarázni, hogy hidrogén-hidak alakulnak ki és ez a folyamat a dimerek kialakulásához vezethet.

#### 4.2.4. Összefoglalás

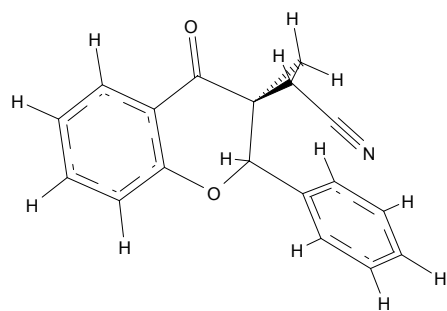
Jelen fejezetben a 3,3-bisz-(toziloxi-metilén)-flavanon reakcióját cianid nukleofil jelenlétében vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy egyéb nukleofilekkel ellentétben, nem egyszerű  $S_N$  reakció játszódik le, hanem  $S_{Ni}$  reakció eredményeként három CN-szubsztituált sztereoiszomer 3,3-spiro-ciklopropán-flavanon keletkezik.

Módszert dolgoztunk ki a sztereoiszomer nitrilek elválasztására és hidrolízissel a megfelelő savamidok illetve karbonsavak előállítására. A karbonsavakból diazo-metánnal a sztereoiszomer metilésztereket nyertük. A karbonsavakból hidrazin-hidráttal potenciálisan

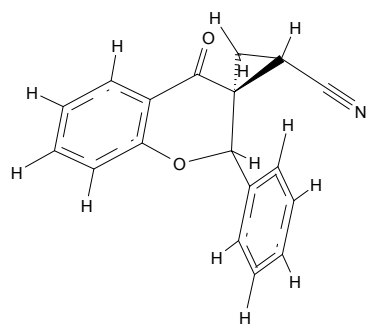
farmakológiai hatással rendelkező piridazinon-spiro-ciklopropán-flavanon származékokat állítottuk elő.

Az előállított sztereoizomerek szerkezetét különböző NMR spektroszkópai módszerek segítségével határoztuk meg. A szerkezetek bizonyítására egydimenziós  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumokat készítettünk, amelyekből kémiai eltolódásokat és spin-spin csatolási állandókat határoztunk meg. A térszerkezet meghatározásához NOE és kétdimenziós 2DJ-spektrumokat vettük fel.  $^1\text{H}$  csatolt  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok segítségével az  $^1J_{C,H}$  spin-spin csatolási állandókat határoztuk meg.  $^{13}\text{C}$  spin-rács relaxációs idő méréseket is elvégeztünk. Tanulmányoztuk az egyes NMR paraméterek és a vegyületek szerkezete és térszerkezete közötti összefüggéseket.

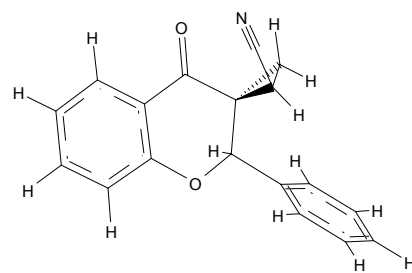
Végezetül, az NMR mérések segítségével meghatároztuk a három 3,3-spiro-ciklopropán-flavanon sztereoizomer szerkezetét és térszerkezetét.



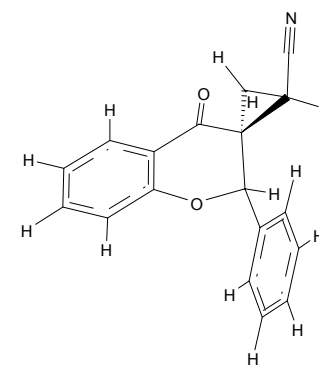
*cisz-transz 2-H<sub>ax</sub>*



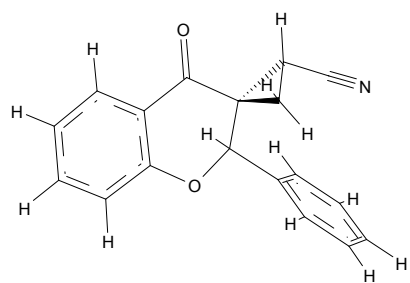
*cisz-transz 2-H<sub>ekv</sub>*



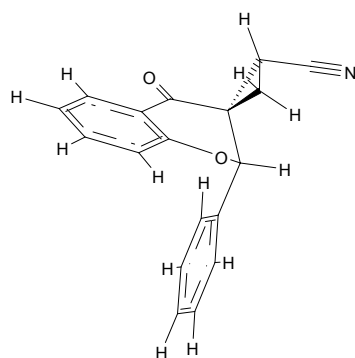
*cisz-cisz 2-H<sub>ax</sub>*



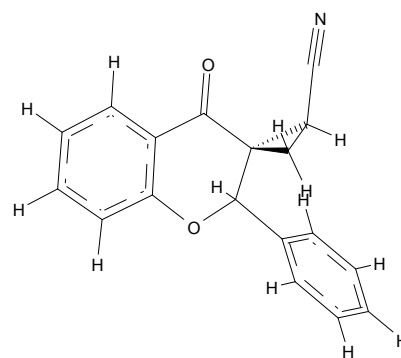
*cisz-cisz 2-H<sub>ekv</sub>*



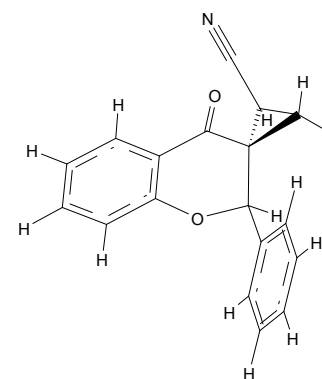
*transz-transz 2-H<sub>ax</sub>*



*transz-transz 2-H<sub>ekv</sub>*



*transz-cisz 2-H<sub>ax</sub>*



*transz-cisz 2-H<sub>ekv</sub>*

34. ábra

*A molekulamechanika MM<sup>+</sup> módszerrel energiaminimalizált lehetséges 11 nitril származékok*

**35. táblázat.** A vizsgált vegyületek <sup>1</sup>H NMR adatai (kémiai eltolódások és spin-spin csatolási állandók)

Vegyület	H <sub>c</sub> , ppm	H <sub>t</sub> , ppm	H <sub>x</sub> , ppm	2-H, ppm	Aromás, ppm	Egyéb, ppm	J <sub>gem</sub> , Hz	J <sub>transz</sub> , Hz	J <sub>cisz</sub> , Hz
<b>11A</b>	<b>1.45</b>	<b>2.19</b>	1.90	5.40	7.00-8.00		5.2	6.7	9.2
<b>11K</b>	0.98	2.23	1.70	5.80	7.10-8.10		5.0	6.8	9.2
<b>11F</b>	<b>2.56</b>	<b>1.47</b>	2.10	5.60	6.93-7.83		5.3	6.3	9.2
<b>12A1</b>	1.45	2.30	2.30	5.23	6.95-7.83	5.35; 5.91	-	-	-
<b>12K1</b>	1.42	2.03	3.21	5.90	6.80-8.00	5.38 6.15	3.9	6.4	8.5
<b>12F1</b>	2.45	1.71	1.95	5.95	6.90-7.80	5.68; 5.84	4.5	6.4	8.3
* <b>13A2</b>	1.55	2.22	2.56	5.49	7.00-7.60	12.25	4.8	7.2	8.5
<b>13K2</b>	1.14	2.16	2.08	5.60	7.00-7.90	9.35	4.3	7.3	8.1
<b>13F2</b>	2.59	1.65	2.17	5.95	6.90-7.80	9.60	4.7	6.4	8.4
* <b>14A3</b>	1.57	2.22	2.63	5.54	6.95-7.60	3.25	4.9	7.1	8.6
<b>14K3</b>	0.98	2.18	2.09	5.65	7.05-7.90	3.60	4.5	7.2	8.4
<b>14F3</b>	2.53	1.63	2.14	5.90	6.90-7.80	3.75	4.7	6.4	8.7
* <b>15A4</b>	0.78	1.40	1.20	5.67	7.10-7.90	11.10	4.8	4.9	9.6
* <b>15K4</b>	1.15	2.05	2.45	5.10	7.00-7.73	11.10	4.2	4.6	9.6
* <b>15F4</b>	1.40	0.78	1.20	5.67	7.10-7.90	11.07	4.8	4.9	9.6
* <b>13K2</b>	1.00	1.80	2.10	5.81	7.10-7.80	3.39	4.6	7.2	8.7
* <b>14K3</b>	1.21	1.79	2.27	5.73	7.10-7.72	3.38	4.7	7.1	8.7

\* - oldószer DMSO-d<sub>6</sub>, a nem jelölt esetekben CDCl<sub>3</sub>

H<sub>x</sub> - a szubsztituált ciklopropil szénen lévő proton

H<sub>c</sub> és H<sub>t</sub> - a ciklopropil metilén protonok, H<sub>c</sub>- cisz, H<sub>t</sub>- transz helyzetű a H<sub>x</sub> protonhoz képest

**36. táblázat.** Elméleti proton - proton távolságok a **11** vegyületekre (nitrilekre)

Izomer	2-H	r <sub>2-H,H<sub>x</sub></sub> , Å	r <sub>2-H,H<sub>c</sub></sub> , Å	r <sub>2-H,H<sub>t</sub></sub> , Å
transz-cisz	axiális	3.4	3.9	4.3
transz-cisz	ekvatoriális	2.7	2.6	3.9
cisz-cisz	axiális	4.0	3.2	3.8
cisz-cisz	ekvatoriális	2.7	2.6	3.8
cisz-transz	axiális	4.4	3.8	3.3
cisz-transz	ekvatoriális	3.9	3.8	2.5
transz-transz	axiális	3.9	4.3	3.9
transz-transz	ekvatoriális	3.9	3.9	2.6

**37. táblázat.** Mért NOE adatok (%) a **11K** izomer esetén

<b>11K</b> ↗	H <sub>c</sub>	H <sub>t</sub>	H <sub>x</sub>	2-H
H <sub>c</sub>	x	36.5	10.2	2.7
H <sub>t</sub>	29.0	x	-	-
H <sub>x</sub>	4.1	-	x	-
2-H	1.2	-	-	x

Az aromás protonokkal H<sub>c</sub> ad 6.2% NOE-t; H<sub>x</sub> pedig 7.2%-os NOE-t

**38. táblázat.** Mért NOE adatok (%) a **11A** izomer esetén

<b>11A</b> $\nearrow$	<i>Hc</i>	<i>Ht</i>	<i>Hx</i>	<i>2-H</i>
<i>Hc</i>	x	37.5	13.2	2.2
<i>Ht</i>	28.1	x	-	-
<i>Hx</i>	7.4	3.0	x	5.4
<i>2-H</i>	4.3	-	7.1	x

**39. táblázat.** Mért NOE adatok (%) a **11F** izomer esetén

<b>11F</b> $\nearrow$	<i>Hc</i>	<i>Ht</i>	<i>Hx</i>	<i>2-H</i>
<i>Hc</i>	x	30.5	12.9	-
<i>Ht</i>	24.8	x	-	7.2
<i>Hx</i>	5.6	-	x	-
<i>2-H</i>	-	3.0	0.7	x

**40. táblázat.** Mért NOE adatok (%) a **14A3** izomer esetén

<b>14A3</b> $\nearrow$	<i>Hc</i>	<i>Ht</i>	<i>Hx</i>	<i>2-H</i>
<i>Hc</i>	x	28.5	7.8	1.4
<i>Ht</i>	26.7	x	-	-
<i>Hx</i>	3.1	-	x	10.7

**41. táblázat.** A háromkötésű  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  spin-spin csatolási állandók meghatározása a 2DJ-spektrumokból

Termék	$^3J_{2-H, C(4)}$	$^3J_{2-H, C(8a)}$	$^3J_{2-H, C(CN)}$	2-H térállása
<b>11A</b>	3.7	5.0	2.6	axiális/ekvatoriális
<b>11K</b>	1.8	1.0	6.7	axiális
<b>11F</b>	5.5	7.5	3.6	ekvatoriális

**42. táblázat.** Mért NOE adatok a **14F3** izomer esetén

<b>14F3</b> $\nearrow$	<i>Hc</i>	<i>Ht</i>	<i>Hx</i>	<i>2-H</i>
<i>Hc</i>	x	27.8	10.0	-
<i>Ht</i>	25.0	x	-	8.6
<i>Hx</i>	4.0	-	x	-
<i>2-H</i>	-	4.2	-	x

**43. táblázat** Mért LIS értékek a **11(A,K,F)** diasztereomerekben (ppm)

Izomer	<i>Hx</i>	<i>Hc</i>	<i>Ht</i>	2-H	5-H
<b>11A</b>	3.9	1.9	3.9	2.8	3.3
<b>11K</b>	1.5	2.8	3.9	1.9	2.8
<b>11F</b>	9.2	8.9	4.1	4.3	8.8

**44. táblázat.** A **15A4** és **15K4** vegyületek  $^{13}\text{C}$  spektrum kémiai eltolódásai

	C(c,t)	C(x)	C(2)	C(3)	C(4)	C(4a)	C(6)	C(7)	C(8)	C(8a)	*Cn	C(1')
<b>15A4</b>	7.8	20.1	77.5	27.4	141.8	119.0	121.9	131.5	117.9	156.3	164.9	132.8
<b>15K4</b>	14.2	22.4	79.2	25.9	140.7	118.4	120.7	131.0	117.7	153.5	164.1	137.1

\*Cn - amid karbonil

**45. táblázat.** Egy kötéses  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolási állandók ( $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolt spektrum alapján)

		<b>11A</b>	<b>11K</b>	<b>11F</b>	<b>12F1</b>	<b>13A2</b>
*C(c,t)	$\delta$ , ppm	16.7	13.3	16.6	15.3	16.4
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	169.4	168.5	168.5	166.1	167.3
*C(x)	$\delta$ , ppm	11.5	8.8	14.0	30.6	28.2
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	176.7	175.1	177.3	162.9	164.1
C(2)	$\delta$ , ppm	81.5	80.4	79.8	78.1	82.7
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	149.0	147.2	150.5	154.5	148.6
C(3)	$\delta$ , ppm	35.1	36.2	33.1	35.9	36.7
C(4)	$\delta$ , ppm	187.2	186.7	187.8	190.3	190.0
C(4a)	$\delta$ , ppm	121.2	120.5	120.8	121.5	121.5
C(5)	$\delta$ , ppm	127.2	127.2	126.6	126.7	127.3
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	159.4	164.8	157.1	158.7	155.2
C(6)	$\delta$ , ppm	122.0	122.1	121.7	121.2	121.7
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	163.3	164.5	163.3	163.5	163.0
C(7)	$\delta$ , ppm	136.7	136.6	137.0	136.5	136.5
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	158.1	158.5	159.0	150.7	159.1
C(8)	$\delta$ , ppm	118.4	118.4	119.0	119.0	118.3
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	162.7	155.1	162.1	162.1	165.4
C(8a)	$\delta$ , ppm	160.0	161.2	159.5	159.7	160.4
C(1')	$\delta$ , ppm	134.9	132.9	136.2	137.9	135.0
C(2')	$\delta$ , ppm	127.4	127.6	127.7	127.6	127.5
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	164.0	159.4	164.0	163.4	172.0
C(3')	$\delta$ , ppm	128.7	128.6	128.6	128.4	128.6
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	161.6	161.8	161.2	162.0	159.4
C(4')	$\delta$ , ppm	129.1	129.3	128.9	128.4	129.0
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	161.4	161.6	161.6	166.0	164.0
C(5')	$\delta$ , ppm	128.7	128.6	128.6	128.4	128.6
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	161.6	161.8	161.2	162.0	159.4
C(6')	$\delta$ , ppm	127.4	127.6	127.7	127.6	127.5
	$^1J_{\text{C,H}}$ , Hz	164.0	159.4	164.0	163.4	172.0
*Y	$\delta$ , ppm	116.7	116.8	117.6	170.1	173.3

C(c,t) - a ciklopropil metilén szénatomot jelöli; C(x) - a ciklopropil metin (szubsztituált) szénatomot jelöli; a \*Y - jelöli a  $^{13}\text{C}$  eltolódását: Y = CN; CONH<sub>2</sub>; COOH

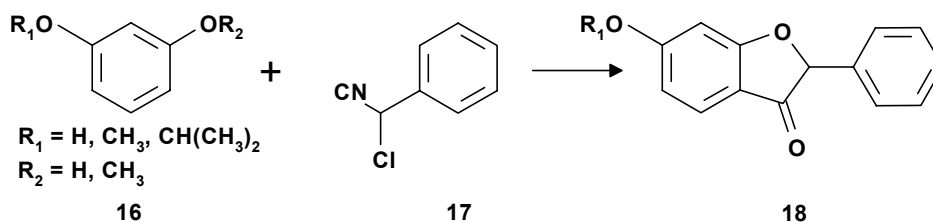
**46. táblázat.**  $^{13}\text{C}$  spin-rács relaxációs idők

