



UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG

COPYRIGHT AND CITATION CONSIDERATIONS FOR THIS THESIS/ DISSERTATION



- Attribution — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.
- NonCommercial — You may not use the material for commercial purposes.
- ShareAlike — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original.

How to cite this thesis

Surname, Initial(s). (2012) Title of the thesis or dissertation. PhD. (Chemistry)/ M.Sc. (Physics)/ M.A. (Philosophy)/M.Com. (Finance) etc. [Unpublished]: [University of Johannesburg](https://ujdigispace.uj.ac.za). Retrieved from: <https://ujdigispace.uj.ac.za> (Accessed: Date).

WC10
ZYL

DIE STRUKTUURBEPALING EN TOTAALSINTESE VAN DIE
ANTI-KANKERVERBINDING DOLASTATIEN 3

deur

WYNAND JACOBUS VAN ZYL

PROEFSKRIF

voorgele ter vervulling van die vereistes vir
die graad

DOKTOR IN DIE NATUURWETENSKAPPE



UNIVERSITY
in OF
JOHANNESBURG

CHEMIE

in die

FAKULTEIT NATUURWETENSKAPPE

aan die

RANDSE AFRIKAANSE UNIVERSITEIT
PROMOTOR: PROF. C.W. HOLZAPFEL

MEI 1989



3 00525 0372RAU BIB



Opedra aan Piet en Kato Prins

Mag ons die liefde en ideale wat hulle vir ons so daadwerklik nagestreef het,
met dieselfde ywer vir die am ons, en later van ons, nastreef.

BEDANKINGS

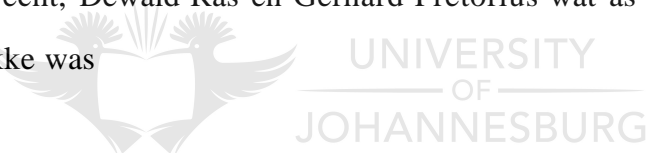
Graag wil ek net die volgende persone en instansies bedank :

Die Almagtige Skepper vir die wonderlike natuur wat Hy geskep het, en die voorreg om dit te kon bestudeer

Prof. Cedric Holzapfel vir die mees entoesiastiese en leersame akademiese leiding wat enige student kan verwag; nie net het dit vir my menige chemiese probleme laat opklaar nie, maar ook 'n liefde vir die vak chemie laat ontwikkel

Marita Roos vir haar onmisbare bydrae met die konformasionele studies

Gerhard Engelbrecht, Dewald Ras en Gerhard Pretorius wat as Honneursstudente ook in die projek betrokke was



Johan Kruger vir die opneem van m.s.- en k.m.r.e-spektra

Susan Vermaakt vir die uitstekende tikwerk

Die tegniese personeel vir gunsies deur die jare gelewer, veral Hannes Bezuidenhout wat ook met die teken van sommige sketse behulpsaam was

Die WNNR en RAU vir ruim finansiele bystand

My mede chemie studente vir die vriendskappe en aangename atmosfeer deur die jare

Jeanne, my ouers, Pietie en Carla vir hulle liefde, ondersteuning, vriendskap en hulp wat my studenteloopbaan soveel meer vervullend gemaak het.

SYNOPSIS

In 1981 Pettit isolated the most active antineoplastic agent then known to man, namely dolastatin B, from the Indian Ocean sea hare *Dolabella auricularia*. A unique cyclic pentapeptide structure, deduced from mass spectrometric fragmentation data, was designated by Pettit to dolastatin 3. The compound contains two hitherto unknown thiazole amino acids, namely the chiral (Gln)Thz and the achiral (Gly)Thz. However, this proposed structure for the natural product was proved to be incorrect by independent syntheses carried out by 3 groups. The aim of the study discussed in this thesis embraces the structural elucidation of dolastatin 3, i.e. its amino acid sequence, deduced from the electron impact mass spectrometric fragmentation data of dolastatin 3 isomers, and the synthesis of the proposed compound.

The first part of the thesis involves the development of a modified Hantzsch-reaction for the synthesis of optically pure 2-(N-protected-1'-aminoalkyl)thiazole-4-carboxylic acids. The achiral (Gly)Thz was synthesized by means of the Hantzsch-reaction, which involves the cyclo addition of ethyl bromopyruvate to an N-protected thioamide amino acid derivative. One approach to the chiral synthesis of *R*-configured thiazole amino acid derivatives was the development of a diastereoselective Strecker-synthesis by incorporating 2,3,4,6-tetra-*O*-pivaloyl- β -D-galactopyranosylamine as a chiral auxiliary. Unfortunately, the direct 1,2-nucleophilic addition of a suitably activated thiazole derivative on the imine carbon of the Schiff-base, which was synthesized either by an amine-aldehyde condensation reaction or by application of the less frequently used Wittig-reaction, proved to be unsuccessful. This problem could be circumvented by converting the chiral *N*-glycosyl- α -aminonitrile to the corresponding *N*-trifluoroacetyl derivative and constructing the thiazole component in a stepwise manner *via* a thioamide derivative. Hydrolysis of the chiral auxiliary could not be effected under conditions essential for the optical stability of the thiazole moiety. The second approach, which proved to be more successful, was the development of a modified Hantzsch-reac-

tion. Mechanistic studies showed that racemisation occurs only after the formation of an intermediate hydroxy-thiazoline derivative. This intermediate was prepared under basic conditions with full retention of optical purity. After suitable activation of the hydroxyl group with trifluoroacetic acid anhydride in pyridine, optically pure thiazole amino acid derivatives were obtained in excellent yields.

The second part of the thesis deals with the synthesis of a structural isomer of dolastatin 3, as well as the interpretation of the electron impact mass spectrometric fragmentation data of this class of compounds. This resulted in the identification of a unique allylic fragmentation pattern associated with the presence of the two thiazole amino acid components, and which led to the formulation of a revised structure of dolastatin 3, *vz.* cyclo[8-Pro-8-Leu-s-(Gln)Thz-(Gly)Thz-8-Val], which was subsequently verified by total synthesis. Two special features of this synthesis involves the application of diethyl phosphoryl cyanide as coupling reagent, and the efficient cyclisation of a pentafluorophenol activated linear pentapeptide. This method does not require the traditional high-dilution associated with these types of reactions.

The third part of this thesis encompasses the determination of the conformations of dolastatin 3 and a closely related isomer of dolastatin 3 in solution, by means of direct experimental techniques (including ^1H - and ^{13}C -n.m.r. spectroscopy, n.m.r.-temperature dependence studies, two-dimensional n.m.r.-studies, infra red studies etc.). From this it was possible to propose a saddle shaped conformation in solution for dolastatin 3, which contributes to an understanding of the very potent physiological activity of this unique compound.

Parts of this work have already been published in the Journal of the American Chemical Society (C.W. Holzapfel, W. van Zyl *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 7581) and presented at international conferences.



HOOFSTUK 2.	DIE SINTESE VAN CHIRALE TIASOOLAMINOSURE	
2.1	Inleiding	24
2.2	Spektroskopiese Eienskappe van Tiasole en Tiasoolaminosure: 'n Literatuuoroorsig	24
2.3	Die Sintese van Tiasole en Tiasoolaminosure: 'n Literatuuoroorsig	31
2.4	Die Sintese van N-t-Boc-(Gly)Thz <u>(112)</u>	52
2.5	Die Sintese van Rasemiese N-t-Boc-(Gln)Thz <u>(129b)</u>	56
2.6	Benaderings tot die Sintese van Chirale Tiasoolaminosure m.b.v. 'n Chirale Hulpreagens	64
2.6.1	Inleidende ondersoek tot metaalgeïnduseerde asimetrieuse Strecker-sintese	64

2.6.2	Die sintese van die Schiff-basis (143)	69
2.6.2.a	Toepassing van In amien-aldehydkondensasie-reaksie vir die bereiding van 143	69
2.6.2.b	Toepassing van 'n asa-Wittig-reaksie vir die bereiding van 143	87
2.6.3	Die diastereoselektiewe sintese van tiasoolamino-suurderivate	96
2.6.3.a	Nukleofiliese 1,2-addisie op die imienkoolstof van 143	96
2.6.3.b	Via 'n diastereoselektiewe Strecker-sintese	101
2.6.4	'n Ondersoek na die chirale induksiemeganisme van die asimmetriese Strecker-sintese	109
2.6.5	Hidrolitiese splyting van die glikosielamien-binding van die tiasoolderivaat 178b: In voorlopige ondersoek	116
2.6.6	Addendum	118
2.7	Die Modifikasie van die Hantzsch-eintese met die Doel om Rasemisasie te verhoed	120
2.7.1	Onlangs gepubliseerde roetes vir die sintese van chirale tiasoolarninosure	120
2.7.2	Bepaling van die optiese suiwerheid van tiasool-aminosuurderivate	126
2.7.3	'n Ondersoek na die meganisme van die Hantzsch-sintese	134
2.8	Die Sintese van Metiel-N-t-Boc-RfS-fenielalaniën-tiasool-d-karboksielsuur (233)	150
2.8.1	Via C-4 alkielhalogeengesubstitueerde tiasool-derivate	150
2.8.2	'n Benadering tot die sintese van 4-eteniel-2-	

III

	(N-t-Boc-1 ¹ -amino-21-fenieletiel)tiasool (241)	155
2.9	Die Sintese van Opties Suiwer Tiasoolamino- derivate m.b.v. In Gemodifiseerde Hantzsch-reaksie	158
2.10	Die Chirale Sintese van <i>N-t-Boc-R-(Gln)Thz</i> (R-260) en <i>N-t-Boc-S-(Gln)Thz</i> (S-260)	160
2.11	Ander Suksesvolle Gemodifiseerde Hantzsch- reaksies : In Vergelykende Studie	168
2.12	Sirkulere Dichroïsme van Chirale Tiasoolamino- derivate	175
HOOFSTUK 3. DIE SINTESE VAN DIE SIKLIESE PEPTIED DOLASTATIEN 3 EN ONDERSOEK VAN DIE ELEKTRONIMPAKGEINDUSEERDE FRAGMENTASIESPEKTRA VAN DIE KLAS VAN VERBINDINGS		
3.1	Die Sintese van Dolastatien 3	177
3.1.1	Die sintese van sikliese peptiede: In Inleidende bespreking	179
3.1.2	Die sintese van die dolastatien 3 isomeer siklo- [S-Pro-s-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-5-Leu] (46)	196
3.1.3	Die sintese van dolastatien 3, naamlik siklo- [S-Pro-5-Leu-s-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (S-266)	204
3.2	Ondersoek van die Elektronimpakgeinduseerde Fragmentasiespektra van Dolastatien 3 isomere	215
3.2.1	Inleiding	215
3.2.2	HREIM8-spektra van dolastatien 3 isomere	218
HOOFSTUK 4. DIE KONFORMASIES IN OPLOSSING VAN SIKLIESE PEPTIEDE		
4.1	Inleiding	233
4.2	Konformasionele Nomenklatuur t.o.v. Peptiede	235
4.3	Konformasionele Homogeniteit van Sikliese Peptiede	

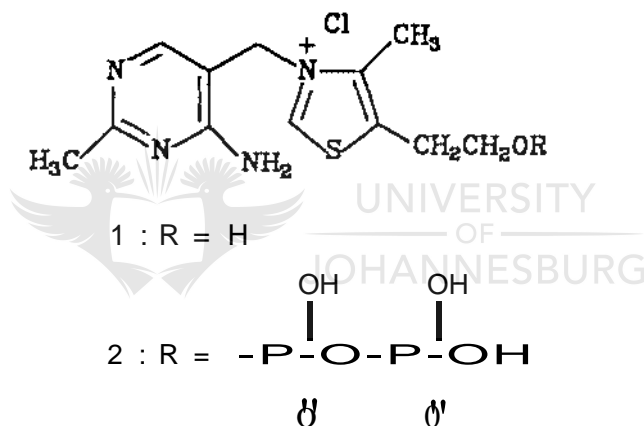
	in Oplossing	237
4.4	'n Studie van die Konformasies van die Sikliese Peptiede <u>8-266</u> en <u>R-266</u> m.b.v. Direkte Eksperimentele Tegnieke	241
4.4.1	X-straalanalise	241
4.4.2	Ultravioletspektroskopie, sirkulere dichroïsme en optiese rotasie dispersie	242
4.4.3	Infrarooispektroskopie	246
4.4.4	KMR-spektroskopie	247
4.4.4.a	Inleiding	247
4.4.4.b	¹³ C-k.m.r.-spektroskopie	248
4.4.4.c	Temperatuur- en oplosmiddelafhanklike ¹ H-k.m.r.- spektroskopie	250
4.4.4.d	Interproton k.m.r.-spin-spin-koppelings- konstantes	253
4.4.4.e	Tweedirnensionele-k.m.r.-spektroskopie	263
4.5	Die Konformasies van Dolastatien 3 Isomere	271
4.6	Die Mees Waarskynlike Konformasies van <u>R-266</u> en <u>8-266</u> in Oplossing	275
4.7	Die ¹ H- en ¹³ C-k.m.r.-spektra van <u>5-266</u> en <u>R-266</u> : 'n Vergelykende Studie	291
HOOFSTUK 5.	EKSPERIMENTEEL	301
LITERATUUR		388

HOOFSTUK 1

DIE ONTDEKKING EN STRUKTUUROPKLARING VAN TIASOOLBEVATTENDE SIKLIESE PEPTIEDE

1.1 INLEIDING

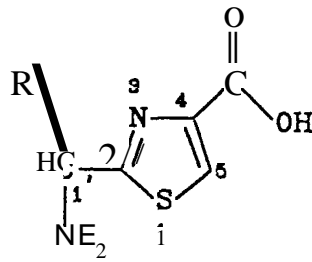
Tiasoolbevattende verbindings vorm 'n groot groep van belangrike medisinale en biologies aktiewe verbindings. Die belangrikste, en mees bekende, natuurlike tiasool-derivaat is tiamien¹, of vitamien B₁ (1), 'n noodsaaklike komponent van die menslike dieet. 'n Tekort aan tiamien in die dieet gee aanleiding tot die siektetoestand wat as beri-beri bekend staan. Ryk bronne van tiamien is egter beskikbaar in die vorm van



eiers, gis en sekere plante. As die ooreenkomstige pirofosfaatderivaat (2) neem die verbinding aan heelwat biologiese reaksies deel, onder meer die ensimatiese omskakeling van piruvaat na asetiel koensiem A en asetien, die ensimatiese dekarboksilering van o-ketoglutaraat asook die transformasies wat deur gis karboksilase en transketolase gekataliseer word.

Tiasoolaminozuurbevattende natuurlike produkte word hoofsaaklik biogesintetiseer deur mikro- en marineorganismes. Hierdie groep van natuurprodukte toon sterk antibiotiese asook 'n breet spektrum van ander fisiologiese aktiwiteite. Tot dusver is tiasoolaminozuurbevattende sikliese peptiede slegs uit laer marineorganismes geïsoleer. Die tiasool-

komponente kom hoofsaaklik voor as chirale 2-(1'-aminoalkiel)tiasool-4-karboksielsure of derivate daarvan (Skema 1.1).



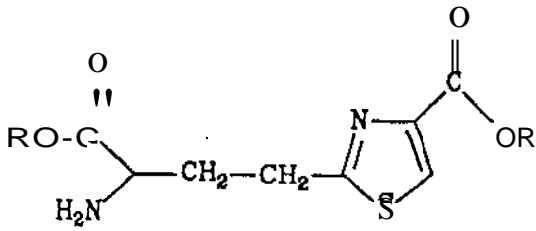
- 3 : R = $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$: (Leu)Thz
 4 : R = $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$: (ne)Thz
 5 : R = CH_2Ph : (Phe)Thz
 6 : R = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$: (Val)Thz
 7 : R = CH_3 : (Ala)Thz
 8 : R = H : (Gly)Thz
 9 : R = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$: (Gln)Thz

Skema 1.1

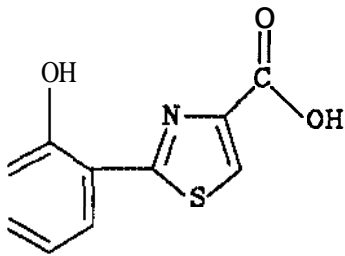
1.2 MIKRO-GRGANISMES AS BRON VAN TIASOOLBEVATTENDE METABOLIE

'n Verskeidenheid van mikro-organismes produseer tiasoolbevattende metaboliëte. 2-Amino-4-(4'-karboksitiasool-2'-iel)bottersuur (10) is uit die swam *Xerocomus subtomentosus* geïsoleer², terwyl aeruginoesuur, 2-(2'-hidroksifeniel)tiasool-4-karboksielsuur (11), in die kultuurmedium van *Pseudomonas aeruginosa* voorkom.^f

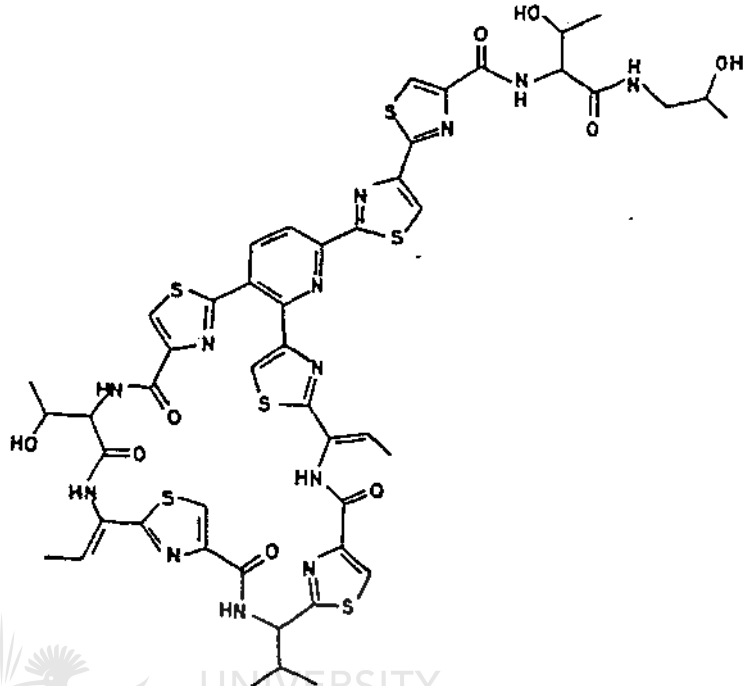
Die politiasoolbevattende antibiotika mikrokokkien P (12) kom in kulture van 'n spore-draende kultuur van *Bacillus pumilus* voor.⁴ Die totaalstruktuur van mikrokokkien P (12) is op grond van 'n volledige vergelykende ¹³C-k.m.r.-studie⁵ van die verbinding en die hidrolise afbouprodukte, waarvan die strukture van sommige deur sintese⁴ bevestig is, afgelei. In Probleem wat die struktuurbevestiging van mikrokokkien P, en ander tiasoolbevattende peptiede, bemoeilik is dat vrystelling van die tiasoolaminosure d.m.v. hidrolitiese splyting ook volledige rasemisasie tot gevolg het. Byvoorbeeld, suurgekataliseerde hidrolise van 12 het onder meer rasemiese (Val) Thz (6) gelewer.^{4b} Die gevolg hiervan



10



11



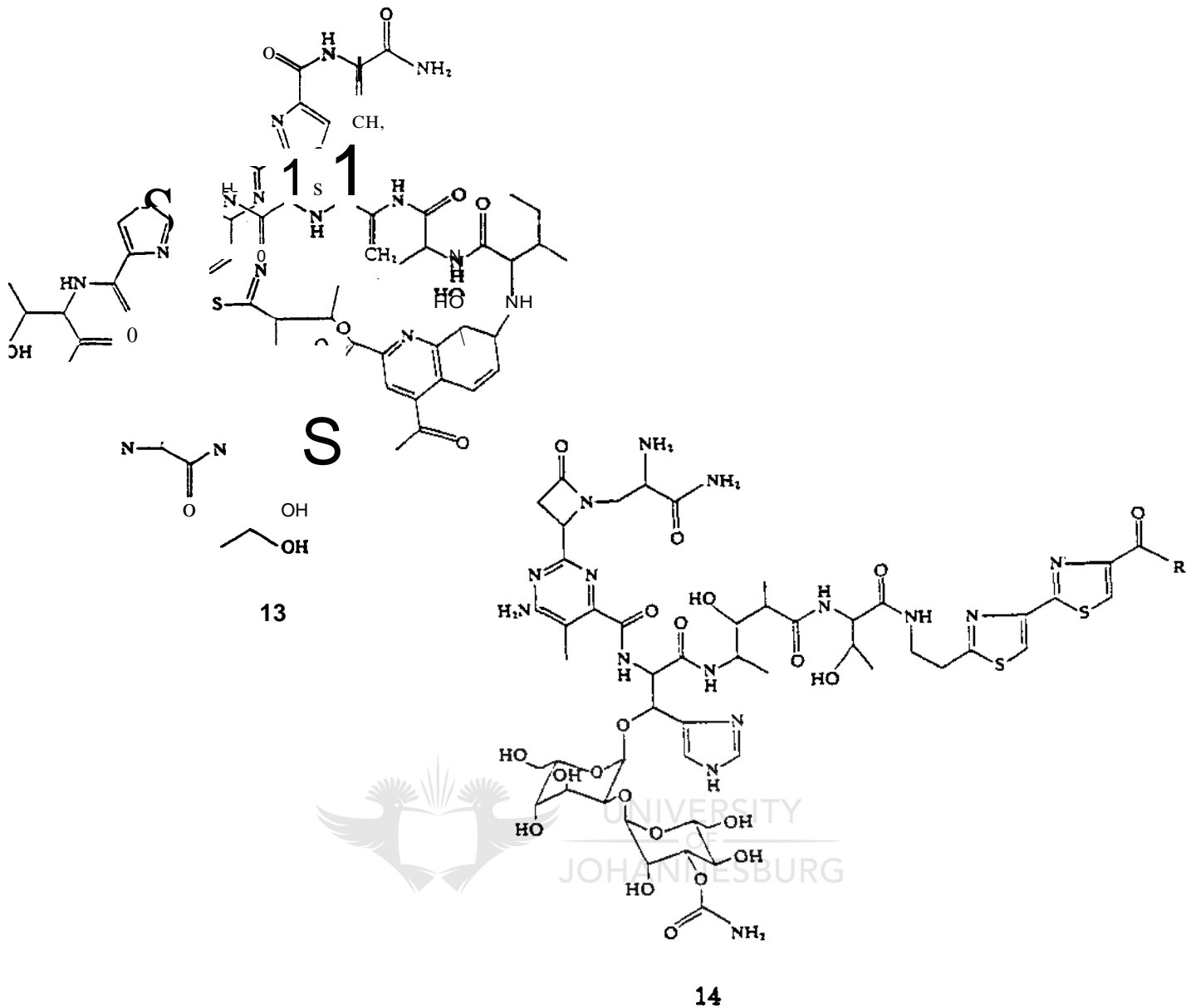
12



UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG

was dat die absolute konfigurasie van mikrokokkien P nie eenduidig bepaal kon word nie.

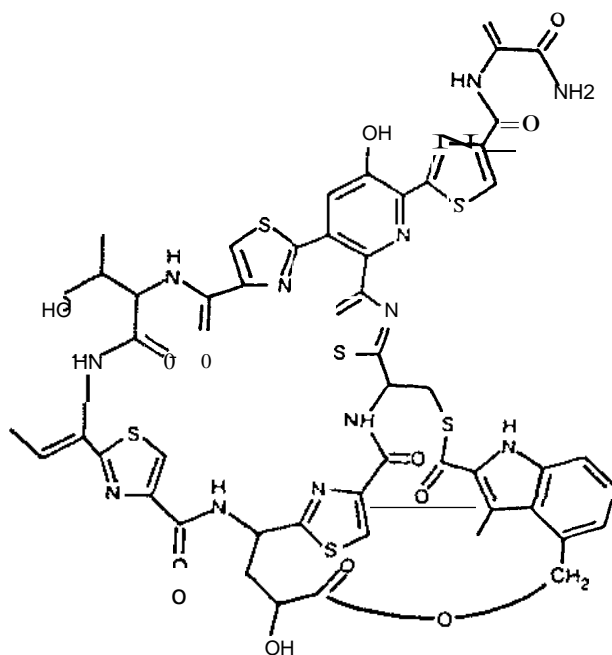
Die *Streptomyces* spesies is een van die rykste bronne van verbindings wat tiasoolringe en peptiedresidue bevat. Die hoofkenmerk van hierdie groep van antibiotika is die baie lae giftigheid daarvan, wat egter ongelukkig geassosieer word met 'n lae wateroplosbaarheid. Tiostrepton^{6,7} (13), geïsoleer uit *S. azureus*, word gebruik vir die behandeling van mastitis by beeste.⁸ "Veel eers het chemiese degradasie tot die isolasie van rasemiese vorms van die natuurlike tiasoolkomponente gelei. In die struktuuropklaring van tiostrepton (13) is die onnatuurlike *R* absolute konfigurasie aanvanklik aan die tiasole op grond van spektroskopiese gegewens toegeken.⁸ Vollerige X-straalanalise het egter bewys dat die tiasole die *S* absolute konfigurasie besit.⁹



Die stofwisselingsprodukte van *S. verticillus* is 'n familie van glikopeptiedtipe antibiotika wat ook antineoplastiese eienskappe besit en reeds gebruik word vir die behandeling van sekere kankers. Bleomisien A₂ 10 (14) is die hoofkomponent van die mengsel van bleomisiene wat klinies gebruik word.¹¹ Sintetiese studies¹² van hidrolise komponente van die natuurlike produk saam met spektroskopiese gegewens het die voorgestelde struktuur 14 bevestig.

Die struktuur van die antibiotikum nosiheptied (15), 'n metaboliet van *S. aciuosus*, is d.m.v. X-straalanalise bepaal.⁸ Die *S* absolute konfigurasie is aan die chirale tiasool-

komponente toegeken.

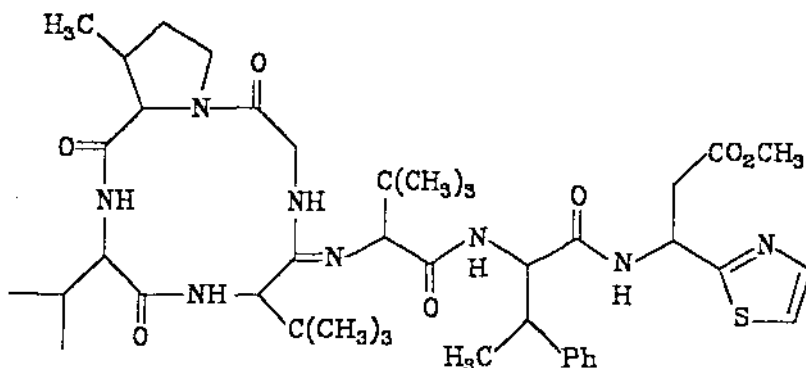


15

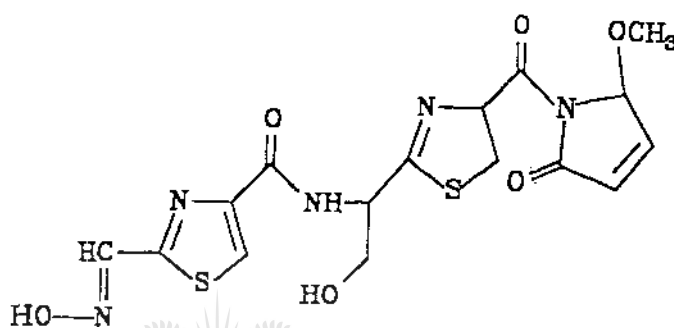
'n Voorlopige struktuur van bottromisien A₂, 'n peptiedagtige antibiotikum van *S. bottropensis*, is voorgestel op grond van chemiese degradasiestudies en sintese van sekere van die afbouprodukte.¹³ Deur gebruik te maak van 'n gemodifiseerde hidrolitiese metode het Umezawa *et al.*^{14a} daarin geslaag om die chirale tiasoolkomponent in opties aktiewe vorm te isoleer. Die S konfigurasie is aan hierdie verbinding toegeken^{14b} op grond van 'n vergelyking van die ORD-spektrum daarvan met die van ander chirale β-aminosure, byvoorbeeld die van S-β-feniel-β-alanien. Dit is egter sonder enige bewyse aanvaar dat feniel- en tiasoolsubstituente die ORD-spektra op vergelykbare wyse beïnvloed. Die struktuur is deur Schipper¹⁾ d.m.v. 'n IH- en 15N-k.m.r.-spektroskopiese ondersoek hersien en 'n unieke vertakte amidienbevattende sikliese peptied 16 is voorgestel as verteenwoordigend van natuurlike bottromisien A₂.

Altiomisien (17) is 'n tiasoolbevattende antibiotikum wat in 1957 geïsoleer¹⁶ is uit *S. althioicus*. Die sintese en X-straalanalise van bisanhidroaltiomiensien', 'n derivaat van 17, het die korrektheid van die struktuur van altiomisien, wat op grond van chemiese en spektroskopiese metodes voorgestel is,¹⁷ bevestig.

6



18



17

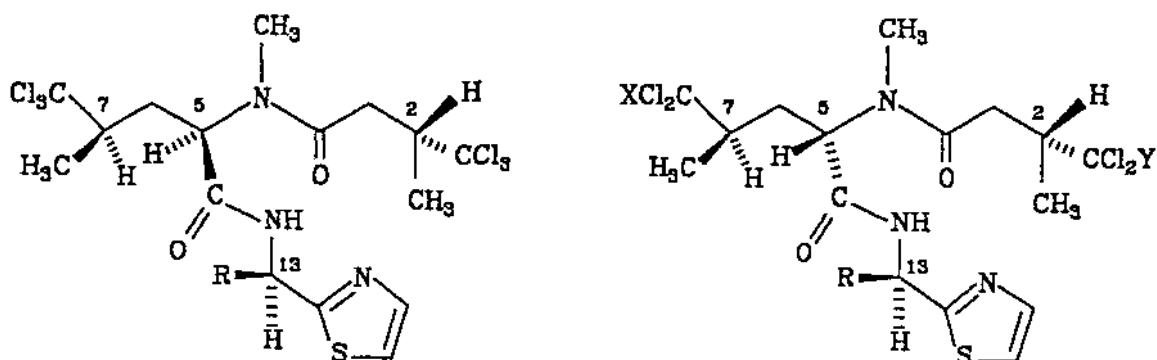
UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG

1.3 MARINESPONSE AS BRON VAN TIASOOLBEVATTENDE METABOLIE TE

Marinesponse (Filum Porifera) word beskou as primitiewe organismes met relatief eenvoudige interne organisasie. Sponse, veral die sonder steeksel, produseer dikwels groot hoeveelhede sekondere metaboliete wat moontlik potensiele roofvande afskrik en ook moontlik die groei van aanpakselorganismes inhibeer. Aangesien baie sponse simbiotiese mikro-organismes bevat, is daar gewoonlik onsekerheid betreffende die ware oorsprong van sponsmetaboliete. Dit word egter nou aanvaar dat die meeste metaboliete deur die sponse self geproduseer word, moontlik in gespesialiseerde klein sferiese selle. In 'n paar uitsonderlike gevalle egter, soos byvoorbeeld by *Dysidea herbacea*, is daar onafhanklike getuienis dat hierdie metaboliete wel deur simbiotiese organismes geproduseer word.¹⁸

Die spons *Dysidea herbacea*, wat hoofsaaklik in die Westelike Stille Oseaan aangetref word, produseer 'n ongewone klas van poligechlorineerde metaboliete. Die eerste metaboliet van hierdie tipe, die heksachloorverbinding dysidenien (18, Skema 1.2), is gerapporteer deur Wells *et al.* wat dan ook die struktuur voorgestel het sonder die toekenning van beide relatiewe of absolute stereoskema's.¹⁹ Kortliks daarna het 'n ander groep die isolasie van 18 tesame met 'n giftige diastereomeer 19, genaamd isodysidenien²⁰, beskryf. Beide relatiewe en absolute stereochemie van 19 volg uit die X-straaldiffraksie-analise van 'n derivaat van 19.²⁰ Die vergelyking van k.m.r.-spektra en chemiese korrelasiestudies tussen dysidenien (18) en isodysidenien (19) het tot die gevolgtrekking gelei dat die twee verbindings C-5 epimere is.^{20,21} Die absolute stereochemie van die ander drie asimmetriese sentra van 18 en 19 is dus identies in beide van hierdie natuurprodukte: *R* vir C-2, C-7 en C-13 soos aangetoon in Skema 1.2. Ireland het die X-straaltoekenning van absolute konfigurasie vir beide 18 en 19 bevraagteken op grond van chemiese degradasiestudies wat aangedui het dat C-13 van beide 18 en 19 die *S* absolute konfigurasie besit.²² Aangesien dit bekend is dat die chirale sentrum α tot 'n tiasool, nl. C-13, gereedelik epimeriseer²³, was die absolute stereochemie van beide 18 en 19 dus onseker. Intussen het 'n versameling van *D. herbacea* van Bowen, Australië drie nuwe isodysidenienderivate (20, 21 en 22) asook 'n nuwe dysidenienderivaat (23) gelewer.²⁴ Die strukturele verwantskap tussen die dysidenien- en isodysidenienderivate is met hierdie studie herbevestig. Die enigste verbinding in die groep van terapeutiese belang is 13-demetieliisodysidenien (20) wat antihypertensiewe aktiwiteit toon met binne-aarse toediening.²⁵ 'n Chirale totaalsintese van (+)-2*R*,4*R*-5,5,5-trichloor-4-metiel-2-[*R*-metiel(4,4,4-trichloor-3-metielbutanoiel)-amino]-N-[1-(tiasool-2-iel)-metiel[pen-tanamied (23) tesame met die diastereomeer (-)-demetieliisodysidenien (20) is uitgevoer.²⁶ Die sleutelstap in die chirale sintese is 'n Ugi 'vier komponent peptidsintese'. Die optiese rotasies van die gesintetiseerde produkte 23 en 20 is gelyk in grootte, maar teenoorgesteld in teken, as die van die ooreenkomstige natuurprodukte. Hiermee is Ireland²² se gevolgtrekking ten opsigte van die absolute stereochemie bevestig en is die *S* konfigurasie aan C-2, C-7 en C-13 van die natuurprodukte (18 - 23) toegeken²⁶,

d.w.s. teenoorgesteld as aangetoon in Skema 1.2. Die absolute stereochemie op C-5 van die natuurlike produkte is egter nog nie eenduidig bepaal nie.



18 : R = CH₃ (Dysidenien)

23 : R = H (Demetiöldysidenien)

19 : R = CH₃ X = Y = Cl

(Isodysidenien)

20 : R = H. X = Y = Cl

(Demetielisodysidenien)

21 : R = Y = H. X = Cl

22 : R = X = H. Y = Cl



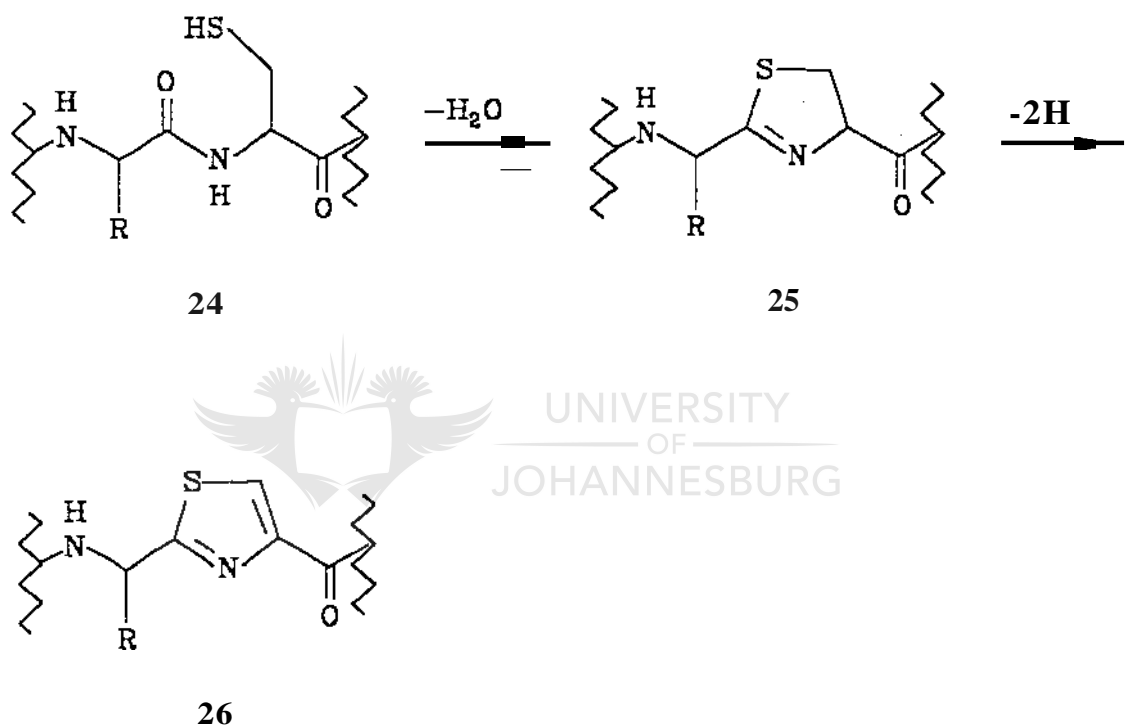
Skema 1.2

1.4 MARINEORGANISMES AS BRON VAN TIASOOLBEVATTENDE SIKLIESE PEPTIEDE

1.4.1 Biosintese van Tiasoolbevattende Sikliese Peptiede

In die natuur word sikliese peptiede en in groot aantal lineere peptiede wat ook nie-proteogeniese aminosure bevat, nie op ribosome volgens die normale roete vir proteïene biogesintetiseer nie, maar eerder deur multi-ensiemkomplekse wat die individuele aminosure as tiolesters aktiveer.²⁷ Dit vind veral plaas in die metabolisme van laer organismes. Aangesien die biosintese sonder die direkte betrokkenheid van RNA en DNA plaasvind, word nie-essensiese aminosure gewoonlik ingesluit. Prominente komponente van sikliese peptiede van plante, bakterie, swamme en laer seidiere is aminosure met 'eksotiese' strukture byvoorbeeld R-aminosure (die *S* absolute konfigurasie kom oorwegend in die natuur voor en is 'n vereiste vir proteïenbiosintese)²⁹, dehidroaminosure, aminoalkieloksalokarboksielsure en aminoalkiel tiasoolkarboksielsure.²⁸

Die biosintese^{7a,10,29,30} van die tiasoolaminosure in natuurlike peptiede vind moontlik plaas deur die biochemiese kondensasie van sisteienbevattende peptiede (24) na tiasoliene (25) gevolg deur oksidasie na tiasole (26) soos in Skema 1.3 aangetoon word. Die voorgestelde biosintese van tiasoolaminosure is in lyn met die teenwoordigheid van 'n tiasolienkomponent van tiostrepton (13) wat moontlik 'n tussenproduk van tiasoolsintese verteenwoordig. Die biosintese van oksasoliene as komponente van sikliese peptiede vind op 'n soortgelyke wyse plaas vanaf treonienbevattende peptiede.²⁸



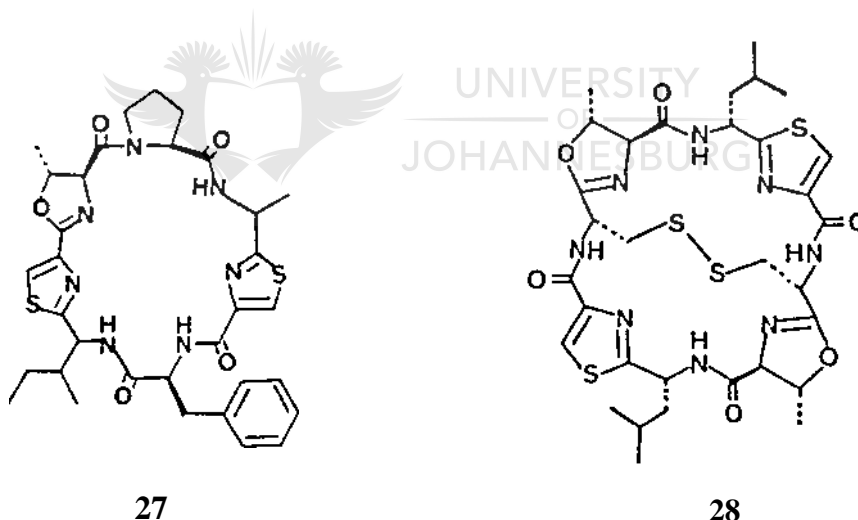
Skema 1.3

'n Nomenklatuur²⁹ wat onlangs voorgestel is voorveronderstel hierdie biosintetiese vormingsmeganisme. Byvoorbeeld, (Gly)Thz (8) sou die tiasoolkondensasieprodukt van glisien en sisteien wees, terwyl (Gln)Thz (9) uit glutamien en sisteien ontstaan. Hierdie internasionaal aanvaarde afkortings vir die tiasoolaminosure sal deurgaans in hierdie bespreking gebruik word. Dit kan verwag word dat die hele reeks tiasoolaminosure ooreenkomstig die verskillende proteienaminosure uiteindelik in die natuurlike peptidprodukte aangetref sal word.²⁹

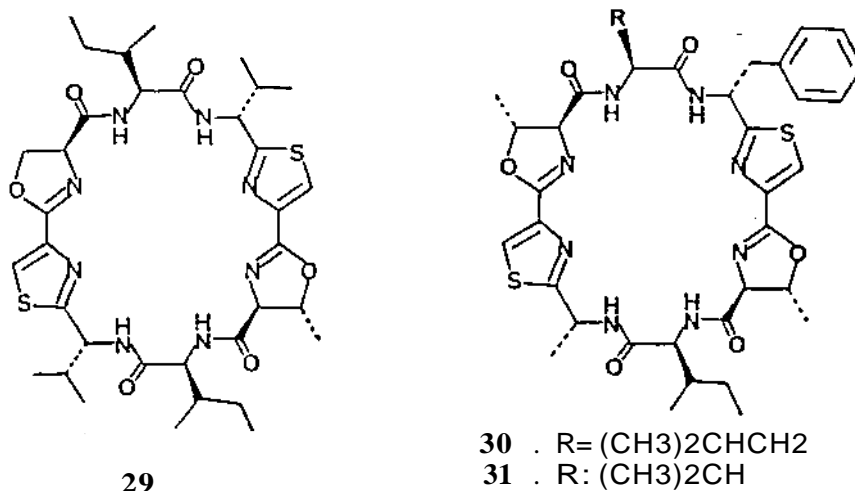
1.4.2 Marinemanteldiere

Manteldiere, of askidiane, is in die klas van subfilum Urochordata. Die herhaalde ontdekking van antineoplastiese verbindings as komponente van manteldiere het die studie van hierdie seediertjies besonder gestimuleer.¹⁸ Die meerderheid van die metaboliete van manteldiere word vanuit aminosure gevorm. Ekstrakte van marine-manteldiere het onlangs 'n aantal sikliese peptiede, wat tiasoolaminosure bevat, gelewer.

Ulisiklamied (27) en ulitiasiklamied (28) was die eerste van 'n reeks sikliese peptiede wat uit die bekerdierspesies *Lissoclinum patella*, wat by Palau in die Westerlike Karoliene Eilande voorkom, geïsoleer is.³¹ Buiten oksasolienresidue bevat ulisiklamied (Ala)Thz (1) en (Ile)Thz (4) residue en ulitiasiklamied twee (Leu)Thz (3) residue. Die strukture van 27 en 28 is voorgestel op grond van uitgebreide spektroskopiese en degradasiestudies.³¹ Ulitiasiklamied (28) verskil van die normale sikliese peptiede daarin dat



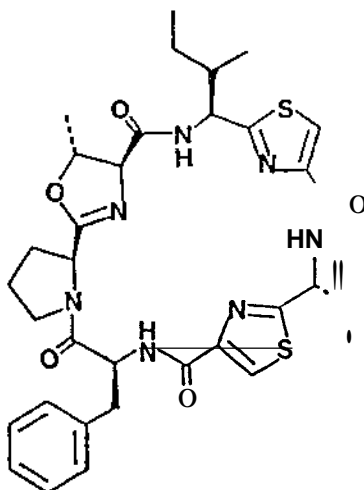
dit oor 'n unieke dimeriese struktuur met 'n karakteristieke simmetriese disulfiedbrug besit. Drie addisionele sikliese peptiede, naamlik patellamied A (29), patellamied B (30) en patellamied C (31) vanuit *L. patella* is ook beskryf³², asook die sitotoksiese gegewens t.o.v. verbindings 27-31. Van die hele klas van verwante sikliese peptiede is ulitiasiklamied die mees aktiewe sitotoksiese agent met 'n IC_{50} van $0.35 \mu\text{g}/\text{mL}$ ten opsigte van *in vitro* gekultiveerde L-1210 muriene leukemieselle.³² Al die aminosure van hierdie klas van sikliese peptiede, afgesien van die tiasoolaminosure, besit die *S* konfigurasie.



Die chiraliteit is afgelei deur middel van 'n gaschromatografieretensiekorrelasie van die trifluoorasetiolderivate van die aminosure op 'n kolom wat met 'n opties aktiewe vloeistoffase (SP-300, Supelco) bedek is.³²

In die struktuur van ulisiklamied (27), soos oorspronklik geformuleer, is C-4 van die (1*l*e)Thz komponent met die C-2 van die oksasolienresidu verbind. Hierdie formulering was gegrond op die feit dat die C-4 proton van oksasolien normaalweg homoalliliese (5-binding) ¹H-koppeling ondergaan met o-protone van alkielsubstituentte op C₂.^{32,33} Die koppeling word waargeneem in die ¹H-k.m.r.-spektrum van natuurlike ulisiklamied (δ 4.05, dd, J = 8 en 2 Hz) waar 'n sisteieneenhed verbind is aan die C-2 van 'n oksasolienresidu. Die C-4 proton van die oksasolienresidu van natuurlike ulisiklamied ondergaan slegs koppeling (δ 4.26, d, J = 4 Hz) met die proton op die naasliggende C-5 atoom. Die afwesigheid van die langafstandkoppeling het gelei tot die gevolgtrekking dat die C-4 van 'n tiasoolring verbind is met die C-2 van die oksasolienresidu van ulisiklamied.³² Met hierdie beperking was die voorgestelde struktuur van ulisiklamied (27) in ooreenstemming met die EI ('Elektronimpak)-massaspektroskopiese data van natuurlike ulisiklamied. Soortgelyke argumente is ook gebruik in die opklaring van die strukture van patellamiede A-e.³² Die voorgestelde struktuur van ulisiklamied (27) is later hersien na ³² op grond van die EI-geïnduseerde fragmentasie van 'n selektief gehidroliseerde produk van natuurlike ulisiklamied en die beskikbaarheid van addi-

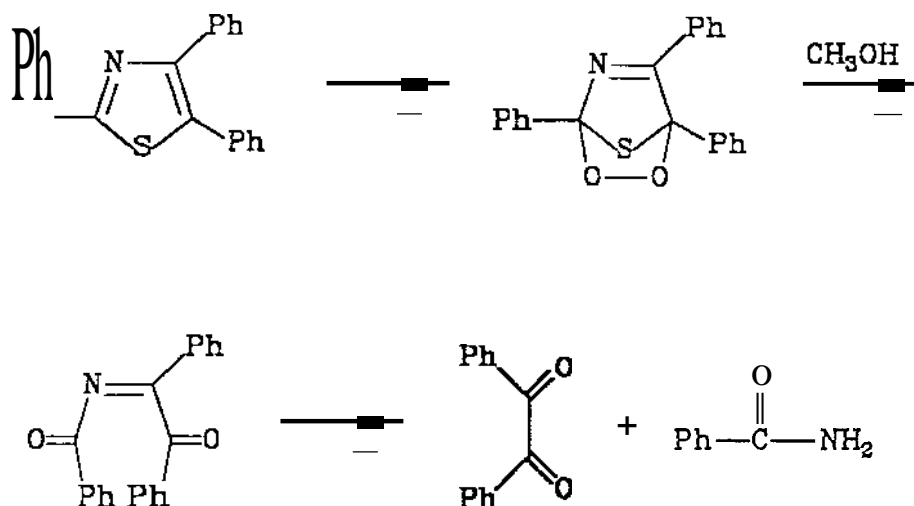
sionele FAB ('fast atom bombardment') fragmentasiedata.³³ Dit is derhalwe duidelik dat met die oorspronklike interpretasie van die k.m.r.-gegewens nie rekening gehou is met die dihedrale hoekafhanklikheid van langafstandkoppeling nie.



32

'n Gerieflike fotochemiese metode vir die bepaling van die absolute stereochemie van tiasoolaminosure in sikliese peptiede is deur Ireland *et al.*²³ ontwikkel. Voorheen was die enigste betroubare metode vir die bepaling van absolute stereochemie van tiasoolaminosure in peptiede enkelkristal Xe-straalstruktuurbepaling. Die milde fotochemiese metode behels die behandeling van 'n tiasoolbevattende peptied met singuletsuurstof (102) wat 'n [4+2] addisie met die tiasoolring ondergaan (kyk Skema 1.4). Suurgekataliseerde hidrolise van die gevormde tio-oonied stel die C-2 syketting van die oorspronklike verbinding vry as 'n o-aminosuur. Geen rasemisasie vind in hierdie reaksie plaas nie. Met hierdie metode kon aangetoon word dat ulitiasiklamied en patellamiede A-e uitsluitlik tiasoolaminosure met die *R* absolute konfigurasie besit.²³ Vir ulisiklamied is (Ala)Thz die *R* absolute konfigurasie en (Ile)Thz die *S* absolute konfigurasie op grond van 'n GC (gaschromatografiese)-analise van die metielestertrifluorasetielderivate, soos reeds beskryf,³² toegeken.³³

Die chirale sinteses van patellamied A,³⁴ patellamied B^{35,36} en patellamied C,³⁵ ooreenkomstig die voorgestelde strukture, is uitgevoer. Nie een van die sintetiese produkte

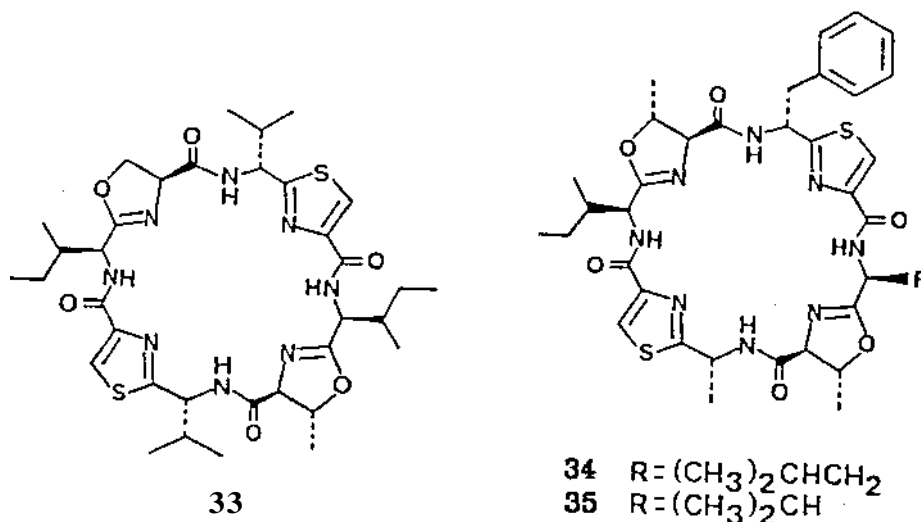


Skema 1.4 : Die reaksie van trifenieltiasool met 102 23

was egter identies met die ooreenkomstige natuurprodukte nie. Byvoorbeeld, die protonresonansies van beide die tiasool- en oksasolienringe van al drie die gesintetiseerde produkte kom by laer veld voor as die van die natuurprodukte.³⁴⁻³⁶ Dit het gedui op die afwesigheid van die direk gekoppelde tiasool-oksasolienkomponente in die natuurlike patellamiede. Nuwe spektroskopiese inligting wat verkry is deur die vergelyking van die spektroskopiese data van 'n tripeptied hidrolise produk van patellamied B met die van ooreenkomstige sintetiese tripeptiede["], het tot die herinterpretasie van die oorspronklike analitiese data van die natuurprodukte gelei. Alternatiewe strukture met 2-(1'-aminoalkiel)oksasolienkomponente en 'n omgekeerde aminosuurvolgorde is derhalwe vir patellamied A34 (33), patellamied B^{37,38} (34) en patellamied C³⁷ (35) voorgestel. Die korrektheid van hierdie strukture is bevestig deur totaalsintese.^{34,37,38} In van hierdie sinteses is die onstabiele oksasoliendeelstrukture as laaste stap voltooi deur die behandeling van serien- en/of allotreonienbevattende peptiede met tionielchloried en silwertrifluormetaansulfonaat (kyk Skema 1.5).^{34,37}

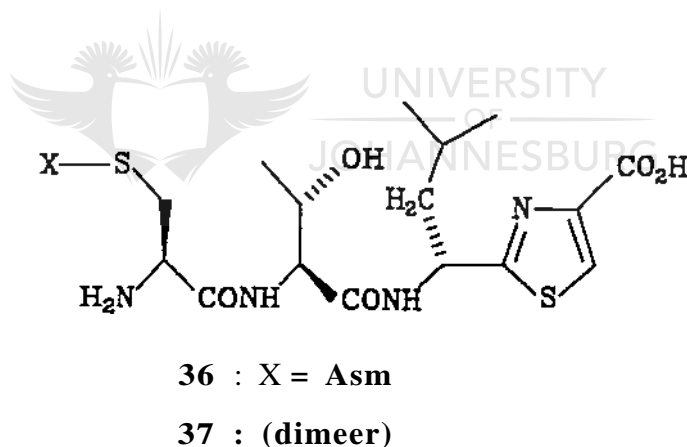
Drie verskillende sikliseringsmetodes is vir die sintese van ulitiasiklarnied (28) gebruik nl.

- (i) die siklodimerisasie van die S-asetamidometiel (S-Asm)tripeptied (36)³⁹



- (ii) die dubbele siklisering van die heksapeptied (37) wat 'n disulfiedbinding bevat³⁹ en
- (iii) met ringsluiting van 'n bifunksionele pentafluoorfenielester.Y'

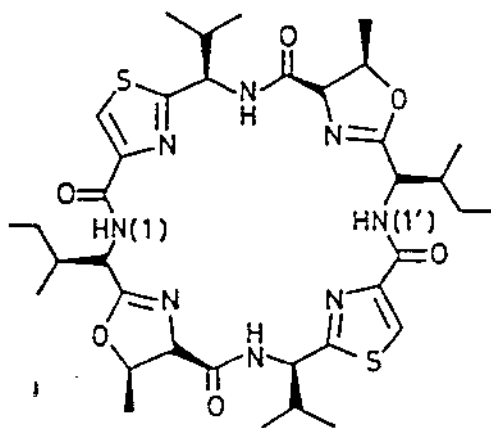
In al drie gevalle was die sintetiese produkte identies met natuurlike ulitiasiklamied.



Die chirale sintese van natuurlike ulisiklamied (32) is suksesvol met beide die standaard metode van peptiedsintese⁴¹ en die soliede-fase metode⁴² met dietielfosforielsianied as koppelingsreagens, uitgevoer.

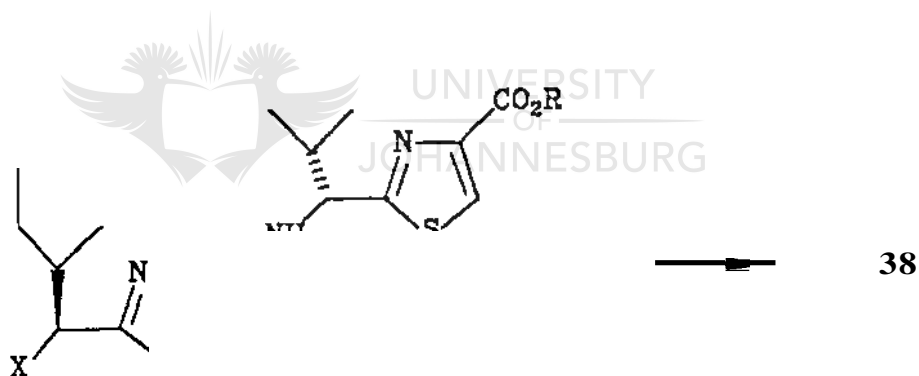
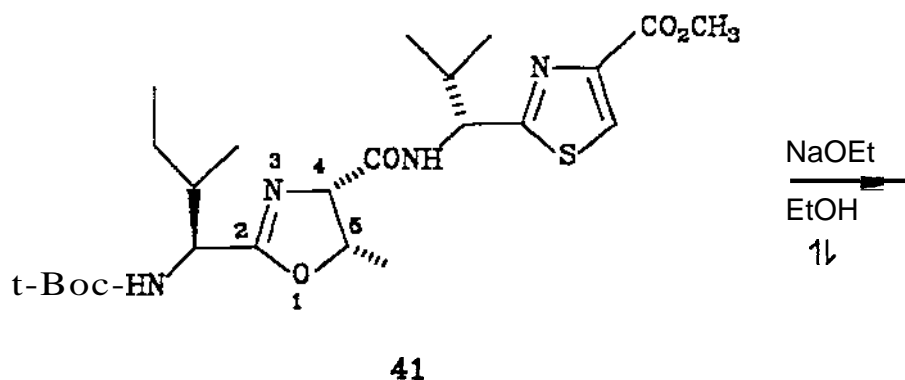
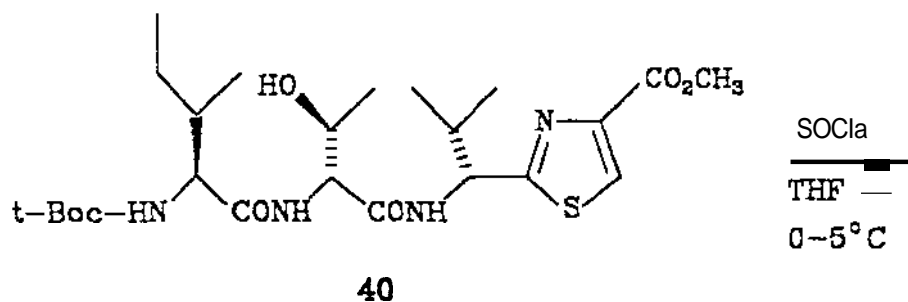
Askidiasiklamied (38) en ulitiasiklamied (28) is uit 'n ongeïdentifiseerde spesie van bekerdiertjies, wat in die Rhodda Rif, Queensland, Australia aangetref word, geïsoleer.⁴³

Die IH-k.m.r.-spektrum van askidiasiklamied het 'n homoalliliese koppeling (δ 4.27,



38

dd, $J = 6.3$ en 1.2 Hz) tussen H-4 van die oksasolienring en 'n ander proton aangetoon. Die karakteristieke verskynsel bet op die teenwoordigheid van 'n metiengroep op C-2 van die oksasolienring gedui. Op grond van hierdie afleiding, tesame met ander spektroskopiese en degradasiestudies, is die simmetriese sikliese peptiedstruktuur 38 as verteenwoordigend van natuurlike askidiasiklamied voorgestel.⁴³ Aangesien ulitiasiklamied ook 'n produk van dieselfde bekerdiertjie as askidiasiklamied (38) is, is aanvaar dat die aminosure van 38 dieselfde absolute konfigurasie besit as die van ulitiasiklamied (28), naamlik 5-soleusien, 5-treonien en -R-{Val}Thz.⁴⁴ Twee kenmerke van die sintese⁴⁴ van 38 is die vorming van die *4S,5R-trans*-oksasolienring-bevattende peptied 39 en die siklodimerisasie van 39 met difenielfosforielasied (DPPA) om die sikliese produk 38 in 'n opbrengs van 27% vanaf 39 te lewer. Die reaksie van 40 met 'n oormaat tionielchloried om die cis-oksasolienpeptied (41) te lewer vind sonder enige waarneembare epimerisasie van die chirale sentrum (op posisie 1') van isoleusien plaas. Epimerisasie van C-4 van die oksasolien is deur behandeling met natriumetoksied in kookende etanol bewerkstellig om die *trans*-oksasolien (42) te lewer. Chemoselektiewe ontskerming van die karbamaatstikstof van 42, wat die suursensitiewe *trans*-oksasolien bevat, is onder milde kondisies met trimetielsilietrifluormetaansulfonaat in droe dichloormetaan uitgevoer. Die sintese het die korrektheid van die voorgestelde struktuur en absolute konfigurasie van 38 bevestig.



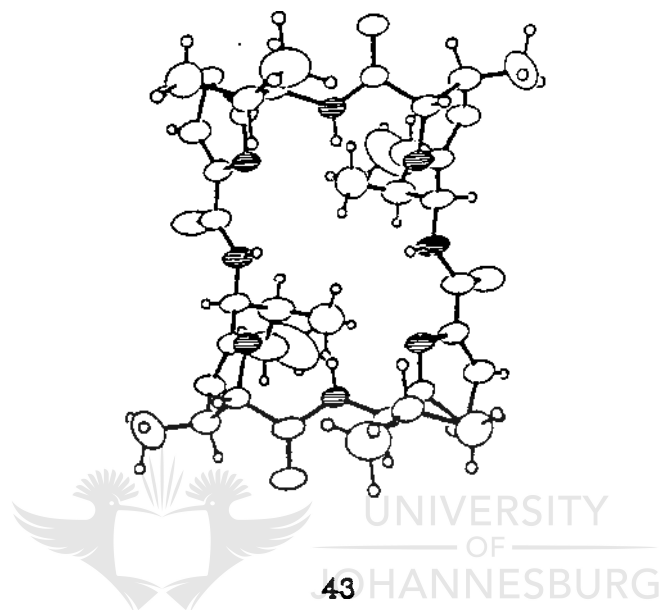
42 : R = CH₃, X = NH-t-Boc

39 : R = H, X = NH₂

Skema 1.5

Askidasiklamied is 'n hoogs aktiewe antineoplastiese verbinding. Dit is waarskynlik dat die spesifieke ringstruktuur en topologie noodsaaklik is vir die biologiese aktiwiteit van die verbinding.⁴⁵ Dit word vandag algemeen aanvaar dat 'n volledige kennis van die driedimensionele struktuur van 'n molekule noodsaaklik is vir 'n insig in die biologiese reaksies daarvan op molekulere vlak. Dit was dan ook die beweegrede vir die volledige

struktuurbeplating van natuurlike askidiasiklamied met behulp van X-straalkristallografie.⁴⁵ Die resultaat wat verkry is het nie alleen die struktuur 38 van die verbinding bevestig nie, maar ook waardevolle topologiese inligting verskaf. Die sikliese peptied neem 'n saalvormige konformasie (Figuur 1.1, 43) aan en is sllindries gedraai langs 'n lyn wat twee stikstofatome [N(1) en N(1')] van 38 verbind. Die tiasool- en oksasolienringe is alternatiewelik geplaas in die vier hoeke van die reghoekige ring. Geen intramoleku-



Figuur 1.1: 'n ORTEP perspektiewe tekening van askidiasiklamied (43) beskou langs 'n tweevoudige as wat deur die middel van die molekule gelee is. Die donker atome verteenwoordig stikstof-atome.⁴⁵

lere waterstofbindings is waargeneem nie, alhoewel intermolekulere bindings tussen naasliggende molekules die kristalvorm stabiliseer. 'n Belangrike kenmerk van die molekule konformasie is dat al die C-N bindings na die sentrum van die ring gerig is. Die N-H bindings van die amiedgroepe en N-atome van tiasool- en oksasolienringe kom afwisselend om die ring met gelyke intervalle voor. Die N-H bindings en die alleenpare van die N-atome is almal na die middelpunt van die molekule gerig. Dit kan verwag word dat sekere verwante sikliese peptiede moontlik dieselfde karakteristieke konfor-

masie, wat sekerlik met biologiese aktiwiteit verband hou, sal aanneem.

1.4.3 Marineweekdiere

Die filum Mollusca sluit die koppotiges (pylinkvis, seekat), die tweekleppiges (mossels, gapermossels, oesters en kammossels) en die buikpotiges (seehase, nudibrange en pulmonate) in. Heelwat chemiese navorsing¹⁸ is gedoen op skulplose weekdiere, soos byvoorbeeld seehase en nudibrange, vanwee die feit dat hulle evolusionere sukses aan die ontwikkeling van chemiese verdedigingsmeganismes toegeskryf kan word. Die metabooliet wat deur die seehase gebruik word, is gewoonlik derivate van hul alge-dieet. Sommige nudibrange bevat bekende sponsmetaboliete, terwyl andere verbindings bevat wat slegs sekere strukturele verwantskappe aan sponsmetaboliete toon. Daar is egter bewyse dat sommige opistobranchie hul eie verdedigingsagente produseer.¹⁸ Daar is 'n veranderlike neiging in die literatuur om gewoonlik te aanvaar dat alle metaboliete van skulplose weekdiere in chemiese verdedigingsmeganismes betrokke is, terwyl in werklikheid slegs net 'n geringe aantal suiwer verbindings vir hul eienskappe in hierdie verband getoets is. 'n Aantal nudibranchmetaboliete, wat moontlik met sponsmetaboliete mag ooreenkom, is ook nog nie in die dieetbronne van die organismes geldentifiseer nie.

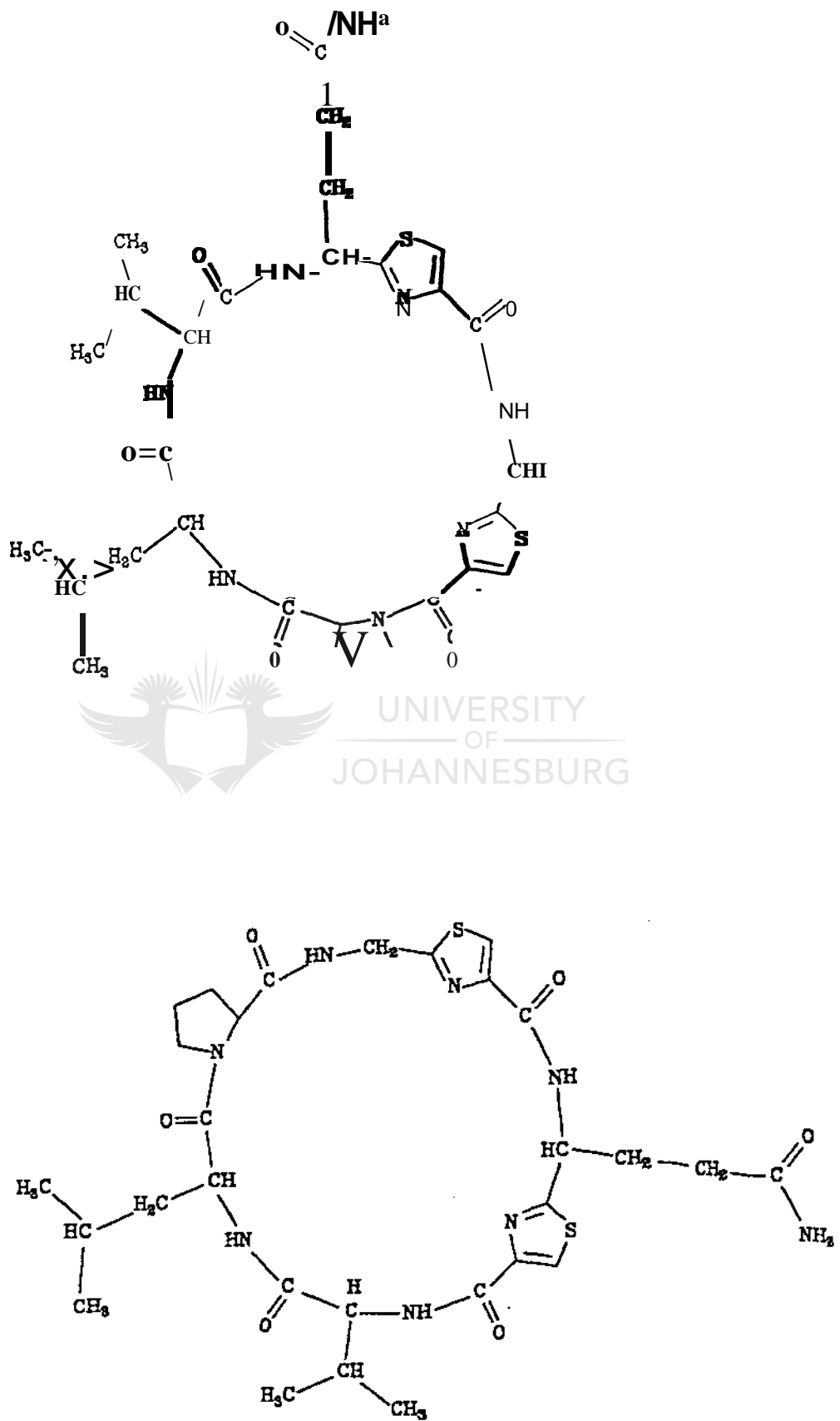
Gedurende 1981 het Pettit *et al.*^{29,46} nege antineoplastiese en/of sitotoksiese verbindings uit die Indiese Oseaan seehaas *Dolabella auricularia* in 1 mg kwantiteite elk vanuit 100 kg van die nat seehaas gelsoleer. Een van hierdie verbindings, nl. dolastatin 3, is een van die mees aktiewe antineoplastiese verbindings wat in die afgelope paar jaar ontdek is. Dolastatin 3 toon veral sterk selgroei-inhiberende werking teen P-388 limfositiese leukemieselle [ED₅₀ = 1x10⁻⁴ tot 1x10⁻⁷ µg/ml].

Die marineorganisme wat dolastatin 3 produseer het 'n interessante geskiedenis. 'n Fisiologiesaktiewe Indiese Oseaan seehaas van die genus *Dolabella* is vir die eerste keer ontdek tydens 'n omvattende studie⁴⁷ in 60 A.D. deur die Romeinse natuurwetenskaplike Gaius Plinius Secundus. Ekstrakte van hierdie diertjie was in die tyd van Nero al

reeds vir hul toksiese eienskappe bekend.^{47,48} Die moontlikheid om sulke ekstrakte vir die behandeling van sekere siektetoestande te gebruik is reeds in 150 A.D. deur Nieander genoem.⁴⁸ Dit was egter nie voor Pe^{tt} 29⁴⁶ antineoplastiese inhoudstowwe soos dolastatien 3 van 'n Indiese Oseaan *Dolabella* gelsoleer het dat die mediese potensiaal ten volle besef is nie.

Die lae geïsoleerde opbrengste van die seehaaspeptiede is in teenstelling met die hoë geïsoleerde opbrengste van die manteldierpeptiede wat die strukturele opklaring van eersgenoemde geweldig bemoeilik het. Die strukturele opklaring van dolastatien 3 in besonder, was dus 'n uitdagende probleem aangesien slegs 1 mg van die amorfe verbinding beskikbaar was. Die primêre struktuur is hoofsaaklik op grond van k.m.r.- en massaspektra voorgestel as siklo[Pro-Leu-Val-(Gln)Thz-(Gly)Thz], (44), 'n sikliese peptied wat die twee voorheen onbekende tiasoolaminosure (Gln)Thz (9) en (Gly)Thz (8) insluit. Dit is interessant om daarop te let dat die voorgestelde struktuur van dolastatien 3 nader verwant is aan die sikliese peptiede van die marinemanteldiere as aan die algemetaboliete wat normaalweg in seehase voorkom. Die absolute stereochemie van elke aminosuureenheid is tentatief, sonder enige addisionele getuïenis afgesien van aanvegbare statistiese oorwegings, as S voorgestel. Dit is dus duidelik dat daar onsekerheid bestaan oor beide die absolute konfigurasie en aminosuurvolgorde van dolastatien 3. Daar is egter sekerheid oor die feit dat die verbinding uit vyf aminosuurkomponente in 'n 1:1:1:1:1 verhouding bestaan. Die aminosure is prolien, valien, leusien en twee tiasoolaminosure (Gly)Thz en (Gln)Thz. Direkte getuïenis vir die aminosuurvolgorde, wat tot die krakingspatroon van die verbinding in die massaspektrometer beperk was, het op struktuur 44 of 45 gedui, alhoewel struktuur 45 (omgekeerde volgorde van binding in vergelyking met 44) as minder waarskynlik beskou is a.g.v. weer eens aanvegbare biogenetiese argumente.

As gevolg van die sterk antineoplastiese aktiwiteit van dolastatien 3 is groot belangstelling getoon in die gedetailleerde fisiologiese toetsing daarvan. Dit is egter verhinder deur



die klein hoeveelheid daarvan beskikbaar uit die natuur.

Die sintese van die voorgestelde struktuur van dolastatien 3 (44) is gelyktydig deur drie onafhanklike groepe onderneem.⁴⁹⁻⁵² So intens was die belangstelling dat Schmidt *et al.*^{49,51} en Shioiri *et al.*⁵⁰ elk 8 diastereomere van 44 gesintetiseer het. Geeneen van die sintetiese verbindings het egter met die natuurlike dolastatien 3 ooreengestem nie. Ook was geeneen van die 8 diastereomere met die omgekeerde aminosuursekwens, naamlik siklo[Pro-(Gly)Thz-(Gln)Thz-Val-Leu] (45), identies met die natuurlike sikliese peptied nie.^{49-51,53} 'n Nuwe pentafluorfenielesteringsluitingsreaksie, wat deur Schmidt *et al.* ontwikkel is,^{49,51} het die dolastatien 3 isomere in opbrengste van >90% gelewer. Hierdie metode is 'n verbetering op die ander bekende metodes wat onlangs ontwikkel is, naamlik siklisering deur middel van die difenielfosforielasied- (23%)⁵⁰ of trichloorfenielestermetode (24%)^{52,53}. Die volgende karakteristieke verskille⁴⁹ tussen die k.m.r.-spektra van die genoemde 16 isomere van dolastatien 3 en die natuurprodukt is gevind:

- (i) verskillende chemiese verskuiwings en koppelingskonstantes van die amiedprotone,
- (ii) verskillende chemiese verskuiwings en koppelingskonstantes van die twee metileenprotone van die (Gly)Thz komponente,
- (iii) verskillende chemiese verskuiwings van al die metielprotone en
- (iv) konsekwente groot verskille in die chemiese verskuiwings van die twee C-5 tiasoolproteïene.

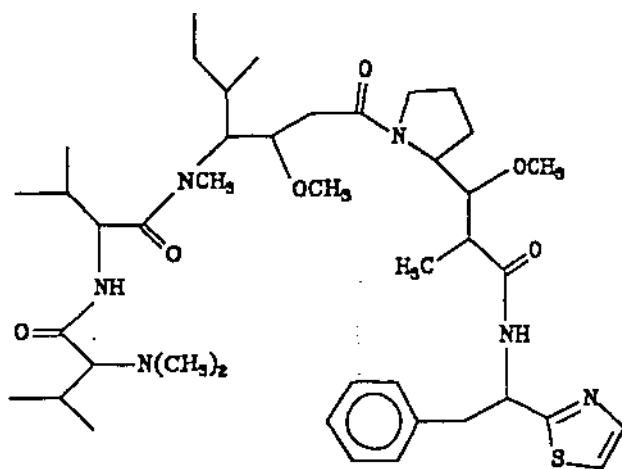
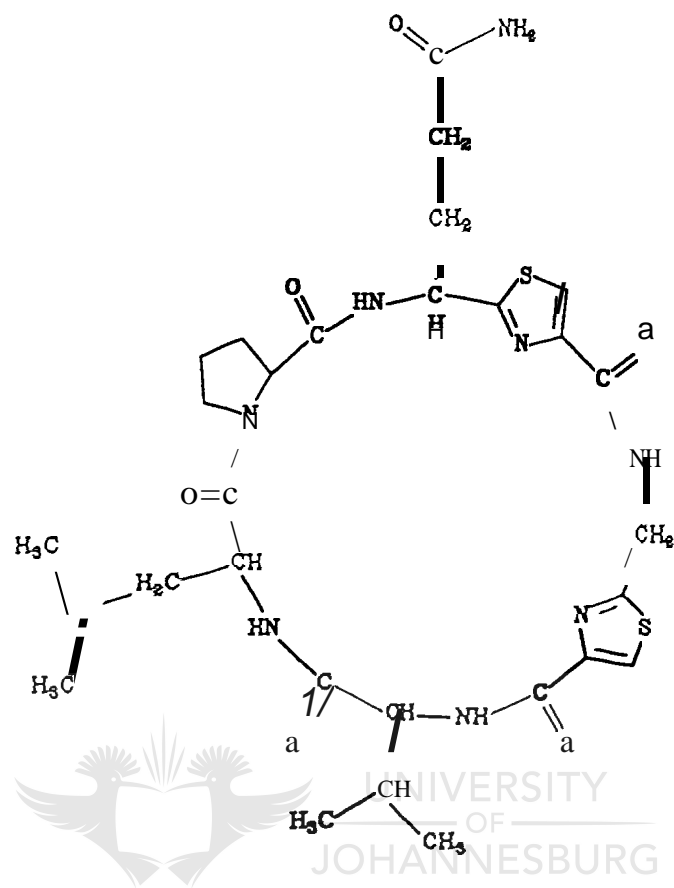
Die belangrike verband tussen spesifieke struktuur en konformasie aan die een kant en biologiese aktiwiteit aan die ander kant, is weer eens bevestig deur die feit dat nie een van die 16 isomere van dolastatien 3 enige selgroei-inhiberende aktiwiteit teen *in vitro* gekultiveerde L-1210 muriene leukemieselle toon nie.⁵⁰

Pettit⁵⁴ het 'n merkbaar verskil by die Leu- en (Gln)Thz eenhede in die ¹H-k.m.r.-spektra van natuurlike dolastatien 3 en die isomere opgemerk. Dit is voorgestel dat die

verskynsel moontlik op die onnatuurlike *R* absolute stereochemie, i.p.v. die *S* reeks, vir beide Leu en (Gln)Thz dui. Andersins kan dit dui op 'n alternatiewe rangskikking van die Pro-Leu-Val segment in die voorgestelde struktuur 44. Met behulp van 'n nuwe rekenaartegniek vir die analise van peptiedmassaspektroskopiese data is die volgende mees waarskynlike strukturele sekvens⁵⁴ vir natuurlike dolastatien 3 as 46 afgelei. Sintese⁵⁴ het egter getoon dat nie een van die twee diastereomere van siklo[S-Val-S-Leu-S-Pro-R/s-(Gln)Thz-(Gly)Thz], (46), identies is aan die natuurlike sikliese peptied nie.

Die struktuuropklaring en sintese van dolastatien 3 is die onderwerp van die navorsing . wat in hierdie proefskrif beskryf word.

'n Nuwe tiasoolaminozuurbevattende lineere pentapeptied, dolastatien 10 (47), is onlangs deur Pettit *et al.*⁵⁵ geïsoleer uit *Dolabella auricularia*. Dolastatien 10 is die mees aktiewe (laagste doses) antineoplastiese verbinding bekend. Dit toon byvoorbeeld 'n 69-102% lewensverlenging met slegs 1-4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ teen die PS leukemie [$\text{ED}_{50} = 4.6 \times 10^{-5} \mu\text{g}/\text{ml}$]. Uniek aan die peptied is die gemaskeerde fenielalanienaminozuur-residu genaamd dolafenien. Pettit is tans besig met 'n ondersoek na die relatiewe en absolute stereochemie van 47 sowel as 'n totaalsintese van die verbinding ooreenkomstig die voorgestelde struktuur.⁵⁵



HOOFSTUK 2

DIE SINTESE VAN CHIRALE TIASOOLAMINOSURE

2.1 INLEIDING

Die uiteindelijke doelwit met die navorsingswerk wat in hierdie tesis beskryf word, was die struktuurbeplanning sowel as die sintese van die antikanker verbinding dolastatien 3. Die benadering wat gevolg is ten opsigte van die struktuurbeplanning van dolastatien 3 het die sintese van 'n aantal strukturele isomere van dolastatien 3 en die herinterpretasie van die spektroskopiese gegewens, in terme van die sintetiese verbinding, behels. Op grond hiervan is die struktuur wat aan dolastatien 3 toegeken is, hersien en is die verbinding dan ook finaal gesintetiseer.

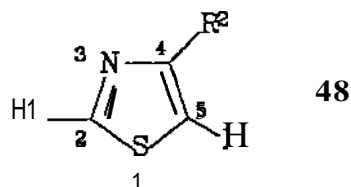
'n Voorvereiste vir die hele studie was die daarstelling van roetes vir die sintese van die twee tiasoolaminoosuurkomponente van dolastatien 3, naamlik die achirale (Gly)Thz (8) en die chirale (Gln)Thz (9). In hierdie studie is baie gebruik gemaak van ^{13}C - en ^1H -k.m.r.-spektroskopie vir die strukturele bevestiging van die verbinding wat berei is. Die sintese van tiasoolaminoosure en die gebruik daarvan vir die sintese van sikliese peptiede word dus bespreek teen die agtergrond van gepubliseerde gegewens ten opsigte van die spektroskopiese eienskappe en sintese van tiasole en tiasoolaminoosure.

2.2 SPEKTROSKOPIESE EIENSKAPPE VAN TIASOLE EN TIASOOLAMINOSURE : 'N LITERATUUROORSIG

2.2.1 ^1H -k.m.r.-spektroskopie

Die ^1H -k.m.r.-spektra van 2- of 4-monogesubstitueerde en 2,4-digesubstitueerde tiasole (48, kyk Tabel 2.1) is opmerklik eenvoudig. Die chemiese verskuiwings van protone op die tiasoolring (sp^2 -koolstofatome) kom by relatief lae veld voor. Die ontskerming is te wyte aan 'n ringstroom wat aan die 'pseudo aromatiese' karakter van

TABEL 2.1 5-Posisie proton chemiese verskuiwings van tiasoolderivate



R_1^a		$\delta(H-5)$ (dpm)	Oplosmiddel	Verwysing
CH_3	H	7.17	$CDCl_3$	57
CH_2CH_3	H	7.18	CCl_4	57
H	CH_3	7.14	$(CD_3)_2CO$	57
H	COOH	8.60	$(CD_3)_2CO$	57
CH_3	CH_3	6.50	CCl_4	57
CH_2CH_3	$C(CH_3)_3$	6.55	CCl_4	57
$CH(CH_3)NH-t-Boc$	$COOCH_3$	8.17	$CDCl_3$	58
$CH(CH(CH_3)_2)NH-t-Boc$	$COOCH_3$	8.18	$CDCl_3$	58
$CH(CH_2CH(CH_3)_2)NH-t-Boc$	$COOCH_3$	8.20	$CDCl_3$	58
$CH(CH(CH_3)CH_2CH_3)NH-t-Boc$	$COOCH_3$	8.23	$CDCl_3$	58
$CH(CH_2C_6H_5)NH-t-Boc$	$COOCH_3$	8.06	$CDCl_3$	58
$CH(CH_2CH_2CONH_2)NH-ebz$	$COOCH_3$	8.13	$CDCl_3$	58
$CH(CH_2CH_2CONH_2)NH-ebz$	$COOCH_2CH_3$	8.52	$CDCl_3$	59
$CH(CH_2CH_2CONH_2)NH-ebz$	COOH	8.46	$(CD_3)_2SO$	59
$CH_2NH-ebz$	$COOCH_3$	8.12	$CDCl_3$	58
CH_2NH_3Cl	COOH	8.60	$(CD_3)_2SO$	60

a : *t-Boc* = tersiere-Butoksikarboniel

Cbz = Bensieloksikarboniel

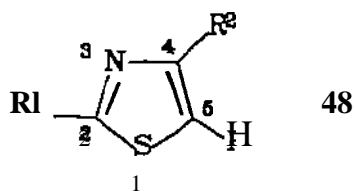
tiasool sowel as aan die anisotropie van beide swael- en stikstofheteroatome toegeskryf kan word.⁵⁶ Die chemiese verskuiwing van die 5-proton is van belang ten opsigte van die navorsingswerk wat in hierdie tesis beskryf word aangesien die 2- en 4-posisies gesubstitueerd is in tiasoolaminosure. Proton chemiese verskuiwings van die 5-posisie vir verskeie tiasoolderivate word in Tabel 2.1 aangetoon.⁵⁷⁻⁶⁰

Dit is duidelik dat die chemiese verskuiwings weens die aard van die substituentte heelwat varieer (6.5-8.6 dpm). Die C-5 protone van 2-gesubstitueerde tiasoolkarboksiesure en die metielesterderivate daarvan, resoneer in die klein gebied van 8.05-8.60 dpm. Dit is egter interessant om op te merk dat H-5 van die etielester van (Gln)Thz (δ 8.52) by heelwat laer veld as die ooreenkomstige metielester (δ 8.13) resoneer. Die natuurlike tiasoolbevattende sikliese peptiede ulisiklamied³¹ (32), ulitiasiklamied³¹ (28), dolastatien 3²⁹ en die patellamiede A-e³² (33, 34, 35) toon almal H-5 resonansies tussen 7.39 en 8.08 dpm. Die proton op C-5 van die dolafenienkomponent van dolastatien 10⁵⁵ (47) resoneer as 'n doeblet ($J = 3.3$ Hz) by 7.25 dpm en die C-4 proton as 'n doeblet by 7.72 dpm.

2.2.2 ¹³C-k.m.r.-spektroskopie

Die koolstof-13 chemiese verskuiwings van baie tiasoolderivate is sterk afhanklik van die aard van die substituentte.⁵⁶ In Table 2.2 word die C-13 chemiese verskuiwings van verskeie 2,4-digesubstitueerde tiasoolderivate, insluitende die natuurlike sikliese peptiede dolastatien 3,²⁹ ulisiklamied³¹ (32), ulitiasiklamied³¹ (28) en die patellamiede A-e³² (33, 34, 35) opgesom. Op grond hiervan kan die korrektheid van Ireland *et al.*³² se C-13 toekennings aan die drie patellamiede A-e dus bevraagteken word. Indien die toekennings van die C-2 en C-4 tiasoolkoolstowwe egter omgeruil word is daar 'n goeie korrelasie met die ooreenkomstige waardes in Table 2.2, 'n ooreenkoms waaraan al die peptiede 28, 32-35 en dolastatien 3 voldoen. Indien bogenoemde in ag geneem word, is die uiters goeie ooreenkoms in die C-13 chemiese verskuiwings vir die tiasoolkomponente van die reeks sikliese peptiede heel opmerklik.

TABEL 2.2 ^{13}C Chemiese verskuiwings van 2,4-digesubstitueerde tiasoolderivate



Tiasoolderivate	δ C-2 (dpm)	δ C-4 (dpm)	δ C-5 (dpm)	Verwysing
2,4-dimetiel	164.5	152.7	113.1	61
2-metiel-4-t-butiel	164.1	166.4	103.8	61
dolastatien 3	149.1	161.0	124.4	29
ulisiklamied (32)	148.6	160.2	123.8	31
	151.4	161.1	124.3	
ulitiasiklamied (28)	148.9	160.5	123.8	31
	149.2	160.1	124.1	
patellamied A (33) (2x)	160.5	149.1	123.0	32
patellamied B (34)	161.8	147.6	123.6	32
	161.6	147.2	123.6	
	161.8	147.5	123.7	
patellamied C (35)	161.8	147.2	123.7	32

2.2.3 Ultravioletspektroskopie

Die ultravioletspektra van tiasoolderivate vertoon twee bande, naamlik A en B. Band A kom ooreen met $\text{In } \pi \rightarrow \pi^*$ oorgang en word in die omgewing van 230-250 nm gevind.⁵⁶ Hierdie karakteristieke absorpsie is van primere belang in tiasoolamino- sure en is gewoonlik die enigste wat in die literatuur gerapporteer word.^{7b} Tiasool- aminosure 3 en 5-9 (kyk Skema 1.1) toon almal absorpsiemaksima tussen 234-237

nm.^{7b} Die absorpsies en hul ooreenkomstige uitdowingskoeffisiente is in Tabel 2.3 getabuleer.

TABEL 2.3 Ultravioletspektra van tiasoolaminosure

Verbinding"	λ_{maks} (nm)		Oplosmiddel	Verwysing
(Leu)Thz (3)	236-238	7200	2N HCl	7b
(Phe)Thz (5)	235-237	6430	2N HCl	7b
(Val)Thz (6) ^b	235	5740	EtOH	7b
(Ala)Thz (1)	234	5510	H ₂ O	7b
(Gly)Thz (8)	234	5460	H ₂ O	7b
(Gln)Thz (9) ^c	235	6570		60

waar a Sien Skema 1.1 vir strukture

b Hydrochloried

c : Ne-Cbz-derivaat.

Die tiasoolbevattende sikliese peptiede dolastatin ³²⁹, ulisiklamied³¹ (32) en ulitia-sikiamied³¹ (28) toon karakteristieke absorpsies by 238 nm ($\epsilon = 8960$, MeOH), 248 nm [$\epsilon = 7900$, MeOH) en 247 nm ($\epsilon = 7000$, MeOH) onderskeidelik.

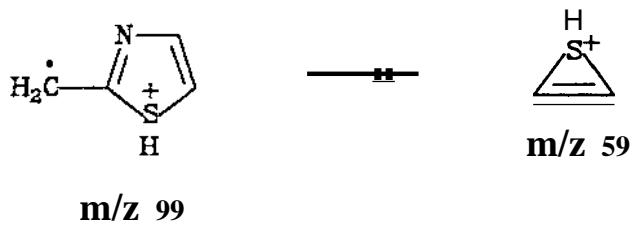
2.2.4 Infrarooisoektroskopie

In die algemeen is die infrarooispektra van tiasole onvolledig in die literatuur gerapporteer aangesien die tiasoolabsorpsiebande selde volledig toegeken word.⁵⁶ In die geval van 2,4-digesubstitueerde tiasooiderivate het 'n paar insiggewende infrarooistudies in die literatuur verskyn.^{4f,56,62} Gemiddelde vibrasionele frekwensies van die C-H

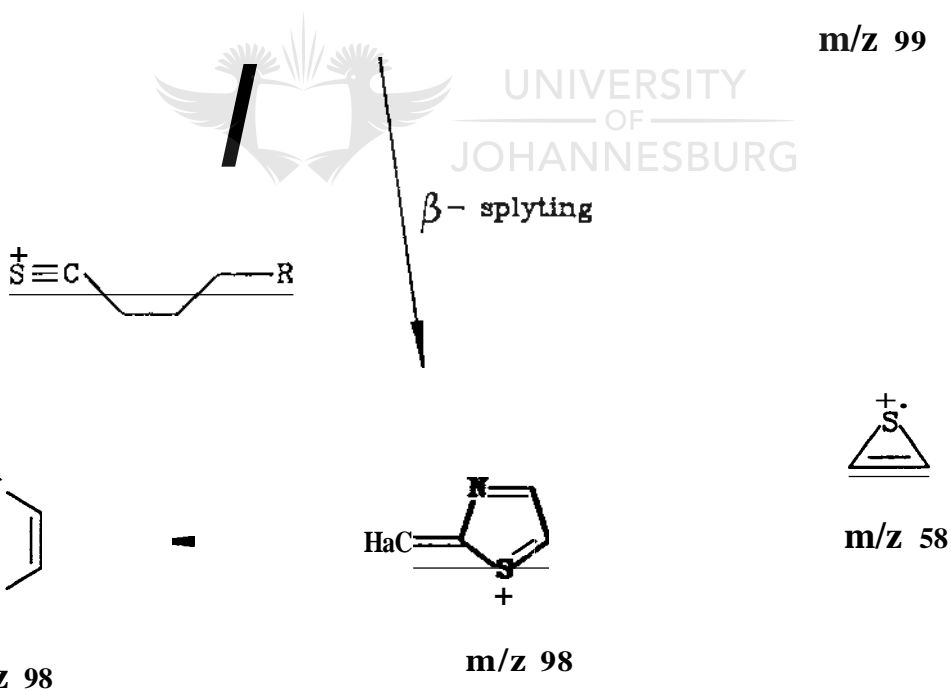
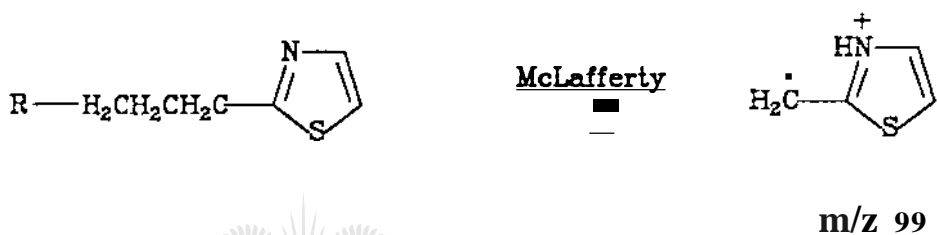
binding op die 5-posisie van tiasole kom by 3121 ± 11 , 1083 ± 55 en 707 ± 32 cm^{-1} voor. Die bande kom met in die vlak verlenging (ν CH), in die vlak buiging (δ CH) en uit die vlak buiging (γ CH) modusse respektiewelik ooreen.⁵⁶ Frekwensies van die verskeie ringvibrasies van 2,4-digesubstitueerde tiasoolderivate is ook beskryf.⁵⁶ In die vlak simmetriese ringvibrasies kom by 1541, 1517, 1324, 1280, 959, 861, 690 en 588 cm^{-1} voor en uit die vlak vibrasies is by 638 en 543 cm^{-1} waargeneem. Ongelukkig is die infrarooispektra van die gesintetiseerde tiasoolaminosure 3 en 5-9 (Skema 1.1) nie aangeteken nie.^{7b} Vir dolastatien 3 is drie absorpsiebande naamlik 1445, 1240 en 1065 cm^{-1} spesifiek aan die tiasoolkomponente toegeken.²⁹

2.2.5 Massaspektroskopie

Vanwee die aromatiëse karakter van tiasoolringe word, in die algemeen, In relatiewe intense molekulere ionpiek in die massaspektra van tiasole aangetref.⁶³ Elektronimpak op tiasole gee aanleiding tot die begunstigde klowing van die S-e(2) en N-e(4) bindings. Fragmentasie gee onder andere In tiireniumioon.^{63a} In die geval van 2-gesubstitueerde tiasole lei bogenoemde tipe fragmentasie tot R(2)CN eliminasie. 2-Alkielgesubstitueerde tiasole ondergaan β -slyting relatief tot die ring, terwyl In McLafferty-herrangskikking voorkom in gevalle waar die 2-substituent ten minste drie koolstofatome bevat.^{63c,63d,64} Substituente op die 4- of 5-posisies van die tiasoolring kan ook tot alliliese tipe klowing aanleiding gee. Die belangrikste elektronimpakgeïnduseerde klowingstipes van tiasole word in Skema 2.1 opgesom.



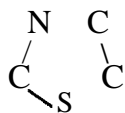
tliClaffertY



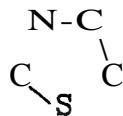
Skema 2.1⁵⁶ : Massaspektroskopiese fragmentasie van 2-gesubstitueerde tiasole.

2.3 DIE SINTESE VAN TIASOLE EN TIASOOLAMINOSURE: 'N LITERATUUROORSIG

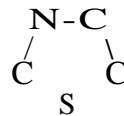
'n Sintetiese taksonomie wat die baie groot hoeveelheid sintetiese metodes van tiasole klassifiseer, het deur die jare ontwikkel. Die indeling is op die aard van die raamwerk van die komponente wat verbind word om die tiasoolringsstelsel te vorm, gebaseer (kyk Skema 2.2).⁶⁵ Hierdie benadering sal in die bespreking gevolg word. Etlike honderde voorbeelde van toepaslike sinteses is reeds bekend,⁶⁶ en slegs tipiese voorbeelde sal genoem word.