		<b>11A</b>	<b>11K</b>	<b>11F</b>	<b>12A1</b>	<b>12F1</b>	<b>13A2</b>
C(c,t)	$T_l$ , s std.dev	0.62 $1.72 \cdot 10^{-2}$	0.51 $2.60 \cdot 10^{-2}$	0.76 $1.15 \cdot 10^{-2}$	0.70 $2.01 \cdot 10^{-2}$	0.61 $3.34 \cdot 10^{-2}$	0.39 $1.79 \cdot 10^{-2}$
C(x)	$T_l$ , s std.dev	1.27 $1.29 \cdot 10^{-2}$	1.12 $3.60 \cdot 10^{-2}$	1.36 $7.55 \cdot 10^{-3}$	1.45 $8.75 \cdot 10^{-3}$	1.62 $4.74 \cdot 10^{-2}$	0.74 $1.76 \cdot 10^{-2}$
C(2)	$T_l$ , s std.dev	1.38 $1.43 \cdot 10^{-2}$	1.33 $2.22 \cdot 10^{-2}$	1.45 $7.44 \cdot 10^{-3}$	1.46 $1.25 \cdot 10^{-2}$	- -	0.83 $1.56 \cdot 10^{-2}$
C(3)	$T_l$ , s std.dev	12.69 $4.11 \cdot 10^{-2}$	12.76 $2.45 \cdot 10^{-2}$	15.76 $4.04 \cdot 10^{-2}$	14.49 $3.25 \cdot 10^{-2}$	8.47 $6.16 \cdot 10^{-2}$	6.61 $3.09 \cdot 10^{-2}$
C(4)	$T_l$ , s std.dev	16.30 $5.60 \cdot 10^{-2}$	16.27 $4.75 \cdot 10^{-2}$	17.05 $4.30 \cdot 10^{-2}$	18.65 $6.63 \cdot 10^{-2}$	25.72 $1.61 \cdot 10^{-1}$	7.59 $5.26 \cdot 10^{-2}$
C(4a)	$T_l$ , s std.dev	15.19 $4.64 \cdot 10^{-2}$	14.49 $3.85 \cdot 10^{-2}$	19.63 $5.55 \cdot 10^{-2}$	15.25 $4.47 \cdot 10^{-2}$	5.61 $1.25 \cdot 10^{-1}$	6.76 $3.73 \cdot 10^{-2}$
C(5)	$T_l$ , s std.dev	1.29 $1.16 \cdot 10^{-2}$	1.16 $1.89 \cdot 10^{-2}$	1.64 $1.48 \cdot 10^{-2}$	1.45 $1.02 \cdot 10^{-2}$	1.55 $5.10 \cdot 10^{-2}$	0.70 $2.19 \cdot 10^{-2}$
C(6)	$T_l$ , s std.dev	1.14 $1.58 \cdot 10^{-2}$	0.91 $1.79 \cdot 10^{-2}$	1.31 $8.53 \cdot 10^{-3}$	1.36 $1.78 \cdot 10^{-2}$	1.18 $3.15 \cdot 10^{-2}$	0.80 $1.16 \cdot 10^{-2}$
C(7)	$T_l$ , s std.dev	1.18 $1.21 \cdot 10^{-2}$	1.08 $3.00 \cdot 10^{-2}$	1.43 $7.45 \cdot 10^{-3}$	1.34 $1.44 \cdot 10^{-2}$	1.57 $6.62 \cdot 10^{-2}$	0.71 $1.97 \cdot 10^{-2}$
C(8)	$T_l$ , s std.dev	1.28 $1.13 \cdot 10^{-2}$	1.18 $1.29 \cdot 10^{-2}$	1.65 $8.88 \cdot 10^{-3}$	1.40 $1.97 \cdot 10^{-2}$	1.72 $4.00 \cdot 10^{-2}$	0.69 $1.59 \cdot 10^{-2}$
C(8a)	$T_l$ , s std.dev	15.26 $4.30 \cdot 10^{-2}$	15.80 $4.72 \cdot 10^{-2}$	18.74 $5.71 \cdot 10^{-2}$	17.34 $4.16 \cdot 10^{-2}$	9.93 $9.70 \cdot 10^{-2}$	7.73 $4.49 \cdot 10^{-2}$
C(1')	$T_l$ , s std.dev	11.65 $3.34 \cdot 10^{-2}$	11.23 $3.98 \cdot 10^{-2}$	15.03 $5.66 \cdot 10^{-2}$	13.33 $2.64 \cdot 10^{-2}$	15.69 $1.01 \cdot 10^{-3}$	5.91 $3.23 \cdot 10^{-2}$
C(2')	$T_l$ , s std.dev	1.72 $8.97 \cdot 10^{-3}$	1.17 $2.40 \cdot 10^{-2}$	2.47 $9.83 \cdot 10^{-3}$	1.98 $8.36 \cdot 10^{-3}$	2.88 $2.61 \cdot 10^{-2}$	1.01 $1.12 \cdot 10^{-2}$
C(3')	$T_l$ , s std.dev	1.75 $1.07 \cdot 10^{-2}$	1.17 $1.41 \cdot 10^{-2}$	2.41 $9.10 \cdot 10^{-3}$	1.97 $7.05 \cdot 10^{-3}$	2.62 $2.27 \cdot 10^{-2}$	1.01 $1.10 \cdot 10^{-2}$
C(4')	$T_l$ , s std.dev	1.06 $1.41 \cdot 10^{-2}$	0.92 $1.20 \cdot 10^{-2}$	1.28 $6.93 \cdot 10^{-3}$	1.21 $1.30 \cdot 10^{-2}$	1.25 $3.38 \cdot 10^{-2}$	0.65 $1.36 \cdot 10^{-2}$
CN	$T_l$ , s std.dev	9.57 $4.00 \cdot 10^{-2}$	9.33 $2.56 \cdot 10^{-2}$	11.50 $3.70 \cdot 10^{-2}$	11.51 $2.53 \cdot 10^{-2}$	10.62 $4.18 \cdot 10^{-2}$	3.11 $4.67 \cdot 10^{-2}$

### 4.3. A 3(2H)-Benzofuranon származékok vizsgálata NMR módszerekkel<sup>3</sup>

#### 4.3.1. Bevezetés

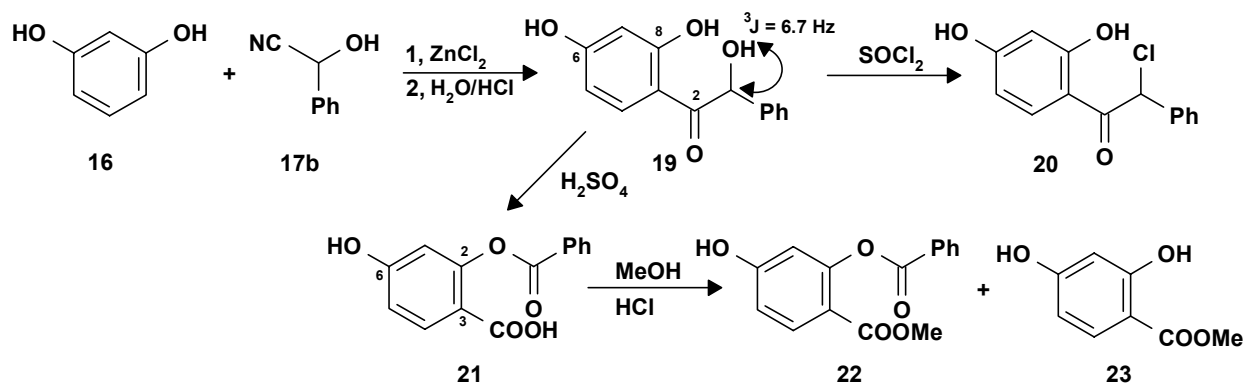
A csontitkulásra ható szerek kutatása során benzofuranon származékokat kívántunk előállítani az irodalomban leírt módszerek alapján.<sup>83,84,85,86,87</sup> Kísérleteink során elsőként a következő reakció termékeit vizsgáltuk:



35. ábra

A fenti reakció során Catamna és munkatársai<sup>87</sup> egy 3(2H)-benzofuranon (18) származék keletkezését írták le. A reakció megisméltése után a várt vegyületen kívül több terméket is kaptunk, melyeket a reakcióelegyből tisztán izoláltunk és jelen munkában ezek szerkezetvizsgálatáról kívánok beszámolni. A szerkezetigazolást IR, NMR, és tömegspektroszkópiai módszerek, továbbá egykristály röntgen diffrakciós vizsgálatok alapján végeztünk el.

Amint előbb utaltunk rá, említett szerzők<sup>87</sup> a Hoesch reakció körülményeit alkalmazva az  $\alpha$ -hidroxi- (17b) vagy  $\alpha$ -haloaril (17a) acetonitrilek polifenollokkal való reakciójában 6-hidroxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranon (18) keletkezéséről számoltak be. A fentebb említett körülmények között végrehajtott reakció lejátszódása után többkomponensű elegyet kaptunk, amelyben a kívánt benzofuranon származék (18) csak nyomokban volt jelen. A reakció izolált termékeiről NMR spektrumokat vettünk fel. A spektrális adatokat lentebb szereplő táblázatok formájában adjuk meg.



36. ábra

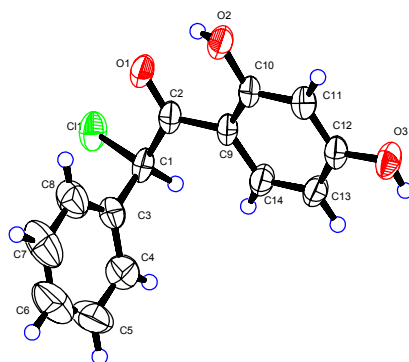
#### 4.3.2. Szerkezetigazolási rész

A 36. ábrán látható **19** hidroxil származék a reakció köztterméke. Az anyagról több oldószerben proton, lecsatolt  $^{13}\text{C}$  és  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 NMR felvételeket készítettünk. A spektrális adatokat a 47. táblázatban foglaltuk össze.

A fentebb említett molekula szerkezetét az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban 4.42 ppm-nél ( $\text{CDCl}_3$ ) megjelenő, mozgékony protontól származó jel bizonyította, amely az 1-es protonnal 6.7 Hz-es spin-spin kölcsönhatást mutatott. További bizonyítékokat szolgáltatnak a 47. táblázatban feltüntetett  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR adatok, továbbá az MS spektrumban 244 daltonnál látható molekulaion és a jellegzetes fragmenscsúcsok.

A **20** vegyület a **19** és tionilklorid hidroxil-klór cserével járó reakciójának terméke (48. táblázat). Az  $^1\text{H}$  NMR spektrumában jellegzetes volt a 7.00 ppm-nél található szingulett jel, ami az 1-es protonhoz rendelhető. A minta tömegspektrumában  $M=262$  daltonnál jelent meg a molekulaion és az izotóp eloszlás egy klóratom jelenlétére utalt. Mivel az anyag az NMR csőben gyönyörűen kikristályosodott, az így nyert egykristály röntgendiffrakciós vizsgálatát is elvégeztük. A 37. ábrán látható ORTEP rajz egyértelműen igazolja a szerkezetet. Az így előállított anyag a kívánt reakció közttermékeként is szolgálhat.

Kísérletet tettünk arra, hogy a **19** molekulából kiindulva, a  $\text{P}_2\text{O}_5$ -tel való dehidratálás során gyűrűzárást követően a kívánt 3(2H)-benzofuranon származékhoz jussunk, de a reakció sikertelennek bizonyult. Egy másik dehidratáló reagens (tömény  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) alkalmazásával a 36. ábrán látható **21** vegyületet kaptuk. A **21** származék keletkezését oly módon magyarázhatjuk, hogy a reakció során először keletkező benzofuranon (**18**) furán gyűrűje felnyílik, majd további oxidációs folyamat révén az izolált (**21**) termék keletkezik (38. ábra). A **21** molekula szerkezetét elemáanalízis adatai és  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok alapján határoztuk meg. A **21** vegyület metanollal reagálva két észter molekulát eredményezett (**22** és **23**, 50. táblázat). A **22** és **23** vegyületek izolálása egy további bizonyíték arra, hogy a 38. ábrán feltüntetett termék a 2-benzoiloxi-4-hidroxibenzoésav (**21**). Az NMR adatokat 49. táblázatban adjuk meg.

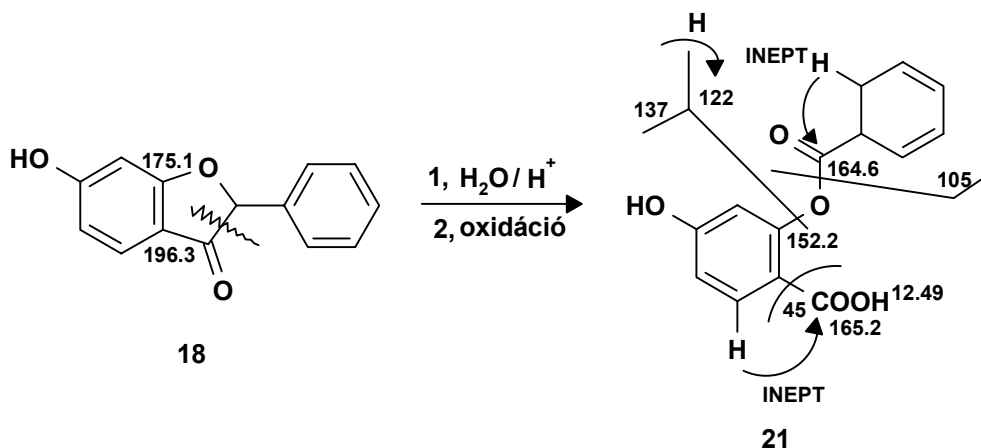


37. ábra

A **20** vegyület egykristály röntgen diffrakciós szerkezete

Az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban 12.49 ppm-nél látható jel egy karboxil csoport protonjához rendelhető. A  $^{13}\text{C}$  spektrumban a benzofuranon (**18**) C(2) és C(3) szénatomjainak kémiai eltolódása a konjugált karbonil csoportokra jellemző 165 ppm körüli tartományba tolódik el.

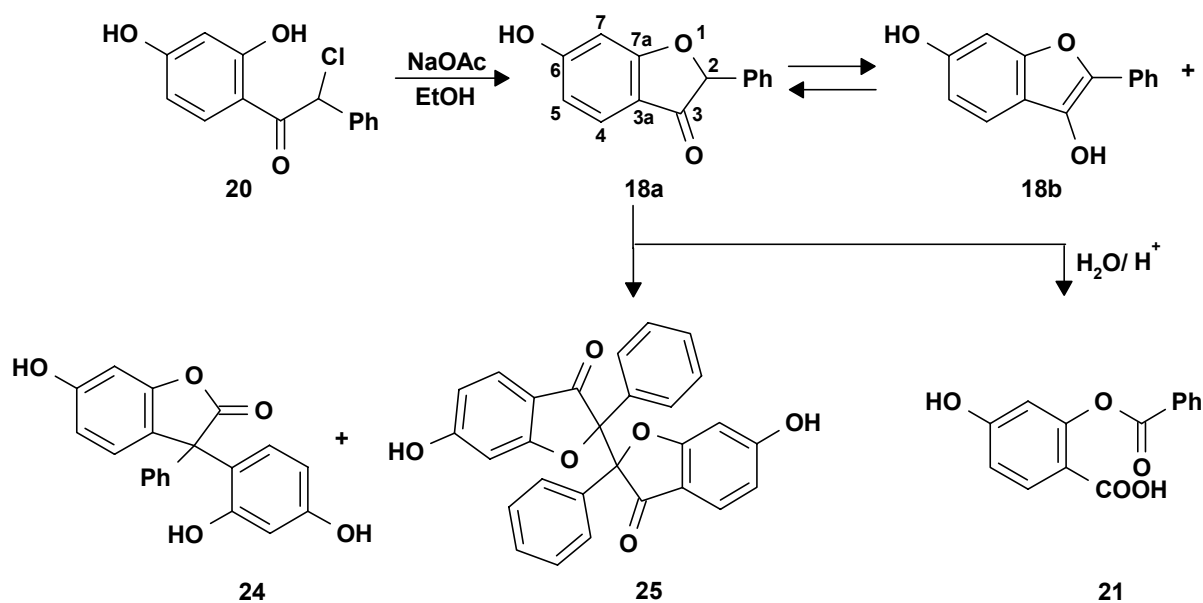
A  $^{13}\text{C}$  jelek hozzárendelését szelektív INEPT kísérletekkel bizonyítottuk. Jellegzetes a C(2) kémiai eltolódás csökkenése ( $\delta \text{C}(2) - 152.2 \text{ ppm}$ ) a benzofuranon származékban mért értékhez képest ( $\delta \text{C}(7a) - 175.1 \text{ ppm}$ ). A minta tömegspektrumában 258 daltonnál jelenik meg a molekulaion és a felírt szerkezettel van összhangban az észter oxigén egyes kötési mentén történő hasadásokból keletkező fragmens ionok megjelenése. A karbonsav csoport jelenlétére utal a tömegspektrumban a molekulaionból 45 tömegegység veszteséssel levezethető fragmens ion.



38. ábra

A **22** és **23** termékek szerkezetét a **21** vegyülethez hasonlóan az  $^1\text{H}$  NMR spektroszkópiai adatok alapján határoztuk meg. Az  $^1\text{H}$  NMR jelek egyértelmű hozzárendelését az **50. táblázatban** adjuk meg.

Mivel a klór származék (**20**) a kívánt reakció köztitermékének tekinthető, kísérletet tettünk e vegyület közvetlen módon történő előállítására is. A sikeres izolálás után ezt a vegyületet kiindulási anyagnak használva végrehajtottuk a következő reakciót (39. ábra):



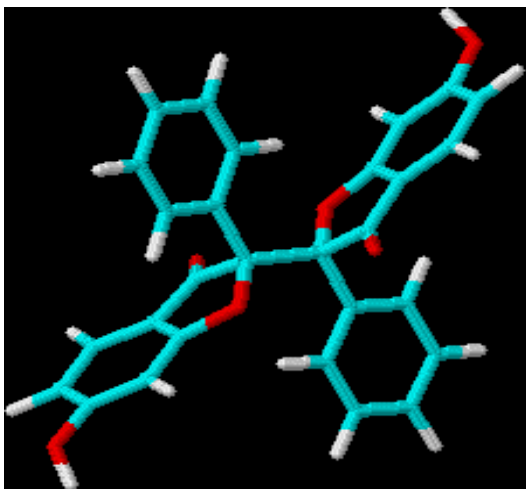
39. ábra

A **20** származék ciklizációját nátrium acetát jelenlétében végeztük el. Az így kapott 3(2*H*)-benzofuranon (**18**) molekulát többféle deuterált oldószerben is vizsgáltuk. Az <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR jelhozrendelést, amit a DEPT-135 és 2D HMBC spektrumok alapján végeztünk el, az **51. táblázat** tartalmazza. Az anyag tömegspektrumában a molekulaion megfelelt a várt anyag moltömegének (M=226 dalton), a DMSO-d<sub>6</sub>-ban felvett NMR spektrumokban, azonban két jelsorozat volt látható, melyek intenzitásaránya időben lassan változott. Ezeket a jelsorozatokat 2D HMBC spektrum alapján (*41. ábra*) a *keto*- és az *enol*- tautomerekhez (**18a** és **18b**) rendeltük hozzá. Az ábrán látható 2-H jele keresztcsúcsokat ad a C(2'); C(6'); C(1'); C(7a) és C(3) szén-13 jeleivel, ami a DMSO-d<sub>6</sub> oldatban fő komponensként a *keto*- forma (**18a**) létezését igazolta. Továbbá 4-H (minor) jel keresztcsúcsokat ad a C(3)-as, C(6)-os és C(7a) szén-13 jeleivel, melyek az *enol*- formára (**18b**) jellemzők. A *keto*- formát azonosító további jelek a 196.3 ppm-es karbonil jel, illetve a C(2) sp<sup>3</sup>-hibridállapotát igazoló <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C kémiai eltolódások. Az *enol*- formában (**18b**) a C(2) és C(3) szénatomok jelei 135 ppm körül jelentkeztek (**51. táblázat**) igazolva ezen atomok közötti kettőskötést; további jellegzetessége az *enol*- formának a két OH jel megjelenése 9.64 és 9.90 ppm-nél. Ezek a tények kiegészítik az irodalomban talált eredményeket, mert a Chopin és munkatársai<sup>87</sup> csak a *keto*- forma jelenlétét említik (a 2-H jelnek DMSO-d<sub>6</sub>-ban készült <sup>1</sup>H NMR spektrumban megfigyelt eltolódása alapján). A *keto-enol* tautomer formák egyensúlyi arányát azonban a spektrumokból nem tudtuk meghatározni, ugyanis a tautomerizáció mellett az oldatban bomlás is fellépett és idővel újabb jelsorozatok jelentek meg a spektrumokban. Deuterált benzolban és kloroformban felvett <sup>1</sup>H NMR spektrumokban csak egy, a *keto*- formához rendelhető jelsorozat látható és több nap elteltével sem jelentek meg az *enol*- forma jelei. A szilárd mintáról *KBr* pasztillában készített IR spektrumában 1682 cm<sup>-1</sup>-nél intenzív karbonil sáv látható. A fentiek alapján tehát szilárd állapotban a *keto*- formában van az anyag és apoláros oldószerekben is ez a domináns stabil tautomer forma, DMSO-d<sub>6</sub>-ban azonban az oldószer szolvatáló hatásának következtében az *enol*- tautomer a *keto*-hoz hasonlóan stabilis.

A reakcióelegyből (*39. ábra*) a 3(2*H*)-benzofuranon származékon (**18**) kívül egyéb anyagokat is izoláltunk. A **21** vegyület a **18** benzofuranon bomlásterméke, amely szerkezetigazolását fentebb már megadtuk.

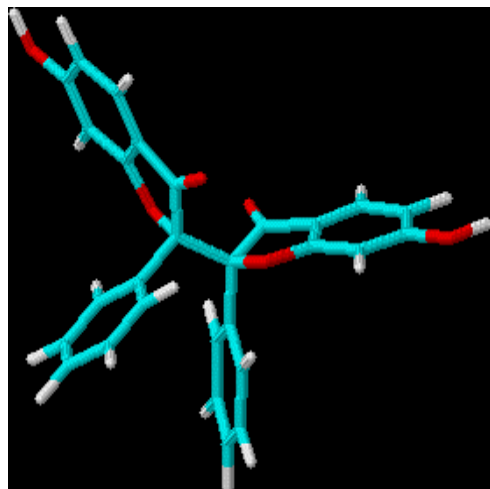
A **25** dimer származék keletkezése valószínűleg egy oxidatív folyamatnak köszönhető. Levegő hatására ugyanis DMSO-d<sub>6</sub> oldatban a teljes dimerizáció néhány nap alatt végbement. A **25** molekula <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR spektrumaiban két hasonló intenzitású jelsorozatot detektáltunk. Az <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR jelek hozzárendelését az **52. táblázatban** adjuk meg.

Az anyag tömegspektrumában a molekulaion 450 daltonnál jelentkezett, ami két hidrogénnel kevesebb, mint a kiindulási **18** anyag moltömegének kétszerese. A tömegspektrumban megjelenő fragmensek azonosak a benzofuranon (**18**) fragmenseivel, azaz a termék a **18** dimerje kell, hogy legyen. Az NMR spektrumokban kettő, közel 1:1 arányú jelsorozat jelenléte vagy azzal magyarázható, hogy a dimer egy gátolt rotáció miatt nem szimmetrikus konformációjú, így a két részegység megfelelő atomjai nem azonos kémiai környezetben vannak, vagy azzal, hogy a molekula két királis centrumot tartalmaz és a két jelsorozat a molekula két diasztereomerjének felel meg (az ellentétes konfigurációjú királis C(2) atomokat tartalmazó diasztereomer egy *mezo*-formának, míg az azonos konfigurációjú szénatomokat tartalmazó diasztereomer esetén két enantiomer keveréknek, azaz egy *racémnek* (*d,l*-párnak) felel meg) (*40. ábra*). A <sup>13</sup>C NMR spektrumában C(2) jel kémiai eltolódása kb. ~90 ppm, ami arra utal, hogy ez egy sp<sup>3</sup>-hibridállapotú kvaterner szén és a két molekula a C(2) szénatomoknál kapcsolódott össze.



*mezo*

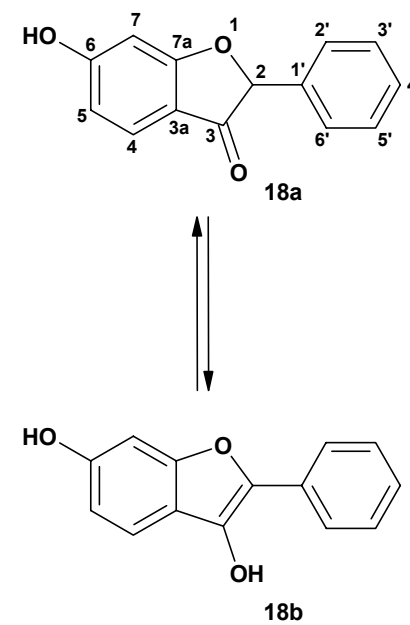
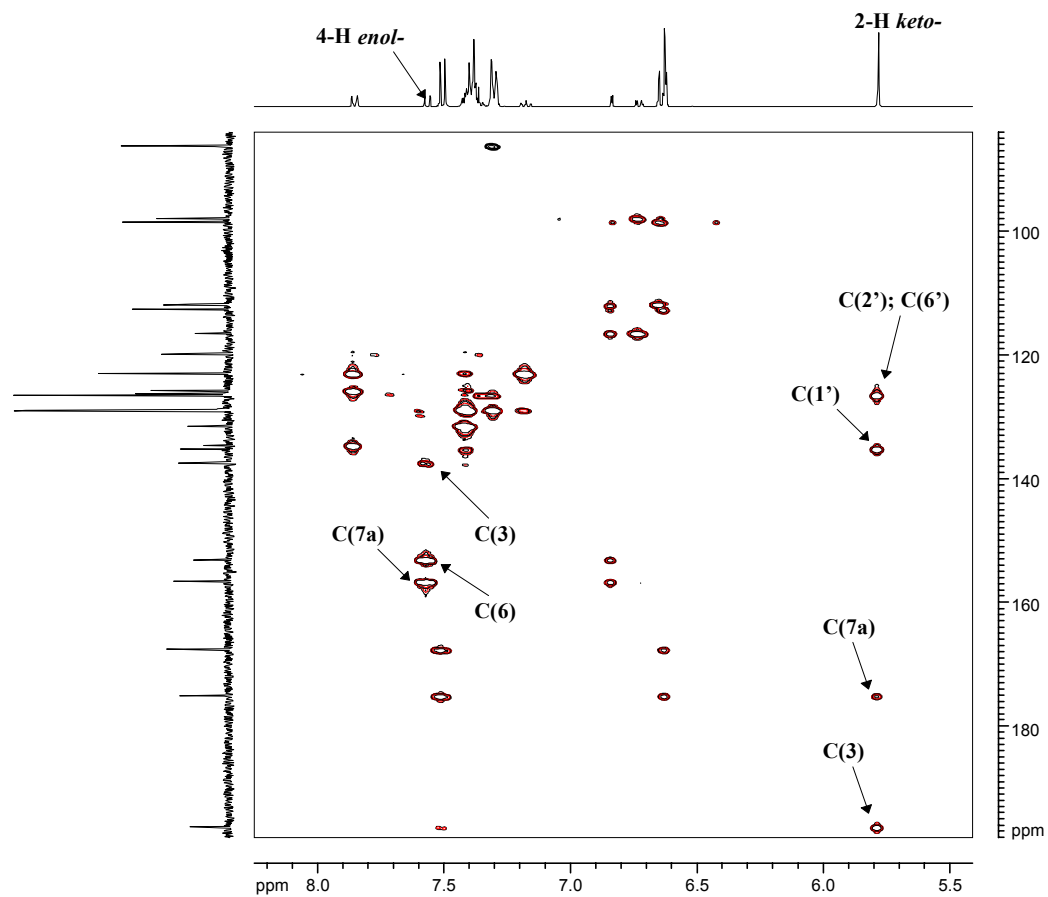
“R”, “S” vagy “S”, “R”



*racém (d,l-pár)*

“R”, “R” vagy “S”, “S”

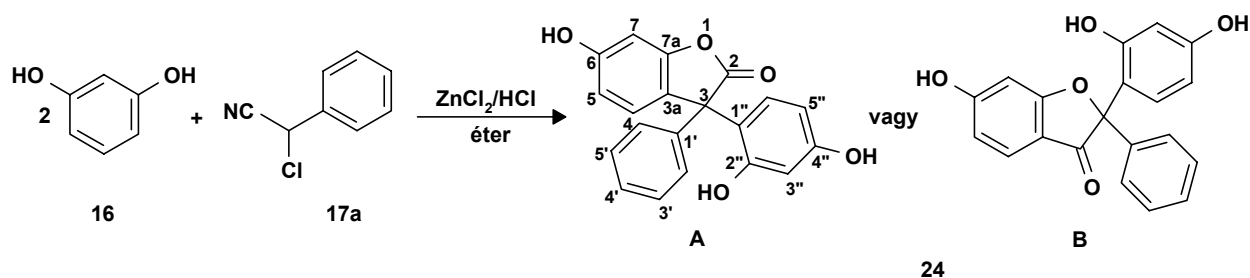
40. ábra



41. ábra

A **18a,b** vegyületek 2D HMBC spektruma. Az ábrán látható nyilak a keto illetve az enol tautamereknek megfelelő keresztcsúcsait jelölnék

Végül a 42. ábrán szereplő reakcióelegyből izolált **24** termék szerkezetvizsgálatát ismertetem. A minta  $^1\text{H}$  NMR spektrumában egy monoszubsztituált és két 1,2,4-triszubsztituált aromás gyűrű jelei, a szén-13 NMR spektrumban pedig 20 szénatomnak megfelelő rezonanciajel jelent meg. A tömegspektrumban a molekulaion 334 daltonnál jelentkezett. Ezek a spektroszkópiai adatok egy olyan anyag összegképletével magyarázhatók mely a benzofuranon és rezorcín molekula oxidatív összekapcsolódásával keletkezik egy molekula hidrogén kilépése mellett (42. ábra). Az alábbi ábrán két feltételezett szerkezetet (**A** és **B**) tüntetünk fel:

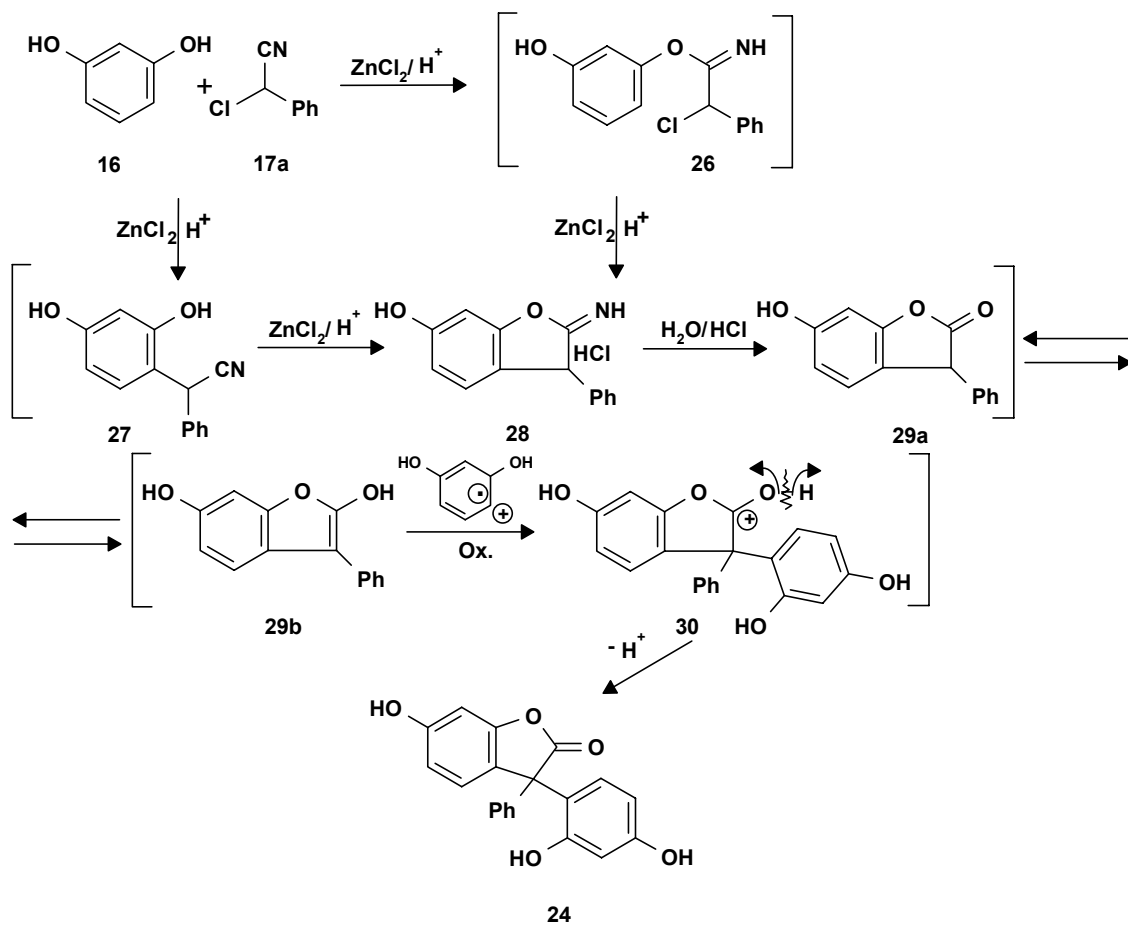


42. ábra

A **24** molekula szerkezetét a 2D HMQC spektrumból meghatározott egykötéses és a 2D HMBC spektrumból azonosított távolható szén-13-proton csatolások segítségével határoztuk meg. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelését az 53. táblázatban foglaltuk össze.

Már a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum tanulmányozása közben kiderült, hogy a 42. ábrán látható reakció lejátszódása során, nagy valószínűséggel, az öttagú gyűrűben észter csoportot tartalmazó származék (**A** forma) keletkezett. Ezt a feltevést az 56.7 és 177.9 ppm-nél megjelenő C(3) és C(2) szén-13 atomoknak megfelelő jelek alapján tettük, mivel várható, hogy a másik szerkezetben (**B** forma) a megfelelő szén-13 jelek kb. 20-30 ppm-mel nagyobb illetve kisebb eltolódást kell, hogy elszenvedjenek.

Az 53. táblázatból látható legfontosabb információ az volt, hogy az 56.7 ppm-nél található  $\text{sp}^3$ -hibridállapotú kvaterner szén mindhárom aromás gyűrű egy protonjával HMBC keresztcsúcsot ad, ugyanakkor a 177.9 ppm-es kémiai eltolódású jel semmilyen távolható spin-spin kölcsönhatásban nem vesz részt, tehát a **24** vegyület az **A** szerkezetnek felel meg. A (**24**) melléktermék képződését a 43. ábrán látható mechanizmussal magyarázzuk. Houben-Hoesch reakció során keletkezett ciklikus iminoészter (**28**) tovább hidrolizál és így kapott 2(3*H*)-benzofuranon (**29a,b**) a 3(2*H*)-benzofuranon (**18a,b**) molekulához hasonlóan az oldatban *keto* (**29a**)-*enol* (**29b**) tautomer egyensúlyban van jelen. Az *enol*-formát kettős kötésnél megtámadja egy rezorcín molekulából származó gyök-kation és az így kapott pozitív töltésű **30** köztitermék a 2-OH csoport deprotonálódása után a **24** 2(3*H*)-benzofuranon származékká alakul át.

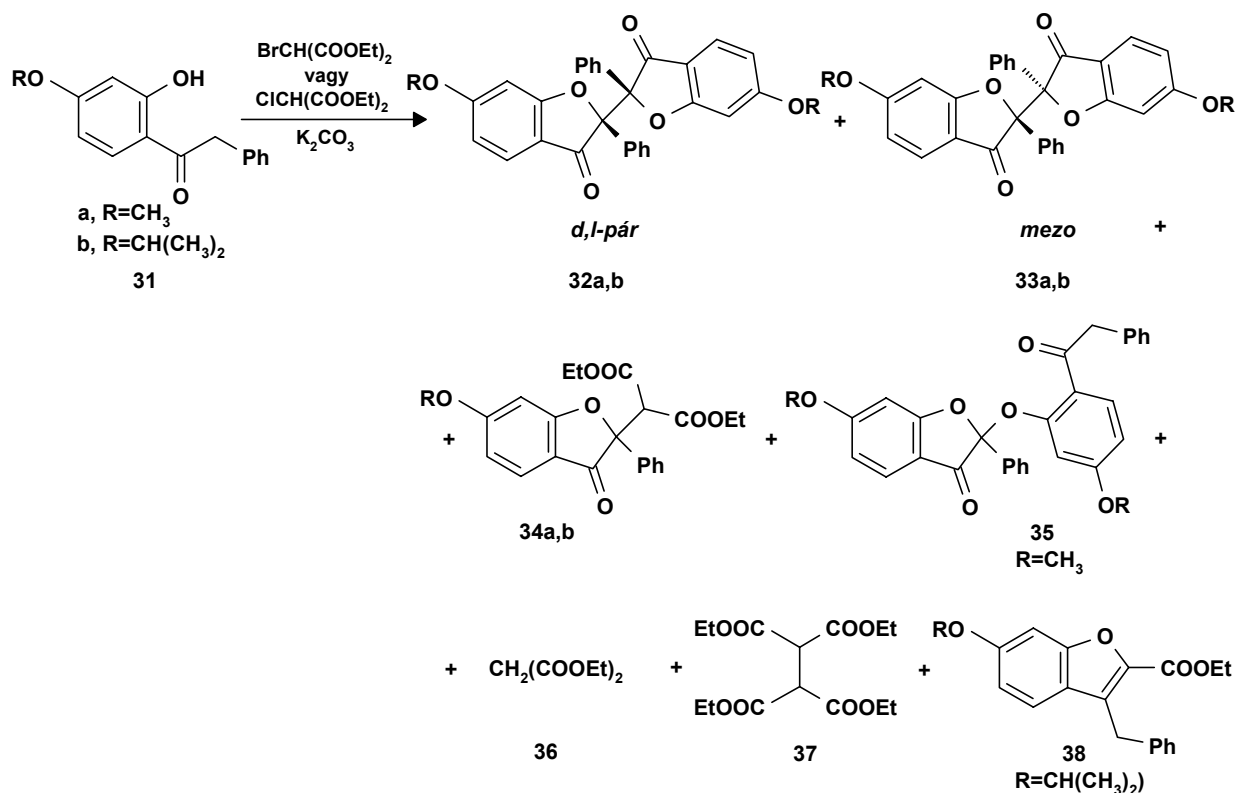


43. ábra

Feltételezett reakciómechanizmus a 24A molekula képződésére

Kanvinde és mtsi<sup>86</sup> a 2-hidroxi-1-oxo-2-phenylethan-1-ol és brómmalonát reakciójának segítségével 2-aryl-3(2*H*)-benzofuranon származékok előállítását írták le. Az 1-(2-hidroxi-4-metoxi)fenil-2-pheniletanon molekulából (31) kiindulva (44. ábra), a cikkben leírt reakció körülményeit betartva, az eljárásukat megismételtük.