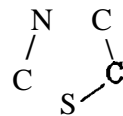
Tipe A



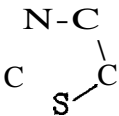
Tipe B



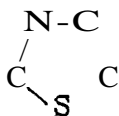
Tipe C



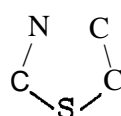
Tipe D



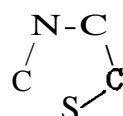
Tipe E



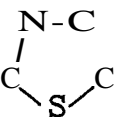
Tipe F



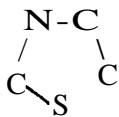
Tipe G



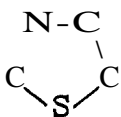
Tipe H



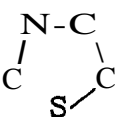
Tipe J



Tipe K



Tipe N



Tipe O

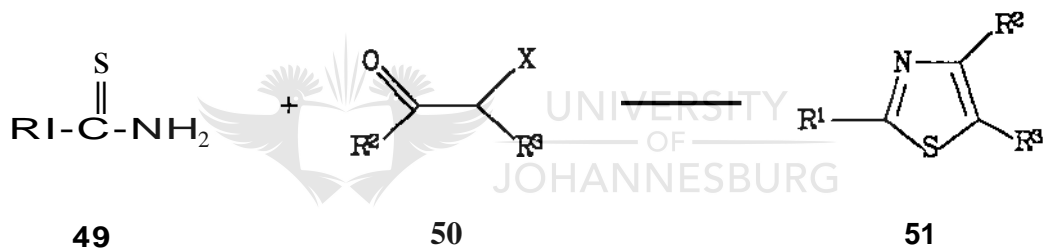
Skema 2.2

2.3.1 Die Tipe A Hantzsch-tiasoolsintese/

Die tipe A sintese, wat deur Hantzsch vir die eerste keer in 1887 beskryf is,⁶⁷ is by verre die belangrikste en veelsydigste van al die tipes tiasoolsinteses.⁶⁶ In die algemeen behels die Hantzsch-sintese die siklisering van o-halokarbonielverbindings met 'n groot verskeidenheid van tioamide en verwante verbindinge.

a. Reaksie met tioamide:

Deur die oordeelkundige keuse van halogeenbevattende karbonielreaktante en tioamiedsubstrate kan alkiel-, ariel-, hetero- en heteroarielsubstituenten in enige van die 2-, 4- of 5-posisies van die tiasoolring geplaas word, soos vir 'n algemene geval in Skema 2.3 aangetoon word. In Tabel 2.4 word sommige van die variasies wat sodoende verkry kan word, geïllustreer.⁶⁸



Skema 2.3

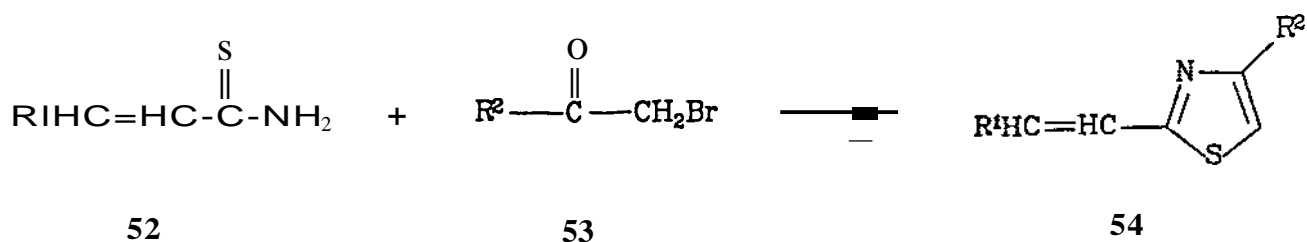
Die kondensasie van tioformamied met o-halokarbonielverbindings lei tot die vorming van 2-ongesubstitueerde tiasole (Tabel 2.4). Byvoorbeeld, tioformamied (49, $R^1 = H$) reageer met chloorasetaldehyd (50, $X = Cl, R^2 = R^3 = H$) om ongesubstitueerde tiasool (51, $R^1 = R^2 = R^3 = H$) te lewer.⁶⁹ Die sikliseringsreaksie van o-haloalkielketone (50, $R^3 = H$) met alkieltioamide (49, $R^1 = \text{alkiel}$), of derivate daarvan, vorm 2,4-dialkiel-tiasole (51, $R^3 = H$). 2,4-Dimietiltiasool (51, $R^1 = R^2 = CH_3, R^3 = H$) en 2-etiël-4-mietiltiasool (51, $R^1 = CH_2CH_3, R^2 = CH_3, R^3 = H$) is vir die eerste keer in 1890 deur Hubacher⁷⁰ en Roubel⁷¹ vanuit chloorasetoon en tioasetamied, en chloorasetoon en tiopropionamied onderskeidelik, berei. As gevolg van die onstabieleit van die tio-

TABEL 2.4 Sintese van tiasool 51⁶⁸

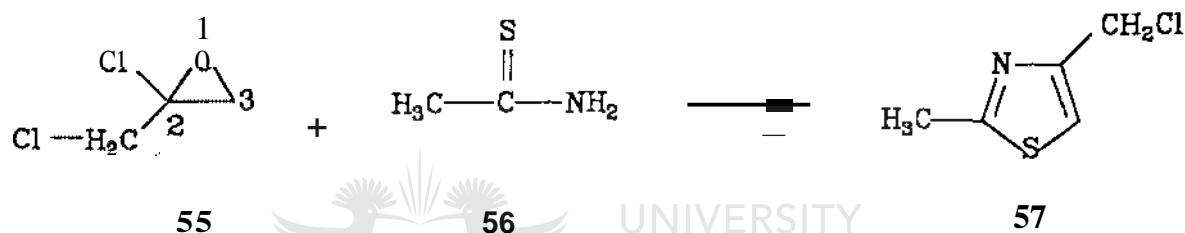
Tiasoolsubstituent			Tioamied	Halogeenverbinding (X = Cl, Br)
2	4	5		
H	H	H	HCSNH ₂	XCH ₂ CHO en derivate
H	R ²	H	HCSNH ₂	R ² COCH ₂ X
H	H	R ³	HCSNH ₂	R ³ CHXCHO
H	R ²	R ³	HCSNH ₂	R ² COCHXR ³
R ¹	H	H	R ¹ CSNH ₂	XCH ₂ CHO en derivate
R ¹	H	R ³	R ¹ CSNH ₂	R ³ CHXCHO
R ¹	R ²	H	R ¹ CSNH ₂	R ² COCH ₂ X
R ¹	R ²	R ³	R ¹ CSNH ₂	R ² COCHXR ³

amiede in In suurmedium, was die opbrengste in beide gevalle egter laag. Opbrengste van tiasoolvormende reaksies is aansienlik verhoog deur die direkte bereiding van die tioamiede in die reaksiemengsel.⁷² Deur die meer reaktiewe α -broomketone te gebruik is die opbrengste van bogenoemde kondensasiereaksies verder verbeter tot 70-76%.⁷³ Dit word nou algemeen aanvaar dat broomketone, in die sintese van 2,4-digesubstitueerde tiasole, beter opbrengste lewer as die ooreenkomstige chloorderivate. 2-Arielvinieltiasole (54) is vanaf 52 en broommetielketone (53), met R¹ = ariel of heteroariel en R² = Ph (90% opbrengs) of CH₃ (55% opbrengs), berei⁷⁴ (Skema 2.4).

Mettertyd het baie variasies van die Hantzsch-sintese ontstaan.⁷⁵ In Interessante voorbeeld is waar die o-haloketoon deur die 2-chlooroksiraan (55) vervang word om, na reaksie met tioasetamied (56), 57 in In opbrengs van 77% te lewer (kyk Skema 2.5).⁷⁶



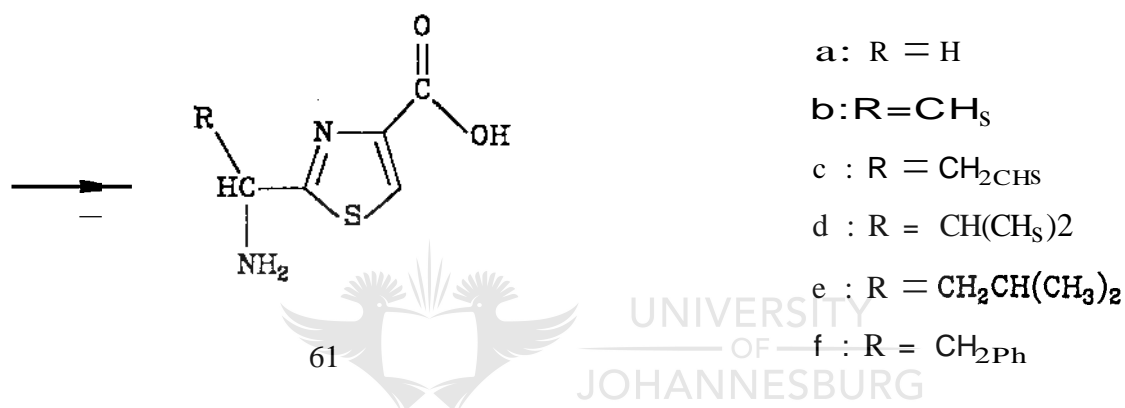
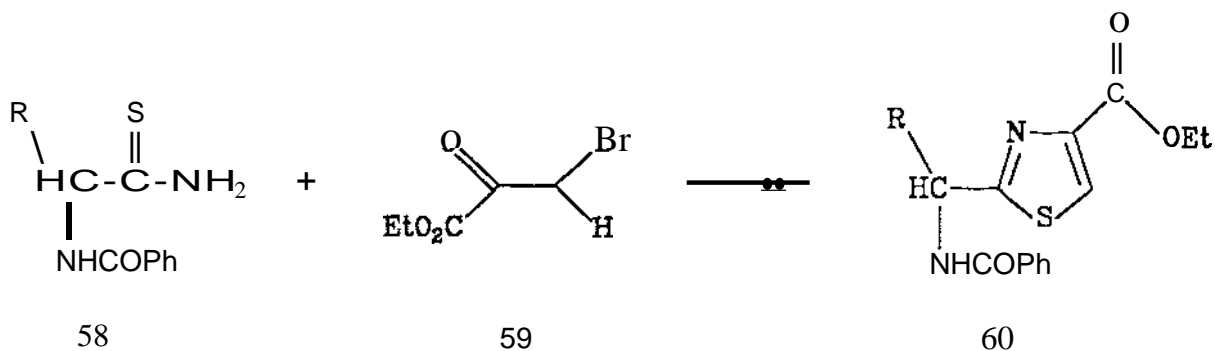
Skema 2.4



Skema 2.5

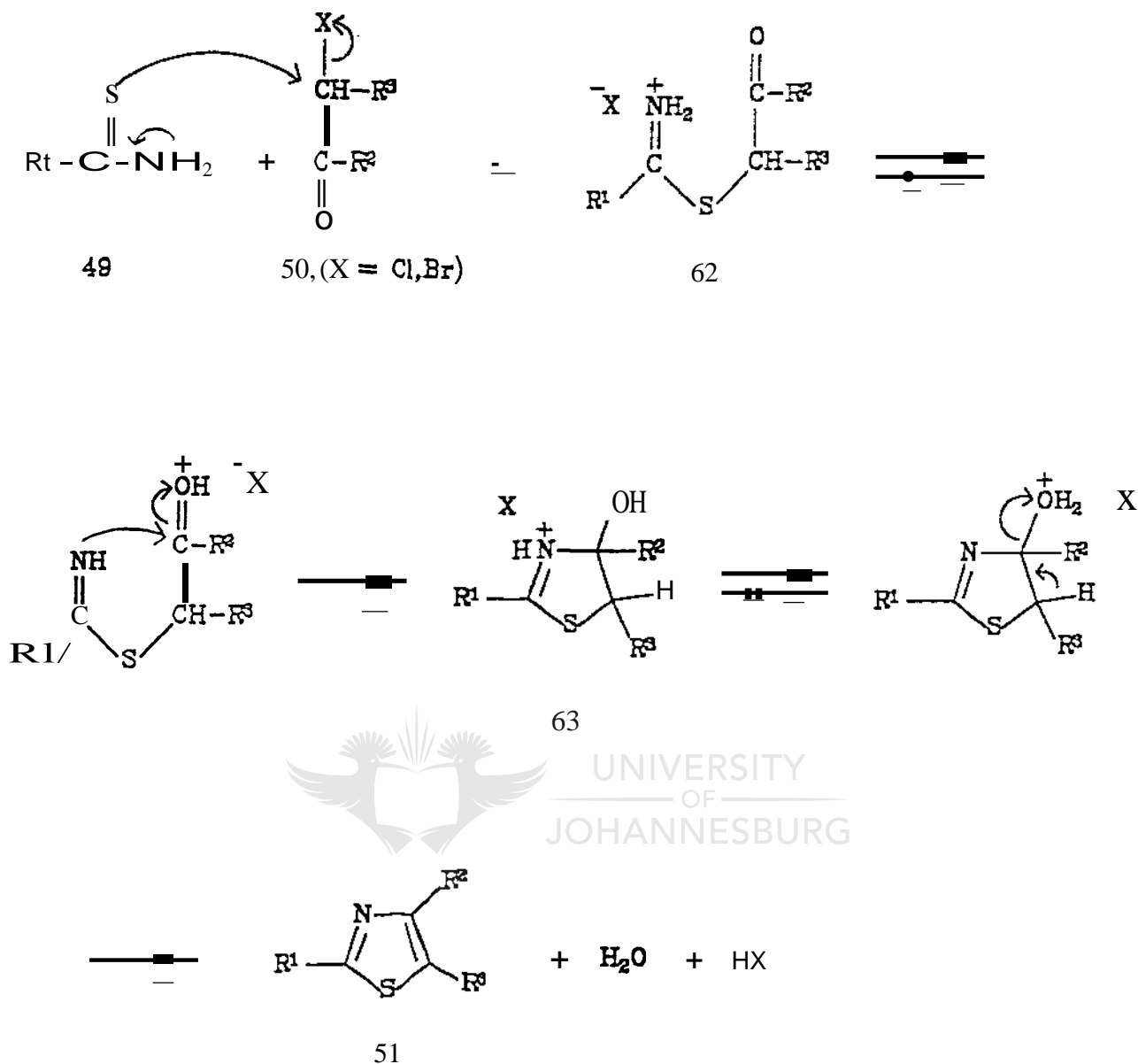
Heelwat gefunksionaliseerde tiasoolverbindings is d.m.v. die Hantzsch-metode gesintetiseer.⁷⁷ Van die eerste voorbeelde hiervan is die sintese van tiasoolaminosure wat as afbouprodukte van tiostrepton (13) geïdentifiseer is (kyk Skema 2.6).⁷ As gevolg van die stabiliteit van beide reagens en substraat is tiasoolkarboksiesure van die maklikste bereibare tiasoolderivate. 'n Reeks rasemiese esters van 2-(1'-aminoalkiel)tiasool-4-karboksiesure (60a-f) is deur die reaksies van etiel broompiruvaat (59) met geskikte gesubstitueerde tioamiede (58) gesintetiseer.^f Ontskerming van verbindings 60a-f het die ooreenkomstige aminosuurderivate 61a-f gelewer;" Die probleem van rasemisasie en pogings om dit te bekamp, sal later in die hoofstuk breedvoerig bespreek word.

Die meganisme van die Hantzsch-reaksie is eenduidig vasgestel⁷⁸ en word in Skema 2.7 aangetoon. In die eerste stap vind 'n S_N2-substitusie, met die tioamied as nukleofiel,



Skema 2.6 : Hantzsch-sintese van Tiasoolaminosuurderivate.⁷

plaas. Aanval vind *via* die meer reaktiewe swaelatoom plaas. In 'n aantal gevalle, byvoorbeeld met die substituenten $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ en $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$, en $\text{R}^1 = \text{CH}_3$ of Ph en $\text{R}^2 = \text{CH}_2\text{Cl}$, is die oopketting o-tloketoon tussenproduk (**62**) by lae temperatuur geïsoleer.⁷⁹ In die volgende stap ondergaan die o-tloketoon (**62**) transprotonering en siklisering om die 4-hidroksi- Δ^2 -tiasolien (**63**) te lewer. Die onstabiele tiasolientussenproduk is in heelwat gevalle by lae temperatuur geïsoleer.^{80,81} Die hidroksitiasolientussenproduk (**63**) word deur suurgekataliseerde dehidrasie na die ooreenkomstige tiasoolderivaat (**51**) omgesit. Dit is interessant om daarop te let dat in alle gevalle slegs een van die tussenprodukte, d.w.s. of die o-tloketoon (**62**) of die hidroksitiasolien (**63**), uit die reaksiemengsels geïsoleer is. Dit dui daarop dat die o-tloketoon (**62**) in ewig

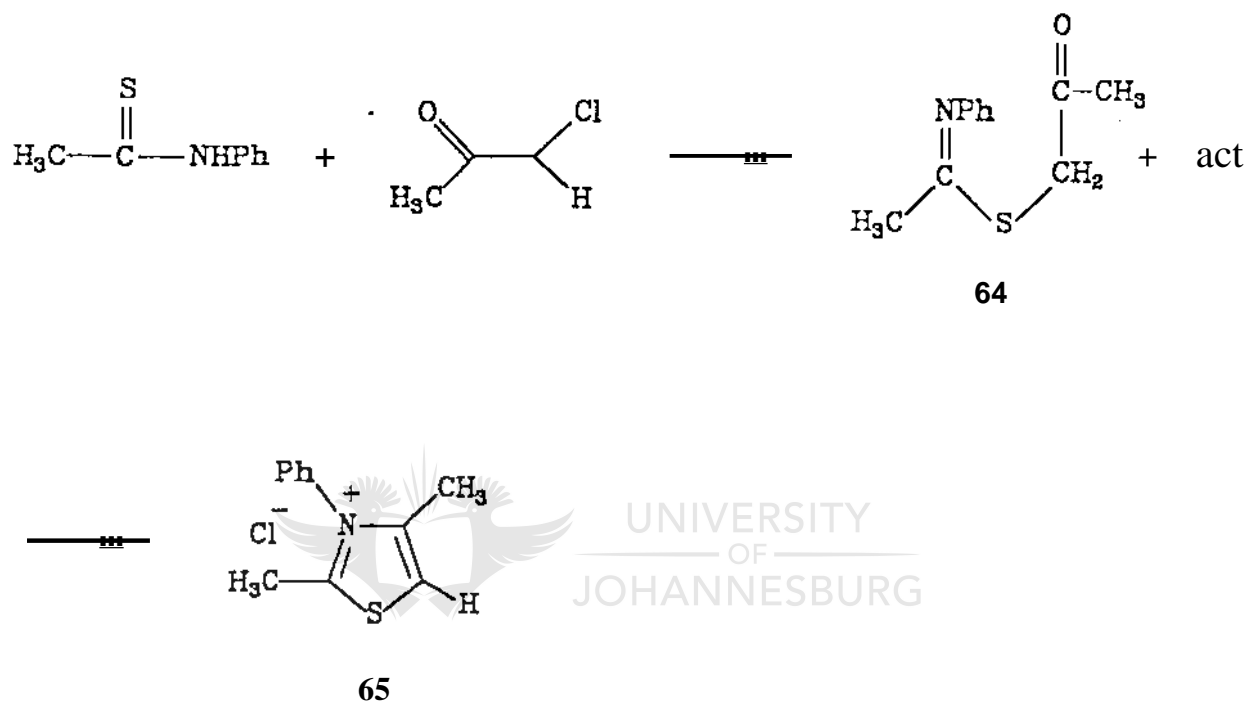


Skema 2.7: Mekanisme van die Hantzsch-sintese

met die hidroksitasolien (63) verkeer⁸¹ en dat die ewewigskonstante deur die aard van die substituent bepaal word.

- b. Reaksie met N-gesubstitueerde tioamide : die hereiding van tiasoliumsoute
 N-gesubstitueerde tiasolieliumsoute word vanaf die ooreenkomstige monogesubstitueerde tioamide deur toepassing van die Hantzsch-sintese verkry. Die metode is veral handig vir die bereiding van tiasolieliumverbindings waar die substituent

op die ringstikstof nie direk deur N-alkilering ingevoer kan word nie, byvoorbeeld met die sintese van ariel- of heterieltiasoliumsoute. In beide gevalle kan die α -tioketoon-tussenproduk (64) geïsoleer word⁸² (Skema 2.8). Omsetting van 64 na die tiasoliumsout (65) word deur verhitting bewerkstellig.⁸²

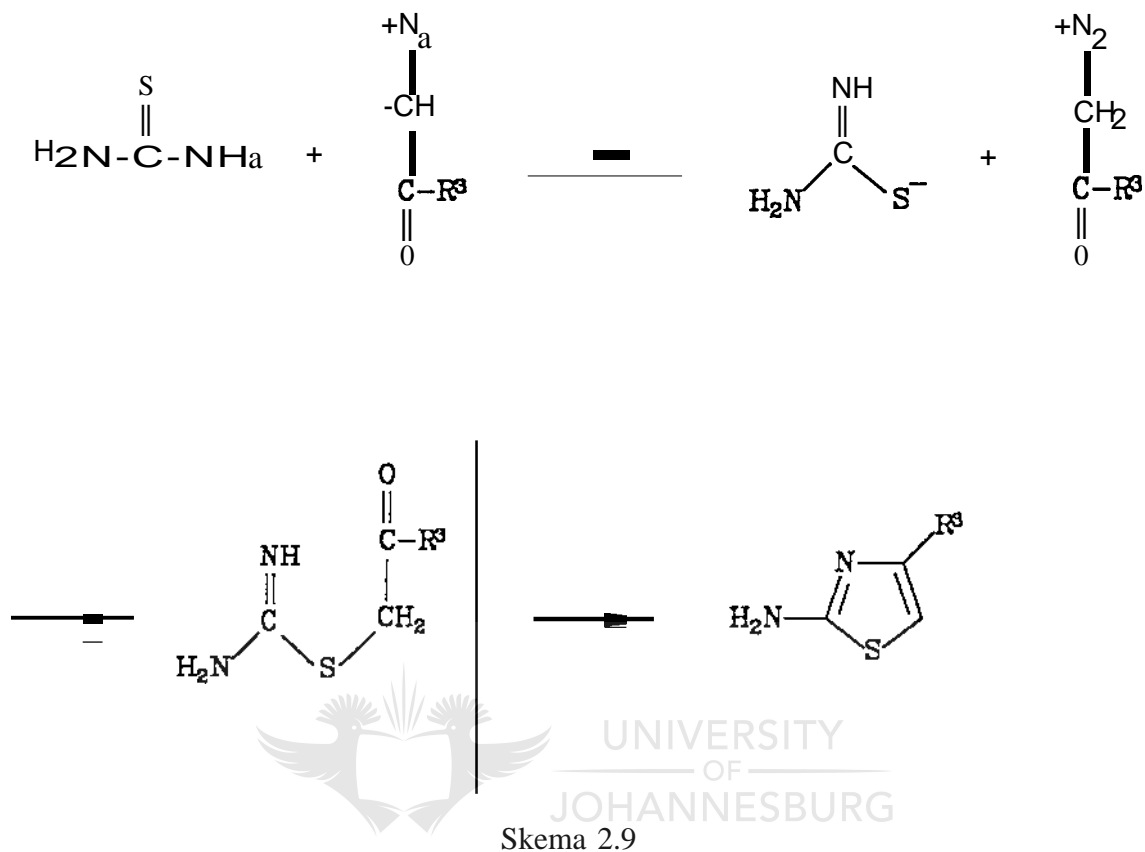


Skema 2.8

c. Reaksie met tiourea : die bereiding van 2-aminotiasole

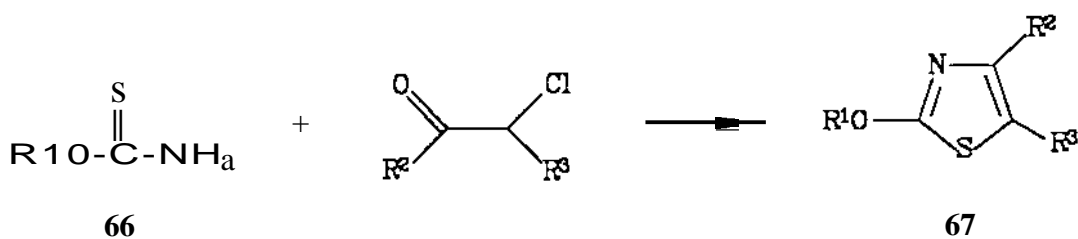
Die mees doeltreffende sintese van tiasoolderivate, in die algemeen, behels die kondensasie van tiourea met o-haloketone of -aldehyde om 2-aminotiasole te lewer.⁸³ Die siklisering van N-gesubstitueerde tiourea met o-halokarbonelverbinding lewer 2-monogesubstitueerde aminotiasole.⁸⁴ Deur o-haloketone met o-dtiasoketone in die Hantzsch-sintese te vervang, word 2-aminotiasole op 'n baie elegante wyse gesintetiseer⁸² (Skema 2.9). 2-Aminotiasole is *via* diasotisering en daaropvolgende reduksie met H₃P0₂, 'n belangrike tussenproduk vir die bereiding van 2-ongesubstitueerde tiasole. Die ooreenkomstige 2-halogeën- en 2-sianotiasole kan deur toepassing

van die Sandmeyer-reaksie verkry word.⁸²



d. Reaksie met soute en esters van tiokarbamiensuur die bereiding van 2-hidroksitiasole

Hierdie metode, wat oorspronklik deur Marchesini in 1893 ontwikkel is,⁸⁵ behels die kondensasie van 'n o-halokarbonielverbinding met ammoniumtiokarba-

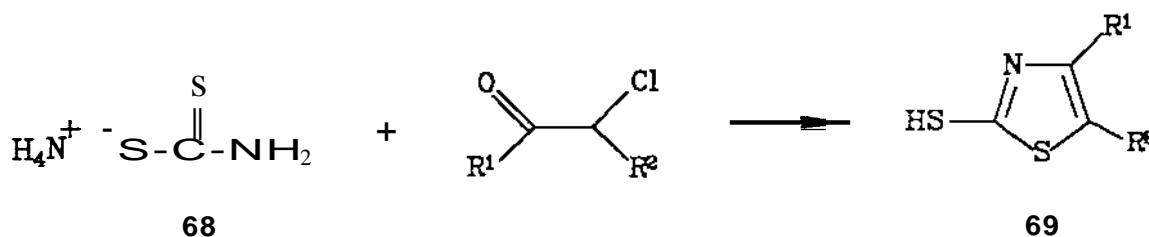


Skema 2.10

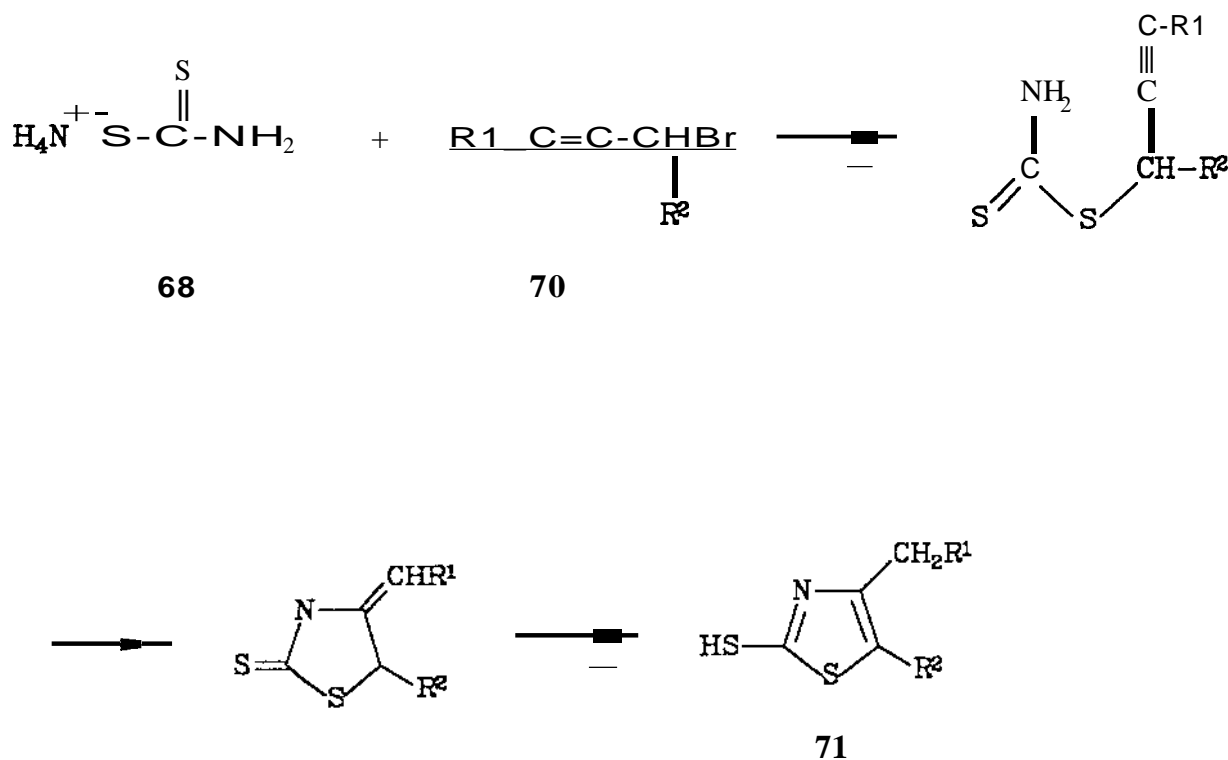
maat (66, $R^1 = NH_4$, Skema 2.10) of die ooreenkomstige esters (66, $R^1 =$ alkiel). Die gevormde 2-hidroksitiasool (67, $R^1 = H$) kan kwantitatief na die ooreenkomstige 2-chloortiasool omgesit word deur die reaksie met $POCl_3$. In gevalle waar die omsetting van 2-amino- na 2-ehloortiasool nie suksesvol is nie, kan bogenoemde metode as 'n aantreklike alternatief dien.⁸²

e. Reaksie met soute of esters van ditiokarbamiensuur die bereiding van 2-merkaptotiasole

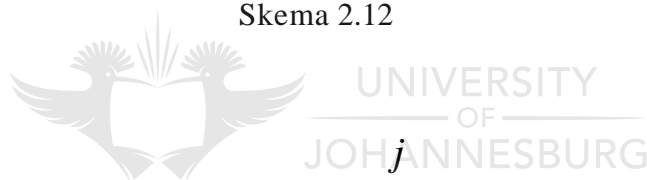
Die sintese van 2-merkaptotiasoolderivate (69) vanaf o-halokarbonielverbindinge en ammoniumditiokarbamaat (68) is deur Mirolati in 1893 ontwikkel (Skema 2.11).⁸⁶ Hierdie klas van verbindinge word as versnellers in die vulkanisering van rubber gebruik. Die kondensasie van o-broomalkyne (70) met ammoniumditiokarbamaat (68) in alkoholiese oplossing lewer ook 2-merkaptotiasole (71, Skema 2.12).^{82,87} Die merkaptotiasoolderivate word nie in die vry vorm (71) geïsoleer nie, maar die reaksiemengsel word onmiddellik met metieljodied behandel om die ooreenkomstige S-metielderivate te verkry.



Skema 2.11



Skema 2.12

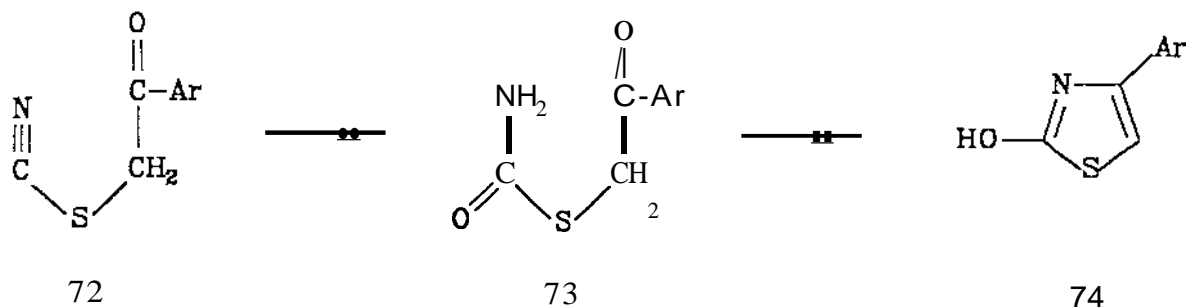


2.3.2 Die tiDe A Tcherniac-tiasoolsintese

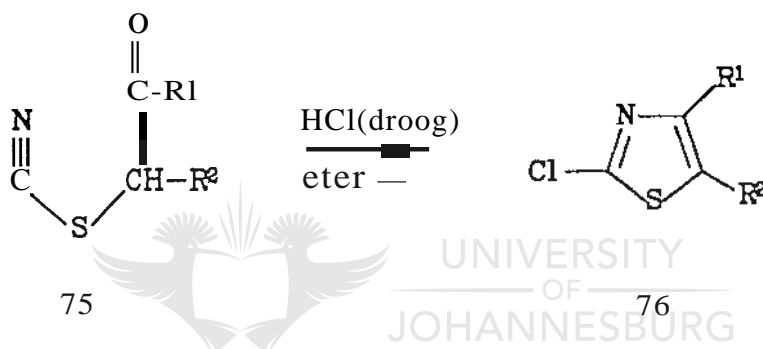
'n Groot verskeidenheid van 2-gesubstitueerde tiasole kan vanaf o-tioslano-ketone gesintetiseer word volgens die metode wat Tcherniac in 1892 ontwikkel het.⁸⁸ Die α -tiosianoketone kan maklik vanaf α -halokarbonielverbindings en 'n metaaltiosianaat berei word, alhoewel hierdie verbindings uiters labiel is en gereedlik isomeriseer.⁸²

Siklisering van α -tiosianoketone kan onder 'n verskeidenheid van kondisies bewerkstellig word. Byvoorbeeld, die siklisering van o-tiosianoasetofenoon (72, Skema 2.13) in waterige suuroplossing vind *via* 73 plaas om na verdunning met water, 4-ariel-2-hidroksitiasool (74) in hoë opbrengs te lewer.^{82,89}

2-ehloortiasoolderivate (76, Skema 2.14) word deur die behandeling van o-tioslano-



Skema 2.13

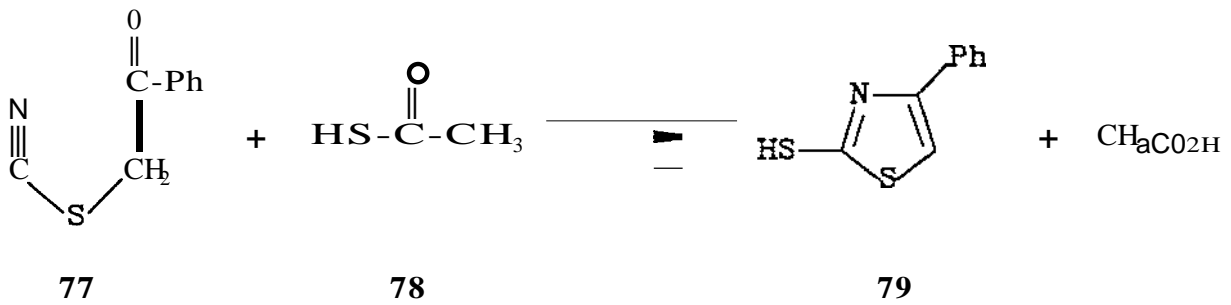


Skema 2.14

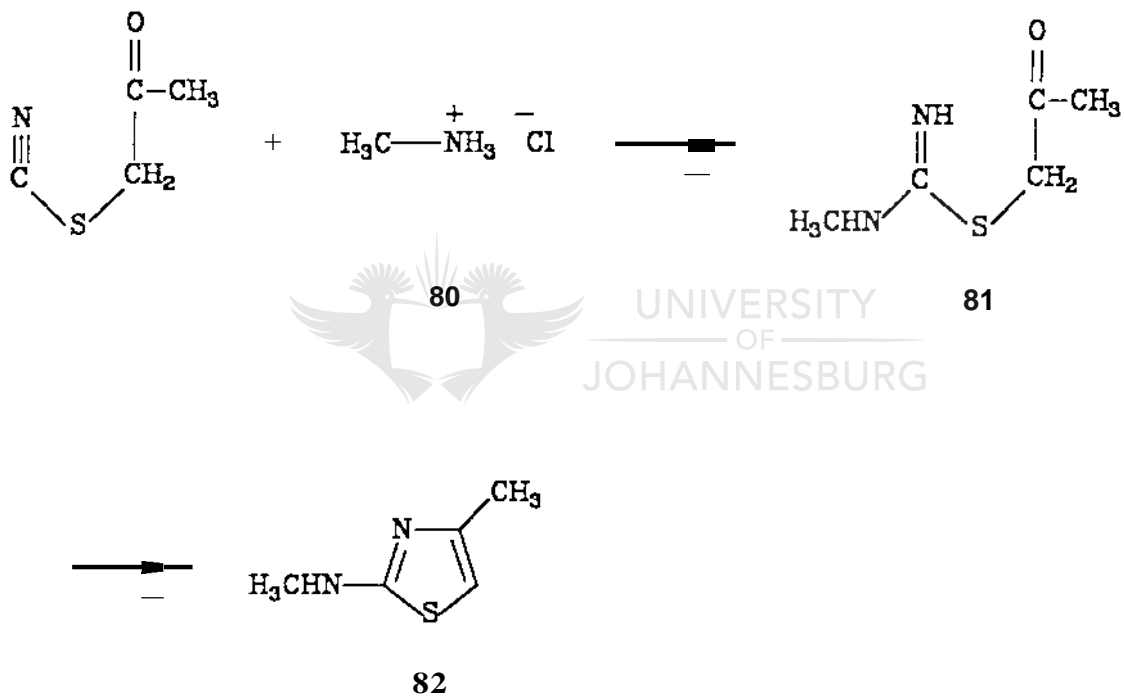
ketone (75) met droe HCl in eteroplossing by lae temperatuur berei.⁸² Onder dieselfde kondisies lewer waterstofbromied die ooreenkomstige 2-broomtiasole.

Die siklisering kan ook deur behandeling van tiosure bewerkstellig word. Byvoorbeeld, tiasynsuur (78) reageer met o-tiosianoasetofenon (77) om 2-merkaptio-4-fenieltiasool (79) te vorm⁸² (Skema 2.15).

2-Aminotiasole en die N-gesubstitueerde derivate daarvan word deur die reaksie van o-tiosianoketone met ammoniumchloried of alkielammoniumchloriede gevorm (Skema 2.16). Byvoorbeeld, metielammoniumchloried (80) reageer met o-tiosianoketoon by OoC in eter om die tussenprodukt 81 in In ophrengs van 80% te lewer. Die siklisering van



Skema 2.15



Skema 2.16

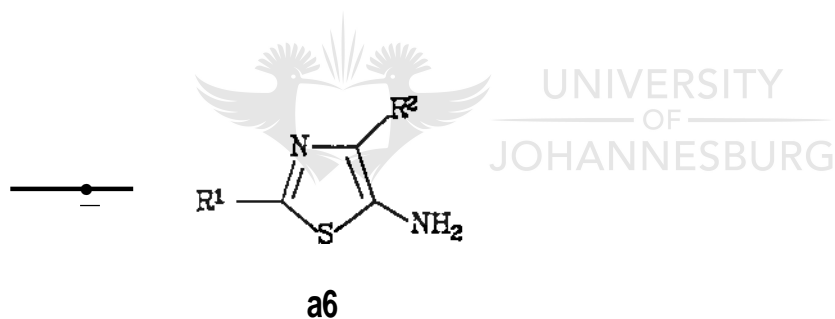
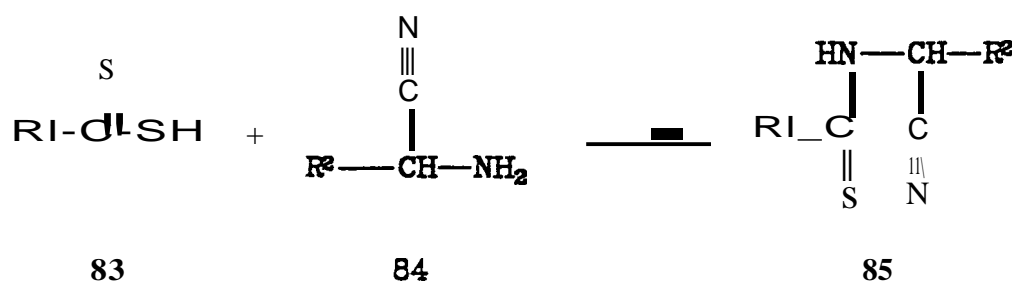
81 vind onder verhitting of behandeling met verdunde HCl plaas om 4-metieI-2-metieI-aminotiasool (82) te Iewer.⁸²

2.3.3 Die tiDe B Cook-Heilbron-tiasoolsintese

Hierdie sintese, wat oorspronklik deur Cook en Heilbron in 1947 voorgestel is,⁹⁰ Iewer deur die reaksie van In α -aminonitriël met soute en esters van ditiosure,

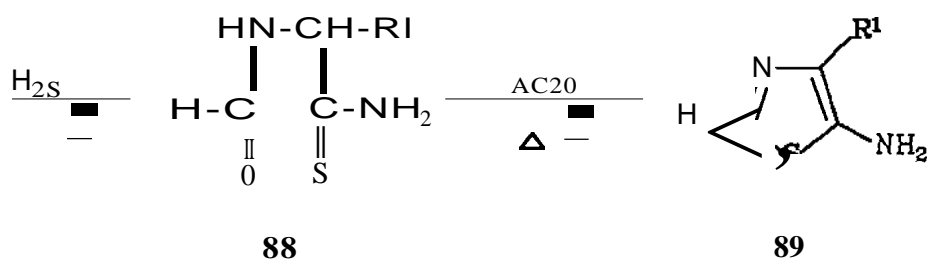
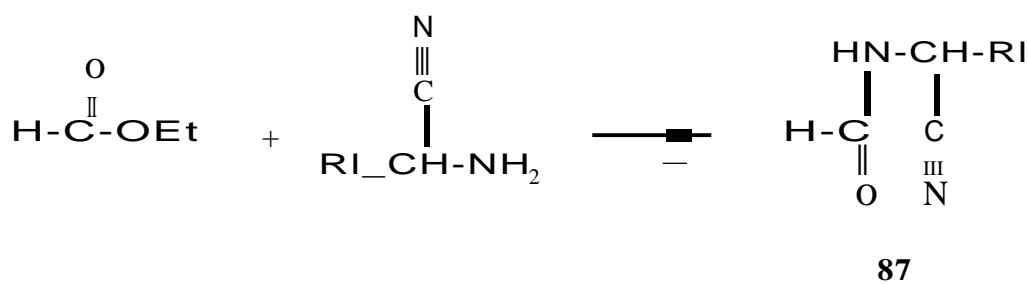
koolstofdissulfied, koolstofoksisulfied of *isotiosianate* onder milde kondisies, 5-aminotiasole met 'n verskeidenheid van substituentte op die 2-posisie.

Die soute of esters van beide ditiomiersuur (83) of ditiofenasynsuur kondenseer met o-aminonitriële (84) om 5-aminotiasole (86) met $R^1 = H$, bensiel en $R^2 =$ feniel, etoksikarboniel of fenoksikarboniel in redelike hoë opbrengste te lewer (Skema 2.17).^{S2} Die asikliese tioamiedtussenproduk (S5) is in sommige gevalle geïsoleer.⁸²



Skema 2.17

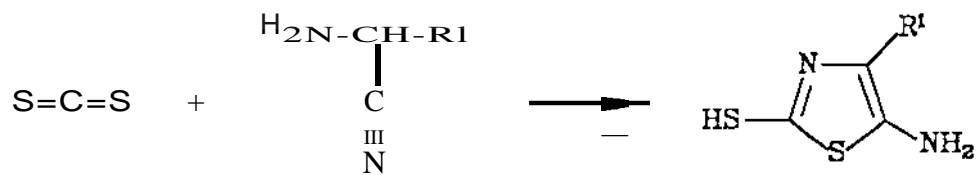
'n Alternatiewe metode vir die sintese van 2-ongesubstitueerde 5-aminotiasole (89) vanaf etielformiaat word in Skema 2.18 aangetoon.^{S2} Die α -aminonitriël reageer met etielformiaat om die α -amldonitrieltussenprcduk (S7) te lewer, wat op sy beurt met H_2S na die ooreenkomstige tioamied (88) omgeskakel word. 5-Aminotiasool (S9) word tydens reflux van 88 in asynsuuranhidried gevorm. Die ooreenkomstige reaksies van koolstofdissulfied,^{S2} koolstofoksisulfied^{S2} en isotiosianate⁸² met o-arnlnonitriële word in Skemas 2.19, 2.20 en 2.21 onderskeidelik geïllustreer.



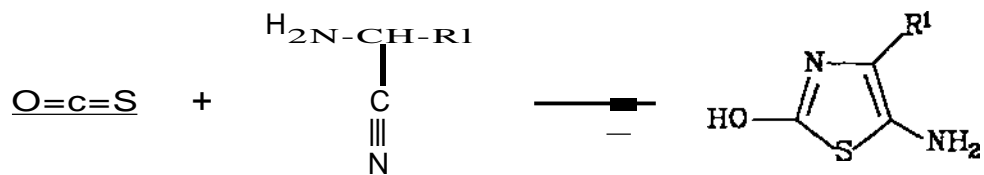
Skema 2.18



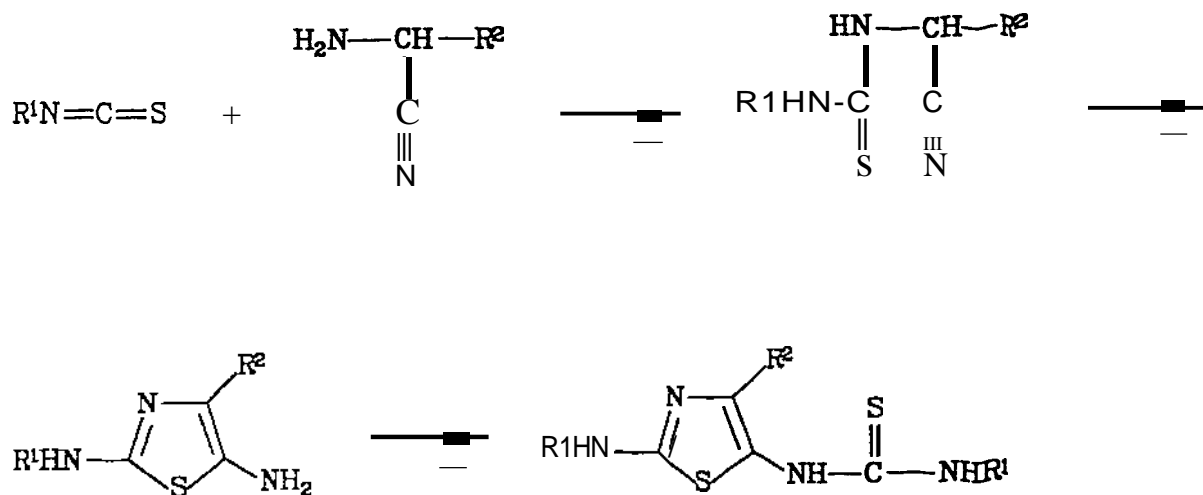
UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG



Skema 2.19



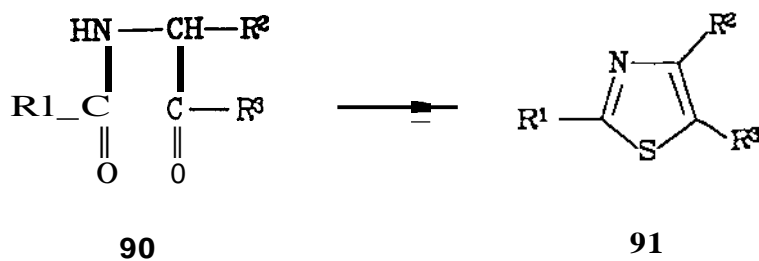
Skema 2.20



Skema 2.21

2.3.4 Die tiRe C Gabriel-tiasoolsintese

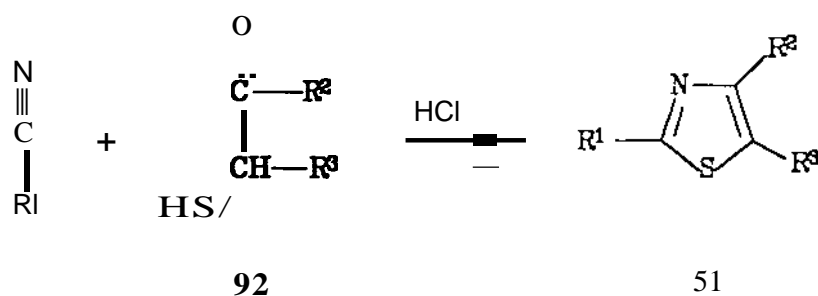
Die reaksie, wat deur Gabriel in 1910 ontwikkel is,⁹¹ behels die reaksie van 'n asielaminoketoon (90) met 'n stoigiometriese hoeveelheid van fosforpentasulfied om tiasoolderivate (91) te lewer. Die reaksie (Skema 2.22) word vergelyk met die vorming van ander 5-lid suurstof- en swaelbevattende ringe vanaf 1,4-dikarbonielverbindings. Die metode word egter selde gebruik en is tot die sintese van 2- of 5-gesubstitueerde of 2,5-digesubstitueerde alkiel-, arieI- of alkoksitiasole beperk.⁸²



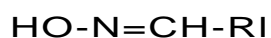
Skema 2.22

2.3.5 Die tiDe D tiasoolsintese

Hierdie benadering word in Skema 2.23 geïllustreer. Buiten o-halokarbonleverbindinge, word 2-merkaptoketone (92) ook vir die sintese van tiasoolderivate (51) vanaf nitriële gebruik.⁸² In In variasie van die reaksie word aldoksieme (93) met α -

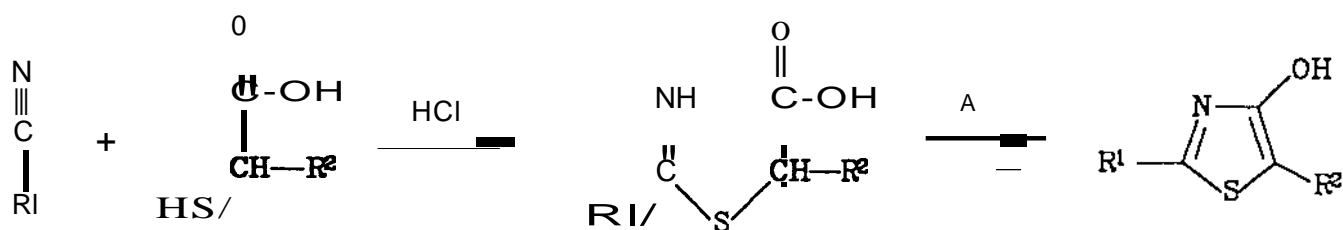


Skema 2.23

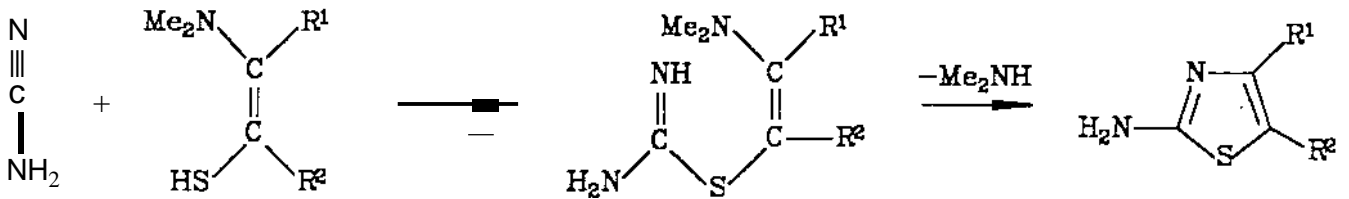
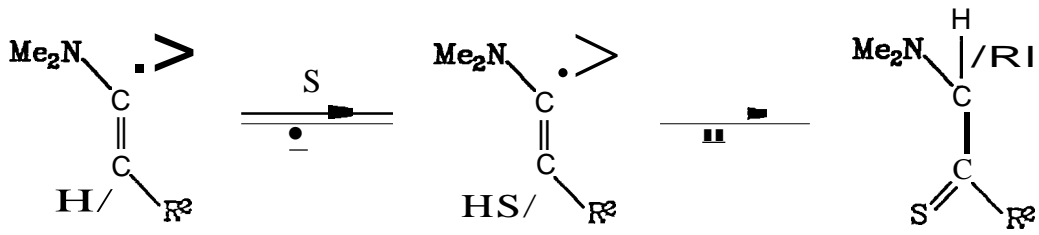


93

merkaptoketone onder terugvloei by 100°C verhit om 2,4-di- of 2,4,5-trigesubstitueerde tiasole (51) in hoë opbrengs te lewer.⁸² Ander variasies van hierdie metode behels die gebruik van α -merkaptokarboksielsure⁸² (Skema 2.24) of α -aminotioetone⁹² (Skema 2.25) as substrate.



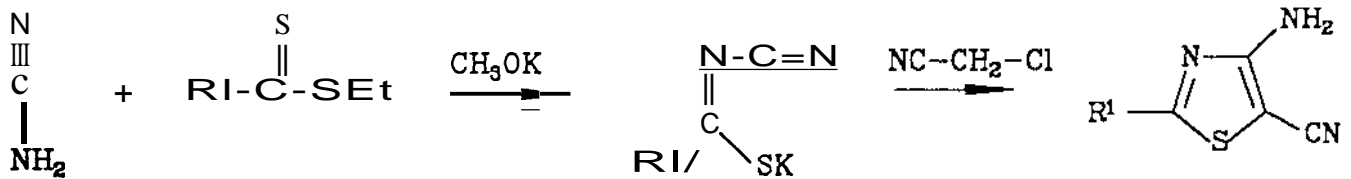
Skema 2.24



Skema 2.25

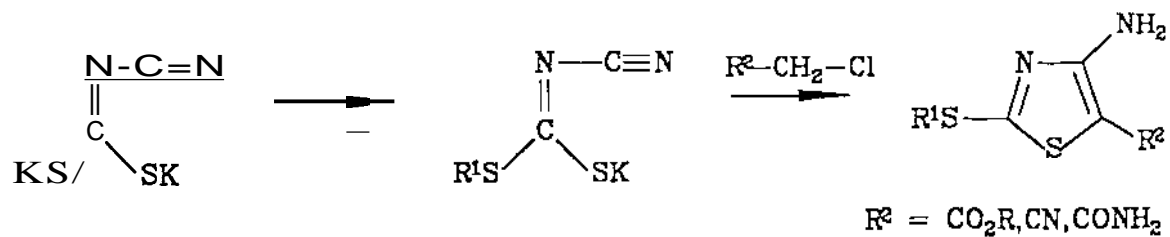
2.3.6 Die tipe F tiasoolsintese

In hierdie tipe van tiasoolsintese verskaf een van die reaktante slegs die C-5 koolstofatoom van die tiasool, byvoorbeeld soos in die reaksie van ditiosters met sianied⁹³ (Skema 2.26). In ander variasies van hierdie metode word sianoimidoditiokar-

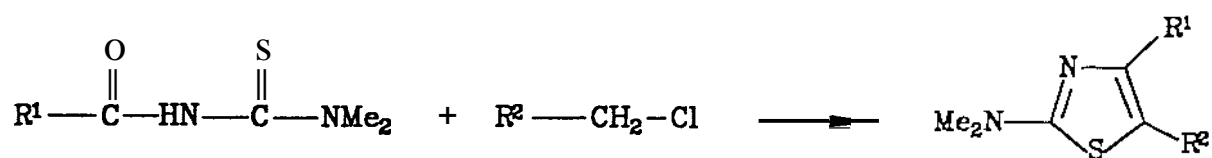


Skema 2.26

bonate⁹⁴ (Skema 2.27) of N-asietiourea⁹⁵ (Skema 2.28) as reaktante gebruik.



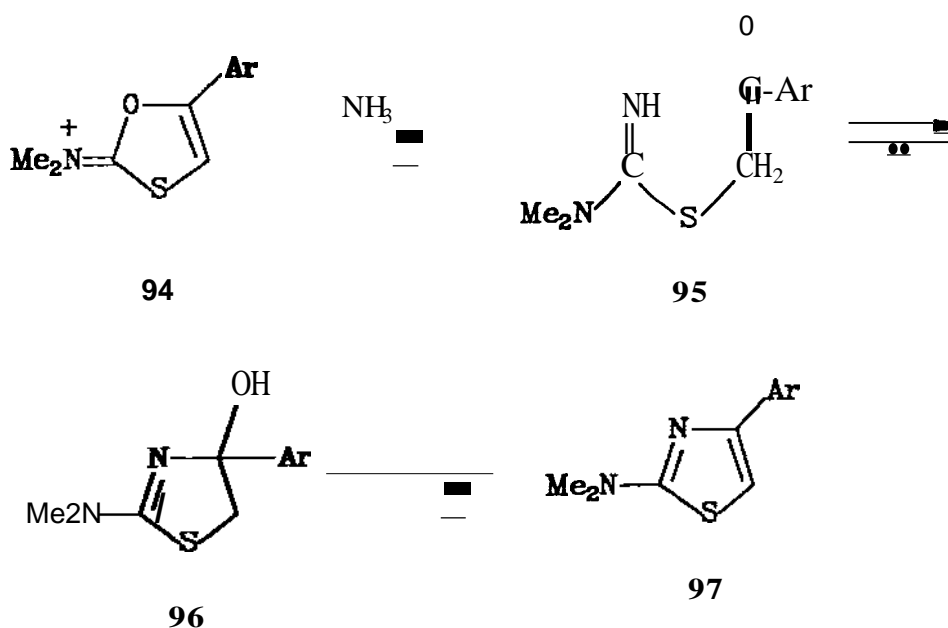
Skema 2.27



Skema 2.28

2.3.7 Die tiDe G tiasoolsintese

In hierdie benadering word N-(5-ariel-1,3-oksatiol-2-ielideen) tersiere imminiumsout (94, Skema 2.29) deur reaksie met ammoniak oopgemaak om 'n tussen-

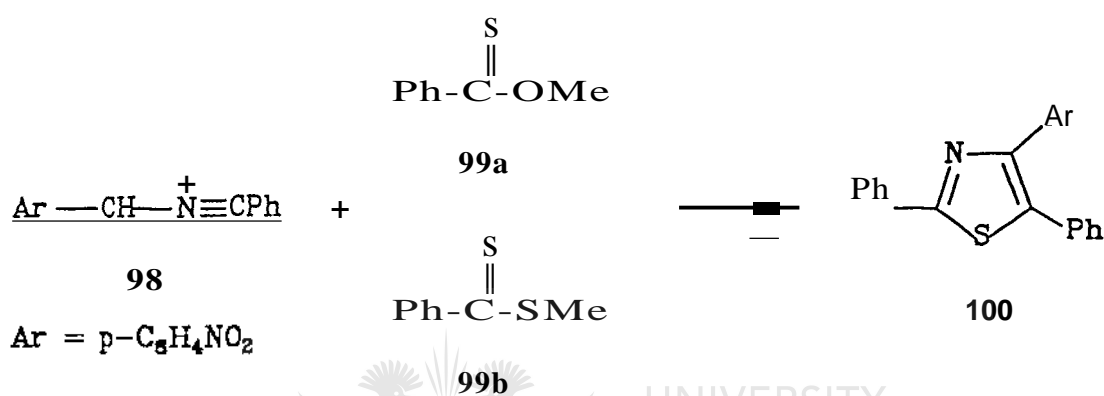


Skema 2.29

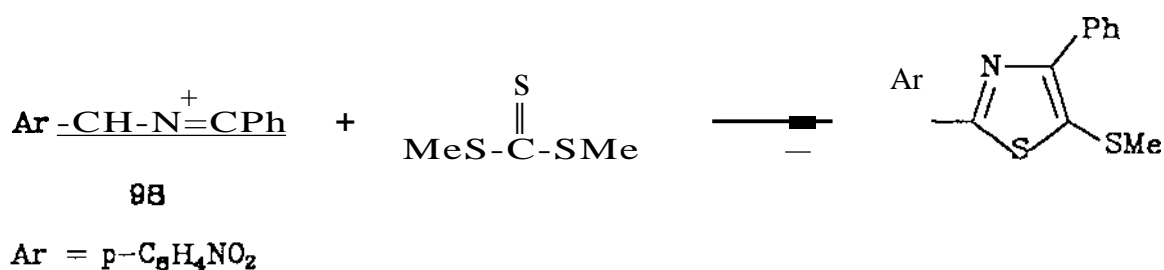
produk (95), wat in ewewig met 'n 4-hidroksi- Δ 2-tiasolien (96) verkeer, te vorm wat op sy beurt dehidrasie ondergaan om 'n 2-dialkielamin0-4-arieltiasoal (97) te lewer.⁹⁶

2.3.8 Die tiRe H tiasoolsintese

Hierdie benadering behels die 1,3-dipolêre sikloaddisie van nitriliëde met tioesters (kyk Skema 2.30 en Skema 2.31). Byvoorbeeld, bensonitril0-4-nitrofenielmetied (98, Skema 2.30) reageer met 'n oormaat metiel-mono- of -ditiobensoaat (99a.b)

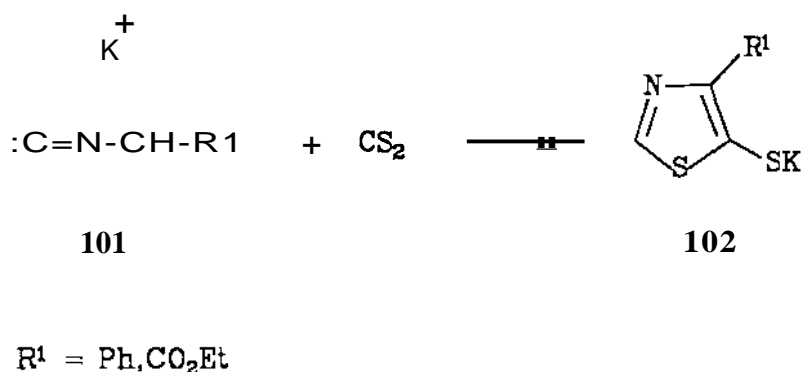


Skema 2.30



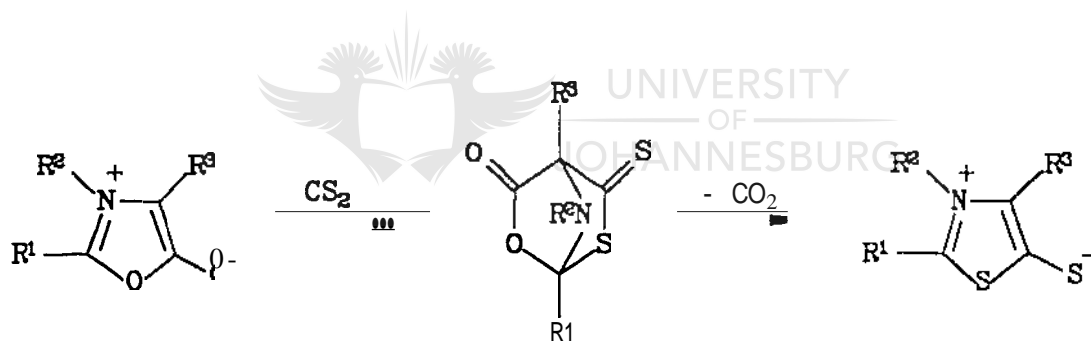
Skema 2.31⁹⁷

in trietielamien om 100 in hoë opbrengs te lewer.^{82,97} Tiasole is ook deur middel van ander 1,3-dipolêre sikloaddisiereaksies verkry. Byvoorbeeld, die reaksie van α -gemetaldeerde isosianiede (101, Skema 2.32) met koolstofdissulfied lewer die metaalsoute van die



Skema 2.32

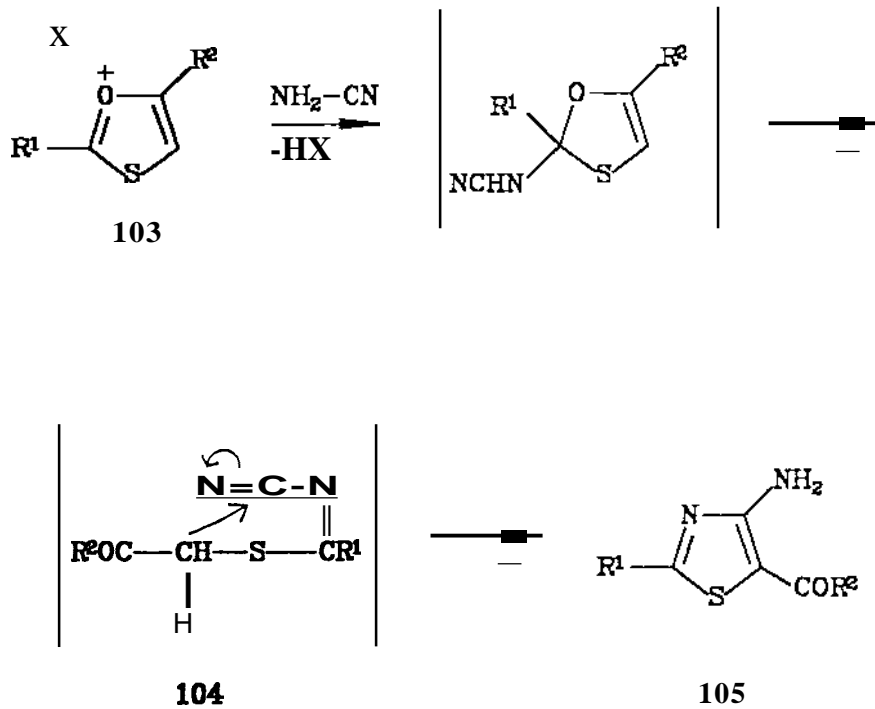
ooreenkomstige 4-gesubstitueerde tiasool-5-tiols (102).⁹⁸ 'n Ander voorbeeld is die omsetting van mesoioniese oksasole na mesoioniese tiasole⁹⁹ (kyk Skema 2.33).



Skema 2.33

2.3.9 Die tipe J tiasoolsintese

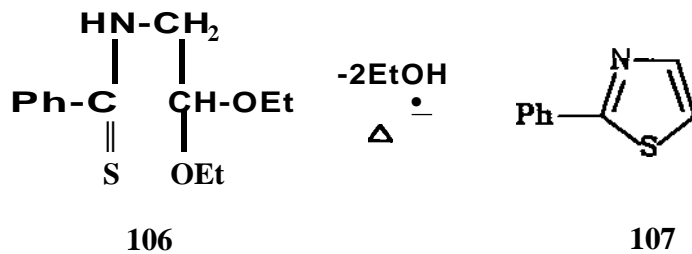
1,3-oksatiasoliurnsoute (103, Skema 2.34) reageer in die teenwoordigheid van natriummetoksied met sianamied om gesubstitueerde 4-aminotiasole (10.5) as eindproduk te lewer.¹⁰⁰ Die tiasoolvorming vind moontlik *via* die oopketting tussenproduk (104) plaas.¹⁰¹



Skema 2.34

2.3.10 Die tiRe K tiasoolsintese

'n Voorbeeld van die tipe reaksie (kyk Skema 2.35) is die siklisering, onder milde kondisies, van tiobensamidoasetaal (106) am 2-fenieltiasool (107) te lewer.¹⁰²



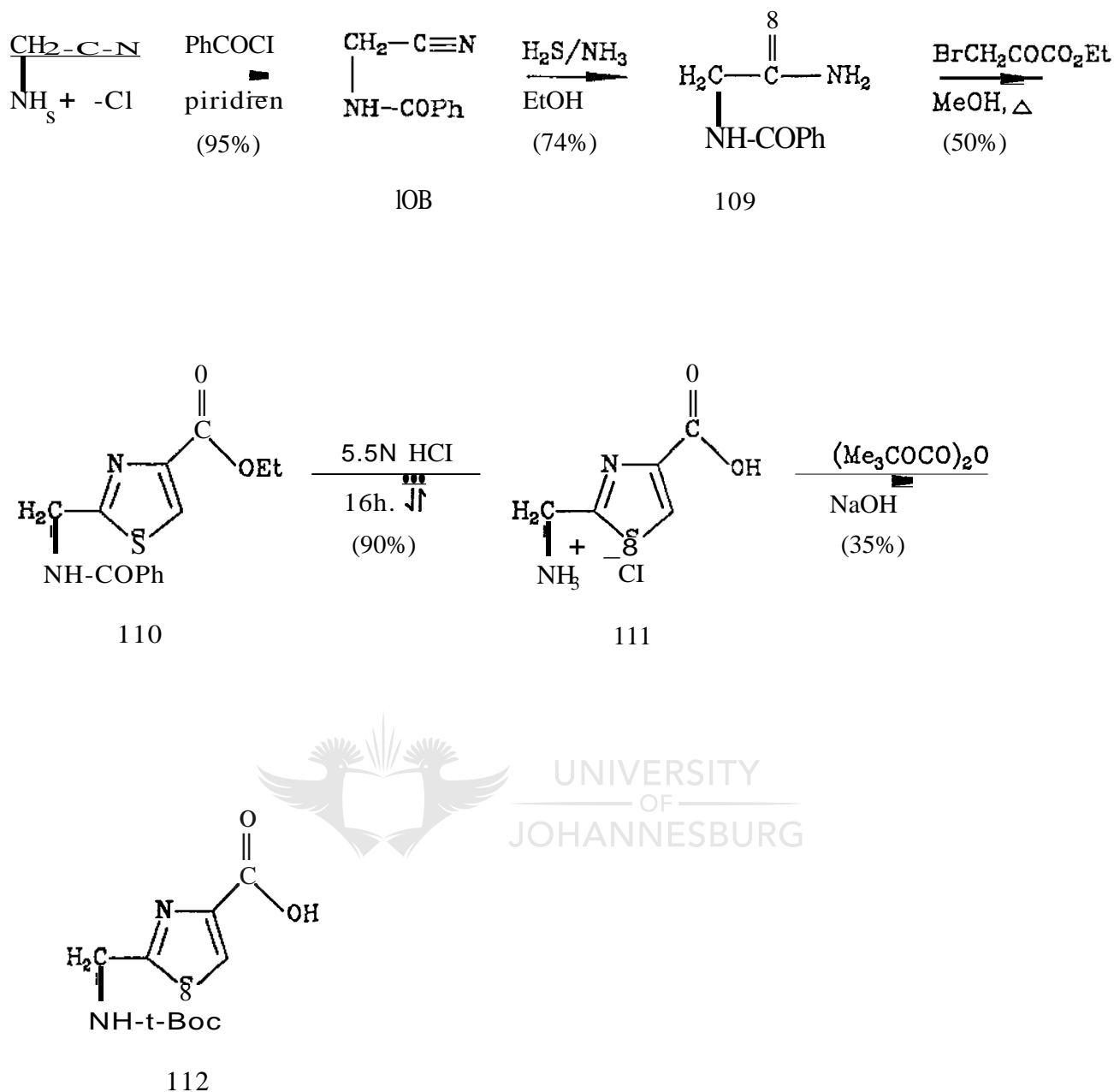
Skema 2.3.5

2.4 DIE SINTESE VAN *N-t-Boe*-(Gly)Thz (112)

In die lig van voorafgaande bespreking van die verskeie metodes wat vir tiasoolsintese ontwikkel is, was dit baie duidelik dat die mees direkte sintese van die tiasoolaminosure van dolastatien 3 op die toepassing van die Hantzseh-sintese sal berus, Soos reeds genoem (Afdeling 2.3.1.a) het Cross *et al.*⁷ reeds in 1963 'n reeks tiasoolaminosure, onder meer (Gly)Thz, met behulp van hierdie metode gesintetiseer. Deur aanpassing van die sintese is twee alternatiewe roetes vir die sintese van (Gly)Thz ontwikkel wat 'n verbetering op die vorige metodes verteenwoordig.

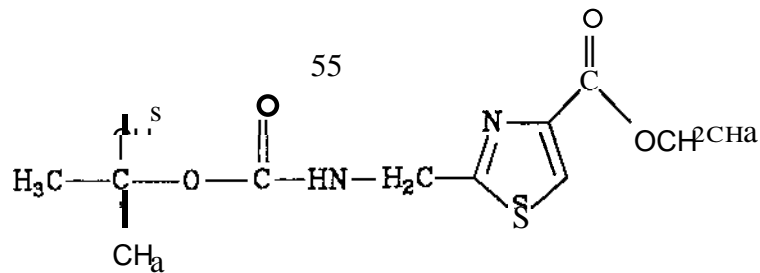
Die eerste roete behels die bereiding van N-benskarbonielglisinonitriël (108) en word volledig in Skema 2.36 geïllustreer. Onder die standaard Hantzseh-reaksieondisies⁷, naamlik verhitting van die reaktante in alkoholiese oplossing onder terugvloei, ondergaan die tioamied (109) kondensasie met etiel broompiruvaat om etiel 2-(bensamido-metiel)tiasool-4-karboksielsuur (110) in 'n opbrengs van 50% te lewer. Die beskermde tiasoolderivaat (110) is met 3N HCl onder terugvloei volledig gehidroliseer om die (Gly)Thz hidroehloriedsout (111) in hoë opbrengs te vorm. Die hidroehloriedsout (111) is in heelwat beter opbrengs verkry as deur die metode van Cross *et al.*,⁷ wat die ooreenkomstige bensamido- en ftaloielestertiasoolderivate deur opeenvolgende hidrolise met NaOH en HCl ontkerm het. Aangesien die tiasoolaminosuurderivaat met die oog op peptiedsintese berei is, was dit noodsaaklik dat die amienbeskermingsgroep selektief en onder milde kondisies verwyder kon word, 'n vereiste waaraan die bensioelgroep (5.5N HCl, onder terugvloei, 16h) nie voldoen nie. Die N-t-butoksikarbonielgroep (*t-Boe*) is ideaal vir die doel geskik, veral vanweë die milde hidrolitiese kondisies (CF₃COOH/CH₂Cl₂, 0 °C, 2h) wat vir die verwydering daarvan benodig word. Behandeling van (Gly)Thz hidroehloried (111) met di-t-butieldikarbonaat in teenwoordigheid van IN NaOH het *N-t-Boc*-(Gly)Thz (112) in 'n teleurstellende lae opbrengs van 35% gelewer.

'n Verbeterde strategie vir die sintese van *N-t-Boc*-(Gly)Thz word in Skema 2.37 opgesom. Die reaksie van glisinonitriël met die t-butoksikarboksileringsreagens, onder



Skema 2.36

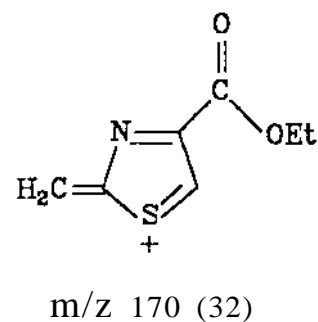
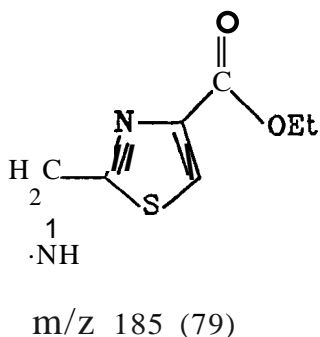
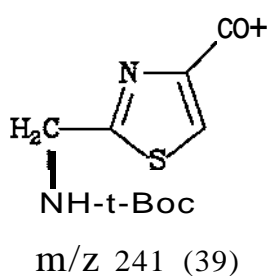
die aprotiese kondisies wat deur Ponnusamy *et al.*¹⁰³ ontwikkel is, het *N-t-Boc*-glisinonitriël (113) in feitlik kwantitatiewe opbrengs gelewer. Die metode behels die behandeling van glisinonitriëlhidrochloried met In 10% oplossing van trietielamien in droe dimetielformamied, gevolg deur verhitting van die reaksiemengsel met di-*t*-buticldikarbonaat. Die nitriël (113) is na die ooreenkomstige tioamied (114) deur die reaksie met NH_4HS in etanol omgesit en deur kristallisatie gesuiwer. Soos in die geval van



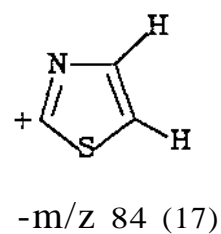
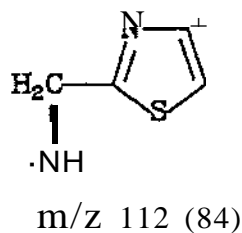
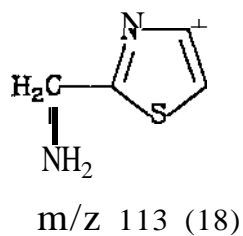
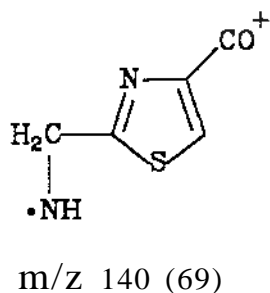
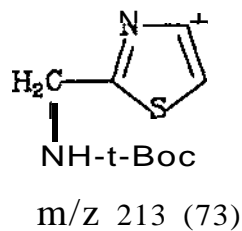
$C_{12}H_{16}N_2O_4S_1$

m/z 286 ($18, M^+$)

β -splyting



UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG



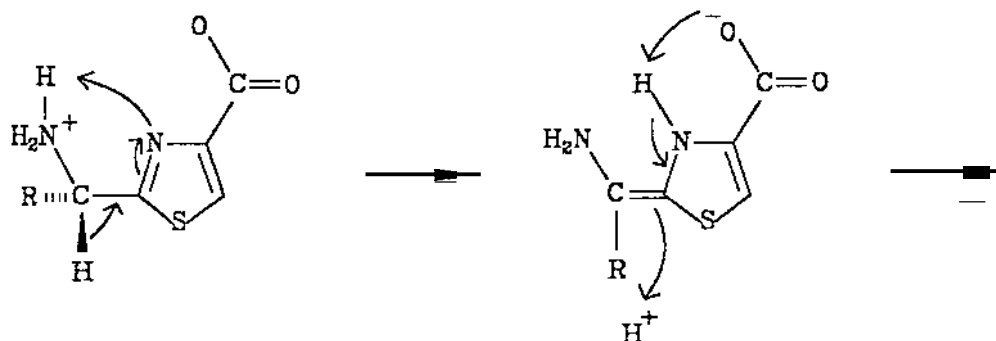
Skema 2.38: Elektronimpakgeïnduseerde fragmentasie van *N*-*t*-Boc-*{Gly}*Thz-*o*Et (115). (Relatiewe intensiteite van die fragmente word in hakkes aangedui)

massaspektrum van dolastatien 3. Die moontlike oorsprong van 'n aantal van die ver-
naamste elektronimpakgeïnduseerde fragmentasies van 115 word in Skema 2.38 opgesom.
Kenmerkend van N-t-butoksikarbonielaminosuurderivate vind afklowing van die be-
skermingsgroep *via* 'n McLafferty-herrangskikking en β -splyting plaas. Die fragmen-
tasiepatroon van 115 toon belangrike ooreenkomste met dié van N-asetiel-(Gly)Thz-
OMe.²⁹

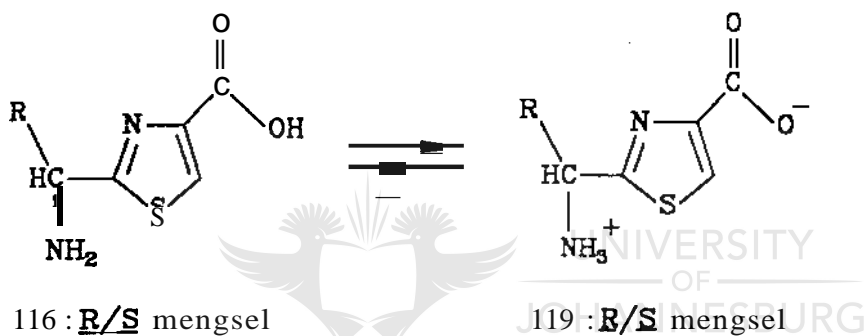
2.5 DIE SINTESE VAN RASEMIESE N-t-Boc-(Gln)Thz (129b)

Vanuit die staanspoor is daar besef dat die chirale sintese van *R*- en
S-(Gln)Thz moontlik problematies kan wees aangesien ander groepe wat van die
Hantzsch-bereidingsmetode gebruik gemaak het,^{4d,4g,7} rasemiese eindprodukte verkry
het. Dit is egter aanvaar^{4d,4g,7} dat die Hantzsch-reaksie wel die derivate van opties
suiwer tiasoolaminosure gelewer het, maar dat rasemisasie tydens hidrolitiese verwy-
dering (5N Hfl, verhit onder terugvloei) van die N'-bcnsolelgroep, wat as beskermings-
groep gebruik is, plaasvind. Die isolasie van rasemiese tiasoolaminosuurafbouprodukte
uit die hidrolisaat van tiasoolbevattende natuurprodukte het, volgens die outeurs, hier-
die aanname bevestig (sien ook Afdelings 1.2 en 1.4.3).

Dean *et al.*^{4g} het 'n meganistiese verklaring, wat in Skema 2.39 geïllustreer word, vir
rasemisasie onder hidrolitiese kondisies voorgestel. Volgens die voorgestelde meganisme
vind daar 'n konserte oordragingsproses (116→117→118) vanaf 'n eksosikliese
ammoniumgroep na 'n karboksilaatgroep *via* die ringstikstofatoom, wat as 'n
intermediere oordragstasie (117) funksioneer, plaas. Die proses gaan dus met die
gevolglike uitruiling van die o-waterstof op die chirale sentrum gepaard. Hierdie
uitruiling vind *via* 'n achirale tussenproduk plaas met 'n nie-stereospesifieke heraanval
van waterstofione, en gepaardgaande rasemisasie. Dean *et al.* het ook gepostuleer dat
die aminosuur (118) relatief stabiel in suurmedium is, maar dat die dipolere ioon (119),
waarmee dit in ewewig verkeer, as die stereochemies labiele komponent optree. 'n
Soortgelyke verklaring is ook voorgestel vir

116: S-konfigurasi

117

R = CH(CH₃)₂116 : R/S mengsel119 : R/S mengselSkema 2.39^{4g}

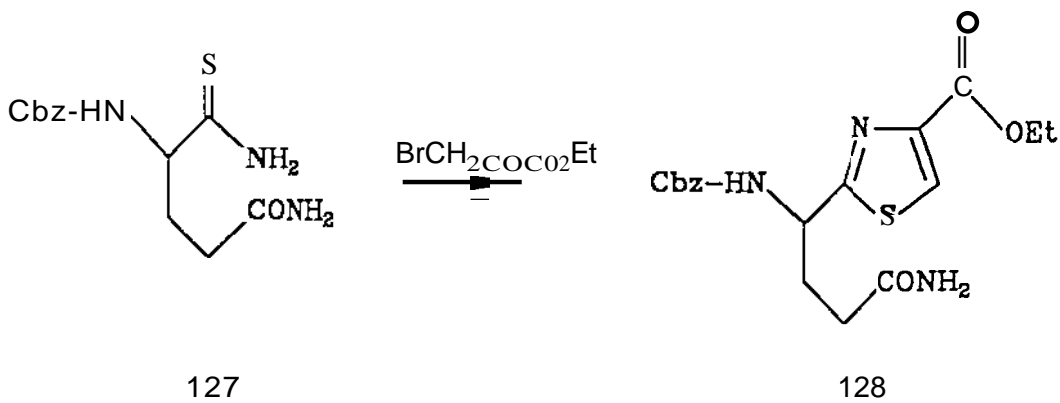
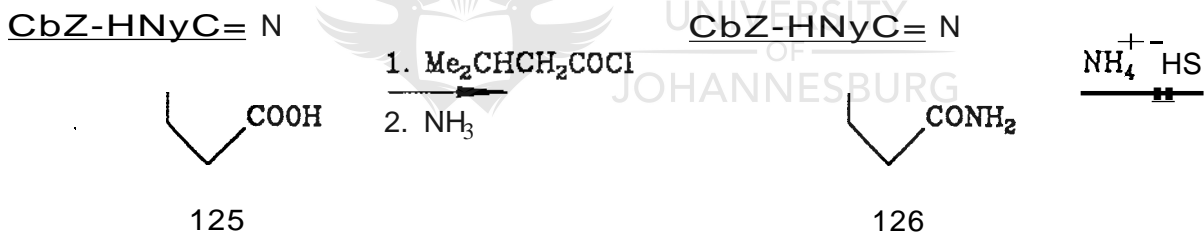
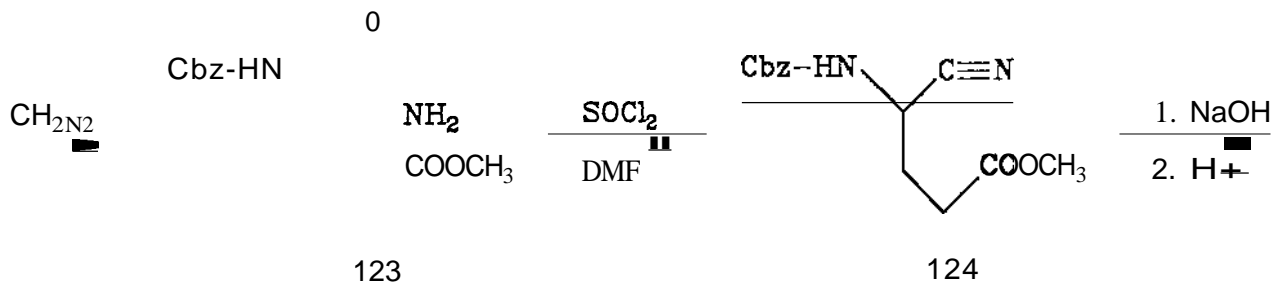
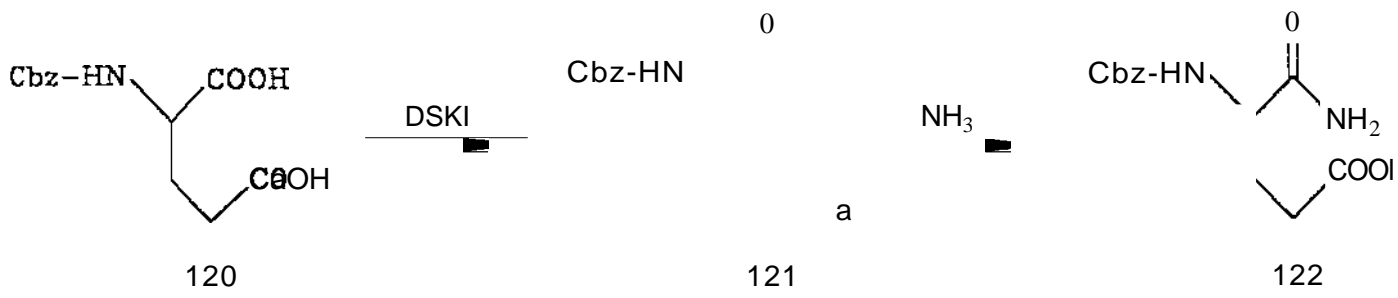
die stereochemiese labiliteit van die antibiotikum bakitrasien A, wat 'n chirale 2-(1'-amino-2'-metielbutiel)tiasoiiniel-4-karbonielresidu besit.^{4g,105}

Bostaande uiteensetting verteenwoordig die stand van kennis ten opsigte van tiasoolaminozuursintese toe daar met die sintese van (Gln)Thz in hierdie ondersoek in aanvang geneem is. In terme van die aanname dat rasemisasie eers tydens die hidrolitiese verwydering van die N-bensoielbeskermingsgroep plaasvind, sou die probleem dan opgelos kan word deur van 'n beskermingsgroep wat onder milde kondisies verwyderbaar is, gebruik te maak. Die eerste totaalsintese van (Gln)Thz is dus uitgevoer met hierdie gevolgtrekking in gedagte. Die sekvens van reaksies wat uitgevoer

is word in Skema 2.40 opgesom.

N-bensieloksikarboniel-B-glutamiensuur (120) is as uitgangstof vir die sintese van (Gln)Thz gebruik. In ooreenstemming met gepubliseerde resultate¹⁰⁶ is gevind dat die omsetting van N-bensieloksikarboniel-B-glutamiensuur na die ooreenstemmende anhidried (121) deur middel van reaksie met asynsuuranhidried gedeeltelike rasemisasie van die produk tot gevolg het, tensy spesiale voorsorg getref word. Die gebruik van disikloheksielkarbodiimied (DSKI) as dehidreringsreagens het egter die verlangde opties suiwer anhidried in goeie opbrengs gelewer. Shealy *et al.*¹⁰⁶ het In modifikasie van die metode van Bergmann en Zervas¹⁰⁷ vir die bereiding van N-bensieloksikarboniel-S-isoglutamien (122) beskryf waarvolgens hierdie verbinding in 50% opbrengs berei is deur die reaksie van NH_3 -gas met N-bensieloksikarboniel-B-glutamiensuuranhidried (121) by 0°C . Ons het egter gevind dat die reaksie ook groot hoeveelhede van die isomeriese N-bensieloksikarboniel-B-glutamien lewer, wat slegs van die hoofproduk verwyder kan word deur twee kristallasies uit water. Dit het egter In groot verlies aan die verlangde amied tot gevolg gehad. Die suiwer materiaal is in In opbrengs van slegs 25% verkry. Hierdie resultate stem ooreen met dié van Ressler *et al.*¹⁰⁸ wat die gemengde anhidried-metode vir die omsetting van N-bensieloksikarboniel-B-glutamiensuur na N-bensieloksikarboniel-S-isoglutamien gebruik het. Hierdie metode is egter nie geskik vir groot-skaalse bereiding nie.¹⁰⁹ Die reaksie van NH_3 met N-bensieloksikarboniel-S-glutamiensuuranhidried is dus herondersoek. Die selektiwiteit van NH_3 vir die α -karbonielgroep van die anhidried kon aansienlik verbeter word deur die reaksie by -60°C uit te voer. Suiwer N-bensieloksikarboniel-S-isoglutamien (122) is in In opbrengs van 69% verkry. Die ooreenstemmende metielester (123)¹¹⁰ is deur die reaksie van 122 met In oormaat diasometaan berei, Dit is later bewys dat die ester (123) in goeie opbrengs ($\pm 60\%$) berei kan word van N-bensieloksikarboniel-B-glutamiensuur sonder enige isolering en suiwering van die anhidried (121) of amied (122).

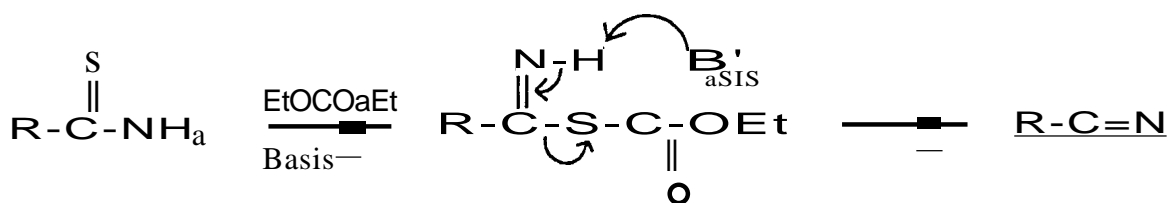
In Effektiewe metode vir die omsetting van die amiedester (123) na die metielester



Skema 2.40

van N-bensieloksikarboniel- γ -amino- γ -sianobottersuur (124) is vervolgens ontwikkel. Verskeie metodes vir die dehidrering van primere amiede is ondersoek, insluitend reaksie met DSKI, beide in die teenwoordigheid en afwesigheid van suurkatalisatore, POCl_3 -DMF en SOCl_2 -DMF. Die beste resultate is verkry met 'n modifikasie van die metode van Ressler *et al.*¹⁰⁵, 111 wat reaksie met SOCl_2 -DMF in die teenwoordigheid van N-metielmorfolien onder streng temperatuurkontrole behels het. Die nitriëlester (124) is deur chromatografie gesuiwer en na die suur (125) gehidroliseer. Hierdie suur is na N-bensieloksikarboniel- γ -amino- γ -sianobutiramied (126) omgesit deur middel van die gemengde anhidriedmetode. Die nitriël (126) is met etanol (0 °C), wat eers met NH_3 en daarna met H_2S by 0 °C versadig is, behandel om die verlangde tioamied (127) te lewer.

Die tioamied (127) het 'n skerp afname in spesifieke optiese rotasie relatief tot die nitriël (126) getoon. Ten einde te bepaal of vorming van die tioamied met rasemisasie gepaard gegaan het, is die produk na die nitriël omgesit deur reaksie met dietielkarbonaat in die teenwoordigheid van N-metielmorfolien, soos in Skema 2.41 aangetoon is. Die nitriël



Skema 2.41

wat sodoende verkry is het dieselfde spesifieke optiese rotasie as die oorspronklike aanvangsmateriaal 126 gehad. Die vorming van die tioamied (127) uit die nitriël (126) het dus sonder rasemisasie plaasgevind.

Die standaard Hantzsch-sintese,^{7b} wat die verhitting van die aminosuurderivaat en

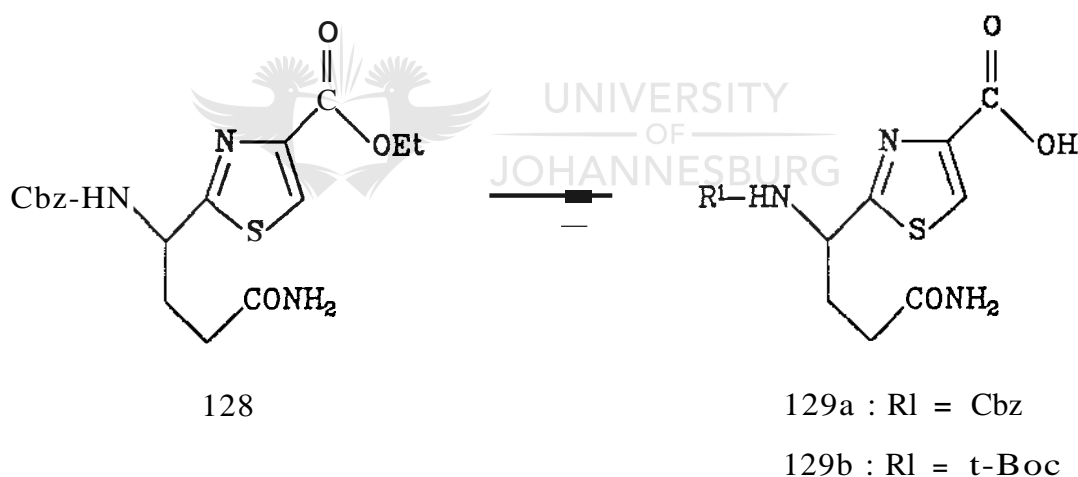
etiel broompiruvaat in etanol onder terugvloei behels, het die verlangde tiasool (128) in uitstekende opbrengs gelewer. Die verbinding was egter opties onaktief. Volledige rasemisasie het dus onder dié reaksiekondisies plaasgevind. Soos reeds genoem, is voorheen aanvaar dat rasemisasie eers tydens die hidrolitiese verwydering van die **N**-beskermingsgroep, eerder as in die Hantzsch-sintese self, plaasvind. In die reaksie wat die tiasool (128) lewer, word een molekwivalent HBr gevorm en die moontlikheid is ondersoek dat die rasemisasie suurgekataliseer is. Onder reaksiekondisies wat neutralisasie van die HBr (reaksie in dioksaan of etanol in teenwoordigheid van anhidriese Na_2CO_3 , reaksie in dioksaan of etanol in teenwoordigheid van een molekwivalent **N**-metielmorfolien, voorafgaande reaksie van die tioamied met een molekwivalent *n*-BuLi by -23°C om die ooreenstemmende litiumsout te lewer) verseker het, is egter baie min van die tiasool (128) gevorm. Dit is later bewys dat die lae opbrengs van die tiasool onder hierdie kondisies toe te skryf is aan:

- (i) Vinnige basisgekataliseerde ontbinding van die etiel broompiruvaat
- (ii) Die feit dat tiasoolvorming 'n suurgekataliseerde reaksie is.