A reakció lejátékozása és a reakcióelegy feldolgozása után 28%-os kitermeléssel fehér szilárd anyagot kaptunk, amelynek az olvadáspontja a közleményben leírt 234°C-hoz közel, 248-250°C volt. A publikált és az általunk izolált termékek között további hasonlóságot is tapasztaltunk, miszerint az általunk izolált molekula IR spektrumában a karbonil csoport rezgései 1715  $\text{cm}^{-1}$  hullámszámnál jelentkeztek (a cikkben 1725  $\text{cm}^{-1}$ ), azonban az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban a 2-H protonnak megfelelő jel hiányzott. A részletes  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR vizsgálatok (2D HMBC, 2D HMQC és DEPT-135) arra a következtetésre vezettek, hogy a kívánt 2-phenil-3(2*H*)-benzofuranon helyett, ismét annak dimerje keletkezett (32a). Mivel az NMR spektrumokban csak egy jelsorozat jelentkezett, a korábban vizsgált 25 jelzéssel ellátott anyag NMR-jével szemben a spektrum jelentős hasonlóságot mutatott, valószínű volt, hogy az előállítás során sikerült tisztán kinyernünk az anyag egyik diasztereomerjét, amelyben a C(2) szén-13 kémiai eltolódása 91.2 ppm volt. Az MS spektrumban 478 daltonnál megjelenő molekulaion szintén a dimer keletkezését támasztotta alá. Az egyértelmű  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozzárendelését az 54. táblázatban foglaltuk össze.



44. ábra

Az anyalóg komponenseinek kromatográfias szétválasztása után további termékeket is izoláltunk (44. ábra). Így az előző molekulához hasonlóan 28%-os kitermeléssel egy másik fehér szilárd anyagot nyertünk. A molekula  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumokban szintén csak egy jelsorozatot tapasztaltunk. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  jeleknek kémiai eltolódása nagyon hasonló volt a **32a** vegyületben mértékhez. Feltételeztük, hogy a **32a** molekula másik lehetséges dimerjét (**33a**) is kinyertük, mivel a részletes NMR vizsgálatok elemzéséből (2D HMBC, 2D HMQC és DEPT-135) egyértelműen egy nagyon hasonló szerkezetet hoztunk ki, amellyel a **32a** dimer rendelkezett. Mivel egyértelművé vált, hogy a két szerkezet csak a C(2) szén konfigurációjában tér el egymástól, kísérletet tettünk arra, hogy a két jelsorozatot (**32a** és **33a**) a *mezo*-(6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz (mindkét C(2)-es szén eltérő konfigurációjú: az egyik "S" vagy "R" a másik pedig "R" vagy "S" megfelelően) vagy a *racém*(*d,l*-pár)-(6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz (a két C(2)-es szén azonos konfigurációjú, "R" vagy "S") rendeljük hozzá. Így mindkét anyaghoz egyidejűleg királis szolvatáló reagenst (TFAE: (R)-(-)-2,2,2-TriFluoro-1-(9-Antril)Etanol) adtunk hozzá és azt tapasztaltuk, hogy a **32a** molekula  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumokban egy jelsorozat helyett két jelsorozat jelentkezett, miközben a másik minta NMR spektrumai változatlanul egy jelsorozatot tartalmaztak. A fentiek alapján a **33a** molekulát a *mezo*-(6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz, míg **32a** a *racém*(*d,l*-pár)-(6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-metoxi-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz rendeltük hozzá (**54. táblázat**).

A 44. ábrán látható **34a** és **35** molekulák keletkezése feltehetően szintén a reakció során lejátszódó oxidatív folyamatoknak köszönhető. Mivel ugyanezeket a termékeket (hasonló kitermeléssel) akkor is izoláltuk, amikor a fentebb említett reakciót inert gáz (argon)

alatt megismételtük, arra a következtetésre jutottunk, hogy, feltehetően, a reakcióban szereplő dietil brómmalonát oxidálószerként viselkedik és a reakció lejátszódása során dietil malonáttá (37) redukálódik. A 34a és 35 termékek  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozrendelését az 55., 56. táblázatokban foglaltuk össze.

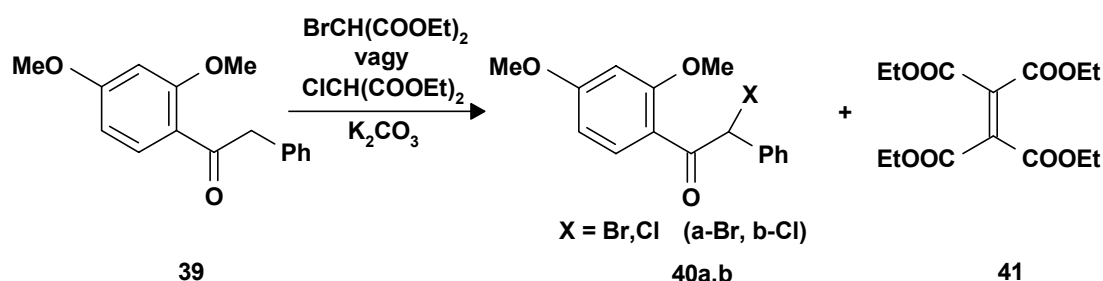
Amikor a 44. ábrán szereplő reakciót az 1-(2-hidroxi-4-(2-propoxi))fenil-2-feniletanon kiindulási anyaggal megismételtük, hasonló szerkezetű termékeket (32b, 33b és 34b (55., 57., táblázatok) kaptunk. Az előbb említett termékek mellett 38 vegyületet is izoláltuk (az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelhozrendelést az 58. táblázatban adjuk meg), amikor a reakciót brómmalonát helyett klórmalonáttal végeztük el, de a kívánt 3(2H)-benzofuranont (18) ebben az esetben sem sikerült szintetizálnunk.

A reakcióelegyből izolált főtermék  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumaiban két hasonló intenzitású jelsorozat jelentkezett. Arra gondoltunk, hogy a korábban vizsgált *racém* (32a) és *mezo* (33a) dimerekhez hasonlóan megint egy dimer párral állunk szemben, amit az MS spektrumban 534 daltonnál megjelenő molekulaion és fragmentáció is igazolt. A két dimer molekulát kromatográfiás módszerrel szétválasztattuk és a korábban említett királis szolvatáló reagens (TFAE) hozzáadása után, egyértelműen hozzá tudtunk rendelni a *mezo*-(6-(2-propoxi)-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-(2-propoxi)-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz (33b) és a *d,l*,-(6-(2-propoxi)-2-fenil-3(2H)-benzofuranon-2-il)-6-(2-propoxi)-2-fenil-3(2H)-benzofuranonhoz (32b). A 33b molekula az NMR csőben kikristályosodott és a kristályok alkalmasnak bizonyultak az egykristály röntgen diffrakciós vizsgálat elvégzéséhez. Így a 46. ábrán látható szerkezet egyértelműen alátámasztja a 33b molekula *mezo* formához rendelésének helyességét.

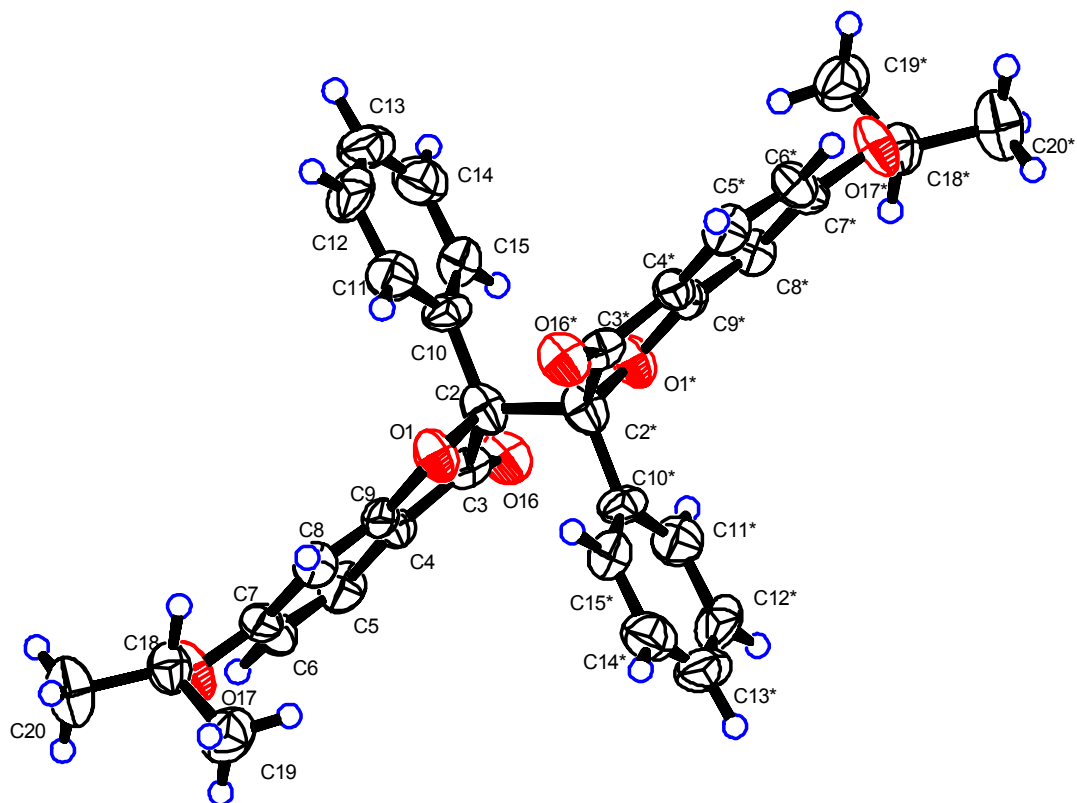
A dietil brómmalonáttal való bromózás nem közismert eljárás, azonban a munkánk során bizonyítékokat kerestünk, amelyek alátámasztják a cikkben leírt koncepciót.

Az 1-(2,4-dimetoxifenil)-2-feniletanon (39) és dietil brommalonát reakcióját a közleményben<sup>86</sup> szerepelt körülmények között végeztük el. A reakció lejátszódása és az elegy feldolgozása után két terméket izoláltunk: 2-bróm-1-(2,4-dimetoxi)fenil-2-feniletanont (40) és dietil 2,3-(dietoxycarbonil)fumarátot (41) (45. ábra). A 40b molekula  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok jelhozrendelését az 59. táblázatban foglaltuk össze.

A 40a származék szerkezetét a 40b vegyület  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok alapján igazoltuk. A jó kitermeléssel nyert 40a molekula azt bizonyítja, hogy ilyen körülmények között lehetséges a bromózás. A 41 vegyület pedig a reaktáns brómmalonészter alkilezéssel induló összekapcsolódásának a terméke. A dietil klórmalonát alkalmazása hasonló termékekhez vezet. A 41 szerkezetigazolását az  $^1\text{H}$  NMR alapján végeztük el. Az  $^1\text{H}$  NMR spektrum proton jeleinek hozzárendelését az 60. táblázat tartalmazza.



45. ábra



46. ábra

A **33b**(mezo) vegyület egykristály röntgen diffrakciós szerkezete

### 4.3.3. Összefoglalás

Chopin és Catamna<sup>87</sup> a 35. ábrán látható reakció segítségével a Hoesch reakció körülményeit alkalmazva 3(2*H*)-benzofuranon (**18**) molekula előállítását írták le. A reakciót azonos körülmények között megismételve, többkomponensű elegyet kaptunk, amelyben a kívánt benzofuranon származék (**18**) csak nyomokban volt jelen (kitermelés kb. 6%). Így a kívánt 3(2*H*)-benzofuranon (**18**) előállítását a **20** molekulából kiindulva etanos natrium acetát jelenlétével kíséreltük meg. A reakció lejátszódása után 46.9%-os kitermeléssel fehér kristályokat kaptunk, melyek a 3(2*H*)-benzofuranon (**18**) molekulának feleltek meg (**51. táblázat**).

Egy másik cikk szerzői, Kanvinde és mtsi<sup>86</sup>, leírtak egy eljárást illetve annak feltételezett mechanizmusát a benzofuranon származékok előállítására. A szerzők azt állították, hogy a dietil brómmalonát brómozó reagensként szerepel a reakcióban és így kialakított reaktív brómmetil csoport kulcsszerepet játszik a gyűrűzárásban, ami a 2-aryl-3(2*H*)-benzofuranonok előállításához vezet. A közleményben és eddig a szakirodalomban sem található bizonyítékok a fentebb említett mechanizmusra, vagyis a dietil brómmalonáttal való brómozás nem közismert eljárás. A munkánk során bizonyítékokat találtunk, amelyek alátámasztották a Katamna és munkatársai koncepcióját. A cikkben említett reakció

körülményeit betartva, az eljárást megismételtük. A 46. ábrán látható reakció során jó kitermeléssel nyert **40a** származék azt jelezte, hogy a cikkben szereplő körülmények között tényleg bróm származék keletkezett.

A 44. ábrán látható reakció lejátszódása és a reakcióelegy feldolgozása után, főkomponensként, 28%-os kitermeléssel fehér szilárd anyagot kaptunk, amelynek az olvadáspontja a közleményben leírt 234°C-hoz közel, 248-250°C volt. A publikált és az általunk izolált termékek között további hasonlóságokat és különbségeket is tapasztaltunk, miszerint az általunk izolált molekula IR spektrumában a karbonil csoport rezgései 1715 cm<sup>-1</sup> hullámszámnál jelentkeztek (a cikkben 1725 cm<sup>-1</sup>). A cikkben szerepelt <sup>1</sup>H NMR (Jeol Fx-90Q!!!) spektrum jelhozzárendelése szerint a 2-H proton jele 7.17-7.51 ppm kémiai eltolódás tartományba esik, míg az általunk izolált főtermék <sup>1</sup>H NMR spektrumában a 2-H protonnak megfelelő jele hiányzott. Így a fizika-kémiai és spektrális adatok összehasonlításából arra a következtetésre jutottunk, hogy a 44. ábrán látható reakció lejátszódása során kapott főkomponenst, a fentebb említett cikk szerzői dimer molekula helyett, tévesen, a 3(2H)-benzofuranon (**18**) molekulához rendelték hozzá.

Az eredményeink alapján azt lehet állítani, hogy a 3(2H)-benzofuranon (**18**) és származékai könnyen oxidálódnak és fő termékként a *mezo* (**25**, **33a**, **33b**) és a *racém* (**25**, **32a**, **33b**) dimerekhez vezetnek.

47. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **19** vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR					$^{13}\text{C}$ NMR		DEPT-135
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	intenzitás	multipl.	$^3J_{\text{H-H}}$ , Hz	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	multipl.
DMSO- $\text{d}_6$	6.01	1-H	1	s		74.7	C(1)	d
	6.23	7-H	1	d	$^3J_{7\text{-H}, 5\text{-H}}=2.3$	102.5	C(7)	d
	6.31	5-H	1	dd		108.2	C(5)	d
	7.24	4'-H	1	m		110.7	C(3)	s
	7.33	3'-H; 5'-H	2	m		127.0	C(3'); C(5')	d, d
	7.45	2'-H; 6'-H	2	m		127.7	C(4)	d
	7.95	4-H	1	d	$^3J_{5\text{-H}, 4\text{-H}}=8.8$	128.4	C(2'); C(6')	d, d
						133.4	C(4')	d
						140.2	C(1')	s
						*164.7	C(6)	s
					*165.0	C(8)	s	
					202.4	C(2)	s	
$\text{CDCl}_3$	4.42	1-OH	1	d		-	-	-
	5.63	6-OH	1	s		-	-	-
	5.88	1-H	1	d	$J_{1\text{-H}, 1\text{-OH}}=6.7$	-	-	-
	6.27	5-H	1	dd	$^3J_{5\text{-H}, 4\text{-H}}=8.8$	-	-	-
	6.37	7-H	1	d	$^3J_{7\text{-H}, 5\text{-H}}=2.4$	-	-	-
	7.36	2'-H; 6'-H; 3'-H; 5'-H	5	m		-	-	-
	7.51	4-H	1	d		-	-	-
	12.05	8-OH	1	s		-	-	-
$\text{CH}_3\text{OD}$	6.01	1-H	1	s		76.2	C(1)	d
	6.25	5-H, 7-H	2	m		103.8	C(7)	d
	7.27	4'-H	1	m		109.2	C(5)	d
	7.33	3'-H; 5'-H	2	m		111.8	C(3)	s
	7.43	2'-H; 6'-H	2	m		128.6	C(3'); C(5')	d, d
	7.71	4-H	1	d	$^3J_{4\text{-H}, 5\text{-H}}=9.6$	129.4	C(4)	d
						129.9	C(2'); C(6')	d, d
						134.0	C(4')	d
						141.2	C(1')	s
						*166.7	C(6)	s
					*167.0	C(8)	s	
					203.0	C(2)	s	

\* - felcserélhető hozzárendelés is lehetséges

48. táblázat. Az  $^1\text{H}$  NMR jelek hozzárendelése a 20 vegyületben

$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	intenzitás; multiplicitás		$^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
6.28	7-H	1	d	$^3J_{7\text{-H},5\text{-H}}=2.6$
6.34	5-H	1	dd	
7.00	1-H	1	s	
7.36	3'-H; 4'-H; 5'-H	3	m	
7.52	2'-H; 6'-H	2	m	
7.86	4-H	1	d	$^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=9.2$
10.79	6-OH	1	s	
11.85	8-OH	1	s	

49. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a 21 vegyületben (DMSO- $d_6$ -ban)

$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR		DEPT-135	szelektív INEPT	
$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	multiplicitás	besugárzott $^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )
6.66	7-H	110.5	C(7)	d	7-H	C(6); C(2); C(3); C(5)
6.80	5-H	113.2	C(5)	d	5-H	C(6); C(3)
7.59	3'-H; 5'-H	114.5	C(3)	s	3'-H; 5'-H	C(2'); C(6')
7.72	4'-H	128.8	C(3'); C(5')	d, d	4'-H	C(2'); C(6')
7.86	4-H	129.4	C(1')	s	4-H	C(6); C(2); COOH
8.09	2'-H; 6'-H	129.8	C(2'); C(6')	d, d	2'-H; 6'-H	C=O; C(3'); C(5')
10.61	6-OH	133.4	C(4)	d		
12.49	COOH	133.7	C(4')	d		
		152.2	C(2)	s		
		162.3	C(6)	s		
		164.6	C=O	s		
		165.2	COOH	s		

$^3J_{5\text{-H},4\text{-H}}=8.8$  Hz;  $^3J_{7\text{-H},5\text{-H}}=2.3$  Hz

50. táblázat. Az  $^1\text{H}$  NMR jelek hozzárendelése a 22 és 23 vegyületekben ( $\text{CDCl}_3$ )

$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	intenzitás; multiplicitás		$^3J_{\text{H-H}}$ , Hz
<b>22</b>				
3.68	OMe	3	s	
6.57	7-H	1	d	$^3J_{7\text{-H},5\text{-H}}=2.4$
6.66	5-H	1	dd	
7.51	3'-H; 5'-H	2	m	
7.63	4'-H	1	m	
7.92	4-H	1	d	$^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.8$
8.21	2'-H; 6'-H	2	m	
<b>23</b>				
3.91	OMe	3	s	
6.37	5-H	1	dd	
6.40	7-H	1	d	$^3J_{7\text{-H},5\text{-H}}=2.4$
7.72	4-H	1	d	$^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.5$
11.00	OH	1	s	

51. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a 18 vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR		DEPT-135	2D HMBC	
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $N^a$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $N^a$ )	multiplic.	melyik prot-kal csatol	
$\text{CDCl}_3$	5.54	2-H	-	-	-	-	
	6.60	5-H	-	-	-	-	
	6.62	7-H	-	-	-	-	
	7.39	Ph-H	-	-	-	-	
	7.58	4-H	-	-	-	-	
$\text{C}_6\text{D}_6$	5.11	2-H	-	-	-	-	
	5.15	6-OH	-	-	-	-	
	6.04	5-H	-	-	-	-	
	6.19	7-H	-	-	-	-	
	7.06	3'-H 4'-H 5'-H	-	-	-	-	
	7.34	2'-H 6'-H	-	-	-	-	
	7.39	4-H	-	-	-	-	
<i>keto-</i>	5.78	2-H	86.20	C(2)	d	2'-H; 6'-H	
	6.61	7-H	98.45	C(7)	d	5-H	
	6.62	5-H	111.81	C(3a)	s	5-H	
	7.29	2'-H 6'-H	112.65	C(5)	d	7-H	
	7.38	3'-H 4'-H 5'-H	126.25	C(4')	d	2'-H; 6'-H 3'-H; 5'-H	
	7.50	4-H	126.47	C(2'); C(6'); C(4)	d; d; d	3'-H; 5'-H	
	11.10	6-OH	129.00	C(3'); C(5')	d; d	2'-H; 6'-H; 4-H'	
			131.42	C(1')	s	2'-H; 6'-H	
			167.60	C(6)	s	4-H; 7-H	
			175.10	C(7a)	s	2-H; 4-H; 7-H	
			196.28	C(3)	s	2-H	
	$\text{DMSO-d}_6$	6.72	5-H	97.88	C(7)	d	H-5
		6.83	7-H	111.96	C(5)	d	7-H
7.18		4'-H	116.48	C(3a)	s	H-5; 7-H	
7.38		3'-H5'-H	119.80	C(4)	d	-	
7.55		4-H	122.99	C(3'); C(5')	d; d	2'-H; 6'-H; 4'-H	
7.86		2'-H 6'-H	125.72	C(4')	d	2'-H; 6'-H 3'-H; 5'-H	
9.64		6-OH	128.83	C(2'); C(6')	d; d	3'-H; 5'-H; 4'-H	
9.91		3-OH	134.61	C(1')	s	2'-H; 6'-H	
			135.15	C(2)	s	2'-H; 6'-H	
			137.43	C(3)	s	4-H	
			153.08	C(6)	s	4-H; 7-H	
			156.60	C(7a)	s	4-H; 7-H	

52. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **25** vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR			$^{13}\text{C}$ NMR			
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$^3J_{\text{H,H}}$ , Hz	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )
DMSO- $d_6$	6.47-6.58	7-H; 5-H	$^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=1.9$	89.5	C(2)	127.2*	2C(3'); 2C(5')
	7.22-7.33	3'-H; 4'-H; 5'-H		90.3	C(2)	128.7	2C(4)
	7.37-7.44	4-H; 2'-H; 6'-H	$^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.4$	97.8	C(7)	131.9	2C(1')
	11.10	6-OH		98.1	C(7)	167.3	C(6)
				112.0	C(3a)	167.4	C(6)
				112.3	2C(5)	172.4	C(7a)
				112.5	C(3a)	172.8	C(7a)
				125.8	C(4')	192.6	C(3)
				126.0	C(4')	193.0	C(3)
				127.1*	2C(2'); 2C(6')		
Piridin- $d_5$	6.72-6.77	5-H	$^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=1.9$	90.4 <sub>9</sub>	C(2)	128.3	C(2'); C(6')
	6.89-6.93	7-H		91.5 <sub>1</sub>	C(2)	128.2 <sub>5</sub>	C(2'); C(6')
	7.26-7.31	3'-H; 4'-H; 5'-H		98.7	C(7)	128.6	C(4)
	7.65	4-H	$^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.4$	98.9	C(7)	128.7	C(4)
	7.96-8.03	2'-H; 6'-H		112.8	C(5)	132.9	C(1')
	$\approx 13.5$	6-OH		112.9	C(5)	133.0	C(1')
				113.1	C(3a)	168.5	C(6)
				113.6	C(3a)	168.7	C(6)
				126.0	C(4')	173.4	C(7a)
				126.2	C(4')	173.9	C(7a)
				127.2	C(3'); C(5')	193.4	C(3)
				127.2 <sub>9</sub>	C(3'); C(5')	193.9	C(3)

\* - felcserélhető hozzárendelés is lehet

**53. táblázat.** Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **24** vegyületben

HMBC			HMQC		
$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^\circ$ )	Milyen protonokkal csatol ( $\text{N}^\circ$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^\circ$ )	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^\circ$ ),★	$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)
56.7	C(3)	2'-H; 6'-H; 6''-H; 4-H	q	-	-
98.1	C(7)	6-OH; 5-H	7-CH	7-H	6.61
102.7	C(3'')	4''-OH; 2''-OH; 5''-H	5''-CH	5''-H	6.12
106.1	C(5'')	4''-OH; 3''-H	3''-CH	3''-H	6.17
110.9	C(5)	6-OH; 7-H	5-CH	5-H	6.58
120.1	C(1'')	5''-H; 3''-H; 2''-OH	q	-	-
120.8	C(3a)	5-H; 7-H	q	-	-
125.4	C(4)	-	4-CH	4-H	6.87
128.1	C(2'), C(3')	-	2'; 6'-CH	2'; 6'-H	7.36
128.6	C(4'), C(5')	-	3'; 5'-CH	3'; 5'-H	
128.8	C(6')	-	4'-CH	4'-H	
129.6	C(6'')	5''-H	2''-CH	2''-H	6.35
138.3	C(1')	2'-H; 6'-H	q	-	-
153.8	C(7a)	4-H; 7-H	q	-	-
155.4	C(2'')	2''-OH; 6''-H; 3''-H	q	-	-
*158.1	C(6); C(4'')	4''-OH; 6-OH; 4-H; 7-H; 3''-H; 5''-H; 6''-H	q	-	-
*158.2					
177.9	C(2)	-	q	-	-

\* - fordított hozzárendelés is lehetséges

$^3J_{\text{H-H}}$  csatolási állandók:  $^3J_{5''\text{-H},6''\text{-H}}=8.8\text{ Hz}$ ;  $^3J_{3''\text{-H},5''\text{-H}}=2.4\text{ Hz}$ ;  $^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.4\text{ Hz}$ ;  $^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=2.4\text{ Hz}$

az  $^1\text{H}$  NMR spektrumban három OH csoport jele is jelentkezett: 4''-OH - 9.31 ppm; 2''-OH- 9.71 ppm; 6-OH - 9.82 ppm

**54. táblázat.** Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **32a** és **33a** vegyületekben ( $\text{CDCl}_3$ )

$^1\text{H}$ NMR			$^{13}\text{C}$ NMR		
$\delta$ , ppm		$^1\text{H}$ ( $\text{N}^\circ$ )	$\delta$ , ppm		$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^\circ$ )
<i>d,l</i> -pár, $\text{CDCl}_3$	<i>mezo</i> , $\text{DMSO-d}_6$		<i>d,l</i> -pár, $\text{CDCl}_3$	<i>mezo</i> , $\text{DMSO-d}_6$	
3.84	3.86	OMe	55.8	56.7	OMe
6.54	6.69	5-H	91.2	89.8	C(2)
6.57	6.91	7-H	96.1	96.7	C(7)
7.24	7.26	3'-H; 5'-H	111.7	112.6	C(5)
7.33	7.33	4'-H	114.7	113.3	C(3a)
7.44	7.48	4-H	125.6	125.9	C(4')
7.57	7.41	2'-H; 6'-H	127.2	127.5	C(3'); C(5')
			127.8	127.5	C(2'); C(6')
			128.7	129.2	C(4)
			131.8	132.1	C(1')
			166.2	168.7	C(6)
			173.2	173.5	C(7a)
			193.9	193.6	C(3)

Vicinális spin-spin csatolási állandók: *mezo*:  $^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.5\text{ Hz}$ ;  $^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=1.9\text{ Hz}$ ;  
*d,l*-pár:  $^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.6\text{ Hz}$ ;  $^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=1.9\text{ Hz}$

55. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **34a,b** vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR	
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )
$\text{CDCl}_3$	0.97, 1.01 (0.93, 0.97)	$\text{CH}_3$	13.6, 13.9 (13.4, 13.5)	$\text{CH}_3$
	(1.39)	iPr $\text{CH}_3$	(21.7, 21.8)	iPr $\text{CH}_3$
	3.91	$\text{OCH}_3$	55.9	$\text{OCH}_3$
	4.02, 4.05 (3.96, 4.01)	$\text{CH}_2$	58.8 (58.8)	CH
	(4.65)	iPrCH	61.4, 61.9 (61.3, 61.9)	$\text{CH}_2$
	4.66 (4.66)	CH	(70.9)	iPrCH
	6.65 (6.61)	5-H	89.3 (89.2)	C(2)
	6.80 (6.75)	7-H	96.4 (97.4)	C(7)
	7.30 (7.29)	3'-H; 4'-H; 5'-H	112.0 (112.9)	C(5)
	7.54 (7.51)	4-H	113.1 (112.6)	C(3a)
	7.60 (7.60)	2'-H; 6'-H	124.9 (124.8)	C(2'); C(6')
			126.0 (126.0)	C(4)
			128.4 (128.4)	C(3'); C(5')
			128.5 (128.3)	C(4')
			135.1 (135.3)	C(1')
			165.4, 165.8 (165.3, 165.8)	C=O
			168.2 (166.7)	C(6)
		174.0 (174.0)	C(7a)	
		196.2 (196.0)	C(3)	

$^3J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}=7.1$  Hz;  $^3J_{5\text{-H}, 7\text{-H}}=2.1$  Hz;  $^3J_{4\text{-H}, 5\text{-H}}=8.6$  Hz;  $^2J_{\text{CH}_2, \text{CH}_3}=7.2$  Hz;  $^3J_{5\text{-H}, 7\text{-H}}=2.1$  Hz;  $^3J_{4\text{-H}, 5\text{-H}}=8.6$  Hz;  $^3J_{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}=5.8$  Hz)

56. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **35** vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR	
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ (N <sup>o</sup> )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ (N <sup>o</sup> )
$\text{CDCl}_3$	3.66	5'-OCH <sub>3</sub>	49.9	CH <sub>2</sub>
	3.93	6-OCH <sub>3</sub>	55.4, 56.1	OCH <sub>3</sub>
	4.40	CH <sub>2</sub>	96.4	C(7)
	6.55	4'-H	106.4	C(6')
	6.66	7-H	106.5	C(2)
	6.67	6'-H	109.6	C(4')
	6.68	5-H	111.1	C(3a)
	7.19	3''-H; 4''-H; 5''-H	112.7	C(5)
	7.24	2''-H; 6''-H	124.7	C(2'')
	7.39	3'-H; 4'-H; 5'-H (fenil)	126.3	C(2',6') fenil
	7.55	4-H	126.4	C(4') fenil
	7.61	3'-H	126.9	C(4)
	7.69	2'-H; 6'-H (fenil)	128.2	C(2'',6'')
			128.8	C(3',5') fenil
			129.8	C(3'',4'',5'')
			132.2	C(3')
			133.2	C(1') fenil
			135.3	C(1'')
			153.6	C(1')
			162.8	C(5')
		169.2	C(6)	
		172.8	C(7a)	
		191.6	C(3)	
		198.6	C=O	

$^3J_{4'-\text{H},6'-\text{H}}=2.3$  Hz;  $^3J_{4'-\text{H},3'-\text{H}}=8.7$  Hz;  $^3J_{5-\text{H},7-\text{H}}=2.1$  Hz;  $^3J_{4-\text{H},5-\text{H}}=8.6$  Hz

57. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **32b** és **33b** vegyületekben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR			
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^{\text{a}}$ )
<b>32b</b>						
<b><math>\text{C}_6\text{D}_6</math></b>	0.86	iPr- $\text{CH}_3$	21.2	iPr- $^{13}\text{CH}_3$	127.3	C(3'); C(5')
	3.84	iPr-CH	21.3	iPr- $^{13}\text{CH}_3$	128.4	C(2'); C(6')
	6.21	5-H	70.2	iPr- $^{13}\text{CH}$	128.7	C(4)
	6.34	7-H	91.8	C(2)	132.8	C(1')
	7.07	4'-H	97.2	C(7)	166.5	C(6)
	7.14	3'-H; 5'-H	112.6	C(5)	173.3	C(7a)
	7.37	4-H	114.9	C(3a)	193.3	C(3)
	8.11	2'-H; 6'-H	125.9	C(4')		
<b><math>\text{CF}_3\text{COOD}</math></b>	1.45	iPr- $\text{CH}_3$	22.6	iPr- $^{13}\text{CH}_3$	129.4	C(3'); C(5')
	4.77	iPr-CH	22.7	iPr- $^{13}\text{CH}_3$	130.4	C(2'); C(6')
	6.62	5-H	75.5	iPr- $^{13}\text{CH}$	132.0	C(4)
	6.76	7-H	94.5	C(2)	133.0	C(1')
	7.25	3'-H; 4'-H; 5'-H	99.5	C(7)	172.4	C(6)
	7.45	4-H	115.7	C(3a)	178.5	C(7a)
	7.86	2'-H; 6'-H	117.8	C(5)	201.7	C(3)
			128.8	C(4')		
<b><math>\text{DMSO-d}_6</math></b>	1.32	iPr- $\text{CH}_3$	21.2	2iPr- $^{13}\text{CH}_3$	126.7	C(3'); C(5')
	4.76	iPr-CH	70.9	iPr- $^{13}\text{CH}$	126.9	C(2'); C(6')
	6.60	5-H	90.4	C(2)	128.2	C(4)
	6.71	7-H	97.6	C(7)	131.8	C(1')
	7.27	3'-H; 4'-H; 5'-H	112.4	C(5)	166.4	C(6)
	7.39	4-H	113.5	C(3a)	172.2	C(7a)
	7.53	2'-H; 6'-H	124.8	C(4')	192.4	C(3)

57. táblázat. (folytatás)

Oldószer	1H NMR		13C NMR	
	$\delta$ , ppm	<sup>1</sup> H (N <sup>o</sup> )	$\delta$ , ppm	<sup>13</sup> C (N <sup>o</sup> )
<b>32b</b>				
CDCl <sub>3</sub>	1.35, 1.37	iPr-CH <sub>3</sub>	21.7, 21.9	iPr- <sup>13</sup> CH <sub>3</sub>
	4.60	iPr-CH	70.8	iPr- <sup>13</sup> CH
	6.50	5-H	91.1	C(2)
	6.56	7-H	97.1	C(7)
	7.25	3'-H; 4'-H; 5'-H	112.7	C(5)
	7.43	4-H	114.2	C(3a)
	7.61	2'-H; 6'-H	127.2, 127.8	C(2'); C(3'); C(4'); C(5'); C(6')
			128.6	C(4)
			132.0	C(1')
			166.6	C(6)
			173.2	C(7a)
		193.8	C(3)	
Vicinális spin-spin csatolások a <b>32b</b> vegyületben:				
C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> : <sup>3</sup> J <sub>iPrCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> =6.0 Hz; <sup>3</sup> J <sub>5-H,7-H</sub> =1.8 Hz; <sup>3</sup> J <sub>4-H,5-H</sub> =8.9 Hz				
CF <sub>3</sub> COOD: <sup>3</sup> J <sub>iPrCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> =6.2 Hz; <sup>3</sup> J <sub>5-H,7-H</sub> =1.6 Hz; <sup>3</sup> J <sub>4-H,5-H</sub> =8.8 Hz				
DMSO-d <sub>6</sub> : <sup>3</sup> J <sub>iPrCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> =6.3 Hz; <sup>3</sup> J <sub>5-H,7-H</sub> =1.6 Hz; <sup>3</sup> J <sub>4-H,5-H</sub> =8.8 Hz				
CDCl <sub>3</sub> : <sup>3</sup> J <sub>iPrCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> =6.1 Hz; <sup>3</sup> J <sub>5-H,7-H</sub> =2.0 Hz; <sup>3</sup> J <sub>4-H,5-H</sub> =8.5 Hz				
<b>33b</b>				
CDCl <sub>3</sub>	1.32	iPr-CH <sub>3</sub>	21.7, 21.8	iPr- <sup>13</sup> CH <sub>3</sub>
	4.58	iPr-CH	70.8	iPr- <sup>13</sup> CH
	6.46	5-H	90.4	C(2)
	6.52	7-H	97.0	C(7)
	7.20	3'-H; 5'-H	112.6	C(5)
	7.25	4'-H	113.9	C(3a)
	7.45	4-H	125.8	C(4')
	7.49	2'-H; 6'-H	127.0	C(3'); C(5')
			127.8	C(2'); C(6')
			128.6	C(4)
			132.0	C(1')
			166.7	C(6)
			173.6	C(7a)
		194.3	C(3)	
Vicinális spin-spin csatolások a <b>33b</b> vegyületben:				
CDCl <sub>3</sub> : <sup>3</sup> J <sub>iPrCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></sub> =6.1 Hz; <sup>3</sup> J <sub>5-H,7-H</sub> =2.0 Hz; <sup>3</sup> J <sub>4-H,5-H</sub> =8.6 Hz				