Addisionele veranderings in die reaksiekondisies is dus ondersoek. Daar is onder andere bevind dat die reaksietyd in kokende etanol of metanol na 15 minute verminder kan word. Onder hierdie kondisies het die reaksie in deuterometanol (CH_3OD) die rasemiese produk gelewer wat ten volle op die 1'-posisie (chirale sentrum) gedeutereer was. Hierdie gevolgtrekking is gebaseer op die ^1H -k.m.r.-spektrum van die gedeutereerde produk wat die afwesigheid van 'n eenproton multiplet by δ 4.95 en die vervanging van 'n doeplet (NH-eH) by δ 8.35 met 'n singulet getoon het. Behandeling van die onge-deutereerde tiasool (128) met kokende deuterometanol in die teenwoordigheid van 1 tot 5 molekwivalente HBr vir tot 30 minute het egter nie die inkorporering van 'n betekenisvolle hoeveelheid deuterium tot gevolg gehad nie. Dit is dus duidelik dat 'n tussenprodukt in die Hantzsch-sintese, eerder as die finale produk, in die rasemisasiestap betrokke is. In Verdere bevinding was dat die tiasool (128) onder milde toe-

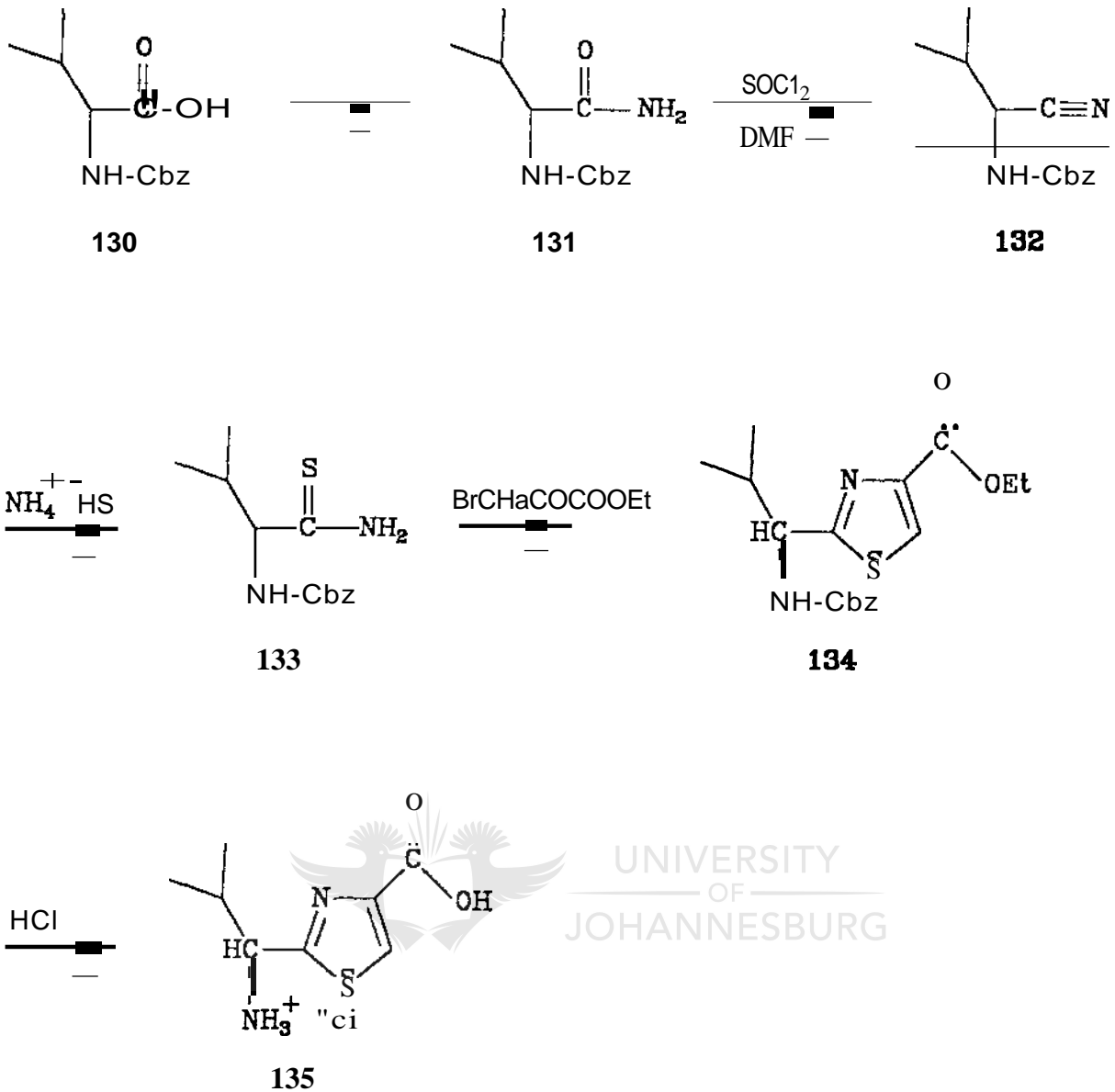
stande berei kon word, nl. reaksie van die tioamied (12i) met etiel broompiruvaat in metanol by kamertemperatuur in die teenwoordigheid van een molekwialent AgI3F4 of reaksie in droe DMF by kamertemperatuur. Die reaksie in DMF is in 'n polarimeterbuis uitgevoer ten einde die verandering in spesifieke optiese rotasie gedurende die reaksie te volg. Die resultate wat verkry is het ook bewys dat rasemisasie voor die isolering van die tiasool plaasgevind het.

Alkaliese hidrolise van 128 gevolg deur aansuring het N-bensieloksikarboniel-RjS-(Gln)Thz (129a) gelewer (Skema 2.42). Die Cbz-beskeringsgroep van 129a is deur behandeling met waterstofbromied in asynsuur, kondisies wat die primere amiedgroep nie geaffekteer het nie, verwyder om na basisgekataliseerde reaksie met di-t-butieldi-karbonaat, N-t-butieloksikarboniel-Rjs-{Gln)Thz (129b) te lewer.



Skema 2.42

Die resultate wat hierbo beskryf is het daarop gedui dat die omsetting van optiese aktiewe α -aminosure na tiasole met die Hantzsch-reaksie as sleutelstap noodwendig gedeeltelike of totale rasemisasie van die chirale sentrum tot gevolg sal hê. Ten einde die geldigheid van hierdie gevolgtrekking te toets is N-bensieloksikarboniel-(Val)Thz uit N-bensieloksikarboniel-S-valien gesintetiseer. Die reeks reaksies wat gebruik is word in Skema 2.43 opgesom. Die N-bensieloksikarboniel-(Val)Thz ester (134) wat



Skema 2.43

sodoende verkry is, was opties onaktief.

Die ondersoek het weer eens getoon dat rasemisasie gedurende die reaksie van die tioamied met etiel broompiruvaat plaasgevind het. Uitvoering van die kondensasiereaksie in deuterometanol het die volledige uitruiling van die waterstof op die chirale sentrum tot gevolg gehad, soos afgelei kon word uit die verdwyning van 'n eenproton doeblet van doeblette by δ 5.03 en die vervanging van 'n eenproton doeblet by δ 5.72 (NH-eH) deur

In singulet in die ^1H -k.m.r.-spektrum van die produk. Die N-bensoieloksikarboniel-(Val)Thz etielester (134) is na (Val)Thz hidrochloried (135) omgesit deur behandeling met soutsuur.

Die resultate wat hierbo beskryf is kan met dié van Dean *et al.*^{4g} vergelyk word, wat (Val)Thz hidrochloried en (Ala)Thz hidrochloried van N-bensoiel-S-valien en N-bensoiel-S-alanien met behulp van die Hantzsch-sintese berei het. Die produkte was essensieel rasemies, maar die outeurs het die gevolgtrekking gemaak dat rasemisasie tydens hidrolise van die ooreenkomstige N-bensoiel etielesters plaasgevind het (kyk Skema 2.39). In ons hande het kondensasie van S-a-bensamido-,B-metielbutiroti, o-amied met etiel broompiruvaat in etanol, onder die kondisies wat deur Dean *et al.*^{4g} beskryf is, die vorming van In swak opties aktiewe N-bensoiel-(Val)Thz ester tot gevolg gehad. Indien die reaksie in deuterometanol uitgevoer is, is minstens 80% van die waterstof op die chirale sentrum van die tiasoolproduk met deuterium uitgeruil (m.s.- en ^1H -k.m.r.-spektra). Dit volg dus dat rasemisasie in die Hantzsch-sintese nie tot gevalle waar Cbz die N-beskermdende groep is beperk is nie, en dat die rasemisasie wat deur Dean *et al.*^{4g} waargeneem is hoofsaaklik gedurende die Hantzsch-sintese plaasvind. Dit sluit nie die moontlikheid uit dat rasemisasie van (Val)Thz ook onder drastiese hidrolitiese kondisies kan plaasvind nie. Omsetting van die bogenoemde deuteriumbevattende N-bensoiel(Val)Thz etielester na (Val)Thz hidrochloried het die geleidelike verlies van deuterium uit die produk tot gevolg gehad. Volledige verlies van deuterium het egter verhitting onder terugvloei van die verbinding in 20% soutsuur vir 6 uur vereis.

2.6 BENADERINGS TOT DIE SINTESE VAN CHIRALE TIASOOLAMINO-SURE MET BEHULP VAN 'N CHIRALE HULPREAGENS

2.6.1 Inleidende Onderzoek tot Metaalgeindnseerde Asimetrisse Strecker-sintese

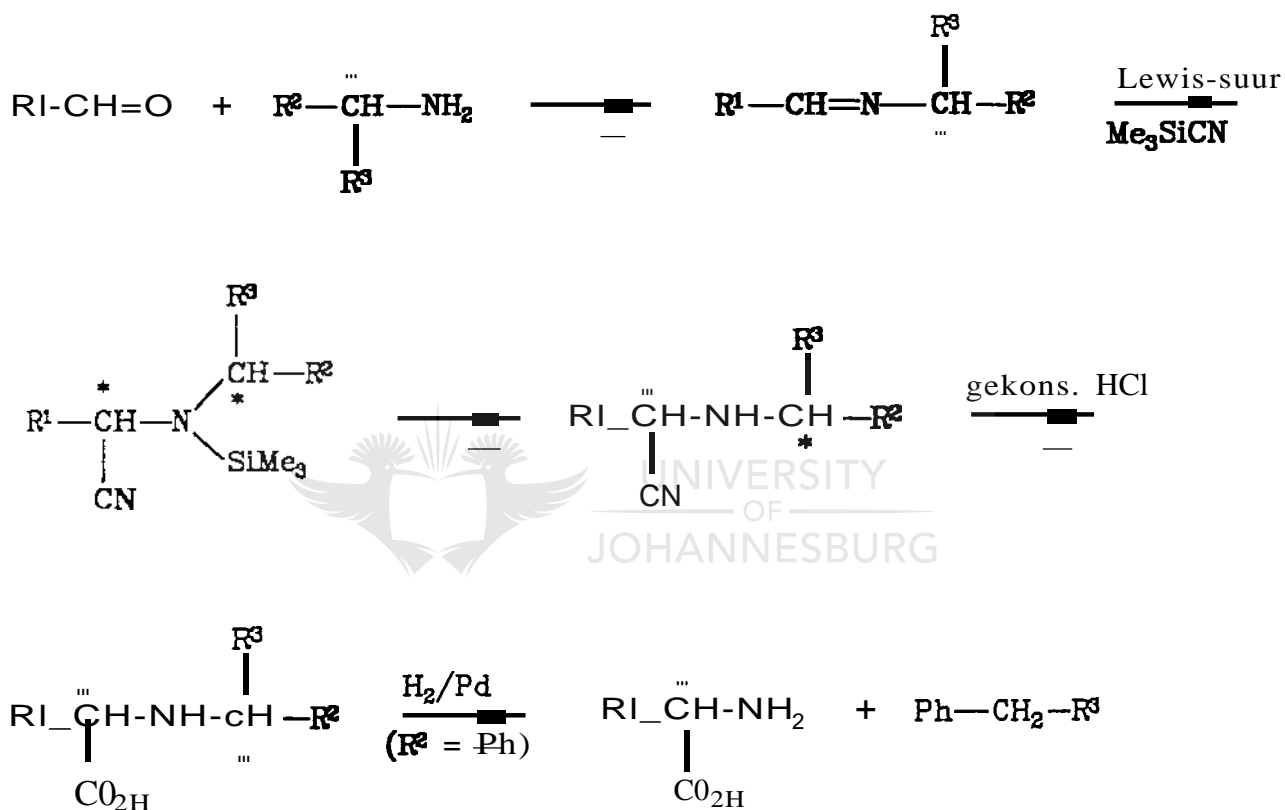
Uit die voorafgaande bespreking (Afdeling 2.5) is dit duidelik dat die Hantzsch-reaksie tot die vorming van In rasemiese mengsel aanleiding gee. Hierdie

gevolgtrekking is egter teenstrydig met die van Houssin *et al.*¹¹² wat in 'n onlangse publikasie beweer het dat ses 'ehirale' 2-(N-t-Boc-1¹-aminoalkiel)tiasool-4-karboksielsuuresters vanaf die ooreenkomstige N-t-Boe-a-aminokarbokstioamide onder standaard Hantzsch-reaksie kondisies berei is. Die optiese suiwerheid van die tiasoolesters is, volgens die outeurs, deur ¹³C- en ¹H-k.m.r.-analise bewys, maar geen stawende optiese rotasie metings is uitgevoer nie. Die sintese van die ses tiasoolesters, nl. *N-t-Boe-(Gly)Thz-QEt*, *N-t-Boc-(Ala)Thz-OEt*, *N-t-Boc-(Val)Thz-QEt*, *N-t-Boc-(Leu)Thz-QEt*, *N-t-Boc(Ile)Thz-QEt* en *N-t-Boe-(Phe)Thz-QEt*, is onder identiese kondisies deur ons herhaal en die gevolgtrekking, wat deur 'n onafhanklike ondersoek deur Schmidt *et al.*¹¹³ bevestig is, was dat die verbinding volledig of feitlik volledig rasemies was. Die tiasoolesters toon almal lae spesifieke optiese rotasies en verder kon die enantiomere deur hoedrukvloeistofchromatografie op 'n chirale Pirkle kolom geskei word. Die sintese en enantiomeriese skeiding sal volledig in Afdeling 2.9 bespreek word. Op hierdie stadium van die ondersoek was dit dus duidelik dat geen eenduidige oplossing vir die probleem van rasemisasie tydens die Hantzsch-sintese bestaan het nie.

Op grond van onlangse vordering op die gebied van asimmetriese sintese¹¹⁴ het die vraag egter ontstaan of dit moontlik sou wees om die kritiese Hantzsch-reaksie met 'n tiasoamide wat aan 'n verwyderbare chirale hulpreagens gekoppel is, uit te voer. Indien epimerisasie tydens dié reaksie wel sou plaasvind, behoort daar egter 'n begunstigde vorming van een diastereomeer (*R* of *S*) te wees. So 'n diastereomeriese mengsel behoort in elk geval geredelik skeibaar te wees. Sodanige benadering sal slegs lewensvatbaar wees indien die chirale hulpreagens, sonder om die chiraliteit van die gesogte sentrum te vernietig, verwyder kan word.

In die afgelope paar jaar is heelwat reagentie wat tot uitstekende asimmetriese induksie aanleiding gegee het ontwikkel, maar slegs 'n geringe aantal het aan die hoofdoel van asimmetriese sintese, nl. die vorming van suiwer enantiomere, voldoen.¹¹⁴ Die asim-

metriese sintese van chirale aminosure is In veld wat heelwat belangstelling in dié verband geniet en verskeie elegante roetes om die probleem te oorkom is reeds gerapporteer. Byvoorbeeld, een metode vir die diastereoselektiewe sintese van aminosure¹¹⁵ behels die reaksie van gemetalleerde bislaktiemeters van sikliese dipeptide.¹¹⁶ Die asimmetriese Strecker-sintese¹¹⁷ word egter al vir die afgelope twee dekades as die verkose metode vir die bereiding van chirale aminosure toegepas. Diastereoselektiewe Strecker-sinteses (vir In algemene geval kyk Skema 2.44) is reeds met In verskeidenheid van chiraliteits-



waar: * = chirale sentrum.

Lewis-suur = AlCl_3 , ZnI_2 en Al(OR)_3

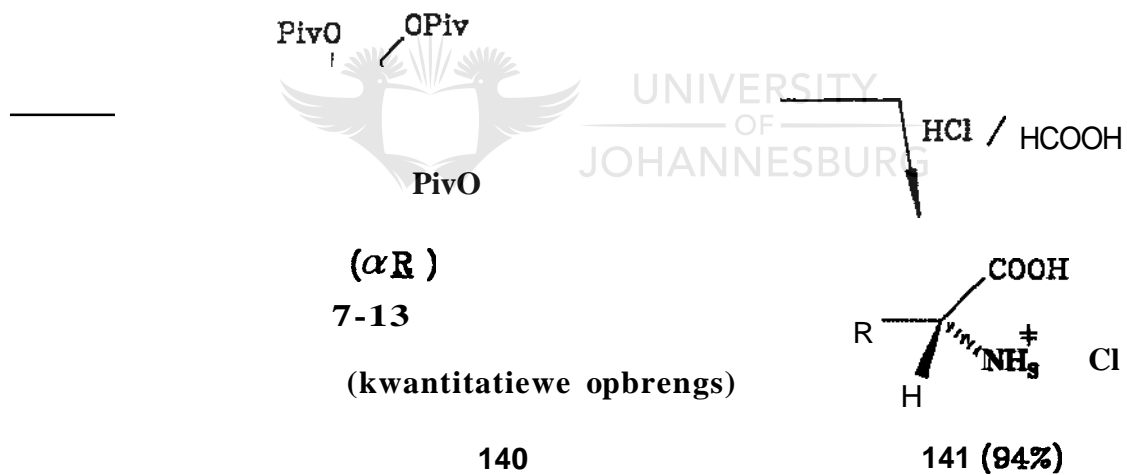
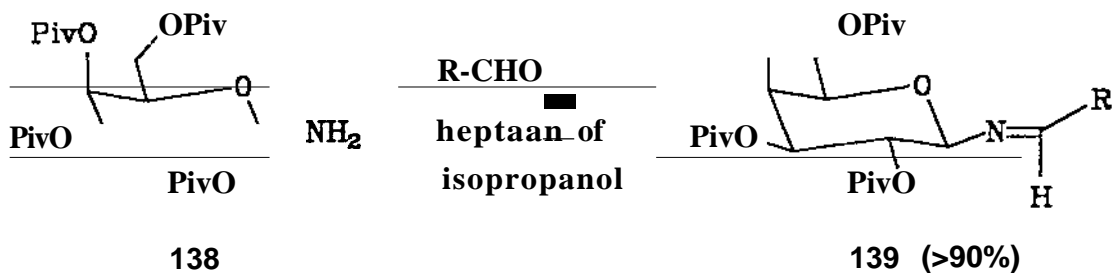
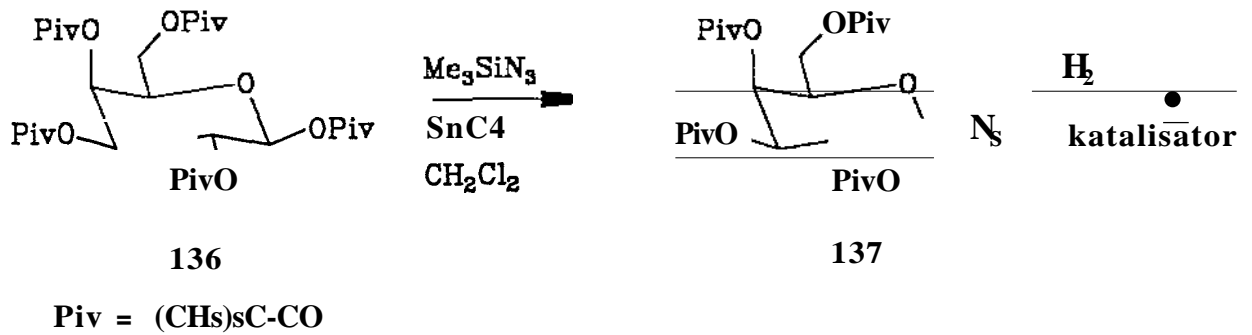
Skema 2.44^{118b} : Algemene Asimmetriese Strecker-sintese.

induserende reagentse, onder meer opties suiwer 1-fenieletielamien¹¹⁸ en (4S,5S)-5-amino-2,2-dimetiel-4-feniel-1,3-dioksaan,¹¹⁹ uitgevoer. Gewoonlik word d.o. (diastereomeriese oormaat) waardes van 50–75% verkry. In een uitsonderlike geval is In d.o. van 98% gerapporteer,¹²⁰ maar dit is egter later aan fraksionering toegeskryf.^{11Sa}

Hoogs verrykte en selfs suiwer diastereomere is slegs verkry indien een van die diastereomere, soos in die geval van N-4-feniel-1,3-dioksaan-5-iel-gesubstitueerde α -metiel- α -aminonitriële, 119 uitgepresieer. 121 Soos aangedui in Skema 2.44, kan die chirale hulpreagense normaalweg geredelik d.m.v. hidrogenering in die teenwoordigheid van aktiewe platinum verwyder word om sodoende die vry aminosure te lewer.

Tydens 'n ondersoek na die sintese van glikopeptiede het Kunz *et al.*¹²² die interessante waarneming gemaak dat suikers buitengewone komplekserende eienskappe teenoor katione toon. Dit het aanleiding gegee tot die gedagte om dié kompleksering tesame met die hoë chiraliteit van suikers, vir die stereochemiese kontrole van reaksies te benut. Dit is interessant om op te merk dat, afgesien van chirale-poelsinteses en in die bereiding van sommige chirale hidriedreagense, suikers slegs in geïsoleerde gevalle in asimmetriese sintese gebruik is. 123

Op grond van bogenoemde oorwegings het Kunz *et al.*¹²⁴ 'n diastereoselektiewe Strecker-sintese van α -aminonitriële met glikosielamien as chirale hulpreagense ontwikkel (Skema 2.45). Die geskikste chirale hulpreagens vir dié Strecker-sintese, 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-.B-D-galaktopiranosielamien (138), is volgens die outeurs geredelik vanaf penta-O-pivaloïel-.LJ-D-galaktose (136) deur reaksie daarvan met trimetielsiliasiedjintetrachloried en daaropvolgende hidrogenering van die gevormde galaktosielasied (137), gesintetiseer. Die (aR)-diastereomere van N-glikosiel- α -aminonitriële word in die begunstige verhouding van 5:1 deur die reaksie van glikosielamien (138) met aldehyde, natriumsianied en ysasynsuur in 2-propanol gevorm. Dié R/S (d.w.s. D/L) verhouding het betrekking op die konfigurasie van die α -koolstofatoom van die aminonitriëlkomponent. Die lang reaksietyd van 2 weke het egter aanleiding tot gedeeltelike anomerisasie gegee en tot 20% van die o-gekonfigureerde glikosielaminonitriële is geïsoleer. Die anomerisasie, wat moontlik tydens vorming van 'n Schiff-basis-tussenproduk plaasvind, kon grootliks onderdruk word deur die Schiff-basis (139) vanaf die amien (138) en die ooreenkomstige aldehyd in 2-propanol of heptaan in die teenwoordigheid van ysasynsuur te berei. Reaksie van die aldimien (139) met trimetielsiliasiel-

Skema 2.4.5¹²⁴

sianied in die teenwoordigheid van sinkchlorid in 2-propanol of tintetrachloried in tetrahydrofuraan (THF) by lae temperatuur het die ooreenkomstige N-glikosiel- α -aminonitriël (140) in hoë opbrengs gelewer. In die spesifieke gevalle van die isopropiel-o-amlnontrielgalaktosederivaat (140, R = CH(CH₃)₂) en isobutiel- α -aminonitriël-galaktosederivaat (140, R = C(CH₃)₃) is diastereoselektiwiteit van 8:1 en 13:1 onderskeidelik ten opsigte van die R-diastereomeer verkry. In beide gevalle is slegs spore van die ongewenste o-anomere produkte gevind. Suurhidrolise (HCl/HCOOH) het die

ooreenkomstige vry *R*- (d.W.s. *D*) aminosure (141) gelewer.

Die suksesvolle hidrolitiese verwydering van die chirale huipreagens om die hidrokloriedsout van die aminosuur sonder enige merkbare verlies aan optiese suiwerheid te lewer, het die moontlike gebruik van dié klas van suikerderivate as chirale hulpreagense vir die diastereoselektiewe sintese van tiasoolaminosuurderivate heel aantreklik gemaak. Hiervolgens het ons twee sintetiese roetes vir die sintese van chirale tiasoolaminosure ondersoek nl.

- (i) *via* direkte nukleofiliese addisie van 'n tiasoolkarbanioon op die Schiff-basis (139) en
- (ii) *via* omskakeling van die natrielfunksionaliteit van die N-glikosiel- α -aminonitriël (140) na die ooreenkomstige tioamied.

'n Voorvereiste vir die uitvoerbaarheid van beide roetes is die beskikbaarheid van die Schiff-basis (139).

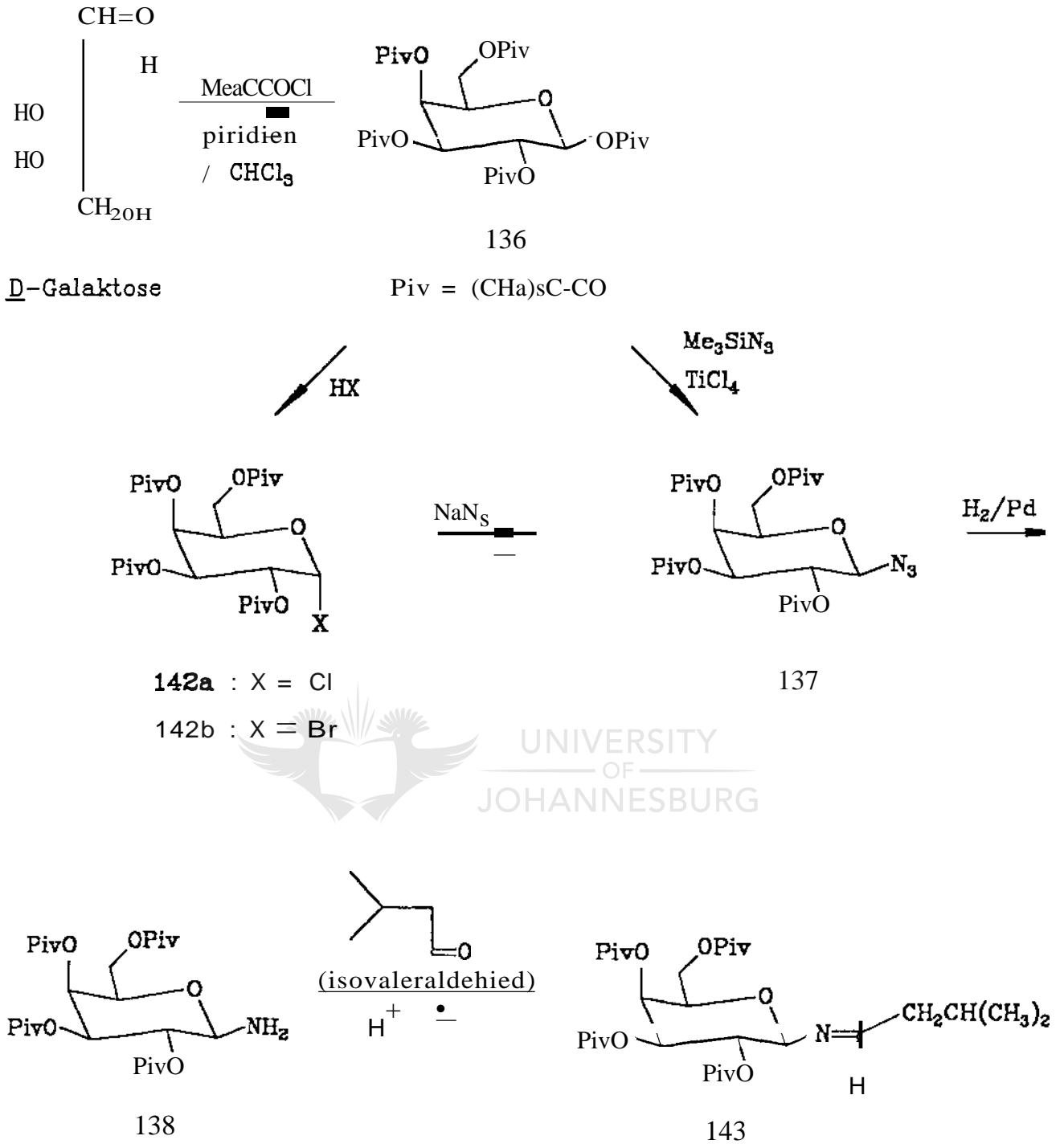


2.6.2 Die Sintese van die Schiff-basis (43)

2.6.2.a Toepassing van 'n amien-aldehydekondensasiereaksie vir die bereiding van 143

Dit is nodig om daarop te let dat die beskrywing van die diastereoselektiewe Strecker-sintese deur Kunz *et al.*¹²⁴ in notavorm, sonder enige eksperimentele gegewens, gepubliseer is. Dit was dus nodig om al die reaksiekondisies van meet af te ontwikkel.

Penta-*O*-pivaloïel- β -*D*-galaktose (136, Skema 2.46) is vanaf *D*-galaktose op 'n soortgelyke wyse as die gerapporteerde penta-*o*-pivaloïel-/3-*D*-glukose¹²⁵ gesintetiseer. Na 'n reaksietyd van 5 dae by kamertemperatuur is penta-*G*-pivaloïel-/3-*D*-galaktose (136) in 'n opbrengs van slegs 60% verkry. Die hoofhyproduk is as die ooreenkomstige galaktofuranosiedderivaat geïdentifiseer. Aldoses, wat normaalweg in oplossing as sikliese hemiasetale voorkom,¹²⁶ reageer, sods in die geval van Fischer-glikosidasie (H^+ , MeOH),¹²⁷ met asielchloriede om onder kondisies van termodinamiese kontrole



Skerna 2.46

hoofsaaklik die ooreenkomstige piranosiedes te vorm. Tydens Fischer-glikosidasie word die kineties begünstigde furanosied baie vinnig gevorm waarna die konsentrasie daarvan dan stadig afneem soos die piranosied die dominante spesie word.¹²⁸ Vanweë die groot aksiale pivalolelsubstituent op C-4 van penta-O-pivaloël- β -D-galaktopiranosied

(136) word die piranosiedvorm in hierdie geval gedestabiliseer deur ongunstige 1,3-diaksiale interaksies. Die gevolg hiervan is dat onder ewewigskondisies heelwat van die ooreenkomstige furanosiedvorm behoue bly. Dit is in teenstelling met die waarneming dat slegs $< 1\%$ van galaktose as die furanose- en die res in die piranosevorm in oplossing voorkom.¹²⁶ Die asileringsreaksie is derhalwe uitgevoer onder kondisies wat ewewiginstelling sal bevorder.

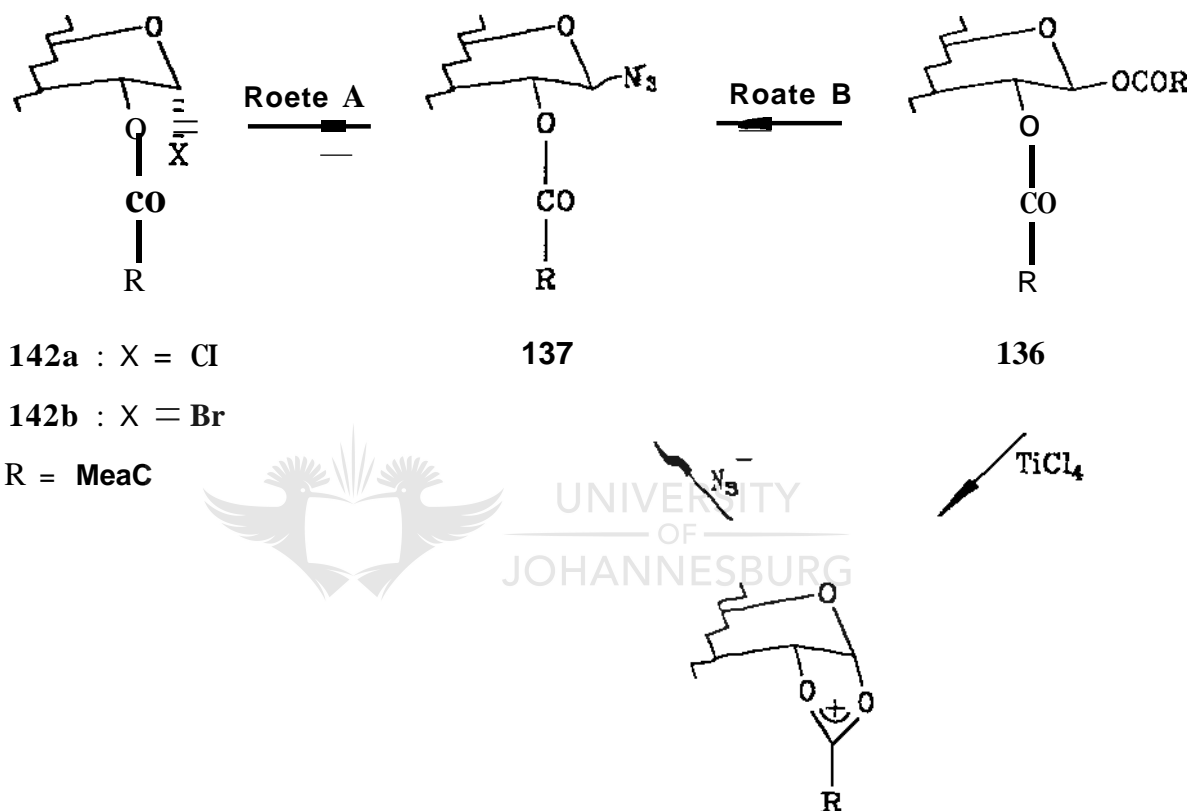
Drupsgewyse byvoeging van pivaloieelchloried by 'n oplossing van droe D-galaktose in anhidriese piridien by 75°C , gevolg deur verhitting van die reaksiemengsel by 75°C vir 2 dae, het penta-*o*-pivaloieel-, β -D-galaktose (136) in 'n verhoogde opbrengs van 72% gelewer. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van 136 resoneer H-1 (δ 5.69) as 'n doeplet met $J_{1,2} = 8.2$ Hz in ooreenstemming met koppeling tussen aksiale protone. Dit is bekend dat α - en β -piranosevorms van D-galaktose in 'n verhouding van 73:27, as gevolg van die anomere effek, in oplossing voorkom.¹²⁶ Die uitsluitlike vorming van die β -anomeer van die gepivaloieeleerde derivaat (136) kan aan die steries groot pivaloieelsubstituent op C-1 toegeskryf word, aangesien in die geval van die α -anomeer die substituent sterk 1,3-destabiliserende steriese interaksies met die waterstowwe op C-3 en C-5 sal ondervind. H-2 van 136 resoneer as 'n doeplet van doebllette by δ 5.33 ($J_{2,3} = 10.3$ en $J_{1,2} = 8.2$ Hz), terwyl H-3 ooreenkomstig as 'n doeplet van doebllette by δ 5.14 ($J_{2,3} = 10.3$ en $J_{3,4} = 3.3$ Hz) resoneer. H-4 resoneer as 'n doeplet met $J_{3,4} = 3.3$ Hz by δ 5.40. Die doeplet van doebllette by δ 4.07 kan aan H-5 toegeskryf word en dit vorm die X-gedeelte van 'n ABX-sisteem. Die AB-sisteem, nl. H-6a en H-6b, resoneer by δ 4.14 en δ 3.95, respektiewelik, as twee doebllette van doebllette. Bogenoemde toekennings is m.b.v. ontkoppelingseksperimente bevestig. Met bestraling van H-1 verval H-2 na 'n doeplet terwyl bestraling van H-2, H-1 na 'n singulet en H-3 na 'n doeplet laat verval. Bestraling van H-3 laat H-2 na 'n doeplet en die doeplet van H-4 na 'n singulet verval. Die ^1H -k.m.r. gegewens is volledig vereenselwigbaar met 'n verbinding 136 in die stabiele stoelkonformasie en met die C-4 substituent aksiaal. Die afwesigheid van enige koppeling tussen H-4 en H-5 dui egter op 'n visinale hoek van ongeveer 90° wat moontlik

die gevolg is van 'n klein distorsie ten einde die afstotende interaksies tussen die groot substituentte op C-2, C-3 en C-4 te minimiseer.

2,3,4,6-Tetra-o-pivaloïel-p-D-galaktopiranosielasied (137) is m.b.v. twee roetes vanaf penta-0-pivaloïel-p-D-galaktose (136) berei, naamlik *via* die ooreenkomstige C-1-halogeenderivaat en tweedens op 'n direkte wyse. Die bereiding van 2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel-a-D-galaktopiranosielchloried (142a) het aanvanklik probleme opgelewer. Die pentapivaloïelderivaat (136) was onveranderd na langdurige blootstelling aan IN waterstofchloried (HCl) in dioksaan of 6N HCl in ysasynsuur by kamertemperatuur. Deur 'n kontinue stroom van HCl deur 'n oplossing van 136 in ysasynsuur onder streng anhidriese kondisies te borrel is 142a egter in 'n opbrengs van 68% gevorm. Die koppelingskonstante ($J_{1,2} = 3.9$ Hz) van H-1 (δ 6.36) met H-2 bevestig die aksiaal-ekwatoriale verwantskap tussen hierdie waterstowwe. Hierdie afleiding is in ooreenstemming met waarnemings in die literatuur waarvolgens die o-anomeer van glikosielhaliede, a.g.v. die groot anomere effek, die meer stabiele isomeer verteenwoordig.¹²⁹ Die m.s.e-spektrum van 142a het die teenwoordigheid van die chloorsubstituent bevestig en twee M⁺-pieke by m/z 536 en m/z 534 in 'n 1:3 verhouding respektiewelik vertoon. Die meer reaktiewe 2,3,4,6-tetra-o-pivaloïel-a-D-galaktopiranosielbromied (142b) is deur die reaksie van 136 met waterstofbromied, opgelos in ysasynsuur,¹²⁵ verkry.

Alhoewel dit bekend is dat sekonder gesubstitueerde halogeenderivate normaalweg slegs substitusie met asiede onder redelik drastiese kondisies of met behulp van katalisatore ondergaan,¹³⁰ is beide halogeensuikerderivate (142a.b) sander probleme deur die reaksie met natriumasied in droe dimetielformamied by 120°C vir 2 uur in hoë opbrengs na 2,3,4,6-tetra-D-pivaloïel-,B-D-galaktopiranosielasied (137) omgesit. Die verhoogde reaktiwiteit wat in dié substitusiereaksies waargeneeri is kan aan die reaktiewe aard van die anomere posisie toegeskryf word. Die asied (137) is oak met behulp van 'n verbeterde metode, wat die reaksie van 136 met trimetielsilieliasied in die teenwoordigheid van titaantetrachloried by -70°C behels het, berei. Beide van die twee metodes het die

β -anomeer (137) as eindproduk, sods bevestig deur IH-k.m.r.-analise, gelewer. Byvoorbeeld, H-1 (δ 4.59) is betrokke in 'n aksiaal-eaksiaalkoppeling met H-2 ($J_{1,2} = 8.6$ Hz). Die omsetting van 142a en 142b kan in terme van 'n SN2-reaksie (Roete A) gerasionaliseer word, maar die omsetting van 136 na 137 dui op buurgroepdeelname (Roete B) sods in Skema 2.47 uiteengesit. Die asiedfunkeionaliteit vertoon in die i.r.e.-spektrum ($CHCl_3$) van 137 'n swak absorpsie by 2121 cm^{-1} .



Skema 2.47

Die reduksie van 2,3,5-tri-o-bensoiel-.B-D-ribofuranosielasied deur Baddiley *et al.*¹³¹ met Adam se katalis het tot 'n anomere mengsel van die ooreenkomstige amien gelei. Die vermoede het ontstaan dat die polariteit van die oplosmiddel 'n merkbare invloed op die anomere verhouding van die produk uitoefen. Die anomere konfigurasie van N-tosiel-2,3-Q-isopropilideen-D-ribofuranosielasied in verskeie oplosmiddels is m.b.v. IH-k.m.r.-analise en optiese rotasies deur Cusak *et al.*¹³² ondersoek. Dit is gevind dat min van die o-anomeer in chloroform teenwoordig is, maar dat in die meer polere

dimetielsulfoksied tot 37% van die verbinding as die α -anomeer voorkom. In deuteriumoksied kom tot 40% in die α -anomeervorm voor. Dit was dus duidelik dat die kondisies waaronder hidrogenering van die asied (137) uitgevoer word In merkbare invloed op die anomere verhouding sou uitoefen.

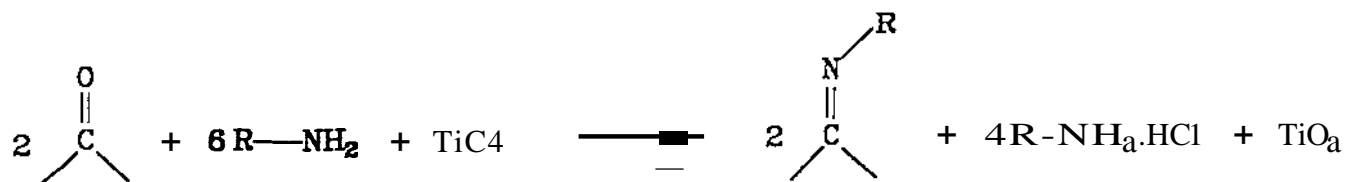
Verskeie reduksiemetodes waaronder NaBH_4 /fase-oordragkatalis/ H_2O /tolueen,^{130b} Lindlar-katalis/ H_2 ,¹³³ propaan-1,3-ditiol-trietielamien/metanol,¹³⁴ H_2S /piridien/ H_2O ¹³⁵ en PPh_3 /tetrahydrofuraan/ H_2 ¹³⁶ is dus ondersoek om die optimale reduksiekondisies te identifiseer wat slegs tot die vorming van In enkele anomeer sou lei. Die beste resultaat is met katalitiese hidrogenering van die asied (137) in die teenwoordigheid van platinumdioksied in etiel asetaat behaal, waardeur suiwer 2,3,4,6-tetra--Q-pivaloiel-,B-D-galaktopiranosielamien (138) in In opbrengs van 74% verkry is. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van 138 het bevestig dat H-1 (δ 4.11) duidelik in In aksiaal-aksiaalkoppeling met H-2 ($J_{1,2} = 8.7$ Hz) betrokke is. Geen spore van die ooreenkomstige o-anomeer, met In aksiaal-ekwatoriaalkoppeling tussen H-1 en H-2, is waargeneem nie. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van die amien (138) resoneer die twee amienprotone as In bree multiplet by δ 1.86, terwyl die amienfunktionaliteit verantwoordelik is vir twee swak absorpsiebande by 3431 en 3350 cm^{-1} in die I.r.-spektrum van die verbinding.

Die bereiding van die Schiff-basis (143) vanaf die glikosielamien (138) was van meet af problematies. Kondensasie van die glikosielamien (138) met isovaleraldehyd ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CHO}$) in heptaan of in 2-propanol in die teenwoordigheid van 1 mol-ekwivalent ysasynsuur het nie die verwagte aldimien (143) in hoë opbrengs gelewer nie. Sels na verlengde reaksietye by kamertemperatuur het dunlaagchromatografie van die reaksiemengsels op die teenwoordigheid van In groot hoeveelheid uitgangsmateriaal ($R_f = 0.31$, heksaan:etiel asetaat 4:1) en die vorming van In reeks ongeïdentifiseerde minder polere produkte gedui. Die uitvoering van die reaksie by verskillende temperature,¹³⁷ die gebruik van ander oplosmiddels soos byvoorbeeld benseen, diehloormetaan of

heksaan en met trifluormetaansulfoonsuur as alternatiewe protonbron het geensins tot verbeterde resultate gelei nie.

Die kondensasie van 'n amien met 'n aldehied om 'n Schiff-basis te vorm, gaan met die vrystelling van water gepaard en gevolglik is bogenoemde reaksies in die teenwoordigheid van disikloheksielkarbodiimid (DSKI, wat gevormde water d.m.v. 'n chemiese reaksie uit 'n ewewigsreaksie onttrek) of anhidriese natriumsulfaat uitgevoer. Die produksamestelling is egter nie hierdeur noemenswaardig beïnvloed nie. Aseotropiese verwydering van water met benseen of uitvoering van die reaksie met die aldehied self as oplosmiddel,¹³⁸ het volgens dunlaagchromatografie slegs die vorming van 'n wye reeks reaksieprodukte tot gevolg gehad. Molekulere sif, wat beide as katalisator en dehidreeringsreagens kan funksioneer, vind heelwat toepassing in die bereiding van ketimien en enamiene vanuit steries gehinderde ketone.¹³⁹ Volgens dunlaagchromatografie het uitvoering van die kondensasiereaksie in die teenwoordigheid van molekulere sif onder 'n verskeidenheid van reaksiekondisies, egter in ons geval, nie tot bruikbare produkvorming gelei nie.

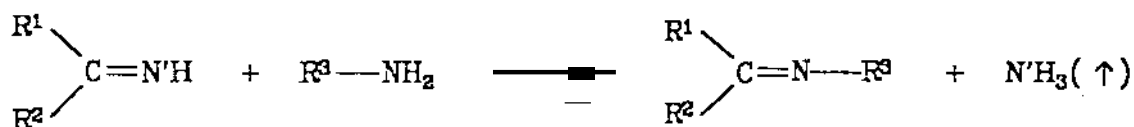
Corey *et al.*¹⁴⁰ het die steries gehinderde isobornielamien met (+)-kamfer in die teenwoordigheid van titaantetrachloried gekondenseer om die ooreenkomstige imien in hoë opbrengs te lewer. Uit 'n stoigiometriese oogpunt (kyk Vergelyking 2.1) sou die reaksie in ons geval nie ekonomies wees nie, aangesien 'n drievoudige oormaat van die duur gesintetiseerde amien t.o.v. die aldehied gebruik sou word. Nietemin, die gebruik van



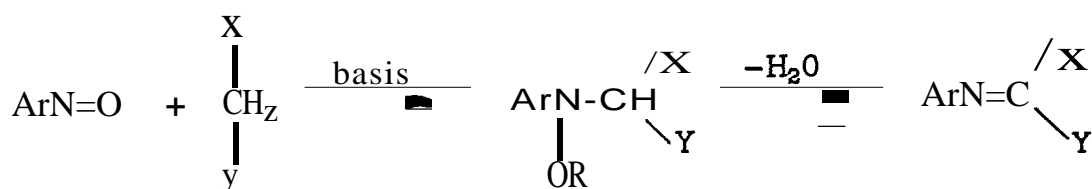
Vergelyking 2.1

titaantetrachloried, wat analoog aan molekulere sif as beide katalis en dehidreringsreagens kan optree, het slegs tot die omsetting van 138 na die ooreenkomstige hidrokloriedsout gelei. Die teenwoordigheid van bygevoegde basis (trietielamien of kaliumwaterstofkarbonaat) het geen wesentlike uitwerking op die genoemde soutvorming gehad nie. Die gebruik van twee ander Lewis-sure vir die bereiding van Schiff-basisse, nl. di-n-butieltindichloried¹⁴² (wat as 'n good gekontroleerde bron van HCl kan dien) en BF₃-Et₂O in toluen,¹⁴³ het egter ook nie die vorming van die Schiff-basis (143) bevorder nie. In hierdie sowel as al die ander gevalle wat voorheen genoem is, het Schiff-basisvorming volgens dunlaagchromatografie baie onvolledig verloop. Die vermoede het dus ontstaan dat die resultate toegeskryf kan word aan (i) 'n ongunstige ewewigsposisie ten opsigte van Schiff-basisvorming of (ii) 'n foutiewelike afleiding ten opsigte van die mate van produkvorming as gevolg van hidrolise van die Schiff-basis tydens dunlaagchromatografie. Beide van hierdie moontlikhede is ondersoek in die lig van die bestaande kennis ten opsigte van die vorming en reaktiwiteit van Schiff-basisse.

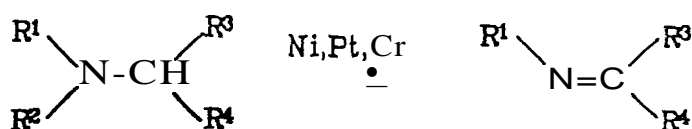
Soos die status van die koolstof-stikstofdubbelbinding as funksionele groep in organiese chemie tot so 'n mate toegeneem het dat dit huidiglik self met dié van die koolstofsuurstofdubbelbinding vergelyk kan word, het verskeie metodes vir die bereiding van asometriene (Schiff-basisse, oksieme en hidrasone) in die literatuur verskyn.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ 'n Opsomming van die algemeenste bereidingsmetodes van Schiff-basisse word in Skemas 2.48-2.53 geïllustreer. Die klassieke metode egter vir die daarstelling van 'n koolstofstikstofdubbelbinding behels die kondensasie van aldehyede of ketone (144, Skema 2.54) met 'n verskeidenheid van aminoverbindings (145), byvoorbeeld ammoniak, amiene,



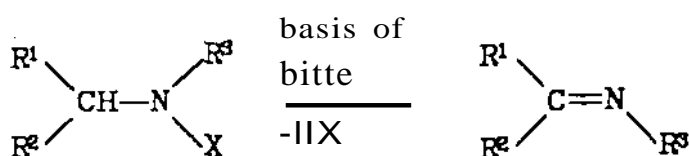
Skema 2.48 : Bereiding van Schiff-basisse deur Imien-uitruilreaksies.^{144,146}



Skema 2.49 : Bereiding van Schiff-basisse deur Kondensasiereaksies met Metileengroepe (X en Y is elektrontrekkende groepe).¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

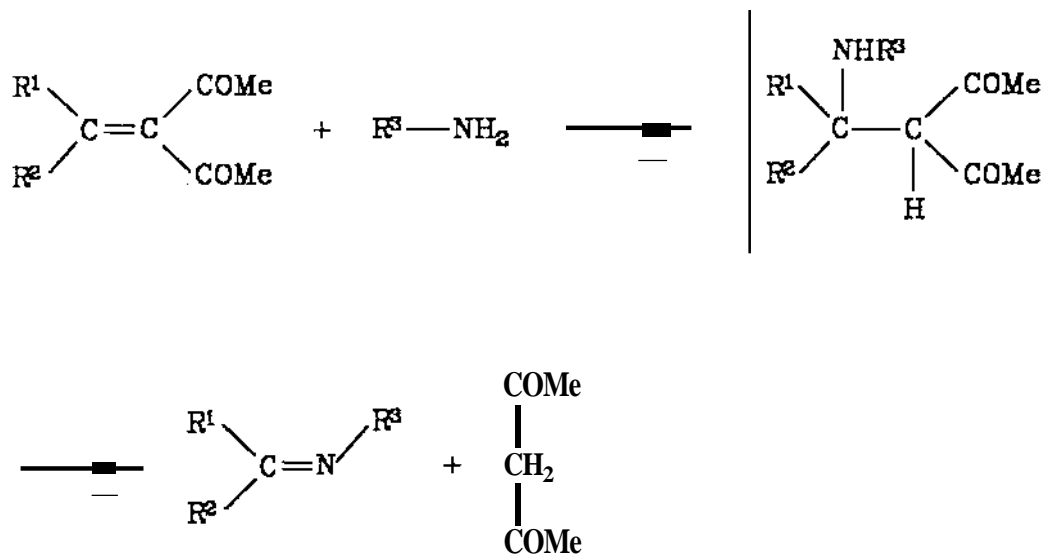


Skema 2.50 : Bereiding van Schiff-basisse deur Dehidrogenering (oksidasie) van Aminogroepe.¹⁴⁴



Skema 2.51 : Bereiding van Schiff-basisse deur Eliminasiereaksies.^{144,145}

hidroksielamiene en hidrasiene, om na eliminasië van water die ooreenkomstige asometien (147) te lewer.^{144-146,148} Uitgebreide kinetiese studies het aanleiding gegee tot die formulering van In tweestapmeganisme vir asometienvorming (en omgekeerd asometienhidrolise) *via* In tetrahedrale karbinolamientussenproduk(146).^{148,149} Asometienvorming in die algemeen is suurgekataliseer. Die tempo van kondensasie, onder optimale kondisies by pH 4, is ongeveer direk eweredig aan die nukleofiliteit van die

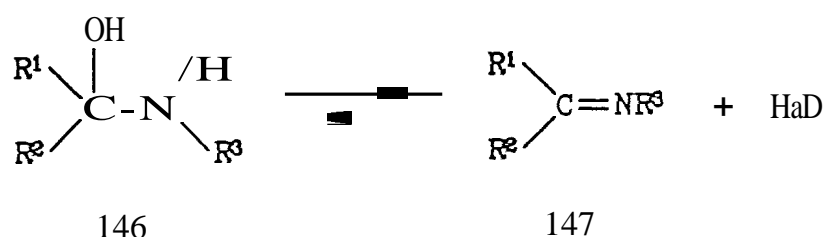
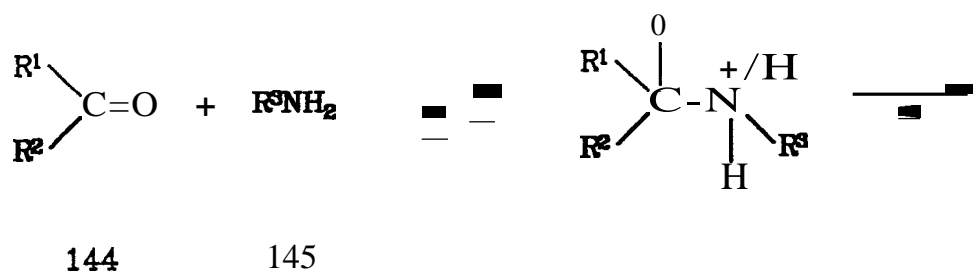


Skema 2.52 : Bereiding van Schiff-basisse vanaf Substrate met Meervoudige Bindings.144-146



Skema 2.53 : Bereiding van Schiff-basisse deur [1,2] C → N Migrasies.¹⁴⁷

aminokomponent. In neutrale medium is dehidrasie van die karbinolamlen (146) die tempobepalende stap waarteenoor in suurmedium karbinolamienvorring die tempobepalende stap is. In die geval van ammoniak- en amien-karbonieikondensasies (Skema 2.54) lê die ewewig sterk na links, met die gevolg dat aseptropiese verwydering van water noodsaaklik vir imien- en Schiff-basisvorming is. Die karbinolamien (146) is baie onstabiel en ondergaan gereedelik polimerisasie. Schiff-basisse (147) wat vanaf formaldehied en alifatiese aldehyede gevorm word, ondergaan by wyse van 'n aldoitipe kondensasie oak gereedelik polimerisasie. Schiff-basisse van aromatiese aldehyede is egter heelwat stabiel.



waar : $\text{R}^1, \text{R}^2 = \text{H}, \text{alkiel}, \text{arief}$

$\text{R}^3 = \text{alkiel}, \text{arief}, \text{OH}, \text{OR}, \text{NHR}, \text{Hal}$

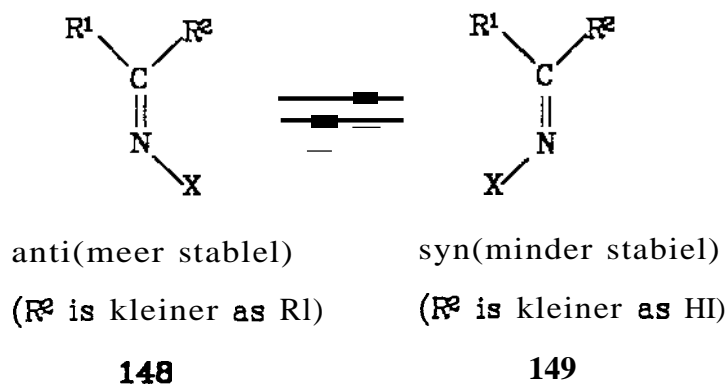
Skema 2.54

In die lig van bostaande gegewens ten opsigte van Schiff-basisse is geoordeel dat die oenskynlike mislukking van alle pogings om verbinding 143 te berei eintlik toe te skrywe was aan 'n onvermoe om dié reaktiewe verbinding m.b.v. dunlaagchromatografie (silika) waar te neem. Die besluit is dus geneem om die verloop van die kondensasiereaksie met behulp van fisiese tegnieke, naamlik Lr.- en k.m.r.-spektroskopie, te volg. Alhoewel in hierdie ondersoek nie gepoog is om die pH van die reaksiemengsels te bepaal nie, kon aanvaar word dat die byvoeging van 1 molekwivalent ysasynsuur by die reaksiemengsels wel 'n nadelige uitwerking op die ewewigskondisies van die kondensasiereaksies uitgeoefen het. Aangesien pH 4 optimaal vir Schiff-basisvorming is, is besluit om slegs 0.25 molekwivalent ysasynsuur as katalisator te gebruik. Die reaksie is uitgevoer in heksaan of deuteriochloroform in teenwoordigheid van anhidriese natriumsulfaat.

Die kondensasie van glikosielamien (138, Skema 2.46) met isovaleraldehyd onder bogenoemde reaksiekondisies in heksaan is eerstens met behulp van Lr.-spektroskopie gevolg. Na 'n reaksietyd van 4.5 uur by kamertemperatuur het die Lr.-spektrum (CHCl_3) van die reaksiemengsel 'n mediumsterkte C=N absorpsieband by 1670 cm^{-1} vertoon, terwyl die amienabsorpsiebande by $3500\text{-}3350 \text{ cm}^{-1}$ nie meer waargeneem is nie. Langer reaksietye het tot 'n verlaging in die intensiteit van die imienabsorpsieband gelei, moontlik as gevolg van ontbinding van die Schiff-basis. Aangesien kwantitatiewe analise met behulp van Lr.-spektroskopie moeilik was, is analise met behulp van ^1H -k.m.r.-spektroskopie vervolgens ondersoek.

Die verloop van die kondensasie van die amien (138) met isovaleraldehyd in deuteriochloroform in die teenwoordigheid van 0.25 molekwivalent ysasynsuur en anhidriese natriumsulfaat is met behulp van ^1H -k.m.r.-spektroskopie gevolg. Na 'n reaksietyd van 5 minute by kamertemperatuur het die ^1H -k.m.r.-spektrum van die reaksiemengsel twee tripletresonansies by $\delta 7.82$ ($J = 5.1 \text{ Hz}$) en $\delta 7.67$ ($J = 4.5 \text{ Hz}$) in 'n verhouding van 3:1 onderskeidelik getoon. Dit is bekend dat imienprotonresonansies normaalweg tussen $\delta 8.02\text{-}8.28$ voorkom,¹⁵⁰ met die gevolg dat die genoemde resonansies aan die imienproton van die Schiff-basis (143) in twee isomeriese vorms toegeken is. Na 14 uur het die verhouding van die twee triplette na 2:3 verander. Herhaling van die reaksie in die afwesigheid van ysasynsuur en/of anhidriese natriumsulfaat het soortgelyke resultate gelewer. Die vraag het dus ontstaan of die produk as 'n anomere mengsel van Schiff-basisse of as 'n enkele anomeer in ander moontlike isomeriese vorms bestaan. Ongelukkig kon die ^1H -k.m.r.-resonansies van die anomere protone van die twee isomere nie met sekerheid toegeken word nie vanwee die kompleksiteit van die spektrum.

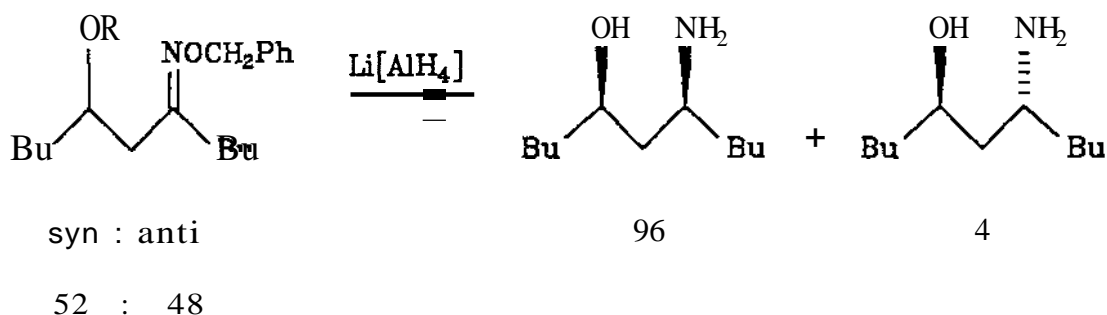
As gevolg van die relatiewe starheid van die koolstof-stikstofdubbelbinding en die nie-lineeriteit van die strukture wat dit bevat is dit vir N-gesubstitueerde asometiene, d.w.s. Schiff-basisse, potensieel moontlik om in twee diskrete geometriese isomeriese vorms (148 en 149, Skema 2.55) te bestaan.^{146,151} In die geval van N-gesubstitueerde



Skema 2.55

aldimie is die sogenaamde *anti*-struktuur 148 ($\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{X} =$ alkiel of ariel), met die waterstofatoom aan dieselfde kant van die dubbelbinding as die N-substituent, die termodinamies meer stabiele vorm. Die ander konfigurasie (149; $\text{R}^2 = \text{H}$, $\text{X} =$ alkiel of ariel) is die minder stabiele *syn*-isomeer. Twee meganistiese verklarings¹⁵² vir die *syn* \rightleftharpoons *anti*-isomerie bestaan huidiglik, naamlik 'n uit die vlak rotasionele proses via 'n dipolere oorgangsproduk en 'n in die vlak laterale skuifmeganisme via 'n lineere oorgangsproduk. Alhoewel Schiff-basisse by kamertemperatuur in die algemeen eksklusief as die meer stabiele *anti*-isomeer voorkom,¹⁵³ is in die geval van C-ariël-N-alkielaldimie m.b.v. ^1H -k.m.r.-analise vasgestel dat die minder stabiele *syn*-isomeer in 'n redelike konsentrasie by dié temperatuur voorkom.¹⁵⁴

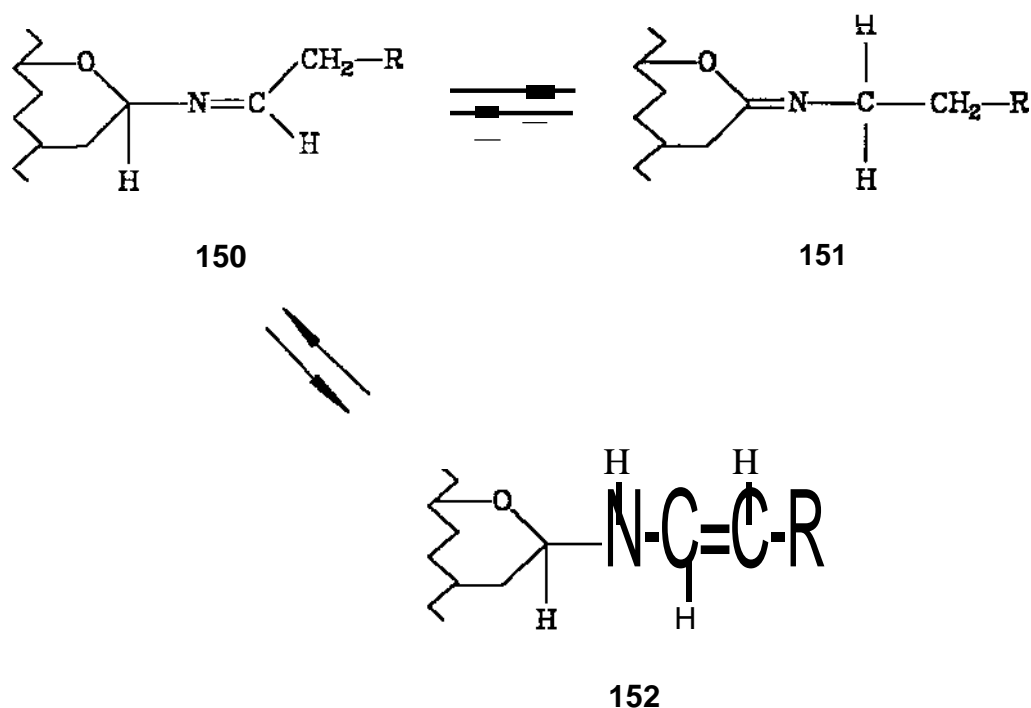
In die lig hiervan is die moontlikheid oorweeg dat verbinding 143 as 'n mengsel van *syn*- en *anti*-isomere bestaan. Die moontlike invloed hiervan op sianiedaddisie is oorweeg in die lig van 'n diastereoselektiewe reduksie van 'n ongeveer 1:1 mengsel van *syn*- en *anti*-O-bensieloksieme van β -hidroksiketone (Skema 2.56) om byna uitsluitlik die *cis*-amien te lewer.¹⁵⁵ Die resultaat kan geredelik gerasionaliseer word in terme van verskille in die tempo van reduksie van twee isomere wat in dinamiese ewewig met mekaar verkeer. Op analoe wyse sou verwag kan word dat die reaksie van die *syn*- en *anti*-isomere van 143 met sianiedione hoofsaaklik een diastereomeer sal lewer. Die



Skema 2.56

moontlikheid dat die twee tripletresonansies by δ 7.82 en δ 7.67 wel aan die voorkoms van syn-anti--isomerie toe te skryf is, is vervolgens m.b.v. temperatuurveranderlike IH-k.m.r.-spektroskopie ondersoek. Temperatuurveranderlike IH-k.m.r.-studies in deuteriochloroform (100°C intervale, 20°C → 60°C) en deuteropiridien 100°C intervale, 20°C → 100°C) op monsters van bogenoemde reaksiemengsels het geen verandering in die verhouding in integrasieoppervlaktes van die twee triplette relatief tot mekaar getoon nie. Aangesien die aktiveringsenergie van soortgelyke *syn-anti--omsettings*¹⁵⁴ laag is, het die genoemde eksperiment dus die teenwoordigheid van sulke isomere as verklaring van die twee tipes resonansies in die spektrum van 143 uitgeskakel. Die moontlikheid van ander isomeriese vorms is ook oorweeg.

Dit is bekend dat Schiff-basisse prototropiese tautomerie (150 ⇌ 151, Skema 2.57), wat 'n [1,3]-protonoordrag behels, ondergaan.¹⁴⁶ Dié asometien-asometientautomerie vind op 'n stapsgewyse manier (gewoonlik onder drastiese basisgekataliseerde kondisies¹⁵⁰) *via* die stereospesifieke oordrag¹⁵⁶ van 'n proton oar die 'gesig' van 'n asa-allielanioon-tussenproduk¹⁵⁷ plaas. Die ooreenkomstige situasie in die geval van verbinding 143 kan uitgeskakel word op grond van die IH-k.m.r.-spektrum van die verbinding. In gevalle waar 'n mobiele waterstofatoom α tot die asometienkooistof teenwoordig is, soos in die geval van 143, kan asometien-enamienprototropla'Y' (150 ⇌ 152, Skema 2.57) onder

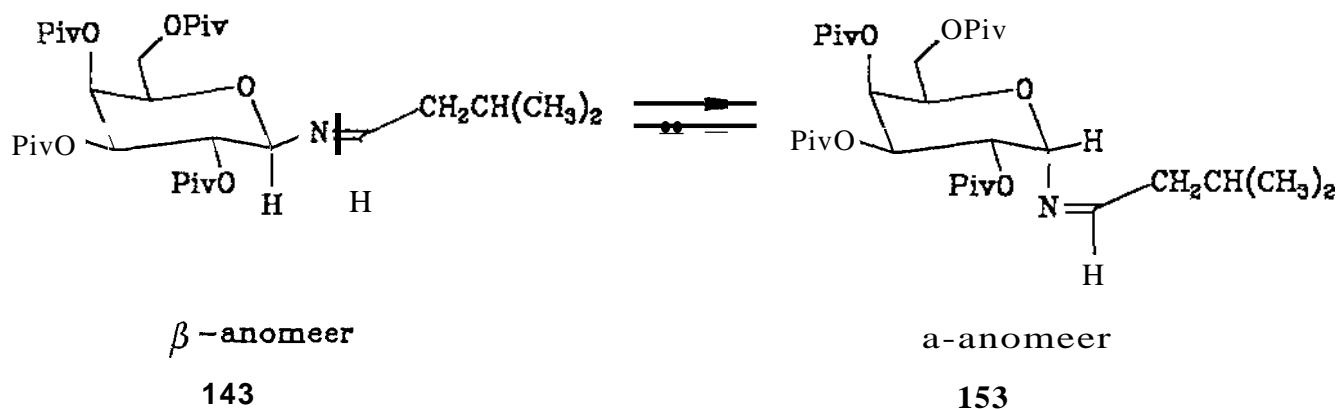


Skema 2.57

milde kondisies, byvoorbeeld in 'n polere oplosmiddel soos dimetielsulfoksied, ¹⁵⁸ ingestel word. Die voorkoms van die enantiomere (¹⁵²) in beduidende hoeveelhede vereis egter addisionele stabiliserende faktore, byvoorbeeld konjugasie, wat nie in die geval van ¹⁴³ (Skema 2.46) teenwoordig is nie. Indien die Schiff-basis van die glikosielamien (¹³⁸) met fenielasetaldehyd ($C_6H_5CH_2CHO$) egter gevorm word, sou beduidende hoeveelhede van die enantiomere wel kon bestaan vanwee die stabiliteit van die gekonjugeerde sisteem. Op grond van bogenoemde oorwegings, tesame met die feit dat die resonansies van die viniliese protone van enamieë normaalweg by hoer veld (δ 6.5-5.5)¹⁵⁸ voorkom as die tripletresonansies (δ 7.82 en δ 7.67) van ¹⁴³, is die moontlikheid van enamien-imienomimerie in hierdie geval uitgesluit as 'n verklaring van die bestaan van hierdie isomere.

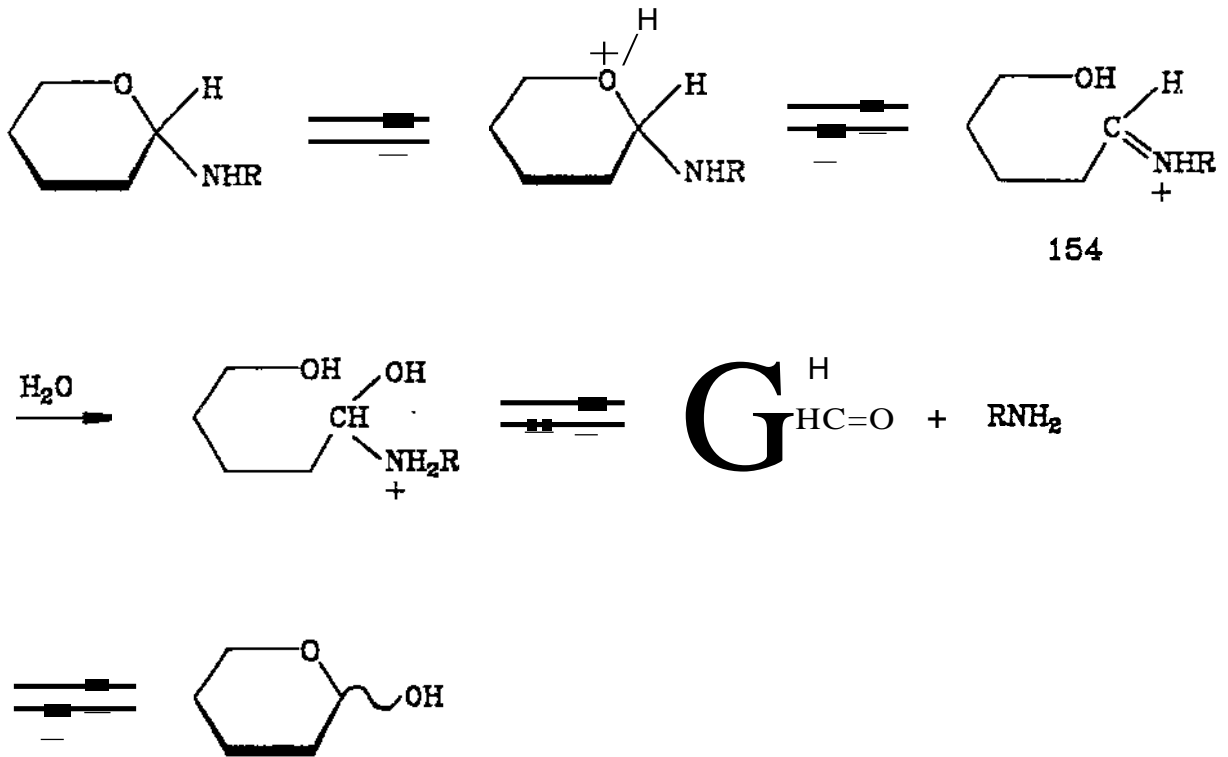
Die oorkoepelende resultaat van bogenoemde studies was dat die vorming van die Schiff-basis (¹⁴³) met epimerisasie van die anomere posisie gepaard gaan en dat die produk dus as 'n mengsel van ¹⁴³ en ¹⁵³ (Skema 2.58) bestaan. Die veranderende

produksamestelling met verloop van tyd kon nou verklaar word in terme van die aanvanklike ell uitsluitlike vorming van die ,8-Schiff-basis (143) wat deur middel van epimerisasie van die anomere posisie binne enkele minute in ewewig met die α -Schiff-basis (153) tree. Die twee tripletresonansies wat by δ 7.82 en δ 7.67 in die ^1H -k.m.r.-

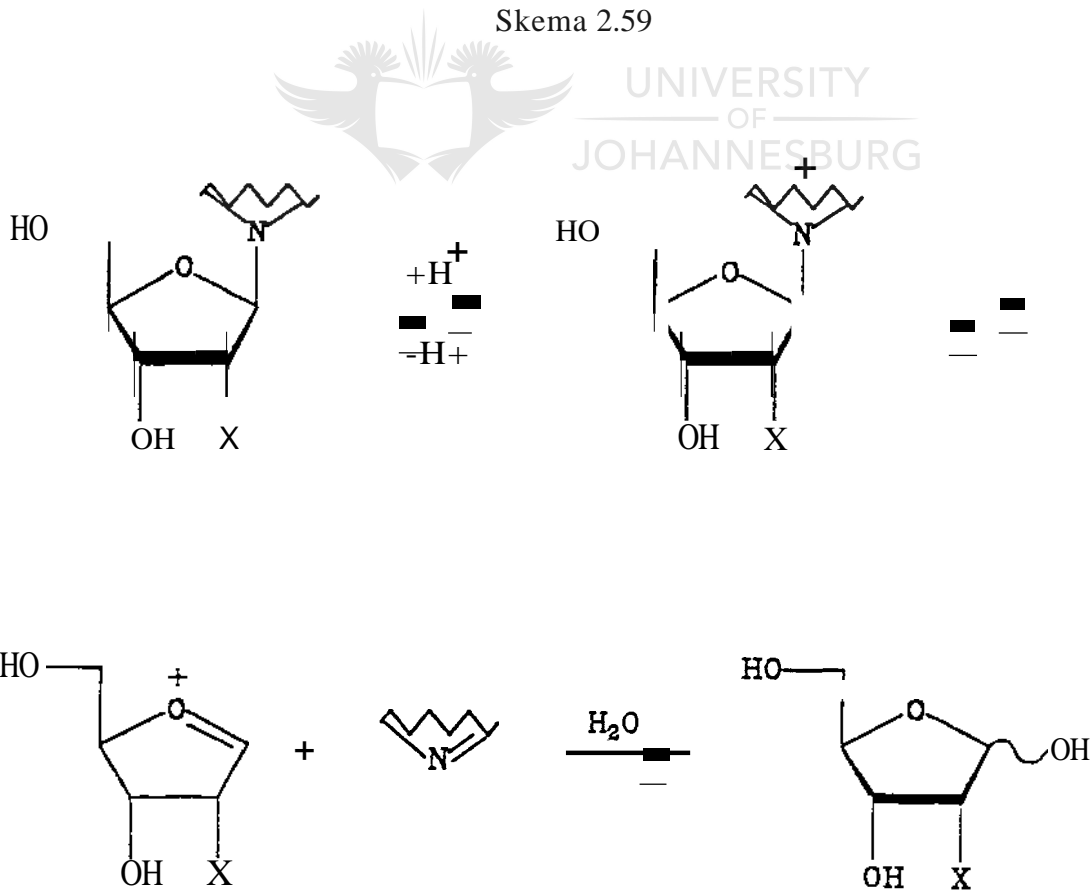


Skema 2.58

spektrum van die reaksieprodukt waargeneem word kon aan die imienprotone van die ,8-Schiff-basis en die α -Schiff-basis onderskeidelik, toegeken word. Die uiteindelijke produksamestelling word deur die anomere effek (wat die α -Isomeer bevoordeel) en 1,3-diaksiale interaksies. (wat die α -Isomeer destabiliseer) bepaal. Glikosielamiene ondergaan gereedelik epimerisasie sowel as hidrolise onder suurkondisies.¹⁵⁹ Aanvanklik is vermoed dat onder dié kondisies die ringsuurstof geprotoneer word (Skema 1.59) waardeur 'n ewewig met die asikliese Schiff-basis (154) ingestel word om sodoende 'n anomere mengsel te lewer.¹⁵⁹ In teenwoordigheid van water sal die intermediere asikliese Schiff-basis (154) vinnig gehidroliseer word. Uit kinetiese data wat oor 'n wye pH gebied vir verskeie N-nukleosiede verkry is, is egter 'n alternatiewe meganisme vir glikosielbindingshidrolise voorgestel (Skema 2.60).^{160,161} Dit behels die voor-ewewigsprotonering van die heterosikliese basis van die nukleosied gevolg deur die tempobepalende ionisasie van die glikosielbinding. 'n Soortgelyke meganisme sou ook die suurgekataliseerde epimerisasie van Schiff-basisse kon verklaar. Die implikasie hiervan was dat epimerisasie verhoed sou kon word deur Schiff-basisvorming onder neutrale kondi-



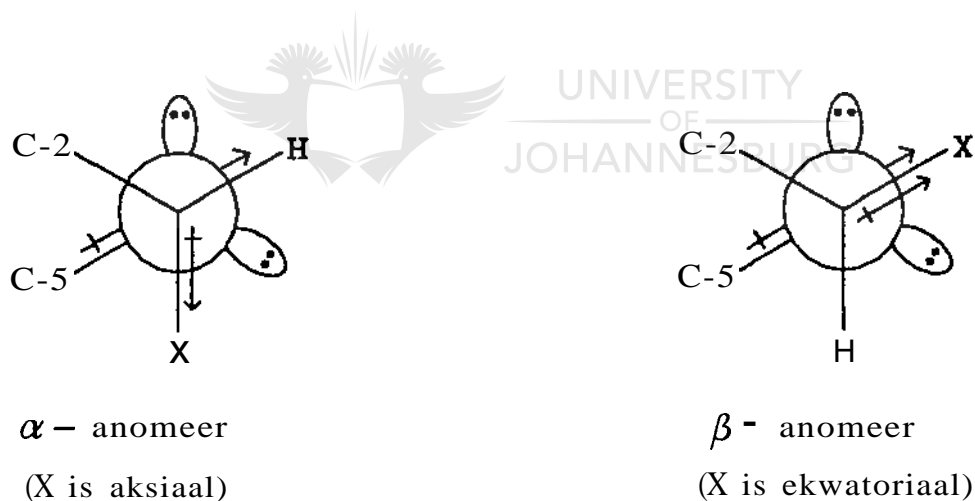
Skema 2.59



Skema 2.60

sies uit te voer.

Die kondensasie van glikosielamien (138) is dus met isovaleraldehyd in deuteriochloroform in die teenwoordigheid van anhidriese natriumsulfaat onder neutrale kondisies uitgevoer. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van die reaksiemengsel na 'n reaksietyd van 3 minute by kamertemperatuur was egter feitlik identies met dié wat in teenwoordigheid van suur verkry is. In die afwesigheid van suur moos 'n ander meganisme vir epimerisasie verantwoordelik wees, terwyl die dryfkrag daarvoor die sogenaamde anomere effek mag wees. Stereo-elektroniese faktore wat die dipolere interaksies tussen die ringsuurstof aan die een kant en die aksiale heteroatoom op C-1 aan die ander kant van 'n piranosesuikerring bevoordeel, gee aanleiding tot die sogenaamde anomere effek.¹⁶¹ Die Newman-projeksie langs die C-1 - O-5 binding van die β -anomeer van 'n piranosesuker (Skema 2.61) toon dat die diPOOL van die C-1 - X binding parallel en



Skema 2.61¹⁶¹

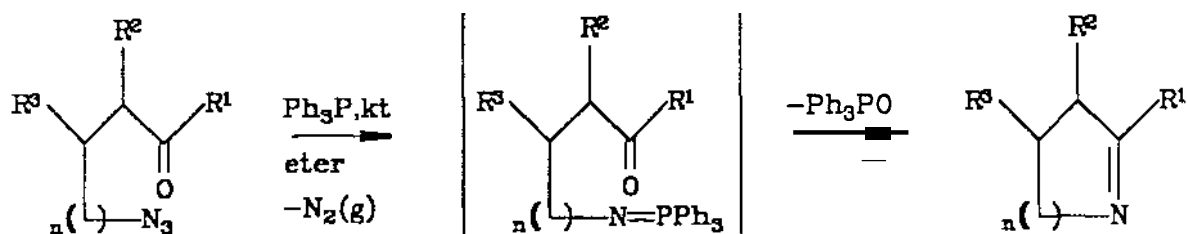
teenoorgesteld aan die dipool van die ringsuurstof is. In die geval van die o-anomeer is hierdie dipole nie meer opponerend van aard nie. Die grootte van die anomere effek is afhanklik van die aard van beide die X-substituent en die oplosmiddel. Solvering verswak die anomere effek met die gevolg dat die effek veral in min-polere oplosmiddels betekenisvol is. Onder invloed van die anomere effek ondergaan die elektronryke imien-

substituent op C-1 van die β -Schiff-basis (143) in heksaan geredelik epimerisasie om uiteindelik die ooreenkomstige o-Schiff-basis as hoofproduk te lewer. Terwyl dit etlike minute neem om In ewewigsmengsel van anomere te verkry, is die kondensasiereaksie self vinnig en kwantitatief. Schiff-basisvorming is egter deurentyd in die nie-polere heksaan as oplosmiddel uitgevoer aangesien die invloed van polariteit van die oplosmiddel op die anomere effek eers na afhandeling van hierdie ondersoek ten volle beseft is.

Ten einde die ongewenste epimerisasie te verhoed, is die reaksiemengsel van glikosielamien (138) in heksaan in die teenwoordigheid van 0.25 molekwivalent ysasynsuur en anhidriese natriumsulfaat onmiddellik na die byvoeging van isovaleraldehyd, deur selliet gefiltreer en *in vacuo* drooggedarnp. Die Schiff-basis (143) is daarna onmiddellik, en sonder enige suiwering, in die volgende reaksie gebruik. Onder dié optimale reaksiekondisies word die epimerisasie tot In maksimum van 5% beperk en die Schiff-basis (143) word in hoë opbrengs gevorm.

2.6.2.b Toepassing van In asa-Wittig-reaksie vir die bereiding van 143

In Meer direkte metode vir die bereiding van die Schiff-basis (143) is gelyktydig met bostaande metode (Afdeling 2.6.2.a) ontwikkel. Die roete behels die bereiding van In iminofosforaanderivaat van 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielasied wat *via* In asa-Wittig-reaksie met In aldehyd die ooreenkomstige Schiff-basis lewer. Soortgelyke asa-Wittig-reaksies vind wye toepassing in die sintese van asiridiene,¹⁶² isokinoliene,¹⁶³ 3,5-digesubstitueerde 1,2,4-oksadiazole,¹⁶⁴ vinilloeuretane en amiede,¹⁶⁵ kinoliene,¹⁶⁶ oksasole¹⁶⁷ en pirasiene.¹⁶⁸ Carrie *et al.*¹⁶⁹ het sikliese imiene *via* In intramolekulere asa-Wittig-reaksie vanaf ω -asidoketone berei (Skema 2.62). Dié reaksie het egter min toepassing in die sintese van isoleerbare Schiff-basisse self gevind.¹⁷⁰ In Moontlike verklaring hiervoor lê onder meer in die geredelike beskikbaarheid van die ooreenkomstige amiene as uitgangsmateriaal vir die sintese van Schiff-basisse. Indien die gesogte Schiff-basis, soos in die geval van 143, nie onder dié



$n = 1 \cdot 2 \text{ of } 3$

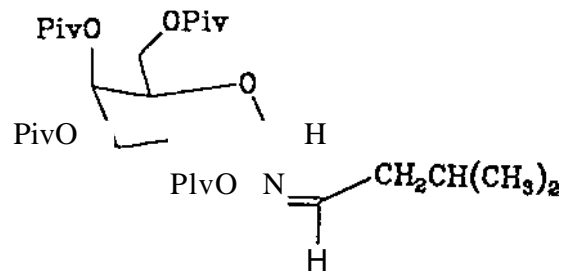
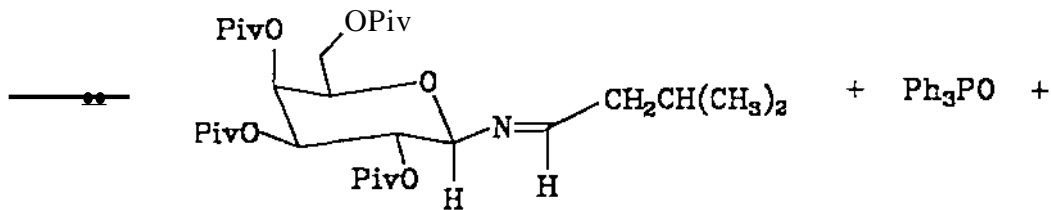
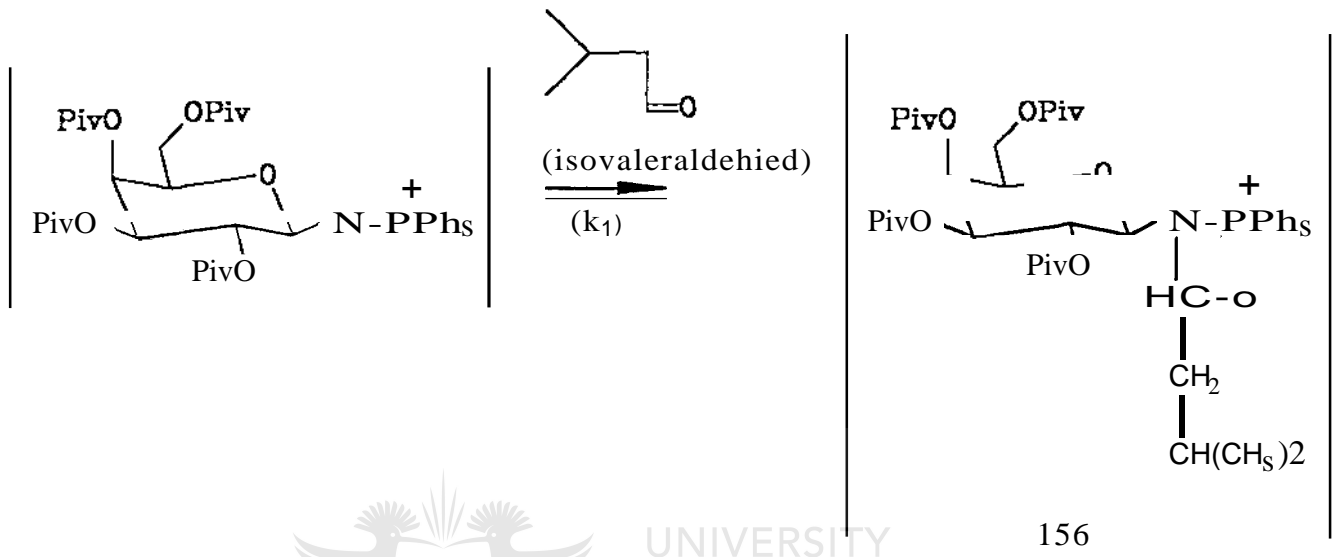
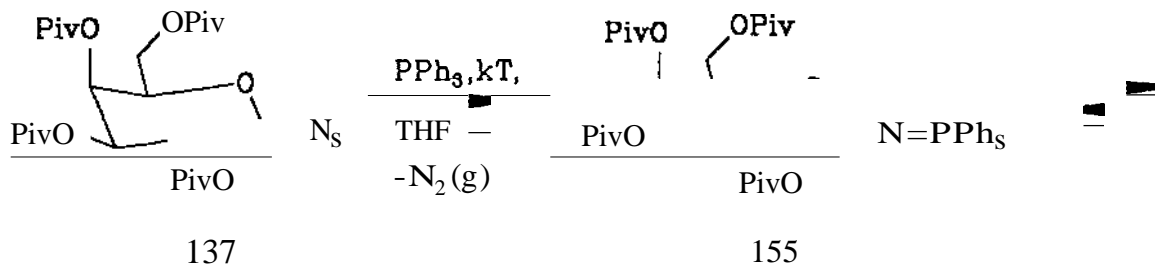
(5- • 6- of 7-lidring)

Skema 2.62¹⁶⁹

reaksieondisies stabiel is nie, dien die asa-Wittig-reaksie as 'n aantreklike alternatief. 'n Verdere voordeel t.o.v. die bereiding van 143 langs hierdie weg is die uitskakeling van 'n addisionele stap, nl. die reduksie van die asied (137) na die ooreenkomstige amien (138). Die voorgestelde sintese van die Schiff-basis (143) word in Skema 2.63 geillustreer.



Die reaksie van 2,3,4,6-tetra-Q-pivaloiel-,B-D-galaktopiranosielasied (137) met trifenielfosfien in tetrahydrofuraan (THF) gaan met die onmiddellike en hewige vrystelling van $N_{2(g)}$ gepaard. Na 'n reaksietyd van 30 minute by kamertemperatuur, waartydens vorming van die iminofosfooraan (155) volledig plaasgevind het, is die reaksiemengsel *in vacuo* drooggedamp en die residu op silikajel (heksaan:etiel asetaat.trietielamien 100:15:2) gechromatografeer. Die iminofosfooraan (15.5) is onverwags stabiel onder hierdie kondisies en is in 'n suiwer toestand en in hoë opbrengs van die kolom geelueer. Die ongewone stabiliteit van 15.5 kan aan steriese hindering van die normaalweg reaktiewe N=P funksionaliteit deur die groot C-2 pivaloielsubstituent toegeskryf word. In die IH-k.m.r.-spektrum van 15.5 resoneer H-1 (δ 4.33) as 'n doeblet van doeblette ($J_{1P} = 18.8$ en $J_{12} = 8.2$ Hz). Hieruit is afgelei dat uitsluitlik die β -iminofosfooraan (155) vanuit die β -glikosielasied (137) gevorm is. In gevalle waar ^{31}P ($I = 1/2$) as substituent op 'n alkeen voorkom word groot $1,3J_{HP}$ -waardes in die



Skema 2.63

orde van 10-30 Hz (*cis*) en 30–60 Hz (*trans*) in die ^1H -k.m.r.-spektra van die verbindings waargeneem.¹⁷¹ Alhoewel ^{31}P in die geval van 155 as deel van die dubbelbinding funksioneer, ondervind dit in koppeling met H-1 in die orde van 18.8 Hz.

Die vorming van die Schiff-basis (143) uit die iminofosforaan (155) is ook m.b.v. ^1H -k.m.r.-spektroskopie ondersoek. Een molekwivalent isovaleraldehyd is by in oplossing van die iminofosforaan (155) in deuteriochloroform gevoeg en die reaksiemengsel is vervolgens by kamertemperatuur geroer. Met verloop van tyd het die ^1H -k.m.r.-spektrum in intensiteitsvermindering van die dublet van dublette van H-1 (δ 4.33) van die iminofosforaan (155) en die verskyning van in bree dublet by δ 4.51 ($J_{12} = 7.2$ Hz) getoon. Die addisiereaksie het na 25 uur volledig verloop, maar die uitsplitsing van Ph_3PO uit die tussenproduk (156) is eers na 96 uur voltooi, waarna die relatiewe intensiteit van die imienprotontriplet by δ 7.81 nie meer toegeneem het nie. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van die totale reaksiemengsel kon egter geen uitsluitel verskaf oor die vraag of die β -Schiff-basis (143) by voorkeur gevorm is nie, aangesien die imienprotonresonansie van die α -Schiff-basis (153, δ 7.67), indien teenwoordig, deur die multipliet van die aromatiese protone (δ 7.15-7.75) verberg is.

In in ondersoek na die meganisme van die reaksie van soortgelyke iminofosforane as 155 met karbonielverbindings, het Wong *et al.*¹⁷² vasgestel dat die snelheidskonstante vir die α -Wittig-reaksie deur twee onafhanklike snelheidskonstantes, nl. k_1 en k_2 , bepaal word. Soos aangetoon in Skema 2.63, dui k_1 die tempo van betaienvorming en k_2 die tempo van betaienontbinding aan. Elektrondonerende substituent op die imien verhoog die elektrondigtheid en gevolglik ook die nukleofilisiteit van die stikstofatoom, maar terselfdertyd verhoog dit ook die elektrondigtheid op die fosforatoom. Die fosforatoom word dus minder elektrofilies met die gevolg dat k_1 toeneem en k_2 afneem. Elektron-trekkende substituent op die imien verlaag die nukleofilisiteit van die stikstofatoom, maar verhoog terselfdertyd die elektrofiliese karakter van die fosforatoom met die gevolg dat k_1 afneem en k_2 toeneem. Hieruit kan afgelei word dat enige substituent op die

imien 'n teenwerkende effek op die twee snelheidskonstantes kan uitoefen. 'Wong *et al.*¹⁷² het verder gevind dat steriese interaksie om die iminofosfooraanbinding slegs 'n nadelige invloed op k_1 uitoefen en dat k_2 onveranderd bly.

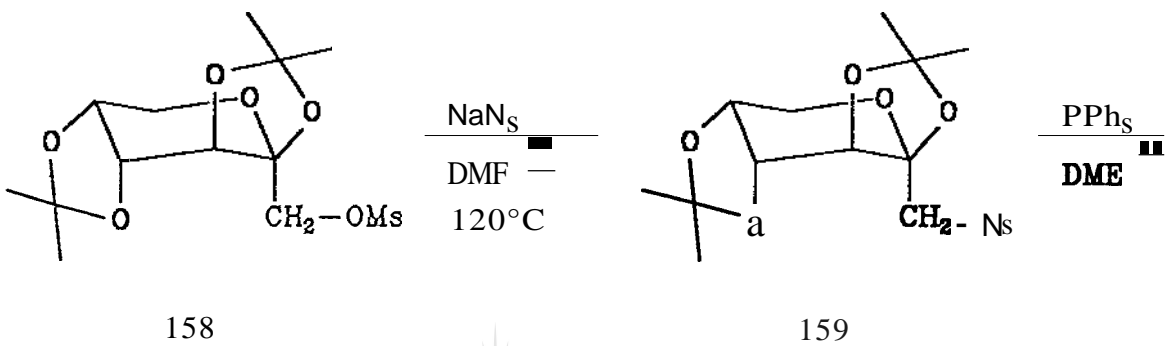
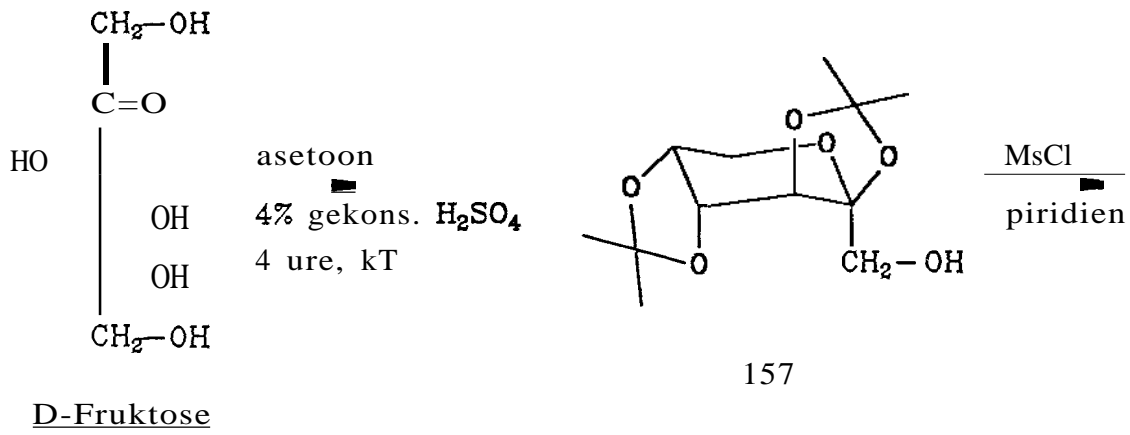
Uit die resultate is dit duidelik dat in die geval van die vorming van 143 k_2 die tempobepalende stap is. Die ringsuurstof verhoog die elektrondigtheid op die stikstofatoom met die gevolg dat die nukleofiliese karakter daarvan en dus ook k_1 toeneem. Die resulterende hoer elektrondigtheid op die fosforatoom verlaag die elektrofiliese karakter daarvan met die gevolg dat k_2 afneem. Aangesien steriese hindering slegs 'n invloed op betaienvorming (k_1) uitoefen en die addisiereaksie reeds volledig na 25 uur by kamertemperatuur verloop het, strook dit met die gevolgtrekking dat betaienontbinding (k_2) die tempobepalende stap is, d.w.s. $k_1 > k_2$. In 'n poging om betaienontbinding te versnel en dus die reaksietyd te verkort is 'n soortgelyke reaksiemengsel as bogenoemde in deuteriochloroform onder terugvloei verhit. Onder hierdie kondisies egter het groot-skaalse ontbinding van beide die produk (143) en ongereageerde iminofosfooraan (1.5.5) plaasgevind. Die invloed van reaksiekondisies is egter nie verder ondersoek nie. Ten einde te bepaal of epimerisasie tydens bereiding van die Schiff-basis (143) via die *asa*-Wittig-reaksie plaasgevind het, is die produk (143) na die ooreenkomstige N-glikosiel-o-amlnonitrel omgesit. Die bereiding, wat later volledig bespreek sal word, het wel op die teenwoordigheid van 'n ongeveer gelyke hoeveelheid van die o-Schiff-basis (153) ten opsigte van die gewenste β -Schiff-basis (143) gedui.