58. táblázat. Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a 38 vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR	
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $\text{N}^\circ$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $\text{N}^\circ$ )
$\text{C}_6\text{D}_6$	1.02	iPr-CH <sub>3</sub> , EtCH <sub>3</sub>	14.3	EtCH <sub>3</sub>
	4.04	iPr-CH	21.7	iPr-CH <sub>3</sub>
	4.13	EtCH <sub>2</sub>	30.5	CH <sub>2</sub> -Ph
	4.45	CH <sub>2</sub> -Ph	60.7	EtCH <sub>2</sub>
	6.77	5-H	70.1	iPr-CH
	6.82	7-H	97.3	C(7)
	7.00	4'-H	115.2	C(5)
	7.07	3'-H; 5'-H	121.8	C(3a)
	7.11	4-H	122.5	C(4)
	7.29	2'-H; 6'-H	126.5	C(4')
			128.0	C(3)
			128.8, 128.9	C(2'); C(3'); C(5'); C(6')
			139.7	C(1')
			141.1	C(2)
		156.5	C(6)	
		159.3	C(7a)	
		160.3	C=O	
$^3J_{\text{CH}_2\text{CH}_3}=7.1 \text{ Hz}; ^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=2.2 \text{ Hz}; ^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.7 \text{ Hz}$				
$\text{CDCl}_3$	1.35	iPr-CH <sub>3</sub>	14.3	EtCH <sub>3</sub>
	1.40	EtCH <sub>3</sub>	21.7	iPr-CH <sub>3</sub>
	4.44	CH <sub>2</sub> -Ph, EtCH <sub>2</sub>	30.1	CH <sub>2</sub> -Ph
	4.52	iPr-CH	60.9	EtCH <sub>2</sub>
	6.81	5-H	70.3	iPr-CH
	7.01	7-H	97.3	C(7)
	7.17	4'-H	114.7	C(5)
	7.24	3'-H; 5'-H	121.3	C(3a)
	7.31	4-H; 2'-H; 6'-H	122.0	C(4)
			126.2	C(4')
			128.3, 128.4	C(2'); C(3'); C(5'); C(6')
			128.5	C(3)
			138.9	C(1')
			140.2	C(2)
		155.9	C(6)	
		158.7	C(7a)	
		160.2	C=O	
$^3J_{\text{iPrCH}(\text{CH}_3)_2}=5.3 \text{ Hz}; ^3J_{\text{CH}_2\text{CH}_3}=7.1 \text{ Hz}; ^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=2.2 \text{ Hz}; ^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.7 \text{ Hz}$				

**59. táblázat.** Az  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR jelek hozzárendelése a **40** klórszármazékban

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		$^{13}\text{C}$ NMR	
	$\delta$ , ppm	$^1\text{H}$ ( $N^a$ )	$\delta$ , ppm	$^{13}\text{C}$ ( $N^a$ )
$\text{CDCl}_3$	3.83	$\text{OCH}_3$	55.4	$\text{OCH}_3$
	3.86	$\text{OCH}_3$	55.5	$\text{OCH}_3$
	6.38	7-H	65.4	C(1)
	6.52	5-H	98.2	C(7)
	6.58	$\text{CH-Ph}$	105.8	C(5)
	7.30	3',4',5'-H	118.6	C(3)
	7.41	2',6'-H	128.5	C(4')
	7.84	4-H	128.6, 128.7	C(2',3',5',6')
			134.0	C(4)
			136.8	C(1')
			160.0, 165.0	C(6,8)
		191.6	C=O	

$^3J_{5\text{-H},7\text{-H}}=2.2$  Hz;  $^3J_{4\text{-H},5\text{-H}}=8.8$  Hz

**60. táblázat.** Az  $^1\text{H}$  NMR jelek hozzárendelése a **41** vegyületben

Oldószer	$^1\text{H}$ NMR		
	$\delta$ , ppm	multiplicitás	$^1\text{H}$ ( $N^a$ )
$\text{CDCl}_3$	1.32	t	$\text{CH}_2\text{CH}_3$
	4.32	q	$\text{CH}_2\text{CH}_3$

$^3J_{\text{CH}_2\text{CH}_3}=7.2$  Hz

## 5. Kísérleti rész

### 5.1. Alkalmazott NMR módszerek

Az NMR spektrumokat BRUKER WP 200 SY és BRUKER DRX-400 impulzus Fourier-spektrométereken regisztráltuk, amelyeknek a  $^1\text{H}$  frekvenciája – 200, 400 MHz és a  $^{13}\text{C}$  – 50, 100 MHz.

A proton spektrumokat a TMS-re (TetraMetilSzilán), a szén-13 spektrumokat pedig az alkalmazott szerves oldószer jelére vonatkoztattuk (pl.  $\text{CDCl}_3$ :  $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77.0$  ppm,  $\text{DMSO-d}_6$ :  $\delta_{\text{DMSO}} = 39.8$  ppm, stb.). A megfelelő oldószer kiválasztását az  $^1\text{H}$  NMR spektrum jeleinek szeparációja határozta meg.

A hármas fejezetben és a negyedik fejezet 4.3. alfejezetében szereplő molekulák szerkezet illetve térszerkezet felderítésére különböző 1D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, szelektív INEPT, szelektív gradiens TOCSY, spin-rács ( $T_1$ ) relaxáció mérése) és 2D (HMQC, HMBC, COSY, fázisérzékeny NOESY és TOCSY) NMR technikákat alkalmaztunk. Az említett NMR méréseket BRUKER DRX-400 NMR készüléken a standard BRUKER programcsomag segítségével végeztük el. Kivételt csak a szelektív gradiens TOCSY képezte, a kísérlet (impulzusszekvencia) végrehajtása Dr. E. Kövér Katalin munkájának köszönhető. Az NMR kísérletekhez 5 mm-es inverz multinukleáris és duál NMR mérőfejeket egyaránt használtuk. Az inverz mérőfej alkalmazása során a  $90^\circ$ -os  $^1\text{H}$  impulzushossz  $9.8 \mu\text{s}$  (PL = 0 db),  $^{13}\text{C}$  impulzushossz  $14.9 \mu\text{s}$  (PL = -3 db), míg a duál mérőfej esetén a  $90^\circ$ -os  $^1\text{H}$  impulzushossz  $18.7 \mu\text{s}$  (PL = 0 db),  $^{13}\text{C}$  impulzushossz  $11.6 \mu\text{s}$  (PL = 0) volt.

A dolgozatom negyedik fejezet 4.2. alfejezetében szereplő molekulák szerkezet illetve térszerkezet felderítését  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ( $^1\text{H}$ -csatolással és  $^1\text{H}$ -lecsatolt),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE,  $^{13}\text{C}$   $T_1$  idők mérésével és 2D  $J$ - modulált spektroszkópia alkalmazásával a BRUKER WP 200 SY NMR spektrométeren végeztem.

Az  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE mérések során a kiválasztott multiplettet általában 10 s-ig történő besugárzással telítettük és az NOE faktorokat, az úgynevezett “*off rezonancia*” FID (Free Induction Decay) kivonása után határoztuk meg (FID differencia módszer). A százalékos értékeket a megfelelő jelek integrálásával határoztuk meg a besugárzott jel intenzitásra vonatkoztatva. A mintákat nem oxigénmentesítettük.

$^{13}\text{C}$  NMR spektrumokat 10 mm-es mintákon mértük  $J$ -echo módszerrel. A  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  csatolt spektrumokat általában szintén 10 mm-es mintákon mértük (a csekély jel/zaj viszony miatt) kapuzott lecsatolással. A heteronukleáris  $^1J_{\text{C,H}}$  spin-spin csatolási állandókat  $\pm 0.5$  Hz pontossággal határoztuk meg. A közönséges  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumokban a jel/zaj viszonyt transzfarmáció előtt 3 Hz exponenciális szűréssel javítottuk.

A  $^{13}\text{C}$   $T_1$  időket a mágnesezettség invertálási technikával határoztuk meg. Mindegyik méréshez az alábbi  $\tau$  várokozási időket (VD-listát) használtuk: 0.0010 s; 0.1000 s; 0.3000 s; 1.0000 s; 2.0000 s; 5.0000 s; 10.0000 s; 20.0000 s. A szekvenciák ismétlése előtt 20 s várokozási időt iktattuk be. A  $T_1$  értékek kiszámításához a BRUKER DISNMR/P programcsomag  $T_1$  rutinját használtuk.

A szelektív 2D  $J$  méréseket a 2-H proton rezonancia jelén a lecsatoló egység segítségével adott szelektív impulzusokkal hajtottuk végre.  $t_1$  inkrementumok száma 16 volt, a spektrális ablak az  $F_1$  dimenzióban 8 Hz, a FID adatpontok száma 4K. Az  $F_1$  dimenzióban egyszeres zérustöltés után az  $F_2$  illetve  $F_1$   $2\pi/3$  illetve  $2\pi/6$  radiánnal fázistolt

súlyfüggvényekkel történt multiplikációja után elvégeztük 2D Fourier-transzformációt. A transzformált spektrumból nyert  $^3J_{C,H}$  csatolási állandókat  $F_1$ -el párhuzamos metszetekből határoztuk meg.

## 5.2. *A vizsgált minták oxigénmentesítése*

Az irodalomból ismert “freeze-pump-thaw” oxigénmentesítési eljárás<sup>88</sup> nehézségei miatt egy másik módszert választottuk, ami várhatóan legalább annyira hatékony, de a megvalósítása egyszerűbb. Az 5 mm-es NMR csőben elhelyezett oldatba egy kapillárison keresztül inert argon gázt vezettük úgy, hogy közben az NMR csövet ultrahangos fürdőbe helyeztük el. Így az argon bevezetésével a mintában oldott oxigén eltávozott. Az oxigénmentesítés után az oldatot szárazjeges acetonban (-70 - -80°C) lefagyasztottuk és az NMR-csövet leforrasztottuk.

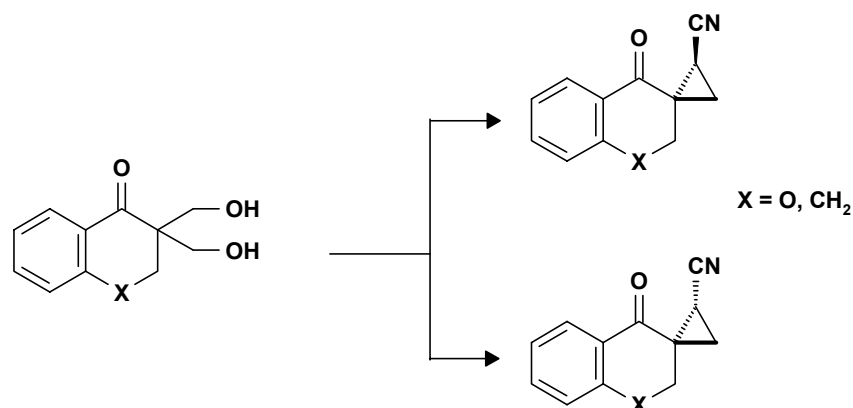
## 5.3. *3-Subsztituált flavanon származékok előállítása*

A 29. ábrán látható bisz-hidroximetilén (7) származékot már ismert módszer alapján<sup>78</sup> állítottuk elő. A kiindulási flavanont (6) formaldehiddel reagáltattuk nátrium-karbonát jelenlétében szobahőmérsékleten két napig. A reakció előrehaladását VRK-val, toluol-etilacetát (4:1) futtatószerben ellenőriztük. A reakcióelegy feldolgozása után sárga olajat kaptuk. A vékonyréteg kromatogramon a kiindulási anyagon és a terméken kívül egy újabb folt is megjelent. A termék egy ciklusos éternek (8) bizonyult, amely sósav hatására bisz-hidroximetilén származékká (7) bomlik el. A 7 terméket 112.7%-os kitermeléssel (15 g) kaptuk, amely kis mennyiségű formaldehidet tartalmazott.

Alkoholok nukleofil szubsztitúciós reakcióival számos termék nyerhető. A hidroxilcsoport azonban rossz távozó csoport, ezért a diolból *bisz*-tozil-észtert (9) készítettük, amely könnyen átalakítható más származékká. A 9 *bisz*-tozil-észtert Tipson módszerével<sup>89</sup> állítottuk elő, úgy hogy a diol (7) és piridin-kloroformos oldatát 0-5°C-on egy napig reagáltattuk tozil-kloriddal. A 9 terméket 26.3%-os (8.2 g) kitermeléssel kaptuk (Op.:150-153°C).

A *bisz*-tozil-észter (9) különböző nukleofilekkel<sup>78</sup> ( $N_3^-$ ,  $I^-$ ) lejátszódó reakcióiban általában monoszubsztituált termékeket képez. A cianid nukleofilek reakcióit részletesen eddig még nem vizsgálták. A 3,3-[*bisz*-(toziloxi)-metilén]-flavanont (9) kálium-cianiddal absz. DMSO-ban hat órán keresztül reagáltattuk a forró vízfürdőn. A reakciót VRK-val követtük (toluol-etilacetát(4:1)). Miután a kiindulási anyag elfogyott, az elegyet jeges vízre öntöttük és a szilárd csapadékot szűrtük. A VRK lapon egymástól kis  $R_f$  érték különbséggel három folt jelent meg. A nyers termék  $^1H$  NMR spektruma nem felelt meg sem a monoszubsztituált, sem a diszubsztituált származéknak. A spektrumban a 2-H hidrogén jelen kívül 1.2 és 2.3 ppm között megjelent három darab, egy-egy proton intenzitású dupla dublett jel. Ennek alapján egy szubsztituált ciklopropilgyűrűt tartalmazó származékok képződését tételeztük fel, amelyek feltehetően csak a nitrilcsoport helyzetében különböznek egymástól. Ez arra utalt, hogy a *mono*- szubsztitúciót egy belső eliminációs reakció követi és így képződnek a 11 sztereoisomerek. Továbbiakban azt az izomert, amelyiknek a legelső VRK-folt felel meg, **A**(lső) betűvel, amelyiknek a középső, **K**(özépső) betűvel és amelyiknek a felső, **F**(első) betűvel jelöltük.

Hasonló körülmények között 3,3-[bisz(toziloxi)-metilén] származékokból az alábbi két sztereoizomer képződését írták le<sup>90</sup> (47. ábra):



47. ábra

Az ábrán látható reakció termékei racemátok, azonban csak az egyik enantiomert tüntettem fel

A három diasztereomert tartalmazó elegyből többszöri frakcionált átkristályosítással és oszlopkromatográfiás elválasztás eredményeképpen sikerült a tiszta izomereket illetve ezek keverékeit a következő mennyiségekben előállítanunk:

<b>11A</b>	m=1.29 g (16.9%)	Op.: 182-184°C
<b>11K</b>	m=0.64 g (8.4%)	Op.: 195-197°C
<b>11F</b>	m=1.34 g (17.6%)	Op.: 168-169°C
<b>11F+11K</b>	m=0.32 g	
<b>11A+11K</b>	m=0.22 g	

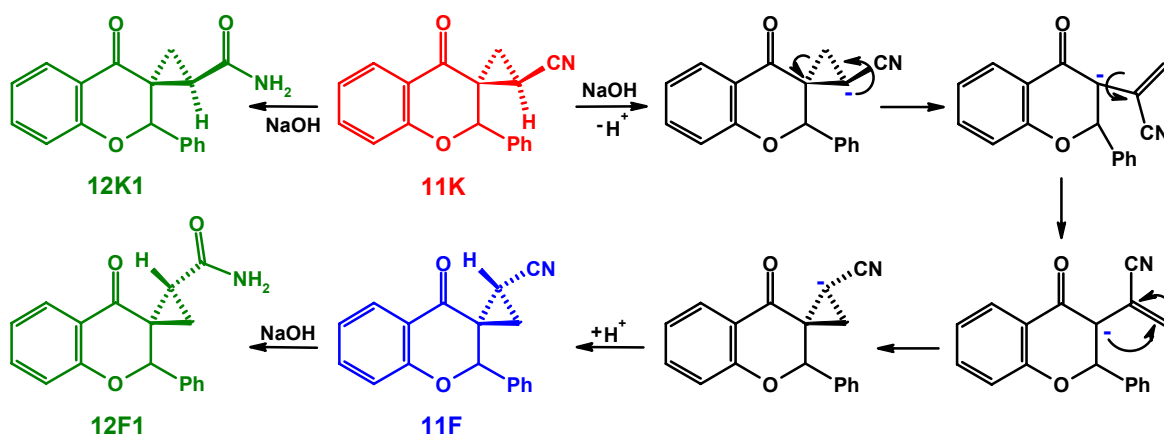
A keletkezett nitrileket **11(A,K,F)**, alkoholban oldva, 5%-os NaOH jelenlétében (3 mol/ekv feleslegben) 35 órán át forró vízfürdön hidrolizáltuk és a reakciót VRK-val követtük. A reakció lejátszódása után az alkoholt lepároltuk, a maradékhoz vizet adtuk. Fehér savamid **12(A1,K1,F1)** kristályok váltak ki, amelyeket szűrtünk és azután az anyalúgokhoz egy kis mennyiségű sósavat (1:1) adtunk. Az anyalúgokból szintén fehér kristályok váltak ki, amelyek a megfelelő savaknak **13(A2,K2,F2)** feleltek meg (**13A2**: m=0.32 g (60.4%), Op.:188-191°C; **13K2**: m=0.26 g (49.1%), Op.:190-191°C; **13F2**: m=0.22 g (41.5%), Op.:158-165°C (174°C-nál olvad össze)).

A lúgos hidrolízis során nyert savamidok **12(A1,K1,F1)** olvadáspont értékei nem voltak egyértelműek. Az igen alacsony hozamú **12A1** izomer (**12A1**: m=0.01 g (1.9%)) olvadáspontja majdnem azonos volt a **12F1** olvadáspontjával (**12A1**: Op.:228-233°C; **12F1**: Op.:232-234°C). Mivel a **12A1** izomer <sup>1</sup>H NMR spektruma azonos volt a **12F1** savamidéval és a három diasztereomer közül a **12A1** hidrolizált el leggyorsabban savvá, arra a következtetésre jutottunk, hogy a **12A1** savamidot a fentebb említett körülmények között nem lehet előállítani és hogy a kiindulási **11A** nitril származék kis mennyiségben **11F** izomert tartalmazott. Mivel a **12F1** savamid savvá való átalakulása lassú volt így érthetővé vált a kis hozam és a két **12(A1,F1)** anyag <sup>1</sup>H NMR spektrumainak azonossága.

A **12K1** esetén szintén nehézségekbe ütköztünk, mivel a nyert anyag éles olvadáspontja ellenére nem volt egységes (**12K1**: Op.: 108-109°C), jóllehet a hidrolízist azonos

körülmények között végeztük. A többszöri oszlopkromatográfias szétválasztás után sem sikerült kinyerni tiszta egységes anyagot. Így lúgos hidrolízis során a három izomer közül csak a **12F1** savamidot (**12F1**: m=0.16 g (30.3%), Op.:232-234°C) tudtuk előállítani.

A savamidok szintézisét más módszer segítségével végeztük<sup>91</sup>, a magasabb hozamot remélve. A kiindulási nitrileket 30%-os hidrogénperoxiddal, DMSO és kálium karbonát jelenlétében (0.5-3 óra) reagáltattuk és a reakció idő elteltével **12(A1,F1)** izomereket nyertük (**12A1**: m=0.07 g (63.4%), Op.:206-207°C; **12F1**: m=0.05 g (46.2%), Op.:233-234°C). E reakcióban sem sikerült tisztán előállítanunk a **12K1** diasztereomert (**12K1**: (két anyag keveréke: **12F1**+**12K1**): m=0.03 g, Op.:170°C). A termék <sup>1</sup>H NMR spektrumában két közel 1:1 intenzitás arányú jelsorozatot tapasztaltuk. Összehasonlítva a **12K1** molekula <sup>1</sup>H NMR spektrumát a **12A1** és **12F1** diasztereomerek <sup>1</sup>H NMR spektrumaival azt vettük észre, hogy a **12K1** molekula <sup>1</sup>H NMR spektrumában az egyik jelsorozat egyértelműen a **12F1** molekulának felel meg. Ez azt jelenti, hogy a lúgos hidrolízis során egy átrendeződéses reakció megy végbe, miszerint a ciklopropilgyűrű felnyílását és az egyes kötés körüli rotációt, újabb gyűrűzárás követi. A feltételezett reakciómechanizmust a következő séma mutatja be:



Séma I.

A karbonsavak metilésztereit **14(A3,K3,F3)** diazo-metán segítségével állítottuk elő. Savas közegben a diazo-metán jó alkilező szer, így az alábbi anyagokat nyertük:

<b>14A3</b>	m=0.06 g (64.9%)	Op.: 104-105°C
<b>14K3</b>	m=0.07 g (75.7%)	Op.: 110-111°C
<b>14F3</b>	m=0.04 g (43.2%)	Op.: 128-129°C

A 29. ábrán látható reakciósor utolsó lépese a spiro-ciklopropil-3-(2H)-piridazon származék előállítása volt, amelyet a **13(A2,K2,F2)** savakból kiindulva hidrazin-hidrát segítségével végeztünk el. Az <sup>1</sup>H NMR spektrumok alapján kiderült, hogy a gyűrűzárás mindhárom izomer esetében, alábbi kitermelésekkel megy végbe (további diszkussziót lásd 4.1. fejezetben):

<b>15A4</b>	m=0.07 g (80.4%)	Op.: 294-299°C
<b>15K4</b>	m=0.08 g (91.8%)	Op.: 210-212°C
<b>15F4</b>	m=0.01 g (11.5%)	Op.: 308-311°C

## 6. Összefoglalás

Az értekezésemet egy kutatócsoport tagjaként végzett munkára alapoztam. “A prolil-endopeptidáz (PEP) inhibitorok szerkezetvizsgálata NMR módszerekkel” és “A 3(2*H*)-benzofuranon származékok vizsgálata NMR módszerekkel” című fejezetekben szerepelő szerves molekulák előállítását a Chinoin Gyógyszer- és Vegyészeti Termékek Gyára Rt.-nél Dr. Bátori Sándor, Dr. Horváth Ágnes és Dr. Kánai Károly irányításával végezték. A dolgozatom “3-Szubsztituált flavanon származékok szerkezet és térszerkezet vizsgálata NMR módszerek segítségével” című fejezetben szerepelő szerves molekulákat a debreceni Kossuth Lajos Tudományegyetem Szerves Kémiai Tanszékén Dr. Litkei György és Dr. Antus Sándor irányításával jómagam állítottam elő. Ezekbe a témákba bekapcsolódva célkitűzésem az volt, hogy az NMR vizsgálatokra általam szintetizált és a kutatócsoport tagjai által átadott mintákról a rendelkezésemre álló technikai feltételek maximális kihasználásával ne csak a szerves vegyész számára szükséges (sokszor csak szerkezeti igen-nem) információkat szerezzem meg, hanem minél több spektrális adat meghatározásán keresztül a vegyületek relatív konfigurációjára és konformációjára vonatkozóan is adatokat szolgáltatassak. Ezek az eredmények, illetve értelmezésük ugyanakkor bővítették a reakciók mechanizmusára vonatkozó ismereteinket is.

A prolil-endopeptidáz inhibitorok kutatása során kettős célt állítottunk magunk elé: - a szubsztrát-inhibitor kölcsönhatás felderítése céljából, a már ismert, PEP inhibitor tulajdonságokkal bíró SUAM-1221 jelű molekula szerkezetének és oldatbeli konformációjának meghatározását, valamint ezzel párhuzamosan - az eddig ismert inhibitor hatással rendelkező molekuláknál hatékonyabb, új molekulák kutatását és fejlesztését.

Szubsztituált 4 $\alpha$ , $\beta$ -hidroxi-prolinokat dietilamino-szulfurtrifluoriddal (DAST) reagáltatva, várhatóan PEP inhibitor hatással rendelkező 4 $\alpha$ , $\beta$ -fluoro-prolin származékokat kívántuk előállítani. Az új vegyületek előállításán kívül, az említett reakció mechanizmusának tisztázását is megcéloltuk.

A munkánk során a következő eredményeket értünk el:

1. Elvégeztük a SUAM-1221 jelű molekula azonosítását a különböző oldószerekben felvett  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D NOESY, 2D TOCSY, továbbá 2D HMBC és 2D HMQC NMR spektrumok alapján.

Az oldatfázisban kialakuló *transz* és *cisz* amid rotamerek jelhozzárendelését döntően a NOESY és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok segítségével oldottunk meg. Megfigyeltünk egy jellegzetes érdekességet is, miszerint az amid rotamereket számos esetben a prolil  $\delta$  (C(5)) protonjai közötti  $^2J$  csatolási állandó értéke alapján is meg lehet különböztetni. Az utóbbi módszer segítségével azonosítottunk a pirrolidil 2'-H<sub>2</sub> és 5'-H<sub>2</sub> protonpárokat. Tudomásunk szerint, peptideknél a prolin konformerek azonosítására ezt a módszert még nem használták.

Az oldószerhatást a *transz/cisz* arányra vizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy az apoláros oldószerektől poláros oldószerek felé haladva a *transz/cisz* arány jelentősen változik a *cisz* izomer javára. Megállapítottuk, hogy a mért és a molekulamechanikai számításokkal kapott izomer arányok jelentősen eltérnek, míg a mért és félempirikus kvantumkémiai módszerrel nyert eredmények elfogadható egyezést adnak.

Mivel a proлил- és a pirrolidilgyűrű amid csoportjainak gátolt rotációja az NMR időskálán lassú folyamat, meghatároztuk a *transz-cisz* reakció átalakulási sebességi állandóit és *transz* illetve a *cisz* rotamerek átlagélettartamát. Megfigyeltünk, hogy a polárosabb oldószerek felé haladva a *transz-cisz* átalakulás sebessége egyre lassúbb lesz.

A proлилgyűrű térszerkezetét vizsgálva azt találtuk, hogy a molekulamechanikai számolásokból kapott konformer készletben az „északi” (N), míg az oldatfázisban a „déli” (S) konformer család dominál.

A mért NOE térfigati integrál értékek és az atom távolságokból számolt elméleti NOE intenzitások alapján meghatároztuk a két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzetét. A mért és számolt NOE adatok összhangban voltak egymással, tehát a két öttagú gyűrű egymáshoz viszonyított helyzete oldatban megfelelt a számításokból kapott konformációknak.

Az U-alakú/lineáris konformerarány meghatározását a Haigh-Mallion egyenlet David A. Case által parametrizált formájának alkalmazásával próbáltunk megoldani. Azt találtuk, hogy a módszer adott esetben alkalmatlan a számolt konformerekben az aromás gyűrűáram okozta kémiai eltolódás változásának kvantitatív értékelésére. A mért és számított adatok alapján feltételeztük, hogy az oldatban az U-alakú konformerek részaránya feltehetően kisebb, mint gáz fázisban.

**2.** Elvégeztük a  $4\alpha,\beta$ -hidroxi- illetve  $4\alpha,\beta$ -fluoro-prolin származékok azonosítását különböző oldószerekben felvett  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D NOESY, 1D TOCSY (gradiens változata), 2D TOCSY, továbbá 2D HMBC és 2D HMQC NMR spektrumok alapján.

Az oldatfázisban kialakuló *transz* és *cisz* amid rotamerek jelhozrendelését a NOESY  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok segítségével határoztuk meg. Megfigyeltük, hogy a négyes helyzetben elektronegatív szubsztituens tartalmazó prolin származékokban az 5- $\text{H}_2$  protonok geminális csatolási állandója alapján nem lehet a *cisz* és a *transz* rotamereket megkülönböztetni. A vizsgált négy vegyületben az NOE adatok és a csatolási állandók igazolták a hidroxil és a fluor csoportok relatív térállását.

A 4-fluoro-prolin származékoknál a  $^{19}\text{F}$ - $^1\text{H}$  spin-spin csatolások meghatározására alkalmazott 1D gradiens TOCSY módszer révén egy érdekességre figyeltünk föl, miszerint a proton frekvencián szelektíven besugározva a *transz* rotamer 4-H proton fluor csatolás szerinti dublett jelének egyik komponensét, egy olyan spektrumot kaptunk, amelyben a jelek a proton spektrum multipllettjeinek csak az egyik száránál jelentek meg. Az így elvégzett 1D gradiens TOCSY kísérlet analóg a 2D HETLOC kísérlettel, illetve annak egydimenziós változata. A fentebb említett eljárás hasznos lehet a spin-spin csatolások meghatározásakor azokban az esetekben, amikor az 1D  $^1\text{H}$  NMR spektrum jelei jelentősen átfednek egymással; egy másik előny a kísérlet rövidege.

A  $4\alpha$ -hidroxi- illetve  $4\alpha$ -fluoro-prolin származék esetében, összhangban az irodalmi adatokkal, oldatban a proлилgyűrű N konformációja a domináns térszerkezet, míg a  $4\beta$ -hidroxi- illetve  $4\beta$ -fluoro-prolin származéknál az S konformáció dominál. Így oldatban a proлилgyűrű konformációja erősen függ a négyes helyzetben lévő szubsztituens térhelyzetétől, míg az amid gátolt rotáció következtében kialakult *transz* illetve *cisz* rotamerek egymásba való átalakulása lényegesen nem befolyásolja a gyűrű konformációját.

Megfigyeltük, hogy a proлилgyűrű 4-es helyzetű elektronegatív szubsztituensének térállása hatással van a *transz-cisz* átalakulás sebességére: a  $4\alpha$ -szubsztituált származékokban a *transz-cisz* átalakulás lassúbb, mint a  $4\beta$ -szubsztituált származékok esetében, feltehetően szterikus effektus miatt. Összehasonlítva a **3**, **4** vegyületek *transz-cisz* átalakulás sebességi állandójának értékét a SUAM-1221 (**1**) és a **2** molekula *transz-cisz* átalakulás sebességi állandóival látható, hogy az előbbi molekulánál a *transz-cisz* izomerek egymásba alakulása

kisebbségi aktiválási energiáján megy keresztül. Ezt talán azzal lehetne magyarázni, hogy az amid karbonil melletti elektronegatív oxigén atom lecsökkenti az amid C-N kettős kötés jellegét.

Ezek az eredmények igazolják, hogy az N-tercier-butoxikarbonil-4 $\alpha$ - illetve N-tercier-butoxikarbonil-4 $\beta$ -hidroxi-prolinmetilészter és a DAST közötti reakció inverzióval megy végbe, más szerkezetű vegyületek irodalomban leírt viselkedéséhez hasonlóan.

**3.** A tioprolin származékból kiindulva, várhatóan PEP inhibitor tulajdonságokkal rendelkező 4-szulfoxidot kívántunk előállítani. Az  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  és 2D NOESY NMR spektrumokban négy jelsorozatot detektáltunk, amelyeket az  $\alpha$ - és  $\beta$ - szulfoxid diasztereomerekhez, illetve azok *transz* és *cisz* amid rotamerjeihez rendeltünk hozzá.

A szulfoxid diasztereomereket ASIS módszer alkalmazásával különböztettük meg. A két szulfoxid izomer egyértelmű hozzárendelése és konfigurációjának megállapítása után, az oxidációs reakció körülményeit változtatva, HPLC segítségével meghatároztuk a *transz/cisz* (major/minor) izomerek arányát. Vizsgálataink során kiderült, hogy az oxidációs reakció sztereoselektivitása erősen függ az alkalmazott reakció körülményeitől. MCPBA reagenssel gyakorlatilag csak a *transz*, illetve  $\alpha$ -szulfoxid izomer keletkezik (>99%), miközben a  $\text{NaIO}_4$  a *transz* és a *cisz* izomerek keverékéhez vezet. Megfigyeltük, hogy a reakció hőmérsékletének növelése a sztereoselektivitás csökkenéséhez vezetett.

**4.** Vizsgáltuk a 3,3-*bisz*-(toziloxi-metilén)-flavanon reakcióját cianid nukleofil jelenlétében. Megállapítottuk, hogy egyéb nukleofilekkel ellentétben, nem egyszerű  $S_N$  reakció játszódik le, hanem  $S_Ni$  reakció eredményeként három CN-szubsztituált 3,3-spiro-ciklopropán-flavanon sztereoizomer keletkezik. Módszert dolgoztunk ki a sztereoizomer nitrilek elválasztására és hidrolízissel a megfelelő savamidok illetve karbonsavak előállítására. A karbonsavakból diazo-metánnal sztereoizomer metilésztereket nyertünk. A karbonsavakból hidrazin-hidráttal potenciális farmakológiai hatással rendelkező piridazinon-spiro-ciklopropán-flavanon származékokat állítottuk elő. Különböző NMR spektroszkópiai módszerek segítségével meghatároztuk a keletkező sztereoizomerek szerkezetét. A szerkezetek bizonyítására egydimenziós  $^1\text{H}$  és  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumokat készítettünk, amelyekből kémiai eltolódásokat és spin-spin csatolási állandókat határoztunk meg. A térszerkezet meghatározásához NOE és kétdimenziós 2DJ-spektrumokat vettük fel.  $^1\text{H}$  csatolt  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumok segítségével az  $^1J_{C,H}$  spin-spin csatolási állandókat határoztuk meg.  $^{13}\text{C}$  spin-rács relaxációs idő méréseket is elvégeztünk. Tanulmányoztuk az egyes NMR paraméterek és a vegyületek szerkezete és térszerkezete közötti összefüggéseket.

Végezetül, az NMR mérések segítségével meghatároztuk három 3,3-spiro-ciklopropán-flavanon sztereoizomer szerkezetét és térszerkezetét.

**5.** A csonttritkulásra ható új anyagok kutatása során benzofuranon származékokat kívántunk előállítani az irodalomban leírtak alapján. Megismételtük és továbbfejlesztettük az irodalmi módszereket, valamint javaslatot tettünk az egyik reakció mechanizmusára vonatkozóan. A reakciókban, a közleményekben szereplő termékek mellett, egyéb anyagok is keletkeztek, amelyeket izoláltunk és  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, 1D gradiens TOCSY, 1D szelektív INEPT, 2D HMBC, 2D HMQC és 2D NOESY NMR, valamint IR és MS módszerek segítségével meghatároztuk a szerkezetüket, illetve térszerkezetüket. Az eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a 3(2*H*)-benzofuranon és származékai könnyen oxidálódnak és fő termékként a *mezo* és a *racém* dimerekhez vezetnek.

## Summary

The subject of this thesis is the structural study of biologically active molecules, proline derivatives, flavonones and benzofuranones.

The organic molecules as presented in chapters “Investigations on the prolyl-endopeptidase (PEP) inhibitors by NMR techniques” and “Analysis of 3(2*H*)-benzofuranone derivatives with NMR methods” were prepared in Chinoin Pharmaceutical and Chemical Works Ltd. Organic molecules referred to in chapter “Configuration and structure elucidation of 3-substituted flavanone derivatives with NMR methods” were produced by myself at the Department of Organic Chemistry, Kossuth Lajos University, Debrecen.

The main results of this dissertation can be summarized as follow.

1. We have studied the SUAM-1221 molecule by  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D NOESY, 2D TOCSY and also 2D HMBC and 2D HMQC NMR spectra measured in different solvents.

We have executed the assignments of *trans* and *cis* amide rotamers in solution mostly with the help of NOESY and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. We have also detected an interesting phenomenon, namely that, in several cases, it is possible to differentiate between the amide rotamers on the basis of the  $^2J$  coupling constant between the prolyl  $\delta$  protons. Through the assistance of the latter method have we identified the pyrrolidinyl 2'- $\text{H}_2$  and 5'- $\text{H}_2$  proton pairs. As far as we know this method has not yet been used for the identification of the proline conformers in peptides.

Investigating the solvent effect on the *trans/cis* ratio we have established that in polar solvents the *cis* isomer is favoured. The isomer ratios measured and obtained through molecular mechanics calculations differ considerably while results measured and obtained through a semi-empirical quantum chemical method show acceptable agreement with expected.

As the hindered rotation of the amide units of the prolyl- and pyrrolidinyl rings is a slow process on the NMR time scale, we have determined the rate constants of the *trans-cis* isomerization as well as the average lifetimes of the *trans* and *cis* rotamers. We have observed that in more polar solvents the rate of the *trans-cis* rotation is getting slower.

Analyzing the conformation of the prolyl ring we have found that in the conformer set obtained through molecule mechanics calculations the “northern” (N) while in the solution phase the “southern” (S) conformer family dominates.

We have determined the relative orientation of the two five membered rings on the basis of the comparison of measured and calculated NOE integral values. The structure obtained in this way was in agreement with that obtained from molecular mechanics calculations.

We have attempted to determine the conformation of the aliphatic chain of SUAM-1221 (U-shaped/linear conformer ratio) via the application of the Haigh-Mallion equation as parameterized by David A. Case. This method proved to be inappropriate for quantitative evaluation but, on the basis of the measured and calculated data we assumed that the ratio of the U-shaped conformers in the solution was smaller than that calculated in vacuo.

2. We have accomplished the identification of the 4 $\alpha,\beta$ -hydroxy- and that of the 4 $\alpha,\beta$ -fluoroproline derivatives on the basis of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D NOESY, 1D gradient TOCSY, 2D TOCSY, 2D HMBC and 2D HMQC NMR spectra measured in different solvents.