Onder neutrale kondisies kan die anomere effek as 'n redeJike verklaring vir die vorming van die o-epimeer (153) dien. In hierdie verband kan verwys word na 'n ondersoek deur Paulsen *et al.*¹⁷³ na die konformasionele ewewigte van N-gesubstitueerde N-pentapiranosiede. Dit is byvoorbeeld gevind dat in die geval van N-gesubstitueerde N-pentapiranosiede die anomere effek van C-1 substituenten toeneem in die orde: $\text{NH}^+\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Cl}^- \approx \text{NHAc} \approx \text{NH}_2 < \text{NHCOC}_6\text{H}_4\text{NO}_2^-(p) \approx \text{NHCOC}_6\text{H}_4\text{OCH}_3^-(p) < \text{NHCOCF}_3 < \text{N}_3 < \text{OAc} < \text{N-P}+(\text{C}_6\text{H}_5)_3$. Geen anomere effek of omgekeerde

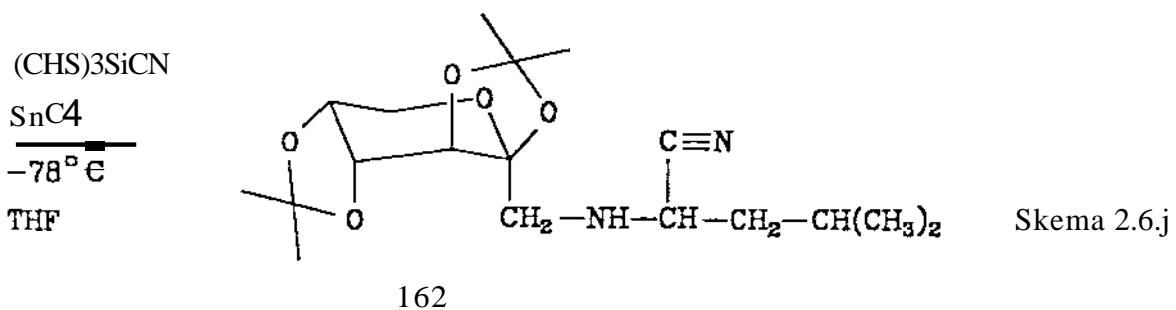
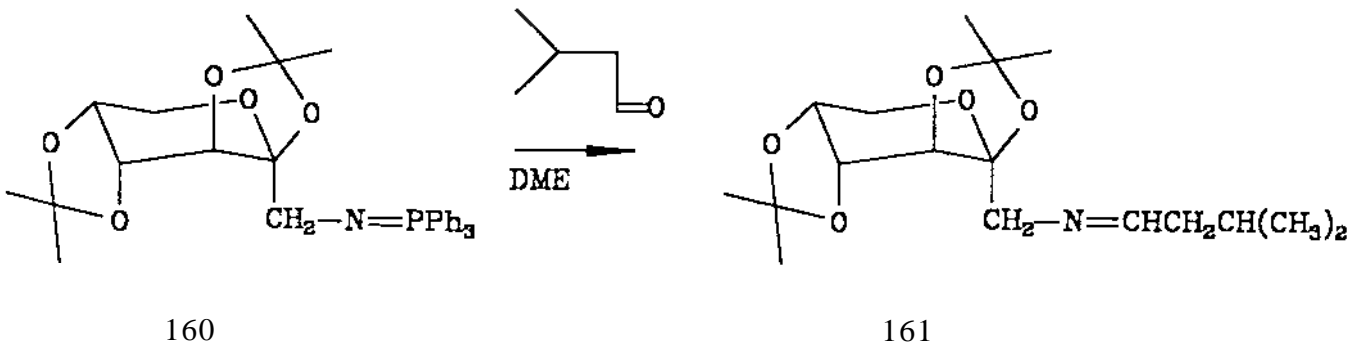
king kan ook verwag word dat die imiensubstituent van die Schiff-basis (143) by wyse van In soortgelyke meganisme as in Skema 2.64 'n sterk anomere effek ondervind. Dit sou die gevolgtrekking t.o.v. epimerisasie in Afdeling 2.6.2.a volledig verklaar.

Die aanvanklike doelwit om epimerisasie tydens Schiff-basisvorming te verhoed deur gebruikmaking van die asa-Wittig-roete wat in die afwesigheid van suur verloop, is dus nie bereik nie. Vanwee die lang reaksietyd en epimerisasie wat plaasgevind het, besit die reaksie geen voordeel bo die alternatiewe amien-aldehydkondensasiereaksie nie. Die benutting van die asa-Wittig-reaksie dien egter in ander gevalle as 'n aantreklike alternatiewe roete vir die sintese van Schiff-basisse. Die algemene toepasbaarheid van die roete is deur die sintese van 1'*R/S*-*N*-(1'-nitriolo-3'-metielbutiel)-2,3; 4,5-di-o-isopropilideen-,B-D-fruktopiranosielamien (162, Skema 2.65) gedemonstreer.

2,3;4,5-Di-o-isopropilideen-,B-D-fruktopiranosie (157) is in feitlik kwantitatiewe opbrengs vanaf D-fruktose volgens die metode van Den Drijver¹⁷⁴ berei. In die ¹H-k.m.r.-spektrum van 157 resoneer die vier isopropilideenmetielgroepe as 4 singulette by δ 1.35, δ 1.40, δ 1.47 en 01.53. Die triplet by δ 2.25, wat die resonansie van die primere hidroksielproton verteenwoordig, is volledig met D₂O uitruilbaar. Die alkoholderivaat (157) is oornag met mesielchloried (CH₃SO₂Cl) in piridien by kamertemperatuur behandel om 2,3;4,5-di-o-isopropilideen-1-0-mesiel-,B-D-fruktopiranosie (158) in 'n opbrengs van 96% te lewer. In die ¹H-k.m.r.-spektrum van 158 resoneer beide H-1a en H-1b as twee AB-doelette ($J_{1a,1b} = 11.0$ Hz) by δ 4.27 en δ 4.17 onderskeidelik. H-3 resoneer as 'n doeplet, ooreenkomstig In ekwatoriaal-ekwatoriaalkoppeling met H-4 van 2.7 Hz, by δ 4.27. Interessant genoeg resoneer H-6b slegs as 'n AB-doeplet (δ 3.72, $J_{6a,6b} = 12.9$ Hz), terwyl H-6a as 'n doeplet van doelette (03.87, dd, $J_{6a,6b} = 12.9$ en $J_{5,6a} = 1.7$ Hz) resoneer. Die drie metielprotone van die metaansulfonielgroep toon In kenmerkende singulet by δ 3.02.



UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG



1-Asido-2,3;4,5-di-Q-isopropilideen-,B-D-fruktopiranoose (159) is vanaf die mesilaat (158) deur die reaksie met natriumasied in dimetielformamied by 120°C vir 24 uur in 'n opbrengs van 74% berei. In die ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 159 resoneer C-1 as 'n triplet by heelwat hoer veld, naamlik δ 55.5, as in die geval van die ooreenkomstige mesilaat (δ 69.93). Die asiedfunktionaliteit van 159 vertoon 'n karakteristieke swak intensiteit-Lr.-absorpsie by 2111 cm^{-1} .

Die reaksie van trifenielfosfen met die asiedderivaat (159) het die iminofosforaan (160) gelewer, wat sonder enige suiwing *via* 'n formele [2+2]sikloaddisie met isovaleraldehyd en gevolglike retrosikloaddisie, die β -fruktose Schiff-basis (161) na 'n reaksietyd van 18 uur by kamertemperatuur in hoë opbrengs gevorm het. Die korter reaksietyd, soos bepaal m.b.v. ^1H -k.m.r.-spektroskopie, in vergelyking met die 96 uur wat vir die vorming van die vergelykbare Schiff-basis (143) benodig was, is 'n aanduiding van die mate waartoe steriese hindering en aard van die imiensubstituent die reaksietempo van die asa-Wittig-reaksie beïnvloed. Die i.r.e-spektrum van 161 het 'n mediumintensiteit-absorpsieband van die C=N groep by 1670 cm^{-1} getoon.

Die reaksiemengsel is direk en sonder enige suiwing gebruik vir die bereiding van die o-arninonitriël (162). Na afkoeling tot -78°C is die reaksiemengsel vir 10 uur met trimetielsilielsianied en tintetrachloried behandel. Chromatografie van die reaksieprodukt het suiwer 1'R/8-N-(1'-nitriël-3'-metielbutiel)-2,3j4,5-di-Q-isopropilideen-p-D-fruktopiranosielamien (162) as 'n kleurlose stroop gelewer. Analise van die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van 162 het op die teenwoordigheid van 2 diastereomere getoon. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van 162 resoneer H-1₁ van die twee diastereomere as twee triplette ($J_{11,21} = 7.8 \text{ Hz}$) met 'n intensiteitsverhouding van 3:2 by δ 3.57 en δ 3.73 onderskeidelik, en in die ^{13}C -k.m.r.-spektrum by δ 49.24 en δ 49.32 onderskeidelik. Twee singuletresonansies by δ 120.10 en δ 120.40 word ook in die ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 162 vir die nitriëlkoolstof waargeneem. Hoe verder 'n atoom vanaf die nuwe chirale sentrum, d.w.s C-1₁, gelee is, hoe kleiner is die effek van hierdie sentrum (gemeet as $\Delta\delta$

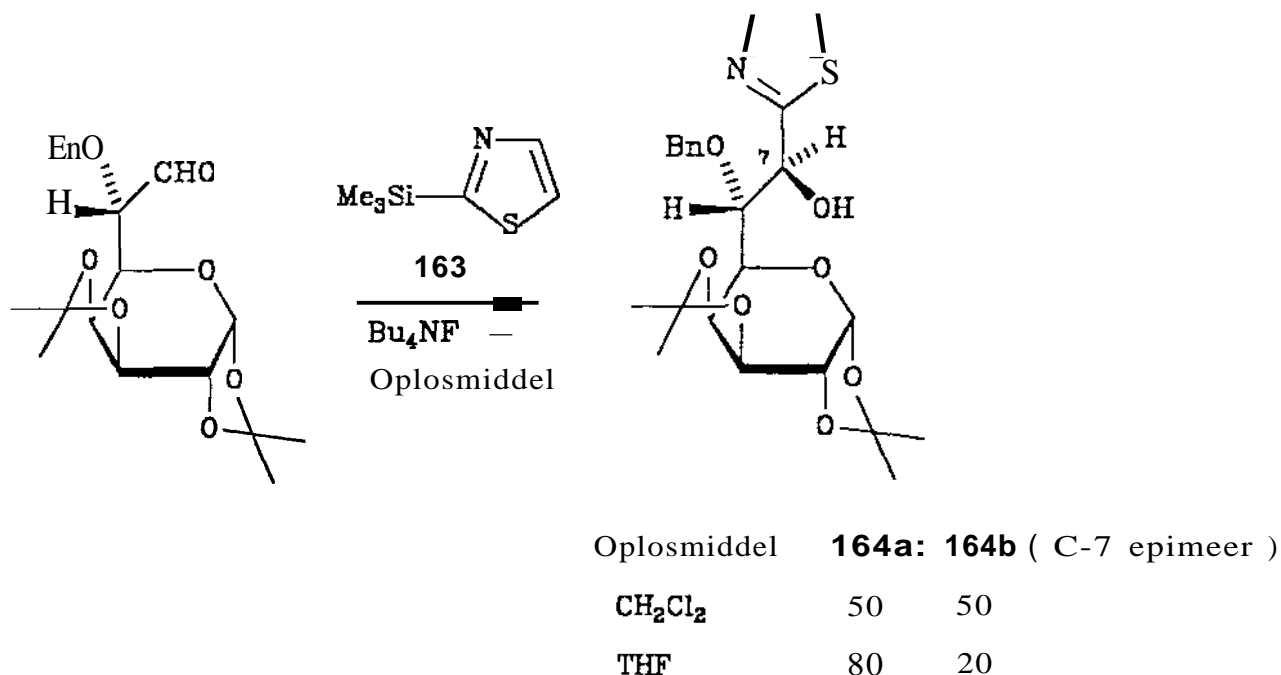
tussen ooreenkomstige resonansies van die twee diastereomere) op die chemiese verskuiwing daarvan. Byvoorbeeld, in die ^1H -k.m.r.-spektrum van **162** verskyn die resonansies van H-6b, wat ver verwyder is van die nuwe chirale sentrum, van die twee diastereomere by δ 3.74 en δ 3.75. In die COSY-spektrum van **162** kon die seine van die twee stereoisomeriese H-1 maklik met die van H-2'a en H-2'b gekorreleer word en dié van H-3' met die van $\text{CH}_3\text{-4'}$ en $\text{CH}_3\text{-1''}$. Verdere korrelasies wat gevind is, is die tussen die seine van H-3 met H-4 en van H-5 met beide H-4 en H-6a.

Alhoewel dit nie die doel van hierdie sintese was nie, dien bostaande voorbeeld as 'n indikasie van die mate waartoe die diastereoselektiwiteit wat in In Strecker-reaksie verkry word afhanklik is van die aard van die chirale hulpreagens. Die grater mate van diastereoselektiwiteit wat deur Kunz *et al.*¹²⁴ verkry is deur gebruikmaking van die tetra-Q-pivaloïel-IJ-D-galaktosehulpreagens, kon waarskynlik in groot mate daaraan toegeskryf word dat die chirale sentrum wat geskep word naby gelee is aan die sentrum wat die chiraliteit induseer. Met die probleem van die vorming van die Schiff-basis (**143**) opgelos (kyk Afdeling 2.6.2.a), kon voortgegaan word met die moontlike ontwikkeling van 'n diastereoselektiewe sintese van tiasoolaminosuurderivate.

2.6.3 Die Diastereoselektiewe Sintese van Tiasoolaminosuurderivate

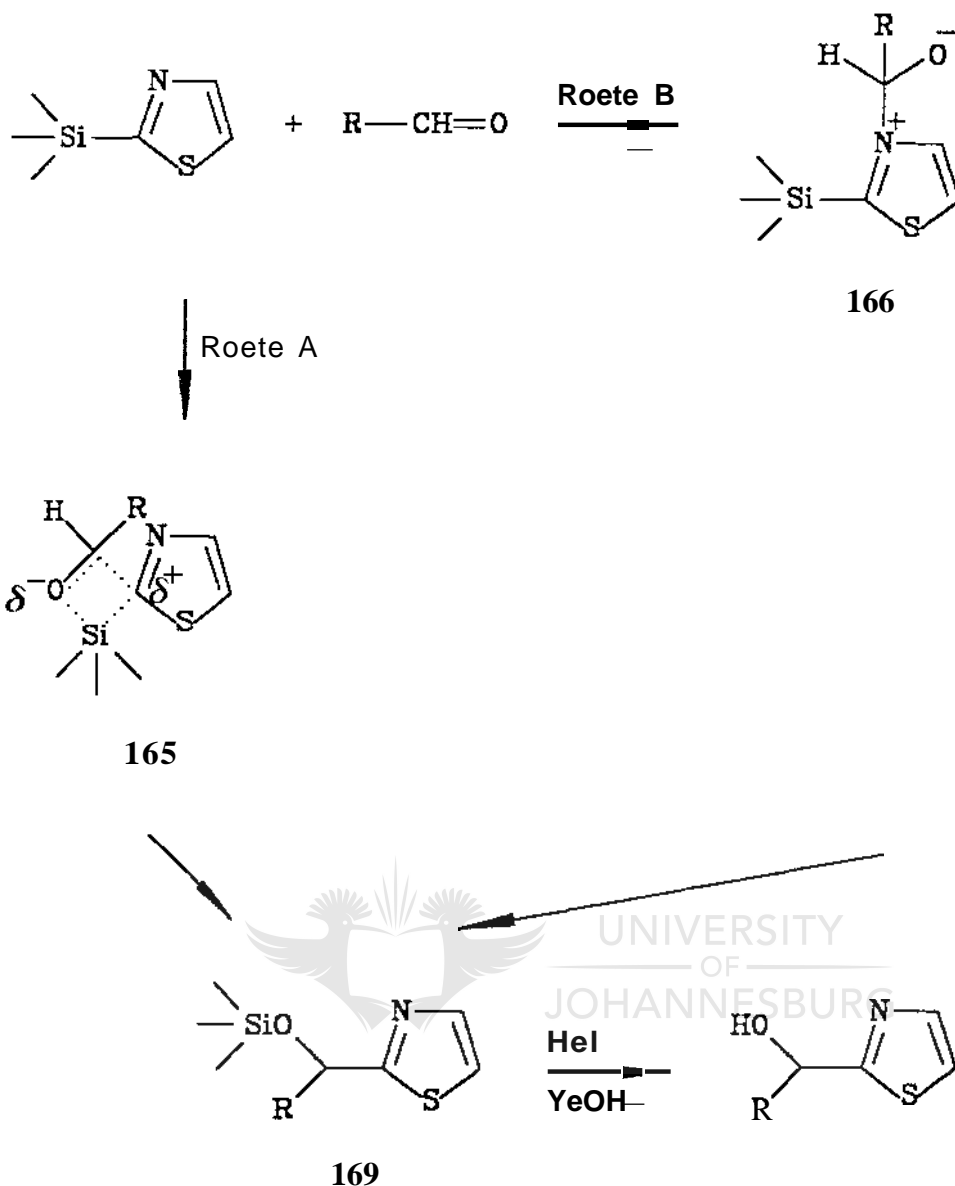
2.6.3.a Nukleofiliese 1,2-addisie 00 die imienkoolstof van 143

Die eerste benadering tot die diastereoselektiewe sintese van chirale tiasoolaminosure met behulp van In chirale hulpreagens wat in hierdie ondersoek aandag geniet het, was gebaseer op resultate van Dondoni *et al.*¹⁷⁵ ten opsigte van die stereospesifieke homologering van D-xilo- en D-galaktodialdoses met 2-trimetieIsilieltiasool (2-TST, **163**, Skema 2.66). In die sintese speel die aard van die oplosmiddel In belangrike rol. Met dichloormetaan (CH_2Cl_2) as oplosmiddel word geen diastereoselektiwiteit in die 1,2-addisiereaksie verkry nie, maar in tetrahidrofuraan (THF) vind diastereoselektiewe addisie met In d.o. van ca. 80% plaas.



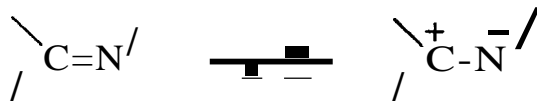
Skema 2.66 : Stereoselektiewe Homologering van 'n *D*-Galaktosederivaat.¹⁷⁵

Daar bestaan tans twee moontlike meganistiese verklarings waarvolgens 2-TST (163) met swak elektrofile, onder meer aldehyede, reageer om 2-gesubstitueerde tiasool-derivate te vorm.¹⁷⁶ Een roete behels die direkte aanval van die aldehyd op die siliel-tiasool (Roete A, Skema 2.67) om *via* die 4-sentrumtussenproduk (165) en SiMe₃ oordrag vanaf koolstof na suurstof die 1,2 adduk 169 te lewer. Die alternatiewe meganisme (Roete B) vind *via* die N-tiasoliumylid (167), wat in ewewig met die oorspronklik gevormde N-tiasoliumsout (166) verkeer, plaas. Laasgenoemde verklaring word gesteun deur die isolasie van die verwagte adduk 169 sowel as 168 vanuit die reaksiemengsel.¹⁷⁶ Die tussenproduk 165 (Roete A) word energeties begunstig deur die spesiale eienskap van silikon om die positiewe lading op die β -posisie te stabiliseer en weens die feit dat klowing van die koolstof-silikonbinding gelyktydig met vorming van die sterker suurstof-silikonbinding plaasvind. In die geval van Roete B word die yliedtussenproduk (167) weer termodinamies begunstig vanwee die komplimenterende aksies van die drie heteroatome, nl. stikstof vir aktivering, silikon vir yliedvorming en swael vir stabili-

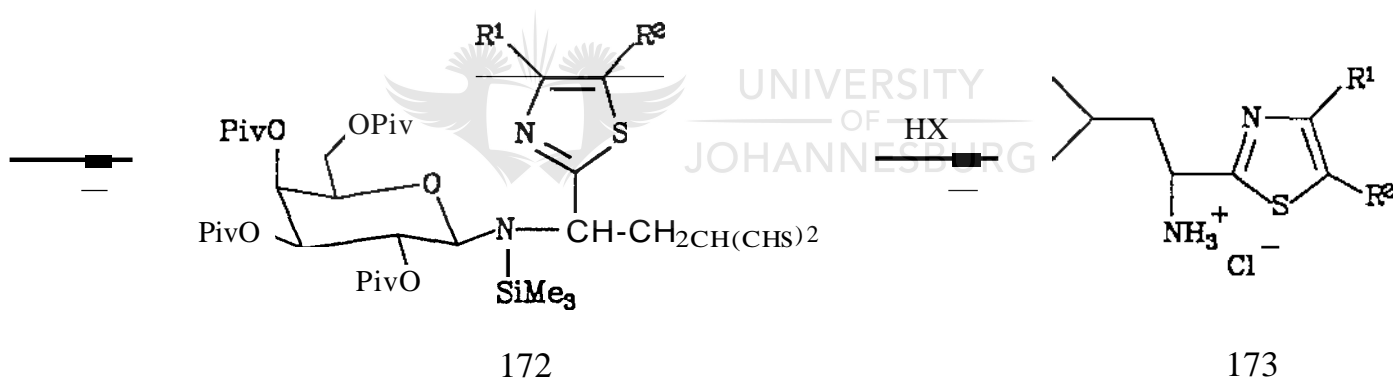
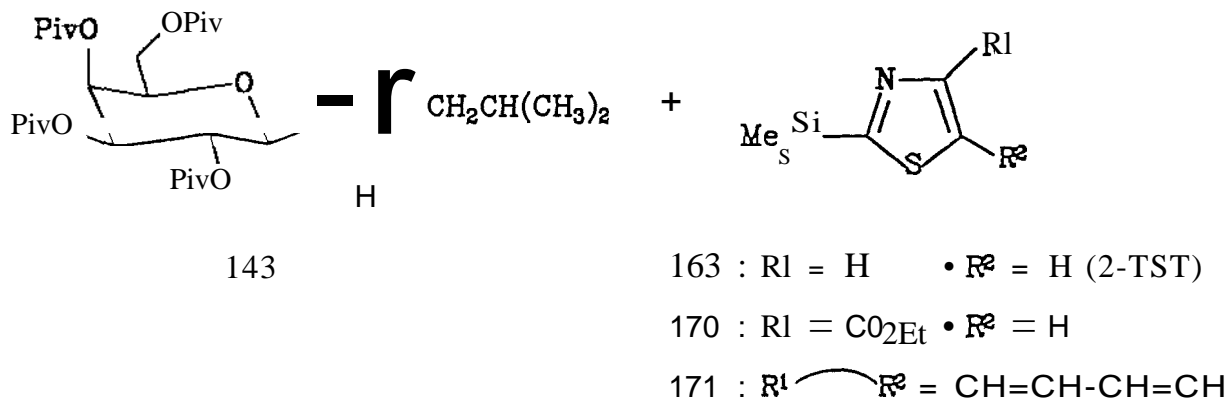


Skema 2.67

sering. Analogoos aan die koolstof-suurstofdubbelbinding kan die koolstof-stikstofdubbelbinding as 'n resonansibried van twee kanoniese vorms, soos in Skema 2.68 aangetoon, beskou word. Die dipolere karakter van die koolstof-stikstofdubbelbinding lei daartoe dat elektrofiele hoofsaaklik op die stikstofatoom en nukleofiele op die imidieelkoolstofatoom aanval. Die vermoede van 2-TST (163) om 1,2-addisie op swak elektrofiele soos aldehyede te ondergaan, het die gedagte laat ontstaan om 'n soortgelyke addisiereaksie met 'n geskikte tiasoolderivaat (170) en die Schiff-basis (143) uit te voer met die oog op 'n diastereoselektiewe sintese van tiasoosaminosure (Skema 2.69).



Skema 2.68



Skema 2.69

Dit is in die vooruitsig gestel dat etiel 2-trimetielsilieltiasool-4-karboksielsuur (170) 'n stereospesifieke 1,2-addisie op die Schiff-basis (143) sal ondergaan om sodoende die tiasoolbevattende adduk (172, R¹ = CO₂Et en R² = H) te lewer. Die opties suiwer tiasool sou dan daarna gereidelik onder milde kondisies¹²⁴ as die ooreenkomstige amiensout(173) vrygestel kon word. Etiel tiasool-4-karboksielsuur is gereidelik beskikbaar deur die kondensasie van tioformamied 177 met etiel broompirivaat en die verbinding kan dan vervolgens *via* die litiumsout 178 na etiel 2-trimetielsilieltiasool-4-karboksiel-

suur (170) omgesit word. Alternatiewelik kan die trimetielsilielanaloog vanaf die 2-halogeentiasoolderivaat berei word.^{176a} As gevolg van die onmiddellike beskikbaarheid van bensotiasool is besluit om die ooreenkomstige 2-trimetielsilieliderivaat (171) as modelreagens in die ondersoek te gebruik.

2-Trimetielsilielbensotiasool (171) is vanaf bensotiasool volgens die metode van Pinkerton *et al.*¹⁷⁸ berei. Vanwee die onstabiliteit van 2-bensotiasoliellitium by temperature hoer as -35°C is die reaksie daarvan met trimetielsilielchloried by temperature laer as -35°C uitgevoer. 2-Trimetielsilielbensotiasool (171) het selfs na lang reaksietye by kamertemperatuur geen reaksie (IH-k.m.r.-spektroskopie) met die Schiff-basis (143) in deuteriochloroform ondergaan nie. Die byvoeging van 'n katalitiese hoeveelheid trifluorasynsuur om die iminiumsout van 143 te vorm en sodoende die elektrofiliese karakter daarvan te verhoog, het ook nie tot die gewenste 1,2-addisie aanleiding gegee nie. Fluoriedgekataliseerde desililering van 171 met tetrabutielammoniumfluoried onder kondisies wat reeds suksesvol in gevalle met aldehyede as elektrofile toegepas is,^{175,179} het ook nie enige reaksie met 143 tot gevolg gehad nie. In In poging om die elektrofiliese karakter van die Schiff-basis (143) verder te verhoog, is 143 met 'n goeie Lewis-suur nl. tetrachloried gekomplekseer¹⁸⁰ en toe met 171 laat reageer. In die IH-k.m.r.-spektrum van die reaksiemengsel in deuteriochloroform by -30°C het die imienprotonresonansie 'n duidelike laer-veldse verskuiwing vanaf δ 7.79 (ongekomplekseerd) na δ 8.50 (gekomplekseerd) ondervind. Na In reaksietyd van 30 uur by -30°C is egter nog geen teken van In addisiereaksie waargeneem nie. In 'n finale poging is 2-bensotiasoliellitium by -75°C in eter met die Schiff-basis (143) behandel. Die IH-k.m.r.-spektrum van die reaksiemengsel het aangedui dat in hierdie geval die reaktiewe karbanioon slegs met die asielgroepe van die suikercomponent reageer.

Hierdie resultaat was onverwags aangesien dit bekend is dat Schiff-basisse met Grignard- en organolitiumpreparasies (alkiel- en ariel-) reageer om na daaropvolgende hidrolise sekondere amiene in hoë opbrengs te lewer.¹⁸¹ Die reaksie verteenwoordig trouens In

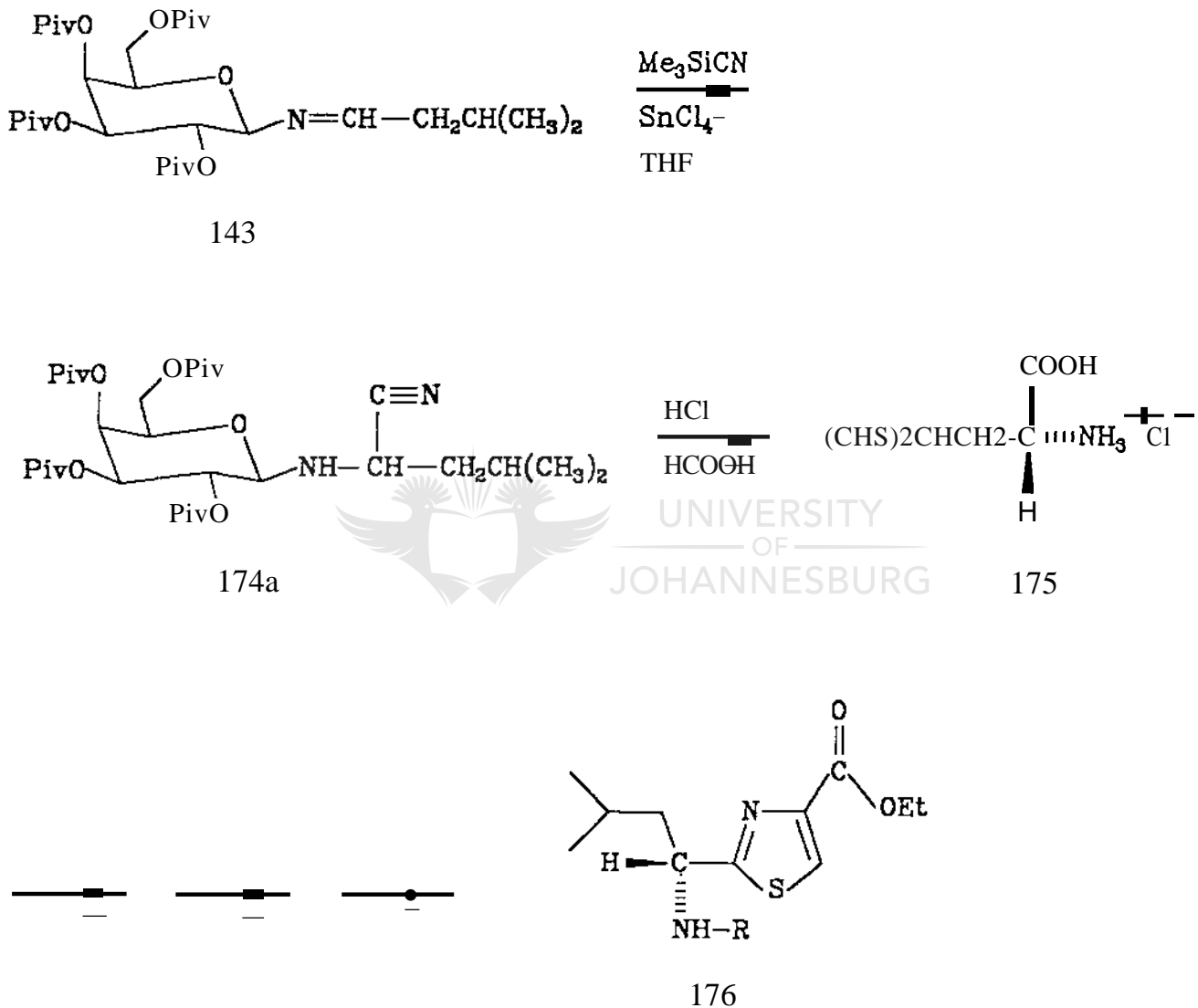
algemene metode vir die sintese van sekondere amiene en is veral suksesvol vir die bereiding van arialdimiene. 'n Voorvereiste vir die suksesvolle verloop van so 'n reaksie is egter die afwesigheid van waterstofatome α tot die koolstof-stikstofdubbelbinding, aangesien sulke verbindings suureienskappe besit en met sterk basisse gedeprotoneer word analoog aan enolaatvorming by aldehiede en ketone. Aangesien twee waterstofatome α tot die imienbinding in 143 voorkom, is dit dus moontlik dat ook in hierdie geval deprotonering, eerder as nukleofiliese addisie, plaasvind. Dit is verder ook bekend dat die addisie van organometaalreagense aan Schiff-basisse sensitief is ten opsigte van steriese hindering deur substituentte van die Schiff-basis.^{1S1} Die substituentte op die organometaalreagens oefen blykbaar geen nadelige effek op die reaksie uit nie. Die steriese groot pivaloïelsubstituentte op die chirale hulpreagens (143) sal dus ook nie vir die addisiereaksie bevorderlik wees nie. Die reduktiewe dimerisasie van Schiff-basisse onder soortgelyke reaksiekondisies, maar veral met Grignard-reagense, lei ook tot 'n verlaging in die opbrengste van die gewenste addisieprodukte. Dit was derhalwe duidelik dat die Schiff-basis (143) geensins aan die vereistes voldoen vir suksesvolle addisiereaksies met organometale nie.

Die potensieel elegante roete vir diastereoselektiewe tiasoolaminosuursintese moes dus noodgedwonge laat vaar word. 'n Alternatiewe, effens langer roete is egter verder ondersoek. Die motivering om met die sintese voort te gaan was ook ten dele beïnvloed deur 'n behoefte om in die RAU-laboratorium kennis van chirale sintese en die gebruik van chirale hulpreagense op te doen. 'n Ander oorweging was dat daar geen ooglopende alternatiewe vir die sintese van die R-tiasoolaminosuurkomponente van 'n belangrike klas van sikliese peptiede was nie.

2.6.3.b Via 'n diastereoselektiewe Strecker-sintese

Twee moontlike alternatiewe roetes (Skemas 2.70 en 2.71) vir die sintese van chirale tiasoolaminosure, en wat op die metodologie wat reeds ontwikkel is gebaseer is, is oorweeg. Beide roetes het die diastereoselektiewe bereiding van die N-glikosiel- α -

aminonitriël (174a) vanaf die Schiff-basis (143) onder die kondisies van Kunz *et al.*¹²⁴ vereis. Die eerste moontlikheid (Skema 2.70) behels die hidrolise van 174a na die ooreenkomstige R-aminosuurhidrochloriedsout (175), waarna dit met behulp van bekende transformasies, waaronder die Hantzsch-reaksie, na die tiasoolester (176) omgesit kan word. Sodanige benadering sou egter nie toepaslik wees nie aangesien reeds bewys is dat



Skema 2.70

die Hantzsch-reaksie rasemisasie tot gevolg het. Die tweede moontlikheid (Skema 2.71) behels omsetting van die nitriëlgroep van 174a na die ooreenkomstige tioamied (177a), waarna dit onder Hantzsch-reaksiekondisies na die chirale tiasoolderivaat (17Sa) omgesit word. Die vry R-tiasoolaminosuur (179) sou dan na verwagting volgens die metode

van Kunz *et al.*¹²⁴ (*HCfIHCOOH*) deur hidrolise van 178a verkry word.

Die Schiff-basis (143, Skema 2.71) is by -78°C in droe tetrahydrofuraan (THF) vir 10 uur met trimetielsilielsianied en tintetrachloried behandel. Die hoofproduk van hierdie Strecker-sintese was N-(1'-nitrilo--3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-O-pivaloieI-,8-D-galaktopiranosielamien (174a) wat in 'n hoë opbrengs van 74% verkry is. Die enigste ander produk van die reaksie is in 'n opbrengs van 12% verkry en as 2,3,4,6-tetra-O-pivaloieI-,8-D-galaktopiranosieiamien (138) gekarakteriseer. Laasgenoemde verbinding ontstaan waarskynlik deur hidrolise van die ongereageerde Schiff-basis (143). Die i.r.-spektrum (CHCl_3) van 174a toon geen absorpsieband van C=N by 1670 cm^{-1} nie, maar wel die van $\text{C}\equiv\text{N}$ by 2254 cm^{-1} en van N-H by 3380 cm^{-1} . Die vorming van slegs die gewenste β -anomere produk kon uit die ontkoppelde ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 174a waargeneem word, aangesien C-1 as 'n enkele resonansie by δ 88.92 voorkom. Dit is nodig om te noem dat suiwering van 174a opeenvolgende ehromatografie en kristallisasie (nit n-heptaan) beheis het. Die optiese rotasies sowel as die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-analises van beide die olie en kristalle van 174a was identies. Geen duplisering van enige resonansies in dié spektra wat op die bestaan van 'n anomere en/of rasemiese mengsel kon dui is waargeneem nie. Ander opmerklike resonansies in die ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 174a is die van C-1' by δ 46.16 en die van die nitriëlkoolstof by δ 120.66. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van 174a resoneer H-1 as 'n doeblet van doeblette ($J_{1,\text{NH}} = 10.5$ en $J_{1,2} = 8.8\text{ Hz}$) by δ 4.17, terwyl H-2 ook as 'n doeblet van doeblette ($J_{2,3} = 10.3$ en $J_{1,2} = 8.8\text{ Hz}$) by δ 5.00 resoneer. 'n Doeblet van doeblette by δ 2.16 ($J_{1,\text{NH}} = 10.5$ en $J_{\text{NH},1'} = 8.0\text{ Hz}$) kon aan die amienproton (NH) toegeken word. H-1' resoneer as 'n doeblet van triplete ($J_{\text{NH},1'} = J_{1',2'} = 8.0\text{ Hz}$) by δ 3.58. In die COSY-spektrum van 174a is daar 'n duidelike korrelasie tussen die seine van NH en H-1 asook die van H-3 met H-4. 'n Korrelasie tussen CH_{3-4} en CH_{3-1} met CH-3' is ook waargeneem. Die oorblywende protonkoppelings is m.b.v. ontkoppelingseksperimente bevestig. Bestraling van NH laat H-1 na 'n doeblet en H-1' na 'n triplete verval. Met bestraling van H-2 verval H-1 sowel as H-3 na doeblette. Die bestraling van H-4 laat H-3 na 'n doeblet

verval.

Die vraag het ontstaan of dieselfde resultaat met 'n anomere mengsel van Schiff-basisse, naamlik 143 en 153 (Skema 2.58), verkry sou word, veral omdat verwag is dat die anomere in dinamiese ewewig met mekaar onder die reaksiekondisies sou verkeer. Die anomere mengsel van Schiff-basisse (143 en 153), berei volgens die asa-Wittig-roete (kyk Skema 2;63), is vervolgens in 'n Strecker-reaksie gebruik. Skeiding van die twee isomere, wat in byna gelyke hoeveelhede gevorm het (dic, heksaan:etiel asetaat 5:1), is deur kolomchromatografie bewerkstellig. Een van die twee isomere was identies aan 174a (β -anomeer), wat vroeër gekarakteriseer is. Die tweede isomeer is as die α -anomeer (174c, Skema 2.71) gekarakteriseer op grond van die IH-k.m.r.-spektrum van die verbinding. Dit is 'n suiwer diastereomeer, maar die konfigurasie (*R* of *S*) van die nuwe chirale sentrum is nie bepaal nie. H-1 van die o-anomeer (174c) resoneer as 'n doeblet by δ 5.43 ($J_{1,2} = 3.2$ Hz), terwyl H-2 as 'n doeblet van doeblette by δ 5.31 ($J_{2,3} = 10.8$ en $J_{1,2} = 3.2$ Hz) resoneer. 'n Doeblet van doeblette by δ 5.45 ($J_{2,3} = 10.8$ en $J_{3,4} = 4.6$ Hz) kan aan H-3 toegeken word. H-4 resoneer as 'n doeblet ($J_{3,4} = 4.6$ Hz) by δ 5.00. Die doeblet van doeblette by δ 4.37 ($J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.9$ Hz) kan aan H-5 toege-skryf word terwyl H-6a en H-6b by δ 4.10 (dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6a} = 6.9$ Hz) en δ 3.94 (dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6b} = 6.9$ Hz), respektiewelik, resoneer. H-1' resoneer as 'n doeblet van triplete by δ 3.68 ($J_{\text{NH},1'} = 12.2$ en $J_{1,2'} = 8.2$ Hz), terwyl die amienproton as 'n doeblet ($J_{\text{NH},1'} = 12.2$ Hz) by δ 1.89 resoneer. Die afwesigheid van enige koppeling tussen H-1 en die amienproton van die o-anomeer (153) dui egter op 'n visinale hoek van ongeveer 90° tussen dié twee protone.

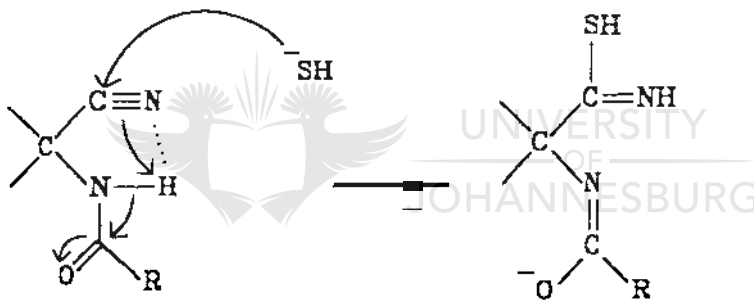
Die resultate wat verkry is met die mengsel van α - en β -Schiff-basisse dui daarop dat:

- (i) elk van die twee isomeriese Schiff-basisse (143 en 153) 'n enkele sianoaddukklewer, d.w.s. dat ewewiginstelling tussen die isomeriese Schiff-basisse stadiger plaasvind as die addisiereaksie,

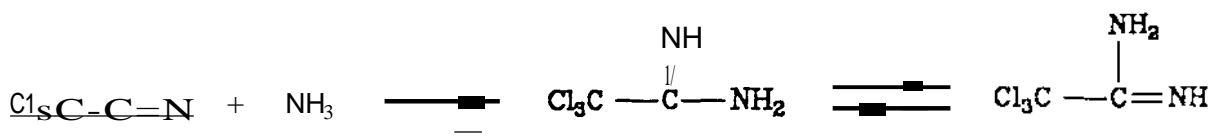
- (ii) dat uitstekende chirale induksie in die geval van beide Schiff-basisse verkry word en
- (iii) dat die α - en β -sianoaddukte nie onder dié reaksiekondisies in ewewig met mekaar is nie. Die stabiliteit van die amien (138) t.O.V. anomcrisie in vergelyking met die labiliteit van die Schiff-basis (143) is moeilik verklaarbaar, maar kan moontlik aan die bekende verskille in die anomere effek in die twee gevalle toegeskryf word.¹⁷³ Dit is verder ook bekend dat aminoglikosiede nie geredelik epimeriseer nie.¹⁷³

Die omsetting van die sianogroep van 174a na In tioamiedgroep is vervolgens ondersoek. Sodanige omsetting kan in baie gevalle bewerkstellig word deur die nukleofiliese addisie van H_2S aan die sianogroep. Die reaksie van nitriële met nukleofiliese reagense vereis egter normaalweg sure of basisse as katalisatore. N-glikosiel-a-aminonitriël (174a) is soortgelyk aan die bereiding van N-t-Boc-glisinotioamied vanaf die ooreenkomstige nitriël (Afdeling 2.4), met ammoniumwaterstofsulfied in etanol by kamertemperatuur behandel. Na 4 dae by kamertemperatuur het dunlaagchromatografie hoofsaaklik onveranderde uitgangsmateriaal, en geen definitiewe produkvorming, aangedui. Die onverwagte onreaktiwiteit van die nitriël (174a) is tentatief aan steriese hindering toegeskryf. Ten einde hierdie probleem te oorkom is dit oorweeg om die reaktiwiteit van die waterstofsulfiedioon (wat in protiese oplossings sterk gesolveer is) te verhoog deur in aprotiese oplossings te werk. Dit is bekend dat HS- verhoogde nukleofilisiteit teenoor nitriël-groepe in aprotiese oplossings soos dimetielformamied (DMF) toon.¹⁸² Met trietiël-ammonium- of piridiniumteenione vind die reaksie met aromatiese nitriële gewoonlik by 60°C plaas.¹⁸² Alifatiese nitriële reageer egter uiters stadig onder hierdie reaksiekondisies.^{182a,183} In hierdie gevalle kan tioamiedvorming bevorder word deur gebruikmaking van In heftig geroerde heterogene reaksiemengsel bestaande uit In waterige oplossing van natriumsulfied, In fase-oordragkatalis en oplossing van die nitriël in In organiese oplosmiddel by 70°C onder In waterstofsulfied atmosfeer.¹⁸³ Onder geeneen

van die verbeterde metodes vir tioamiedvorming kon die nitriël (174a) na die ooreenkomstige tioamied (177a) omgesit word nie. In elke geval is hoofsaaklik onveranderde uitgangsmateriaal (174a), selfs na lang reaksietye, herwin. Toepassing van die genoemde metodes het egter N-t-Boc-glisinotioamied (114, Skema 2.37) in goeie opbrengs vanaf die ooreenkomstige nitriël (113) gelewer. Die reaksie is beduidend vinniger as in die geval van selfs eenvoudige alifatiese nitriële. Die moontlikheid is dus oorweeg dat die asielaminogroep van 113 die sianogroep se elektrofilisiteit verhoog òf d.m.v. 'n induktiewe effek òf d.m.v. buurgroepdeelname (Skema 2.72). In hierdie verband kan genoem word dat die addisie van NH_3 aan nitriële omkeerbaar is en slegs suksesvol uitgevoer kan word in die geval van nitriële wat elektrontrekkende substituentte bevat om sodoende N,N-ongesubstitueerde amidie te lewer¹⁸⁴ (Skema 2.73).



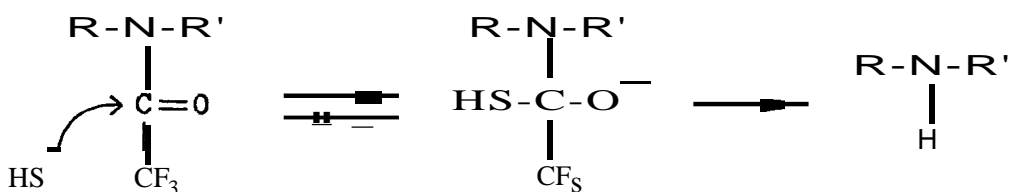
Skema 2.72

Skema 2.73¹⁸⁴

In die lig van laasgenoemde moontlikheid is die nitriël (174a) dus geasileer met 'n verwyderbare asielgroep. Die asileringsreagense wat oorweeg is, het $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, $t\text{-BuO}_2\text{COC}_2^t\text{-Bu}$, CH_3COCl en $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ in teenwoordigheid van piridien ingesluit. Die asilering van die uiters gehinderde sekondere amiengroep van 174a was

slegs suksesvol in die geval van trifluorasetilering met die baie reaktiewe trifluor-asynsuuranhidried. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van die N-glikosiel-N-trifluorasetiel-a-aminonitriël (174b) resoneer H-1, as 'n doeblette van doeblette ($J_{1',2'a} = 10.2$ en $J_{1',2,b} = 5.1$ Hz) by δ 4.36. 'Beide H-1' en H-1 (δ 5.12, d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz) het relatief tot hul onderskeie resonansies in die ^1H -k.m.r.-spektrum van 174a na laer veld geskuif. Die teenwoordigheid van die trifluorasetielfunksionaliteit in 174b is eenduidig met behulp van ^{13}C -k.m.r.-analise bevestig. In dié spektrum resoneer $-\text{CF}_3$ as 'n kwartet by δ 117.41 en $\text{CO}-\text{CF}_3$ as 'n kwartet by δ 157.91. Die nitriëlkoolstof resoneer as 'n singulet by δ 119.09 en C-1 resoneer as 'n singulet by δ 85.35.

Die N-glikosiel-N-trifluorasetiel-a-aminonitriël (174b) het dan ook soos verwag gereedelik 'n addisiereaksie met die waterstofsulfiedioon ondergaan en wel onder die volgende kondisies: Wit kristallyne $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{SH}^-$ is gevorm deur waterstofsulfied deur 'n yskoue oplossing van trietielamien in dimetielformamied te borrel. Die N-trifluorasetielderivaat (174b) is by dié heterogene megsel gevoeg en die resulterende oplossing is vir 12 uur by kamertemperatuur geroer. Onder dié kondisies is die ooreenkomstige tioamied (177b) in 'n opbrengs van 84.5% gevorm. Indien die reaksie egter by 60°C uitgevoer word, is die uitgangsmateriaal (174b) na 1 uur opgebruik, maar word die N-gedeasetileerde uitgangsmateriaal (174a) as hoofproduk verkry. Onder hierdie reaksiekondisies kan die addisiereaksie dus nie met HS--geïnduseerde splyting van die amiedbinding (Skema 2.74) kompeteer nie. In die ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 177b resoneer die tioamiedkoolstof as 'n singulet by δ 204.60 en die trifluorasetielresonansies word duidelik by δ 121.00 (CF_3 ' kwartet) en by δ 159.00 ($\text{CO}-\text{CF}_3$ ' kwartet) waargeneem.



Skema 2.74

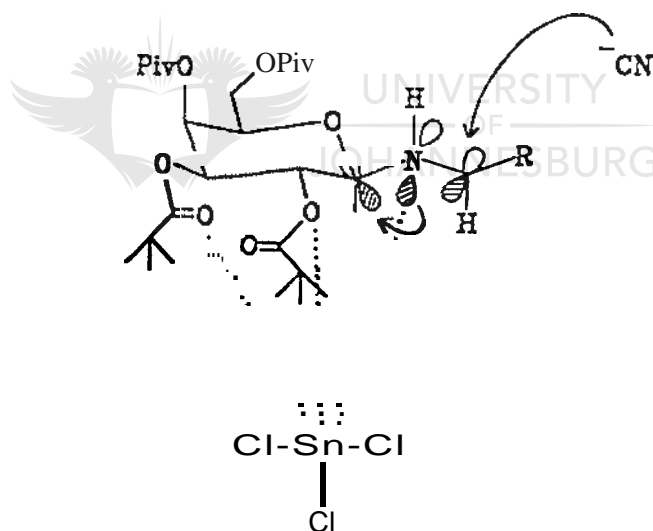
N-(1'-tioamido-3'-metielbutiel)-N-trifluorasetiel-2,3,4,6-tetra-O-pivaloel-,B-D-galaktopiranosielamien (177b) is onder Hantzsch-reaksieondisies (wat later volledig bespreek sal word) na die tiasoolderivaat (178b) in hoë opbrengs omgesit. In die 1H-k.m.r.-spektrum van N-[1'-(4"-etoksikarbonieltiasoel-2'")-3'-metielbutiel]-N-trifluorasetiel-2,3,4,6-tetra-O-pivaloel-,8-D-galaktopiranosielamien (178b) resoneer H-1' as 'n triplet ($J_{1'2'} = 7.3$ Hz) by δ 5.36 en H-1 as 'n doeblet ($J_{12} = 9.0$ Hz) by δ 5.19. Die tiasoolprotonresonansie word as 'n singulet by δ 8.05 waargeneem. Die metielprotone van die tiasoolester resoneer as 'n triplet ($J_{2''3''} = 7.2$ Hz) by δ 1.36 en die twee magneties nie-ekwivalente metileenprotone resoneer elk as 'n ABX₃-sisteem ($J_{2''a,2''b} = 10.8$ en $J_{2''a,3''} = J_{2''b,3''} = 7.2$ Hz). In die 13C-k.m.r.e-spektrum van 178b resoneer die tiasoolkoolstowwe by δ 129.99, δ 147.03 en δ 162.21 en die trifluorasetielkoolstowwe by δ 117.81 (CF₃, kwartet) en δ 159.00 (CO-CF₃ kwartet). C-1 resoneer as 'n singulet by δ 85.45. In beide die 1H- en 13C-k.m.r.e-spektra van 178b is geen duplisering van resonansies wat op 'n anomere of rasemiese mengsel kon dui, waargeneem nie.

Uit die resultate van Kunz *et al.*¹²⁴ moes ons nou toe aanvaar dat die chirale sentrum met die *R* absolute konfigurasie op C-1' tydens die Strecker-sintese gevorm het. Uit die k.m.r.-analises het dit geblyk dat die absolute konfigurasie op C-1' tydens die bereiding van die tiasoolderivaat (178b) vanaf die N-glikosiel- α -aminonitriël (174a) behoue gebly het. 'n Onomwonde bewys hiervoor sou egter slegs deur die bepaling van die spesifieke optiese rotasie van die vry tiasoolaminosuur (179) verkry kon word.

2.6.4 'n Ondersoek na die Chirale Induksiemeganisme van die Asimmetriese Strecker-sintese

Kunz *et al.*¹²⁴ skryf die hoë diastereoselektiwiteit van die Strecker-reaksie (Skema 2.45), wat die pentapivaloelglikosielamien (138) as chirale hulpreagens inkorporeer, toe aan steriese en stereo-elektroniese effekte wat deur die suikerkomponent uitgeoefen word. Op grond van 'n gepostuleerde ladingsoordrag wat

vanaf die C=N π -orbitaal na die a^* -orbitaal van die ring C-O binding plaasvind, is Konformasie A vir die metaalgekomplekseerde Schiff-basis voorgestel. Volgens Kunz *et al.*¹²⁴ is hierdie konformasionele voorkeur van die Schiff-basis bevestig deur 'n sterk NOE ('Nuclear Overhauser Effect') wat tussen H-1 en H-1' van die syketting waargeneem is. Die groot aksiale substituent op C-4 rig aanval van die Lewis-suur (SnCl_4) na die α -vlak van die Schiff-basis (139) in die Konformasie A. Die merkbare verbreding van die resonansies van die o-aksiale protone (H-1, H-3 en H-5) in die Sn-kompleks van 139 is as getuieis vir kompleksering op die α -vlak aanvaar. Sianiedione (wat vanuit silielsianied in die polere oplosmiddel gegeneer word) val dan op die oop kant van die molekule, d.w.s. aan die kant van die ringsuurstof, aan. Hierdie β -aanval bied 'n moontlike verklaring vir die voorkeurvorming van die (aR)-diastereomeer.



Konformasie A en die Ooreenkomstige Sn-kompleks .

Alhoewel Kunz se model daarin slaag om die chiraliteitsinduksie te rasionaliseer, is dit ten opsigte van verskeie aspekte aanvegbaar, nl.:

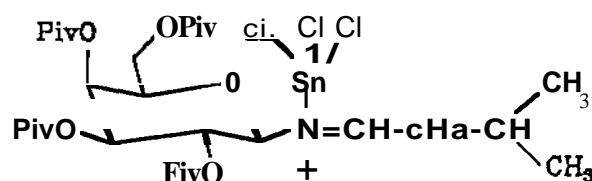
- (i) Dit kan nie sonder meer aanvaar word dat die voorkeurkonformasie van die vry Schiff-basis in die tinkornpleks behoue bly nie.
- (ii) Inspeksie van Dreiding-modelle toon dat Kunz *et al.* se voorstelling van die

tinkompleks nie fisies moontlik is nie, d.w.s. dit onmoontlik is vir gelyktydige kompleksering van In enkele tinatoom met die stikstofatoom van die Schiff-basis en twee pivaloieelgroepe. Selfs gelyktydige kompleksering van In tinatoom met die stikstofatoom en die C-2 pivaloieelgroep is fisies moeilik realiseerbaar. Ten einde die katalitiese effek van die Lewis-suur (SnCl_4) te verklaar moes aanvaar word dat dit minstens met die stikstofatoom van die Schiff-basis komplekseer.

Met die doel om meer direkte inligting oor die struktuur van die tinkompleks van die Schiff-basis (143) te verkry is ^1H - en ^{13}C -chemiese verskuiwings wat deur die byvoeging van SnCl_4 by die Schiff-basis (143) veroorsaak word, geïdentifiseer. In Halwe molekwivalent SnCl_4 is by In 1:1 anomere mengsel van die α - en β -Schiff-basisse (153 en 143, Skema 2.58) by -60°C in deuteriochloroform gevoeg. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van die reaksiemengsel het die tripletresonansie ooreenkomstig die imienproton van die o-anomere Schiff-basis (δ 7.60) direk na byvoeging van die Lewis-suur onveranderd gebly, maar die imienprotonresonansie van die steries meer toeganklike β -anomere Schiff-basis (δ 7.76) het na laer veld by δ 8.40 geskuif. Vanweë die duplisering en verbreding van die ander resonansies in die spektrum kon geen verdere afleidings gemaak word nie. Na In paar minute by -60°C het die o-anomere imienprotonresonansie by δ 7.60 ook na laer veld begin verskuif. Die ^{13}C -k.m.r.-spektrum het getoon dat die resonansies van die twee epimere imienkoolstowwe van aanvanklike waardes δ 170.69 en δ 169.43 (α - en β -Schiff-basisse onderskeidelik) na laer veld tot in die gebied van die karbonielresonansies rondom δ 173.9 verskuif het. Alhoewel daar In verskuiwing in die resonansies van die imienkoolstowwe was, het daar nie In beduidende verskuiwing na laer veld van die individuele karbonielresonansies plaasgevind nie. Dit is derhalwe onwaarskynlik dat enige van die pivaloieelgroepe met die tinatoom gekoördineer is. Weer eens, kon a.g.v. die kompleksiteit van die spektrum, geen verdere eenduidige afleidings t.o.v. ^{13}C -chemiese verskuiwings gemaak word nie. Uit bogenoemde kan dus egter tot

die gevoigtrekking gekom word dat die Lewis-suur wel met die imienstikstof koordinasie ondergaan.

Om die moontlikheid van verdere koordinering van die Sn-atoom met die naasliggende pivaloieisuurstofatome en/of die ringsuurstofatoom te ondersoek, is 'n minimumenergie-molekulere model van die tinkompleks (180) ontwikkel. Die bepaling van die minimum-



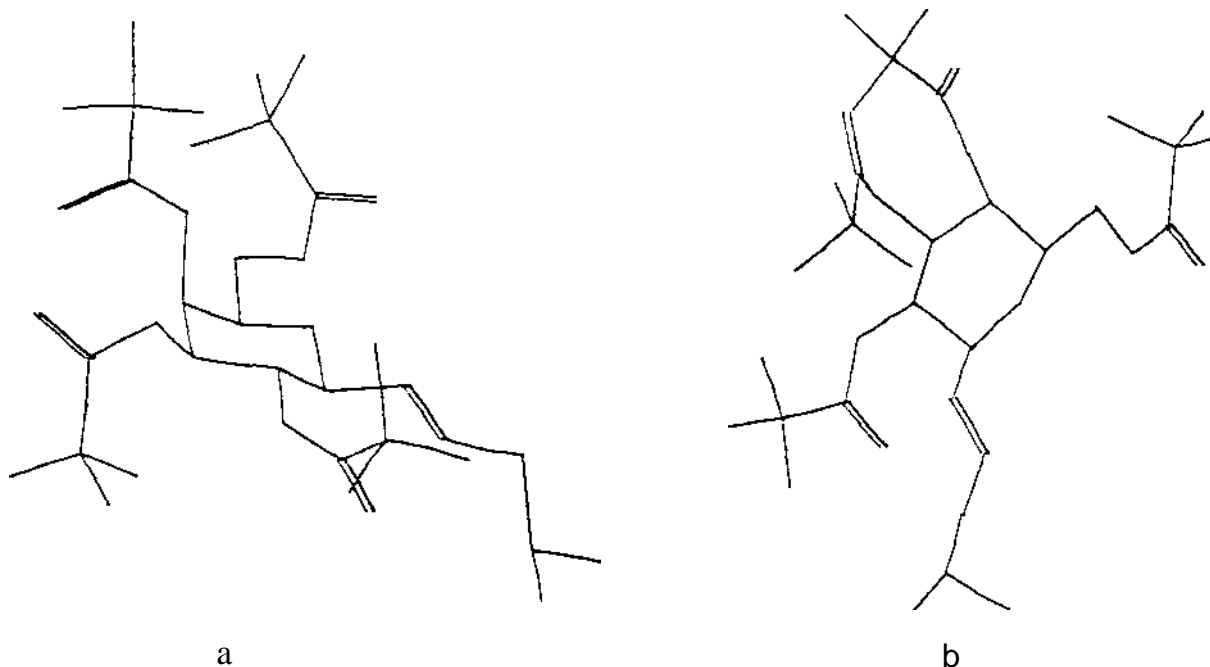
180

energiekonformasie van 180, waarvolgens die molekulere koördinate gemodifiseer word om sodoende 'n lae-energiemolekulere geometrie voor te stel, is m.b.v. die Alchemy rekenaarprogram¹⁸⁵ uitgevoer. Die potensiele energie (PE) van 'n molekule, waarvolgens die minimumenergiekonformasie bepaal word, word in die Alchemy minimizeerder in die volgende terme uitgedruk:

$$PE = E_{\text{strek}} + E_{\text{hoek}} + E_{\text{tor}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{udv}}$$

waar :	strek	-	bindingstrekking
	hoek		hoekbuiging
	tor		torsievormverandering
	vdw	-	van der 'Waals interaksie
	udv	-	uit die vlak buiging.

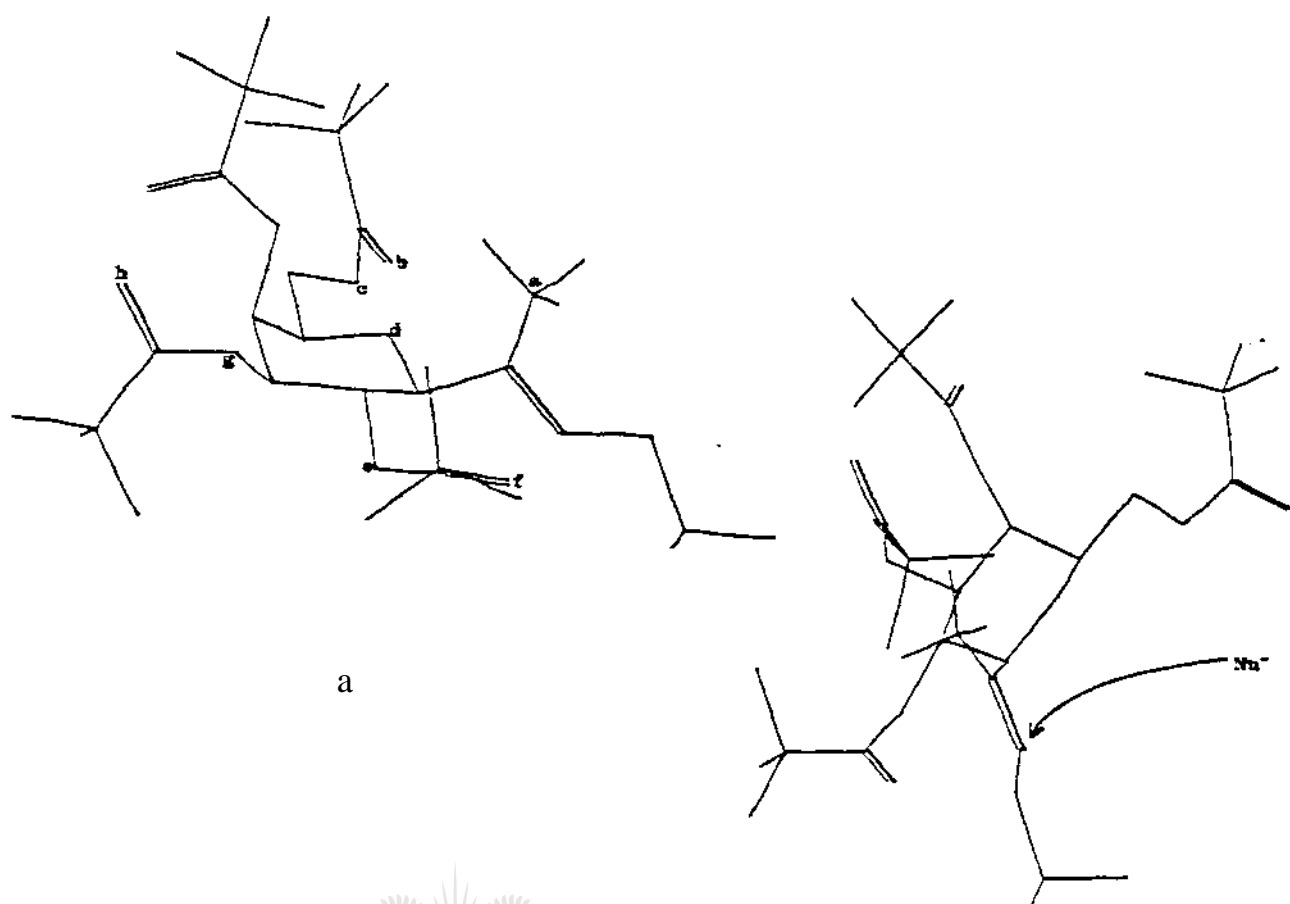
Die minimumenergiekonformasie van die Schiff-basis (143) uit twee verskillende aansigte (a en b) word in Skema 2.75 geïllustreer. Die suikerkomponent is in die stabiele stoelkonformasie met die pivaloie substituenten redelik egalig daarom versprei. Die



Skema 2.75

omgewing van die ringsuurstof is egter grootliks onbeset. Die imienfunktionaliteit besit ook die termodinamies meer stabiele trans-konfigurasië. Uit die minimumenergiekonformasie van 143 (Skema 2.75) is dit reeds duidelik dat nukleofiliese aanval vanaf die oop kant, d.w.s, die kant van die ringsuurstofatoom, sal plaasvind.

Die minimumenergiekonformasie van die gekomplekseerde Schiff-basis (180) word in Skema 2.76(a en b) geïllustreer. Die kompleksering van die imienstikstof met die Sn-atoom het weinig verandering in die verkose konformasie van die uitgangsmateriaal (Skema 2.75) teweeg gebring. Dit is egter opmerklik dat die karbonielfunktionaliteit van die C-2 pivalolelsubstuent nou amper onder die imiendubbelbinding en die (CH₃)₃C-komponent skuins voor die dubbelbinding inbeweeg het. Interessante afleidings wat moor lig op die moontlikheid van verdere koordinasie deur die Sn-atoom met ander atome kon werp, is verkry deur 'n oorweging van die afstande tussen verskillende atome van die kompleks. Die moontlike bindingsafstande (in Angstrom) tussen tin en verskillende suurstofatome word in Tabel 2.5 aangedui. Deur vergelyking van die moontlike bindingsafstande met die bekende Sn-Q bindingslengte van 2.05Å,¹⁸⁶ blyk



Skema 2.76

UNIVERSITY OF

JOHANNESBURG

Tabel 2.5

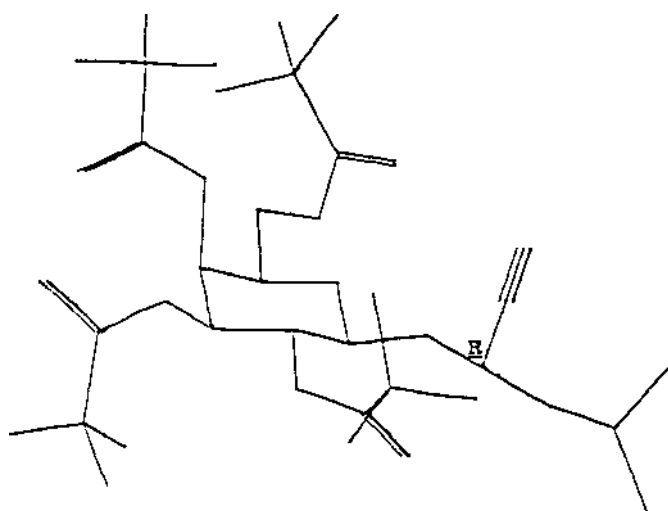
Atome in Skema 2.76(a)	Bindingsafstande (A)
---------------------------	----------------------

a-b	6.711
a-c	5.073
a-d	2.967
a-e	3.929
a-f	3.247

Tabel 2.5(vervolg):

a-g	5.173
a-h	6.983

dit dat indien die Sn-atoom aan die imienstikstof gekoördineer is, dit moontlik is om hoogstens verdere koördinasie met die ringsuurstofatoom te kan ondergaan. Indien so In 4-lidring gevorm word, kan die chirale C-1 posisie ook induktief optree met die gevolg dat verhoogde diastereoselektiwiteit verkry kan word. Uit die Dreiding-model is dit verder ook duidelik dat koördinasie met die ringsuurstof die imiendubbelbinding steries meer toeganklik vir addisie maak. Nukleofiliese aanval vanuit die oop kant (Skema 2.76(b)) lei eksklusief tot die vorming van die gewenste R-diastereomeer (Skema 2.77). Indien die S-isomeer gevorm sou word, moes nukleofiliese aanval vanuit die steries rninder toeganklike kant, dit is van onder af, plaasgevind het. Aanval op die o-vlak word egter deur die C-2 pivalolelsubstituent verhinder.



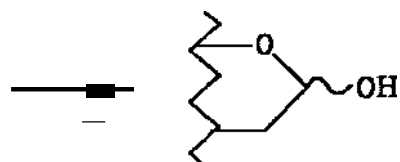
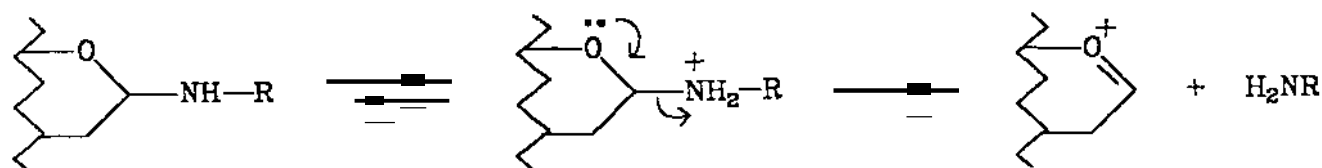
Skema 2.77

Dit wil dus voorkom of die teenwoordigheid van die groot pivaloieisubstituent op C-2 dus reeds voldoende is om die chirale induksie te bewerkstellig. Die groot aksiale substituent op C-4 speel oenskynlik dus geen rol in die diastereoselektiwiteit van die addisiereaksie nie. Die aksiale aard van dié substituent is egter nodig om die drie steriese groot pivaloieisubstituentte op C-2, C-3 en C-4 beter te akkomodeer en sodoende die spesifieke konformasie op die ring af te dwing. In die geval van die ooreenkomstige glukosederivaat sou al die groot substituentte op dieselfde e--vlak van die molekule voorgekom het met gevoiglike visinale interaksies.

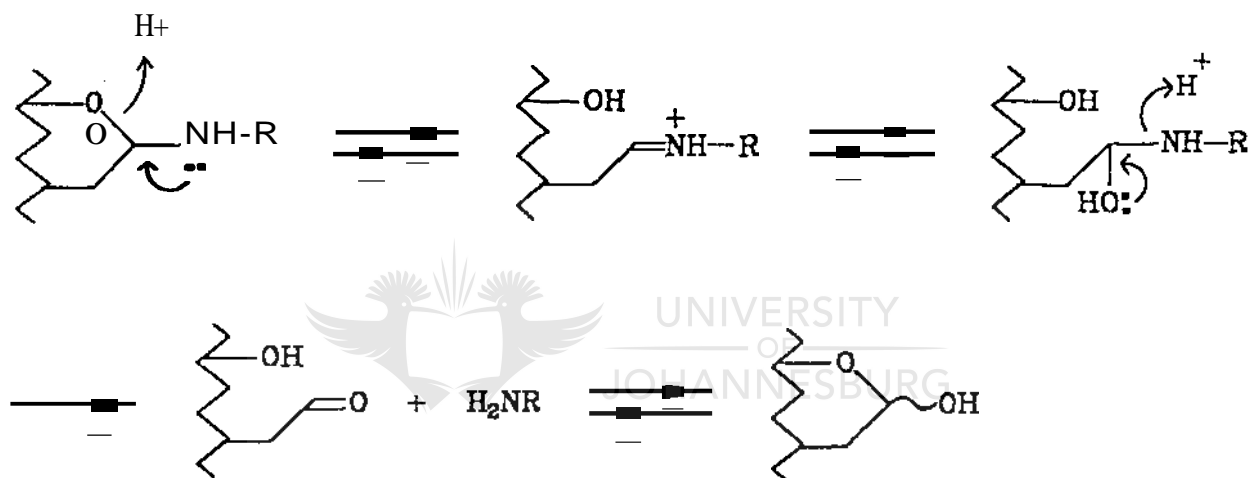
2.6.5 Hidrolitiese splyting van die Glikosielamienbinding van die Tiasooiderivaat 178b: 'n Voorlopige Onderzoek

Die suikerkomponent van 178b kon selfs na verlengde reaksietye by kamertemperatuur onder die kondisies van Kunz *et al.*,¹²⁴ nl. HCl/HCOOH, nie afgehidroliseer word nie. Die N-glikosielbinding was ook stabiel onder ander kondisies, nl. behandeling met soutsuur (HCl) of met HCl in etanol.¹⁸⁷ Onder meer drastiese kondisies, waaronder verhitting van bogenoemde reaksiemengsels, ondergaan 178b volledige ontbinding na 'n reeks produkte. Geen poging is aangewend om die afbouprodukte te identifiseer nie aangesien dit vroeër reeds bewys is dat tiasoolaminosuurderivate onder drastiese suurkondisies rasemisasie ondergaan (kyk Afdeling 1.2).

Die buitengewone stabiliteit van 178b teenoor hidrolise, in teenstelling met dié van vergelykbare aminoglikosiede,^{124,187} kan aan die teenwoordigheid van die elektrontrekkende N-trifluorasietielsubstituent toegeskryf word. Die deaktiverende effek van hierdie substituent verhoed protonering van die stikstof, wat deur sommige navorsers as 'n noodsaaklike voorvereiste vir glikosielamienhidrolise beskou word¹⁶⁰ (Skema 2.78). 'n Alternatiewe meganisme wat ook vir glikosielamienhidrolise oorweeg is verloop *via* In Schiff-basistussenproduk¹⁵⁹ (Skema 2.79). Deaktivering van die stikstofalleenpaar deur 'n N-trifluorasietielsubstituent sal ook hierdie roete onderdruk. Alternatiewe metodes



Skema 2.78



Skema 2.79

vir die selektiewe hidrolise van die N-glikosielbinding geniet tans aandag. Een benadering behels die selektiewe verwydering van die N-trifluoorasietielgroep deur behandeling met etanoliese ammoniak gevolg deur suurgekataliseerde hidrolise van die glikosielbinding. Hierdie ondersoek is op hierdie stadium nog nie afgehandel nie.

Die onsuksesvolle hidrolitiese sptying van die glikosielamienbinding van [178b](#), het daartoe gelei dat die absolute konfigurasie (*R* of *S*) en optiese suiwerheid van die tiasool-aminosuurkomponent van dié verbinding nie eksperimenteel bepaal kon word nie (om hierdie rede is die konfigurasie op die o-posisie van die glikosielamienderivate in hierdie

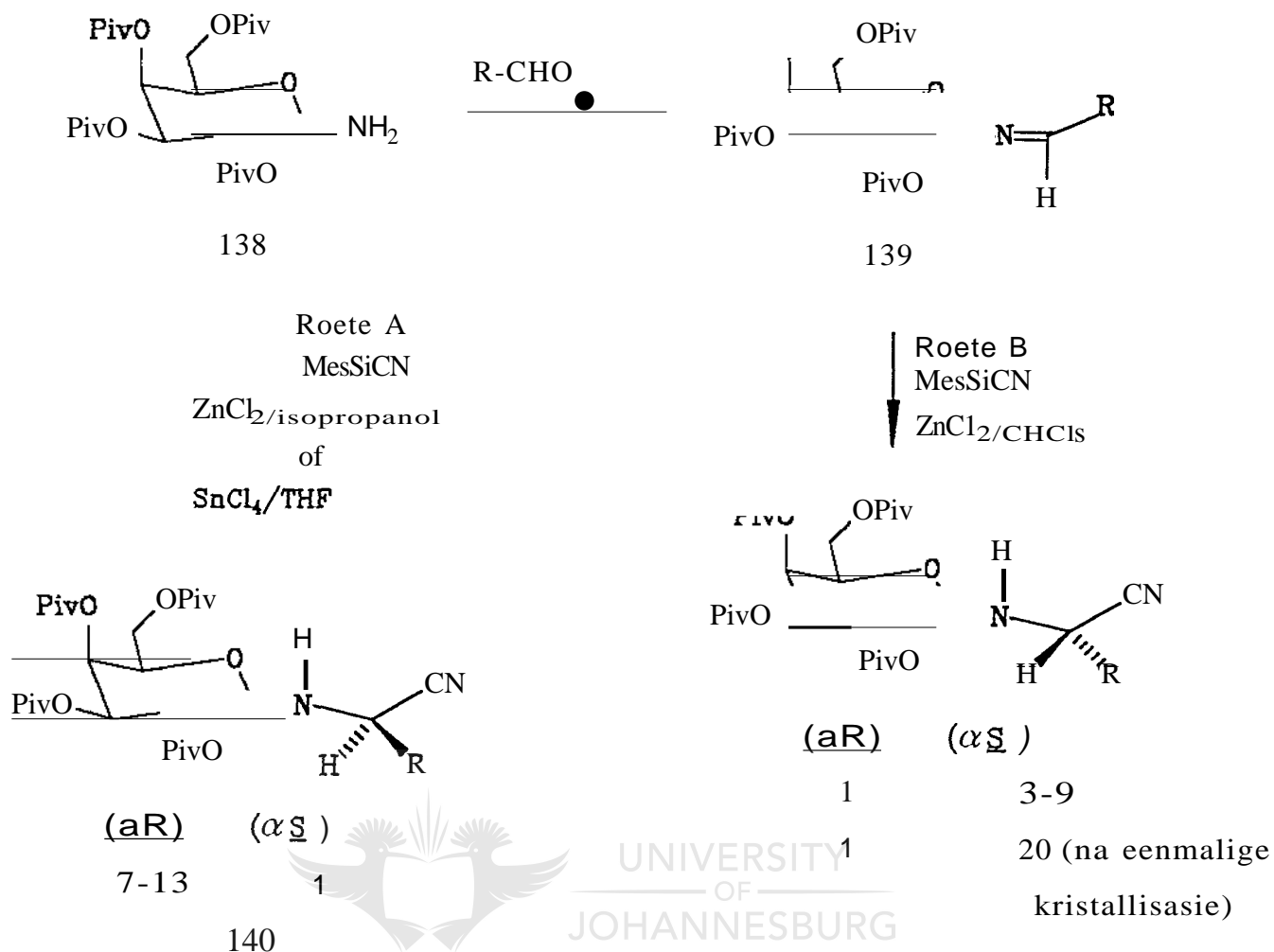
ondersoek berei, nie in die benamings van die verbindings aangedui nie). Op grond van Kunz *et al.* se resultate kan egter voorlopig aanvaar word dat die R-gekonfigureerde produk tydens die Strecker-reaksie by voorkeur gevorm het.

Op 'n vroeë stadium van die Strecker-tipe benadering tot die sintese van chirale tiasool-aminosure het dit duidelik geword, dat al sou dit suksesvol deurgevoer kan word, dit 'n duur en tydrowende sintese sal wees en dat alternatiewe metodes weer eens aandag moet geniet.

2.6.6. Addendum

In 'n baie onlangse publikasie wat na afhandeling van hierdie diastereoselektiewe Strecker-sintese projek (Afdeling 2.6) in die literatuur verskyn het, toon Kunz *et al.*²⁸² dat dit wel moontlik is om die asimmetriese induksie van die diastereoselektiewe Strecker-sintese gebruikmakende van 2,3,4,6-tetra-Q-pivaloieel-p-D-galaktopiranosielamien (138, Skema I) as chirale hulpreagens deur die geskikte keuse van oplosmiddel om te keer. Soos reeds in Afdeling 2.6 bespreek, het Kunz *et al.*¹²⁴ gevind dat die Schiff-basis (139) 'n diastereoselektiewe reaksie met trimetielsilielsianied in die teenwoordigheid van of sinkchloried ($ZnCl_2$) in isopropanol of tintetrachloried ($SnCl_4$) in tetrahydrofuraan ondergaan am, na 'n eenmalige kristallasie van die produk uit heptaan (of dlchlormetaan/heptaan), suiwer R-aminonitriël (140) te lewer (Roete A). Die galaktosielamien (138) is ook suksesvol in die diastereoselektiewe Ugi-sintese van **R**-ammosuurderivate gebruik.¹⁸⁷

Die **S**-diastereomeer van die aminonitriël vorm in oormaat indien die Schiff-baals (139) met trimetielsilielsianied in chloroform in die teenwoordigheid van soliede sinkchloried behandel word (Roete B). In die afwesigheid van sinkchloried vind die reaksie nie plaas nie. Die gebruik van alternatiewe Lewis-sure (titaantetrachloried, aluminiumtrichloried, boortrifluoriedeteraat, magnesiumchloried) het egter tot 'n afname in die



Skema 1

diastereoselektiwiteit sowel as opbrengs van die reaksie gelei. Dit is ook gevind dat verlengde reaksietye tot die vorming van die ongewenste α -anomeer aanleiding gegee het. Die minore komponent van Roete B, dit wil se die R-diastereomeer, kan deur kristallisasie uit heptaan verwyder word sodat 'n verrykte mengsel ten opsigte van die 8-diastereomeer ($R:S$ 1:20) verkry word. Suiwer 8-diastereomeer kan in In opbrengs van 50-75% na chromatografie op silika gelsoleer word. Hierdie verandering in reaksiekondisies het egter nie die sin van asimmetriese induksie in die Ugi-reaksie, gebruikmakende van 138 as chirale templaar, omgekeer nie.

IH-k.m.r.-spektroskopie het bewys dat die Schiff'-basis (139) wat as uitgangsmateriaal vir beide stereoseleksies (Roete A en Roete B) gebruik word, dieselfde konfigurasie (E-isomeer) besit. Die omkering in die sin van asimmetriese induksie kan dus waarskynlik aan 'n verskil in kompleksing van die sinkchloriedkatalisator en veranderde nukleofilisiteit van die sianiedioon in die ander medium toegeskryf word. In die polere isopropanol word die sianiedioon deur die oplosmiddel vrygestel, maar in chloroform word die sianiedioon deur interaksie van die silielderivaat met 'n ligand van die sink-katalisator vrygestel.

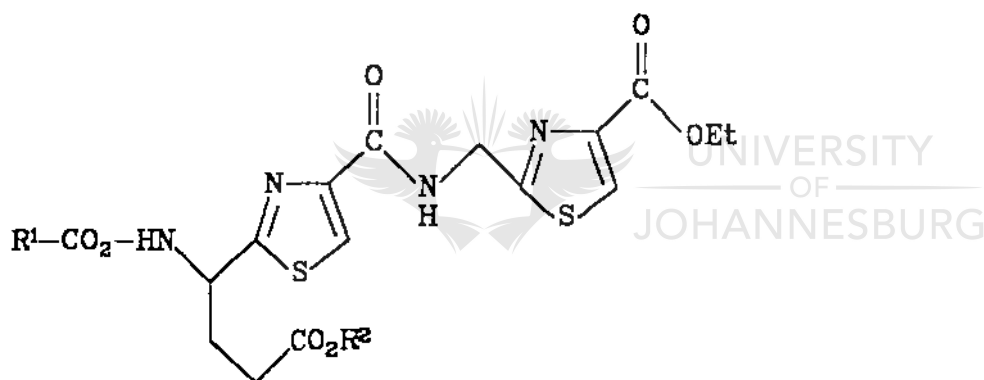
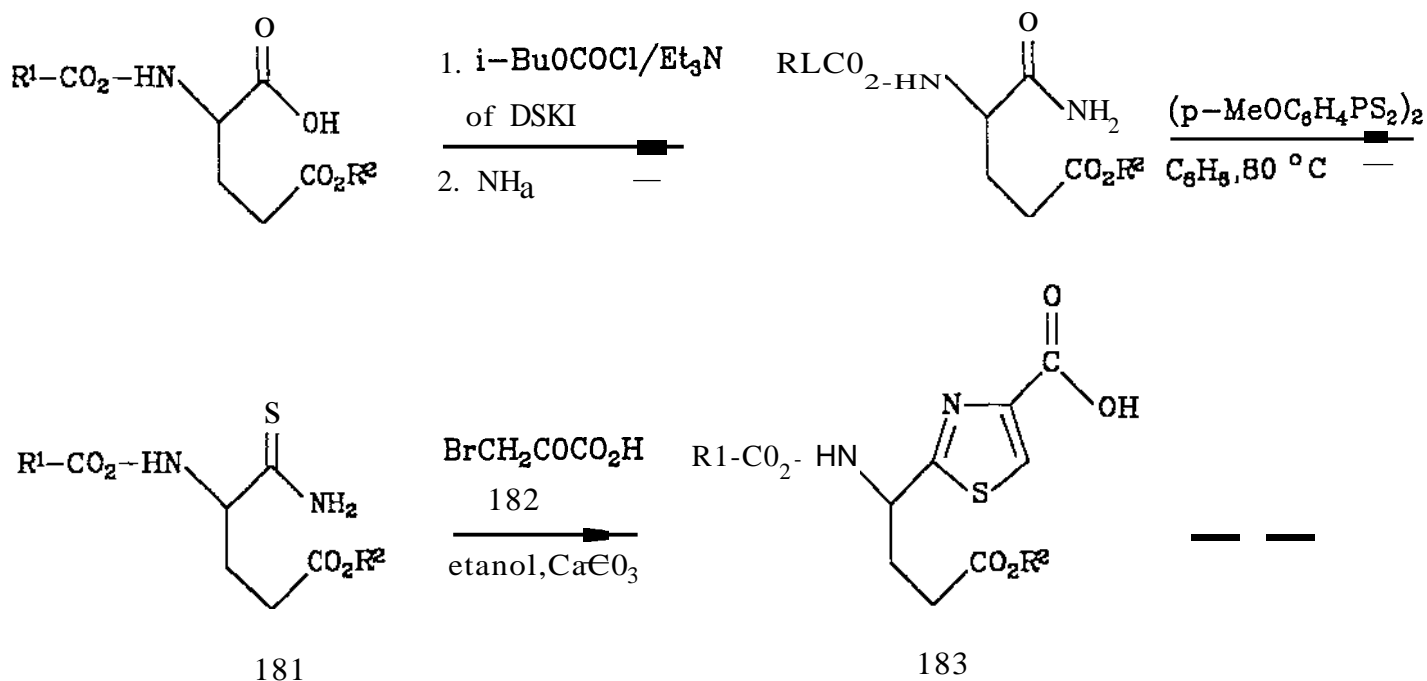
Dit is opmerklik dat Kunz *et al.* glad nie die gebruik of invloed van tintetrachloried as katalisator op die diastereoselektiewe uitkoms van die Strecker-reaksie in chloroform noem nie. Hierdie diastereoselektiewe Strecker-sintese (Skema I) is egter 'n rare geval waarin beide alternatiewe stereoseleksies gebruikmakende van dieselfde chirale hulp-reagens, en deur slegs die reaksiekondisies te varieer, verkry word. Dit is derhalwe 'n baie belangrike bydrae tot die gebied van chirale sintese.

2.7 DIE MODIFIKASIE VAN DIE HANTZSCH-SINTESE MET DIE DOEL OM RASEMISASIE TE VERHOED

2.7.1 Onlangs Gepubliseerde Roetes vir die Sintese van Chirale Tiasoolaminosure

Uit die resultate van Afdeling 2.6 is tot die gevolgtrekking gekom dat die beste oplossing vir die probleem van rasemisasie tydens die Hantzsch-reaksie die modifikasie van die reaksiekondisies, ten einde rasemisasie te verhoed, sal behels. Derhalwe is 'n volledige ondersoek ingestel om die faktore wat vir rasemisasie verantwoordelik is, te identifiseer. Gedurende die loop van hierdie ondersoek het drie interessante bydraes met betrekking tot die sintese van chirale tiasoolaminosuurderivate in die literatuur verskyn.

Met die sintese van In bistiasooldipeptiedkomponent (184, Skema 2.80) van dolastatien 3 as finale oogmerk, het Kelly *et al.*¹⁵⁸ met behulp van In gemodifiseerde Hantzsch-reaksie, wat die reaksie van die tioarnied (181) met broompiruwaatsuur (182) in etanol in



184a : R₁ = t-Bu , R₂ = CH₂C₆H₅

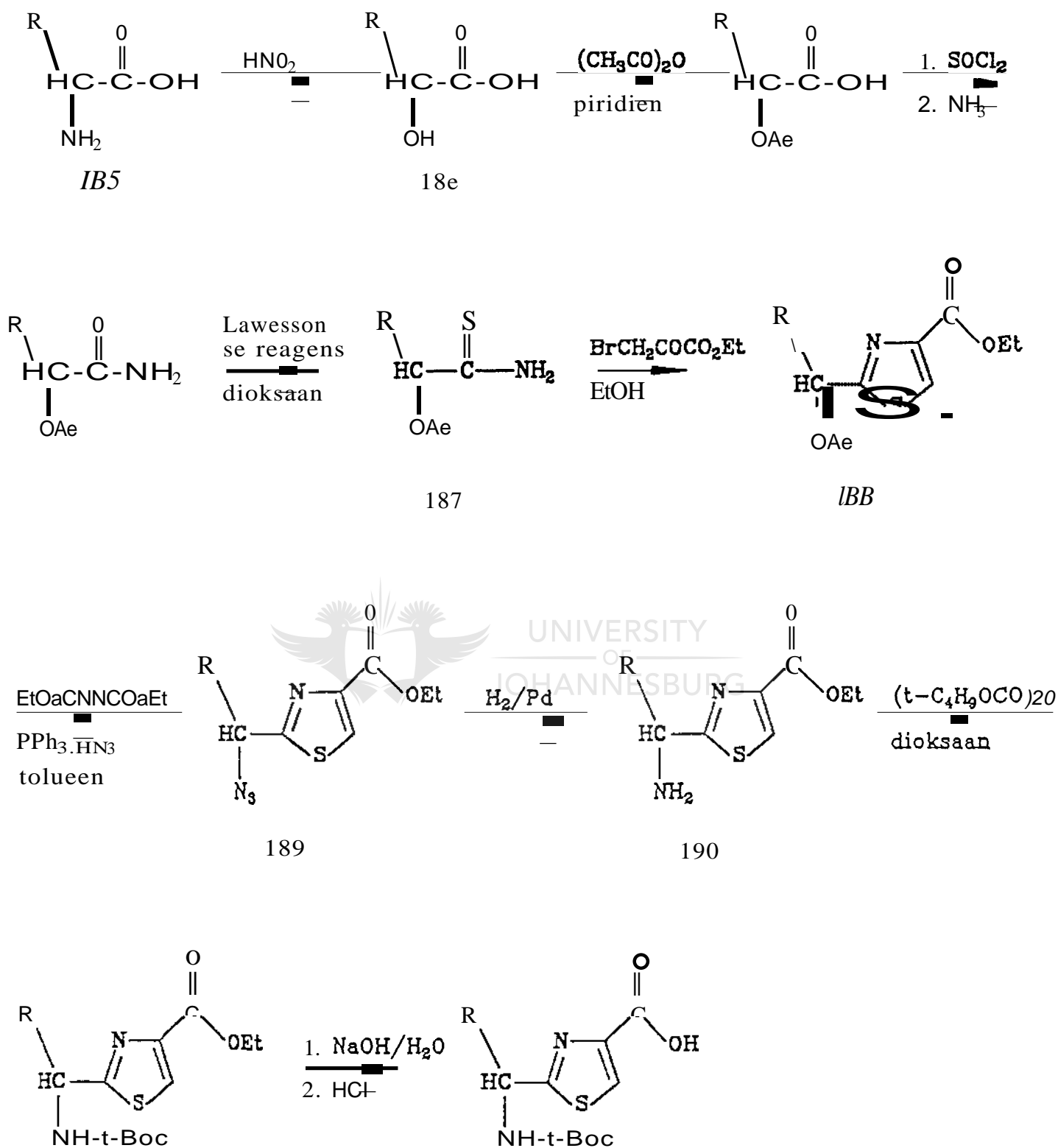
184b : R₁ = Fmoc , R₂ = t-Bu

Skema 2.80¹⁸⁸

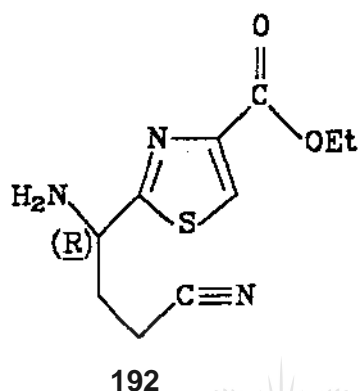
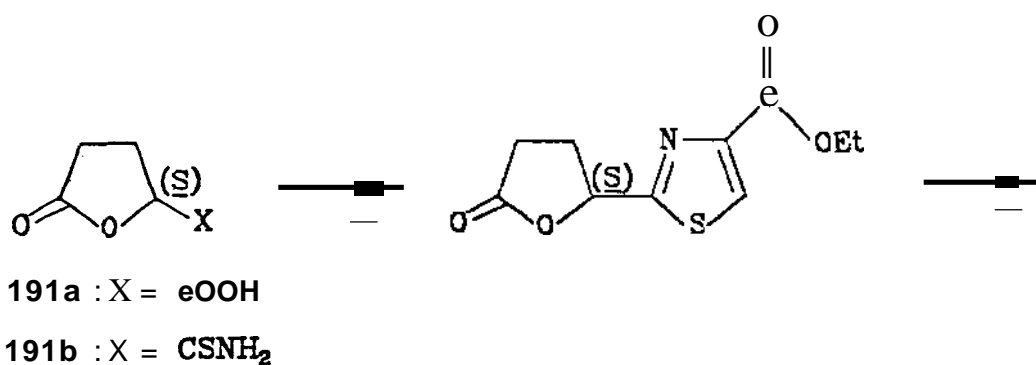
die teenwoordigheid van CaCO₃ behels het, 'n enantiomeriese oormaat (e.o.) van 60% van die gewenste stereoisomeer (*R* of *S*, afhangende of uitgangsmateriaal met die *R*- of *B*-konfigurasië respektiewelik gebruik is) van 183 verkry. Die enantiomeriese samestelling van 183 is met behulp van hcedrukvloeistofchromatografie (HDVC) op 'n Pirkle chirale kolom bepaal. Die lae spesifieke optiese rotasies van die *B*-isomeer van 183a ($[\alpha]_D^{25} -7.8^\circ$), sowel as die *R*-isomeer van 183b ($[\alpha]_D^{25} +9.6^\circ$), is in ooreenstemming met

die HDVC resultate wat op 'n beduidende mate van rasemisasie gedui het. Alhoewel Kelly *et al.* dus nie die probleem van rasemisasie opgelos het nie, het die groep se resultate aangetoon dat reaksiekondisies en/of die aard van die substituentte wel 'n direkte invloed op die rasemisasietempo tydens die Hantzsch-reaksie uitoefen.

Schmidt *et al.*^{41,189} het 'n metode vir chirale tiasoolaminosuursintese, gebaseer op die waameming dat onder sekere kondisies die Hantzsch-reaksie van chirale α -asieloksisure die ooreenkomstige opties suiwer α -asieloksitasool-4-karboksielsure in hoë opbrengs lewer, ontwikkel. Die ietwat lang sintese (Skema 2.81) behels onder meer die deasotisering van 'n chirale o-emiuosuur (185) om die α -hidroksisuur (186) met behoud van konfigurasie te lewer wat na asilering na die ooreenkomstige tioamied (187) omgesit word. Die Hantzsch-reaksie van die chirale 187 met etiel broompiruvaat in etanol lewer die opties suiwer etiel α -asieloksitasool-i-karboksielsuur (188). Inversie van die chirale sentrum vind tydens die daaropvolgende Mitsunobu-reaksie¹⁹⁰ plaas waardeur die asieloksigrup van 188 'n SN2 verplasing met asied ondergaan om die opties suiwer o-asidotiasool (189), wat nou oor die geïnverteerde konfigurasie in vergelyking met 188 besit, te lewer. Hidrogenering van 189 gee die opties suiwer tiasoolaminosuurderivaat (190). Indien die sintese met 'n *S*-gekonfigureerde aminosuur (185) as uitgangsmateriaal uitgevoer word, word die ooreenkomstige R-tiasoolaminosuur (190) gevolglik as produk verkry. Soortgelyk word die 5-tiasoolaminosuur (190) vanaf die R-aminosuur (185) berei. Aangesien die minder beskikbare en gevolglik duur R-aminosuur (185) as uitgangsmateriaal benodig word indien die natuurlike S-tiasoolaminosuur (190) verlang word, is die sintese van Schmidt sekerlik nie ekonomies nie. Daarbenewens is die totale opbrengs van die lang sintese laag en gedeeltelike rasemisasie vind tog in die omsetting van 185 na 186 plaas.¹¹³ Selfs in die omsetting van 187 na 188 vind gedeeltelike rasemisasie plaas al word dié reaksie onder streng gekontroleerde kondisies uitgevoer.¹¹³ Bogenoemde metode is deur Schmidt *et al.*⁴⁹ vir die sintese van etiel *R*-2-(1'-amino--3'-sianopropiel)tiasool-i-karboksielsuur (192, Skema 2.82) vanaf die *S*- α -asieloksisuur (191a) toegepas. Die S-analoog van 192 is op soortgelyke wyse vanaf die *R*- α -asieloksi-

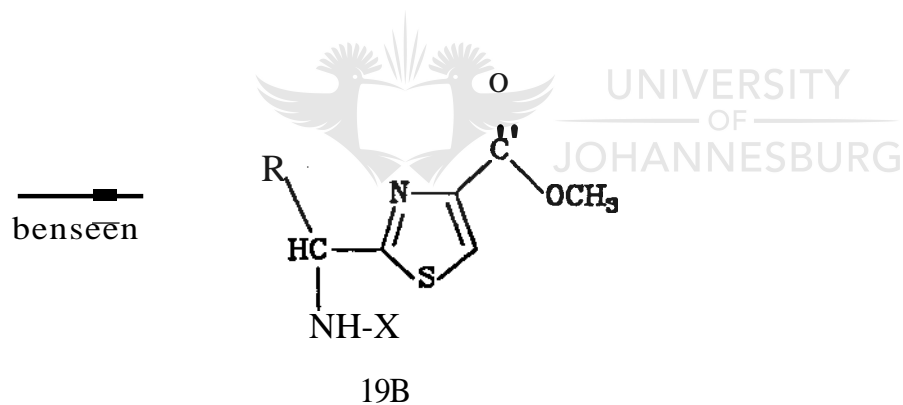
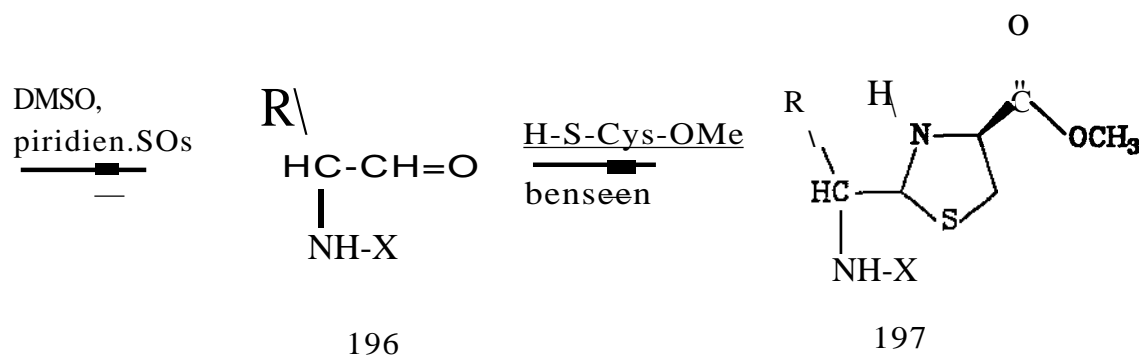
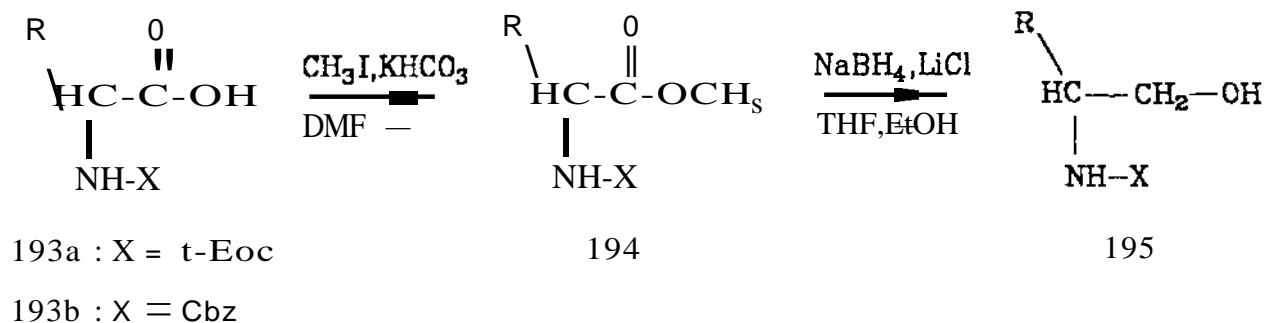


Skema 2.81



suur (191a) berei. Schmidt het geen verklaring vir die behoud van optiese suiwerheid van die o-asieloksisubstraat tydens die Hantzsch-reaksie gebied nie. 'n Moontlike verklaring hiervoor, wat die kontras met die situasie in die geval van die ooreenkomstige α -aminoderivaat uitlig, sal in Afdeling 2.7.3 bespreek word.

'n Suksesvolle sintese van chirale 2-{1'-aminoalkiel}tiasool-!-karboksielsure is deur Shioiri *et al.*^{50,58} ontwikkel (Skema 2.83). Hierdie metode kan in sekere opsigte as 'n biogenetiese-tipe sintese beskou word, aangesien die finale stap die oksidasie van 'n tiasolidienvoorloper behels. Die eerste stappe van die Shioiri-metode behels die esterifikasie van 'n chirale N-beskermdde aminosuur (193) met metieljodied, gevolg deur reduksie met litiumchloried-natriumboorhidried van die gevormde ester (194) om die alkohol (195) te lewer. Selektiewe reduksie van die o-esterfunktionaliteit van die ooreenkorn-



Skema 2.83

stige glutamiensuurderivate (γ -*t*-Butiel-N-Cbz-(*R* en *S*)-glutamiën-a-O-metiel en γ -*t*-Butiel-N-Cbz-(*R* en *S*)-glutamiën-a-O-butiel) is ook onder hierdie kondisies bewerkstellig. Daaropvolgende dimetielsulfoksiedoksidasie gevolg deur kondensasie van die gevormde aldehyd (196) met die metielester van sisteïn het die tiasolidien (197) gelewer, wat gereedelik dehidrogenering met 'chemiese' mangaandioksied (MnO_2) ondergaan om die gewenste opties suiwer tiasoolaminosuurderivaat (198) te vorm. Die produk is in aansienlik hoer opbrengste verkry deur middel van oksidasie met 'chemiese' man-

gaandioksied (wat vir gebruik in batterye geproduseer word) as met gewone geaktiveerde mangaandioksied. Die optiese suiwerhede van die N-3,5-dinitrobensoiëlderivate van 198 is deur middel van HDVC op 'n chirale Sumipax OA-I000 kolom bepaal en resultate in die orde van 98% e.o. is verkry. Die effektiwiteit van die sleuteloksidasiestap is egter wisselvallig en dit, tesame met die algehele lae opbrengs van die lang roete, lei daartoe dat die Shioiri-metode van chirale tiasoolaminosuursintese nie besonder aantreklik is nie.

Geeneen van die bogenoemde roetes bied 'n bevredigende oplossing vir die sintese van chirale tiasoolaminosuurderivate nie. Daar is derhalwe besluit om 'n eenvoudiger oplossing vir die probleem te vind. Die resultate wat verkry is word bespreek teen die agtergrond van die metodes wat gebruik is vir die bepaling van die optiese suiwerheid of enantiomeriese samestelling van tiasoolaminosuurderivate.

2.7.2. Bepaling van die Optiese Suiwerheid van Tiasoolaminosuurderivate

Tradisioneel het die benadering vir die bepaling van die enantiomeriese samestelling van 'n verbinding op die meting van die spesifieke optiese rotasie van 'n oplossing daarvan, berus. As gevolg van 'n toenemende mate van belangstelling in stereoisomerisme deur navorsers in biochemie, chemie en farmakologie het die behoefte vir meer akkurate, vinniger en veelsydige metodes vir die bepaling van enantiomeriese suiwerheid en absolute konfigurasie van molekules ontstaan, met die gevolg dat sedert die 1960's heelwat spektroskopiese tegnieke vir dié doel ingespan is. Verskeie k.m.r.-tegnieke is ontwikkel vir die bepaling van die enantiomeriese suiwerheid van 'n verbinding waaronder die gebruik van chirale solveringsagente¹⁹¹, chirale lantaniedskuifreagense¹⁹² en chirale derivatiseringsagente¹⁹³. Die chirale agente is egter baie duur. IH-k.m.r.-spektroskopie is ook in hierdie ondersoek ingespan vir die bepaling van die mate van rasemisasie wat tydens die Hantzsch-reaksie plaasvind. Dit het berus op die bepaling van die hoeveelheid deuterium wat in die chirale sentrum geïnkorporeer word tydens die kondensasiereaksie in 'n gedeutereerde oplosmiddel (deuterornetanol of deuterio-etanol)

(kyk Afdeling 2.5). Aangesien hierdie metode 'n beperking plaas op die oplosmiddel wat gebruik kan word en ook nie 'n akkurate en betroubare bepaling van die optiese suiwerheid van sò 'n molekule kan lewer nie, is alternatiewe meer veelsydige en sensitiewe tegnieke ook vir die doel in hierdie ondersoek aangewend.

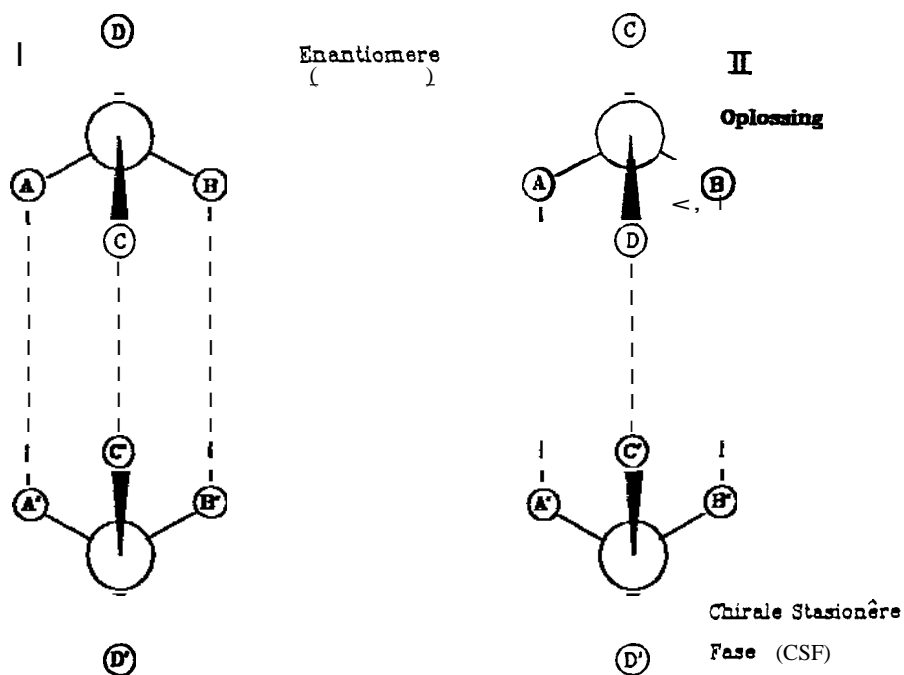
Dit is bekend dat die chiraliteit van aminosure geredelik deur gaschromatografie (GC) met 'n chirale vloeistoffase bepaal kan word.^{32,33,194} Soos reeds bespreek in Afdeling 1.4.2 het Ireland *et al.*²³ 'n metode, gebaseer op die reaksie van tiasole met 102' ontwikkel vir die bepaling van die absolute konfigurasie van 2-(1'-aminoalkiel)tiasool-4-karboksielsure. Aangesien die produk van die geoksideerde tiasoolderivaat, nl. 'n aminosuur, eers na die ooreenkomstige metiel trifluorasetaat gedcrivatiseer moet word voor GC-analise, is die tegniek ietwat omslagtig. Shioiri *et al.*^{50,58} het op soortgelyke wyse met HDVC op 'n chirale kolom die enantiomeriese samestelling van tiasoolaminosuurderivate bepaal eers nadat die N-beskeringsgroep afgehidroliseer is en die sout na die ooreenkomstige N-3,5-dinitrobensoieltia."oolaminosuur gderivatiseer is (kyk Afdeling -2.7.1). Kelly *et al.*¹⁸⁸ het uitstekende resultate verkry deur 'n enantiomeriese mengsel van γ -*t*-butielester-N-Fmoc-*R/S*-(Gln)Thz-OMe met behulp van HDVC op 'n Pirkle chirale kolom suksesvol te skei sonder dat derivatisering van die verbinding nodig was (Fmoc = 9-fluorenielmetoksikarboniel). Dit het ons aanvanklike vermoede bevestig dat deur die geskikte keuse van 'n chirale stasionere fase op 'n HDVC-kolom die enantiomeriese samestelling van gesintetiseerde 2-(1I-aminoalkiel)tiasool-4-karboksielsure vinnig, gerieflik en sonder enige derivatisering van die verbindings bepaal sal kan word. Komplimenterend tot die HDVC-resolusie van tiasoolaminosuurderivate op 'n chirale kolom, is dunlaagchromatografiese resolusie van die ooreenkomstige ontskermdde sure *via* liganduitruiling op chirale plate in hierdie ondersoek gebruik vir die bepaling van die optiese suiwerheid van gesintetiseerde tiasoolaminosuurderivate.

a. HDVC chirale analise met behulp van 'n chirale stasionere fase (CSF)

Die resolusie van enantiomere op IIDVC-eSV's is 'n uitbreiding, maar ook 'n

radikale wegbeweeg, vanaf vorige werk ten opsigte van die skeiding van enantiomere as geskikte ooreenkomstige diastereomere. Die meeste van die fisiese eienskappe van *R*- en *S*-enantiomere is identies, maar die koppeling of assosiasie met 'n addisionele chirale sentrum, byvoorbeeld deur derivatisering, lei tot die bestaan van 'n diastereomeriese paar waar elke stereoisomeer oor unieke fisiese eienskappe besit. Dit is gevolglik moontlik om 'n diastereomeriese paar gereedlik onder standaard kondisies chromatografies te skei¹⁹⁵, en wat nie in die geval van 'n enantiomeriese paar moontlik is nie. Die toepassing van die diastereomeriese metode vir die roetine analyses is egter aan verskeie nadele onderhewig, waaronder foutiewe bepaling van weë beperkings op die optiese suiwerheid van die derivatiseringsreagens¹⁹⁶ en die tydrowende opwerk van die derivatiseringsreaksiemengsels. 'n Addisionele komplikasie is dat die reaksies van verskillende enantiomere met 'n gegewe chirale reagens beduidend ten opsigte van reaksiesnelheidskonstantes en/of ewewigskonstantes kan verskil. Die gevolg hiervan is dat die verhouding van die diastereomeriese mengsel aansienlik kan verskil met die van die oorspronklike enantiomeriese mengsel.¹⁹⁷ Die probleme word egter vermy deur 'n enantiomeriese paar direk as enantiomere te skei.

Een van die benaderings in hierdie verband herus op die vorming van tydelike diastereomeriese komplekse tussen die enantiomere in oplossing en 'n spesifiek saamgestelde enantiomeriese fase (CSF) wat aan die stasionere fase, by silika, gebind is. Die verskil in die stabiliteitskonstantes van die verskillende diastereomeriese komplekse lei tot verskillende retensietye. Die gevolg hiervan is dat die enantiomeer wat die minder stabiele diastereomeriese kompleks met die CSF vorm, eerste elueer. Die ontwikkeling van CSF's is gebaseer op 'n drie-punt chirale herkenningsmodel, wat oorspronklik deur Dalgliesh¹⁹⁸ voorgestel is, en wat aanvaar dat chirale herkennung 'n minimum van 3 gelyktydige interaksies tussen die CSF en die enantiomeer in oplossing vereis. Ten minste een van die interaksies moet stereochemiesgekontroleerd wees en mag beide aantrekkend of afstotend van aard wees. Die situasie word in Skema 2.84 geïllustreer. In dié geval ondervind enantiomeer I interaksie met die CSF op posisies $\mathbf{A} - - \mathbf{A}_1$.



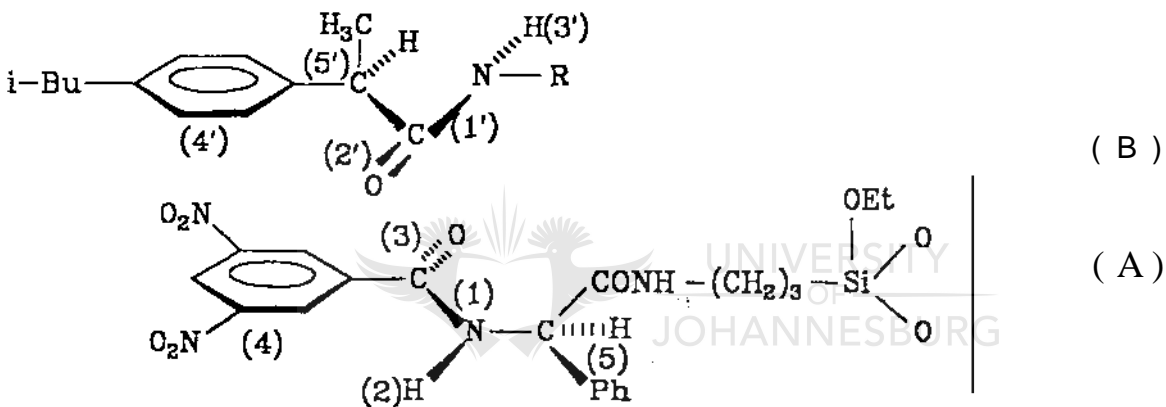
Skema 2.84 : Drie-punt chirale interaksie-model.

B--B'en C-C' waarteenoor die speelbeeld, enantiomeer II, geen C-C' interaksie ondervind nie. Indien die C-C' interaksie 'n aantrekkingsinteraksie is, sal enantiomeer I stadiger van die kolom geelueer word as enantiomeer II. Indien die interaksie afstotend van aard is, is die diastereomeriese kompleks bevattende II meer stabiel met die gevolg dat I eerste geelueer sal word. In die geval van 'n minimale interaksie, sowel as in die afwesigheid daarvan, tussen C en C' sal geen skeiding van die enantiomere waargeneem word nie.

Pirkle *et al.*¹⁹⁹ het 'n reeks CSF's, gebaseer op die drie-puntmodel, ontwikkel waaronder N-3,4-dinitrobensoiel-R-fenielsingien wat deur middel van ioniese of kovalente bindings²⁰⁰ aan 'n γ -aminopropielpakking gebind is. In Skema 2.85(A) word hierdie kovalentgebonde CSF geillustreer. Die CSF besit 'n aantal posisies wat gereedelik interaksies met ander molekules kan ondervind:

- (i) die polere amiedbinding tussen die 3,5-dinitrobensoiel (DNB)-komponent en

- die fenielglisienamien [posisie (1)]
- (ii) die amiedwaterstof, wat vir waterstofbinding beskikbaar is [posisie (2)]
- (iii) die suurstofatoom van die bogenoemde amiedkarbonielgroep, wat vir waterstofbinding beskikbaar is [posisie (3)]
- (iv) die 3,5-DNB-ring, wat elektronarm is en gevolglik $\pi-\pi$ bindings met ander aromatiese ringe kan ondergaan [posisie (4)]
- (v) die karboniel- en fenielgroepe op die fenielglisienkomponent wat òf 'n aantrekkende (op 'n soortgelyke meganisme as bogenoemde) òf 'n afstotende interaksie (vanwee die steriese grootte daarvan) kan ondervind [posisie (5)].



Skema 2.85 : Die voorgestelde interaksiemodel tussen 'n R-ibuprofeenderivaat en die kovalentgebode Pirkle-tipe HDVC - CSF.²⁰²

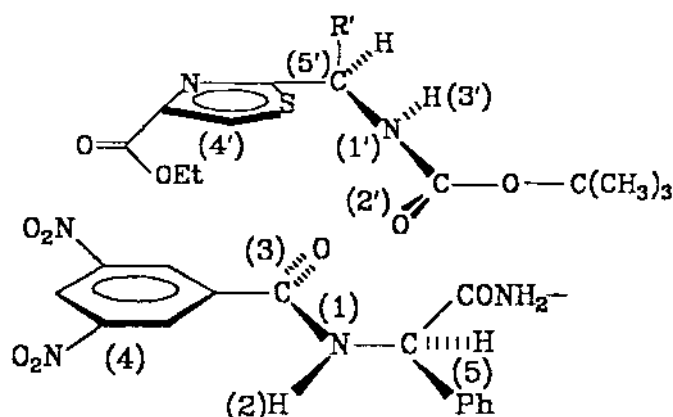
Uit die voorafgaande is dit dus duidlik dat die verbinding in oplossing oar 'n suuroposisie, basiese posisie en 'n bron van π -elektrone moet besit om geredelik enantiomeriese skeiding op die spesifieke CSF te ondergaan. Vanwee die groot aantal posisies op die CSF wat interaksies met enantiomere kan ondergaan en die akkurate en vinnige aard van die tegniek, het die Pirkle CSF goue wye toepassing gevind. Enantiomeriese skeidings met die Pirkle-tipe HDVC-eSF van N-3,5-dinitrobenso"iel-R-fenielglisien is suksesvol op onder meer alkielkarbinole, sikliese alkohole, arielasetarniede, oksasolidone, ftaliede, bi- β -naftole en hidroksisulfiede uitgevoer.19S-200

'n Goeie voorbeeld ter illustrasie van die toepassing van die Pirkle CSF word in die geval van die enantiomeriese mengsel van die I-naftaleenmctielamied van R/3-ibuprofeen[2-(p-isobutielfeniel)propionsuur] (Skema 2.85(B)) gevind.²⁰² 'n Dipool-dipool-stapelingsinteraksie tussen die dipole van die CSF en die opgeloste R-enantiomeer [posisies (1) en (1')] gee aanleiding tot die voorgestelde model (Skema 2.85). Die volgende interaksies kan egter ook plaasvind:

- (i) waterstofbinding op posisies (2) en (2')
- (ii) waterstofbinding op posisies (3) en (3')
- (iii) $\pi-\pi$ aantrekkende interaksie op posisies (4) en (4').

Bogenoemde interaksies is almal belangrik vir die vorming van die diastereomeriese kompleks, maar dit is nie deurslaggewend vir die diskriminasie tussen die twee enantiomere verantwoordelik rue. Die funksie word verrig deur 'n stereochemiesgekontroleerde interaksie, nl. die steriese interaksie van die o-metielgroep op posisie (5'). In Skema 2.85 word die diastereomeriese kompleks tussen die CSF en die R-enantiomeer (in oplossing) geïllustreer. In hierdie geval is die o-metielgroep weg van die CSF gerig, maar in die geval van die s-enantiomeer is die o-metielgroep na die CSF gerig met gevolglike destabilisering van die kompleks. Die verskil in die stabiliteit tussen die twee diastereomeriese komplekse resulteer in 'n laer kapasiteitsfaktor vir die s-enantiomeer, met die gevolg dat die twee stereoisomere geskei kan word. Soos reeds genoem, is die tipe interaksie slegs een van vele wat met dié CSF moontlik is. Pirkle *et al.*²⁰⁰ het ook reeds 'n aantal moontlike interaksie Modelle van die CSF met verskeie klasse van verbindinge ondersoek.

'n Soortgelyke interaksie Model as bogenoemde kan vir tiasoolaminosuurderivate met In kovalentgebonde Pirkle-tipe HDVC-CSF voorgestel word (Skema 2.86), en die volgende moontlike beduidende interaksies is tentatief geïdentifiseer:



Skema 2.86 Die voorgestelde interaksiemodel tussen 'n *N*-*t*-Boc-*R*-tiasoolaminosuurderivaat en 'n kovalentgebonde Pirkle-tipe HDVC - CSF.

- (i) dipool-dipoolstapelingsinteraksie [posisies (1) en (1')]
- (ii) waterstofbinding [posisies (2) en (2')]
- (iii) waterstofbinding [posisies (3) en (3')]
- (iv) stereochemiese interaksie wat in die geval van die *R*-tiasoolaminosuurderivate afwesig is, maar wel met die *S*-enantiomere kan plaasvind en sodoende die diastereomeriese kompleks te destabiliser [posisies (5) en (5')].

Die voorstelling is gegrond op die bevinding (kyk Afdolings 2.7.3.b en 2.9) dat die *S*-tiasoolaminosuurderivate eerste elueer.

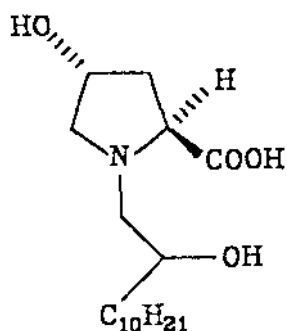
In hierdie ondersoek is 'n Pirkle Kovalente *R*-Feniëlgliësin (Hi-chrom) Omkeerbare HDVC Kolom (4.6 mm binnedeursnee x 250 mm), gekoppel aan 'n Waters Model 6000 A Solvent Delivery System, gebruik. Die kovalente kolom is bo die ioniese kolom verkies, aangesien laasgenoemde die polariteit van die elueermiddel wat gebruik kan word, beperk. Die optimale kondisies vir die resolusie van die enantiomere van etiel *N*-*t*-Boc-2-(1'-aminoalkiel)tiasool-4-karboksiëlsure met die Pirkle kolom is proefondervindelik vasgestel en sluit die volgende in:

- | | | |
|-------|--------------------------------------|--|
| (i) | elueermiddel | .heksaan met 10% (v:v) isopropanol |
| (ii) | vloeispoed | :0.6 mf/min. |
| (iii) | detektor | :UV--detektor met In waarnemingsgolf-
lengte van 254 nm |
| (iv) | streng gekontroleerde
temperatuur | |
| (v) | druk op HDVC-kolom | :200 PSI (druk per vierkante duim). |

b. Dunlaagchromatografiese enantiomeerresolusie via liganduitruiling

Die gebruik van gas- en vloeistofchromatografie vir die skeiding van enantiomere vereis die gebruik van duur apparate en in sommige gevalle, ook die derivatisering van die betrokke verbindings. Martens *et al.*²⁰³ het In beduidende bydrae gemaak wat hierdie beperkings oorkom, naamlik die ontwikkeling van In eenvoudige, goedkoop en vinnige dunlaagchromatografiese metode vir die bepaling van die enantiomeriese samestelling van o-aminosure en ontskermdde suurderivate daarvan.

Die dunlaagchromatografieplate bevat In Cu^{2+} chirale selektor, nl. (2*S*, 4*R*, 2'*R*/5')-4-hidroksi-1-(2'-hidroksidodesiel)prolien (199), wat *via* liganduitruiling vir die skeiding



199

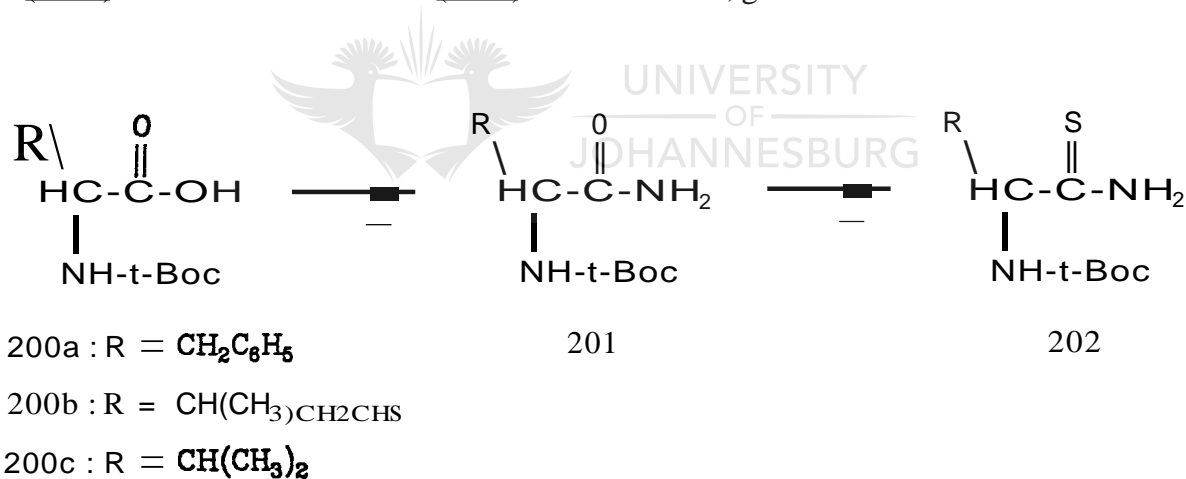
van die genoemde enantiomere verantwoordelik is. Die tegniek is uiters sensitief aangesien dit nodig is om slegs 2 μL van In 1% oplossing van In enantiomeriese aminosuur op die dunlaagplaatjies aan te bring en die laagste vlak van deteksie op $\sim 1\%$ vasgestel is.

Optimale skeiding is verkry deur die plaatjies vooraf vir 15 minute by 100^o C te aktiveer. Na voltooiing van die skeidings is die plaatjies gedroog waarna dit met 'n 0.1% ninhidrienreagens ontwikkel is. Die enantiomere kom dan as duidelik waarneembare rooi-bruin kolle op die wit agtergrond voor. Hierdie metode is dan ook suksesvol in hierdie ondersoek vir die skeiding van enantiomeriese mengsels van sekere tiasoolaminosuurderivate aangewend.

2.7.3 'n Ondersoek na die Meganisme van die Hantzsch-reaksie

a. Die sintese van N-beskermdes α -aminokarbokstioamiede

Die studie van die meganisme van die Hantzsch-reaksie is aanvanklik uitgevoer gebruikmakende van drie chirale N-*t*-Boc- α -aminotioamiedderivate (202 a-c, Skema 2.87) wat vanuit N-*t*-Boc-B-fenielaanien (200a), N-*t*-Boc-*S,B*-isoleusien (200b) en N-*t*-Boc-B-valien (200c) onderskeidelik, gesintetiseer is. In hierdie sinteses

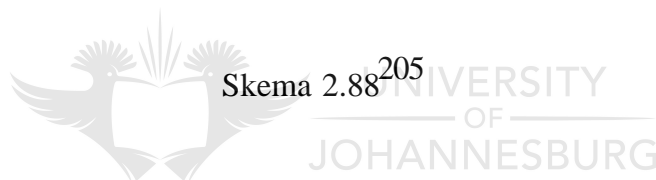
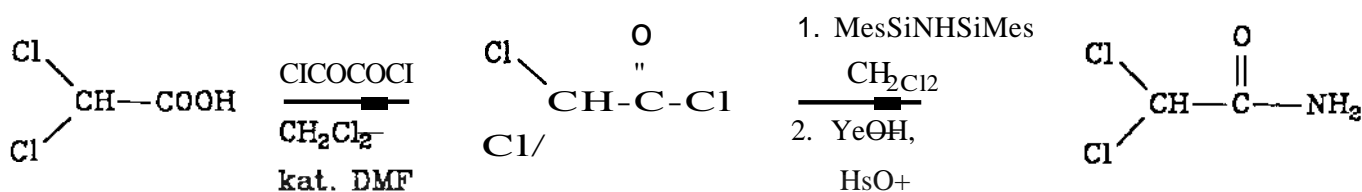


Skema 2.87

is die tioamiede (202a-c) direk vanuit die ooreenstemmende amiede (201a-c) verkry deur middel van reaksie met Lawesson se reagens. Dit verteenwoordig 'n verbetering op die tradisionele metodes (kyk Skemas 2.36, 2.37, 2.40 en 2.43) wat die omsetting van amiede na nitriële en 'n daaropvolgende addisiereaksie met waterstofsulfied behels het.

Die standaard metodes vir die omsetting van karboksiesure na primere amiede²⁰⁴

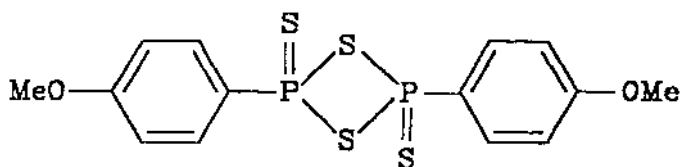
behels onder meer die reaksie met ammoniumkarbonaat of urea, die ammonolise van die ooreenkomstige esters of anhidriede of die reaksie van asielechloriede met ammoniak. In die geval van die polifunksionele of onstabiele edukte kan verwag word dat die genoemde metodes nie altyd ewe suksesvol sal wees nie vanwee die moontlikheid van kompeterende reaksies. Verskeie metodes is derhalwe ontwikkel om die probleem te oorkom, waaronder omsetting van karboksiesure na die ooreenkomstige asielchloriede met oksalielechloried en daaropvolgende reaksie met heksametioldisilasaan [bis(trimetielsilil)amien] om na hidrolise die primere amiede te lewer²⁰⁵ (Skema 2.88). Die drie *N-t-Boc-S-*



aminosure (200a-c) is in hoë opbrengs na die amiede (201a-c) omgesit deur middel van 'n meer direkte metode, nl. aktivering van die karboksiesure met isobutiellchloroformiaat in die teenwoordigheid van N-metiilmorfolien en daaropvolgende reaksie met ammoniak. Die Lr.-spektra van 201a-c vertoon elk 'n doeblet van swak absorpsiebande in die gebied 3522-3360 cm^{-1} , wat aan $-\text{NH}_2$ toegeskryf kan word, sowel as sterk karbamaatabsorpsiebande by 1670-1692 cm^{-1} .

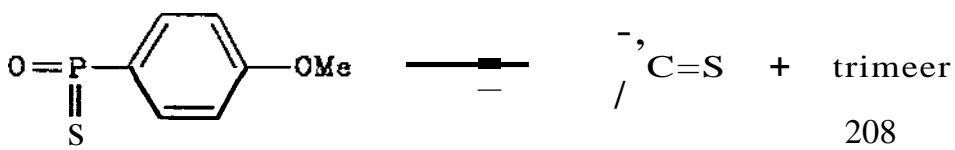
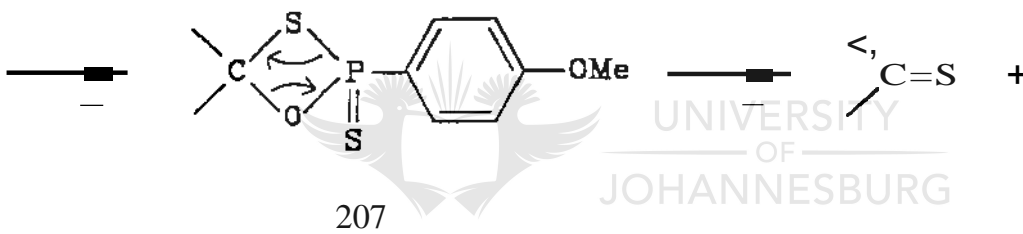
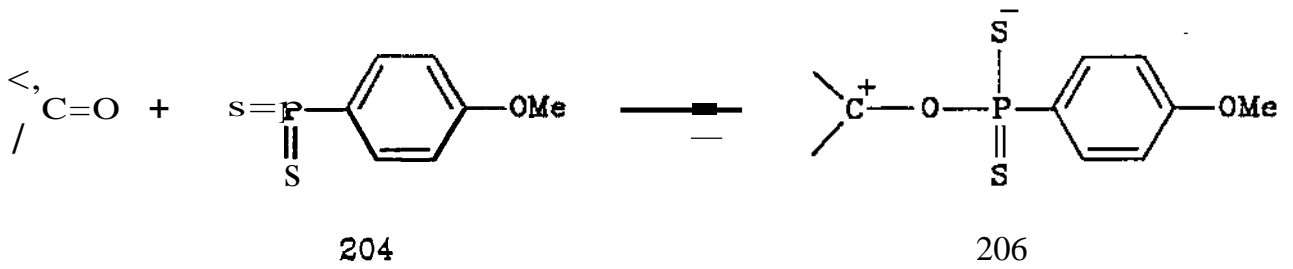
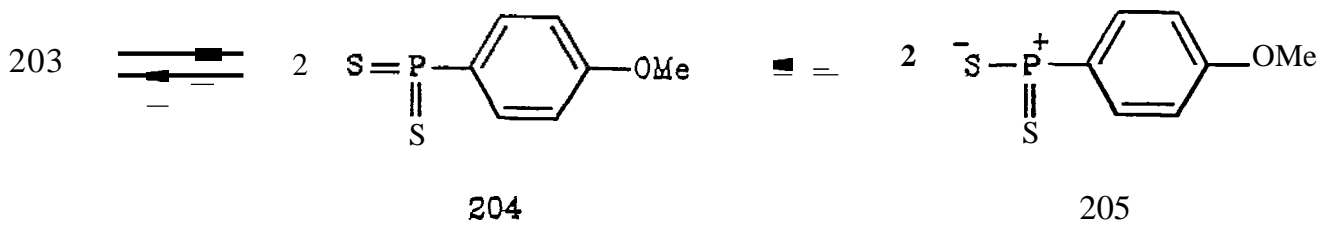
In die bereiding van die ooreenkomstige tioamiede is gebruik gemaak van die mees effektiewe tioneringsreagens bekend²⁰⁶, naamlik 2,4-bis(p-metoksifeniel)-1,2,3,4-ditia-difosfetaan-2,4-disulfied (203, Lawesson se reagens). Die reagens sit karbonielverbindings soos esters²⁰⁷, laktame²⁰⁸, imiede²⁰⁸, ketone²⁰⁹, enaminone²¹⁰, hidrasiene²¹¹ en amiede^{206,212} in hoë opbrengs om na die ooreenkomstige tiokarbonielverbindings onder bepaalde reaksiekondisies, gewoonlik verhitting in 'n geskikte inerte oplosmiddel soos

benseen en toluen. Tionering van die N-beskernde- α -aminokarboksamiede (201a-e) volgens 'n modifikasie van die oorspronklike metode van Lawesson *et al.*^{207b}, nl. deur die reaksies met 203 in anhidriese DME by kamertemperatuur, vind chemoselektief plaas aangesien die t-butoksikarbonielgroep en die ester groep eers by 110°C en 140°C onderskeidelik, met 203 reaksie ondergaan.^{207b}, 213

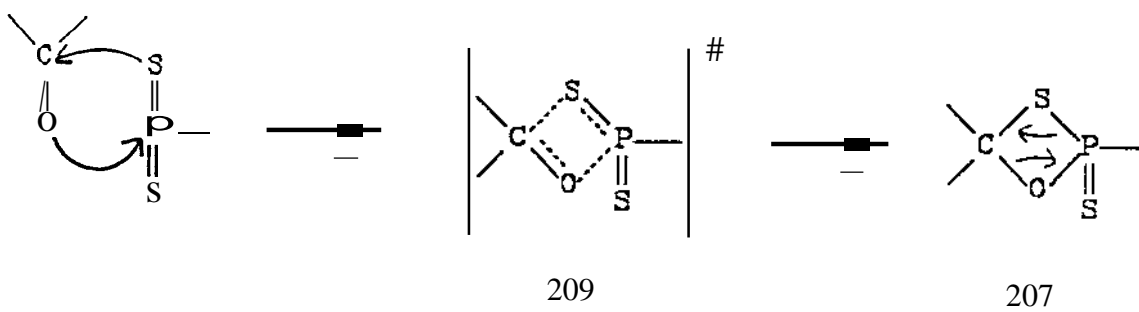


203

By kamertemperatuur het die 0 jS-uitruiling van die primere amied na 4 uur volledig plaasgevind. Tans bestaan daar twee meganistiese verklarings²¹⁴ vir die tionering van karboniele met Lawesson se reagens (203). In die eerste van dié meganismes (Skema 2.89) word veronderstel dat 203 in oplossing as die monomeriese ditiometafosfonaat (204), in resonans met die kanoniese struktuur 205, voorkom. In beide 204 en 205 is die fosforatoom elektrofilies met die gevolg dat dit gereedlik deur 'n nukleofiel aangeval kan word om 'n tussenproduk (206) te vorm wat *via* 'n sikliese tioketaal (207) na die tio-karboniel en 'n trimeer (208) ontbind. Hierdie voorgestelde meganisme is versoenbaar met die waarneming dat die tempo van tionering toeneem met 'n toename in die nukleofilisiteit van die karbonielsuurstof. Die tweede meganisme verklaar die lae sensitiwiteit van die tioneringsreaksie ten opsigte van substituentte van beide die reagens en die substraat (Skema 2.90). Die verklaring behels die gelyktydige elektrondigtheidsoordrag tussen die karbonielgroep en die P=S groep met die gevolglike vorming van die sikliese tioketaal *via* 209. Dit sal die elektroniese effekte van substituentte wat aan die fosforatoom en karbonielgroep verbind is, grootliks neutraliseer. Die voorkoms van [2+4] en [2+3] sikloaddisierreaksies van 203 met verskeie onversadigde sisteme ondersteun sò 'n meganisme.



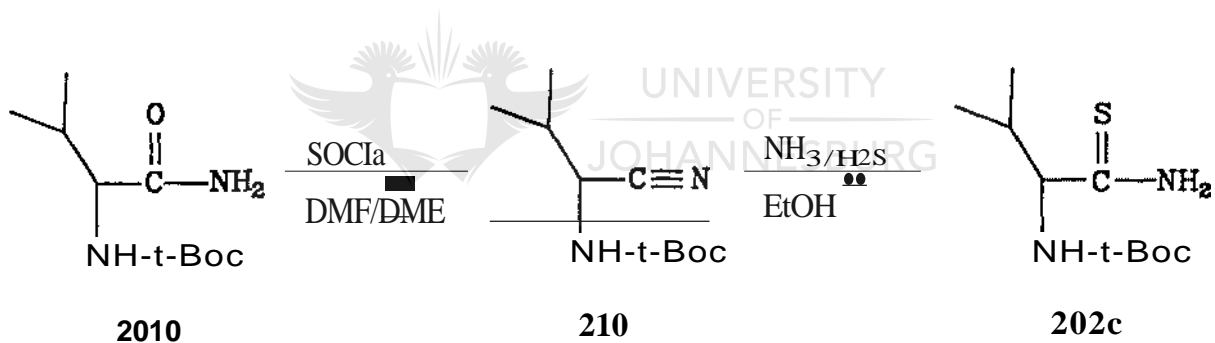
Skema 2.89



Skema 2.90

Die dryfkrag vir die reaksies van karboniele met 203 word gevind in die vorming van die sterker P=Q (130 kkalj/mol) en P-o bindings in plaas van die labiele P=S (90 kkalj/mol) en P-S bindings. In die geheel berus die sukses van die tioneringsreaksie op die relatiewe gemak waarmee die fosforatoom se koördinasiegetal kan verander van P(IV) → P(V) → P(VI). Die wye toepassings wat Lawesson se reagens (203) in sintese vind kan aan 'n aantal faktore toegeskryf word, onder meer die geredelike beskikbaarheid daarvan, eenvoudige en gerieflike reaksiemetodes, hoë opbrengste waarin swaëlbevattende reaksieprodukte gewoonlik verkry word en die relatiewe gemak waarmee die gewenste produkte geïsoleer kan word.

Ten einde vas te stel of vorming van die tioamide (202a-c) sonder rasemisasie plaasgevind het, is N-t-Boc-S-2-amino-3-metielbutiramied (201c, Skema 2.91) na die nitril



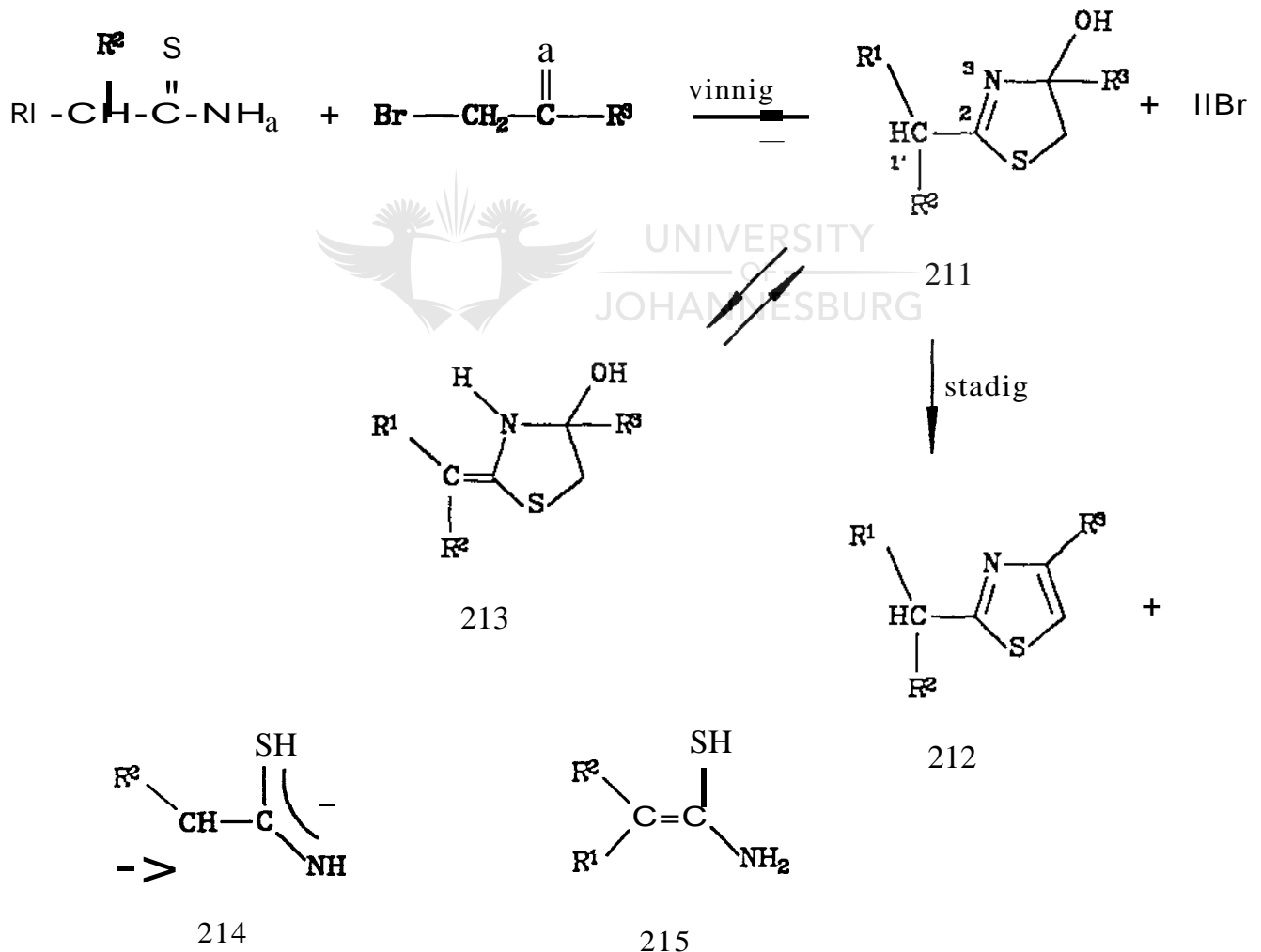
Skema 2.91

(210) omgesit deur reaksie met tioniëlchloried.²¹⁵ Die nitril (210) is onder standaard tioneringsreaksieondisies ($\text{NH}_3/\text{H}_2\text{S}$, etanol), en wat tot geen rasemisasie aanleiding gee nie, na die ooreenkomstige tioamide (202c) omgesit. Die tioamide wat sodoende verkry is het dieselfde spesifieke optiese rotasie getoon as dié wat deur middel van die Lawesson-reaksie berei is. Op grond van hierdie resultate is aanvaar dat die bereiding van die tioamide (202a-c) vanuit die amide (201a-c) met behulp van Lawesson se reagens (203) sonder enige rasemisasie plaasgevind het.

Noudat die uitgangsmateriaal vir 'n meganistiese ondersoek van die Hantzsch-reaksie geredelik beskikbaar was, is met dié ondersoek in aanvang geneem,

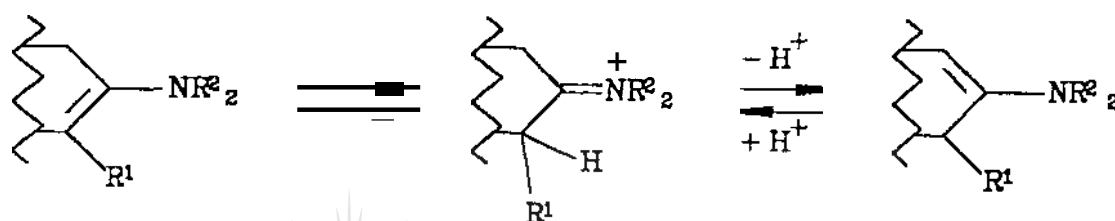
b. 'n Ondersoek na rasemisasie tydens die Hantzsch-reaksie

Vorige resultate wat in hierdie ondersoek verkry is (Afdeling 2.5) het reeds aangedui dat 'n tussenproduk van die Hantzsch-reaksie, eerder as die finale produk, in die rasemisasiestap betrokke is. Ongereageerde tioamiede wat uit die reaksies herwin is, is steeds in 'n opties suiwer vorm verkry. Die uitgangstof is dus nie direk in die rasemisasie (*via* 215, Skema 2.92) betrokke nie, met die gevolg dat aanvaar kan word dat die aanvanklike enolisering van die tioamied *via* tussenproduk (214) plaasvind. Dit is

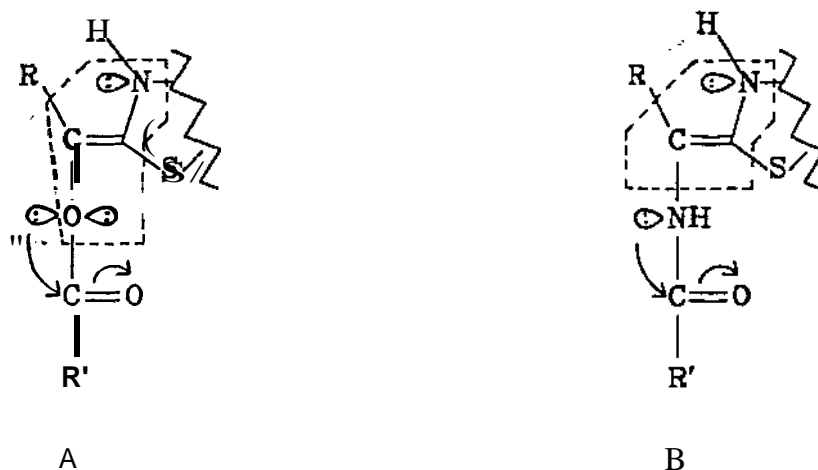


Skema 2.92

verder bekend dat die stadige stap in die Hantzsch-reaksie (vir volledige meganisme kyk Skema 2.7) die dehidrering van die hldroksiltiasolientussenproduk (211) is. Dit was denkbaar dat 'n verbinding van tipe (211) deur middel van 'n vinnige suurgekataliseerde Imien-enamientipe toutomerie en aldus 'n simmetriese tussenproduk (213) rasemisasie kon ondergaan, veral indien die daaropvolgende dehidreringstap stadig is. Onder standaard Hantzsch-reaksie kondisies vind dehidrering, wat deur die *in situ* gevormde RBr gekataliseer word, egter baie stadig plaas. Derhalwe bestaan daar voldoende geleentheid vir 'n imien-enamien ewewig om in te stel *via* die vorming van 'n iminiumsout²¹⁷ (Skema 2.93).

Skema 2.93²¹⁷

Indien die bostaande verklaring van rasemisasie tydens die standaard Hantzsch-sintese van tiasoolaminosuurderivate as korrek bewys word, ontstaan die vraag na die rede vir die feit dat min of geen rasemisasie in die ooreenkomstige reaksies van α -asieloksitioamiede (kyk Afdeling 2.7.1) plaasvind nie. Een moontlikheid is dat die stabiliteite van die enarnientoutomere in die twee gevalle aansienlik verskil. In hierdie verband kan die α -asieloksigesubstitueerde enamien as 'n hoë energie 6-elektron butadieentipe sisteem beskou word aangesien twee elektrone in sodanige sisteem noodwendig in antibindende molekulere orbitale geplaas moet word. Die 6π -elektrone waarna verwys word is 'n stikstofalleenpaar, 2π -elektrone van die dubbelbinding en 'n suurstofalleenpaar (die tweede suurstofalleenpaar is gedelokaliseer na die karbonielgroep) soos hieronder aangedui (A, Skema 2.94). Die butadieentipe sisteem ontstaan deur die interaksie van 'n p-orbitaal van stikstof, 'n p-orbitaal van suurstof en 'n p-orbitaal van elk van twee

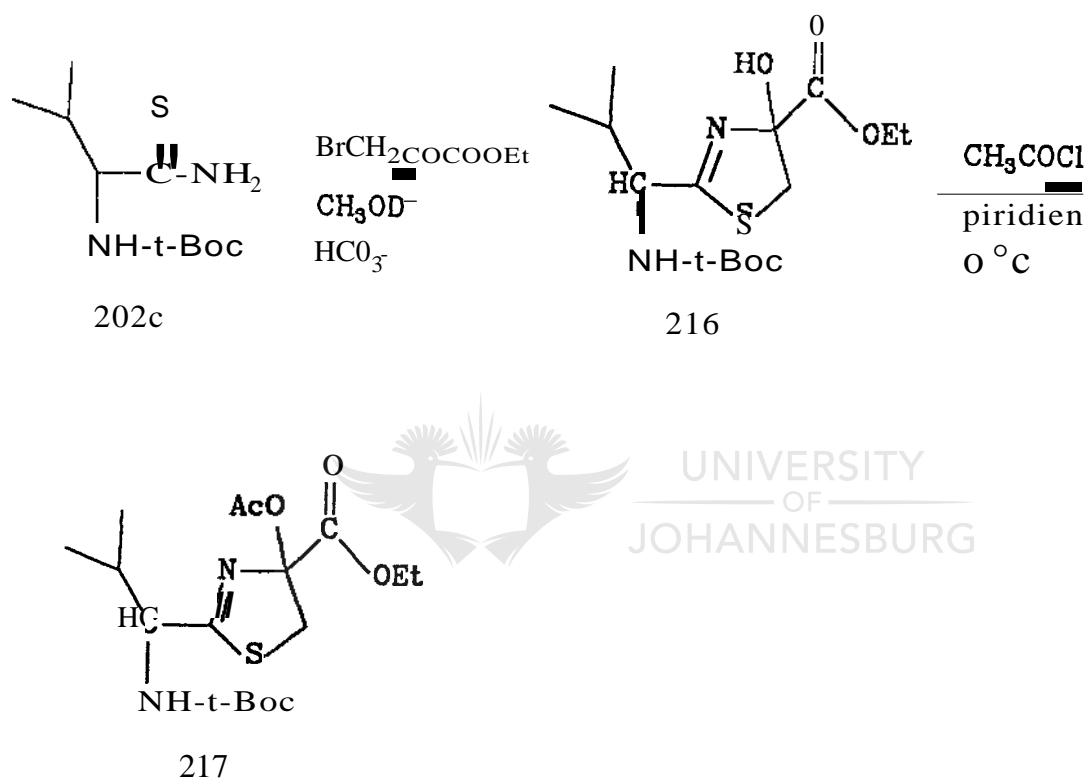


Skema 2.94

koolstofatome. Die ooreenkomstige o-asielaminogesubstitueerde enamien kan egter as 'n stabiele 4--elektron butadieentipe sisteem beskou word met al 4π -elektrone in bindende molekulere orbitale. Die 4π -elektrone waarna verwys word is die 2π -elektrone van die dubbelbinding en 'n alleenpaar van die ringstikstof. Die stikstofalleenpaar van die asielaminogroep vorm nie deel van die butadiesentipe sisteem nie aangesien dit na die karbonielgroep gedelokaliseer word (B, Skema 2.94). Volgens bostaande argument bestaan daar dus min of geen dryfkrag vir die vorming van 'n a-asieloksigesubstitueerde enamien (A), in teenstelling met dié vir die vorming van 'n o-asielaminogesubstitueerde enamien (B).

Die voorgestelde volledige meganisme van die Hantzsch-reaksie aanvaar dat die dehidrering van die hidroksitasolientussenproduk (211) 'n suurgekataliseerde proses is. Indien die Hantzsch-reaksie onder die standaard kondisies uitgevoer word, is die tempo van die dehidreringstap waarskynlik vergelykbaar met dié van die eerste stap naamlik die substitusiereaksie. Onder hierdie omstandighede is daar geen opbou van 'n tussenproduk nie. Indien die verloop van die reaksie met behulp van dunlaagchromatografie gevolg word is daar hoogstens aanduiding van die teenwoordigheid van een tussenproduk. Indien die reaksie in die teenwoordigheid van NaHCO_3 of KHCO_3 , d.w.s. onder

swak basiese kondisies, uitgevoer word, word die dehidreringsstempo sodanig onderdruk dat die tussenproduk wel geïsoleer kan word. Byvoorbeeld, die hidroksitasolientussenproduk (216, Skema 2.95) is in goeie opbrengs verkry uit die reaksie van die tioamied (202c) met etiel broompiruvaat in deuterometanol by kamertemperatuur (24 uur) in die teenwoordigheid van 'n oormaat fynge maalde NaHCO_3 . Onder hierdie kondisies word



Skema 2.95

die gevormde HBr onmiddellik geneutraliseer terwyl die reaksie-medium essensieel neutraal bly as gevolg van die lae oplosbaarheid van NaHCO_3 . Soos reeds in Afdeling 2.5 genoem, reageer sterker basiese, byvoorbeeld N-metielmorfolien, met etiel broompiruvaat. Die hidroksitasolien (216) is verbasend stabiel onder basiese kondisies en is deur chromatografie op silika in 2% trietielamien by $-\text{IO}^\circ\text{C}$ geïsoleer.

Uit die $^1\text{H-NMR}$ -spektrum van 216 was dit duidelik dat die produk uit 'n mengsel van

twee diastereomere (a.g.v. die teenwoordigheid van twee ehirale sentra) bestaan. Die ^1H -k.m.r.--data van die hoof-isomeer ($\sim 80\%$ van die totale produk) kan soos volg opgesom word: Die $\text{CH}_{3-3'}$ en die $\text{CH}_{3-1''}$ van 216 resonoeer beide as doebllette by δ 0.92 ($J = 7.0$ Hz) en δ 1.02 ($J = 5.8$ Hz) onderskeidelik, terwyl 'n singulet by δ 1.48 aan die teenwoordigheid van die $-\text{e}(\text{CH}_3)_3$ groep toegeskryf kan word. 'n Triplet by δ 1.34 ($J = 7.0$ Hz) kan aan die metielgroep van die ester toegeskryf word, terwyl die metileen-groep as 'n kwartet by δ 4.33 ($J = 7.0$ Hz) resoneer. Die amienproton sowel as H-2' resoneer as multipllette by δ 5.26 en δ 2.20 onderskeidelik. Die twee magneties nie-ekwivalente protone op C-5, nl. H-5a en H-5b, resoneer as 'n AB-sisteem by δ 3.85 ($J = 12.0$ Hz) en δ 3.40 ($J = 12.0$ Hz) onderskeidelik. Die multipllet van die een chirale proton, nl. H-11, integreer vir 1 proton, 'n onomwonde bewys dat geen deuteriumuitruiling op C-11 plaasgevind het nie. Die hidrositasolientussenproduk (216) van die Hantzsch-reaksie is dus nog essensieel opties suiwer. Die Lr.-spektrum van 216 vertoon 'n bree mediumintensiteit hidrosi-absorpsieband by 3500 cm^{-1} .

Die reaksie van 216 met asetiellchloried in piridien vir 2 uur by 0°C het die ooreenkomstige O-asetielderivaat (217) gelewer. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van 217 is 'n drie-proton singuletresonansie by δ 2.20 waargeneem wat aan die teenwoordigheid van 'n asetiellgroep toegeskryf kon word. Die res van die spektrum was essensieel identies aan die van 216. In ooreenstemming met die voorgestelde meganisme van die reaksie (Skema 2.92), bevestig bogenoemde resultate dat rasernisasie van die chirale sentrum tydens die Hantzsch-reaksie voor die vorming van die aromatiese tiasoolaminosuurderivaat (212), maar na vorming van die hidrositasolientussenproduk (211) plaasvind. Derhalwe sal chirale tiasoolaminosuurderivate slegs gevorm kan word indien die dehidrering van die hidrositasolientussenproduk (211) aansienlik vinniger kan plaasvind as die rasernisasie daarvan,

Die vraag het dus nou ontstaan of die aard van die substituent op die 4-posisie van die hidrositasolientussenproduk die tempo van die dehidreringsreaksie bepaal. Ten einde

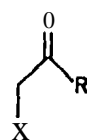
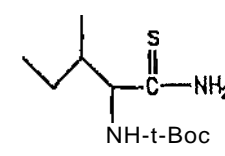
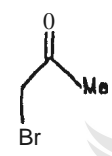
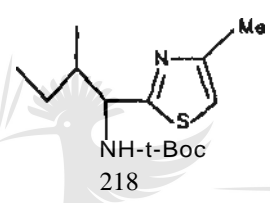
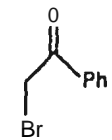
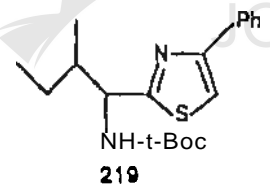
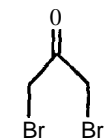
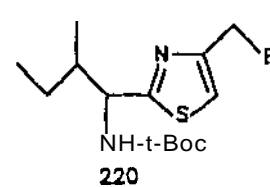
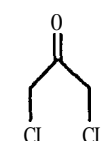
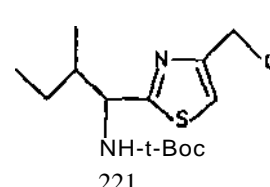
die vraag te beantwoord is die reaksie van chirale tioamide (202a,b) met verskillende α -halokarbonielverbindings onder standaard Hantzsch-reaksieondisies ondersoek, veral met betrekking tot die mate waarin tiasoolvorming met rasemisasie gepaard gaan (Tabel 2.6).

Die reaksies is in deuterio-etanol as oplosmiddel uitgevoer (Skema 2.96). Die persentasie deuteriuminkorporasie in die chirale sentrum op C-II, as 'n maatstaf van die mate waarin rasemisasie plaasgevind het, is bereken in terme van die relatiewe intensiteit van die H-1' sein in die IH-k.m.r.-spektra van die reaksieprodukte (218-225).

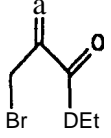
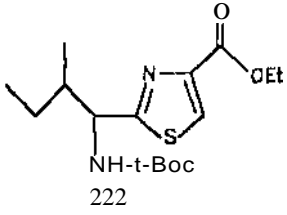
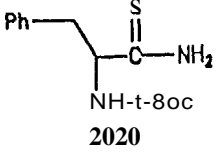
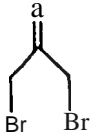
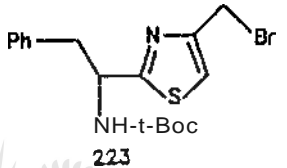
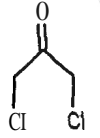
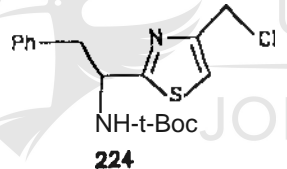
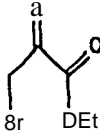
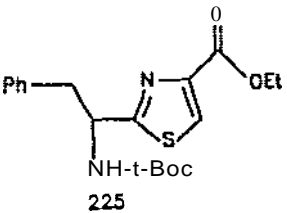
Dit was opmerklik dat daar 'n oenskylike verband is tussen die mate van deuteriumuitroiling, en dus rasemisasie, met die karbokationstabiliserende eienskappe van die substituent R van die α -halokarbonielreagens (XCH_2COR). Deuteriumuitruiling het toegeneem in die volgorde $R = CH_3 \approx Ph < CH_2Br < CH_2Cf < COOEt$. Die karbokationstabiliserende eienskappe van die metiel- en fenielgroepe kan aan induktiewe (elektronskenkende) en resonanseffekte respektiewelik, toegeskryf word. Die twee opties suiwer tiasoolaminosuurderivate (218) en (219) het beide groot spesifieke optiese rotasies ($[\alpha]_D^{21} - 54.4^\circ$ en $[\alpha]_D^{20} - 52.6^\circ$ onderskeidelik) waarna dit afneem na $[\alpha]_D^{15} - 14.1^\circ$ vir die broomtiasool (220) en $[\alpha]_D^{15} - 11.6^\circ$ vir die chloortiasool (221). Die byna volledig gerasemiseerde etielester (222) toon slegs 'n spesifieke optiese rotasie van $[\alpha]_D^1 4.5 - 7.9^\circ$. Die waardes van die spesifieke optiese rotasies van die onderskeie verbindings is dus in ooreenstemming met die resultate van die deuteriumstudies.

In die IH-k.m.r.-spektra van die produkte wat by wyse van rasemisasie twee diastereomere gelewer het, naamlik 220, 221 en 222, is soos verwag duplisering van sommige resonansies waargeneem. Byvoorbeeld, die 500 MHz 1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van die broomtiasool (220) het onomwonde op die bestaan van In diastereomeriese mengsel in In 7:3 verhouding gedui. In die IH-k.m.r.-spektrum van 220 is dubbele multiplet-resonansies vir onder meer C-2' (δ 2.05 en δ 2.15) en die tiasoolproton (δ 7.17 en δ 7.18)

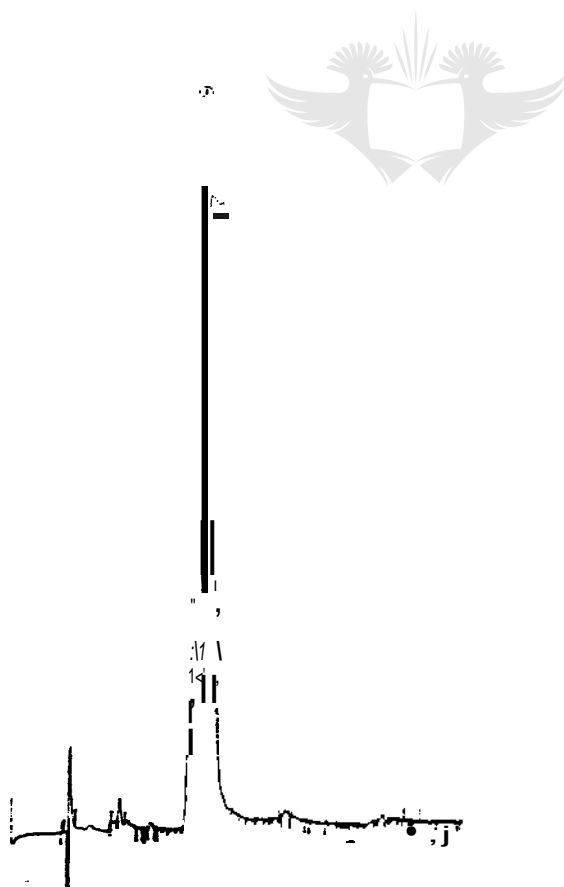
TABEL 2.6

Tioamied	α -Halokarboniel-reagens	Tiasoolproduk	Chemiese verskuiwing van H-1' (dpm, CDCl_3)	% deuterium-uitruiling op C-1' (EtOD)	%-d.o. (of e.o.)
					
 NH-t-Boc 202b	 Br	 NH-t-Boc 218	4.89	0	100
202b	 Br	 NH-t-Boc 219	5.00	0	100
202b	 Br Br	 NH-t-Boc 220	4.92	30	70
202b	 Cl Cl	 NH-t-Boc 221	5.20	50	50

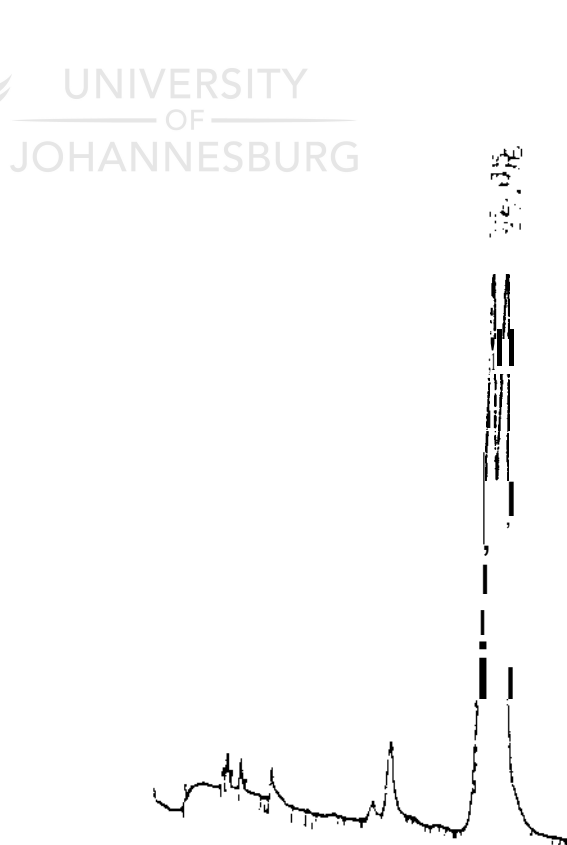
TABEL 2.6 (vervolg) :

202b		 <p>222</p>	4.89	72	28	
2020	 <p>2020</p>		 <p>223</p>	5.25	25	75
202a		 <p>224</p>	5.15	55	45	
2020		 <p>225</p>	5.26	75	25	

waargeneem. Die multiplet van H-1' bet met ca. 30% in intensiteit afgeneem en die amienproton het as 'n bree multiplet by δ 5.23 en as 'n singulet by δ 5.15, in 'n verhouding van ca. 8:2 onderskeidelik, geresoneer. In die ^{13}C -k.m.r.-spektrum is ook duplikaat resonansies vir meeste van die koolstowwe waargeneem. Byvoorbeeld, C-1' resoneer as 'n bree doeblet by δ 57.35 en C-2' resoneer as twee singulette by δ 39.92 en δ 39.97. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van 220 was essensieel onafhanklik van temperatuur sodat afgelei kon word dat konformasionele ewewigte nie vir die duplikasie van seine verantwoordelik is nie. Die diastereomeriese of enantiomeriese samestelling van die verskillende tiasoolaminosuurderivate is ook met behulp van HDVC op 'n Pirkle-tipe CSF ondersoek. Onder die kondisies bespreek in Afdeling 2.7.2.a is volledige diastereomeriese resolusie van 222 (Figuur A) en enantiomeriese resolusie van 225 (Figuur B) bewerkstellig, waaruit dit duidelik is dat in beide gevalle rasemisasie feitlik volledig plaasgevind het. Die HDVC-eSF resolusie van die ander tiasoolaminosuurderivate (218



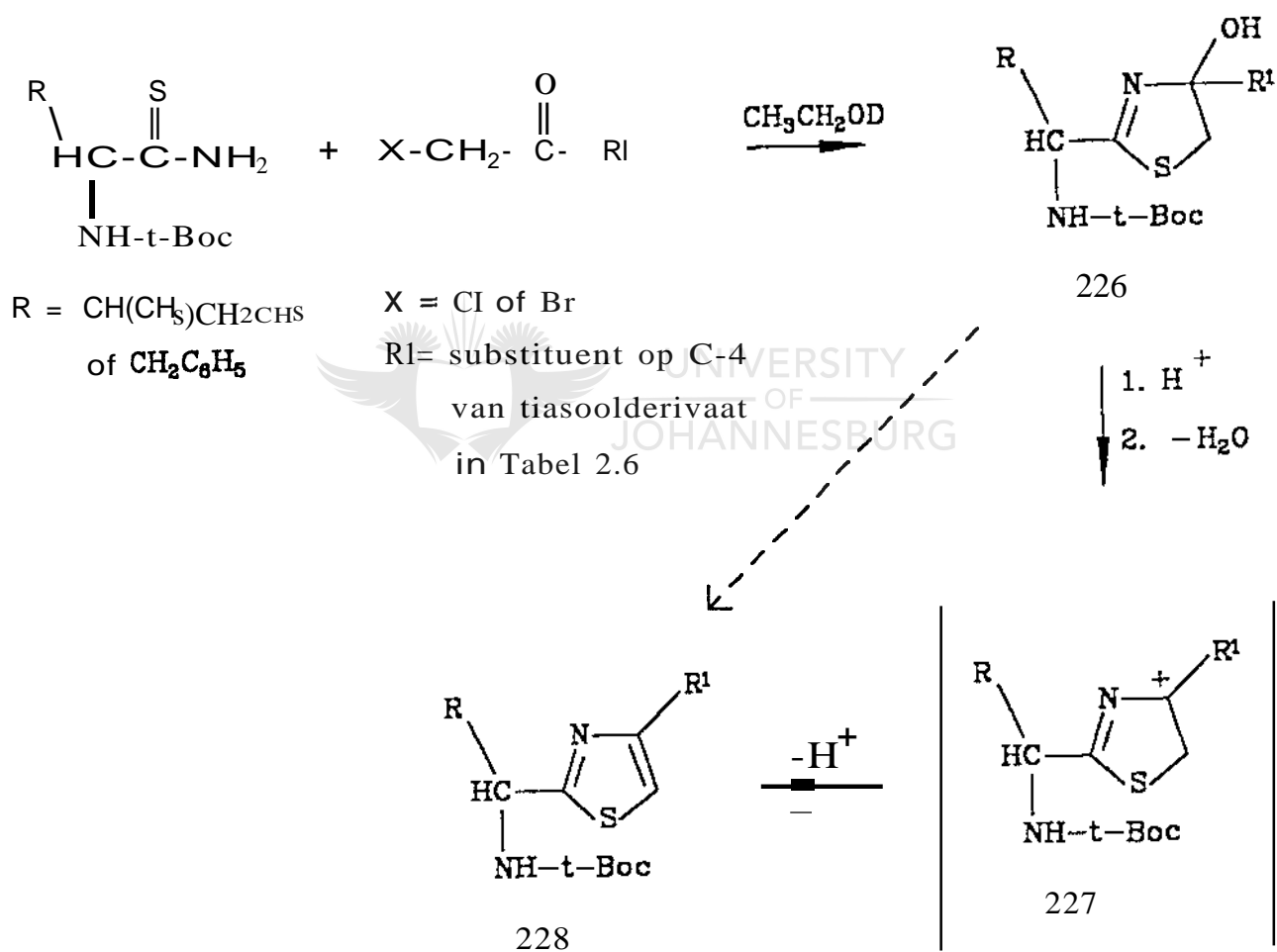
Figuur A



Figuur B

- 221, 223 en 224) was egter nie suksesvol nie. In die geval van die broomtiasool (220) is 'n beperkte mate van resolusie wel verkry, maar piekoorvleueling het akkurate produksamestelling onmoontlik gemaak.

Die afhanklikheid van rasemisasie van die aard van die C-4 substituent op die tiasool kan geïnterpreteer word indien dit aangeneem word dat dehidrasie (waterverlies) van die hidroksitiasolientussenproduk (226, Skema 2.96) nie 'n konserte proses is nie, maar wel 'n 2-stap proses *via* 'n karbokatioon (227) wat ontstaan na protonering van die hidroksielgroep. In konserte E-2 eliminasië is in elk geval minder waarskynlik omdat dit 'n



Skema 2.96

ongunstige versteekte konformasie van die 5-lidring son vereis. 'n Elektrontrekkende substituent op C-4 van die ring sal die karbokatioontussenproduk (227) destabiliseer

met gevolglike verlaging in die tempo waarteen dit gevorm word. Onder hierdie omstandighede word die leeftyd van die hidrokstiasolientussenproduk (226) dus verleng sodat dit in ewewig kan tree met die ooreenkomstige enamien (kyk Skerna 2.92). Dit verklaar die byna volledige rasemisasie wat in die geval van die elektrontrekkende estersubstituente (222 en 225), die beperkte rasemisasie in die geval van die alkielhaliedsubstituente (220, 221, 223 en 224) en die afwesigheid van rasemisasie in die geval van die karbokatioonstabiliserende alkiel- en fenielsubstituente (218 en 219) verkry word. Die voorgestelde verklaring vir die verband tussen die mate van rasemisasie en die aard van die substituent op C-4 werp ook lig op die verskille in die reaksietye wat nodig was om volledige tiasoolvorming te verseker. In die geval van die karbokatioonstabiliserende substituent, naamlik metiel-(218) en faniel-(219), is die kondensasiereaksies na relatief kort reaksietye (7-8 uur, kamertemperatuur) voltooi, maar in die geval van die elektrontrekkende etoksikarbonielsubstituent (222) was 'n langer reaksietyd (> 24 uur, kamertemperatuur) nodig. Die aard van die alkielsubstituent op C-1' van die aminosure (R, Skema 2.96) het egter min of geen invloed op die mate van rasemisasie tydens die Hantzsch-reaksie uitgeoefen.

Die kondensasiereaksies van 'n chirale tioamied (202a) met etiel broompiruvaat by kamertemperatuur is in verskeie oplosmiddels, naamlik dimetyletoksietaan, etanol, chloroform, benseen en koolstoftetrachloried uitgevoer. Die verloop van die reaksies is met behulp van dunlaagchromatografie gevolg. Dit het bewys dat die vorming van etiel 2-(N-t-Boc-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool-4-karboksielstuur (225) die vinnigste in dimetyletoksietaan (2 uur) plaasvind, gevolg deur chloroform (7 uur), etanol (20 uur), benseen (24 uur) en koolstoftetrachloried (24 uur). Dit is duidelik dat daar ander eienskappe van die oplosmiddel as dielektriese konstante hier op die spel is, byvoorbeeld solveringsvermoë ten opsigte van protone. Die tiasole en hidrokstiasolientussenprodukte is op dunlaagplate sigbaar as wit kolle op 'n donker agtergrond deur behandeling van die plate met chroomsuur en palladiumchloried gevolg deur verhitting. Die tussenproduk verskyn net bo die tioamied, wat as 'n donker kol sigbaar is. Die tiasool (225) is

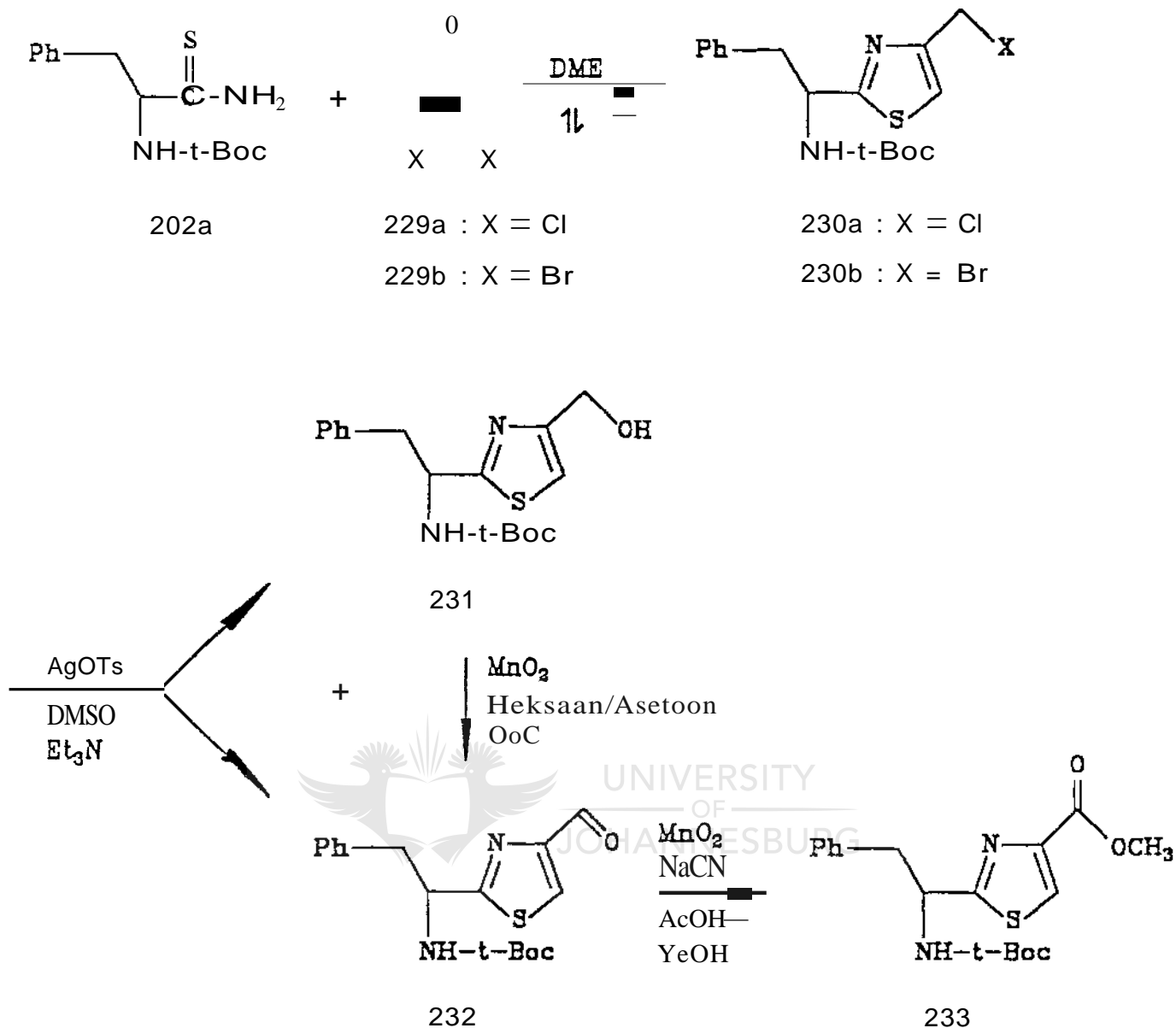
egter heelwat minder poler. Vir die bepaling van die enantiomeriese samestelling van die reaksieprodukte (225) is 'n oplossing van die reaksiemengsel in etiel asetaat deur 'n 'Sep-pak' silikakolom (Waters-Associate, VSA, Part nr. .51900) gefiltreer en die filtraat verdun met 'n oplossing van 10% *isopropanol* in heksaan, waarna HDVC resolusie op 'n Pirkle--tipe CSF uitgevoer is. Dit het aangetoon dat al die produkte (225) as 'n 1:1 R/8-enantiomeriese mengsel voorkom. Die aard van die oplosmiddels oefen dus wel 'n beduidende invloed op die tempo van die Hantzsch-reaksie uit, maar bepaal nie die enantiomeriese samestelling van die tiasoolproduk nie.

Aangesien chirale tiasoolaminosuurderivate met In karhoksielsuurfunksionaliteit op C-4 in hierdie ondersoek vereis is vir gebruik in die sintese van dolastatien 3, is besluit om die gedeeltelik gerasemiseerde broomalkieltiasoolderivaat (223) te gebruik in die sintese van die ooreenkomstige gedeeltelik gerasemiseerde tiasool-4-karboksielsuurderivaat, wat dan as die ooreenkomstige brusiensout geskei sou kon word.

2.8 DIE SINTESE VAN Metiel-N-t-Boc-RI5-Feniellalanientiasool-4-Karboksielsuur (233)

2.8.1 Via C-4 Alkielhalogeengesubstitueerde Tiasoolderivate

Die reaksie van N-t-Boc-5-2-amino-3-fenielpiontioamied (202a, Skema 2.97) met 1,3-dichloor-2-propanoon (229a) in DME onder terugvloei vir 3 uur het 4-metielchloortiasool (230a) in 'n opbrengs van 52% gelever. Die meer reaktiewe 1,3-dibroom-2-propanoon^{218,219} (229b) het na slegs 15 minute by 90°C volledige kondensasie met die tioamied (202a) ondergaan. In die 1H-k.m.r.-spektra van 230a en 230b resoneer H-5 in beide produkte as In singulet by δ 7.13 en die chirale waterstof, d.w.s, H-1', as multiplette by δ 5.15 en δ 5.25 onderskeidelik. Die m.s.e-spektrum van 230a het die teenwoordigheid van die chloorsubstituent bevestig en twee M+-pieke by m/z 354 en m/z 352 in In 1:3 verhouding respektiewelik vertoon. Die m.s.-spektrum van 230b het ook twee M+-pieke vertoon en wel by m/z 398 en m/z 396 in In ongeveer 1:1 verhouding. Die S-gekonfigureerde 4-broommetieltiasool (230b) is in 'n e.o. van

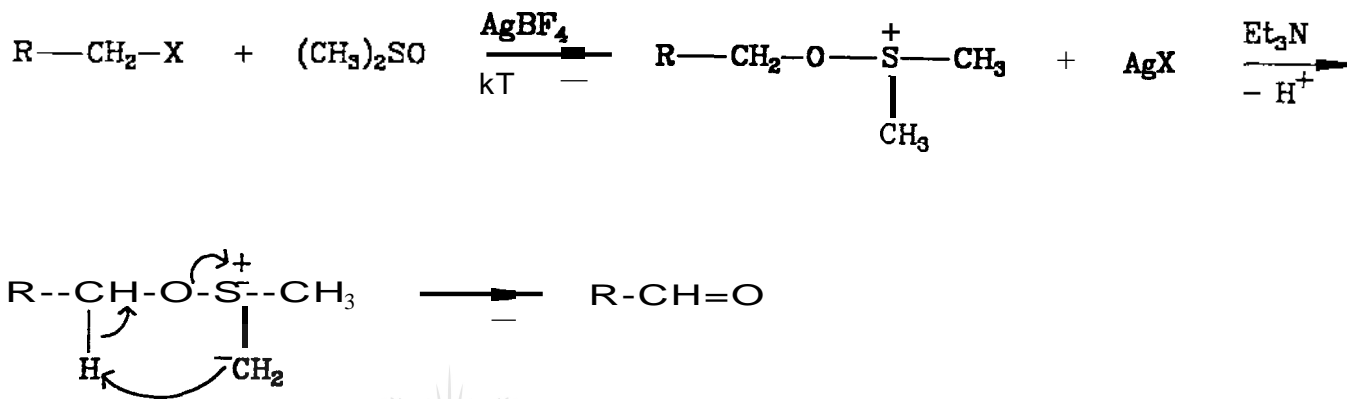


Skema 2.9i

75% verkry (kyk Tabel 2.6, [223](#)). Pogings is dus aangewend om die broommetielgroep na 'n karboksielsuurgroep om te sit.

Kornblum²²⁰ en ander navorsers het aangetoon dat die direkte verplasing van primers jodiede en tosiate²²¹ met dimetieIsulfoksied (DMSO) by 150°C plaasvind. Die resulterende oksisulfoniumsoute is volledig gekarakteriseer²²² en kan termiese of basisgekataliseerde fragmentasie²²³ ondergaan om aldehydie in redelik hoë opbrengste te lewer.

Selfs by hoë temperature is alkielbromiede egter inert teenoor DMSO en gevolglik kon die oksisulfoniumsoute van dié verbindings slegs berei word deur eers die halogeenderivate na die ooreenkomstige tosilate om te sit.²²⁰ Ganem *et al.*²²⁴ het die probleem oorkom deur die DMSO-oksidasie van alkielbromiede en -chloriede in die teenwoordigheid van 'n oplosbare en nie-nukleofiliese silwersout, nl. silwertetrafluoroboraat (AgBF_4) wat bevorderlik is vir die verplasing van die halogeensubstituent, uit te voer (Skema 2.98).



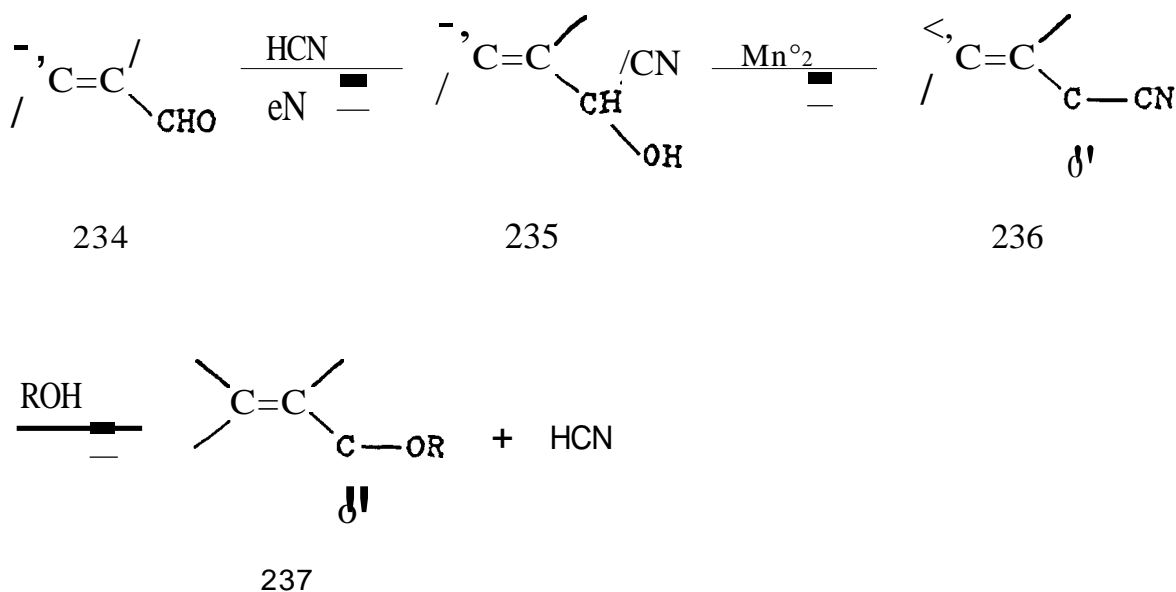
Skema 2.98 : Meganisme vir die oksidasie van alkielhaliede met DMSO in die teenwoordigheid van AgBF_4 en Et_3N .

Die 4-broommetieltiasool (230b) is derhalwe agtereenvolgens met AgBF_4 en trietielamien in anhidriese DMSO behandel. Die hoofproduk van die reaksie is deur ehromatografie gesuiwer en as die alkohol (231) gekarakteriseer. Die gesogte formielerivaat (232) is slegs as 'n neweproduk verkry. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van 231 resoneer die alkoholproton as 'n bree singulet by δ 2.30 en ondergaan volledige uitruiling met D_2O . Die karakteristieke bree $-\text{OH}$ absorpsieband by 3400 cm^{-1} is ook in die I.r.-spektrum van 231 waarneembaar. In die ^1H -k.m.r.-spektrum van die formielerivaat (232) resoneer die formielproton as 'n singulet by δ 10.05. Die vorming van die alkohol (231) was onverwags en is tentatief toegeskryf aan hidrolise as gevolg van die teenwoordigheid van spore water in die DMSO. Die DMSO is vervolgens twee keer *in vacuo* vanaf kalsiumhidried (CaH_2) gedistilleer en gebruik vir die oksidasie van 230b onder streng

anhidriese kondisies in die teenwoordigheid van verskeie silwer(I)soute. Die beste resultate is met AgOTs (silwertosilaat) verkry. Onder optimale kondisies is die formienderivaat (232) in 'n opbrengs van 57% verkry. Die oksidasie van die 4-ehloormetieltiasool (230a) onder dieselfde kondisies het die formienderivaat (232) in 'n opbrengs van 46% gegee. Die oksidasieproses is duidelik uiters gevoelig vir water en selfs onder die streng anhidriese kondisies het daar aansienlike hoeveelhede van die alkohol (231) gevorm.

Die tradisionele metode vir die oksidasie van 'n aldehyd na 'n karboksiesuur behels behandeling met varsbereide silweroksied (Ag_2O)^{225,228}. Die formienderivaat (232) was egter onreaktief ten opsigte van hierdie reagens onder 'n verskeidenheid van kondisies. Die direkte oksidasie van die alkohol (231) na die ooreenkomstige karboksiesuur (233) is vervolgens ondersoek.

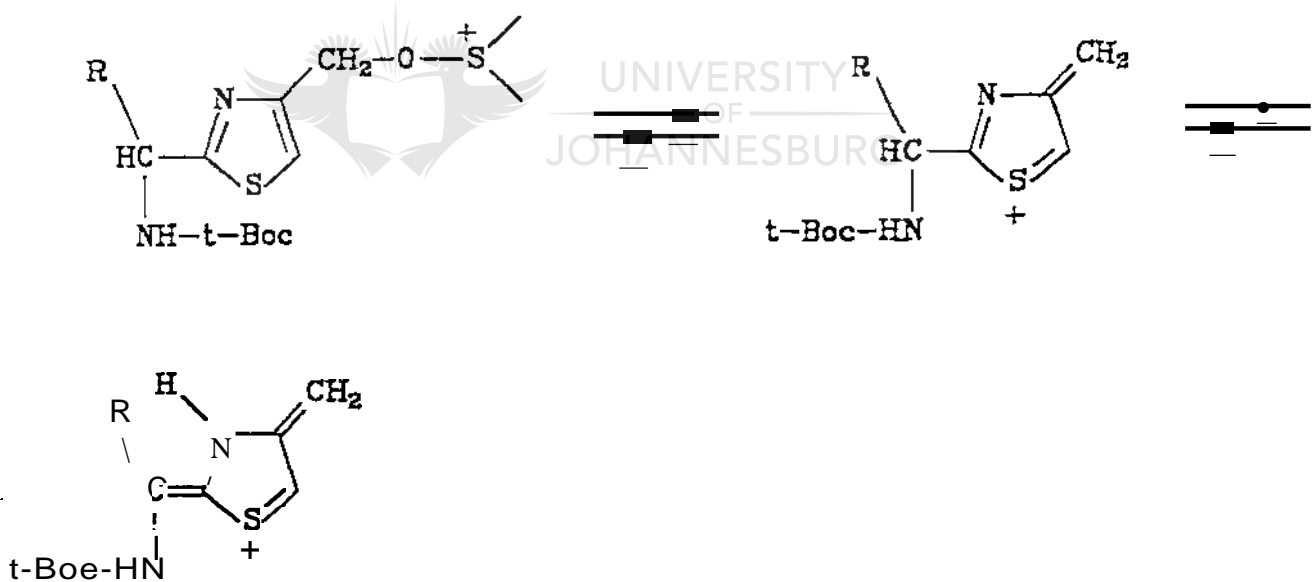
Die alkohol (231) is volgens die metode van Corey *et al.*²²⁶ met aktiewe mangaandioksied (MnO_2)²²⁷ na die 4-formienderivaat (232) geoksideer. Verdere oorksidisasie na die ooreenkomstige karboksiesuur het egter nie plaasgevind nie. Corey *et al.*²²⁶ noem ook dat die behandeling van 'n gekonjugeerde aldehyd (234, Skema 2.99) met HCN en CN-



Skema2.99

die ooreenkomstige sianohidrien (23.5) lewer, wat deur oksidasie met aktiewe MnO_2 die asielsianied (236) gee, en wat in 'n alkoholiese medium na 'n ester (237) omgesit word. Die reaksie verloop in hoë opbrengs sonder enige *cis-trans* isomerisasie van die α,β -olefiniese verbindings. Die metode van Corey *et al.*²²⁶ is suksesvol toegepas in die bereiding van metiel 2--(*N-t-Boc*-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool-4-karboksielsuur (233) in hoë opbrengs vanaf die 4-formielderivaat (232). Die produk (233) was egter feitlik volledig rasemies, soos bewys is deur HDVC op 'n Pirkle-tipe CSF-kolom. 'n Rasemiese produk is dus verkry alhoewel met 'n chirale uitgangstof (230b) begin is.