We have assigned the *trans* and *cis* rotamers in solution with the help of NOESY and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. We have observed that in proline derivatives carrying an electronegative substituent in position four the *cis* and *trans* rotamers cannot be differentiated on the basis of the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  geminal coupling constant of the 5- $\text{H}_2$  protons. In all four compounds the NOE data and the coupling constants have confirmed the relative position of the hydroxyl and fluorine substituents.

During these studies we could establish that the 1D gradient TOCSY experiment is analogous to the 2D HETLOC experiment; it is in fact, a one-dimensional version of the former. The method can be useful when determining the spin-spin couplings in cases when the signals of the 1D  $^1\text{H}$  NMR spectrum are overlapping each other.

In accordance with literature data, in case of the 4 $\alpha$ -hydroxy-, and the 4 $\alpha$ -fluoroproline derivatives, the dominant conformation of the prolyl ring in solution is the N, while for the 4 $\beta$ -hydroxy-, and 4 $\beta$ -fluoroproline derivatives the S conformation is the dominant one. Therefore, in solution, the conformation of the prolyl ring strongly depends on the position of the substituent in position four while the *trans* and *cis* rotamers of the same isomer have similar ring conformations.

We have observed that the electronegative substituent in position four of the prolyl ring affects the rate of the *trans-cis* isomerisation; this is slower in the 4 $\alpha$ -substituted derivatives than in 4 $\beta$ -substituted compounds, supposedly because of a steric effect. Comparison of the *trans-cis* rate constant of the 4 $\alpha$ - and 4 $\beta$ -isomers with that of the SUAM-1221 indicates a smaller activation energy barrier for the former. This can be explained by the fact that the electronegative oxygen atom next to the amide carbonyl reduces the C-N double bond nature of the amide.

Our results provided explanation for the reaction between the N-tert-butoxycarbonyl-4 $\alpha$ - and the N-tert-butoxycarbonyl-4 $\beta$ -hydroxyproline methylester and the DAST taking place with inversion similarly to examples described in the literature.

**3.** Starting from a thioproline derivative 4-sulfoxide derivatives were obtained. We detected four sets of signals in their  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and 2D NOESY NMR spectra, which were assigned to the  $\alpha$  and  $\beta$  sulfoxide diastereomers, and to their *trans* and *cis* amide rotamers.

We differentiated between the sulfoxide diastereomers with the application of ASIS method. After definite assignments of the two sulfoxide isomers and the establishment of their configurations we determined the ratio of *trans/cis* (major/minor) isomers with the help of HPLC. We have observed that the stereoselectivity of the oxidation reaction remarkably depends on the reaction conditions. With MCPBA reagent practically only the *trans* or the  $\alpha$ -sulfoxide isomer is produced (>99%), while  $\text{NaIO}_4$  results in a mixture of *trans* and *cis* isomers. We have observed that an increase of the reaction temperature led to a decrease of stereoselectivity.

**4.** We analyzed the reaction of 3,3-bis-(tosyloxymethylene)-flavanone in the presence of cyanide nucleophile. We have established that, as opposed to other nucleophiles, here not a simple  $S_N$  reaction takes place but, as a result of a  $S_Ni$  reaction, three CN-substituted 3,3-spiro-cyclopropane-flavanone stereoisomers are formed. We have elaborated methods for separating the stereoisomeric nitriles and for producing the appropriate amides and carboxylic acids through hydrolysis. From the acids we obtained pyridazinon-spiro-cyclopropane-flavanone derivatives through reaction with hydrazine hydrate. We established the configuration of the 3,3 spiro-cyclopropane-flavanone stereoisomers by applying different NMR techniques such as 1D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOE and two-dimensional 2DJ NMR spectra. We determined the  $^1J_{C,H}$  spin-spin coupling constants from proton coupled  $^{13}\text{C}$  NMR spectra.

5. During our research on new materials affecting osteoporosis, we have improved literature methods for the production of a benzofuranone derivative and made a proposal for the mechanism of one of the reactions. Besides the products reported, further molecules have been isolated and, with the help of  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, 1D gradient TOCSY, 1D selective INEPT, 2D HMBC, 2D HMQC, 2D NOESY NMR, IR and MS methods, we have unambiguously elucidated their structures. Based on these results we have concluded that the 3(2*H*)-benzofuranone and its derivatives get easily oxidized resulting in the formation of *meso* and *racemic* dimers as the main products.

## 7. Irodalomjegyzék

- 
- <sup>1</sup> Károly Kánai, Benjamin Podányi, **Sándor Bokotey**<sup>†</sup>, Felix Hajdu and István Hermecz: “*Stereoselective sulfoxide formation from a thioproline derivative*”, *Tetrahedron Assymetry*-hez beküldve.
- <sup>2</sup> Gy. Litkei, B.P. Khilya, A.B. Turov, L. Szilágyi, **S. Bokotey**, S. Antus: “Sintez spirociklopropankarbonovih kislot iz flavanonov i ih prevrascenie v sootvetstvujuschije piridazinoni”, *Khim. Get. Sojed.*, **5**, 616-623 (1995)
- <sup>3</sup> **Sándor Bokotey**, Mária Kövari-Rádkai, Benjamin Podányi, Imola Ritz, Zsolt Böcskei and Sándor Bátori, “*Studies on synthesis of 3(2H)-benzofuranone derivatives*”, *Synthetic Communications*, közlésre elfogadva (2001)
- <sup>4</sup> D. Neuhaus and M. Williamson: The Nuclear Overhauser Effect In Structural And Conformational Analysis, VCH Publishers Inc., New York, p.31-32 (1989)
- <sup>5</sup> Ch.L. Perrin and T.J. Dwyer, *Chem. Rev.*, **90**, 935-967 (1990)
- <sup>6</sup> C. Altona and M. Sundaralingam, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 8205-8212 (1972)
- <sup>7</sup> D. Cremer and J.A. Pople, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1354 (1975)
- <sup>8</sup> C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. De Leeuw, H.P.M. De Leeuw and C. Altona, *Biopolymers*, **20**, 1211-1245 (1981)
- <sup>9</sup> L.H. Meyer, A. Saika and H.S. Gutowsky, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4567 (1953)
- <sup>10</sup> J.A. Pople, *J. Chem. Phys.* **24**, 1111 (1956)
- <sup>11</sup> H.J. Bernstein, W.G. Schneider and J.A. Pople, *Proc. Roy. Soc. London* **A236**, 515 (1956)
- <sup>12</sup> J.S. Waugh and R.W. Fessenden, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 846 (1957)
- <sup>13</sup> R.H. Sarma and R.J. Mynott, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, p.075 (1972)
- <sup>14</sup> A.J. Jones, *Rev. Pure Appl. Chem.*, **18**, 253 (1968)
- <sup>15</sup> C.C. McDonald and W.D. Phillips, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 6336 (1967)
- <sup>16</sup> C.W. Haigh and R.B. Mallion, *Prog. NMR Spectrosc.*, **13**, 3030-344 (1980)
- <sup>17</sup> D.A. Case, *J. Biomol. NMR*, **6**, 341-346 (1995)
- <sup>18</sup> M. Eberstadt, G. Gemmecker, D.F. Mierke and H. Kessler, *Angew. Chem.Int.*, **34**, 1671-1695 (1995)
- <sup>19</sup> K.L. Williamson, Y.F. Hsu, F.H. Hall, S. Swager and M.S. Coulter: *J.Amer.Chem.Soc.*, **90**, 6717 (1968)
- <sup>20</sup> A.M. Ihrig and S.L. Smith: *J.Amer.Chem.Soc.*, **92**, 759 (1970)
- <sup>21</sup> R.J. Abraham and L. Cavalli: *Mol. Phys.*, **9**, 67, (1965)
- <sup>22</sup> R. Walter, W.H. Simmons & T. Yoshimoto, *Mol. Cell. Biochem.* **30**, 111-127 (1980)
- <sup>23</sup> (a) S. Wilk, *Life Sci.*, **33**, 2149 (1983); (b) R.M. O’Leary, B. O’Connor, *J. Neurochem.*, **65**, 953-963 (1995)
- <sup>24</sup> D. Remnax, B.A. Hemmings, J. Hofsteenge, & S.R. Stone, *Biochemistry* **30**, 2195-2203 (1991)
- <sup>25</sup> N.D. Rawlings, L. Polgár, & A.J. Barrett, *Biochem. J.*, **279**, 907-911 (1991)
- <sup>26</sup> L. Polgár, *Biochem. J.* **283**, 647-648 (1992)
- <sup>27</sup> R. Walter, H. Shlank, J.D. Glass, I.L. Schwartz, T.D. Kerényi, *Science*, **173**, 8279 (1971)
- <sup>28</sup> S. Kalwant, A.G. Porter, *Biochem. J.*, **276**, 237-244 (1991)
- <sup>29</sup> R.M. O’Leary, B. O’Connor, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 277 (1995)
- <sup>30</sup> G. De Nanteuil, B. Portvin, J.Lepagnol, *Drugs of the Future*, **23**, 167-179 (1998)
- <sup>31</sup> V. Fülöp, Zs. Böcskei, L. Polgár, *Cell*, **94**, 161-170 (1998)
- <sup>32</sup> T. Nakajima et. al, *Neurosci. Lett.* **141**, 156-160 (1992)

- 
- <sup>33</sup> Y. Tanaka et. al, *J. Med. Chem.* **37**, 2071-2078 (1994)
- <sup>34</sup> Benjamin Podányi, **Sándor Bokotey**, Károly Kánai, Miklós Fehér, István Hermeecz, “*The investigation of a flexible prolyl-endopeptidase inhibitor in solution by NMR techniques*”, *Magn. Res. Chem.* **37**, 346-352 (1998)
- <sup>35</sup> T. Yoshimoto, K. Kado, F. Matsubara, N. Koriyama, H. Kaneto, D. Tsuru, *J. Pharmacobio-Dyn.* **10**, 730 (1987)
- <sup>36</sup> M. Fehér, K. Kánai, B. Podányi, I. Hermeecz, *Quant. Struct.-Act. Relat.* **16**, 136-141 (1997)
- <sup>37</sup> Zs. Böcskei et. al. to be published
- <sup>38</sup> C.M. Deber, F.A. Bovey, J.P. Carver and E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6191-6198 (1970)
- <sup>39</sup> S. Fischer, R.L. Dunbrack, Jr. and M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 11931-11937 (1994)
- <sup>40</sup> D.Neuhaus and M. Williamson: *The Nuclear Overhauser Effect in Structural And Conformational Analysis*, VCH Publishers Inc., New York, p.136 (1989)
- <sup>41</sup> (a) W.A. Thomas, M.K. Williams, *Chem. Comm.* 994 (1972). (b) D.E. Dorman, F.A.Bovey, *J. Org. Chem.* **38**, 2379 (1973)
- <sup>42</sup> T.A. Crabb, P.J. Chivers, R.F. Newton, *Org. Magn. Reson.*, **5**, 397 (1973)
- <sup>43</sup> (a) E.S. Eberhardt, S.N. Loh, A.P. Hinck and R.T. Raines, *J.Am.Chem.Soc.*, **114**, 5437 (1992); (b) C.K. Larive and D.L. Rabenstein, *J.Am.Chem.Soc.*, **115**, 2833 (1993); (c) F. Thuncke, A. Kálmán, F. Kálmán, S. Ma, A.S. Rathore and Cs. Horváth, *J.Chromatogr.*, **A 744**, 259 (1996)
- <sup>44</sup> C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. De Leeuw and C. Altona, *Tetrahedron*, **36**, 2783 (1990)
- <sup>45</sup> M. Saito, M. Hashimoto, N. Kawaguchi, H. Shibata, H. Fukami, T. Tanaka, N. Higuchi, *J. Enzyme Inhibition*, **5**, 51 (1991)
- <sup>46</sup> Avent, A.G, Bowler, A.N, Doyle, P. M, Marchard, C. M., Young, D. W.: *Tetrahedron Lett.*, **33**, 1509 (1992)
- <sup>47</sup> Hudlicky M. and Merola J.S., *Tetrahedron Lett.*, **31**, 7403-7406, 1990 and **32**, 3134 (1991)
- <sup>48</sup> Demange L., Ménez A. and Dugave Ch., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1169-1172 (1998)
- <sup>49</sup> D. Tsuru, T. Yoshimoto, N. Koriyama and S. Furukawa, *J. Biochem.*, **104**, 5 (1988)
- <sup>50</sup> K. Kánai, S. Erdő, E. Susán, M. Fehér, J. Sipos, B. Podányi, A. Szappanos and I. Hermeecz, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, Vol. 7, **13**, 1701-1704 (1997)
- <sup>51</sup> L. Pierre, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance*, **3**, 231-402 (1967)
- <sup>52</sup> W.A. Nachtergaele, and M.J.O. Anteunis, *Bull. Soc. Chem. Belg.*, **89** (n° 9), 749-758 (1980)
- <sup>53</sup> B. Tinant, J. P. Declercq, G. Germain, and M. Van Meerssche, *Cryst. Struct. Comm.*, **11**, 523-527 (1982)
- <sup>54</sup> E.J. Lien, A. Das and L.L. Lien, *Progress in Drug Research*, Vol. **46**, 263-280 (1996)
- <sup>55</sup> V.S. Bankova, S.S. Popov and N.L. Marekov, *J. Chrom.*, **242**, 135-143 (1982)
- <sup>56</sup> I. Rusznyak, A. Szent-Györgyi: *Nature /London/* **138**, 27 (1936)
- <sup>57</sup> W. V. Carrant, A. Ross: *J. Med. Chem.*, **17**, 273 (1974)
- <sup>58</sup> F. J. Mc Eroy, G. R. Allen: *J. Med. Chem.*, **17**, 281 (1974)
- <sup>59</sup> J. A. Bristol et. al., *J. Med. Chem.*, **27**, 1099 (1984)
- <sup>60</sup> J. Sircar et. al., *J. Med. Chem.*, **28**, 1405 (1985), **29**, 261 (1986)
- <sup>61</sup> P. Caudert, *J.Pharm. Belg.*, **45**, 191 (1990)
- <sup>62</sup> G. Cignarella et. al., *J. Med. Chem.*, **32**, 2277 (1989)
- <sup>63</sup> J. Sircar et. al., *J. Med. Chem.*, **30**, 1955 (1987)
- <sup>64</sup> G. Cignarella et. al., *Synthesis*, **1**, 160 (1990)

- 
- <sup>65</sup> T.A. Geissman, "The chemistry of flavonoid compounds", *Pergamon Press*, 286-316 (1962)
- <sup>66</sup> O. Gertz, *Kgl. physiograf. Sällskap. Lund. Förh.*, **8**, 62, 71, 215 (1938); *Chem. Abstr.* **34**, 473 (1940)
- <sup>67</sup> A.L. Kazakov, V.P. Khilya, B.B. Mezherickij, Gy. Litkei, "Prirodnije i modificirovannije izoflavonoidi", *Izd.Rost.Univ.*, (1985)
- <sup>68</sup> (a) L. Feuer, M. Nógrádi, Á. Gottsegen, B. Vermes, J. Streliszky, A. Wolfner, L. Farkas, S. Antus and M. Kovács, 162377 lajstromszámú magyar szabadalom (bejelentés napja 1970. május 27.); (b) L. Feuer, M. Nógrádi, Á. Gottsegen, B. Vermes, J. Streliszky, A. Wolfner, L. Farkas, S. Antus and M. Kovács, *Ger. Pat.*, 2,125,245 (1971); (*Chem. Abstr.*, **76**, (1971), 72407e); (c) A special issue (Ed. By I. Hermecz) by different authors was dedicated to ipriflavon in *Acta Pharm. Hung.*, **65**(6), 189-232 (1995)
- <sup>69</sup> L. Feuer, M. Nógrádi, Á. Gottsegen, B. Vermes, J. Streliszky, A. Wolfner, L. Farkas, S. Antus, M. Kovács, 162377 lajstromszámú magyar szabadalom (bejelentés napja 1970.május 27.)
- <sup>70</sup> US pat. 3833730 (1974)
- <sup>71</sup> US pat. 3949085 (1976)
- <sup>72</sup> Ger. pat. 2125245 (1971). CA: 76: 72407e (1971)
- <sup>73</sup> Gy. Lányi, M. Nógrádi, M. Puskás és I. Hermecz, *Acta Pharm. Hung.*, **65**, 191-194 (1995)
- <sup>74</sup> L. Feuer: FL-113 (7-izopropoxi-izoflavon) élettani hatása (Chinoin dokumentáció) (1973)
- <sup>75</sup> J. Szücs: *Gyógyszereink* **42**, (4), 152-155 (1992)
- <sup>76</sup> I. Yamazaki, M. Kinoshita, *Life Sci.*, **38**, 1535-1541 (1986)
- <sup>77</sup> Gy. Litkei, T. Patonay, L. Szilágyi, Z. Dinya, *Org. Prep. Proc.*, **23**, 741-747 (1991)
- <sup>78</sup> Kardos J.: 3-szubsztituált flavanon vegyületek előállítása, diplomamunka, Debrecen (1989)
- <sup>79</sup> D.J. Patel, M.E.H. Howden, J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3218 (1963)
- <sup>80</sup> F.W. Wehrli, T. Wirthlin: Interpretation of Carbon-13 NMR Spectra, *Helyden*, **56**, (1976)
- <sup>81</sup> F.W. Wehrli, T. Nishida: The Use of Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Natural Products Chemistry, Springer, New York (1979)
- <sup>82</sup> E.Pretsch, T. Clerc, J. Seibl, W. Simon: Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1981)
- <sup>83</sup> (a) T. Kinoshita, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 259; (b) M. Martin and P. M. Dewick, *Phytochemistry*, **18**, 1309 (1979)
- <sup>84</sup> S. Ghosh, I. Banerjee and S. Baul, *Tetrahedron*, **55**, 11537 (1999)
- <sup>85</sup> (a) D. M. X. Donnelly, J. M. Kielty, A. Cormons and J. P. Finet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2069 (1993); (b) D. H. R. Barton, D. M. X. Donnelly, J. P. Finet, P. J. Guiry and J. M. Kielty, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6637 (1990)
- <sup>86</sup> M. N. Kanvinde, R. M. Kelkar and M. V. Paradkar, *Synth. Commun.*, **23**, 961 (1993) and citations therein
- <sup>87</sup> M.A. Auger, C. Catamna, J. Chopin, *Bull. Soc. Fr.*, 11, 4024 (1970)
- <sup>88</sup> Andrew E. Derome, "Modern NMR Techniques for Chemistry Research", *Pergamon Press*, **6**, 112-113 (1987)
- <sup>89</sup> R.S. Tipson, *J. Org. Chem.*, **9**, 235 (1944)
- <sup>90</sup> G. Cignarella, D. Barlocco, G. Rossi, *Synthesis*, 160-162 (1990)
- <sup>91</sup> A.R. Katritzky, B. Pilarski, L. Üröadi, *Synthesis*, 949 (1989)