'n Meer volledige ondersoek het aan die Jig gebring dat rasemisasie tydens die DMSO-oksidasie van die uitgangstof (230b) plaasgevind het, en wel met die vorming van die hoë-energiesulfoksoniumtussenproduk (met verhoogde suureienskappe van die chirale sentrum, Skema 2.100):



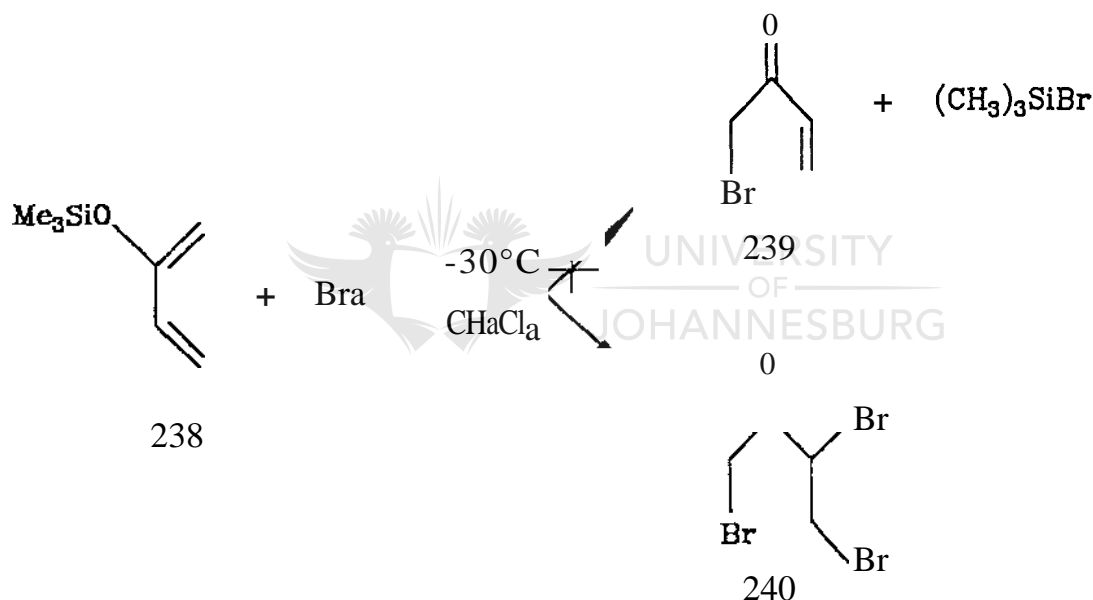
Skema 2.100

In 'n alternatiewe poging om die probleem van rasemisasie te oorkom is die moontlike sintese van 4-eteniel-2-(*N-t-Boc*-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool (241, Skema 2.102) ondersoek. Dit is aanvaar dat die karbokationstabiliserende olefiniese substituent op

die C-4 posisie van die tiasool rasemisasie tydens die Hantzsch-reaksie tot 'n minimum behoort te beperk.

2.8.2 'n Benadering tot die Sintese van 4-Eteniel-2-(N-t-Boc-1'-Amino-2'-Fenieletiel)tiasool (241)

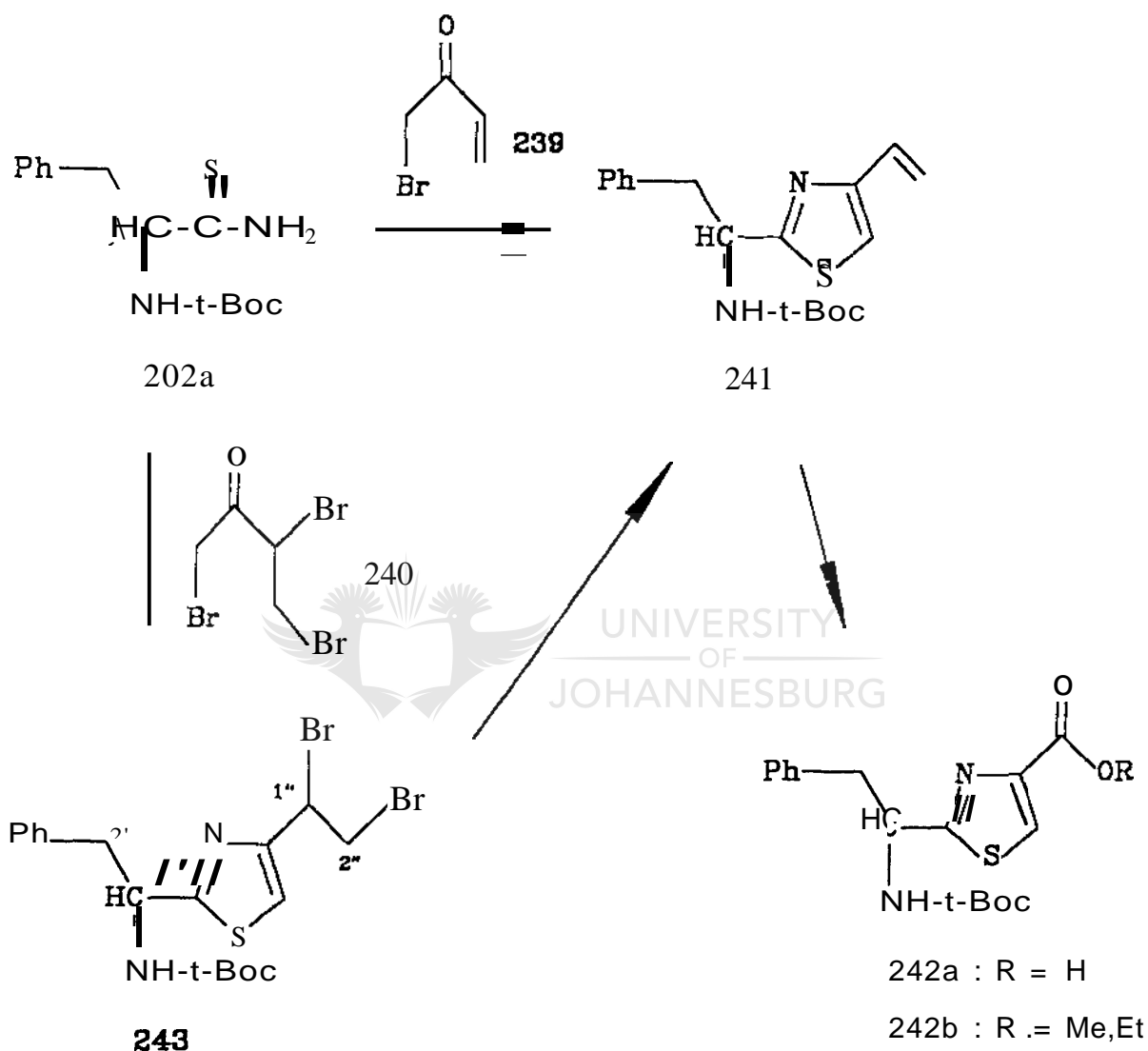
Die 4-broom-but-2-een-3-oon (239, Skema 2.101) wat as reagens benodig sou word vir die sintese van die 4-etenieltiasoolderivaat (241, Skema 2.102) was egter nie in die literatuur beskryf nie. In 'n poging om die broomketoon (239) te berei is 2-trimetielsilieloksibutadien (238) met broom by -30°C behandel. Die tribroomketoon (240) is egter die enigste produk wat verkry is. In die 80 MHz ^1H -k.m.r.-spektrum van



Skema 2.101

240 resoneer die twee magneties nie-ekwivalente geminale protone op C-1, nl. H-1a en H-1b, beide as doeblette ($J_{1a,1b} = 12.0$ Hz) by δ 4.34 en δ 4.08 onderskeidelik. H-3 vorm die X-gedeelte van 'n ABX-sisteem en resoneer as 'n doeblet van doeblette by δ 4.99 ($J_{3,4a} = 10.3$ en $J_{3,4b} = 4.4$ Hz). Die AB-gedeelte van die ABX-sisteem word gevorm deur H-4a en H-4b wat beide as doeblette van doeblette by δ 3.96 ($J_{4a,4b} = 10.0$ en $J_{3,4a} = 10.3$ Hz) en δ 3.67 ($J_{4a,4b} = 10.0$ en $J_{3,4b} = 4.4$ Hz) onderskeidelik resoneer.

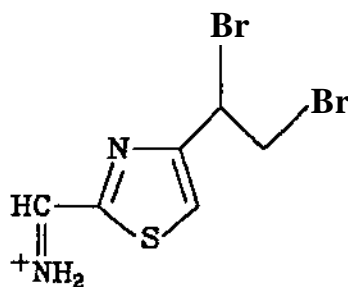
Die reaksie van die tioamied (202a) met die tribroomketoon (240) het regioselektief verloop om hoofsaaklik 243 as 'n mengsel van diastereomere (a.g.v. die teenwoordigheid van twee chirale sentra) te lewer. In die 1H-k.m.r.-spektrum van 243 het die verbreding van die H-2''a en H-2''b sowel as die bensiliese metileenprotone se resonansies op



Skema 2.102

die bestaan van 'n diastereomeriese mengsel gedui. H-1'', wat die X-gedeelte van 'n ABX-sisteem vorm, resoneer as twee doeblette van doeblette ($J_{1'',2''a} = 10.0$ en $J_{1'',2''b} = 5.0$ Hz) by δ 5.61 en δ 5.63 in 'n 1:1 verhouding (Elke resonansie ooreenkomstig 'n spesifieke diastereomeer). H-2''a en H-2''b, wat tesame die AB-gedeelte van die ABX-sisteem vorm, resoneer elk ook as twee doeblette van doeblette by δ 4.28 en δ 4.33

($J_{2''a,2''b} = J_{1''a,2''a} = 10.0$ Hz) en δ 4.17 en δ 4.19 ($J_{2''a,2''b} = 10.0$ en $J_{1''a,2''b} = 5.0$ Hz) onderskeidelik. In die m.s.-spektrum van 243 het die molekulere ioon (M^+ , m/z 330) oenskynlik met die van die 4-etenieltiasoolderivaat (241) ooreengekom. Dit is egter bekend dat die m.s.-spektra van dibroomverbindings dikwels prominente fragmente ooreenkomstig die verlies van een of twee broomatome toon. Die teenwoordigheid van die twee broomatome in 243 is egter aangetoon deur 'n prominente fragmentioon ooreenkomstig die samestelling van 244. Hierdie fragment het pieke by m/z 297, 299 en 301 in 'n 1:2:1 verhouding respektiewelik, vertoon.



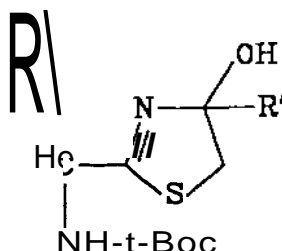
244

Die moontlikheid om die diastereomeriese mengsels van 243 na die 4-etenieltiasoolderivaat (241) om te sit deur middel van die reduktiewe eliminasië van broom (bv. deur behandeling met natriumjodied of sink), en daaropvolgende oksidatiewe splyting van die 4-etenieldubbelbinding om die ooreenkomstige karboksielsuur (242a) te verkry, is egter nie verder ondersoek nie. Die besluit het gevolg op die bevinding dat deuteriuminkorporasie (en dus rasemisasie) in die chirale C-1' sentrum plaasvind indien die ter sake Hantzsch-reaksie in deuterometanol uitgevoer word.

Die finale en suksesvolle benadering tot die sintese van chirale tiasoolaminosure het herus op gegewens oor die meganisme van die Hantzsch-reaksie wat in Afdeling 2.7.3.b hoespreek is.

2.9 DIE SINTESE VAN OPTIES SUIWER TIASOOLAMINOSUURDERIVATE M.B.V. 'N GEMODIFISEERDE HANTZSCH-REAKSTE

Die resultate wat in Afdeling 2.7.3.b bespreek is, het onteenseglik bewys dat die reaksie van chirale tioamide met etiel broompirivaat onder essensieel neutrale kondisies, sander enige rasemisasie verloop am chirale hidroksitiasoliene (245) te lewer.



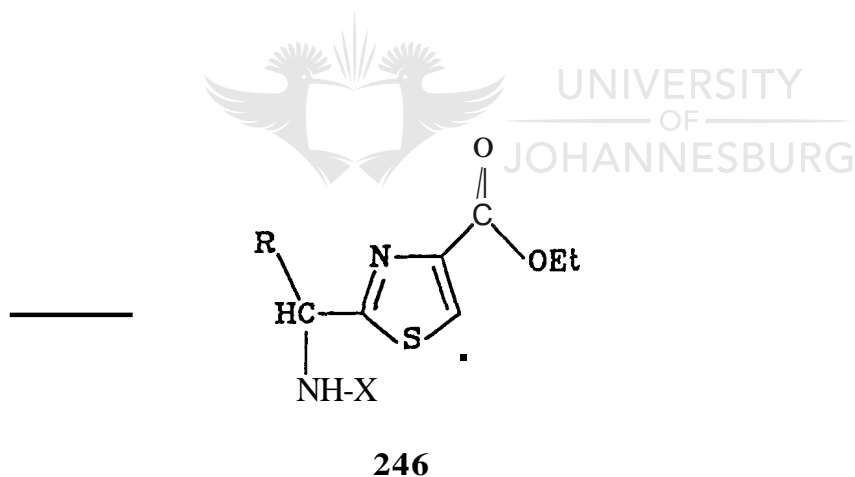
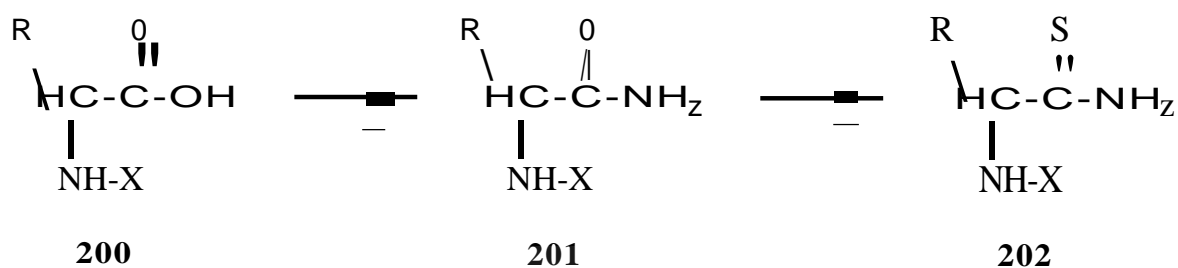
245

Suurgekataliseerde dehidrering van hierdie verbindings het ook rasemisasie tot gevolg. Dit was dus duidelik dat dehidrering onder neutrale of basiese reaksiekondisies uitgevoer sal moet word indien chirale tiasoolaminosuurderivate verlang word. Dit het gelei tot die gedagte om die hidroksielgroep sodanig te derivatiseer dat 'n goeie verlatende groep geskep word. Die asetaatgroep is 'n beter verlatende groep as die hidroksiedioon, maar die O-asetienderivaat van 245 is stabiel genoeg om selfs chromatografie oor silika te oorleef. O-trimetielsililering in teenwoordigheid van basisse soos piridien was ook nie bevorderlik vir eliminering nie. Beter verlatende groepe is derhalwe oorweeg. Aanvanklik is aktivering van die hidroksielgroep met trifluormetaansulfoonsuur-anhidried ondersoek. Behandeling van die hidroksitiasolien (245) met hierdie reagens in die teenwoordigheid van piridien by lae temperatuur het egter nie alleen eliminering tot gevolg gehad nie, maar ook sulfonylering van die reaktiewe tiasoolswaelatoom.

Die feitlik onmiddellike en kwantitatiewe omsetting van verbindings van tipe 245 na tiasoolaminosuurderivate is bewerkstellig deur die behandeling met trifluorasynsuur-anhidried in teenwoordigheid van piridien by lae temperatuur. Die tiasoolaminosuurderivate wat sò verkry is, was opties suiwer soos bewys met behulp van die tegnieke wat voorheen bespreek is. Verdere bevestiging dat rasemisasie van die kritiese chirale sen-

trum nie onder hierdie omstandighede plaasvind nie, is verkry deur die sintese van etiel 1'5,2'8-2-{N-t-Boc-1'-amino-2'-metielbutiel)tiasool-4-karboksielsuur (246b, Skema 2.103) langs hierdie weg. Die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van hierdie verbinding, wat twee chirale sentra bevat, het geen aanduiding van kontaminasie deur 'n diastereoiso- meer gegee nie.

Die bereiding van 'n reeks chirale etiel 1'8-2-(N-beskermd-1'-aminoalkiel)tiasool-4-karboksielsure (246a-f, Skema 2.103) is uiteindelik met ewe groot sukses in 'n eenpot-



- a : R = $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$; X = t-Boc
 b : R = $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; X = t-Boc
 c : R = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; X = t-Boc
 d : R = $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; X = Cbz
 e : R = CH_3 ; X = t-Boc
 f : R = $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$; X = t-Boc

metode, dus sonder isolasie van die hidroksitiasolientussenproduk (245), bewerkstellig. Volgens hierdie metode word die tioamied in DME en in die teenwoordigheid van fynge-
maalde kaliumwaterstofkarbonaat vir 5 minute by kamertemperatuur geroer en daarna
met 3 molekwivalente etiel broompiruvaat laat reageer. Die reaksiemengsel is onrniddel-
lik afgekoel na 0°C en 'n oormaat trifluoorasynsuuranhidried in piridien is bygevoeg.
Die opties suiwer chirale tiasoolaminosuurderivate (246a-f) is dan in hoë opbrengs
geisoleer. Die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie is suksesvol in die bereiding van opties
suiwer N-t-butoksikarboniel- en N-bensieloksikarboniel-tiasoolarninosuurderivate
toegepas. Die rasemiese analoe van die tiasoolaminosuurderivate (246a-f) is volgens
standaard Hantzsch-reaksies berei om as standarde te kon dien met bepaling van die
optiese suiwerheid van die chirale tiasole m.b.v. HDVC op die Pirkle-tipe CSF-kolom.

Die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie het dit dus nou moontlik gemaak om opties suiwer
chirale tiasoolaminosuurderivate op 'n kort roete en in hoë opbrengs vanaf chirale
aminosure te berei. Aangesien die chiraliteit van die (Gln)Thz-komponent van dola-
statien 3 onbekend was, was dit dus nodig om beide die *R*- en *S*-enantiomere (*R*-260 en
S-260), deur onder meer gebruik te maak van die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie, te
sintetiseer.

2.10 DIE CHIRALE SINTESE VAN *N*-t-Boc-*R*-(Gln)Thz (*R*-260) en *N*-t- Boc-*S*-(Gln)Thz (*S*-260)

Die sintese van *N*-t-Boc-*R*/*S*-{Gln}Thz-oEt wat in Afdeling 2.5 (Skemas
2.40 en 2.42) bespreek is, is besonder omslagtig. Die keuse van uitgangsmateriaal vir die
sintese van die *R*- en *S*-enantiomere van N-t-Boc-(Gln)Thz (*R*-260 en *S*-260, Skema
2.106) het egter nou op die *R*- en *S*-enantiomere van γ -bensielglutamaat (*R*-250 en
S-250, Skema 2.105) onderskeidelik geval, vanwee die moontlikheid wat dit ingehou het
om 'n verkorte roete na die teikenmolekules (*R*-260 en *S*-260) te ontwikkel. In teen-
stelling met γ -bensiel-*S*-glutamaat (*S*-250), was die *R*-enantiomeer (*R*-250) nie
kommersieel beskikbaar nie.

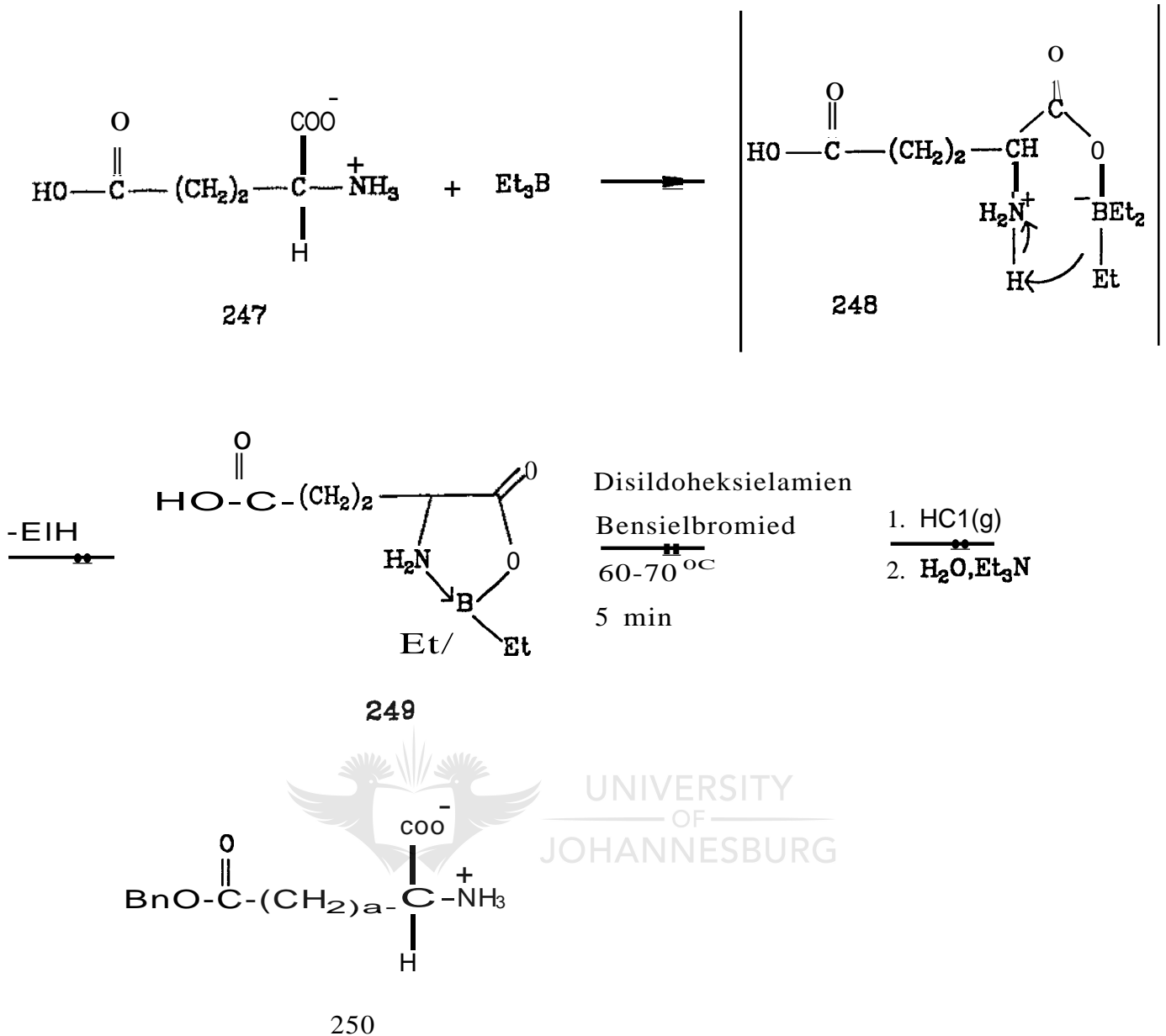
Verskeie metodes vir die bereiding van γ -esters van glutamiensuur sowel as die analoe β -esters van aspartaamsuur is bekend, waaronder:

- (i) suurgekataliseerde esterifikasie²²⁹,
- (ii) alkoholise van N-beskermdes sikliese anhidriede²³⁰,
- (iii) bereiding *via* α -NH₂ en α -COOH beskermdes dcrivate²³¹,
- (iv) koper(II)gekataliseerde hidrolise van α , γ -diësters²³² en
- (v) alkilering van die alkalimetaalsoute van die onderskeie aminosuurkoper(II)-komplekse (251a en 251b, Skema 2.105)²³³.

Bogenoemde metodes lei aan een of meer gebreke, waaronder onekonomiese multistap proseduros (metodes ii en iii), onvoldoende posisie-spesifisiteit (metodes i en ii) of die gewenste produk word in lae opbrengs verkry (metode v).

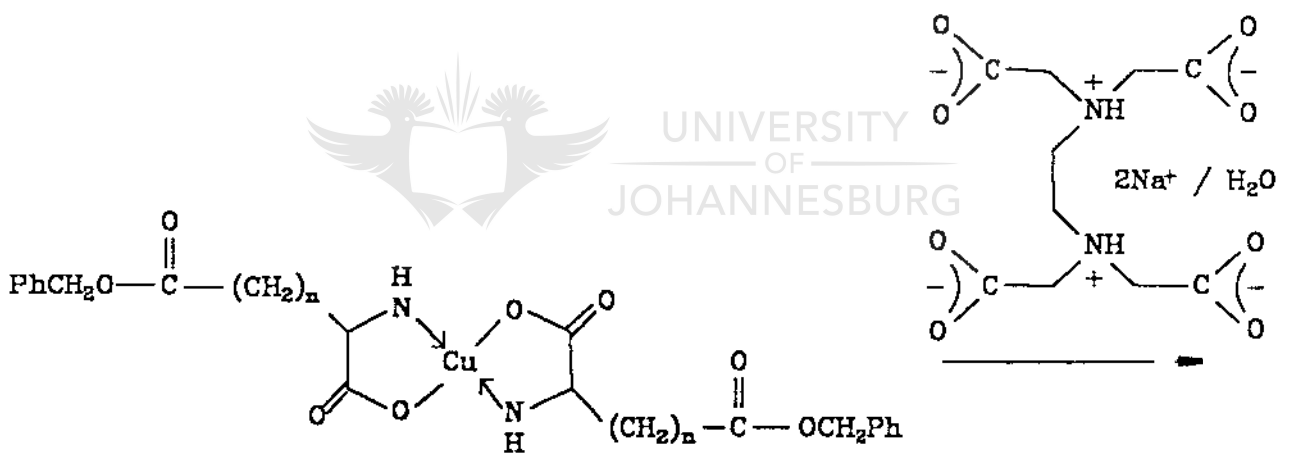
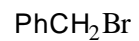
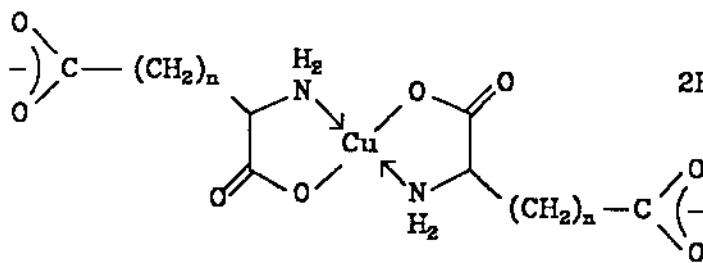
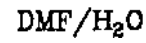
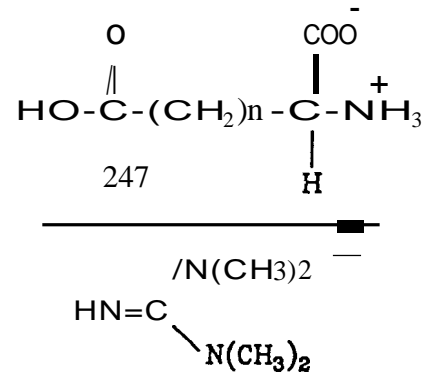
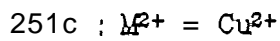
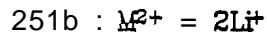
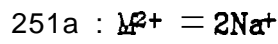
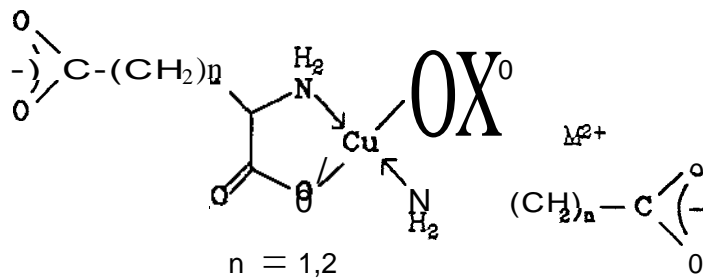
Zwanenburg *et al.*²³⁴ het 'n baie effektiewe en elegante metode ontwikkel vir die selektiewe γ -bensilering van glutamiensuur (Skema 2.101). Die reaksie van glutamiensuur (247) met trietielboraan (Et₃B) in THF lei *via* 248 tot die eksklusiewe vorming van die 5-lid booroksasolidoon (249) wat regioselektief met bensielbromied reageer om die γ -ester (250) te lewer. Die gebruik van Et₃B, wat onder sekere kondisies plofbaar is, maak die toepassing van hierdie metode egter minder aantreklik.

Die metode van Van Heeswijk *et al.*²³⁵ (Skema 2.105) is dcrhalwe toegepas in die bereiding van γ -bensiel-*R*-glutamaat (R-250). Hierdie metode is ontwikkel toe besef is dat die lae opbrengste verkry met die alkilering van die alkalimetaalsoute van 251a en 251b (metode v) hoofsaaklik te wyte is aan kompeterende hidrolise van die alkielhaliedreagense in die oplosmiddel (DMF:water, 1:1 in volume, 100:430 molare verhouding), waar water nodig is om die koperkompleks (251a of 251b) in oplossing te hou. Van Heeswijk *et al.*²³⁵ het die kopermetode (metode v) geoptimiseer deur die water in die gemengde oplosmiddel tot ongeveer 10% van die volume (100:47 molare verhouding) te beperk deur gebruikmaking van die N,N,N'.Nt--tetrametlelguanldiniumsoute van die koper-

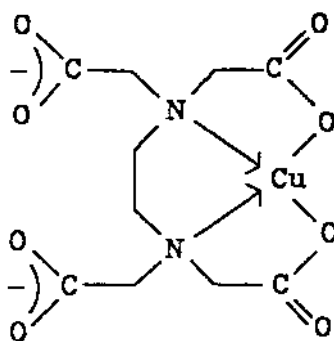


Skema 2.104

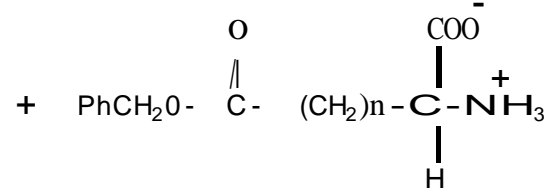
kompleks (252). Die soute (252) word in hoë opbrengs vanaf die geredelik toeganklike koper(II)sout van die aminosuurb koper(II)kompleks (251c) berei. In hierdie ondersoek is egter gevind dat die kopersout (*R*-251c) in hoer opbrengs (94.5%) as volgens die literatuurmetode (85%)²³⁵ gevorm kan word indien die watcrige oplossing van koper(II)-asetaat en *R*-glutamiensuur (*R*-247) vir 3 dae in plaas van die voorgeskrewe 2 dae by kamertemperatuur geroer word. Behandeling van *R*-251c met N,N,N',N'-tetrametielguanidien lewer die sout (*R*-252) wat *in situ* met bensielbromied gealkileer word.



253



+ 250

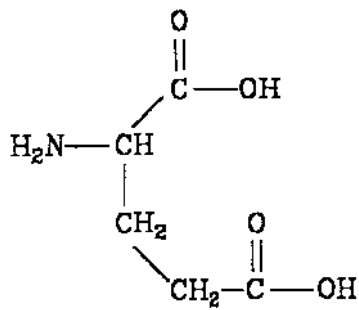


250

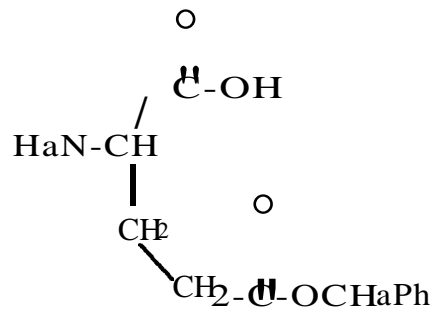
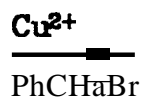
Skema 2.105

Presipitering van die koperkompleks (R-253), gevolg deur behandeling met 'n oormaat van die dinatriumsout van etileendiamientetra-asynsuur (EDTA) in koue water, het die vry γ -bensiel-*R*-glutamaat (R-250) gelever. Die produk (R-250) is as essensieel een verbinding bewys deur dunlaagchromatografie ($R_f = 0.56$, butanol:ysasynsuur:water 18:2:5) en die smeltpunt kom ooreen met die gerapporteerde waarde van 174°C .²³⁶ Die ooreenkomstige 5-enantiomeer (8-250) is op soortgelyke wyse berel. Met beide R-250 en 8-250 nou in groot hoeveelhede geredelik beskikbaar, is die sintese van R-260 en 8-260 (Skema 2.106) suksesvol afgehandel.

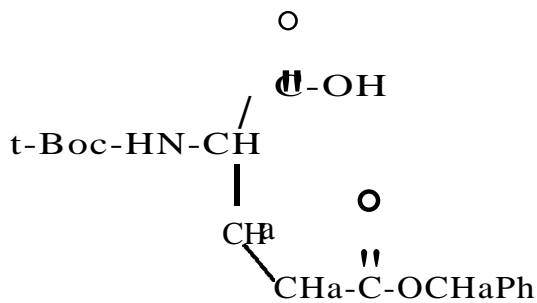
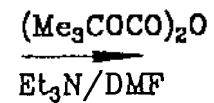
Omsetting van die amien (250) na γ -bensiel-*N-t*-Boc-glutamaatsuur (254) met di-*t*-butioldikarbonaat ((Me₃COCO)₂O) in teenwoordigheid van waterige natriumhidroksied het onverwags slegs γ -debensilering van 250 tot gevolg gehad. Die ongewenste hidrolise is vermy deur die *t*-butoksikarbonileringsreaksie onder aprotiese kondisies in die teenwoordigheid van trietielamien uit te voer. Hierdie reaksiekondisies, wat deur Ponnusamy *et al.*¹⁰³ ontwikkel is, is reeds in Afdeling 2.4 bespreek. Die suiwerheid van die produk (254) is met dunlaagchromatografie vasgestel. In die ¹H-k.m.r.--spektrum van 254 resoneer die protone van die *t*-Boc-groep as 'n singulet by δ 1.42. Die magneties ekwivalente metileenprotone van die bensielgroep resoneer as 'n singulet by δ 5.10 en die aromatiese protone as 'n multiplet by δ 7.35. 'n Bree resonansie by δ 8.55, wat verval het met byvoeging van D₂O, kon aan die suurproton toegeken word. *N-t*-Boc-2-amin-4-bensieloksikarboniel-butiramied (255) en *N-t*-Boc-2-amin-4-bensieloksikarboniel-butirotioamied (256) is met behulp van die gebruikelike metodes (kyk Afdeling 2.7.3.a) bereel. Tot dusver is nog geen kommentaar oor die spesifieke optiese rotasies van die produkte (250, 254-256) gelever nie. Beide enantiomere van elk van die verbindings besit almal opmerklik lae spesifieke optiese rotasies vir opties suiwer chirale verbindings. Die waardes is in teenstelling met die hoë spesifieke optiese rotasies van die *N-t*-Boc-amied- en *N-t*-Boc-tioamiedaminosuurderivate in Skema 2.103. Aangesien vroeer reeds bewys is dat die *t*-butoksikarbonileringsreaksie amied- sowel as tioamiedvorming sonder enige rasemisasie laat plaasvind, is geen addisionele werk ge-



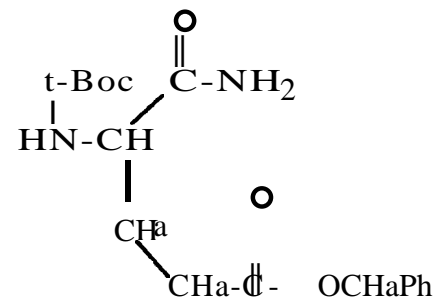
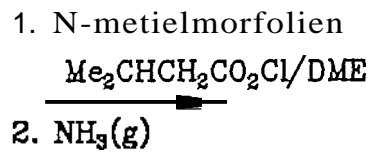
247



250



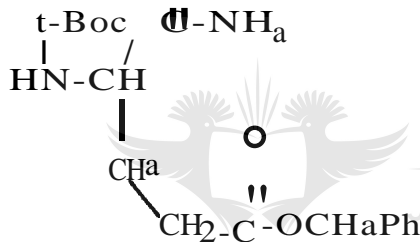
254



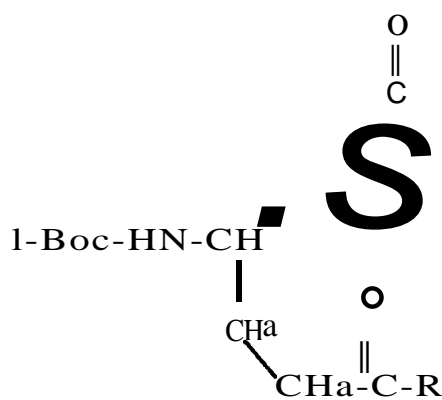
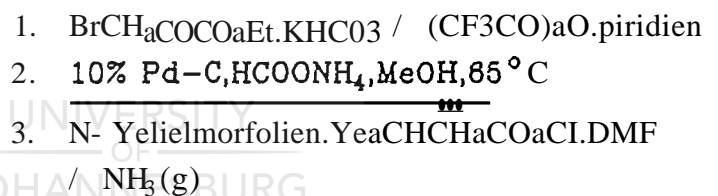
255

S

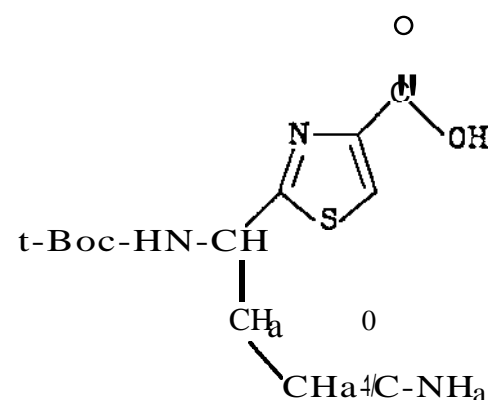
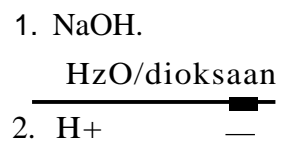
Lawesson se reagens



256

257 : R = OCH₂Ph

258 : R = OH

259 : R = NH₂

260

doen om die optiese suiwerhede van die verbindings (250, 254-256) met ander metodes te bevestig nie. Kelly *et al.*¹⁸⁸ het ook 'n soortgelyke waarneming gemaak in die sintese van analoe glutamiensuurderivate. Die optiese suiwerhede van die verbindings (250, 254-256) is wel in hierdie ondersoek bevestig op grond van die optiese suiwerhede van die tiasoolaminosuurderivate (R-257 en 8-257) wat groot spesifieke optiese rotasies besit.

Die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie het opties suiwer etiel R-2-(N-t-Boc-1'-amino-3'-bensieloksikarboniel-propiel)tiasool-4-karboksielsuur (R-257), sowel as die enantiomeriese 8-257, in hoë opbrengs vanaf die ooreenkomstige tiaoamide (R-256 en 8-256 onderskeidelik) gelewer. Dit is bevind dat beter resultate verkry word indien die tiaoamid (256) eers vir 5 minute by kamertemperatuur in die teenwoordigheid van 'n oormaat HCO_3^- geroer word voordat etiel broompiruvaat bygevoeg word. In die ^1H -k.m.r.e-spektrum van 257 resonanceer die tiasoolproton as 'n singulet by δ 8.05. Die metielprotone van die ester resonanceer as 'n triplet ($J = 7.2$ Hz) by δ 1.36, en die metileenprotone resonanceer as 'n kwartet ($J = 7.2$ Hz) by δ 4.37. In die ^{13}C -k.m.r.-spektrum van 257 is die resonansies van die drie tiasoolkoolstowwe by δ 127.20, δ 147.32 en δ 161.17 waarneembaar. Die groot spesifieke optiese rotasies van R-257 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 48.6^\circ$) en S-257 ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 36.6^\circ$) is opvallend. Die feit dat die absolute waardes van die spesifieke optiese rotasies nie identies is nie dui moontlik daarop dat die optiese suiwerhede van die verbindings tog ietwat verskil. Dit kan moontlik toegeskryf word aan verskille in die optiese suiwerhede van die chirale uitgangstowwe wat in die sintese van die twee enantiomere gebruik is.

Hidrogenolise van bensieleters en -esters van swaelhevattende verbindings is gewoonlik onsuksesvol vanwee vergiftiging van die palladiumkatalisator deur swael. Dit verklaar die resultaat dat debensilering van die γ -bensieltiasool (257) met waterstof op 10% palladium op koolstof (10% Pd-G) as katalisator²³⁷ na 24 uur slegs 50% verloop het. Katalitiese waterstofoordrag is met sukses gebruik in die hidrogenolise van bensielesters

in die geval van sommige swaelbevattende verbindings.^{238,239} Debensilering van 257 in mieresuur (KeOOH) as waterstofbron en in die teenwoordigheid van 10% Pd-C in metanol²³⁹ het egter nie plaasgevind nie. Selfs in gevalle waar die metode suksesvol is, is die gebruik van 'n groot oormaat van palladium (1 g van 10% Pd-C per 2 mmol substraat) noodsaaklik indien HCOOH as waterstofbron gebruik word. Deur gebruikmaking van 'n waterstofoordragsreaksie wat deur Bieg *et al.*²⁴⁰ vir die debensilering van O-bensieleters in suikers ontwikkel is, is die γ -bensiel-tiasool (257) binne 5 minute en in 'n opbrengs van 96% na die ooreenkomstige γ -suur (258) omgesit. Die reaksie gebruik ammoniumformiaat (HCOONH₄) as waterstofbron, en behels die verhitting onder terugvloei van die γ -bensiel-derivaat (257) in metanol met HCOONH₄ en 10% Pd-C (~0.7 g van 10% Pd-C per 1 mmol substraat). Die metode van Bieg *et al.* is ook suksesvol op die debensilering van N-bensiele deur Mitchell *et al.*²⁴¹ toegepas. Die omsetting van die ontskerrnde karboksielsuurgroep van 258 na die γ -amied (259) is met die standaard metode (kyk Afdeling 2.7.3.a) uitgevoer. In hierdie geval egter is dimetielformarnied (DMF) as oplosmiddel gebruik vanwee die onoplosbaarheid van 258. In die i.r.e-spektrum van 259 kon 'n doebletabsorpsieband by 3340 en 3190 cm⁻¹ aan -NH₂ toegeken word. In die 1H-k.m.r.-spektrum van 259 resoneer die twee amiedprotone as twee bree singulette by δ 5.68 en δ 6.22.

Alkaliese hidrolise van 259 het 2-{N-t-Boc-1'-amino-Si--amldopropiel)tiasool-4-karboksielsuur (260) gelewer. Heide R-260 ($[\alpha]_D^{25} - 38.5^\circ$) en 8-260 ($[\alpha]_D^{25} + 35.8^\circ$) vertoon groot spesifieke optiese rotasies. Dunlaagchromatografiese resolusie van die twee enantiomere op chirale plate (kyk Afdeling 2.7.2.b) is geredelik bewerkstellig. Die enantiomere word goed geskei met metanol:water:asetonitriël (.50:50:200; V:V:V) as ontwikkelingsmedium; die S-enantiomeer met $R_f = 0.62$ en die R-enantiomeer met $R_f = 0.53$. Geen oorvleueling van die kolle of enige stertvorming is verkry nie en ook is geen spoor van die teenoorgestelde enantiomeer by een van die twee tiasoolderivate (R-260 en 8-260) waargeneem nie. Beide R-260 en 5-260 is dus sonder enige rasemisasie vanaf R- en S-glutamiensuur (R-247 en 8-247) onderskeidelik gesintetiseer. Die

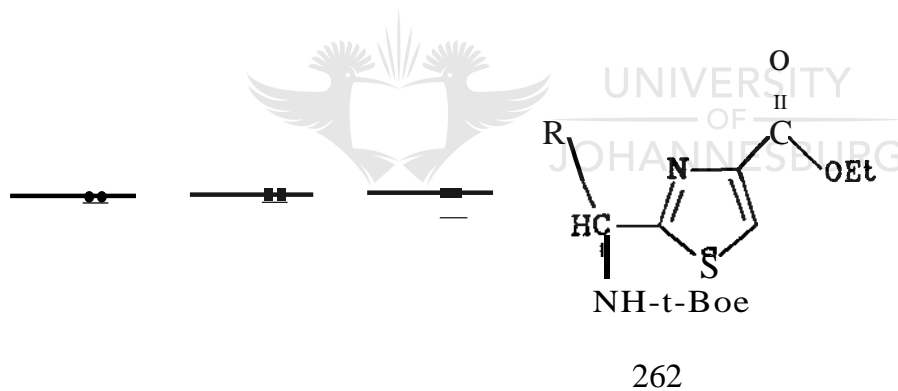
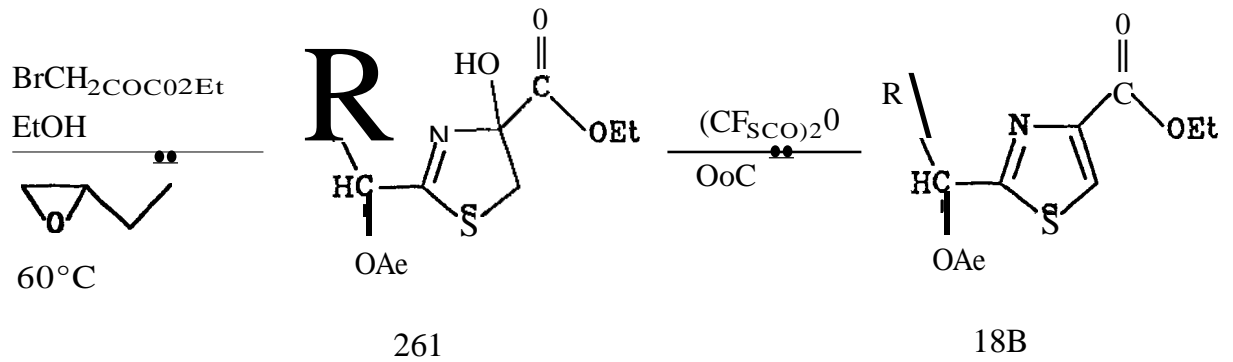
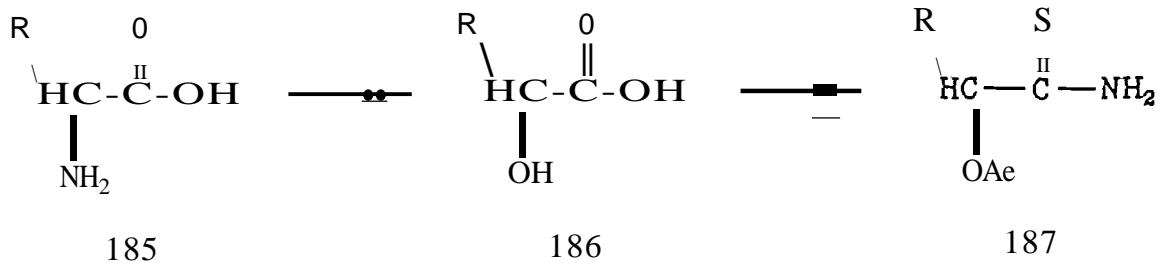
skeiding van *R*/5-259 en *Rj*8-260 kon egter nie met HDVC op die Pirkle-tipe CSF bewerkstellig word nie.

Noudat beide *R*- en 8-enantiomere van die chirale tiasoolaminosuurkomponent van dolastatien 3 gereedlik vanaf chirale aminosure beskikbaar was, het die klem in die ondersoek nou na die struktuuropklaring en sintese van dolastatien 3 verskuif. Dit is egter insiggewend om die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie wat in hierdie ondersoek ontwikkel is, te vergelyk met ander blykbaar suksesvolle variasies van die Hantzsch-reaksie.

2.11 ANDER SUKSESVOLLE GEMODIFISEERDE HANTZSCR-REAKSIES : 'N VERGELYKENDE STUDIE

Nadat die bogenoemde studie ten opsigte van die sintese van chirale tiasoolaminosuurderivate reeds afgehandel was, het Schmidt *et al.*^{113,242} twee vergelykbare gemodifiseerde Hantzsch-reaksies vir die sintese van opties suiwer tiasoolaminosuurderivate gerapporteer (Skemas 2.107 en 2.108).

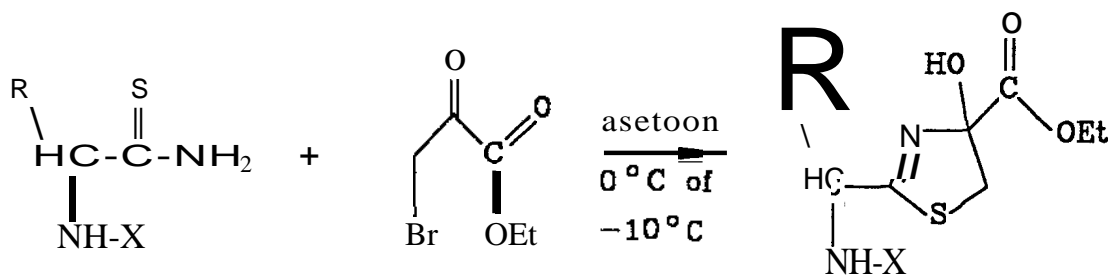
Die eerste roete¹¹³, wat 'n uitbreiding van vorige werk (kyk Skema 2.81^{41,189}) deur Schmidt *et al.* verteenwoordig, behels die reaksie van chirale o-asieloksltoamlede (187, Skema 2.107), wat vanaf chirale aminosure (185) in 'n e.o. van 88-94% verkry is, met etiel broompiruvaat in die teenwoordigheid van etieloksiraan (1,2-epoksibutaan) in etanol by 60° *A* om die opties suiwer hidroksitiasolien (261) te lewer. Die etieloksiraan verwyder die *in situ* gevormde RBr effektief genoeg sodat die reaksie nie verder verloop nie en die hidroksitiasolien (261) gelsoleer kan word. Die gesuiwerde hidroksitiasolien (261) is met trifluorasynsuuranhidried by 0°C behandel om die opties suiwer o-asieloksitiasoolderivaat (188) te lewer. Die verbinding is vervolgens na die α -aminotiasoolderivaat (262), met die geïnverteerde konfigurasie, omgesit. Die sintese van chirale tiasoolaminosuurderivate volgens hierdie omslagtige metode het steeds 'n beduidende mate van rasemisasie van die o-hidrokslelsuur (186) sowel as van die o-asieloksitiasool-



Skerna 2.107

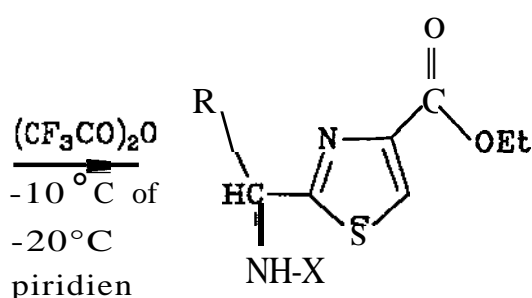
derivaat (188) tot gevolg.¹¹³

In die tweede modifikasie van die Hantzsch-reaksie deur Schmidt *et al.*¹¹³ (Skema 2.108) word N-t-Boc-S-fr-aminotioamide (263) met etiel broompiruvaat in aseton by -in?c gekondenseer om, na neutralisasie van die reaksierengsel en daaropvolgende reaksie van die gevormde hidroksitiasolien (264) met trifluorasynsuuranhidried in piridien by -20°C, die tiasoolaminosuurderivaat (265) te lewer. Dit is beweer dat

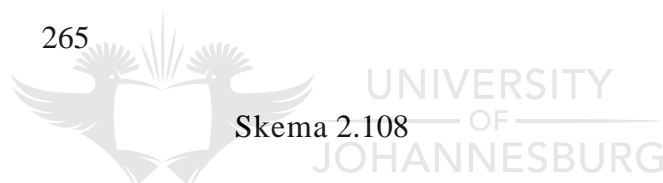


263 : X = t-Boc of Cbz

264



265



Skema 2.108

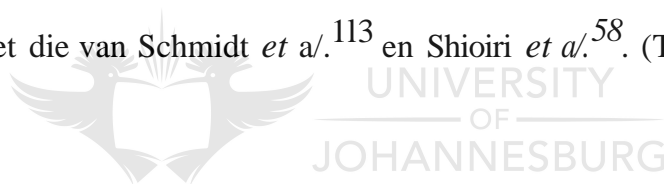
UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG

hierdie metode opties suiwer produkte lewer, selfs onder omstandighede waar die *in situ* gevormde HBr nie verwyder word nie. Hiervolgens sou die afleiding gemaak kon word dat rasemisasie van die tussenproduk, wat soos bewys is deur suur gekataliseer word, volledig onderdruk word slegs deur die reaksie in aseton by 'n lae temperatuur uit te voer. Schmidt *et al.* noem egter dat die keuse van N-beskeringsgroep baie belangrik is aangesien ftalolelaminotiokarboksamlede en p-nitrobensieloksi karbonielaminoverbindings onder dié kondisies aanleiding gee tot rasemiese tiasoolprodukte. Met N-bensieloksi karboniel- en N-t-butoksi karbonielaminotiokarhoksamiede word onder bogenoemde kondisies egter na bewering opties suiwer tiasoolaminozuurderivate (265) in hoë opbrengs gevorm.

Ten einde die effektiwiteit van Schmidt *et al.* se metode (kyk Skerna 2.108) te vergelyk

met dié wat deur ons ontwikkel is, is beide metodes toegepas vir die bereiding van etiel *l'S,2'S*-2-(*N*-*t*-*Boc*-1'-amino-2'-metielbutiel)tiasool-4-karboksielsuur (246b, kyk Skema 2.103) vanaf die ooreenkomstige *S,S*-gekonfigureerde tioamied (202b). Die keuse van substraat het berus op die feit dat rasemisasie diastereomere sal lewer wat gereidelik met behulp van k.m.r.-spektroskopie waarneembaar is. Die resultate wat verkry is word in Tabel 2.7 opgesom. Die resultate het betrekking op die totale tiasoolreaksie-produk na chromatografiese suiwing. Dit is gevind dat kristallisering van die produk die diastereomeriese samestelling daarvan verander. Die resultate toon duidelik dat Schmidt *et al.* se metode tog, soos dan ook verwag is, tot gedeeltelike rasemisasie lei.

Die gemodifiseerde Hantzsch-reaksie wat in die RAU-laboratorium ontwikkel is, is derhalwe die suksesvolste metode aan ons bekend vir die bereiding van chirale tiasool-aminosuurderivate. Hierdie gevolgtrekking is bevestig deur die aansienlik hoer spesifieke optiese rotasies van ander tiasoolaminosuurderivate wat volgens hierdie metode verkry is in vergelyking met die van Schmidt *et al.*¹¹³ en Shioiri *et al.*⁵⁸. (Tabel 2.8).



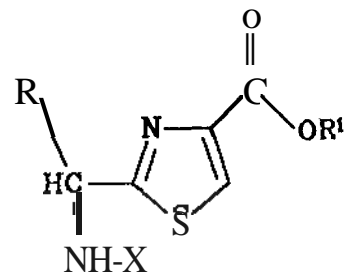
TABEL 2.7

Kondisies waaronder <u>246b</u> berei is	Spesifieke optiese rotasie	% Verskil in spesifieke optiese rotasie ^a	% Rasemisasie volgens 1H-k.m.r.-spektroskopie
Standaard Hantzsch- reaksie	$[\alpha]_D^{14} - 7.9^0$ (c = 1.2, CHCl ₃)	77.6%	100%
Schmidt se metode (in DI\IE)	$[\alpha]_D^{19} - 32.2^0$ (c = 6.2, C/ICf ₃)	8.8%	15.6%
Schmidt se metode (in Asetoon)	$[\alpha]_D^{19} - 31.9^0$ (c = 0.7, CHCl ₃)	9.9%	19.6%
Gemodifiseerde Hantzsch- reaksie (bikarbonaatmetode)	$[\alpha]_D^{17} - 35.4^0$ (c = 2.6, CHCl ₃)	0%	0%

waar a: Bepaal met produk van gemodifiseerde Hantzsch-reaksie as standaard.

TABEL 2.8

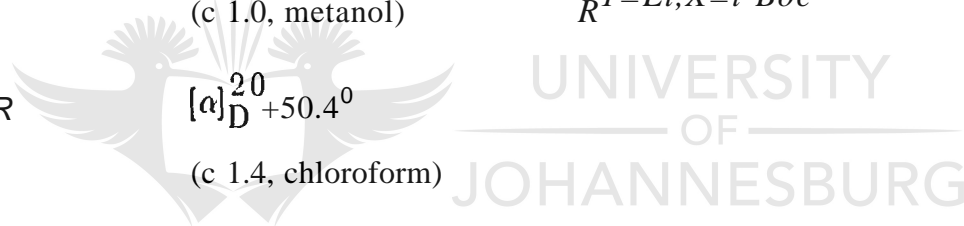
Vergelyking van die spesifieke optiese rotasies van chirale tiasoolaminozuurderivate deur die groepe van Schmidt *et al.*¹¹³ en Shioiri *et al.*⁵⁸ berei en die van analoë chirale tiasoolaminozuurderivate in hierdie ondersoek berei.



LITERATUUR			EKSPERIMENTEEL VAN HIERDIE ONDERSOEK		
Verbinding (verwysing)	Enantiomeer	Spesifieke Optiese Rotasie	Verbinding	Enantiomeer	Spesifieke Optiese Rotasie
R=ClI ₃ , R ¹ =ClI ₃ X= <i>t</i> -Boc ⁶⁸	<i>R</i>	[α] _D ²³ +28.5 ⁰ (c 0.5, metanol)	R=CH ₃ , R ¹ =Et X= <i>t</i> -Boc	<i>S</i>	[α] _D ²¹ -41.8 ⁰ (c 5.1, chloroform)
R=ClI ₃ , R ¹ =Et, X= <i>t</i> -Doc ¹¹³ (Metode J)	<i>R</i>	[α] _D ²⁰ +38.6 ⁰ (c 0.7, dichloormetaan)			
R=ClI ₃ , R ¹ =Et, X=Cbz ¹¹³	<i>S</i>	[α] _D ²⁰ -17.2 ⁰ (c 2.8, dichloormetaan)			

TABEL 2.8 (vervolg):

$R=(\text{ClI}_3)_2\text{CH}, R^1=\text{CH}_3,$ $X=t\text{-Boc}$ ⁵⁸	<i>R</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{24}+27.0^0$ (c 1.0, metanol)	$R=(\text{CH}_3)_2\text{CH}, R^1=\text{Et},$ $X=t\text{-Boc}$	<i>S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{21.5}-42.0^0$ (c 2.6, chloroform)
	<i>S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{24}-26.0^0,$ (c 1.0, metanol)			
$R=(\text{ClI}_3)_2\text{CHCH}_2'$ $R^1=\text{CH}_3, X=t\text{-Boc}$ ⁵⁸	<i>R</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{24}+22.5^0,$ (c 1.0, metanol)	$R=(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2'$ $R^1=\text{Et}, X=t\text{-Boc}$	<i>S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{23}-44.0^0$ (c 5.8, chloroform)
$R=(\text{ClI}_3)_2\text{CHCH}_2,$ $R^1=\text{ClI}_3, X=t\text{-Boc}$ ¹¹³ (metode I)	<i>R</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}+50.4^0$ (c 1.4, chloroform)			
$R=(\text{ClI}_3)_2\text{CHCH}_2,$ $R^1=\text{CH}_3, X=t\text{-noc}$ ¹¹³ (metode II)	<i>S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}-51.2^0$ (c 1.1, chloroform)			
$R=\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{ClI}_3)\text{CH},$ $R^1=\text{CH}_3, X=t\text{-Boc}$ ⁵⁸	<i>S,S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{22}-22.7^0$ (c 1.0, metanol)	$R=\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{CH},$ $R^1=\text{Et}, X=t\text{-Boc}$	<i>S,S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^1 7.4_{-35.4}^0$ (c 2.6, chloroform)
$R=\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2,$ $R^1=\text{ClI}_3, X=t\text{-Boc}$ ⁵⁸	<i>R</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{22}-8.8^0$ (c 1.0, metanol)	$R=\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2,$ $R^1=\text{Et}, X=t\text{-Boc}$	<i>S</i>	$[\alpha]_{\text{D}}^{20}-20.1^0$ (c 1.0, chloroform)



TrABBL 2.8 (vervolg) :

R=H ₂ NCOCH ₂ CH ₂ , R ¹ =CH ₃ , X=Cbz ⁵⁸	R	[α] _D ²³ +19.4 ⁰ (c 1.0, dimetielformamied)	R=H ₂ NCOCH ₂ CH ₂ , R ¹ =Et, X= <i>t</i> -Boc	R	[α] _D ²⁵ +34.1 ⁰ (c 1.5, chloroform)
	S	[α] _D ²³ -18.9 ⁰ (c 1.0, dimetielformamied)		S	[α] _D ²⁵ -31.9 ⁰ (c 1.4, chloroform)

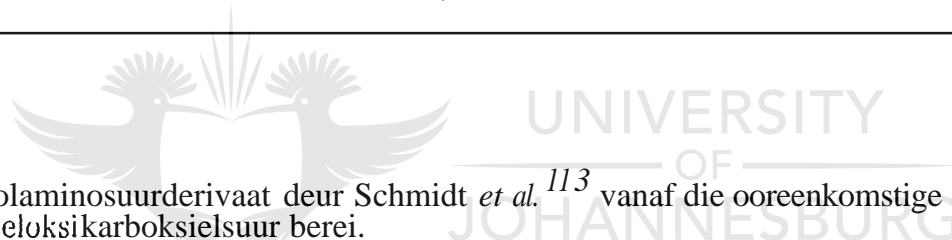
waar:

metode I

tiasoolaminosuurderivaat deur Schmidt *et al.*¹¹³ vanaf die ooreenkomstige α-asieloksikarboksielsuur berei.

metode II :

tiasoolaminosuurderivaat deur Schmidt *et al.*¹¹³ deur die gemodifiseerde Hantzsch-metode vanaf die ooreenkomstige α-asielaminokarbokstioamiede berei.

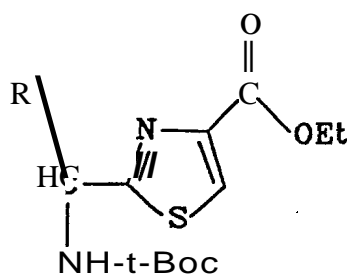


2.12 SIRKULERE DICHROISME VAN CHIRALE TIASOOLAMINOSUUR-
DERIVATE

Die sirkulere dichroïsme van 'n aantal chirale tiasoolaminosuurderivate, nl. 8-246a (Figuur C), 8,8-246b, 8-246c, 8-246e, 8-246f, 8-259 en R-259 in etanol (Tabel 2.9) is bepaal met behulp van In Jasco J-20 automatiese spektropolarimeter. Al die

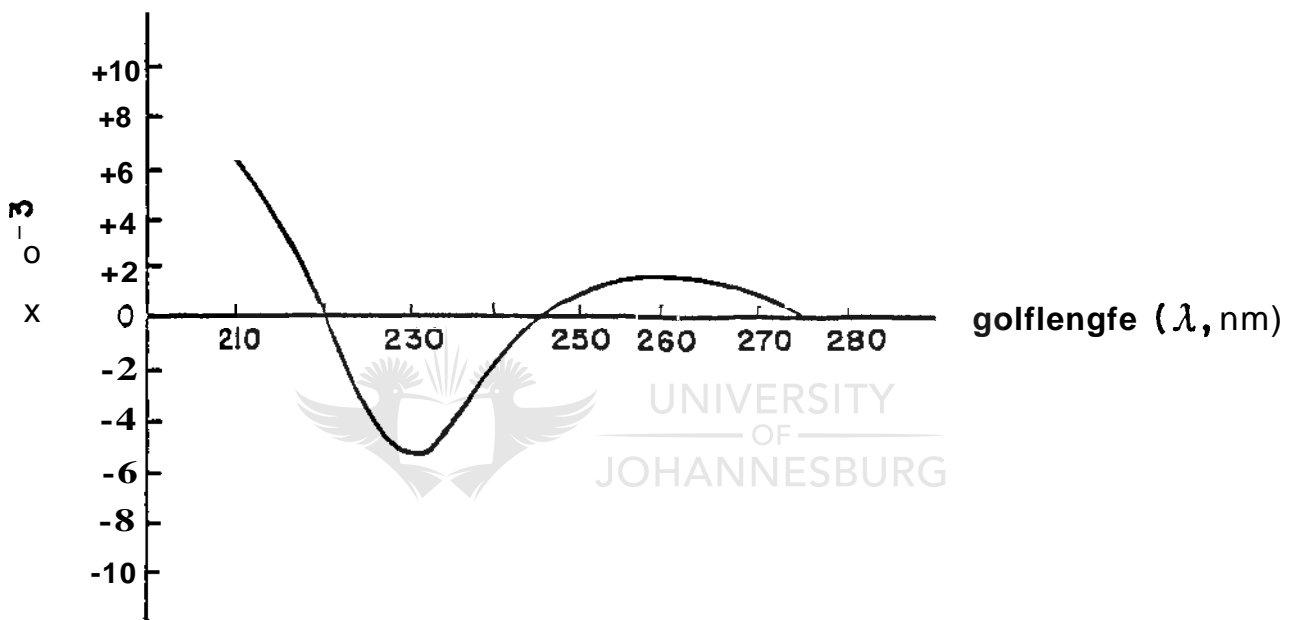
TABEL 2.9 : Sirkulere dichroïsme van tiasoolaminosuurderivate

Verbinding	$\Delta \epsilon_{\text{maks}}$ (verskil in die molekulere absorpsie-koeffisient)	λ (nm) (golflengte)
<u>8-246a</u>	-2.41	230
<u>8-246b</u>	-1.84	242
<u>8-246c</u>	-1.28	235
<u>8-246e</u>	-1.02	238
<u>8-246f</u>	-3.15	235
<u>8-259</u>	-1.47	235
<u>R-2.59</u>	+1.62	235



246a	R = CH ₂ C ₆ H ₅	246e	R = CH ₃
246b	R = CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	246f	R = CH ₂ CH(CH ₃) ₂
2460	R = CH(CH ₃) ₂	259	R = CH ₂ CH ₂ CONH ₂

verbinding toon Cotton-effekte in die gebied van 230-212 nm, d.w.s. die gebied wat met die U.V.-absorpsiemaksima van die 4-etielestertiasoolchromofoor ooreenkom. Addisionele swak Cotton-effekte wat in die gebied < 230 nm of in die gebied > 250 nm in sommige gevalle opgemerk word, toon egter nie 'n direkte verwantskap met die chirale sentrum op die 1'-posisie nie. Al die derivate met die 5-konfigurasië op die 1'-posisie toon negatiewe Cotton-effekte, ongeag die aard van die syketting. Dit wil dus voorkom of die absolute konfigurasies van tiasoolaminosure met behulp van sirkulêre dichroïsme spektra bepaal kan word.



Figuur C : Die sirkulêre dichroïsme spektrum van N-t-1loc-5-(Phe)Thz-oEt
(8-246a) ($c = 0.34$ mg/ml).

HOOFSTUK 3

DIE SINTESE VAN DIE SIKLIESE PEPTIED DOLASTATIEN 3 EN ONDERSOEK VAN DIE ELEKTRONIMPAKGEINDUSEERDE FRAGMENTASIESPEKTRA VAN DIE KLAS VAN VERBINDINGS

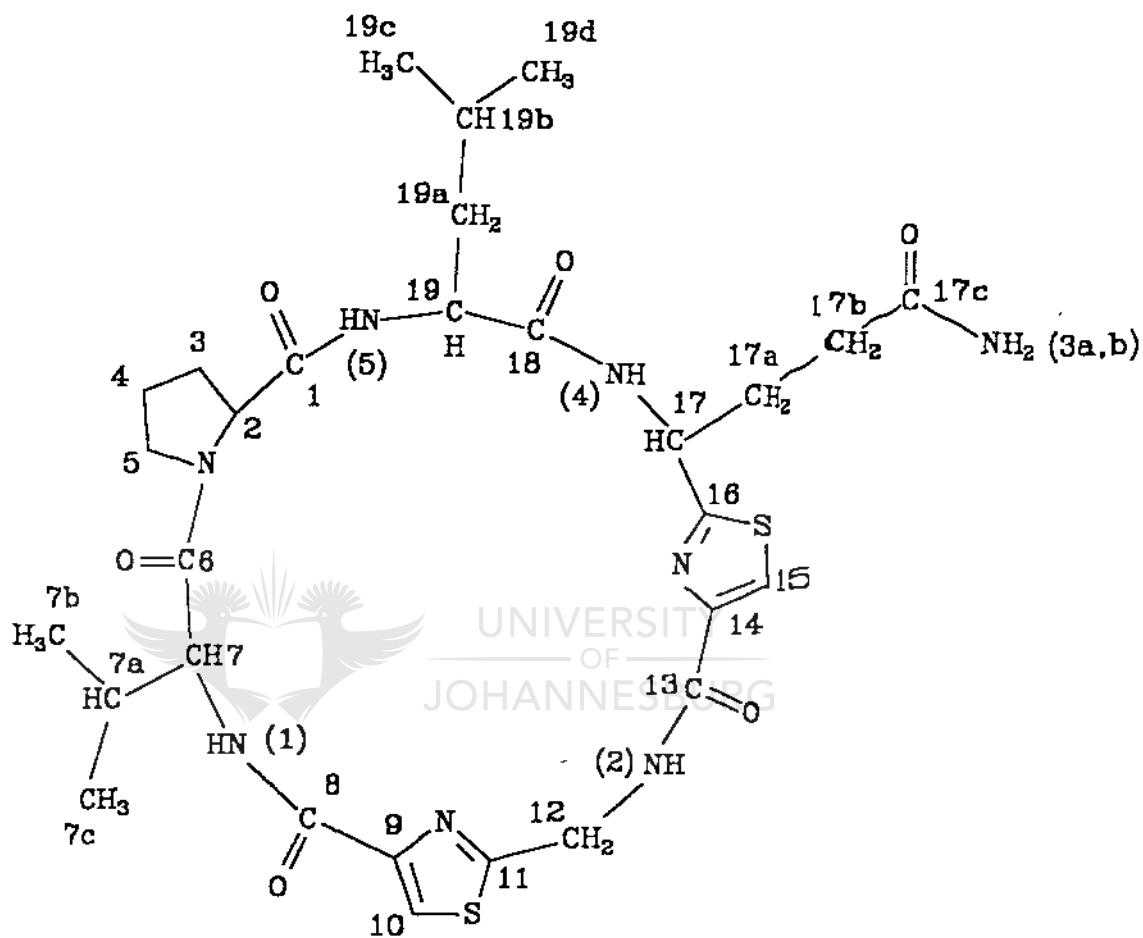
3.1 DIE SINTESE VAN DOLASTATIEN 3

'n Inleidende bespreking tot die isolasie, karakterisering en fisiologiese aktiwiteit van natuurlike dolastatien 3, sowel as die sintese van isomere van die natuurprodukt, is reeds in Afdeling 1.4.3 afgehandel. Die volgende punte kan uit die bespreking gelig word:

- (i) Pettit *et al.*^{29,46} het die primere struktuur van dolastatien 3 op grond van k.m.r.- en m.s.-spektra as sikIo[Pro-Leu-Val-(GIn)Thz-(GIy)Thz] (44) voorgestel.
- (ii) Die konfigurasie van die chirale aminosuurkomponente is tentatief as *S* voorgestel.
- (iii) Die voorgestelde primere struktuur van dolastatien 3, naamlik (44), sowel as die omgekeerde aminosuursekwens naamlik sikIo[Pro-(Gly)Thz-(GIn)Thz-Val-Leu] (45), is op grond van totaalsintese deur drie onafhanklike groepe as verkeerd bewys.⁴⁹⁻⁵³
- (iv) Pettit *et al.*⁵⁴ het op 'n later stadium 'n alternatiewe aminosuursekwens naamlik sikIo[S-Val-S-Leu-S-Pro-Rjs-(GIn)Thz-(GIy)Thz] (46) afgelei gebruikmakende van peptiedmassaspektroskopiese data. Totaalsintese het egter getoon dat hierdie struktuur *oak* nie met die natuurprodukt ooreenstem nie.

Na 'n deeglike studie van die peptiedmassaspektroskopiese gegewens van isomere van dolastatien 3, wat onder meer opklaring van die meganismes van elektronimpakgeïnduseerde fragmentasies (die resultate word volledig in Afdeling 3.2 bespreek) en herinter-

pretasie van die gepubliseerde massaspektroskopiese gegewens behels het, het ons 'n alternatiewe aminosuursekwens vir natuurlike dolastatien 3, naamlik siklo[Pro-Leu-(Gln)Thz-(Gly)Thz-Val] (266), met 'n redelike mate van vertroue voorgestel. Die voorstelling is op 'n waarneming gebaseer dat sekere ongewone fragmentasies, wat deur



266

ander groepe as ontstaan deur herrangskikkingsprosesse geïnterpreteer is, gevorm word deur middel van 'n unieke fragmentasiepatroon wat met die teenwoordigheid van tiasoolaminozuurkomponente geassosieer is. Hierdie interpretasie van die massaspektroskopiese data kon natuurlik geen inligting ten opsigte van die konfigurasies van die onderskeie aminosuurkomponente verskaf nie. Die sintese van die 16 diastereomere van 266 sou egter 'n buitengewone groot inset vereis. Aangesien die 'normale' aminosure (onder meer Val, Pro en Leu) gewoonlik die meer algemene *S*-konfigurasie besit terwyl die ongewone tiasoolaminozuurderivate (onder meer (Gln)Thz) beide as die *R*- en die

S-isomeer in die natuur kan voorkom (kyk Afdeling 1.4.2), is besluit om 2 diastereomere van 266, naamlik siklo[*S*-Pro-*S*-Leu-*S*-(Gln)Thz-(Gly)Thz-*S*-Val] (*S*-266) en siklo-[*S*-Pro-*S*-Leu-*R*-(Gln)Thz-(Gly)Thz-*S*-Val] (*R*-266), te sintetiseer. Met die doel in gedagte is 'n chirale sintese van opties suiwer *N*-*t*-Boc-*R*-(Gln)Thz (*R*-260) en *N*-*t*-Boc-*S*-(Gln)Thz (*S*-260) ontwikkel (kyk Afdeling 2.10). Voordat met die bespreking oor die sintese van dolastatien 3 en 'n isomeer van dolastatien 3 in aanvang geneem word, is dit nodig om kortliks 'n inleidende bespreking oor sikliese peptiedsintese en belangrike oorwegings in die beplanning daarvan, uit te voer.

3.1.1 Die Sintese van Sikliese Peptiede: 'n Inleidende Bespreking

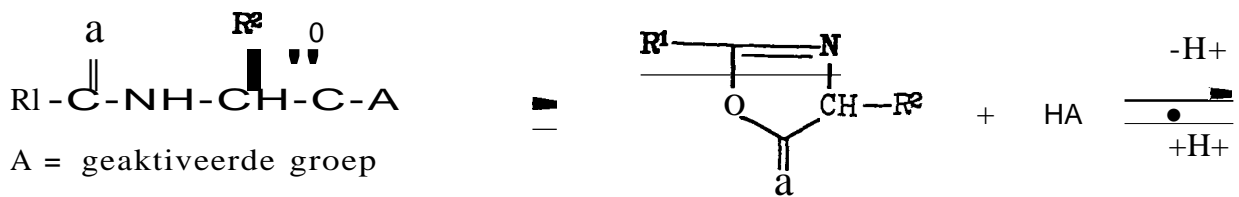
Formeel behels peptiedsintese die eliminasië van water vanuit twee aminosure (of peptiede) (Vergelyking 3.1):



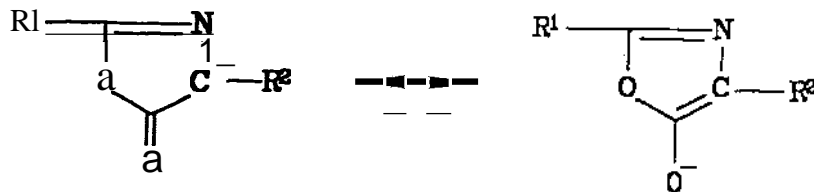
As gevolg van die ioniese karakter van die aminosure is die reaksie egter termodinamies ongunstig en vereis dus buitengewone hoë temperature. Dié probleem, sowel as nuwe reaksies wat kan plaasvind, kan vermy word deur:

- (i) opheffing van die ioniese karakter van die reagerende aminosure,
- (ii) differensiasie tussen die aminokomponent (die aminosuur wat die N-atoom aan die nuut gevormde peptiedbinding bydra) en die karboksikomponent (die aminosuur wat die karbonielgroep aan die nuut gevormde peptiedbinding bydra) en
- (iii) deur die geskikte aktivering van die karboksikomponent sodat koppeling onder milde kondisies en in hoë opbrengs kan plaasvind.

Vereistes (i) en (ii) kan geredelik bevredig word deur die gebruik van geskikte be-



267



Skema 3.1

sasie van die chirale o-eentrum. Die verlies aan optiese aktiwiteit *via* die oksasoloon (267) kan aan resonansstabilisering van die ooreenkomstige anioon toegeskryf word. Alhoewel 'n aantal meganismes vir die rasemisasie van o-aminosuurderivate voorgestel is, is dit waarskynlik dat in die afwesigheid van spesiale sykktings of N-substituentefekte, oksasoloonvorming die belangrikste roete is.²⁴⁴

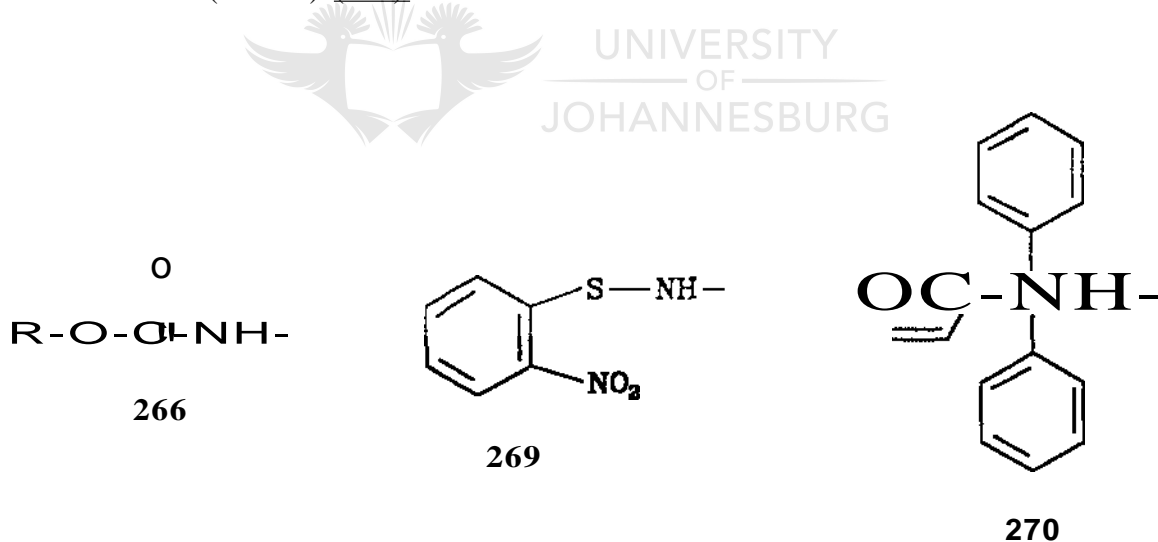
Daar moet verkieslik geen rasemisasie van die individuele aminosuurkomponente tydens peptidsintese plaasvind nie, aangesien dit tot die vorming van diastereomeriese mengsels lei wat moeilik skeibaar en karakteriseerbaar kan wees. Die vorming van diastereomeriese mengsels lei ook tot 'n afname in die opbrengs van die gewenste chirale peptied. 'n Verdere probleem is dat die biologiese aktiwiteite van lineere en sikliese peptiede normaalweg krities afhanklik is van die korrekte stereochemie. Om hierdie redes is dit dus verkieslik om in peptidsintese met opties suiwer uitgangsmateriale te werk en geen rasemisasie van die substrate tydens koppelingsreaksies te verkry nie.

Die vorming van oksasoloon (267) word grootliks deur die aard van die N-asielsubsti-

tuent, die karboksi-aktiveringsmetode, die oplosmiddel en die basis beïnvloed. Teen dié agtergrond is dit dus nodig om amino- en karboksibeskeringsgroepe, karboksi-aktiveringsmetodes en sikliseringsmetodes afsonderlik te bespreek.

3.1.1.a Amino- en karboksibeskeringsgroepe

Verskeie faktore is belangrik in die keuse van aminobeskeringsgroepe. Onder meer behels dit die gemak van koppeling aan die N-atoom van die individuele aminosuur, voldoende beskerming van die aminofunksie, stabiliteit onder kondisies van peptiedsintese, beskerming van die naasliggende chirale sentrum (in aminosure anders as glisien) teen rasemisasie en gemak van verwydering tydens, of na voltooiing, van die sintese. Die aminobeskeringsgroep funksioneer deur die nukleofilisiteit van die N-atoom te verminder. Dit kan bewerkstellig word deur gekonjugeerde elektrononttrekking soos deur asielgroepe, veral uretane (268), deur induktiewe elektrononttrekking, bv. met o-nitrofenielsulfenielderivate (269), of deur steriese hindering soos met trifenielmetiolderivate (tritiel-) (270). Gewoonlik is in kombinasie van die faktore in werking.



Vanwee die verskil in die aard van die onderskeie aminobeskeringsgroepe, is dit dus moontlik om elk van die groepe gewoonlik selektief onder geskikte kondisies te verwyder. In hierdie ondersoek is van uretaanbeskeringsgroepe, naamlik 1-butoksikarboniel (*t-Boe*) en bensoksikarboniel (Cbz), gebruik gemaak (kyk Afdeling 2.7). Die keuse het op hierdie twee aminobeskeringsgroepe geval vanwee hul sterk rasemisasie onderdruk-

kende eienskappe en die feit dat verwydering daarvan geredklik en selektief onder suur- (*t-Boc:CF₃CO₂H/CH₂Cl₂*) of neutrale kondisies (Cbz:H₂/Pd) plaasvind. Beide groepe is stabiel onder basiese kondisies.

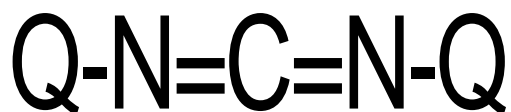
Die keuse van karboksibeskerminingsgroepe val normaalweg op eenvoudige esters byvoorbeeld bensielesters (verwyderbaar deur hidrogenolise of behandeling met sterk sure) en t-butielesters (gekloof onder uiters milde suurkondisies). In hierdie ondersoek is besluit op eenvoudige alkielesters (metiel- en etiel-) wat veral in die geval van prolienderivate selektief en sonder rasemisasie d.m.v. basiese hidrolise (saponifikasie) verwyder kan word.

3.1.1.b Karboksi-aktiveringsmetodes

Die keuse van die koppelingsmetode (d.w.s. die tipe karboksi-aktiveringsreagens) berus op onder meer die totale sintetiese strategie, die snelheid en effektiwiteit (t.o.v. opbrengs en rasemisasie) van die koppelingsreaksie en praktiese faktore. Die aktiveringsreagens wat aangewend word moet ook nie deur die vorming van byprodukte die isolasie van die gewenste peptied bemoeilik nie. Die sintese van peptiede deur die stapsgewyse koppeling van geskikte beskermde o--amlnosure is reeds met 'n groot verskeidenheid van metodes, en met byna volledige onderdrukking van rasemisasie, uitgevoer.²⁴⁵ Van die belangrikste aktiveringsreagense, en wat vir gebruik in hierdie ondersoek oorweeg is, sal vervolgens kortliks bespreek word.

i) Karbodiimiede

Die gebruik van karbodiimiede vir peptiedsintese deur Sheehan en Hess²⁴⁶ in 1955 is een van die belangrikste bydraes nog in die veld van peptiedchemie gelewer. Die eenvoud van die metode, sowel as die snelheid van koppeling en hoë opbrengste verkry, het daartoe gelei dat N,N'--disikloheksielkarbodiimied (DSKI, 271) vandag die mees gebruikte reagens vir peptiedsintese is.²⁴⁵ Met die bereiding van klein, oplosbare peptiedderivate lei die buitengewone onoplosbaarheid van die byproduk, N,N'-disiklohek-



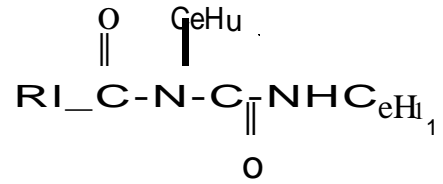
NtN'-disikloheksielkarbodiimied(DSKI)

271

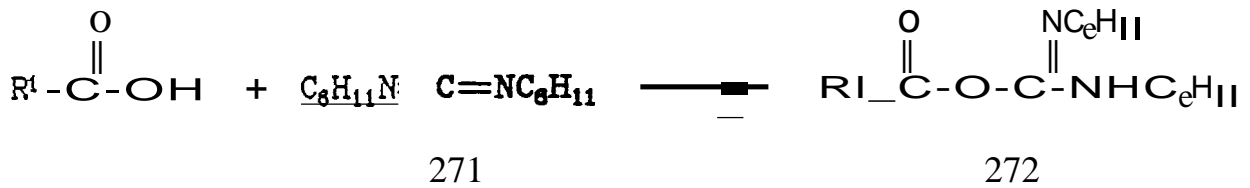
sielureum, in oplosmiddels anders as alkohole tot die gerieflike isolasie van die gevormde peptied. Die gebruik van DSKI (271) word egter soms beperk deur die giftigheid daarvan, die vermoë om nie-uretaanbeskermdes aminosure (insluitende peptiede) te rasemiseer²⁴⁷ en potensiele neweprodukvorming deur herrangskikking van die geaktiveerde tussenprodukte (Skema 3.2). Laasgenoemde twee ongunstige newereaksies kan gewoonlik beperk word deur die sorgvuldige keuse van reaksiekondisies en byvoeging van sekere hidroksielamienderivate (bv. N-hidroksisuksienimied en I-hidroksibensotriasool) by die reaksiemengsels. Karbodiimiede reageer relatief stadig met amiene met die gevolg dat aktivering van karboksikomponente in die teenwoordigheid van die aminokomponent bewerkstellig kan word. Die meganisme van karbodiimiedasileringsreaksies is ietwat kompleks en die moontlike roetes word in Skema 3.2 opgesom.²⁴⁴

Soos reeds genoem, kan die beperkte mate van rasernisasie wat in hierdie koppelingsreaksie plaasvind byna volledig deur die byvoeging van N-hidroksisuksienimied (273, Skema 3.3) onderdruk word.²⁴⁸ N-Hidroksisuksienimied (273) is 'n *o*-effek' nukleofiel en reageer baie vinnig met O-asielisuoreum (272) om die ester (274) te lewer. Die reaksie van die ester (274) met die aminokomponent ($\text{R}^2\text{-NH}_2$) vind ook vinnig plaas en wel *via* die waterstofgebonde tussenproduk (275). Dit blyk dat die vinnige vorming en aminolise van 274 rasemisasie, wat *via* 'n oksasoloontussenproduk kan plaasvind, volledig onderdruk.

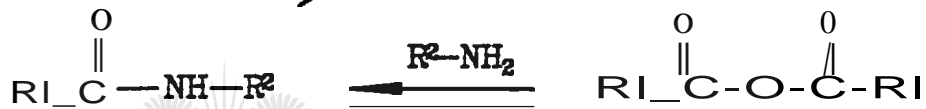
Verskeie variasies van die karbodiimiedkoppelingsreaksie het mettertyd ontstaan, waaronder die gebruik van DSKI (271) met trietielamien²⁴⁹, I-hidroksibensotriasool²⁵⁰ en



t_{newereaksie}

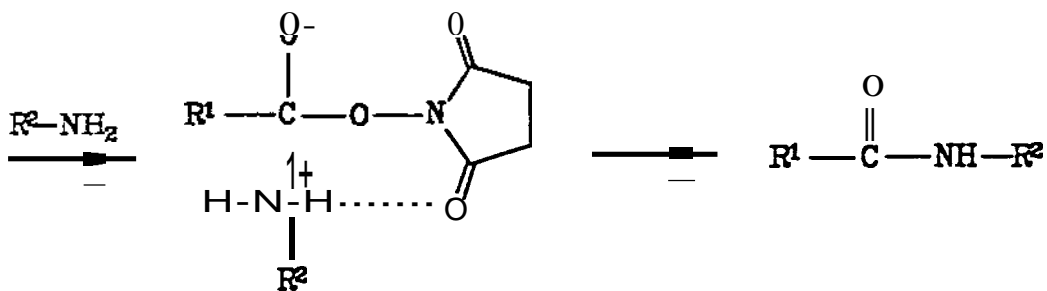
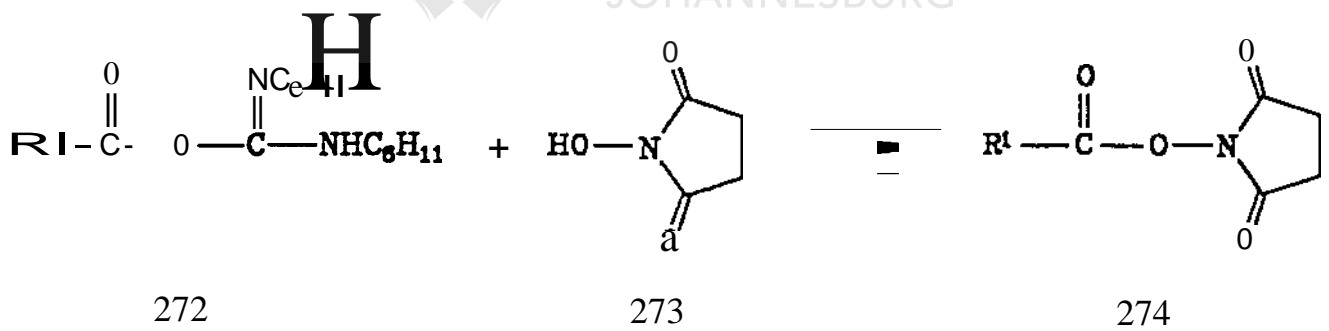


hoofroete R^2-NH_2 $\text{R}^1\text{CO}_2\text{H}$ (karboksi-
komponent is in
oormaat)



Skema 3.2

UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG



Skema 3.3

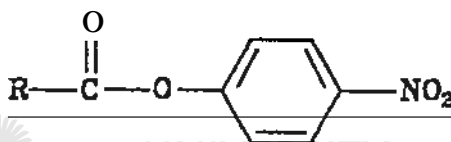
koper(II)cWoried²⁵⁰,sowel as die vervanging van DSKI met N,N'-karboniëldiimida-sool.²⁵¹

ii) Geaktiveerde esters

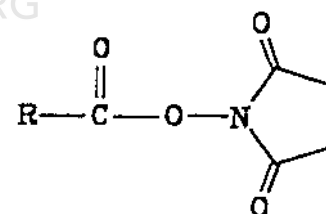
Eenvoudige alkiel- en arielesters aminoliseer te stadig om as geaktiveerde karboksikomponente in peptiedsintese te funksioneer. Die verhoging van die elektrofiliese karakter van die ester karbonielgroep word vir 'n vinnige bimolekulere reaksie vereis. Dit word normaalweg bewerkstellig deur die teenwoordigheid van elektrontrekkende substituentte op die alkiel- of arielesterfunksionaliteitte. Tipiese voorbeelde is sianometiel²⁵² (276), p-nitrofenielesters²⁵³ (277), tiolesters²⁵⁴ (bv. 278), 2,4,5-trichloarfenielesters²⁵⁵ (279) en O-asielhidroksielamienderivate²⁴⁸ (bv. 274). Die meer



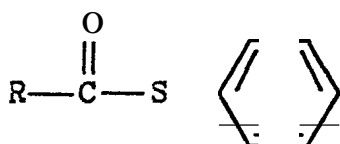
276



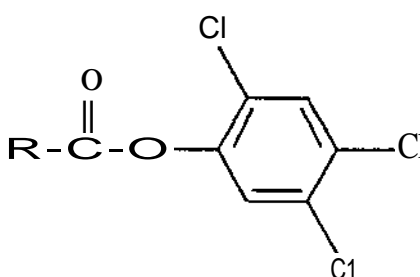
277



274



278



279

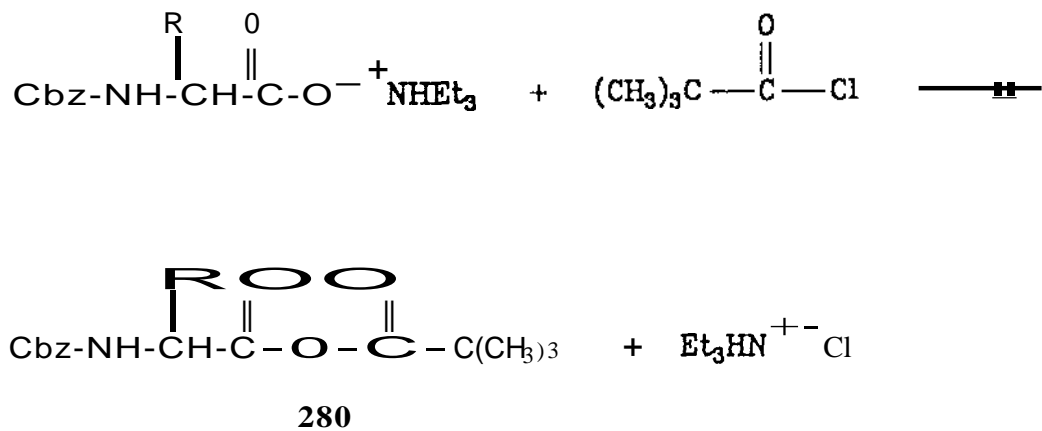
reaktiewe pentachloorfeniel-²⁵⁶ en pentafluoarfenielesters²⁵⁷ het oak reeds heelwat toepassing in peptiedsintese gevind.

Die geaktiveerde estermetode vind onder milde reaksiekondisies plaas en gevolglik word newereaksies grootliks onderdruk. Die vorming van alkohol- en fenolbyprodukte be-moeilik egter die isolasie van die bereide peptied. *p*-Nitrofenielesters (277) vind die wydste toepassing. Hierdie esters word normaalweg deur die reaksie van uretaanbeskernde aminosure en *p*-nitrofenol in die teenwoordigheid van *N,N'*-disikloheksiel-karbodiimied (271) berei. 258

Beide die vorming van die geaktiveerde esters en aminolise kan met rasemisasie *via* oksasoloonvorming gepaard gaan, Gevolglik vind hierdie metode slegs wye toepassing in die gevalle van opties stabiele uretaanbeskernde (bv. *t*-Boc en Cbz) aminosuurderivate.

iii) Gemengde anhidriede

Gemengde anhidriede (280, Skema 3.4 en 282a,b, Skema 3.5) word berei vanaf 'n asielaminosuursout en (normaalweg) die suurchlorid van 'n karboksielsuur²⁵⁹ (Skema 3.4) of van 'n koolsuurderivaat^{260,261} (Skema 3.5). Die gemengde anhidried-



Skema 3.4

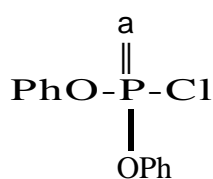
metode is suksesvol in hierdie ondersoek (gebruikmakende van isobutielchlorformiaat (281b)) vir die bereiding van *N*-beskernde α -aminokarboksarniede vanaf *N*-beskernde α -aminokarboksielsure (kyk Afdeling 2.7) gebruik. Die lae temperatuur « 0° C)

naasliggende karbonielkoolstof deur die induktiewe effek van die isobutielgroep toegeskryf word. Onder hierdie kondisies lei die reaksie van sekondere amiene, by. prolien, egter nog steeds tot grootskaalse vorming van die ooreenkomstige uretaan (284).²⁶¹ Benoiton²⁶² het gevind dat in gevalle waar dieselfde aktiveringsreagens gebruik word, uretaanvorming hoofsaaklik deur die keuse van die nie-nukleofiliese amien (wat as basis in die reaksie gebruik word) en oplosmiddel bepaal word. Dit is vasgestel dat die kombinasie van N-metielpipiridien, bo die algemeen gebruikte N-metielformolien, en dichloormetaan die beste resultate in hierdie verband lewer.

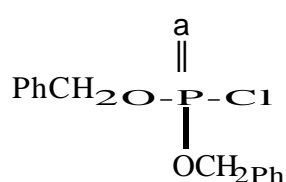
'n Voordeel van hierdie koppelingsmetode is dat vlugtige komponente (koolstofdiksied en in laer alkohol) as byprodukte gevorm word, en wat dus die isolasie van die produk vergemaklik. Aan die ander kant moet onder streng anhidriese kondisies gewerk word indien die aktivering met isobutielchloorformiaat (281b) uitgevoer word. In die geval van nie-uretaanbeskernde aminosure kan rasemisasie wel tydens ammonolisering plaasvind.

iv) Organofosfortipe koppelingsreagense

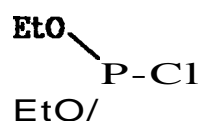
Vanwee die toenemende gebruik en belangrikheid van hierdie klas van aktiveringsreagense word dit afsonderlik bespreek. In verskeidenheid fosforbevattende anorganiese sure is as reagense vir die bereiding van gemengde anhidriedderivate in peptied-sintese aangewend. Byvoorbeeld, anhidriede is berei vanaf asielaminosure en difenielfosforielchloried²⁶³ (285), dibensielfosforielchloried²⁶⁴ (286), dietielchloorfosfiet²⁶⁵ (287), o-fenileenchlorfosfiet²⁶⁵ (288) en difenielfosfinielchloried^{261,266} (289). In Nuwe ontwikkeling op hierdie gebied is die gebruik van organofosfaatreagense, by. bensotriazol-1-iel-diëtielfosfaat²⁶⁷ (290), vir die bereiding van gemengde anhidriede. Die organofosfor gemengde anhidriede ondervind selektiewe nukleofiliese aanval (deur die aminokomponent) op die karbonielkoolstof met die gevolg dat uretaanvorming nie plaasvind nie. Die metode is dus veral geskik vir die aktivering van steries gehinderde aminosure.



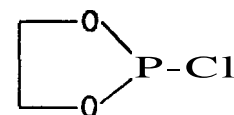
285



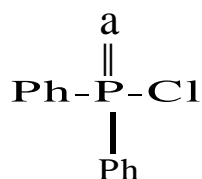
286



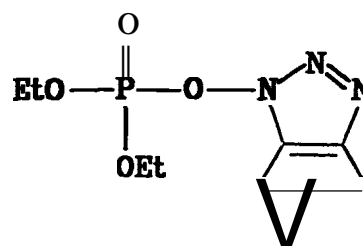
287



28B



289



290

Sole *et al.*²⁶¹ het egter gevind dat difenielfosfien-gemengde anhidriede wel tot rasemisasie van die fenielalanienkomponent tydens die sintese Cbz-Gly-S-Phe-S-Pro-NH(CH₂)₁₃-eH₃ aanleiding gee. 'n Vergelyking van hierdie benadering met twee bekende gemengde anhidriedmetodes, insluitende die rol van oplosmiddel op rasemisasie, word in Tabel 3.1 opgesom. Alhoewel die beste opbrengste van die spesifieke koppelingsmetodes deur die difenielfosfinielchloried-dimetielformamied kombinasie gelewer is, is dit onaantreklik weens die gepaardgaande ongewone hoë persentasie rasemisasie.

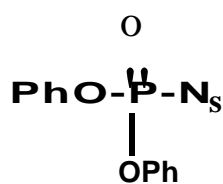
Met die ontwikkeling en gebruik van difenielfosforielasied²⁶⁸ (291) en dietielfosforielasianied²⁶⁹ (292) in chirale peptiedsintese, het die groep van Shioiri *et al.* die weg gebaan vir die gebruik van organofosforreagense in die bereiding van opties suiwer peptiede. Veral dietielfosforielasianied (292), wat soortgelyk aan 'n dialkielfosforpseudohalied funksioneer, vergelyk uitstekend met die tradisionele aktiveringsreagense ten opsigte van opbrengs, reaksietyd, afwesigheid van rasemisasie en gemak van opwerk van die reaksiemengsel. Die koppelingsreaksie vind essensieel sonder rasernisasie plaas sods met die supersensitiewe Young-toets bewys.²⁶⁹ Die reagens (292) is selfs effektief indien pep-

TABEL 3.1 Rasemisasie van die Phe-komponent tydens die sintese van Cbz-Gly-S-Phe-S-Pro-NH(CH₂)₁₃-eH₃

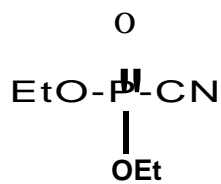
Koppelingsmetode	Oplosmiddel	% Rasemisasie ^a
Isobutiëlchloroformiaat (281b)	Tetrahidrofuraan	2.0
	Dichloormetaan	6.0
	Dimetielformamied	5.0
Difenielfosfinielchloried (289)	Tetrahidrofuraan	6.0
	Dichloormetaan	6.2
	Dimetielformamied	6.0
N,N'-disikloheksiel karbodiimied (271) en I-hidroksi-bensotriasool	Tetrahidrofuraan	1.0
	Dichloormetaan	2.0
	Dimetielformamied	2.0

waar :

a - Persentasie rasemisasie is met S-aminosuuroksidase en gaschromatografie op In chirale stasionêre fase bepaal.



291



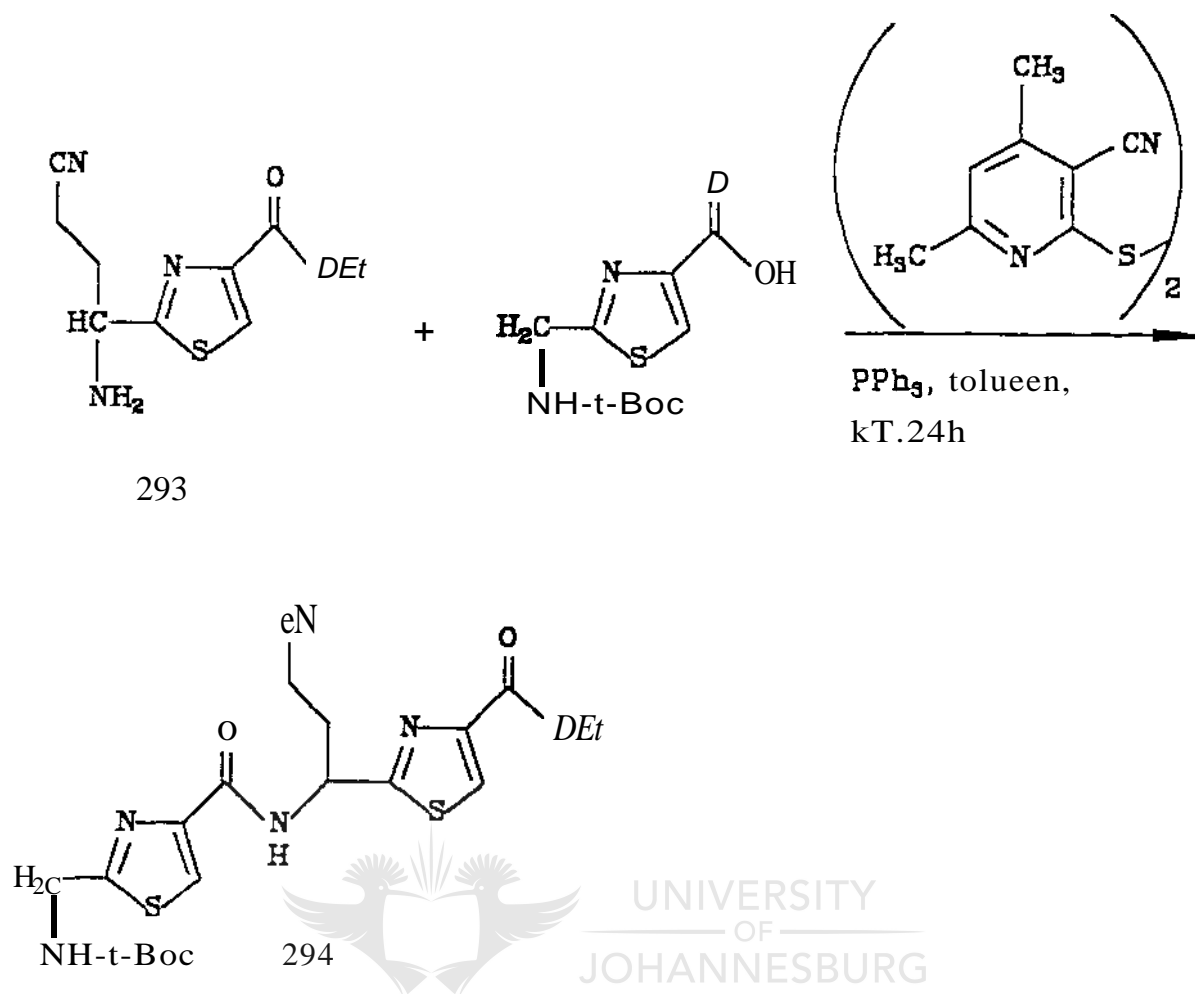
292

tiedvorming met steries gehinderde karboksikornponente uitgevoer word. Byvoorbeeld, bensoesuur koppel met sikloheksielamien in die teenwoordlgheid van 292 en trietielamien om N-sikloheksielbensarnied in 'n opbrengs van 97% te lewer. Geen produkvorming vind plaas indien N,N'-disikloheksielkarbodiimied (271) as aktiveringsreagens gebruik word. Dietielfosforielsianied (292) is deur die groep van Shioiri *et ai.*⁵⁰ as aktiveringsreagens in die sintese van isomere van dolastatien 3 suksesvol toegepas. Die veelsydigheid van die aktiveringsreagens (292) is verder bewys deur gebruik daarvan in die soliede-fase sintese van die sikliese peptied ulisiklamied.⁴²

v) Alternatiewe karboksi-aktiveringsreagense

'n Groot verskeidenheid van ander aktiveringsreagense wat nie vir toepassing in die dolastatien 3 ondersoek oorweeg is nie, word nie in hierdie bespreking behandel nie. Daar bestaan wel heelwat volledige literatuuroorsigte in hierdie verband.^{244,245}

'n Laaste interessante koppelingsreaksie wat van besondere waarde vir die dolastatien 3 sintese kan wees, is die wat deur Schmidt *et ai.*⁵¹ gebruik is om 'n aanvanklik problematiese koppeling tussen twee tiasoolaminosuurderivate te bewerkstellig (Skema 3.6). 'n Aktiewe ester van *N-t-Boc-(Gly)Thz* is deur 'n redokskondensasiereaksie met bis-(3-sian0-4,6-dimetiepiridiel-2)disulfied en trifenielfosfien berei. Die hoogs reaktiewe sianodimetiepiridieltolester is met die aminokomponent (293) gereageer om die dipeptied (294) in 'n opbrengs van 93% te lewer. Die aantreklikheid van hierdie metode word egter verminder weens die feit dat die skeiding van die peptied vanaf die byprodukte, onder meer trifenielfosfienoksied, tydrowend vanaard is.



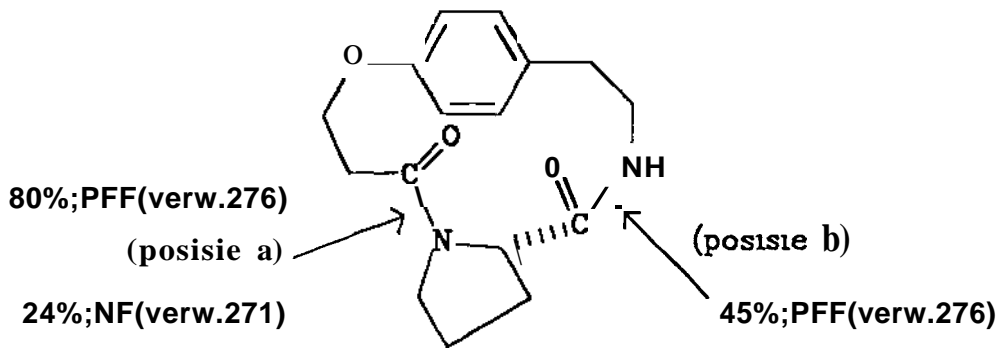
Skema 3.6

3.1.1.c Die sikliseringsreaksie van lineêre peptiede

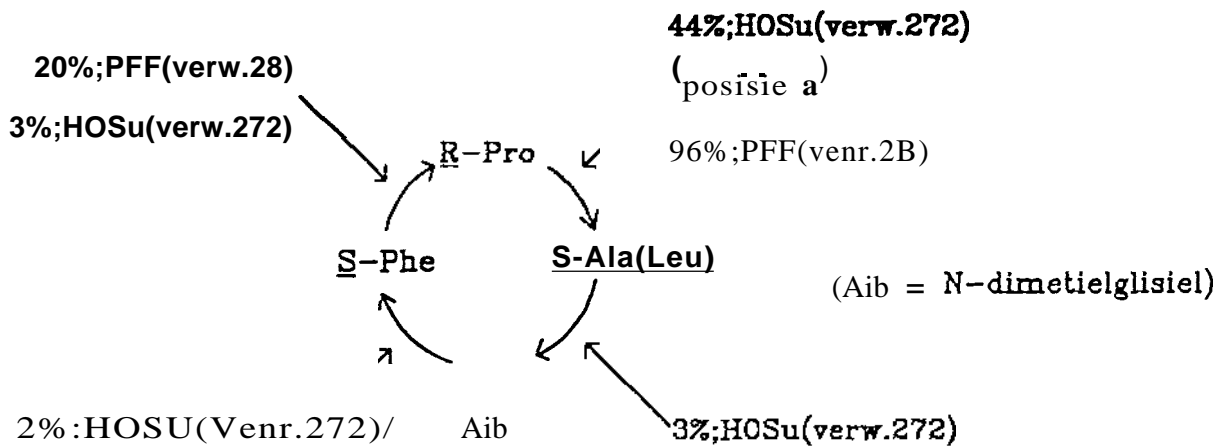
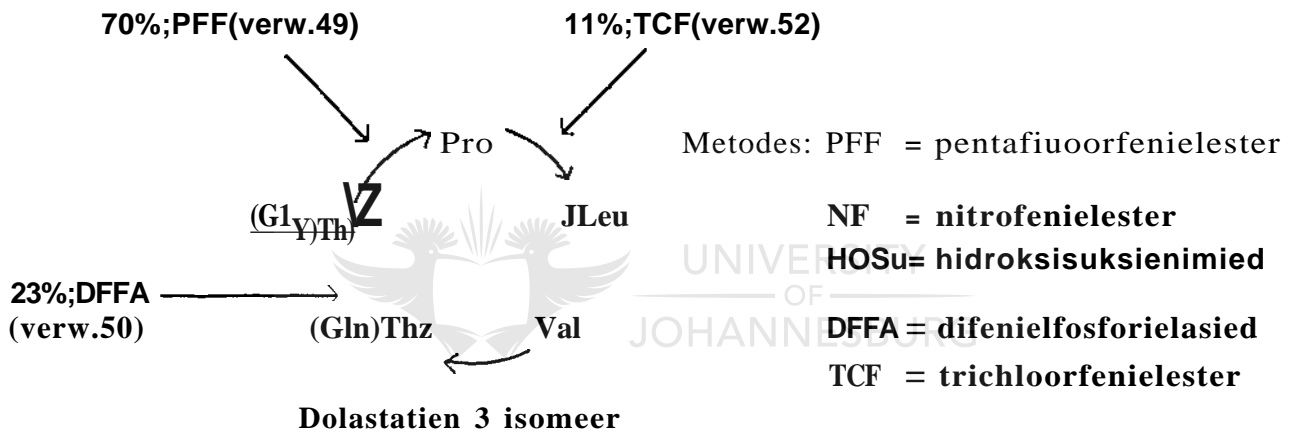
Ringsluiting van lineêre peptiede, d.w.s. die vorming van sikliese peptiede, is reeds met al die bestaande metodes wat vir die bereiding van amiedbindings van lineêre peptiede ontwikkel is, uitgevoer.²ⁱ⁰ Probleme word veral by die vorming van mediumgrootte peptiedringe ondervind. Daarbenewens is kompeterende oligomerisasie van die lineêre voorlopers 'n algemene probleem wat normaalweg opgelos word deur die sikliseringsreaksie onder hoë verdunning uit te voer. Die beste resultate, dit is opbrengste in die orde van 20-30%, is verkry deur aktivering van die karboksikomponent as die ooreenkomstige nitrofenielester²⁷¹, trichloorfenielester^{52,53} en hidroksisuksienimiedester^{2i2,2i3} of deur reaksie met difenilfosforielasied^{50,2i1} (291). In 'n ondersoek na

sikliese peptiedsintese en die beperkings daarvan, het Jones²⁷⁵ die volgende opmerking gemaak: "Die opbrengste van peptiedsikliseringsreaksies is nooit 'goed' in die normale sin van die woord soos deur organiese chemici gebruik nie, maar in die algemeen word 30% as 'n bevredigende opbrengs aanvaar; gewoonlik is die opbrengste heelwat laer." Hierdie opvatting van navorsers kan bevraagteken word in terme van 'n oniangse resultaat deur Schmidt *et al.* Hierdie navorsers het 'n uiters suksesvolle sikliseringsreaksie (opbrengste van gemiddeld 80%) *via* pentafluorfenielesters ontwikkel.^{28,30} Aangesien geen buitengewone verdunning van die reaksiemengsel vereis word nie, vind hierdie sikliseringsreaksie relatief vinnig plaas. Alhoewel die geaktiveerde pentafluorfenielester meer reaktief is as analoe geaktiveerde esters, vind geen rasemisasie tydens die sikliseringsreaksie plaas nie.

Die pentafluorfenielestermetode is toegepas vir die suksesvolle bereidings van medium-²⁷⁶ en grootring⁴⁹ sikliese peptiede. Die vorming van karboksiliese ringverbindings as klein, normaal, medium en groot is vanaf entalpie, strukture en 'gemak van vorming' afgelei. Hierdie indeling kan egter nie direk vir die klassifisering van ringverbindings wat sikliese substituenten (soos tiasole) bevat, toegepas word nie. Die verskil is dat in mediumgrootte ringe met heterosikliese komponente Pitzer-spanning blykbaar chemies nie belangrik is nie.^{28,30} Dit is moontlik dat die destabiliserende Pitzer-spanning in mediumringe meer as vergoed word deur die vermindering van grade van vryheid as gevolg van die teenwoordigheid van sikliese sub siste me. Twaailidmediumringe met een of meer ringkomponente sikliseer, soortgelyk aan groot ringsisteme, normaalweg maklik en in hoë opbrengste. Die 13-lidring (295, Skorna 307) word *via* die pentafluorfenielester in 'n opbrengs van 80% (posisie a) gevorm.²⁷⁶ Indien hierdie sikliseringsmetode op posisie b uitgevoer word, word die sikliese peptied in 'n opbrengs van slegs 45% verkry. Aangesien beide reaksiemengsels nie uitermatig verdun is nie, kan dit dus aanvaar word dat die verkose konformasie van die lineere adduk baie gunstig vir ringsluiting op posisie a is. 'n Baie belangrike punt in die sintese van sikliese peptiede, en wat soms deur chemici buite rekening gelaat word, is die konformasie van die amid-



295



296

Skema 3.7

groepe. Sikliese tripeptiede met ten minste een amiedgroep in die δ -*cis* konfigurasie kan slegs berei word indien prolien of N-metielaminosure as komponente teenwoordig is.²⁸

Dit is In gevolg van die verskil in entalpie tussen δ -*cis* en δ -*trans* amiede. In die algemeen is sikliese tetrapeptiede wat primere aminosure van dieselfde konfigurasie bevat, baie moeilik bereibaar. Hierteenoor is 12-lid sikliese peptiede met ten minste een aminosuur van teenoorgestelde konfigurasie, of met aminosure as ringkomponente, maklik sintetiseerbaar. Byvoorbeeld, verbinding 296 is in In opbrengs van 96% (posisie a) met die pentafluorfenielmetode berei.²⁸

Ten spyte daarvan dat sikliese pentapeptiede oor lae ringspanningsenergie besit, word die dimeriese sikliese dekapeptiede gewoonlik as byprodukte gevorm. Vandaar die uitermatige verdunning van die reaksiemengsels en gevolglike lang reaksietye by die gebruik van die tradisionele sikliseringsreaksiemetodes. Die invloed van posisiespesifieke siklisering en die uitstekende vergelyking van die pentafluorfenielmetode teenoor die tradisionele sikliseringsmetodes t.o.v. opbrengste, word in Skema 3.7 geillustreer.

Dit is egter nodig om te noem dat in die geval van peptiedsikliseringsreaksies die achi-rale glisienkomponent op die C-terminus van die peptiedfragment verkies word, aangesien ontskering van die ester (basiese hidrolise), aktivering van die ontskernde suur en koppeling met die aminokomponent geen moontlikheid van rasemisasie bied nie. Om dieselfde rede word prolien ook normaalweg op die C-terminus van die peptiedfragment verkies, aangesien sekondere amiene nie oksasolone kan vorm nie.

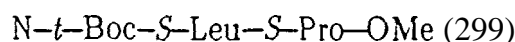
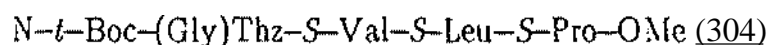
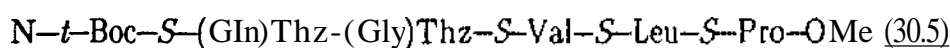
Teen die bree agtergrond van peptiedsintese wat nou behandel is, word die sintese van 'n isomeer van dolastatien 3, en daarna dié van dolastatien 3, bespreek.

3.1.2 Die Sintese van die Dolastatien 3 Isomeer Siklo [~~S-Pro-S-(Gln)Thz-~~ (Gly)Thz-8-Val-8-Leul (46)

Die gemodifiseerde dolastatien 3 sekwens siklo [~~S-Pro-RjS-(Gln)Thz-~~

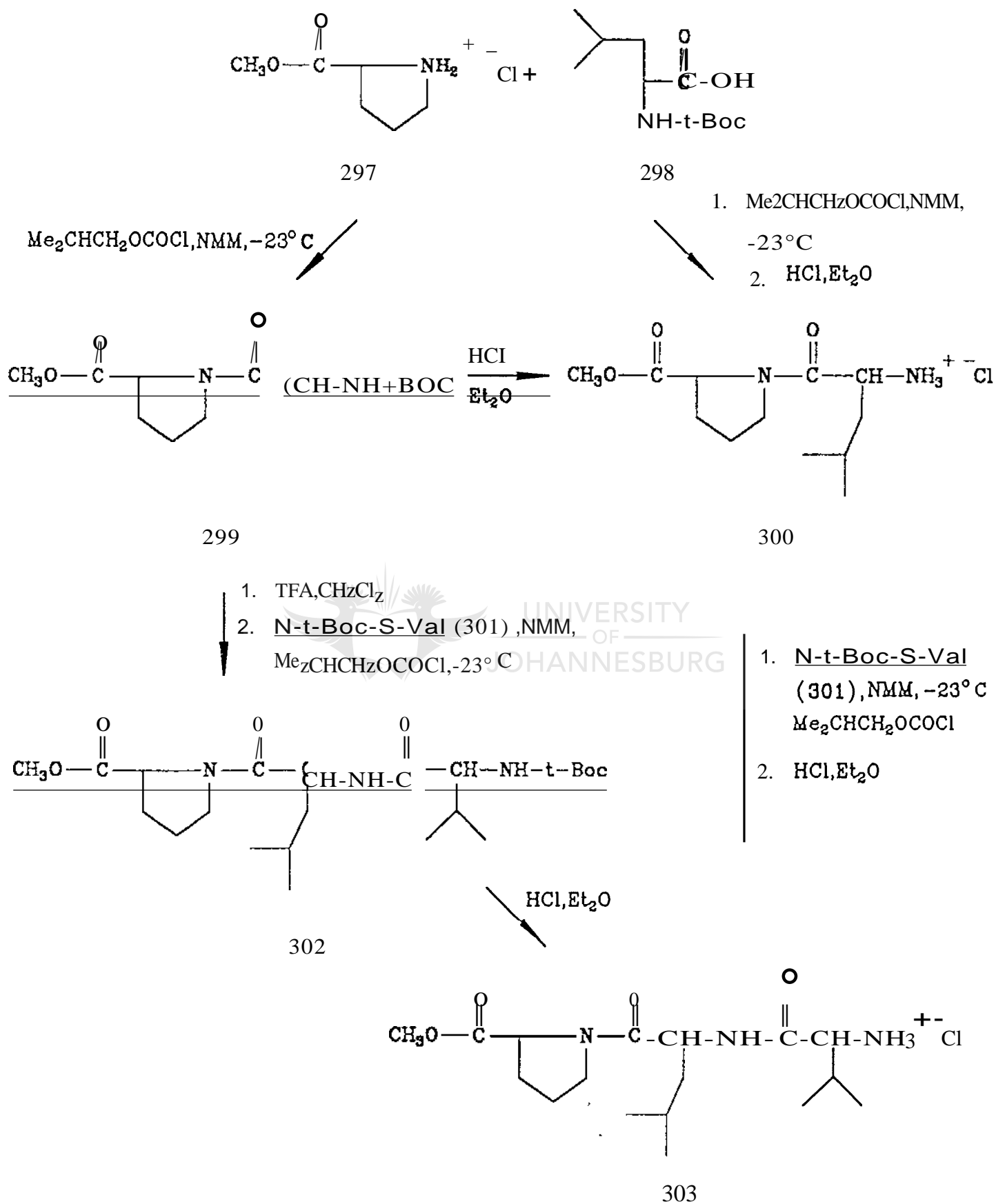
(Gly)Thz-S-Val-S-Leu] (46) is deur Pettit *et al.*⁵⁴ gesintetiseer. Die gevormde diastereomeriese mengsel kon egter nie met behulp van chromatografiese tegnieke geskei word nie en derhalwe was dit nie moontlik om die onderskeie ¹H- en ¹³C-k.m.r.-resonansies eenduidig toe te ken nie. Hierdie sikliese peptied het dus as goeie model gedien om ondervinding in peptiedsintese in hierdie laboratorium op te doen. Die bestudering van die m.s.-fragmentasie spektrum van 44 sou ook waardevolle inligting t.o.v. die m.s.-fragmentasiepatrone van hierdie klas van sikliese peptiede lewer.

S-Prolien, S-valien, S-leusien en S-(Gln)Thz is as aanvangsmateriale in die sikliese peptiedsintese gebruik, hoofsaaklik op grond van die feit (soos reeds genoem) dat die meerderheid van die 'normale' aminosuurresidue van verwante sikliese peptiede wat uit marinebekerdiere geïsoleer is, die 5-konfigurasie besit (kyk Afdeling 1.4). Die beskermde lineêre pentapeptied (305) is as die voorloper van die sikliese peptied (46) gekies. Die besluit om prolien as 'n terminale aminosuur te gebruik was gebaseer (kyk Afdeling 3.1.1.c) op die feit dat basiese hidrolise (verseping) van die metielester van prolien nie rasemisasie tot gevolg het nie. Die ontskerming is nodig sodat die vrygestelde karboksielgroep geaktiveer kan word, ten einde siklisering te bewerkstellig. Die totale sintetiese strategie word in Skema 3.8 opgesom.

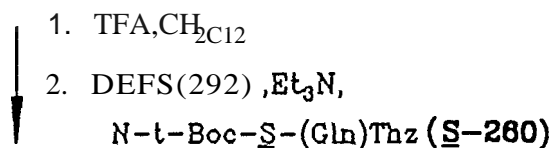
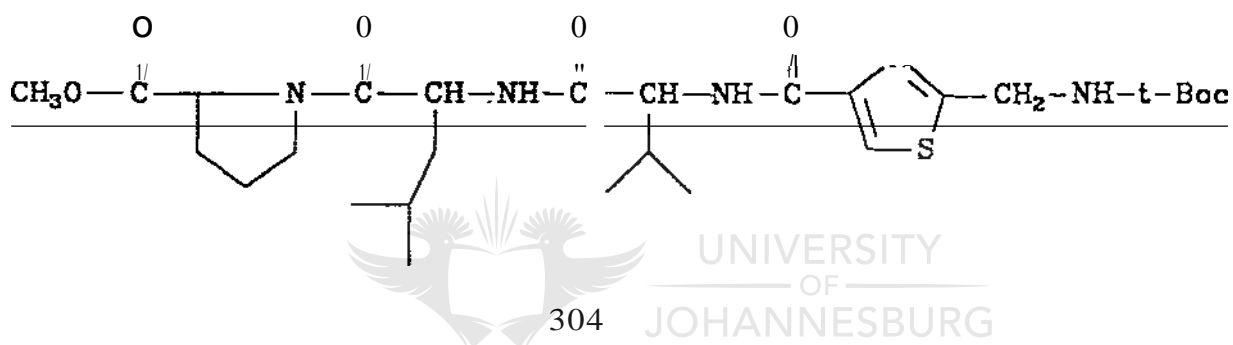
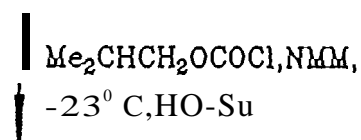
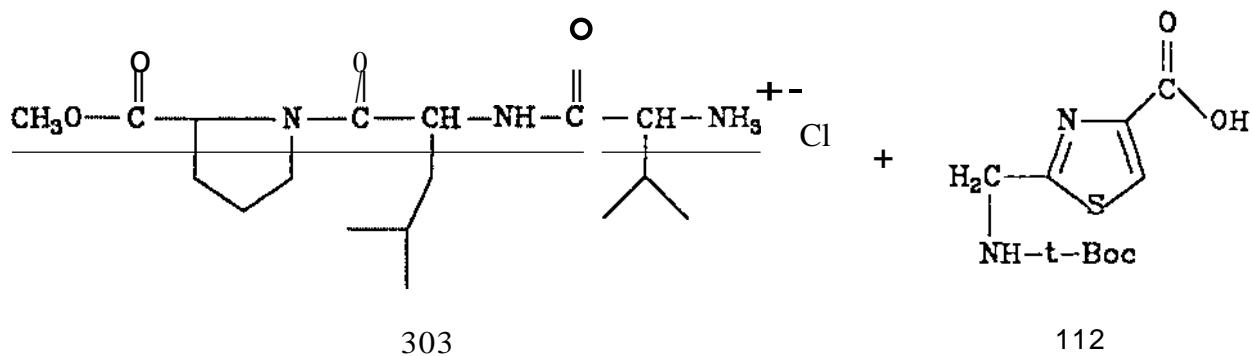


Die tripeptied (303) bestaande uit S-prolien, 5-leusien en 5-valien is berei soos in Skema 3.9 geïllustreer. Die reaksie van *N-t-Boc-5-Leu* (298) met isobutielchlorformiaat en N-metielformolien (NMM) by -23°C , gevolg deur die byvoeging van *5-Pro-OMe.HCl* (297), het *N-t-Boc-S-Leu-5-Pro-OMe* (299) in 'n opbrengs van 80% gelewer. Deur die behandeling van die dipeptied (299) met waterstofchloried in eter (droog en versadig) is *S-Leu-S-Pro-OMe.HCl* (300) in 'n opbrengs van 86% verkry. Die dipeptiedsout (300) is egter meer gerieflik in 'n totale opbrengs van 68% berei deur *N-t-Boc-S-Leu* (298) aan soortgelyke kondisies as bogenoemde, maar sonder suiwering van die dipeptiedtussenproduk (299), te onderwerp. Slegs 'n lae opbrengs (27%) van *N-t-Boc-S-Val-5-Leu-S-Pro-OMe* (302) is verkry indien die dipeptied (299) met trifluorasynsuur-dichloormetaan (1:1) ontskerm en met *N-t-Boc-5-Val* (301), volgens die gemengde anhidriedmetode by -23°C , gekoppel is. Behandeling van die tripeptied (302) met droe versadigde waterstofchloried in eter het *S-Val-5-Leu-5-Pro-OMe.HCl* (303) in 'n opbrengs van 98% gelewer. Die koppeling van *5-Leu-5-Pro-OMe.HCl* (300) met *N-t-Boc-S-Val* (301) volgens dieselfde metode (isobutielchlorformiaat, N-metielformolien, -23°C) gevolg deur hidrolise met waterstofchloried in eter was baie meer effektief en het die tripeptiedsout (303) in 'n totale opbrengs van 86% gelewer.

Na behandeling van *N-t-Boc-(Gly)Thz* (112, Skema 3.10) met isobutielchlorformiaat en N-hidroksisuksienimied in die teenwoordigheid van N-metielformolien, is die reaksiemengsel gefiltreer en die filtraat gekonsentreer onder verminderde druk. 'n Oplossing van *5-Val-5-Leu-5-Pro-OMe.HCl* (303) in tetrahydrofuraan is by die geaktiveerde ester gevoeg om na 16 uur by kamertemperatuur die tetrapeptied (304) in 'n opbrengs van 86% te lewer. *N-t-Boc-(Gly)Thz-5-Val-S-Leu-5-Pro-OMe* (304) is met trifluorasynsuur-dichloormetaan (1:1) ontskerm en met *N-t-Boc-s-(Gln)Thz* (S-260), gebruikmakende van dietielfosforielsianied (DEFS, 292) as aktiveringsreagens, gekoppel. Na 'n reaksietyd van 7 uur by kamertemperatuur het *N-t-Boc-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu-S-Pro-OMe* (305) in 'n opbrengs van 91% gevorm.



Skema 3.9



H_2NOC

305 : $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R}' = t\text{-Boc}$

306 : $\text{R} = \text{H}$, $\text{R}' = t\text{-Boc}$

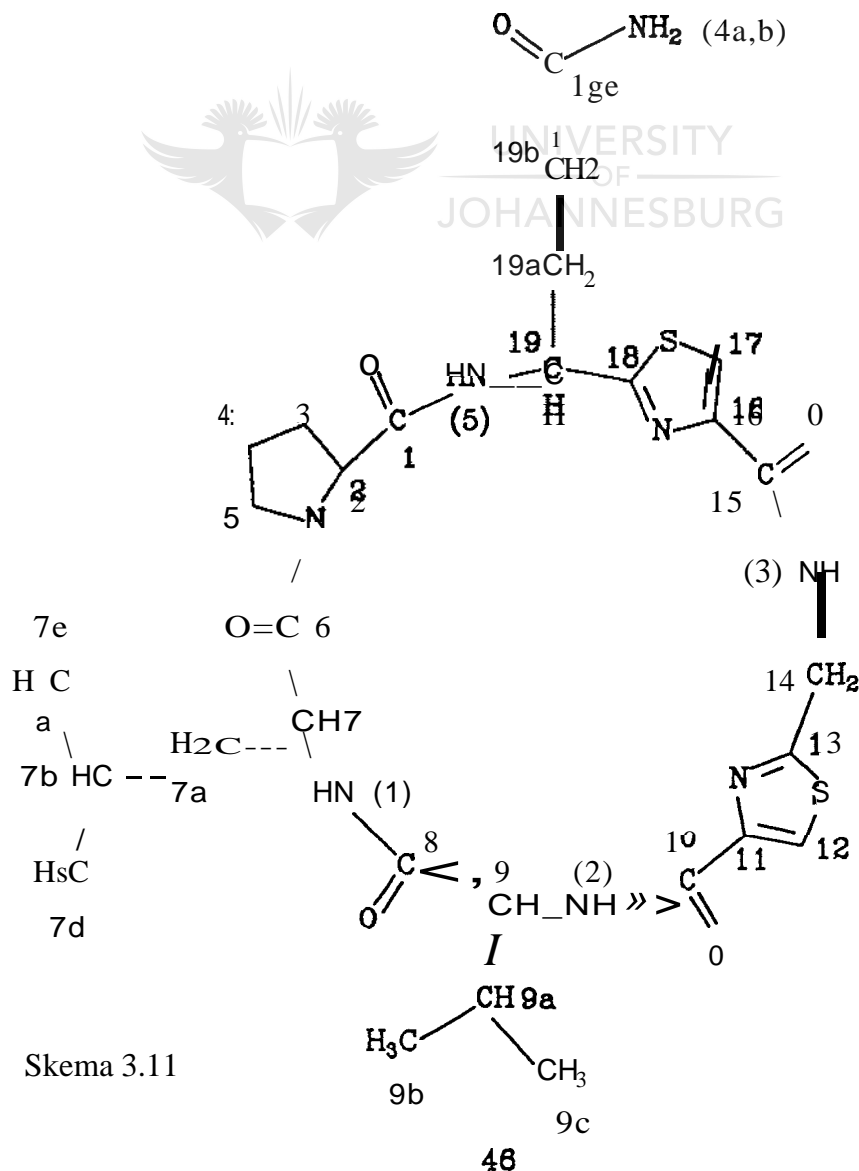
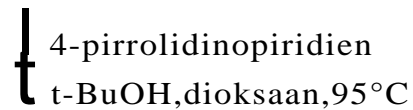
307 : $\text{R} = \text{C}_6\text{F}_5$, $\text{R}' = t\text{-Boc}$

308 : $\text{R} = \text{C}_6\text{F}_5$, $\text{R}' = \text{H}_2^+ \text{O}_2\text{CCF}_3^-$

Skema 3.10

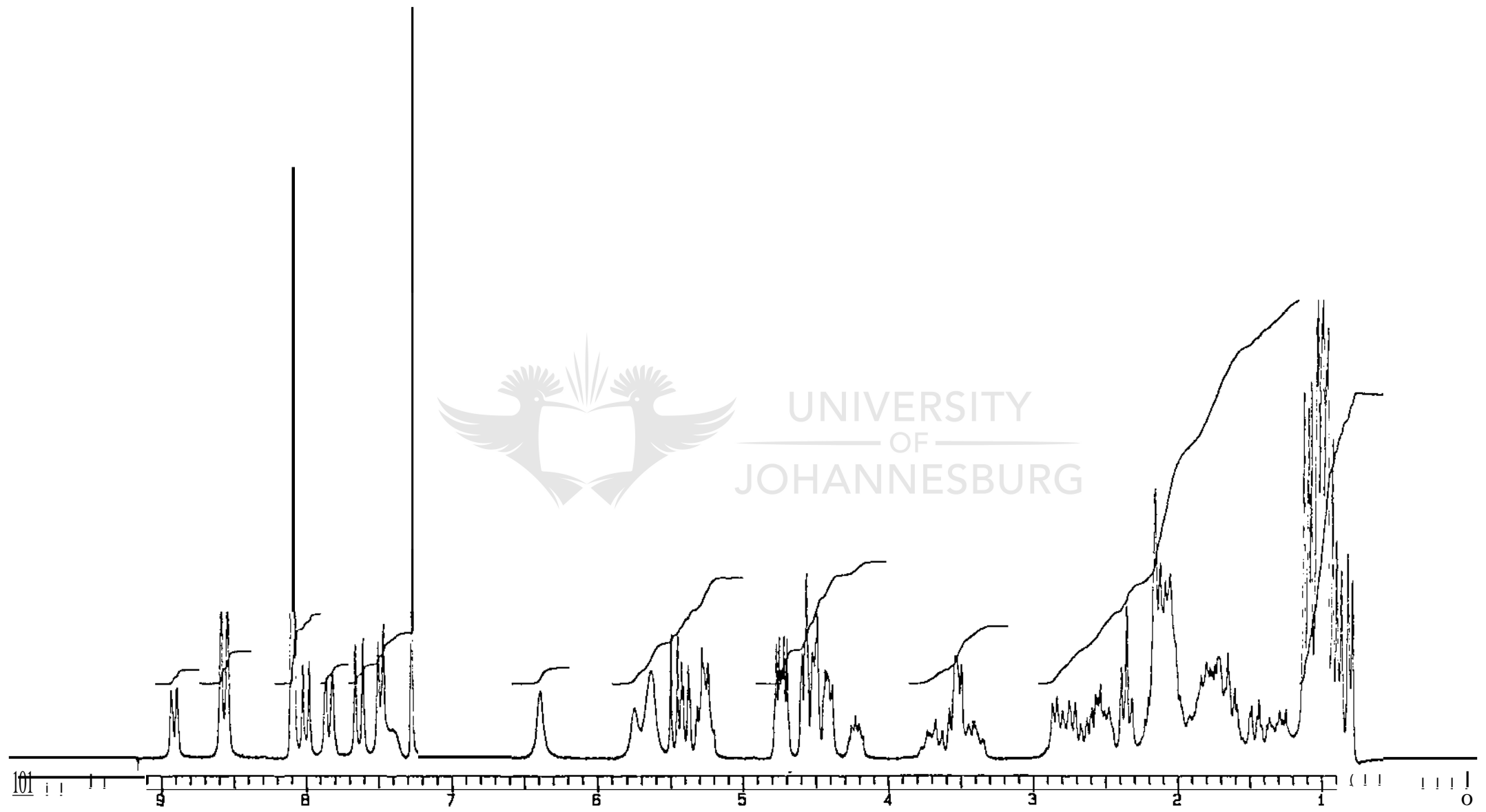
Die siklisering van die lineere pentapeptied (305) is deur die volgende reeks reaksies bewerkstellig. Die metielester van die prolien-komponent is d.m.v. basiese hidrolise ontskerm en die gevormde karboksiesuur (306) is na die ooreenkomstige pentafluorfenielester³⁰ (307) omgesit. Na filtrering van die pentafluorfenielester (307) deur Sephadex LH-20 (chloroform) is die t-butoksikarbonielbeskermingsgroep met trifluoorsynsuur (OoC, 1 uur) verwyder om die trifluoorsynsuursout (308) te lewer. Na verwydering van die vlugtige komponente *in vacuo* is in oplossing van die peptiedpentafluorfenielester-trifluoorsetaat (308, Skema 3.11) in dioksaan baie stadig by 95°C by 'n

308



oplossing van 4-pirrolidinopiridien en t-butanol in dioksaan gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 2.5 uur by die temperatuur geroer. Versigtige chromatografie van die produk oor Sephadex LH-20 (chloroform) en silika (chloroform + 7% metanol) het die sikliese peptied (46) in 'n opbrengs van 71% gelewer. Die opbrengs vergelyk uitstekend met die 18% deur Pettit *et al.*⁵⁴ verkry, en wat ornsetting van *N-t-Boc-R/s-{Gln}Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu-S-Pro* na die ooreenstemmende 2,4,5-trichloorfenielester, ontskerming deur behandeling met trifluoorasynsuur en behandeling van 'n verdunde oplossing van die gevormde sout in tetrahidrofuraan met piridien behels het.

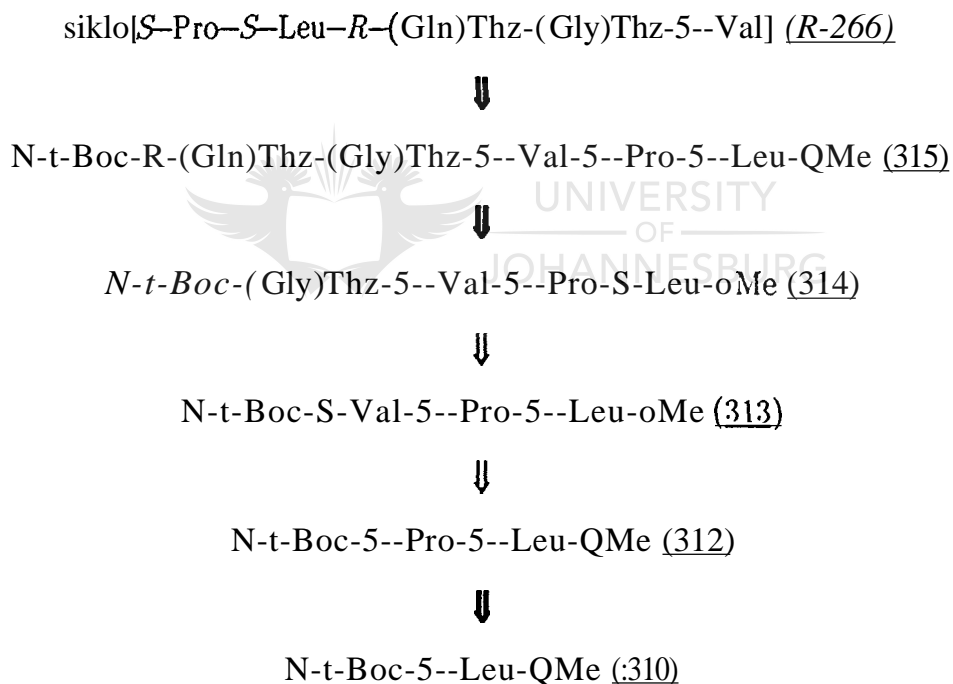
Alhoewel die homogeniteit van die verbinding (46) bevestig is deur die gedrag daarvan in 'n verskeidenheid van chromatografiese sisteme ($R_f = 0.42$, chloroform:metanol:water 100:10:1), het die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra daarvan aanduidings van 'n mengsel van twee verbindings gegee. Verdubbeling van baie van die NH- en CH-resonansies is waargeneem. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van 46 word in Figuur 3.1 aangetoon. Hierdie resultaat was onverwags aangesien die lineere pentapeptidvoorloper (30.5) ongetwyfeld 'n enkele verbinding verteenwoordig het. Alhoewel die sikliseringsmetode wat gebruik is nie in ander gevalle rasernisasie van die geaktiveerde aminosuurkomponente tot gevolg gehad het nie, is die moontlikheid van rasemisasie in ons geval oorweeg. 'n Deeglike studie van die temperatuurafhanklikheid van die ^1H -k.m.r.-spektra van die sikliese peptied (46) in gedeutereerde dimetielsulfoksied het egter bewys dat die verbinding in twee diskrete konformasies, wat in stadige ewewig met mekaar verkeer, by lae temperatuur bestaan. Dit is interessant om daarop te let dat Schmidt *et al.*⁵¹ ook aanduidings verkry het dat sekere isomere van dolastatien 3 meer as een konformasie aanneem. In hierdie geval egter was die tydskaal van verwisseling tussen die verskillende konformasies vergelykbaar met die k.m.r.-tydskaal sodat piekverbreding eerder as verdubbeling van seine opgemerk is.



Figuur 3.1 : Die ¹H-kmr-spektrum van siklo[S-Pro-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu] (46) (200 MHz, dpm, $CDCl_3$)

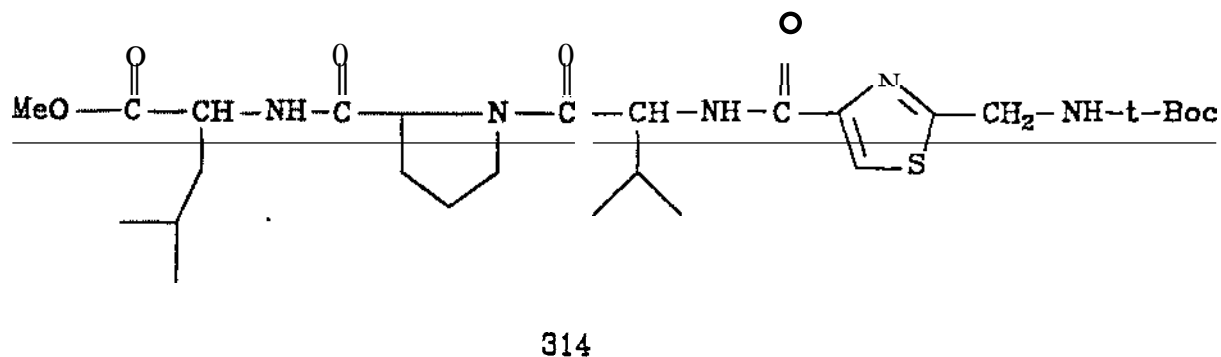
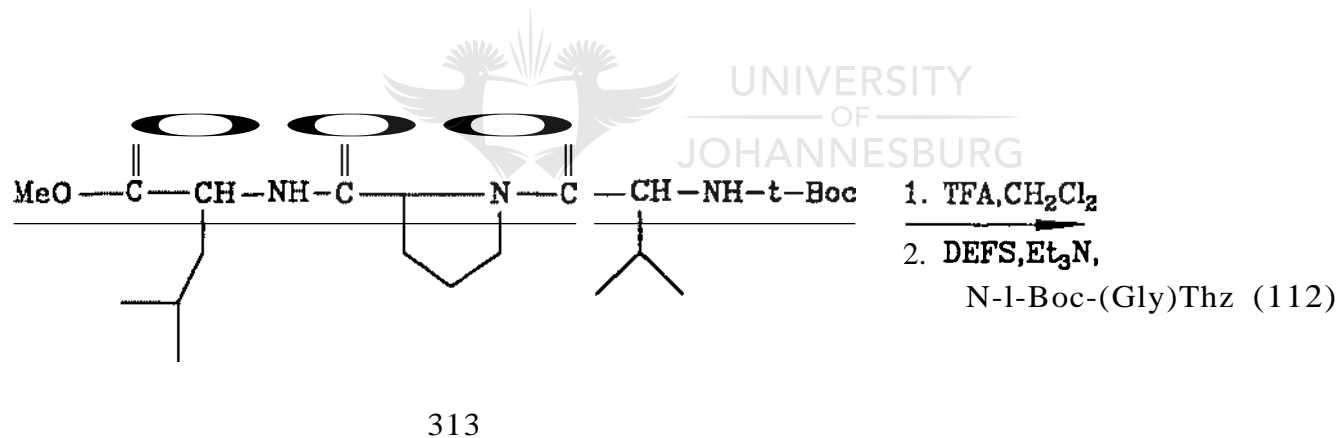
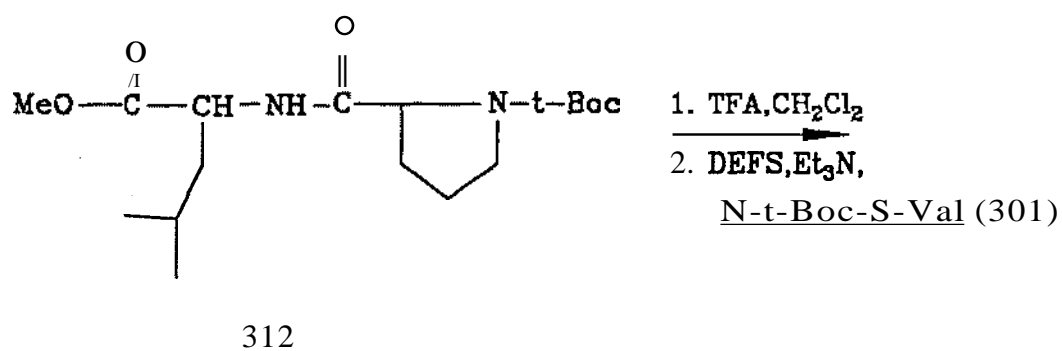
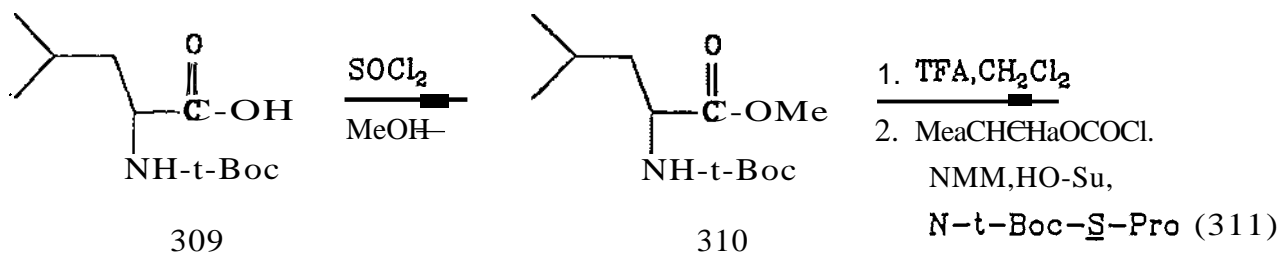
3.1.3 Die Sintese van Dolastatin 3, naamlik siklo [~~S-Pro-S-Leu-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5--Val~~] (S-266)

Die sintese van die voorgestelde aminosuursekwens siklo [Pro-Leu-(Gln)Thz-(Gly)Thz-Val] (266) is nou aangepak. Soos reeds genoem is besluit om twee diastereomere van die spesifieke sekwens, naamlik siklo [S-Pro-5--Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5--Val] (R-266) en siklo [5--Pro-5--Leu-5--(Gln)Thz-(Gly)Thz-5--Val] (5--266), te sintetiseer. Met aanvang van hierdie sintese was die bereiding van die twee enantiomere van N-t-Boc-(Gln)Thz (R-260 en 5--260) nog nie voltooi nie, Gevolglik is aanvanklik gepoog om 'n sintetiese roete (Skema 3.12) te ontwikkel wat die (Gln)Thz-komponent as laaste boublok van die lineere peptied sou inkorporeer.



SKEMA 3.12: Retroanalise van R-266.

N-t-Boc-S-Leu-OMe (310, Skema 3.13) is in hoë opbrengs deur die reaksie van tionielchloried en metanol met N-t-Boc-5--Leu (309) berei. Ontskerming van 310 deur behandeling met trifluorasynsuur-dichloormetaan (1:1), gevolg deur koppeling met N-t-Boc-5--Pro (311) met behulp van isnbutielchlorformiaat en N-hidroksisuksien-

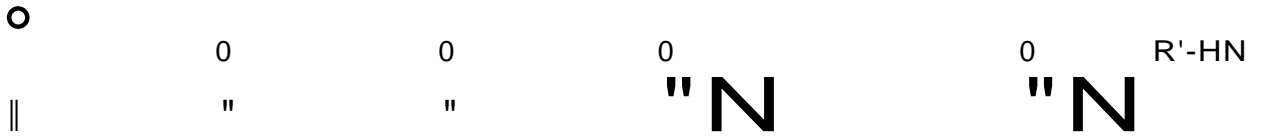


imied, het die beskermde dipeptied (312) in 'n opbrengs van 73% gelewer. Die *t-but*-oksikarbonielbeskermingsgroep van *N-t-Boc-S-Pro-S-Leu-OMe* (312) is met trifluorasynsuur in dichloormetaan (1:1) verwyder. Die trifluorasynsuursout, sowel as die vry amien, van die ontskermd dipeptied het egter geen reaksie met geaktiveerde esters van *N-t-Boc-S-valien* (301) (berei met isobutielchlorformiaat/N-hidroksisuksienimied of N,N'-disikloheksielkarbodiimied/N-hidroksisuksienimied of N,N'-disikloheksielkarbodiimied/koper(II)chloried) ondergaan nie. Afgesien van moontlike ongunstige faktore kan die inertheid van die aminokomponent aan die swakker nukleofilisiteit van die sekondere amien van prolien toegeskryf word. Die superioriteit van diëtielfosforielsianied (292, DEFS) teenoor tradisionele aktiveringsreagense ten opsigte van peptiedvorming is weer eens bewys deurdat gebruik daarvan *N-t-Boc-5-Val-S-Pro-S-Leu-OMe* (313) in 'n opbrengs van 91.6% gelewer het. Na ontskerming van die tripeptied (313) met trifluorasynsuur in dichloormetaan (1:1), het koppeling van die vry amien met *N-t-Boc-(Gly)Thz* (112) in die teenwoordigheid van diëtielfosforielsianied en triëtielamien, die beskermde tetrapeptied (314) in 'n opbrengs van 87.8% gevorm.

Die tetrapeptied (314) is met trifluorasynsuur in dichloormetaan (1:1) ontskerm, waarna koppeling met *N-t-Boc-R-(Gln)Thz* (R-260) (diëtielfosforielsianied/triëtielamien) die gewenste *N-t-Boc-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-5-Leu-OMe* (315, Skema 3.14) in 'n opbrengs van 86% gelewer het. Alkaliese hidrolise van 315, gevolg deur behandeling van die ontskermd pentapeptied (316) met N,N'-disikloheksielkarbodiimied en 2,4,5-trichloorfenol in anhidriese dimetielformamied, het die geaktiveerde ester (317) gelewer. Die hoofproduk (317) is deur chromatografie op 'n kort silikakolom (chloroform + 2.5% metanol) geïsoleer. Die trifluorasynsuursout (318) is verkry deur die reaksie van 317 met trifluorasynsuur in dichloormetaan. Behandeling van 'n verdunde oplossing van die geaktiveerde lineêre pentapeptied (318) in tetrahydrofuraan met piridien vir 2 dae by kamertemperatuur het egter in plaas van die verwagte siklisering, grootskaalse pirrolidoonkarboniëlvorming (Skema 3.15) tot gevolg gehad. Dit is 'n bekende newereaksie²⁴⁴ wat normaalweg verkry word indien vorming van die gewenste

314

1. TFA, CH₂Cl₂
2. DEFS, Et₃N,
N-t-Boc-R-(Gln)Thz (R-260)



H₂NOC

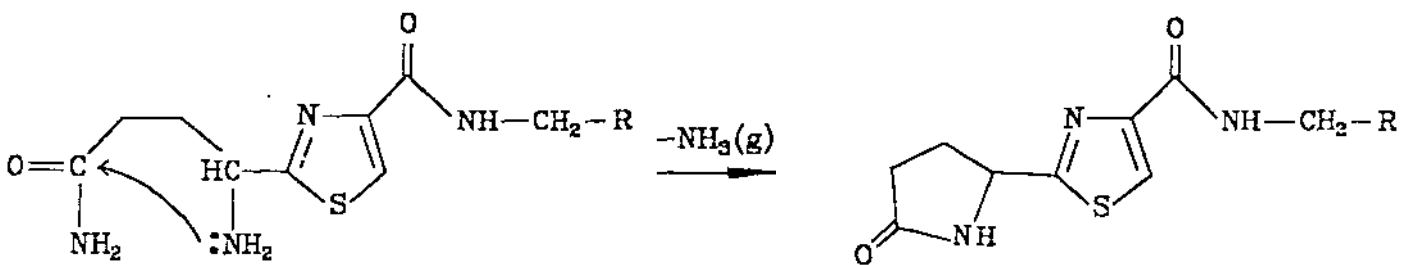
- 315 : R = CH₃ • R' = t-Boc
- 316 : R = H , R' = t-Boc
- 317 : R = C₆H₅ • R' = t-Boc
- 318 : R = C₆H₄Cl₃ , R' = H₂⁺⁻O₂CCF₃
- 319 : R = C₆F₅ , R' = t-Boc
- 320 : R = C₆F₅ • R' = H₂⁺⁻O₂CCF₃

4-pirrolidinopiridien
t-BuOH, dioksaan, 95 °C

siklo[S-Pro-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-.5-Val]

R-266

Skema 3.14



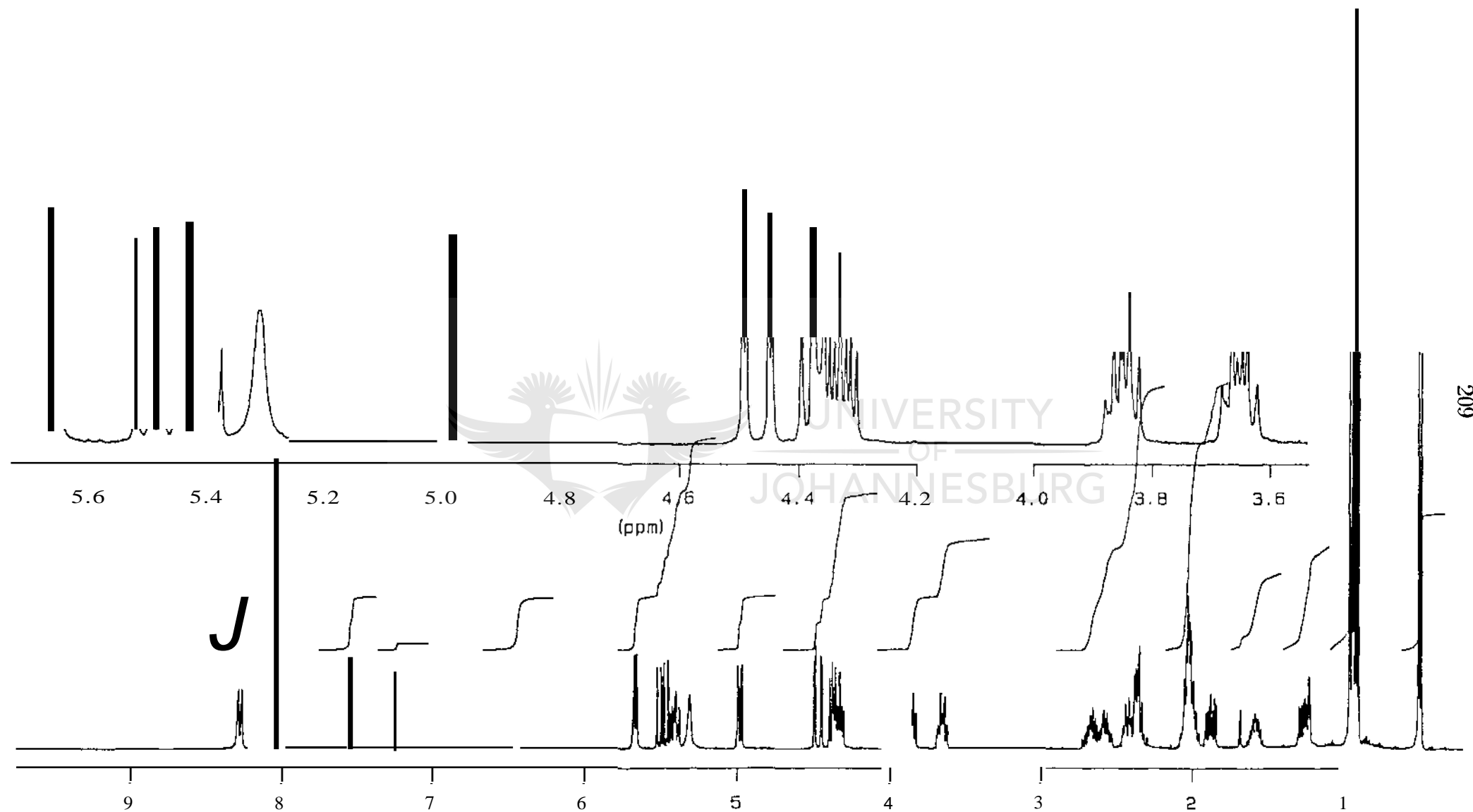
Skema 3.1.5

peptiedbinding vanwee steriese redes baie stadig plaasvind. Hieruit is dit duidelik dat die teenwoordigheid van die steriese groot leusienkomponent op die C-terminus van die lineere peptied wel nadelig vir ringsluiting is.

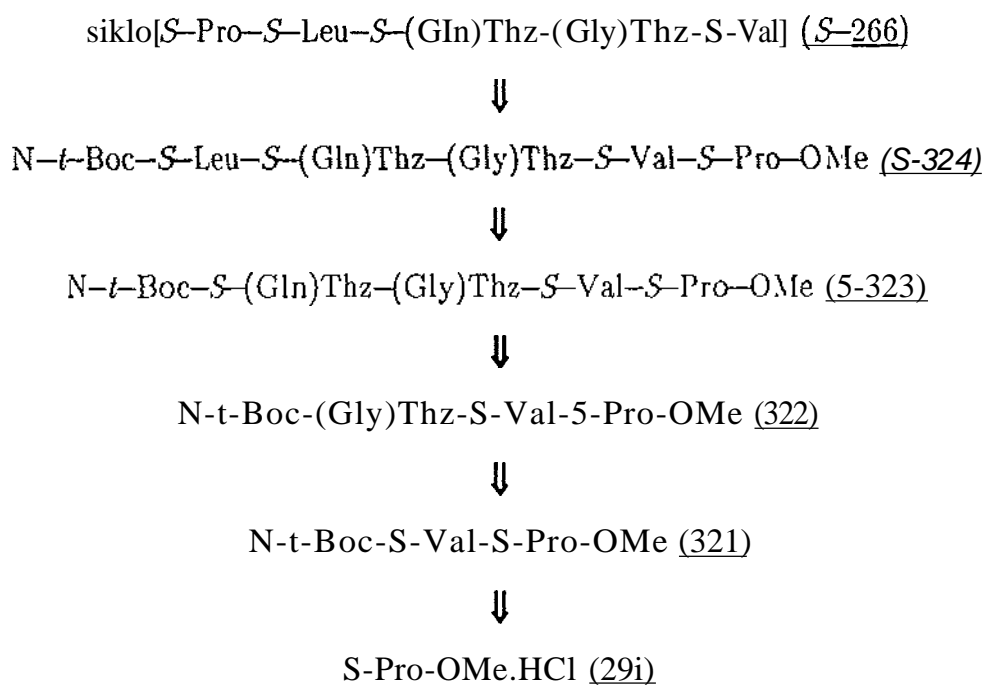
Die probleem kon gedeeltelik oorkom word deur omsetting van die ontskernde suur van die lineere pentapeptied (316) na die ooreenkomstige pentafluorfenielester (319). Na chromatografie van die pentafluorfenielester (319) op Sephadex LH-20 (chloroform) is die N-t-butoksikarbonielgroep deur behandeling met trifluorasynsuur in dichloormetaan (1:1) verwyder. 'n Oplossing van die p(p'ticdpentafluorfenielester-trifluorasetaat (320) in dioksaan is baie stadig by 95°C by 'n oplossing van 4-pirrolidinopiridien en t-butanol in dioksaan gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 7 uur by dié temperatuur geroer. Chromatografie van die produk oor Sephadex LH-20 (chloroform) en silika (chloroform + 7% metanol) het die sikliese peptied (*R-266*) in 'n opbrengs van 46% gelewer.

Die sikliese peptied (*R-266*) was egter nie identies aan dolastatien 3 nie. Op dunlaag (silika) het die sintetiese sikliese peptied (*R-266*) 'n effens laer R_f (0.35, chloroform:metanol:water 100:10:1) as dolastatien 3 ($R_f = 0.41$, chloroform:metanol:water 100:10:1) getoon. Die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van die sintetiese produk (*R-266*) het betekenisvol van dié van dolastatien 3 verskil. 'n Vergelykende studie van die ^1H - en ^{13}C -spektra van die sikliese pentapeptied *R-266* met dolastatien 3 word in Afdeling 4.7 uitgevoer. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van *R-266* in deuteriochloroform word in Figuur 3.2 aangetoon.

Vanwee die relatief lae opbrengs wat met die sikliseringstap in die bereiding van siklo [S-Pro-S-teu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (*R-266*) verkry is, sowel as die moontlikheid dat rasemisasie w die leusienkomponent op die C-terminale posisie kan plaasvind, is die sintetiese strategie vir die sintese van siklo [Pro-Leu-(Gln)Thz-(Gly)Thz-Val] (*266*) hersien en is besluit om die strategie wat in Skema 3.16 geïllustreer word te volg.



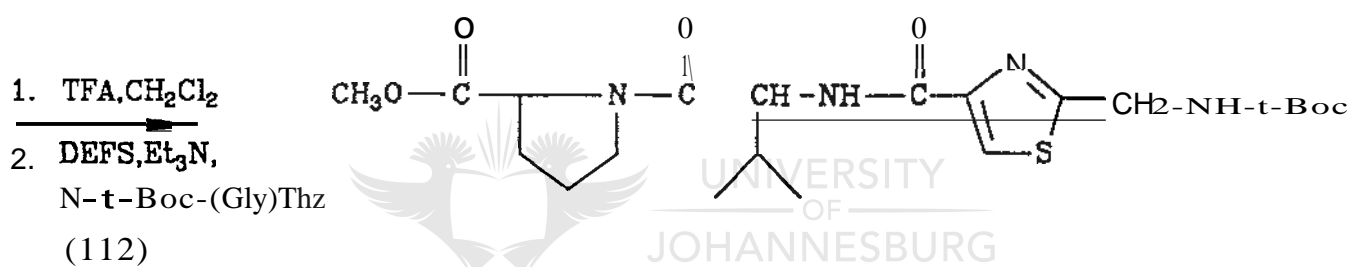
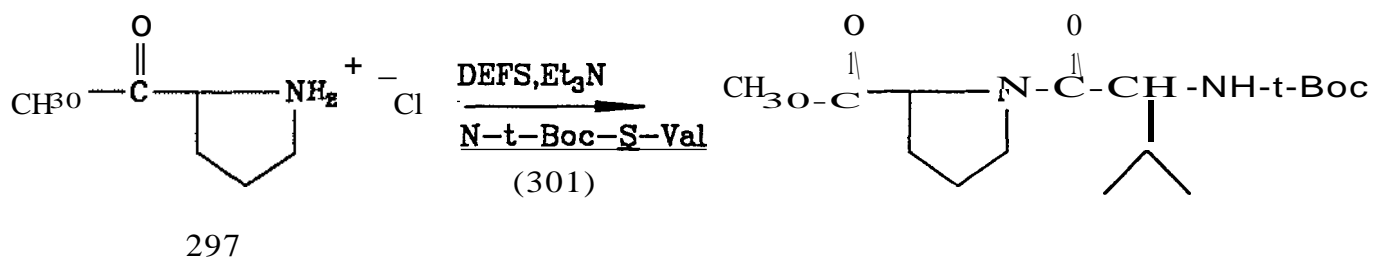
Figuur 3.2 : Die ¹H-kmr-spektrum van siklo[S-Pro-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (*R*-266) (400 MHz, dpm, $CDCl_3$)



SKEMA 3.16: Retroanalise van S-266.

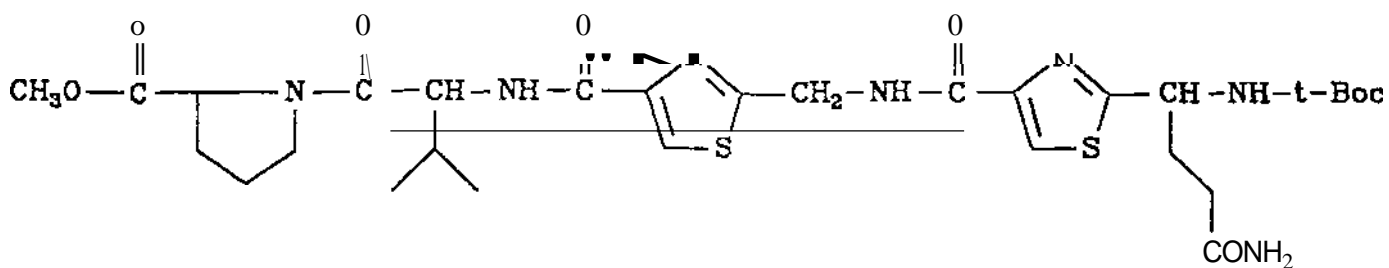
B-Prolien metielester (297, Skema 3.17) en N-t-Boc-S-Val (301) is in 'n opbrengs van 92% met behulp van dietielfosforielsinganied (DEFS) as aktiveringsreagens gekoppel. Die resulterende beskermde dipeptied (321) is met trifluorasynsuur in dichloornetaan (1:1) ontskerm, waarna reaksie met N-t-Boc-(Gly)Thz (112) in die teenwoordigheid van dietielfosforielsinganied N-t-Boc-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (322) in 'n opbrengs van 91% gelewer het. Verwydering van die N-t-butoksikarbonielgroep van die tripeptied met trifluorasynsuur, gevolg deur behandeling van die gevormde trifluorasetaatsout met dietielfosforielsinganied en N-t-Boc-S-(Gln)Thz (8-260), het N-t-Boc-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (5-323) in 'n opbrengs van 93% gevorm. Die diastereomeer N-t-Boc-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (R-232) is op 'n soortgelyke wyse met N-t-Boc-R-(Gln)Thz (R-260) berei.

Ontskerming van die tetrapeptied (5-323, Skema 3.18) deur behandeling met trifluorasynsuur, gevolg deur koppeling met N-t-Boc-B-Leu (298) deur die dietielfosforiel-

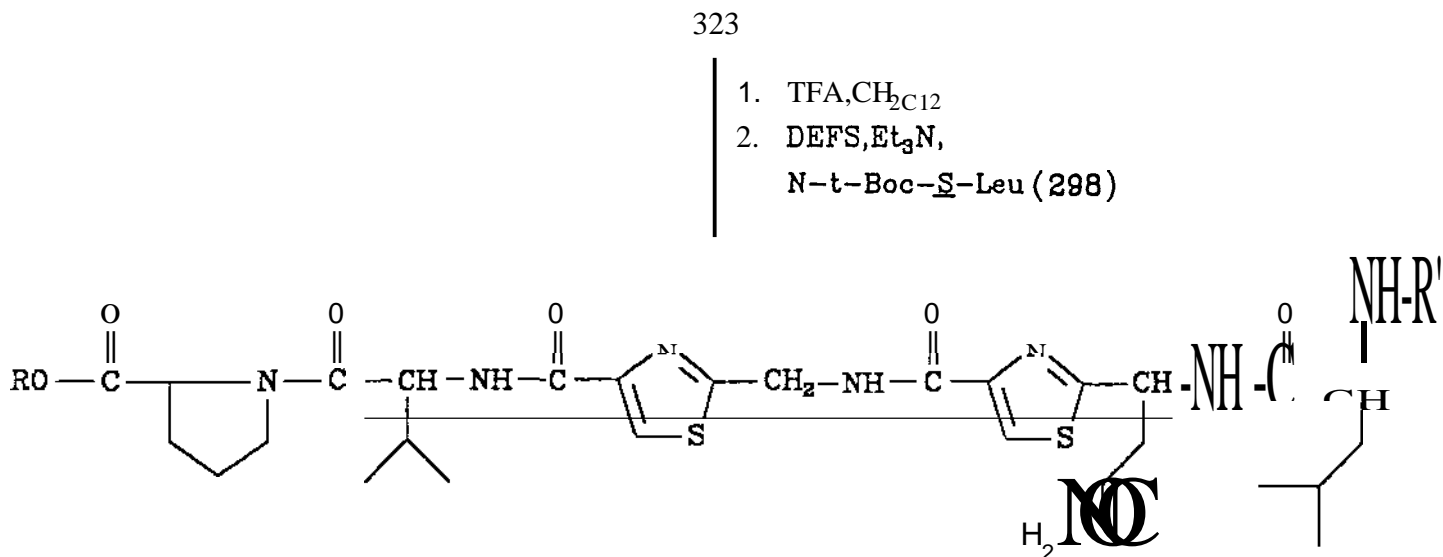


322

1. TFA, CH₂Cl₂
2. DEFS, Et₃N,
N-t-Boc-S-(Gln)Thz (**S-260**) of
N-t-Boc-B-(Gln)Thz (**B-260**)



323



324 : R = Me • H' = t-Boc

325 : H = H • H' = t-Boc

326 : R = C₆F₅ ∴ H' = t-Boc

327 : H = C₆F₅ · H' = H₂⁺⁻ O₂CCF₃



4-pirrolidinopiridien

t-BuOH

dioksaan

95°C

siklo[S-Pro-S-Leu-(R of S)-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val]

R- of S- 266

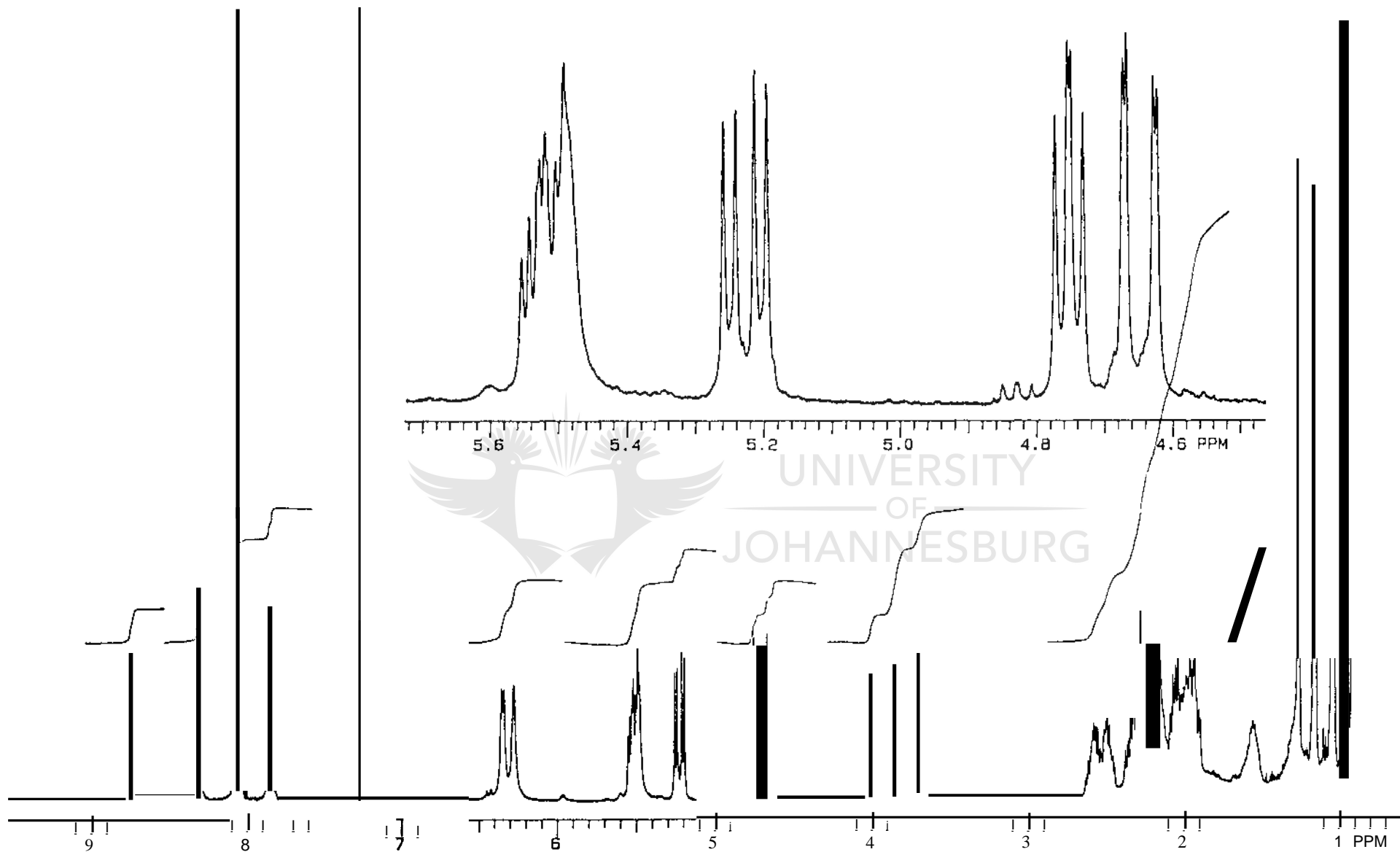
Skema 3.18

sianiedmetode het N-t-Boc-S-Leu-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5-Val-5-Pro-OMe (5-324) in 'n opbrengs van 86% gelever. Die ooreenkomstige diastereomeer (R-324) is op analoe wyse vanaf (R-323) berei. Die ontskermd (325) is verkry deur alkaliese hidrolise van die metielester (324) waarna reaksie met pentafluorfenol en N,N'-disikloheksielkarbodiimid, gevolg deur chromatografie van die produk op Sephadex LH-20 (chloroform), die geaktiveerde ester (326) in hoë opbrengs gelever het. Die pentafluorfenielester (326) is met trifluorasynsuur in dichloormetaan behandel en die gevormde

trifluorasetaatsout (327), opgelos in dioksaan, is baie stadig by 95°C by In oplossing van 4-pirrolidinopiridien en t-butanol in dioksaan gedrup. Na 'n reaksietyd van 2.5 uur by dié temperatuur het die siklisering volledig verloop. Die produk is agtereenvolgens op Sephadex LH-20 (chloroform) en silika (chloroform + 7% metanol.) gechromatografeer. Beide siklo [5-Pro-5-Leu-s-{Gln}Thz-(Gly)Thz-5-Val] (S-266) en siklo [8-Pro-5-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5-Val] (R-266) is op die manier in hoë opbrengs (75.6% en 71.3% onderskeidelik) berei,

Hierdie sintetiese siklo [5-Pro-5-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (R-266) was identies aan die produk wat volgens die alternatiewe roete (kyk Skernas 3.13 en 3.14) berei is. Die sintetiese siklo [5-Pro-5-Leu-5-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (8-266) was egter identies aan die natuurprodukt dolastatin 3. Die identiteit is bewys op grond van die superponeerbaarheid van hoë veld ^{13}C - en ^1H -k.m.r.-spektra (400 MHz, CH_2Cl_2 - d_2) en EIMS, sowel as identiese chromatografiese gedrag (op silikajel, normale en omgekeerde fase) in vier verskillende (bv. dichloormetaan:metanol::water 90:10:0.8) oplosmiddelsisteme. Die ^1H -k.m.r.-spektrum van S-266 (dolastatin 3) in deuteriochloroform word in Figuur 3.3 aangetoon. Die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van 5-266, sowel as die van die lineere analoe 5-324 en R-324, word in Afdeling 4.7 aan die hand van 'n konformasionele model bespreek. Beide die sintetiese en natuurlike monstere van dolastatin 3 toon dieselfde inhiberende groei van PS leukemie ($\text{ED}_{50} = 0.16$ vs. $0.17 \mu\text{g}/\text{ml}$) sowel as 'n soortgelyke vermoë om in oplossing, veral chloroform, te ontbind.

As gevolg van die relatief hoë opbrengste en gemak (d.w.s. kort reaksietye) waarmee die lineere pentapeptiede van beide diastereomere (R-327 en 5-327) gesikliseer bet, wil dit dus voorkom dat beide die lineere pentapeptiede reeds oor gunstige konformasies moet besit om ringsluiting te ondergaan, d.w.s, dat die konformasies van die onderskeie lineere pentapeptiede en sikliese peptiede baie min van mekaar verskil. Die superioriteit van dietielfosforiëlsianied as aktiveringsreagens en pentafluorfenol as sikliseringsreagens teenoor suiwer tradisionele metodes in peptiedsintese is met hierdie ondersoek onomwonde bewys.



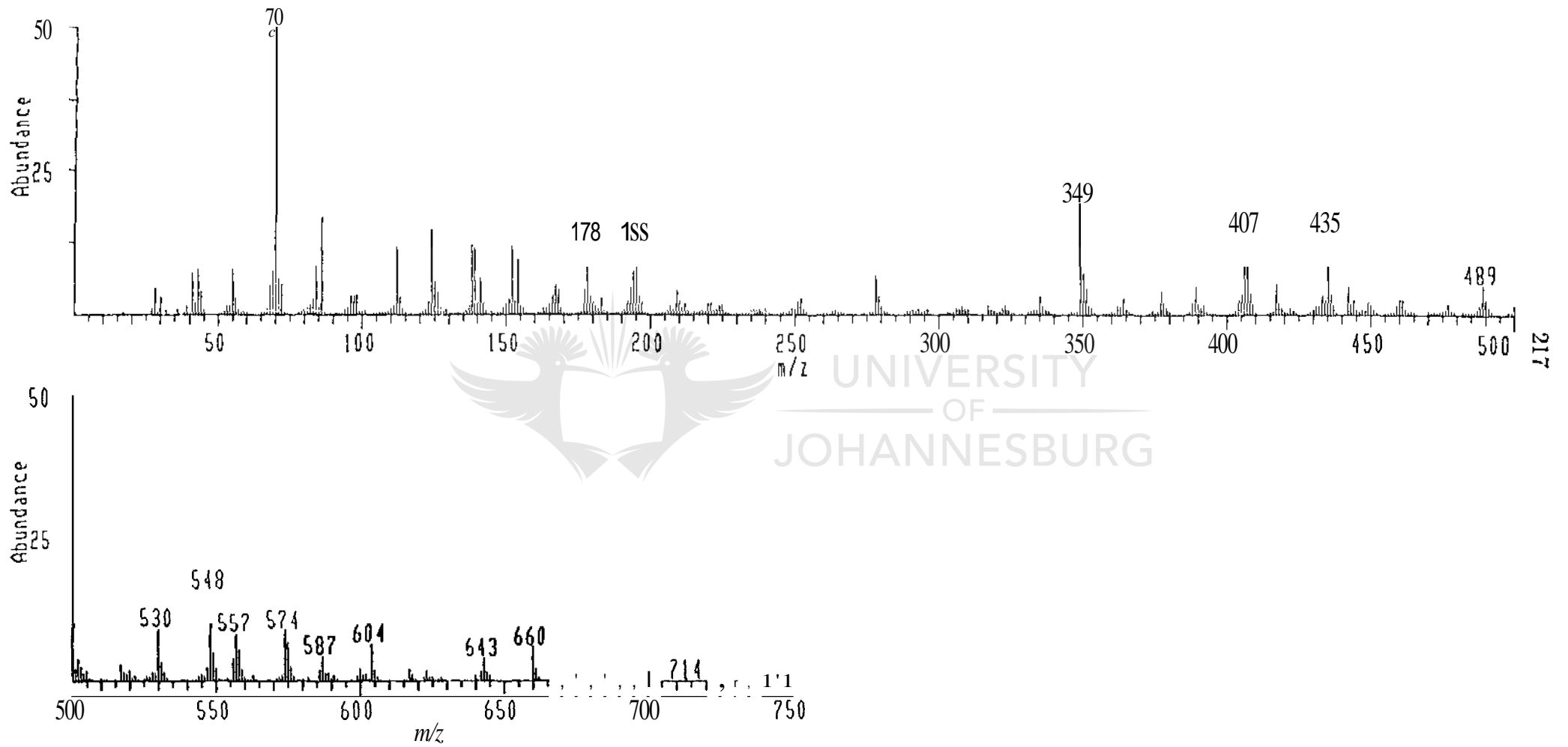
Figuur 3.3 : Die ¹H-kmr-spektrum van siklo[S-Pro-S-Leu-s-{Gln}Thz-(Gly)Thz-S-Val] (*S*-266) (400 MHz, dpm, CDCl₃)

3.2 ONDERSOEK VAN DIE ELEKTRONBIPAKGEINDUSEERDE FRAGMENTASIESPEKTRA VAN DOLASTATIEN 3 ISOMERE

3.2.1 Inleiding

Ten spyte van die vinnige afname van piekintensiteite by hoer massa, kan die aminosuursekwens van geskikte gederivatiseerde lineere peptiede relatief maklik met elektronimpakgeinduseerde massaspektrometrie (EIMS) bepaal word.²⁷⁷ Interpretasie van die spektra word baie vergemaklik deur die oorwegende voorkoms van een spesifieke fragmentasiereaksie, naamlik klowing van die peptiedbinding met retensie van lading op die karbonielfunksionaliteit (Klowing A in Skema 3.19). Orndat relatief min werk oor die EI-fragmentasie van sikliese peptiede gedoen is, het Pettit *et al.*²⁹ klaarblyklik aanvaar dat fragmentasie van hierdie tipe verbindings soortgelyk aan die van lineere peptiede plaasvind en het gevolglik die akkurate massas wat vir individuele pieke verkry is, binne hierdie aanname probeer akkomodeer. Dit sal verklaar waarom in hierdie publikasie daar in baie gevalle swak korrelasies (verskille is dikwels baie grater as 3 dpm (dele per miljoen) wat normaalweg as aanvaarbaar beskou word) tussen die berekende en eksperimentele akkurate massas aangegee is. Dit is dus duidelik dat indien die hoe-resolusie EIMS-spektra (HREIMS, d.w.s. spektra met gepaardgaande eenduidige toekenning van elementere samestelling van meeste van die pieke in die spektrum) van sikliese peptiede geëvalueer word met die oog op die bepaling van die aminosuursekwens, dit noodsaaklik is om die moontlikheid van fragmentasies anders as die normale peptiedbinding(N-eO)klowing ook te oorweeg.

Anders as lineere peptiede, vertoon sikliese peptiede normaalweg nie 'n drastiese afname in piekintensiteit in die hoë massagebied nie en gewoonlik word relatief sterk molekulere ione waargeneem. Ter illustrasie word die EIMS-spektrum van siklo [S-Pro-R/S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu] (46, Figuur 3.3) aangegee. Die interpretasie van die EIMS-spektra van sikliese peptiede word egter heelwat bernoeilik deur 'n verskeidenheid van kompeterende fragmentasiereaksies wat kan plaasvind. Hierdie reaksies is deur Millard²⁷⁸ en Rozynov *et al.*²⁷⁹ beskryf na EIMS-studies van model sikliese



Figuur 3.4 : Die EIMS-spektrum van siklo[5-Pro-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu] (46)

- (ii) Klowing van die C^{α} -CO binding met retensie van lading op een van beide kante (Tipes C en D)
- (iii) Klowing van die N- C^{α} binding met retensie van lading op een van beide kante (Tipes E en F)
- (iv) Elk van bogenoemde tipes klowing kan met waterstofmigrasie òf na òf weg van die gelaaiete partikel gepaardgaan ($\pm H$).

Tesame met bostaande tipes (i-iv), wat klowing van die bindings wat die makrosikliese ringvorm verteenwoordig, kan neutrale molekules of radikale vanaf die sykettings van die individuele aminosuurresidue afgekloof word. Dus:

- (v) Klowing van die C^{α} - C^{β} binding in residue wat 'n γ -waterstof bevat (McLafferty-herrangskikking, Tipe G)
- (vi) Homolitiese klowing van die C^{α} - C^{β} binding indien die resulterende neutrale radikaal voldoende mesomerie gestabiliseer is (Tipe H).

Neutrale verliestipes G en H kan vanaf enige gelaaiete fragment bevattende die geskikte residu plaasvind.

- (vii) Homolitiese klowing van die C^{β} - C^{γ} binding kan ook plaasvind indien die N- C^{α} binding reeds gekloof is, op voorwaarde dat die resulterende gelaaiete radikaal voldoende gestabiliseer is (Tipe I).

3.2.2 HREIMS-spektra van Dolastatin 3 Isomere

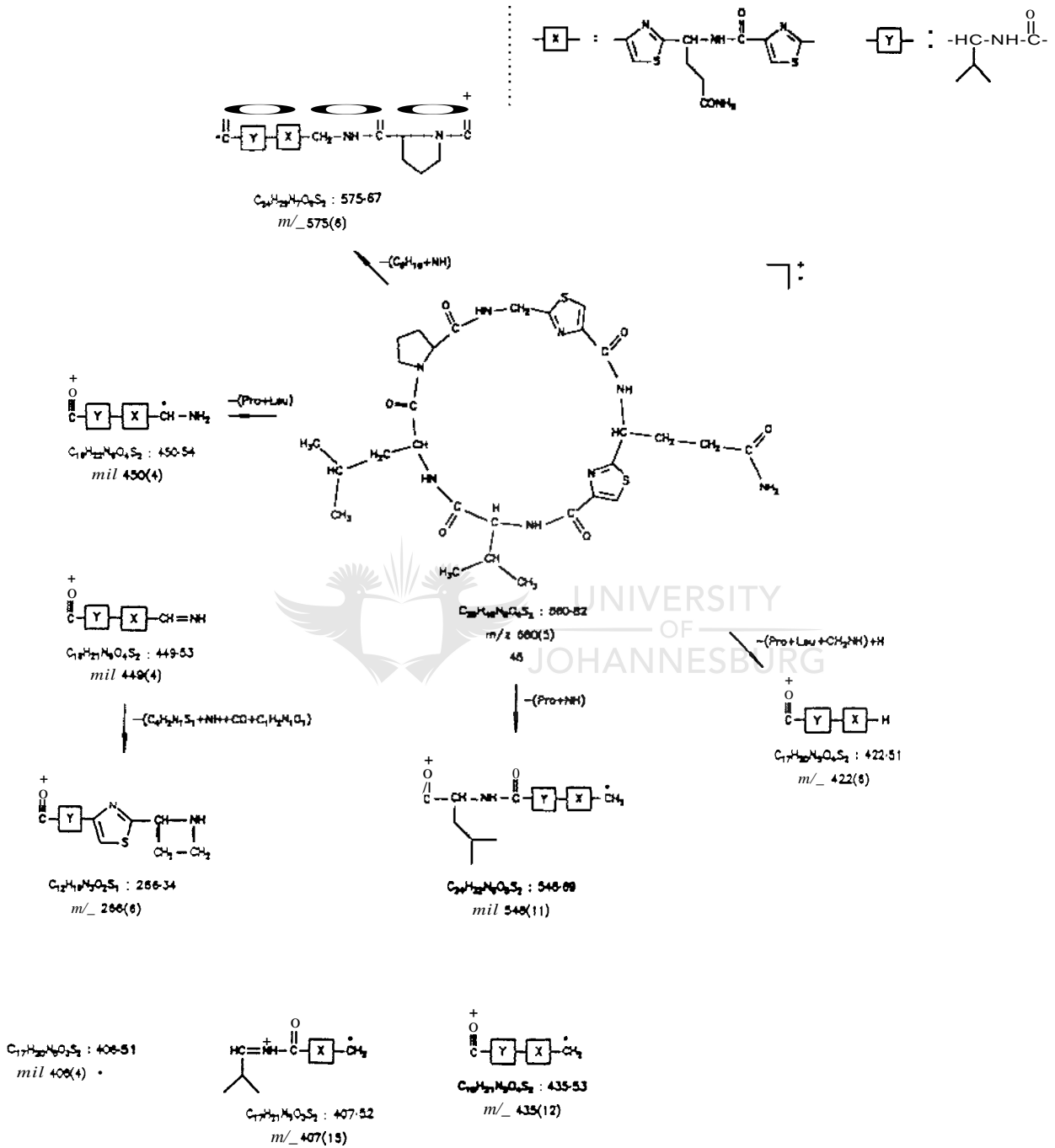
Ter inleiding van hierdie bespreking word die aandag gevestig op die feit dat goud(Au)kroesies in plaas van die by die RAU gebruiklike aluminium(Af)kroesies vir invoeging van die monster by die massaspektrometer gebruik is. In hierdie ondersoek is gevind dat die monster dikwels met die aluminium by die hoë temperatuur reageer wat benodig was om die verbinding te vervlugtig.

Indien die HREIMS-spektra van drie isomere van dola.station 3, naamlik siklo [Pro-Leu-Val-(Gln)Thz-(Gly)Thz] (44), siklo [Pro-{Gly}Thz-(Gln)Thz-Val-Leu] (45) en siklo [Pro--(Gln)Thz-(Gly)Thz-Val-Leu] (46) [Skemas 3.20, 3.21 en 3.22 onderskeidelik), geanaliseer word, kan die volgende algemene afleidings gemaak word:

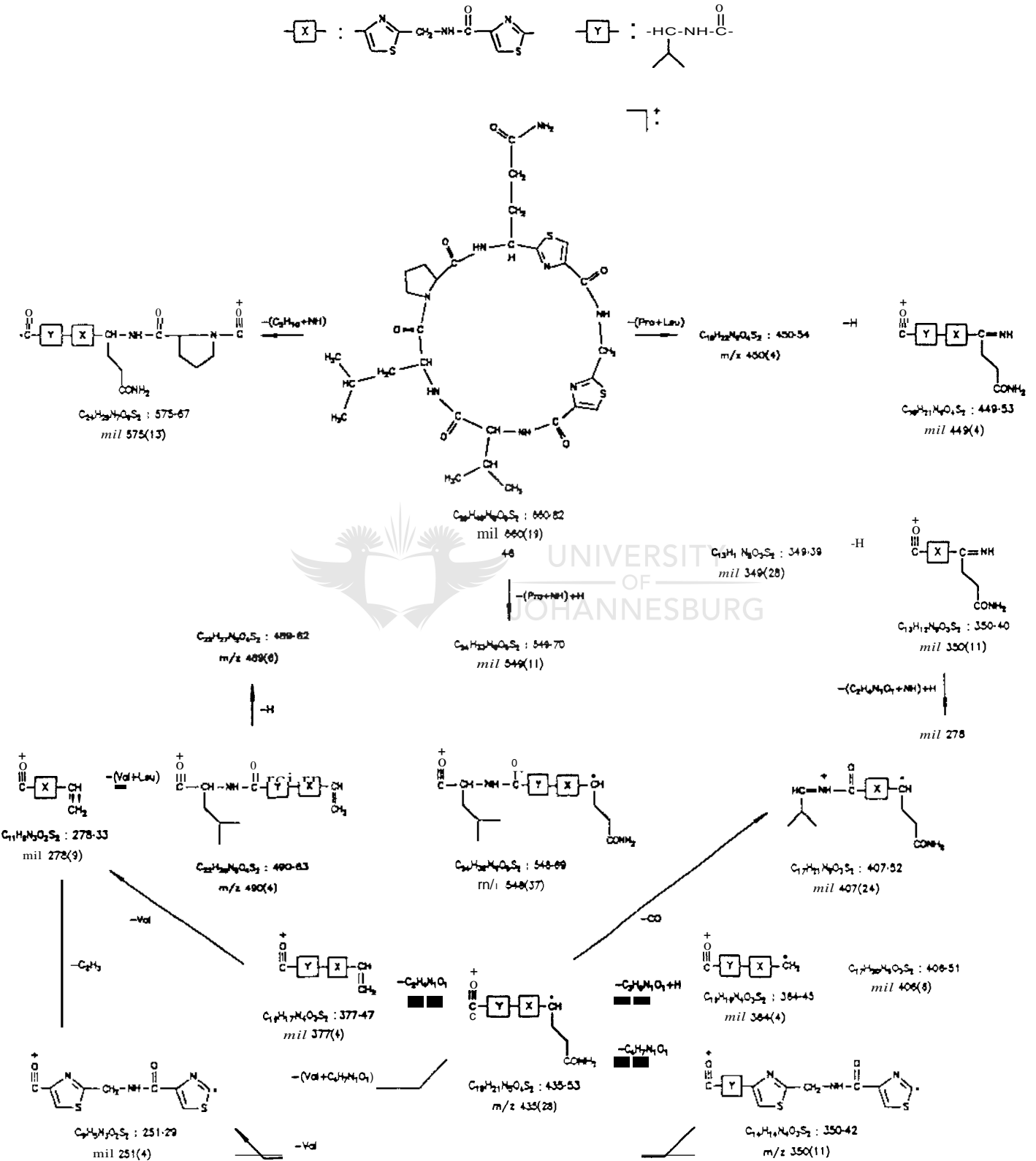
- (i) Anders as in die geval van meeste ander soortgelyke sikliese peptiede wat sterk molekulere ione vertoon, vertoon die drie dolastation 3 isomere (44, 45 en 46) relatief swak molekulere ione met baie sterk fragmente in laer massagebied, veral $m/z < 200$.
- (ii) Daar is relatief min prominente fragmente in hoer massagebied.

Die gevolgtrekking is dus gemaak dat hierdie peptiede baie gereidelik fragmenteer en dat dit moontlik aan die teenwoordigheid van die tiasoolaminosuurkornponente toegeskryf kan word.

Die elementêre samestelling van al die prominente pieke in die HREIMS-spektra van die dolastation 3 isomere is met behulp van akkurate massabepalings vasgestel. Aangesien die eksperimentele resultate wat in hierdie verband verkry is 'n massale hoeveelheid informasie verteenwoordig, is dit nie in hierdie tesis opgesom nie. Dit kan wel genoem word dat slegs molekulere samestellings wat binne die limiet van 3 dpm met eksperimentele waardes ooreengekom het, as bruikbaar beskou is. Hieruit het dit duidelik geword dat fragmente met $m/z < 200$ relatief min informasie oor die sekvens van aminosure in die isomere verskaf. Op grond van die samestelling van die pieke met $m/z > 200$ het dit gou aan die lig gekom dat die fragmentasie van hierdie isomere deur 'n fragmentasie-meganisme wat nie normaalweg in ander sikliese peptiede 'n prominente rol speel nie gedomineer word, naamlik 'n alliliese klowing wat lei tot die sterk primere verlies van die aminosuur wat onmiddellik N-terminaal tot die tiasooleenhede geplaas is plus die NH van die eerste tiasoolentiteit. Die fragmentasie van die isomere van dolastation 3 wat by wyse van hierdie primere verlies ontstaan, sowel as kleiner brokstukke wat weer hieruit ontstaan, word in Skemas 3.20 (44), 3.21 (45) en 3.22 (46) aangetoon. 'n Aantal



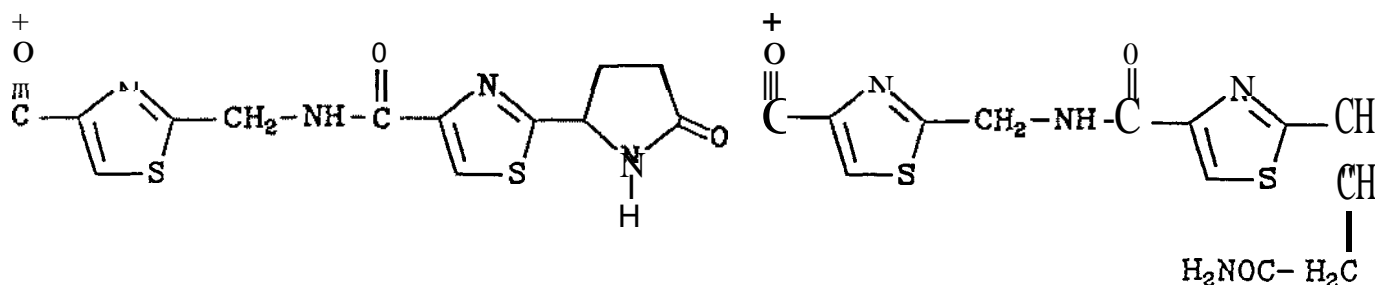
Skema 3.21



Skema 3.22

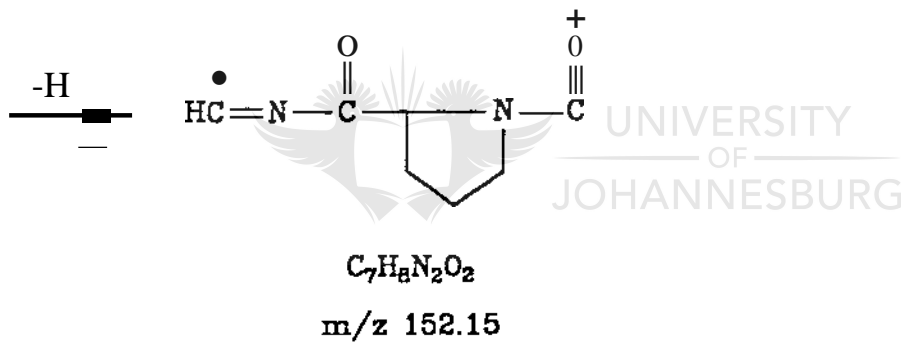
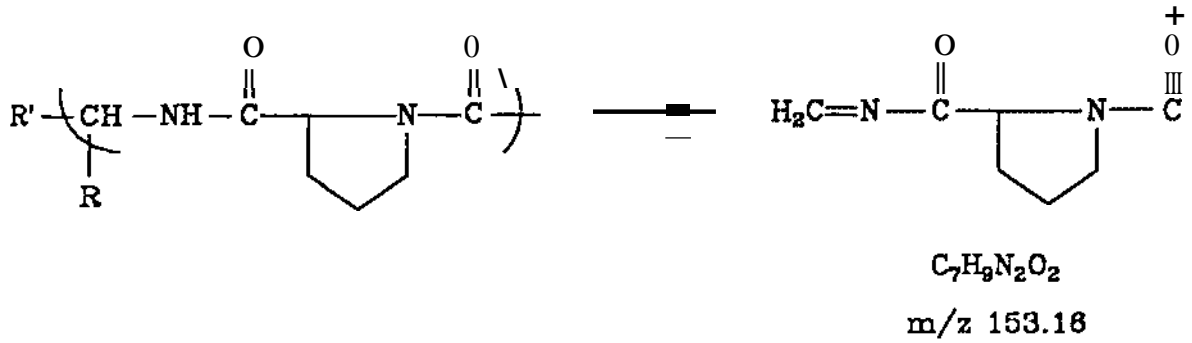
sterk pieke wat lings ander fragmentasieroetes ontstaan word ook in hierdie skemas aangetoon. Slegs pieke met relatiewe intensiteite $\geq 4\%$ van die basispiek (m/z 70 in al die gevalle) in die massagebied $m/z \geq 220$ is in berekening gebring. Alhoewel die m.s.-spektra deur die genoemde alliliese fragmentasie gedomineer word, is dit nodig om van feitlik al die verskillende fragmentasieorganismes wat vir sikliese peptiede bekend is gebruik te maak om die volledige m.s.-spektra van die dolastatien 3 isomere te verklaar. Uit die analise van hierdie spektra (Skemas 3.20, 3.21 en 3.22) is die volgende punte duidelik waarneembaar:

- (i) Al drie isomere van dolastatien 3 vertoon relatief swak molekulere ione by m/z 660, en wel intensiteite van 21, 5 en 19 vir 44, 45 en 46 onderskeidelik.
- (ii) Die genoemde alliliese fragmentasie, wat afklowing van Pro + NH vir 45 en 46 (intensiteite van m/z 548 is 11 en 37 onderskeidelik) en afklowing van Val + NH vir 44 (intensiteit van m/z 546 is 6) behels, is in prominente proses.
- (iii) Die twee tiasoolarninosuurkomponente wat aan mekaar gekoppel is openbaar in besondere stabiliteit ten opsigte van klowing tussen die twee eenhede, met die gevolg dat prominente resulterende ionfragmente bevattende die twee tiasoolaminosuurkomponente (44 : 252(9), 278(14), 308(8) en 404(30); 45 : 407(15), 435(12), 449(4) en 575(6); 46 : 251(4), 278(9), 350(11), 407(24) en 575(13)» in die gebied $m/z > 150$ waargeneem word. Die waarneming kan aan die verhoogde stabiliteit van die amiedbindings wat in direkte konjugasie met die tiasoolringsisteme is, toegeskryf word.
- (iv) Strukturele isomere van ionfragmente kan wel bestaan, byvoorbeeld vir m/z 335(26) (elementere samestelling: $C_{13}H_{11}N_4O_3S_2$) in die geval van 44 :

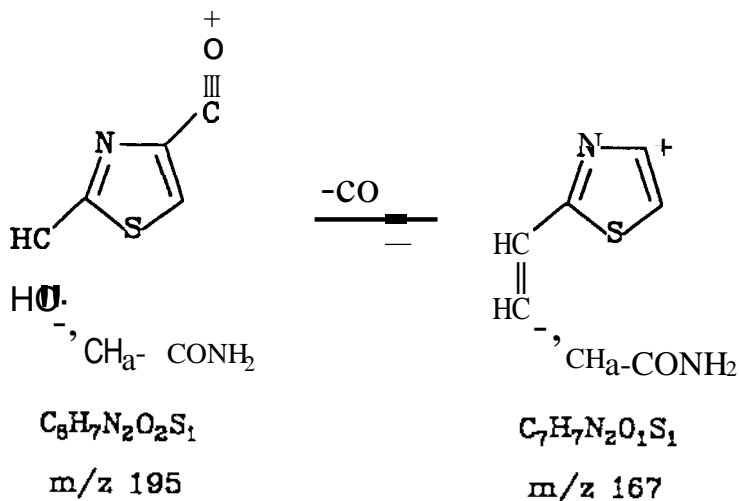


Ander fragmente in die m.s.-spektra van al die isomere is die by m/z 152, 153, 167, 178, 195 en 209. Die pieke gee egter min informasie betreffende die aminosuursekwense. Van hierdie fragmentione kan voorgestel word as:

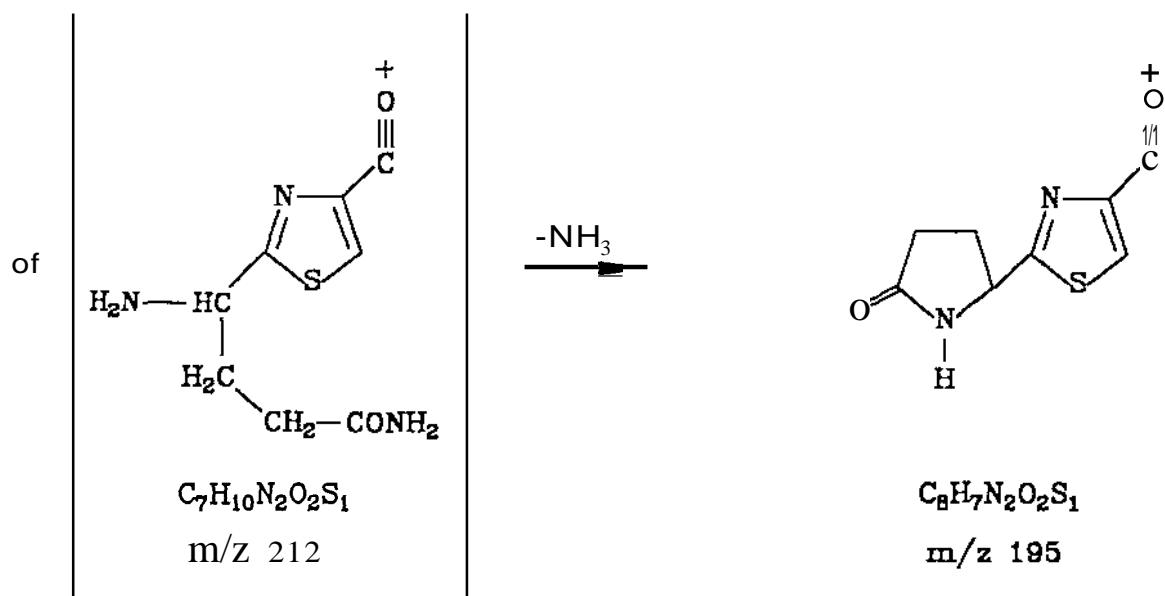
m/z 152 en m/z 153:



m/z 167 en m/z 195:



$C_8H_7N_2O_2S_1$
m/z 195



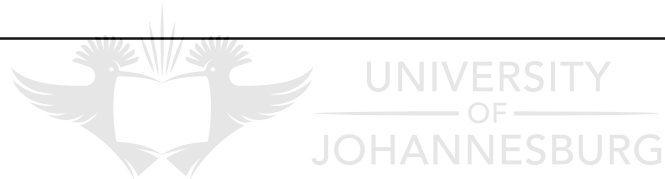
Een van die sterkste pieke in die m.s.-spektra van die drie isomere van dolastatien 3 is die piek by *ta*]: 17S. Die akkurate massa van hierdie pick is herhaaldelik as 177.9969 (teoreties 177.9963) bepaal, en wat 'n elementere samestelling van $C_{SH4N}^{102}S_1$ verteenwoordig. Die fragment is egter nie met behulp van standaard fragmentasies van die onderskeie aminosuursekwense verklaarbaar nie. Dit volg dus dat m/z 178 aan 'n unieke intramolekulere herrangskikking wat nie onder die bekende fragmentasies van peptiede sorteer nie, toe te skryf is.

Die HREIMS-fragmentione van 44, 45 en 46 word in Tabel 3.6 met dié van dolastatien 3 vergelyk. Uit die vergelykende studie is dit baie duidelik dat dit wel moontlik sou wees om die aminosuursekwense van die dolastatien 3 tipe verbindings op grond van massaspektroskopiese data en akkurate massas af te lei. Min van die fragmentione van dolastatien 3 wat in Table 3.6 aangetoon is dra egter by tot die bepaling van die aminosuursekwens. Die pieke wat wel relevant is vir die bepaling van die aminosuursekwens van natuurlike dolastatien 3 word in Tabel 3.7 aangetoon. Die sekwense wat in Tabel

3.7 aangetoon is, is die enigste moontlike oplossings vir die empiriese massas. Vir die ander fragmentione (die in Tabel 3.6 aangetoon, maar nie in Tabel 3.7 nie) kan nie unieke subsekwenstoekenings gemaak word nie, d.w.s. daar is meer as een moontlike subsekvens wat die elementêre samestelling kan verklaar.

TABEL 3.6 Vergelyking van die HREIM8-fragmentione van dolastatien 3 isomere (die waardes in hakkies dui die relatiewe piekintensiteite t.o.v. die basispiek by m/z 70 aan).

<u>44</u>	<u>45</u>	<u>46</u>	Dolastatien 3
660(21)	660(5)	660(19)	660(20)
643(4)			-
617(4)		617(5)	617(4)
		605(6)	-
	604(7)	604(19)	604(6)
	575(6)	575(13)	
	574(7)	574(16)	
	548(11)	549(11)	548(9)
547(5)		548(37)	
546(6)			533(4)
			532(12)
		490(4)	490(7)
		489(6)	
			477(11)
			462(10)
	450(4)	450(4)	450(10)
	449(4)	449(4)	
448(6)			
447(7)			
	435(12)	435(28)	436(11)
			435(41)
433(9)			
	422(6)		423(11)
	-		422(8)
421(24)	407(15)	407(24)	407(22)
	406(4)	406(6)	406(13)
405(20)			
404(30)			
		377(4)	377(6)
		364(4)	364(6)
362(2)			
			351(6)



TABEL 3.7 Akkurate massas van dolastatien 3 wat tot opklaring van die aminosuursekwens aanleiding gegee het.

Gevind	Bereken	Elementere samestelling	Delta (dpm)	Struktuur ^a	Verlies ^b
153.1148	153.1154	C ₉ H ₁₅ NIO ₁	-3.9	Val-Pro	-(CO+NH)
278.0039	278.0058	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₂ S ₂	-6.8	(Gln)Thz- (Gly)Thz	-(C ₂ H ₃ N ₁ ⁰¹⁺ NH+H)
335.0267	335.0273	C ₁₃ H ₁₁ N ₄ O ₃ S ₂	-1.5	[(Gly)Thz, (Gln)Thz]	-(NH+H)

TABEL 3.7 (vervolg) :

422.1202	422.1195	$C_{17}H_{22}N_6O_3S_2$	+1.7	[(Gly)Thz,Val, (Gln)Thz]	-eO
423.1298	423.1273	$C_{17}H_{23}N_6O_3S_2$	+5.9	[(Gly)Thz,Val, (Gln)Thz]	-eO+H
532.1562 ^c	532.1563	$C_{23}H_{28}N_6O_5S_2$	-0.2	[(Gly)Thz,Val, Pro,(Gln)Thz]	-NH

waar:

- a: Residue in [] dui aanliggende residue sonder In spesifieke sekwens aan; Residue sonder [] dui 'n spesifieke sekwens aan,
- b: Hierdie kolom toon die neutrale fragmente aan wat vanaf die "Struktuur" (voorafgaande kolom) getrek moet word om die korrekte elementêre samestelling te verkry.
- c: Verskeie moontlike fragmente kan vir hierdie akkurate massa voorgestel word. Dit is egter op grond van analogie met die resultate van die ander dolastatien 3 isomere gekies (sien hieropvolgende bespreking).

Die data van Tabel 3.7 kombineer as volg om In spesifieke aminosuursekwens vir natuurlike dolastatien 3 voor te stel:

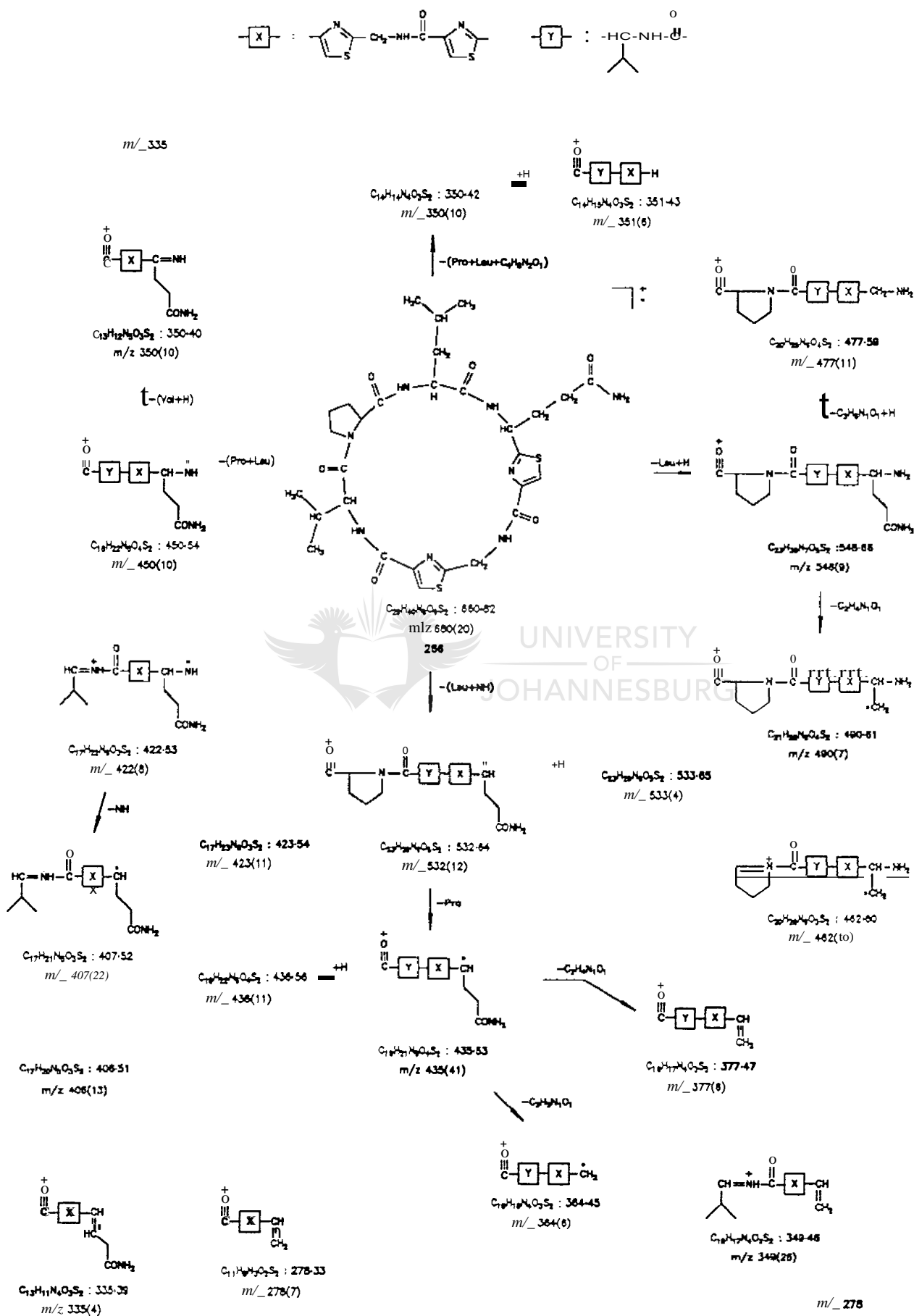
- (i) Massa 335 en 278 toon die aanliggende aard van (GIy)Thz en (Gln)Thz aan, en verder vereis massa 278 die sekwens (Gln)Thz-(GIy)Thz.
- (ii) Massa 153 toon die subsekwens Val-Pro aan.
- (iii) Massa 422 en 423 vereis Pro en Leu om aanliggend te wees.

Hierdie kriteria kan slegs deur die sekwens siko [Pro-LcII-(Gln)Thz-(GIy)Thz-Val]

(266) bevredig word.

Dit is wel in beginsel moontlik dat al drie dolastatien 3 isomere (44, 45 en 46) fragmentione met m/z 532 kan lewer deur verlies van Leu + NH. Soos reeds genoem, vind alliese klowing van die aminosuur wat onmiddellik Ne-terminaal tot die tiasooleenhede geplaas is plus die NH van die eerste tiasoolentl telt egter by voorkeur plaas. Dit gee daartoe aanleiding dat prominente fragmentione vir 44 by m/z 546 (-Val-NH), vir 45 by m/z 548 (-Pro-NH) en vir 46 by m/z 548 (-Pro-NH), en geen fragmentione met m/z 532, waargeneem word. Analoog aan bostaande gee die voorkeurafklowing van Leu + NH vanaf dolastatien 3 aanleiding tot die vorming van die fragmentioon met m/z 532. Dit dui op die subsekwens Leu-[(Gln)Thz,(Gly)Thz], wat in ooreenstemming met die voorgestelde sekwens (266) is. Die voorgesteide HREI-MS-fragmentasiepatroon van dolastatien 3 word in Skema 3.23 geïllustreer. Soos reeds in Afdeling 3.1 bespreek, is die voorgestelde aminosuursekwens siklo [S-Pro-S-Leu-5-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (S-266) deur sintese in hierdie laboratorium as ooreenstemmend met natuurlike dolastatien 3 bewys.

Uit bostaande bespreking is dit dus duidelik dat HREI-massaspektrometrie wel met groot sukses in die bepaling van aminosuursekwense van sikliese peptiede toegepas kan word. Hierdie suksesvolle toepassings berus egter grootliks op die gebruik van die korrekte eksperimentele tegnieke sowel as die fragmentasiereels van sikliese peptiede (kyk Skema 3.19). Ter illustrasie van die punt kan genoem word dat die FAB-spektra van dolastatien 3 en sy isomere as deel van hierdie ondersoek opgeneem is. Onafhanklik hiervan het Schmidt *et al.*²⁸⁰ die FAB-spektra van siklo [S-Pro-R-Leu-S-Val-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz] (44) en siklo [S-Pro-(Gly)Thz-R-(Gln)Thz-S-Val-R-Leu] (45) in gliserol bespreek. Soos verwag vertoon al die FAB-spektra baie sterk (M+H)⁺ pieke, maar slegs baie lae intensiteit fragmentione word in die gebied m/z 250–661 waargeneem. Daar kan dus kritiek uitgespreek word teen die gevoigtrekking van Schmidt *et al.*²⁸⁰ dat FAB-spektra van hierdie klas van verbindings wel waardevolle



Skema 3.23

strukturele inligting lewer, en wel om die volgende redes:

- (i) Alhoewel die outeurs se spektra in 'n mate ooreenkom met HREIMS-spektra soos in ons ondersoek verkry, vertoon dit, behalwe vir sterk (M+H)⁺ pieke, swak sowel as min fragmentione in die gebied $m/z \geq 250$. Dit is nogtans interessant om daarop te let dat die enigste relatief sterk fragmentione in FAB-spektra van dolastatien 3, naamlik 195(3), 277(3), 349(0.3), 407(0.5), 423(0.2) en 661((M+H)⁺, 3) wel met prominente fragmentione in die HREIMS-spektra ooreenkom. Die fragmentioon van Pro-CO+H (m/z 70) vorm die basispiek in die HREIMS-spektra, maar in die FAB-spektra vertoon dit 'n veel swakker piek as die molekulere ioon.
- (ii) Die interpretasie van die fragmentasiepatrone van die dolastatien 3 isomere deur Schmidt *et al.*²⁸⁰ was nie op akkurate massas gegrond nie en is slegs in terme van die nominale molekulere massas aangegee.

Dit is reeds bekend dat die fisiologiese aktiwiteite van sikliese peptiede deur beide die sekvens van die aminosure sowel as die konformasie van die verbinding bepaal word (kyk Afdeling 1.1-1.4). Bostaande uiteensetting het nou aangetoon dat dit wel moontlik is om die sekvens van tiasoolaminosuurbevattende sikliese peptiede m.b.v. E1-rnassa-spektrometrie af te lei. Die vraag het egter nou ontstaan of dit moontlik is om die konformasie van 'n verbinding soos dolastatien 3 af te lei met behulp van spektroskopiese tegnieke, aangesien enkelkristal X-straalkristallografie slegs in uitsonderlike gevalle toepaslik is. Struktuurbepaling met behulp van enkelkristal X-straaltegnieke is natuurlik slegs in beginsel 'n algemene tegniek vir algehele struktuurbepaling weens die feit dat die verbinding nie alleen kristallyn moet wees nie, maar ook kristallyn wat aan sekere vereistes voldoen.

Alle pogings om dolastatien 3 uit 'n verskeidenheid van oplosmiddels, sowel as die ooreenkomstige trifenielfosfienoksiedkornpleks,²⁸¹ te kristalliseer het ongelukkig misluk.

Die pogings om die gesintetiseerde dolastatien 3 te kristalliseer is egter bemoeilik deur die klein hoeveelheid beskikbaar. Indien meer massa van dolastatien 3 (wat nou binne 'n relatief kort tydperk met behulp van die soliede-fase tegniek gesintetiseer kan word) beskikbaar is, kan kristallisatie daarvan onder meer gunstige kondisies gerus weer eens ondersoek word. Vanwee die klein hoeveelheid dolastatien 3 in hierdie laboratorium beskikbaar, het die oplos van die konformasionele probleem dus byna uitsluitlik op k.m.r.-spektroskopie berus.



HOOFSTUK 4

DIE KONFORMASIES IN OPLOSSING VAN SITUÏESE PEPTIEDE

4.1 INLEIDING

Die beplande sintese van 'n totaal selektiewe biologies aktiewe verbinding (d.w.s. geneesmiddel) met geen newe-effekte is die strewe van byna elke farmakoloog en sintetiese organiese chemikus. Die verwesenliking van hierdie doel het reeds intense aandag geniet²⁸³, en gevolglik is die ondersoek van verwantskappe tussen struktuur en aktiwiteit reeds vir 'n geruime tyd die hoofonderwerp in talle industriële en akademiese laboratoria. Terselfdertyd word die ondersoek na verfyning van bekende konsepte van die struktuur van organiese verbindings in die werk van chemici, biochemici en farmakoloë waargeneem. Aanvanklike pogings om 'n verwantskap tussen struktuur en aktiwiteit te vind het tot die gelykstelling van struktuur met samestelling gelei, maar dit het gou geblyk dat konfigurasie ten minste net so 'n belangrike rol speel. Gevolglik is spesiale klem op die stereospesifisiteit in die sintese van aktiewe verbindings in die afgelope paar jaar gele. Die belangrikheid van molekule konformasie in beide chemie en biochemie het sedert die pionierswerk van Barton²⁸⁴ sterk na yore getree, maar ongelukkig is weinig pogings sedertdien aangewend om 'n eenduidige verwantskap tussen konformasie en aktiwiteit vas te stel.²⁸⁵ Verskeie faktore is hiervoor verantwoordelik. Konformere is normaalweg nie as stabiele entiteite isoleerbaar nie, met die gevolg dat dit nie afsonderlik vir biologiese aktiwiteit getoets kan word nie. Die sikliese tetrapeptied [Sar¹]-Tentoksien is sover bekend²⁸⁶ die enigste molekule waarvan die twee konformere afsonderlik ondersoek is. Dit is gevind dat hierdie twee konformere wel ten opsigte van aktiwiteit verskil. In die algemeen is dit egter baie moeilik om die mees stabiele konformasie in oplossing te bepaal, en verder meer om ook die verandering in konformasie in biologiese media te volg.²⁸⁷ Daar bestaan verskeie metodes om die probleme te oorkom²⁸⁸, onder meer deur konformasionele verandering met variasie van die samestelling

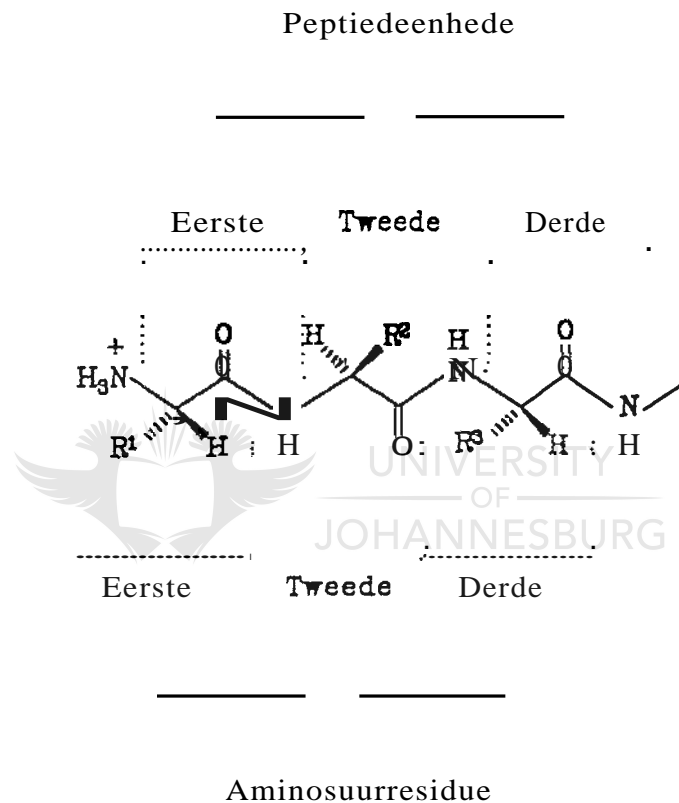
en/of konfigurasie van 'n aktiewe verbinding of die bestudering van die hormoon-reseptorinteraksies van sekere fisiologies aktiewe peptiede. So 'n ondersoek val egter buite die gebied van studie van 'n sintetiese organiese chemikus, met die gevolg dat so 'n persoon homself na meer direkte eksperimentele metodes wend om die konformasie van 'n gesintetiseerde produk te ondersoek.

Ten spyte van die feit dat sikliese peptiede meer star is as die analoe lineere peptiede, is een van die probleme ten opsigte van die konformasionele studies van sikliese peptiede dat die ruimtelike strukture omgewingsafhanklik is, met die gevolg dat dit in oplossing as 'n komplekse ewewig van interomskakelende vorms kan bestaan. Dit vereis dat die bestudering van die driedimensionele struktuur van sikliese peptiede (sowel as lineere peptiede) onder 'n verskeidenheid van kondisies beide in oplossing en in die kristallyne toestand uitgevoer moet word. Die studie van sikliese peptiede behels 'n belangrike nuwe-aspek, naamlik dat hierdie verbindings aanmerklik meer bestand is teenoor ensimitiese splyting as die ooreenkomstige lineere peptiede. Dit is omdat die afbou van peptiede maklikste vanaf die C- of N-endgroep plaasvind. Aangesien die degradasie van sikliese peptiede heelwat stadiger as die van lineere peptiede plaasvind, word die aktiwiteit van eersgenoemde langer in biologiese sisteme gehandhaaf. 289

Kennis van die konformasies van sikliese peptiede is 'n noodsaaklike voorvereiste vir insig oor die gedrag van die verbindings *in vitro* en *in vivo*, asook om die eienskappe van nuwe analoe te voorspel. Indien die konformasie van 'n sikliese peptied met behulp van direkte eksperimentele tegnieke opgeklar wil word, en sodoende 'n bydrae op die gebied van konformasionele studie oor die klas van verbindings te lewer, moet dit eerstens aan 'n vereiste voldoen: die verbinding moet konformasioneel' homogeen wees. Voordat die konformasies in oplossing van siklo[S-Pro-S-Leu-s-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (8-266) en siklo [S-Pro-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (R - 266) aan die hand van dié voorvereiste en met behulp van direkte eksperimentele tegnieke bespreek word, is dit nodig om eers aandag te skenk aan sekere aspekte van peptiednomenklatuur.

4.2 KONFORMASIONELE NOMENKLATUUR T.O.V. PEPTIEDE

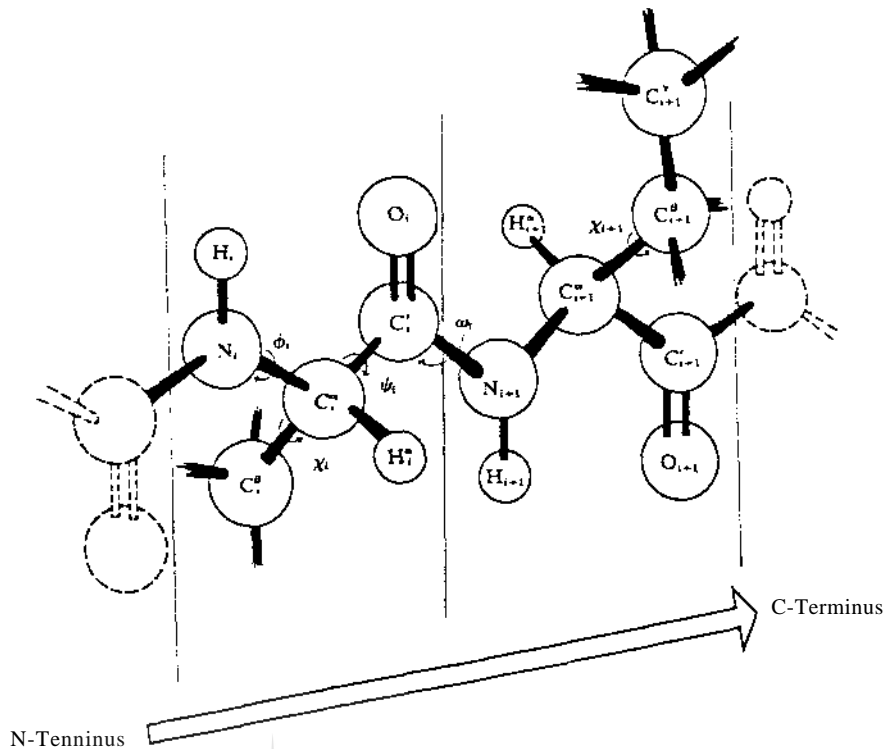
Die ruimtelike strukture van peptiede kan natuurlik deur die driedimensionele koördinate van die samestellende atome verteenwoordig word. Dit is 'n presiese beskrywing sonder dat enige addisionele aannames vereis word. 'n Meer algemene en meer bruikbare beskrywing van die strukture van peptiedkettings en sekere stereochemiese eienskappe van die aminosuurresidue (kyk Skema 4.1) en die peptiedbindings self kan egter gemaak word in terme van die torsiehoeke.²⁹⁰



Skema 4.1 Die verwantskap tussen 'n aminosuurresidu en 'n peptiedeenhede. In hierdie ondersoek word eenduidigheidshalwe normaalweg die aminosuurresidu terminologie gebruik.

In Skema 4.2 word 'n polipeptied bestaande uit S-aminosuurresidue, en getiketteer in terme van atome en torsiehoeke, geïllustreer. Onderskrifnummers ooreenkomstig die nummers van die aminosuurresidue in die polipeptied, en genummer vanaf die N-terminus, is aan die atome van die polipeptiedruggraat toegeken. Sykettingsatome het dieselfde onderskrifnommer, en die koolstofatome word β , γ en δ ens. ooreenkomstig die ver-

wantskap met die karbonielkoolstofaatom (C') geetiketteer.



Skema 4.2

Die torsiehoeke word as ϕ en ψ vir die sekwens van atome -eO-NH-eHR-eO- en -NH-eHR-eO-NH- onderskeidelik geetiketteer en het die waardes van 180° in die ten volle gestrekte (Eng. 'extended') konformasie (Skema 4.2). In die bogenoemde konformasie is w die torsiehoek vir die sekwens -eHR-eO-NH-eUR-, d.w.s. wat die rotasie om die amiedbinding beskryf, ook 180° ('n *trans*-amiedbinding). In die geval van 'n versteekte konformasie, d.w.s. indien die projeksies van die $C_i^\alpha - C_i'$ en $N_{i+1} - C_{i+1}^\alpha$ bindings saamval, is $w = 0^\circ$ ('n *cis*-amiedbinding). Indien 'n sisteem langs die sentrale binding beskou word, byvoorbeeld vir w in die rigting $C_i' \rightarrow N_{i+1}$ (of $N_{i+1} \rightarrow C_i'$), kan aan die torsiehoeke 'n positiewe ($+w$) of negatiewe ($-w$) waarde toegeken word, afhangende of die binding na die voorste (eerste) atoom C_i^α (of C_{i+1}^α) rotasie na regs of na links respektiewelik vereis om met die binding na die agterste (vierde) atoom C_{i+1}^α (of C_i^α) saam te val. Merk op dat dit onbelangrik is van watter kant af die sisteem beskou word. Die torsiehoeke word gemeet in die gebied van $-180^\circ < \theta < +180^\circ$. Wat die ruggraat

van die molekule betref (die sekondere struktuur), kan die konformasie van 'n polipeptied dus ten volle deur 'n stel torsiehoeke, nl. ϕ , ψ en ω , vir elke aminosuurresidu beskryf word. Ooreenkomstige data vir sykettings (torsiehoek χ_i met 'n geskikte onderskrifnommer om die binding waarna dié hoek verwys te spesifiseer) voltooi 'n volledige beskrywing van die tersiere struktuur van 'n polipeptied.

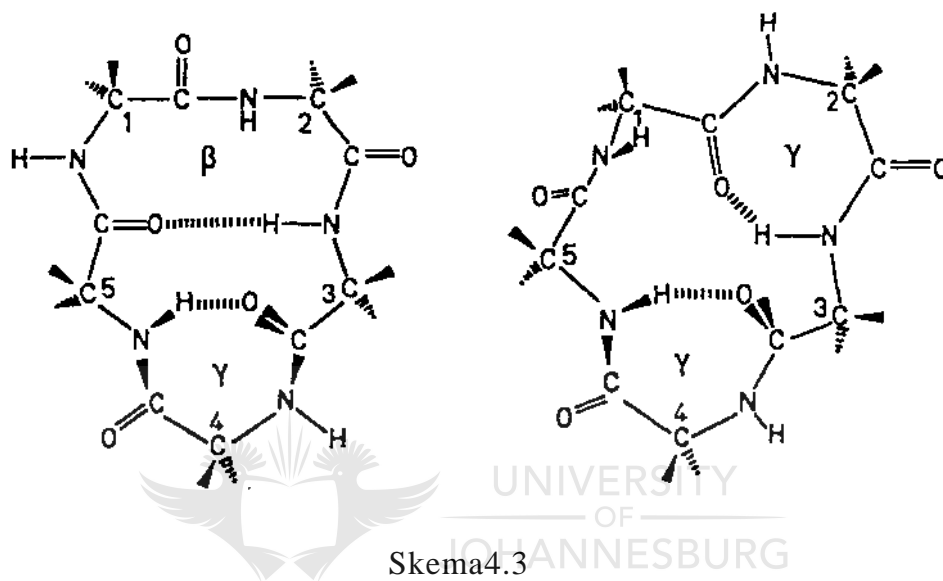
4.3 KONFORMASIONELE HOMOGENITEIT VAN SIKLIESE PEPTIEDE IN OPLOSSING

'n Betekenisvolle studie van sikliese peptiedkonformasies met behulp van k.m.r.-spektroskopiese tegnieke vereis dat die verbinding of 'n enkele konformasie aanneem, of dat een konformasie van die ewewigmengsel dominant is sodat die effek van die ander op spektroskopiese parameters onbeduidend is. Dit is wel bekend dat 'n 'gemiddelde' konformasie as 'n werkende hipotese vir buigsame molekules voorgestel is, maar Jardetzky²⁹¹ wys egter daarop dat so 'n beskrywing in die meeste gevalle fisies betekenisloos is, aangesien daar dan geen lineêre verwantskap tussen k.m.r.-data en geometriese parameters bestaan nie. Die probleem is dat alle bewyse van konformasionele homogeniteit indirek van aard is. Dit is slegs deur die somtotaal van 'n groot verskeidenheid van getuienis dat 'n redelike mate van sekerheid in hierdie verband verkry kan word.

In die algemeen kan verskille in chemiese verskuiwings, koppelingskonstantes en temperatuurafhanklikheid tussen verskillende aminosure in die peptiedsekwens as indikatore van konformasionele homogeniteit gebruik word; hoe kleiner die verskille, hoe groter is die moontlikheid dat 'n vinnig opgestelde konformasionele ewewig tot 'n gemiddelde waarde van die parameters aanleiding sal gee. Sikliese pentapeptiede geniet egter heelwat aandag in hierdie verband aangesien dit die kleinste sikliese peptiede is waarin al die amiedbindings die ongestremde trans--konfigurasie kan aanneem en die molekule dus sodoende 'n relatiewe sterk inhibering van mobiliteit vertoon.²⁸⁸ In hierdie klas van sikliese peptiede kan groter starheid van die ruggraat van die peptiedraamwerk, en

groter relatiewe mobiliteit van die sykettings, dus verwag word.

Tot op hede is ongeveer 20 sikliese pentapeptiede wat essensieel konformasioneel homogeen is, geïdentifiseer.^{288,292} Onder hierdie verbindings kan twee basiese tipes, elk met twee intramolekulere waterstofbindings, onderskei word: die β,γ - en die γ,γ -konformasies geïllustreer in Skema 4.3.²⁸⁸ In 'n β -draai mag daar 'n waterstofbinding tussen



die eerste en vierde aminosuurresidue voorkom, terwyl in 'n γ -draai daar 'n waterstofbinding tussen die eerste en derde aminosuurresidue mag voorkom. Addisionele bevindings sluit die volgende in:

- (i) Posisie 3 (Skema 4.3) word normaalweg deur glisien of 'n R-aminosuur opgeneem.
- (ii) Posisie 4 in die γ -draai word in die algemeen deur 'n groot steriese eenheid (bv. Pro, Val, Phe, Aib) opgeneem.
- (iii) Prolien (Pro) neem by voorkeur posisie 1 of 4 in.

Die mees stabiele konformasie van 'n peptied met 'n spesifieke aminosuursekvens kan in baie gevalle op grond van bostaande veralgemenings voorspel word. 'n Ander afleiding wat gemaak kan word is dat die spesifieke aard van 'n syketting in die reël van minder

belang as die absolute konfigurasie is ten opsigte van die bepaling van die verkose konformasie van sikliese pentapeptiede.²⁸⁸

Die hoofaanwysers vir konformasionele homogeniteit, wat aan hand van die gesintetiseerde R-266 en 8-266 (dolastatien 3) bespreek word, is die volgende:

- (i) Sterk onderskeiding tussen die temperatuurgradiënte van die verskillende NH-seine (¹H-k.m.r.-spektroskopie) van die aminosuurresidue. Die verskynsel tree veral in die gevalle van siklo[8-Pro-8-Leu-s-{Gln}Thz-(Gly)Thz-S-Val] (8-266) en siklo[8-Pro-8-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-8-Val] (R-266) sterk na vore (sien bespreking in Afdeling 4.4.4).
- (ii) Soortgelyke sterk onderskeiding tussen die chemiese verskuiwings van 'n gegewe aminosuurresidu wat meer as een keer in die sekwens voorkom. Geen spesifieke aminosuurresidu word egter in die sekwense van R-266 en 8-266 herhaal nie.
- (iii) Groot verskille in die chemiese verskuiwings van die twee geminale diastereotopiese glisienprotone. In die geval van 8-266 resonanceer die twee geminale protone van die (Gly)Thz-residu by δ 4.65 en δ 5.23, en vir R-266 by δ 4.47 en δ 5.48. In beide gevalle vertoon die verskillende resonansies as 'n doeblet van doeblette.
- (iv) Sterk onderskeiding tussen visinale koppelingskonstantes van diastereotopiese protone, byvoorbeeld dié van NH na beide van die o-protone van glisien en van C ^{α} H na beide diastereotopiese β -protone in ander aminosuurresidue. In die geval van 8-266 ondervind die o-protone van die (Gly)Thz-residu by δ 4.65 en δ 5.23 koppelings in die orde van 2.4 Hz en 7.3 Hz onderskeidelik met die NH. Vir R-266 ondervind dié protone van die (Gly)Thz-residu by δ 4.47 en δ 5.48 byna soortgelyke koppelings van 2.2 Hz en 10.1 Hz onderskeidelik met die NH. Die koppelingskonstantes van die CQH-protone van die Leu- (δ 3.83, J = 4.0 en 11.0 Hz) en (Gln)Thz-residue (δ 5.52, J = 4.6 en 10.9 Hz) van 8-266, sowel as van R-266 (Leu: δ 4.33, J = 4.0 en 10.9 Hz; (Gln)Thz: δ 5.41,

$J = 3.8$ en 11.5 Hz), ooreenkomstig met diastereotopiese β -protone, is ook aanduidend van konformasionele homogeniteit in beide gevalle.

- (v) Groot verskille tussen NH-eO'H-koppelingskonstantes ('n waarde van ± 7.5 Hz kan as 'n gemiddelde vir volledige mobiliteit geïnterpreteer word). In die geval van 8-266 varieer die NH-eO'H-koppelingskonstantes van 2.4 Hz tot 9.2 Hz, en in die geval van R-266 varieer dié konstantes van 2.2 Hz tot 10.0 Hz.

Die volgende inligting kan egter as getuienis vir konformasionele heterogeniteit aanvaar word:

- (i) 'n Nie-lineêre verwantskap van die temperatuurgradiënte van NH-verskuiwings. In beide gevalle van R-266 en 8-266 egter is 'n lineêre verwantskap verkry (sien bespreking in Afdeling 4.4.4).
- (ii) Verandering van koppelingskonstantes met 'n verandering in die oplosmiddel. Geen noemenswaardige verskil in koppelingskonstantes van die ^1H -k.m.r.-spektra van R-266 en 8-266 in CDCl_3 en DMSO-d_6 onderskeidelik, is egter waargeneem me.

Soos reeds genoem (kyk Afdeling 3.1.2), is die konformasionele heterogeniteit van siklo-[8-Pro-s-(Gln)Thz-{Gly}Thz-8-Val-8-Leu] (46) met behulp van ^1H -k.m.r.-temperatuurafhanklike studies in CDCl_3 en DMSO-d_6 bewys. In beide gevalle het die gedupliseerde resonansies van die amiedprotone in die gebied δ 5.5 - 9.0 (kyk Figuur 3.1) na enkele resonansies by hoër temperature verval, die multiplet van die tiasoolprotone by $\pm \delta$ 8.1 het na twee spesifieke resonansies verval en die groot multiplet te wyte aan die metielprotone by δ 0.7-1.2 het aansienlik vereenvoudig. Onder soortgelyke kondisies het die ^1H -k.m.r.-spektra van 5-266 en R-266, behalwe vir temperatuurafhanklike Nll-gradientverskuiwings, geen noemenswaardige veranderinge ondergaan nie.

Noudat die konformasionele homogeniteit van S-266 en R-266, ten minste op die k.m.r.-tydskaal, vasgestel is, is dit moontlik om die spesifieke konformasie van elke molekule met behulp van bekende direkte eksperimentele metodes te ondersoek.

4.4 'N STUDIE VAN DIE KONFORMASTES VAN SIKLIESE PEPTIEDE S-266 EN R-266 M.B.V. DIREKTE EKSPERIMENTELE METODES

Ter inleiding van hierdie bespreking kan dit genoern word dat die mees effektiewe en mees ekonomiese benadering tot die konformasionele analise van selfs eenvoudige oligopeptiede 'n kombinasie van verskeie direkte eksperimentele metodes behels. So 'n benadering impliseer dat elke spesifieke metode slegs gebruik word om die vrae waarvoor dit die geskikste is te beantwoord.

4.4.1 X-Straalanalise

Die X-straalmetode is die mees algemene tegniek vir die studie van die driedimensionele struktuur van peptiede.²⁹³ (kyk Afdeling 1.1-1.4). Alhoewel die tegniek die mees eksakte inligting betreffende die driedimensionele struktuur van 'n molekule in die kristallyne vorm lewer, is dit nog steeds 'n ope vraag tot welke mate die statiese molekulere konformasie in die kristalrooster met die in oplossing ooreenkom. Dit is veral 'n probleem in die geval van buigbare molekules soos peptiede wat, afhanklik van die aard van die oplosmiddel, as verskillende ewewigsmengsels van konformasies kan bestaan. Verder meer is probleme rakende die dinamika van konformasionele omskakelings, wat 'n baie belangrike rol in die biologiese aksie mag speel, natuurlik buite die bereik van diffraksietegnieke. Terselfdertyd egter dien die vaste-toestandkonformasies van veral starre strukture as 'n betroubare bron van verwysingspunte vir kalibrasiedoelendes en vir die evaluering van die betroubaarheid van nuwe metodes wat sensitief ten opsigte van die konformasionele toestande van molekules in oplossing is.

Soos reeds genoem, was intensiewe pogings om die sintetiese dolastatien 3 (S-266) te kristalliseer, onsuksesvol. Etter *et al.*²⁸¹ het onlangs heelwat welslae met die bereiding

van groot hoë kwaliteit organiese kristalle (d.w.s. groot blokkige kristalle met skerp hoeke en good gedefinieerde kristalvlakke) deur middel van kokristallisatie met TFFO (Trifenielfosfienoksied) behaal. Twee faktore dra by tot die effek wat TFFO op kristal-groei uitoefen:

- (i) Die eerste behels die teenwoordigheid van 'n baie sterk waterstofbinding tussen die fosforielsingrupe van TFFO en die protondonor van die substraat. Die binding is nodig vir kornpleksvorming om sodoende 'n gedeeltelik ioniese karakter aan die kristal te verleen. Organiese molekules wat amiedbindings bevat, soos byvoorbeeld peptiede, kan hierdie tipe kompleksing geredelik ondergaan.²⁸¹
- (ii) Tweedens word die vorming van plaatvormige strukture wat daarvoor verantwoordelik is dat kristalle maklik breek of as dun plate groei, deur die steriese grootte van TFFO geinhibeer.

Pogings om dolastatien 3 as die ooreenkomstige trifenielfosfienoksiedkompleks uit 'n verskeidenheid van oplosmiddels (onder meer mengsels van toluen-tetrahydrofuraan sowel as slegs tetrahydrofuraan) te kristalliseer was egter nie suksesvol nie. Die relatief klein hoeveelheid van beide R-266 en 8-266 wat beskikbaar was bet die toepassing van hierdie tegniek heelwat bemoeilik.

4.4.2 Ultravioletspektroskopie (UV), sirkulere dichroïsme (SD) en optiese rotasie dispersie (ORD)²⁹³

Aangesien daar geen waarneembare korrelasie tussen die elektroniese spektra en ruimtelike struktuur van peptiede bestaan nie, lewer hierdie tegnieke nie veel konformasionele inligting nie. Slegs indien verskeie amiedchromofore met soortgelyke absorpsiepieke in die $\pi \rightarrow \pi^*$ gebied naby mekaar gelee is, neem dit deel aan die sogenaamde eksiton (Eng. 'exciton') interaksie wat tot 'n splitsing sowel as 'n intensiteitsverandering van hierdie absorpsieband, asook 'n voorspelbare effek op die optiese rotasie dispersie

en sirkulere dichroïsme spektra, lei.

Differensiele UV-spektroskopie, 'n welbekende metode vir die studie van oplosmiddel-toeganklikheid van die aromatiëse groepe van protelene, is nog nie op sikliese peptiede toegepas nie.

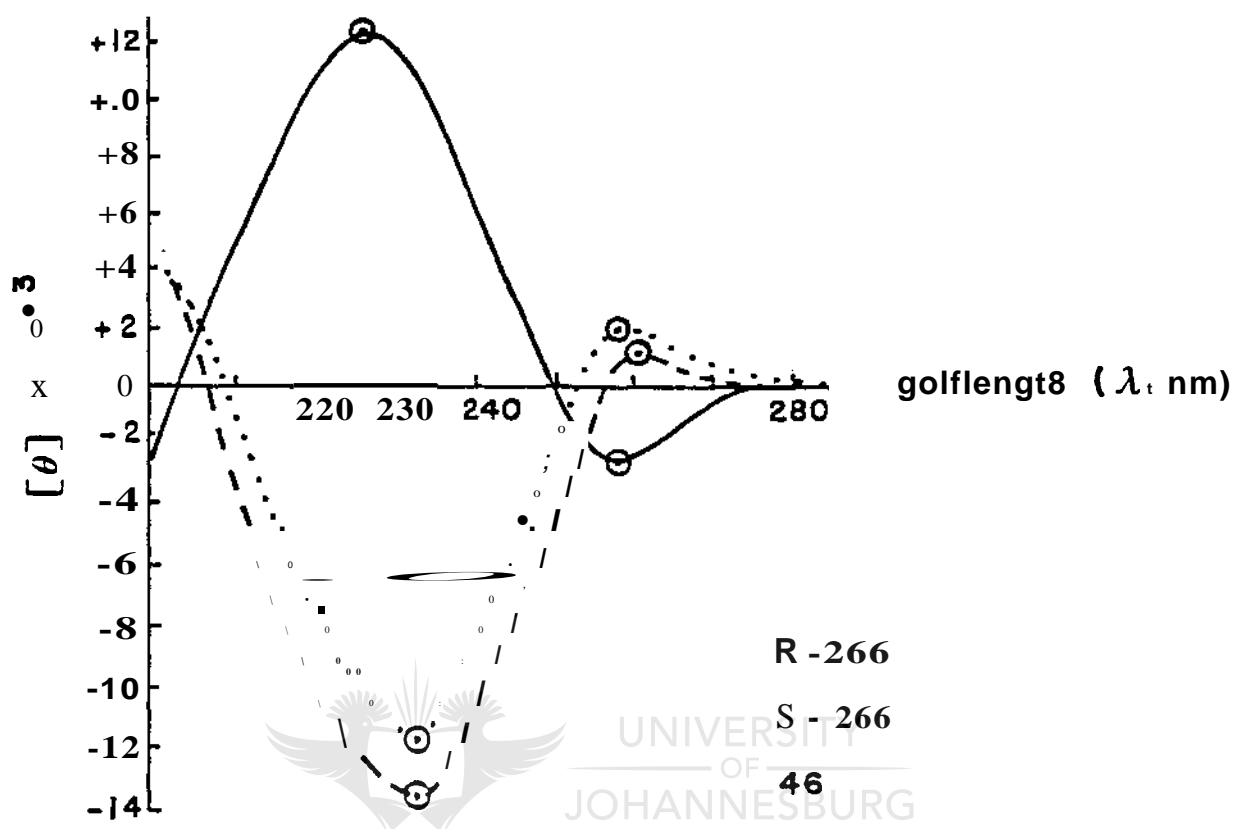
Die UV-spektrum van dolastatien 3 (S-266) in metanol vertoon twee absorpsiemaksima by 206 nm (ϵ 13940) en 238 nm (ϵ 8960), ooreenkomstig die tiasool K-band en tiasool B-band respektiewelik.

Aan die ander kant kan SD- en ORD-spektra heelwat meer inligting oor die konformasies van peptiede lewer aangesien die spektra 'n sensitiewe funksie van die relatiewe orientasie van chromofore en buurgroepe is. Alle opties aktiewe peptiede vertoon chir-optiese effekte by 180-205 nm en 210-240 nm, ooreenkomstig $\pi \rightarrow \pi^*$ en $n \rightarrow \pi^*$ oorgange respektiewelik. Indien 'n stabiele konformasie 'n aantal ruimtelik naby geleë peptied-chromofore besit, split die $\pi \rightarrow \pi^*$ oorgangsband na twee komponente met teenoorgestelde teken. Aanduidings van 'n $n \rightarrow \sigma^*$ oorgang van karbonielgroepe is ook in die SD- en ORD-kurwes van sekere peptiede waargeneem.²⁹³ Dit kan egter aanvaar word dat sodanige oorgang slegs 'n geringe bydrae tot die totale S_L-en ORD-spektra sal lewer.

Ongelukkig bestaan daar nie direkte metodes vir die analise van SD- en ORD-data van peptiede nie en derhalwe het 'n kennis van SD- en ORD-kurwes slegs 'n beperkte bydrae tot die direkte bepaling van driedimensionele peptiedstrukture te lewer. Dit kan egter ondubbelsinnige inligting verskaf ten opsigte van die konformasionele starheid in 'n gegewe geval. SO- en ORD-spektra kan egter ook waardevolle inligting oor die konformasionele 'gevolge van strukturele veranderinge van 'n bepaalde struktuurtype verskaf.

Die sirkulere dichroïsme (SD) spektra van 8-266 (dolastatien 3), R-266 en 46 in metanol word in Figuur 4,1 aangetoon. Die twee sikliese peptiede wat S-(Gln)Thz as kompo-

ment bevat vertoon sterk negatiewe Cotton-effekte by 230 nm, ooreenkomstig met die UV-absorpsiemaksima van die tiasoolchromofore van hierdie verbindings.



Figuur 4.1: Die SD-spektra van die sikliese pentapeptiede R-266, S-266 en 46 in meta-nol.(Sien ook Tabe14.1)

Tabel 4.1 : Sirkulere dichroisme van tiasoolamino-suurbewattende sikliese peptiede (Sien Figuur 4.1)

Verbinding	$\Delta\epsilon_{\text{maks}}$	$\lambda(\text{nm})$	konsentrasie($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)
<u>R-266</u>	+23.41	224	0.312
<u>S-266</u>	-19.10	230	0.220
<u>46</u>	-25.31	230	0.207

'n Swak sekondere positiewe Cotton-effek word ook vir beide 5-266 en 46, by 258 nm en 260 nm onderskeidelik, waargeneem. Die sikliese peptied wat *R*-(Gln)Thz as komponent bevat, vertoon 'n sterk positiewe Cotton-effek by 224 nm en 'n swak negatiewe Cotton-effek by 257 nm. Die SD-spektra van tiasoolaminosuurderivate vertoon ook swak Cotton-effekte in die gebied van 257-260 nm. Hierdie sekondere Cotton-effekte stem moontlik ooreen met 'n $n \rightarrow \pi^*$ oorgang wat nie gereedelik in die UV-spektra waargeneem word nie.²⁹⁴ Bostaande resultate is in ooreenstemming met die gevolgtrekking in Afdeling 2.12 dat 4-etoksikarbonieltiasoolaminosuurderivate met die 5-konfigurasie op die 1¹-posisie negatiewe Cotton-effekte in dié gebied 230-240 nm, en die ooreenkomstige *R*-gekonfigureerde derivate positiewe Cotton-effekte in dié gebied, vertoon.

Soortgelyk aan die gevolgtrekking in Afdeling 2.12 wil dit dus voorkom of die absolute konfigurasie van 'n opties suiwer tiasoolaminosuurderivaat van 'n sikliese pentapeptied wat 'n enkele opties suiwer tiasoolaminosuurresidu bevat, met behulp van SD-spektra bepaal kan word, met dien verstande dat die chiroptiese effekte van die tiasoolresidue by 220-240 nm nie met die $n \rightarrow \pi^*$ oorgange van opties aktiewe peptiede verwar word nie.

Dit is interessant om die SD-spektra van die sikliese pentapeptiede (*R*-266 en 5-266) met die van die lineêre analoë *N*-t-Boc-S-Leu-*R*-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (*R*-324) en *N*-t-Boc-S-Leu-*S*-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (5-324) in metanoliese oplossing te vergelyk. Analoog aan *R*-266 vertoon die SD-kurwe van *R*-324 'n swak negatiewe Cotton-effek by 250 nm en 'n ietwat sterker positiewe Cotton-effek by 225 nm ($\Delta\epsilon_{\text{maks}} = +4.82$; $c = 0.309 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die intensiteite van beide die Cotton-effekte is egter baie swakker as in die geval van die sikliese analoog (*R*-266). Die SD-kurwe van die lineêre peptiedanaloo van dolastatien 3, d.w.s. 5-324, vertoon 'n baie swak negatiewe Cotton-effek by 250 nm, gevolg deur 'n ietwat sterker negatiewe Cotton-effek by 235 nm ($\Delta\epsilon_{\text{maks}} = -3.32$; $c = 0.333 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Die negatiewe Cotton-effek by 250 nm is egter nie net swakker in intensiteit, maar ook teenoorgesteld in teken, as dié van die sikliese pentapeptied (*S*-266) by 258 nm. Dit wil

dus voorkom dat siklisering van die lineere peptiede wel 'n merkbare invloed op die SD-spektra van die klas van verbindings uitoefen. Nie net neem die relatiewe intensiteite van die Cotton-effekte dramaties toe nie, maar die swak sekondêre Cotton-effek van 8-324 ondergaan in die proses 'n verandering vanaf 'n negatiewe waarde na 'n positiewe waarde. Die intensiteitsverandering wat deur bogenoemde SD-kurwes ondervind word (d.w.s. lineêre-siklies) kan moontlik aan die groter relatiewe sterkte van die sikliese peptiede ten opsigte van die lineêre analoë toegeskryf word. Aangesien die relatiewe aard van die SD-kurwe van die lineêre R-324 baie goed met dié van die sikliese R-266 ooreenkom, wil dit verder ook blyk dat die relatiewe orientasies van die echromofore ten opsigte van die ehirale sentra nie veel in die twee verbindings verskil nie. Die konformasie van die lineêre R-324 stem dus moontlik tot 'n groot mate met dié van die sikliese R-266 ooreen. Dit kan dus ook afgelei word dat die lineêre 8-324 tog wel 'n klein konformasionele verandering tydens die sikliseringsproses ondergaan.

4.4.3 Infrarooispektroskopie (IR)²⁹³

IR-spektroskopie is die enigste spektrale metode waarmee betroubare diskriminasie tussen *cis*- en *trans*-sekondêre amiedbindings gemaak kan word. Die amied-II-frekwensies van die twee konfigurasies verskil met 100 cm⁻¹ en geen oorvleueling van die absorpsies vind plaas nie (1420-1460 cm⁻¹ vir *cis*- en 1480-1575 cm⁻¹ vir *trans*-amiede). Gevolglik is die teenwoordigheid van 'n absorpsieband by 1550 cm⁻¹ aanduidend van *trans*-peptiedbindings, en die afwesigheid daarvan aanduidend van slegs *cis*-peptiedbindings. Ongelukkig oorvleuel die amied-II-bande van *cis*-amiede met die CH₂-skervibrasies en kan dus nie vir die bepaling van amiedbindingkonfigurasies in peptiede gebruik word nie.

In die Lr.-spektra van beide R-266 en S-266 word mediumintensiteit amied-II-absorpsiebande by 1445 cm⁻¹ waargeneem, en wat dus op die teenwoordigheid van *trans*-amiedbindings in hierdie sikliese peptiede dui. In die algemeen neem die amiedbindings van peptiede die *trans*-konfigurasie aan. Soos reeds genoem, is die sikliese pentapep-

tiede vera! van belang in hierdie verband aangesien dit die kleinste sikliese peptiede is waarin al die amiedbindings die ongestreerde *trans*-konfigurasie kan aanneem.²⁸⁸ Dit gee aanleiding tot 'n beperking van mobiliteit.

Die NH-strekkrekwensie is baie sensitief ten opsigte van deelname van die groep aan waterstofbinding, en waardevolle inligting betreffende die teenwoordigheid of afwesigheid van intramolekulere waterstofbindings in sikliese peptiede in nie-protonaksepterende oplosmiddels (bv. heptaan, CCl₄ en CHCl₃) kan dus verkry word. Bande by 3420-3480 cm⁻¹ is aanduidend van die teenwoordigheid van vry NH-groepe, en bande by 3300-3380 cm⁻¹ van waterstofgebonde NH-groepe. Bande in die omgewing van ~3400 cm⁻¹ moet versigtig geïnterpreteer word aangesien dit op die teenwoordigheid van beide vry en swak waterstofgebonde NH-groepe kan dui.

Die voorkoms van NH-absorpsiebande by 3427 cm⁻¹ sowel as by 3379 en 3330 cm⁻¹ in die i.r.e-spektra van beide R-266 en 5-266 dui op die teenwoordigheid van vry sowel as waterstofgebonde Nlf-groepe in die twee sikliese peptiede. Die intensiteite van absorpsies van die waterstofgebonde Nlf-groepe (3379 en 3330 cm⁻¹) is veel sterker as dié van die vry NH-groepe (3427 cm⁻¹), maar dit impliseer nie dat meeste van die NH-groepe van eersgenoemde tipe is nie. Die intensiteit van 'n waterstofband is sterk afhanklik van die dipoolmoment van die binding waarmee dit geassosieer is.

4.4.4 KMR-spektroskopie^{293,295}

a. Inleiding

Huidiglik is k.m.r.e-spektroskopie die kragtigste tegniek vir die studie van die driedimensionele strukture van molekules in oplossing. 'n Uitstaande voordeel van die metode is dat dit die moontlikheid bied om in diepte insig ten opsigte van die dinamiese aspekte van die driedimensionele molekulere struktuur (konformasionele ewewigte, konformasionele omskakelings vanweë oplosmiddelinvloede) en intra- en intermolekulere interaksies in oplossing te verkry. Veral vanweë die ontwikkeling van

nuwe kragtige k.m.r.-tegnieke (sien latere voorbeelde) is die moontlikhede van die tegniek in statiese konformasionele analise baie vinnig besig om dié van die X-straal-metode in te haal. Ongelukkig kan die moontlikhede nie altyd weens tegniese en metodologiese redes gerealiseer word nie.

Die toekenning van seine aan aminosure is baie vereenvoudig deur die gebruik van moderne tweedimensionele (2D) k.m.r.-tegnieke²⁹⁶, soos byvoorbeeld homokern²⁹⁷ en heterokern²⁹⁸ 2D-J-opgeloste--spektroskopie²⁹⁹, ^1H - ^{13}C -2D-verskuiwingskorrelasie^{298,300} en homokern-2D-skuifkorrelasiespektroskopie.^{300,301} Deur die gebruik van NOE-verskilspektra³⁰² of 2D-NOE-spektroskopie³⁰³ is dit nou moontlik om die aminosuursekwense van peptiede sonder die omslagtige sintese van selektief gedeute-reerde derivate³⁰⁴ te bepaal. In gevalle waar twee konformere in redelike vinnige ewewig met mekaar verkeer, kan die uitruiling van individuele kerne tussen die twee konformere direk met versadigingsoordrag³⁰⁵ of deur 2D-uitruilingspektroskopie³⁰³ gedemonstreer word.



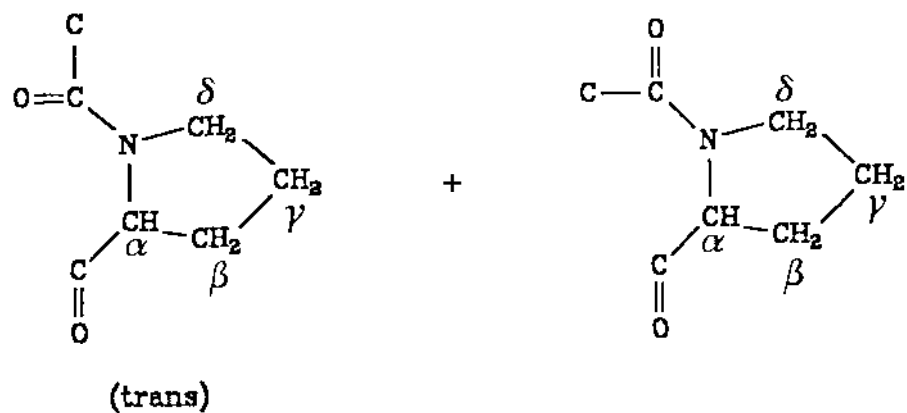
In hierdie ondersoek is van spinontkoppelingseksperimente sowel as van COSY-, DEPT- en HETCOR-eksperimente gebruik gemaak om die seine van die peptiede toe te ken. Die k.m.r.-tegnieke wat in hierdie ondersoek gebruik is om konformasionele inligting van die sikliese peptiede R-266 en S-266 te bekom, word nou elk afsonderlik bespreek.

b. ^{13}C -k.m.r.-spektroskopie

Die aanvanklike gebruik van ^{13}C -k.m.r.-spektroskopie in die studie van peptiede het veral in die onderskeiding tussen *cis*- en *trans*-proHen (dit is die amiedbinding waaraan die N-atoom van Pro deelneem) toepassing gevind.³⁰⁶⁻³⁰⁸ Die resonansies van beide C^β en C^γ verskuif met 2-3 dpm SODS die vorm verander (Tabel 4.2). Indien die ^{13}C -k.m.r.-verskuiwings van C^β en C^γ van R-266 en S-266 se prolienresidue met bekende verskuiwings van *trans*-S-Pro en *cis*-5-Pro vergelyk word (Tabel 4.2), is dit duidelik dat in beide hierdie gevalle die amiedbinding van S-Pro (d.w.s. die

amiedbinding waaraan die N-atoom van Pro deelneem) die trans-konfigurasi aanneem.

TABEL 4.2 ^{13}C -k.m.r.-verskuiwings van S-Prolienamino-suurreidue in peptiede



Koolstof	S-Pro (trans)308	S-Pro (R-266)	S-Pro (S-266)	S-Pro (cis)308
C^α	59.1–61.1	62.28	62.61	58.7
c/3	29.0–30.3	29.49	28.41	31.7
C^γ	24.1–24.2	25.54	25.45	22.0

'n Alternatiewe benadering deur Stimson *et al.*³⁰⁶ gevolg, behels die bepaling van die verskil in ^{13}C -chemiese verskuiwings van die C^β en C^δ atome van Pro. Vir 'n *trans*-prolienamiedbinding is $\Delta\delta_{\beta\gamma} = 3\text{--}5$ dpm en vir 'n *cis*-prolienamiedbinding is $\Delta\delta_{\beta\gamma} = 7\text{--}10$ dpm. Uit die ^{13}C -spektra van beide *R-266* en *S-266* is $\Delta\delta_{\beta\gamma}$ van Pro 3.95 dpm en 2.96 dpm onderskeidelik, dit wil se beide die konformasies besit *trans*-Pro amiedbindings.

Volgens Deber *et al.*³⁰⁷ kan die ClH-protonresonansiepieke van *cis*- en *trans*-konfigurasies relatief tot mekaar in DMSO-d_6 en CDCl_3 normaalweg duidelik onderskei word, aangesien in DMSO-d_6 die *cis*-pieke by laer veld as die ooreenstemmende *trans*-pieke

voorkom, terwyl in CDCl_3 die posisies omgeruil word. Geen duplisering van die C^αH -protonresonansiepieke wat op die bestaan van 'n *cis-trans* ewewig kon dui is in die IH-k.m.r.-spektra van die sikliese peptiede R-266 en 8-266 waargeneem nie.

Veral in die lig van prolien se bekende sterk konformasiebepalende eienskappe³⁰⁹ is bogenoemde waarnemings baie belangrik. Daar word vermoed dat die *trans*-vorm deur waterstofbinding gestabiliseer word, en selfs in party gevalle deur steriese stremming in die alternatiewe *cis*-konfigurasie.³⁰⁸ *Serruon et al.*³¹⁰ het 'n kwantitatiewe verwantskap tussen die verskil in chemiese verskuiwings tussen C^β en C^γ in prolien en die ψ torsiehoek voorgestel, en het dit selfs in 'n paar gevalle op konformasionele analise toegepas. Die verwantskap is egter deur ander navorsers sterk in twyfel getrek.²⁸⁸

c. Temperatuur- en oplosmiddelafhanklike IH-k.m.r.-spektroskopie

Inligting oor die orientasie van amiedbindings in In molekule word normaalweg deur In ondersoek van die moontlike waterstofbindings (intra- of intermolekuler) verkry. Intermolekulere waterstofbindings word maklik deur In toename in temperatuur gekloof. Dit is die geval vir aile oplosmiddels wat waterstofbinding kan ondergaan, en die meeste en betekenisvolste resultate is met oplossings in DMSO verkry.²⁸⁸

Met behulp van k.m.r.-spektroskopie kan twee tipes amied NH-groepe van sikliese peptiede geredelik onderskei word, naamlik die wat na binne gerig is en dus van die oplosmiddel afgeskerm is, en die wat na buite gerig is en dus met die oplosmiddel interaksie kan hê (bv. waterstofbinding met oplosmiddels soos DMSO). Die chemiese verskuiwings van eersgenoemde tipe is relatief onafhanklik van die aard van die oplosmiddel (tensy die oplosmiddel 'n konformasionele verandering teweeg bring). Die chemiese verskuiwings van die laasgenoemde tipe NH is uiters sensitief ten opsigte van die aard van die oplosmiddel. In DMSO as oplosmiddel word temperatuurgradiënte ($d\delta/dT$) vir die chemiese verskuiwings van NH-seine groter as 4×10^{-3} dpm/K as bewys vir eks-teme NII-orientasies geneem, terwyl waardes onder 2×10^{-3} dpm/K op oplosmiddelaf-

skermining dui.292b Tussenliggende gradientwaardes moet versigtig geïnterpreteer word aangesien die parameter nie net slegs op die toeganklikheid van die NH-groepe tot die oplosmiddel berus nie, maar ook op die temperatuurstabiliteit van die waterstofbindings en op die orientasie van naasliggende magneties anisotropiese bindings in sykettings wat met verhitting mag verander. Verder meer kan tussenliggende gradientwaardes ook aanduidend van 'n konformasionele ewewig van verskeie vorms wees wat in die aantal en/of posisies van die waterstofbindings verskil. Die NH's wat na binne gerig is kan natuurlik intramolekulere waterstofbindings ondergaan al dan nie. Die waterstofgebonde NH's sal normaalweg in IH-k.m.r.-spektra by laer veld voorkom as die wat nie waterstofgebonde is nie.³¹¹

Die identifikasie van NH's van R-266 en 8-266 wat na binne gerig is en derhalwe van die oplosmiddel afgeskerm is (en waarskynlik ook by intramolekulere waterstofbinding betrokke is), is op grond van die temperatuur- en oplosmiddelafhanklikheid van die ooreenkomstige chemiese verskuiwings vasgestel (Tabelle 4.3 en 4.4). Vir beide 8-266 en R-266 vertoon die chemiese verskuiwings van die Leu-NH en die (Gln)Thz-sykettings se CO-NH₂ protone sterk temperatuurafhanklikheid, en tesame met die aansienlike verskuiwings na laer veld in DMSO-d₆ van dié protone, is dit 'n duidelike bewys dat die protone aan die oplosmiddel blootgestel is. Dit is ook die enigste amiedprotone wat maklik met deuterium by kamertemperatuur uitruil. Die gedrag van die NH-protone van (Gln)Thz, (Gly)Thz en Val, vir beide R-266 en 8-266, is tipies die van na binne gerigte NH-protone³¹² en neem dus heel moontlik aan intramolekulere waterstofbindings deel. In die geval van R-266 vertoon die (Gly)Thz-NH-proton 'n hoër temperatuurkoeffisient as die ooreenkomstige NH-proton van 8-266, maar die resultate in Tabel 4.4 dui daarop dat die proton wel ook waterstofgebonde is. Die essensieel identiese aard van die IH- en ¹³C-k.m.r.-spektra van beide 8-266 en R-266 in CDCl₃ aan die spektra in DMSO-d₆, asook die klein verskille van die ³JNHC_βH-koppelingskonstantes in CDCl₃ en DMSO-d₆ (Tabelle 4.3 en 4.4), dien as 'n verdere bewys dat die peptiedruggrate van die twee molekules besonder star is.

TABEL 4.3 ^1H -k.m.r.--data^a vir die NH-protone van 8-266

Residu	Nommer	CDCl_3 (dpm)	$\text{DMSO}-d_6$ (dpm)	$\Delta\delta$	$d\delta/dT^b$	$^3J_{\text{NHC}^\alpha\text{H}}$	
						CDCl_3 (Hz)	$\text{DMSO}-d_6$ (Hz)
Leu	(5)	6.39	8.34	+1.95	3.5	6.6	6.7
(Gln)Thz	(4)	7.83	7.73	-0.10	0.8	9.2	9.2
	(3a)	5.48	6.67	+1.19	4.5		
	(3b)	6.29	7.12	+0.83	5.0		
(Gly)Thz	(2)	8.73	8.73	0	0.3	2.4;7.3	2.5;7.5
Val	(1)	8.31	8.21	-0.10	0	9.2	8.9

waar:

- a - δ -waardes is in dpm vanaf interne TMS
- $\Delta\delta$ - $\delta(\text{DMSO}-d_6) - \delta(\text{CDCl}_3)$
- b - Temperatuurgebied: 20 - 100°C (in $\text{DMSO}-d_6$, 10°C intervalle)
- $d\delta/dT$ - 10^{-3} dpm/K
- $[^3J_{\text{NHC}^\alpha\text{H}}]$ - Hertz.

TABEL 4.4: ^1H -k.m.r.-data^a vir die NH-protone van *R*-266

Residu	Nommer	CDCl_3 (dpm)	DMSO-d_6 (dpm)	<i>SS</i>	$d\delta/dT^b$	$^3J_{\text{NHC}^\alpha\text{H}}$	
						CDCl_3 (Hz)	DMSO-d_6 (Hz)
Leu	(5)	5.67	7.19	+1.52	5.3	7.2	6.1
(Gln)Thz	(4)	7.54	7.61	+0.07	0	9.2	9.4
	(3a)	5.31	6.70	+1.39	4.0		
	(3b)	6.44	7.08	+0.64	3.8		
(Gly)Thz	(2)	8.27	8.56	+0.29	2.0	2.2;10.0	3.2;9.7
Val	(1)	7.98	7.68	-0.30	-1.0	9.7	10.0

waar:

a

δ -waardes is in dpm vanaf interne TMS

$\Delta\delta$

$\delta(\text{DMSO-d}_6) - \delta(\text{CDCl}_3)$

b

Temperatuurgebied: 20 - 100°C (in DMSO-d_6 , wOe intervalle)

$d\delta/dT$

10^{-3} dpmjK

$[^3J_{\text{NHC}^\alpha\text{H}}]$ -

Hertz.

d. Interproton k.m.r. spin-spin-koppelingskonstantes²⁹⁵

Proton-protonkoppelingskonstantes speel 'n baie groot rol in die konformasie-analise van peptiede aangesien dit gebruik word in die bepaling van die ϕ , ψ en χ torsiehoeke. Die rede is voor die hand liggend. C^α -protone van peptiede is ruimtelik naby aan die amied- of estergroepe, wat gewoonlik aan beide kante van die ketting voorkom, gelee. Die gevolg is dat die chemiese verskuiwings van die C^α -protone sterk deur die orientasies van die karbonielgroepe beïnvloed word. In hierdie ondersoek is slegs van ^1H -k.m.r.-koppelingskonstantes gebruik gemaak. 'n Kennis van die

visinale koppelingskonstantes met ^{13}C - en ^{15}N -k.m.r.-spektroskopie²⁹⁵ verkry sou egter ook 'n belangrike bydrae tot die oplossing van die probleem (veral ten opsigte van die ψ en ω torsiehoeke) kon lewer.

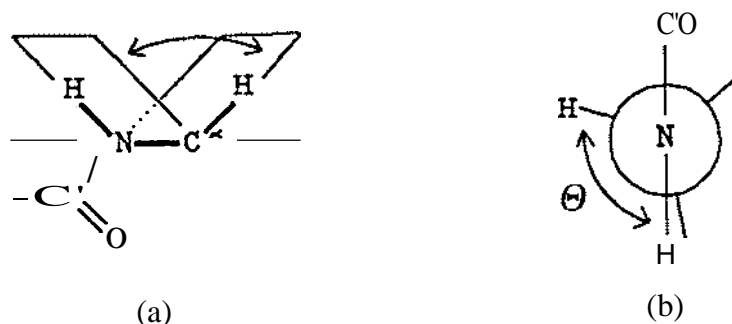
Op grond van die bevinding dat die Pro-amiedbinding in beide R-266 en 5-266 'n trans-konfigurasie besit, kan rederlikerwys aanvaar word dat al die amiedbindings trans-planer is. Vanwee konjugasie tussen die tiasoolringe en die aanliggende amied-groepe kan ook aanvaar word dat dié groepe koplener is ooreenkomstig die situasie in die geval van nosiheptied (15)⁸ en askidiasiklamied (38).³¹³ Hieruit volg dit dus dat al die ω torsiehoeke om die amiedbindings 180° moet wees.

Bystrov *et al.*³¹⁴ het die voorgestelde hoekafhanklikheid vir die $^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}}$ konstante vir peptiede met trans-amiedgroepe³¹⁵, wat in die vorm van 'n Karplus-vergelyking³¹⁶ geformuleer is, op grond van die resultate van uitgebreide k.m.r.-studies verfyn. Die gemodifiseerde Karplus-vergelyking (Vergelyking 4.1), wat vir praktiese doeleindes na Vergelyking 4.2 omskryf kan word, is in hierdie ondersoek gebruik om die dihedrale hoek (θ) te bereken.

$$^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}} = 9.8 \cos^2\theta - 1.1 \cos \theta + 0.4 \sin^2\theta \quad \text{Vergelyking 4.1}$$

$$^3J_{\text{NHC}\alpha\text{H}} = 9.4 \cos^2\theta - 1.1 \cos \theta + 0.4 \quad \text{Vergelyking 4.2}$$

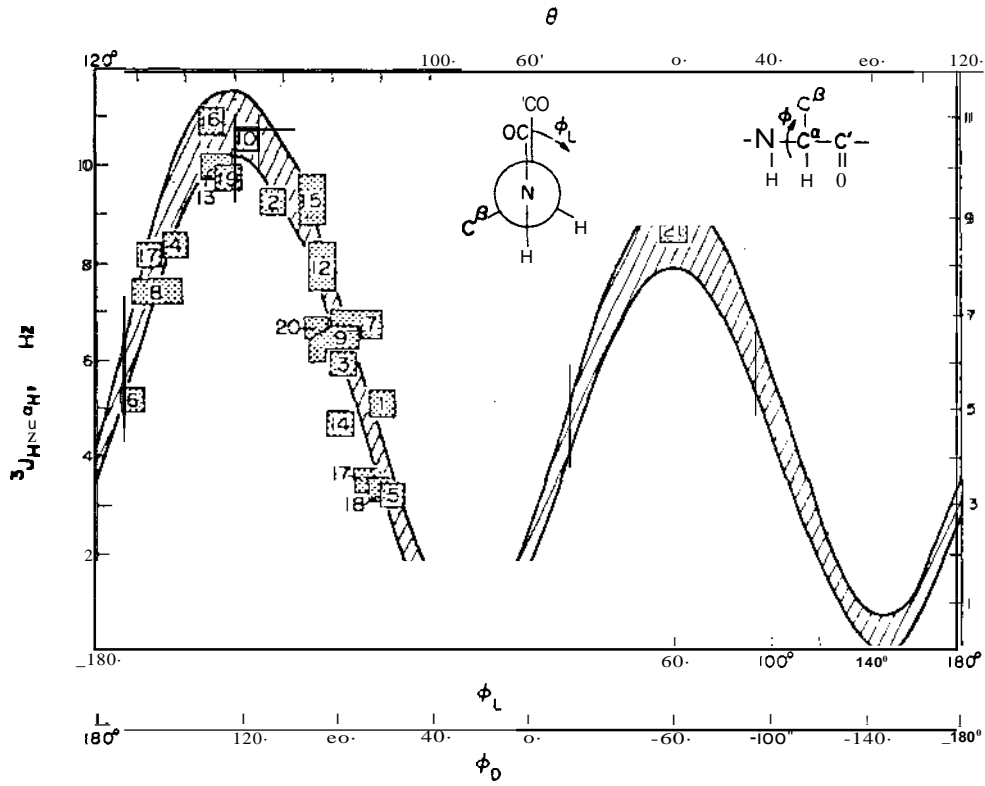
Die dihedrale hoek (θ) is die hoek tussen die vlakke van $\text{H}-\text{N}-\text{C}^\alpha$ en $\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{H}$ in die ruimte²⁹⁵ (Skema 4.4), en besit in die geval van s-gekonfigureerde aminosure die verwantskap $\theta = \phi - 60^\circ$ met die ϕ torsiehoek. Dit is belangrik om te beseft dat bogenoemde verwantskappe vanaf eksperimentele waarnemings afgelei is, en dat die torsie- en dihedrale hoekwaardes (ϕ en θ) daarmee bereken, slegs gemiddelde waardes



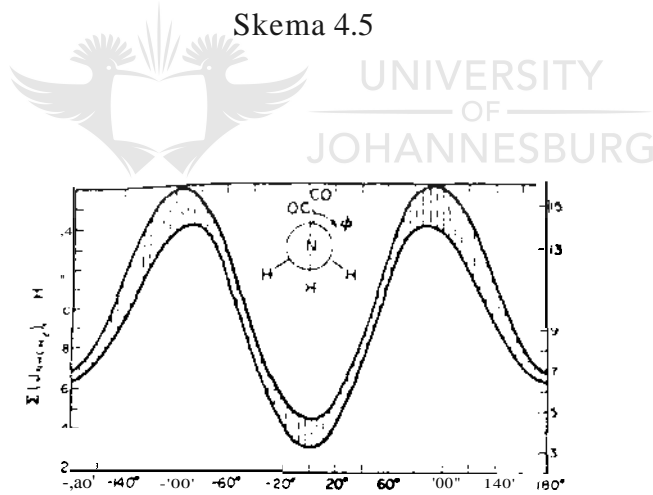
Skema 4.4 Die dihedrale hoek θ tussen die $\text{H}-\text{N}-\text{C}^\alpha$ en $\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{H}$ vlakke in die ruimtelike(a) en Newman-(b) projeksies. Volgens definisie is $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$

ooreenkomstig die gebied van moontlike hoeke is. Dit blyk duidelik uit Skema 4.5 waarin die afhanklikheid van die visinale $\text{H}-\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{H}$ protonkoppeling op die dihedrale hoek (θ) en die ϕ torsiehoek vir peptiede met trans-amidbindings geïllustreer word.^{314,317} Die boonste as wat die torsiehoeke beskryf kom ooreen met *S*-gekonfigureerde peptiede ($\phi_L = \phi_S$) en die onderste as kom ooreen met *R*-gekonfigureerde peptiede ($\phi_D = \phi_R$). Die nommers op die golffunksie kom met die eksperimentele data vir starre peptiede met trans-amidbindings, en waarvan die ruimtelike strukture met behulp van X-straalanalise bepaal is, ooreen. Meestal het verskeie variasies op die oorspronklik voorgestelde Karplus-vergelyking van Bystrov *et al.*, en wat veronderstel is om die golffunksie in Skema 4.5 beter te omskryf, in die literatuur verskyn.^{313,335}

Die visinale $\text{NH}-\text{C}^\alpha-\text{H}_2$ -koppeling (In>If!) van glisienresidue in peptiede vereis spesiale melding aangesien dit tot 'n ABX- of AA'X-spektrum aanleiding gee. In die geval gee die triplet-ofkwadrupletspleetings van die NH-sein (X-proton) nie direk die ${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}}$ konstantes nie.³¹⁸ Streng gesproke is die spasie tussen die buitenste komponente van die X-sein gelyk aan die som van die J_{AX} en J_{BX} konstantes³¹⁹. In Skema 4.6 word die totale $\Sigma({}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}_2})$ visinale konstantes van die glisiel $\text{HNC}^\alpha\text{H}_2$ -protone as 'n funksie van die ϕ torsiehoek geïllustreer.³¹⁴ Die gemiddelde waardes van die toegelate



Skema 4.5



Skema 4.6

ϕ torsiehoeke kan deur Vergelyking 4.3 benader word³¹⁴:

$$\Sigma({}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}_2}) = -9.4 \cos^2 \phi - 1.1 \cos \phi + 14.9 \quad \text{Vergelyking 4.3}$$

Dit moet egter in gedagte gehou word dat bostaande Karplus-vergelykings (Vergelykings 4.1, 4.2 en 4.3) vir die ongesubstitueerde $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_3$ fragment ontwikkel is, d.w.s. dit neem nie die elektronegatiwiteitseffekte van die C' - en C^β -substituente op $\text{C}^\alpha(\text{HN}-\text{HC}^\alpha\text{C}'\text{C}^\beta)$ in aanmerking nie. Bystrov²⁹⁵ het Vergelykings 4.4 en 4.5 vir die $\text{HNC}^\alpha\text{H}$ en $\text{HN}-\text{C}^\alpha\text{H}_2-\text{C}'$ peptiedfragmente onderskeidelik voorgestel om vir elektronegatiwiteitseffekte van substituentte op C^α te kompenseer:

$${}^3J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}} \quad 1.09 \text{ Jobs} \quad \text{Vergelyking 4.4}$$

$$\Sigma^3(J_{\text{HNC}^\alpha\text{H}_2}) = 1.04 \Sigma(J_{\text{obs}}) \quad \text{Vergelyking 4.5}$$

In bostaande twee vergelykings is Jobs die eksperimenteel bepaalde 1H-1H-koppelingskonstante. Uit bostaande bespreking is dit duidelik dat Vergelykings 4.1, 4.2 en 4.3 vanwee elektronegatiwiteitsinvloede nie sonder meer toepaslik op tiasoolgesubstitueerde aminosuurresidue van peptiede is nie. Verder meer kan die ringspanning waaraan kleiner sikliese peptiede (onder meer sikliese pentapeptiede) onderhewig is, daartoe aanleiding gee dat direkte toepassing van die Karplus-tipe vergelykings wat vir vry lineere peptiede ontwikkel is, ongewens kan wees. Hierdie gevolgtrekkings is deur ons bevestig deurdat in die geval van In kristallyne dolastatien 3 isomeer (waarvan die konformasie later volledig bespreek sal word), swak korrelasies tussen die berekende J-waardes (1H_1H) m.b.v. Vergelykings 4.2 en 4.3, sowel as variasies daarvan³¹³ (gebruikmakende van ϕ -waardes wat m.b.v. X-straalanalise bepaal is), en Schmidt *et al.*³²⁰ se eksperimenteel bepaalde 1U-1H-koppelingskonstantes van dieselfde verbinding verkry is. Die dihedrale hoeke (θ), sowel as die ϕ torsiehoeke, van R-266 en S-266 is gevolglik deur middel van die gemodifiseerde eksperimentele proton-proton J-waardes (m.b.v. Vergelykings 4.4 en 4.5) in terme van die eksperimenteel bepaalde grense van dihedrale en torsiehoeke wat met gegewe koppelingskonstantes ooreenstem (Skemas 4.5 en 4.6), afgelei. Die resultate word in Tabel 4.5 vir S-266 en in Tabel 4.6

vir R-266 opgesom. Aangesien prolien 'n tersiere amien is kan die ϕ torsiehoek van die aminosuurkomponent nie op bostaande wyse bepaal word nie. Eksperimentele gegewens toon egteraan dat vir beide *trans*- en *cis*-S-Pro in peptiede die ϕ torsiehoek normaalweg die waardes van -75° *iendo*- of af-konformasie; 'n lae-energiekonformasie van Pro) of -68° (*ekso*- of op-konformasie) aanneem.³²¹

Uit die bepaalde waardes van die mees waarskynlike ϕ torsiehoeke (Tabelle 4.5 en 4.6), sowel as deur ondersoek van Skema 4.5, is dit duidelik dat in die algemeen 'n gegewe $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ vir peptiede met 'n starre konformasie sou kon ooreenstem met tot vier verskillende ϕ hoeke. Die benaderde simmetrie van die hoekafhanklikheid van $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ om $\theta \sim 90^\circ$ is hiervoor verantwoordelik. Slegs in die geval van $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}} > 9.4$ Hz is die keuse tot twee ϕ torsiehoeke, wat in die relatiewe klein gebied van -90° tot -150° voorkom, beperk. Die mees waarskynlike ϕ torsiehoek kan egter gekies word indien addisionele fisiese of teoretiese oorwegings in berekening gebring word.



TABEL 4.5: Moontlike ϕ Torsiehoeke van 5-266 konsistent met $^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ -waardes

$\phi_{\text{aminosuur}}$	Jobs (Hz)	$^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ (Hz)	<u>5-266</u>	
			ϕ (grade)d	O(grade)e (Dihedrale hoek)
ϕ_{Vala}	9.22	10.05	$(-148^\circ - -130^\circ)^{\text{of}}$ $(-117^\circ - -97^\circ)$	$(+152^\circ - +170^\circ)^{\text{of}}$ $(-110^\circ - -157^\circ)$
ϕ_{Leu}^a	7.00	7.63	$(-163^\circ - -153^\circ)^{\text{of}}$ $(-87^\circ - -79^\circ)^{\text{of}}$ $(+28^\circ - +40^\circ)^{\text{of}}$ $(+13^\circ - +90^\circ)$	$(+131^\circ - +147^\circ)^{\text{of}}$ $(-147^\circ - -139^\circ)^{\text{of}}$ $(-32^\circ - -20^\circ)^{\text{of}}$ $(+13^\circ - +30^\circ)$

TABEL 4.5(vervolg)

$\phi_{\text{Gln(Thz)}}^{a,f}$	920	10.03	$(-148^\circ - -130^\circ)$	$(+152^\circ - +170^\circ)$
	.		$(-117^\circ - -97^\circ)$	$(-177^\circ - -157^\circ)$
$\phi_{\text{Gly(Thz)}}^{b,f}$	9.73	10.12	$+(150^\circ - 138^\circ)$	$(+150^\circ - +162^\circ)$
			$+(48^\circ - 5^\circ)$	$(+90^\circ - +7^\circ)$
				$(-10^\circ - -11^\circ)$
				$(-12^\circ - -2^\circ)$
ϕ_{Pro}^c			-75° of -68°	-135° of -12°

- waar a: ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}} = 1.09 J_{\text{obs}}$ en J_{obs} is die eksperimenteel bepaalde IH-IH-koppelingskonstante (200 MHz)
- b: $\Sigma({}^3J_{\text{HNCH}_2}) = 1.04 \Sigma J_{\text{obs}}$ en $J_{\text{obs}} = J_{\text{AX}} + J_{\text{BX}}$
- c: Gepubliseerde waardes³²¹
- d: ϕ Torsiehoekwaardes is ooreenkomstig vir ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ vanaf Skema 4.5 en Skema 4.6 bepaal
- e: $\phi = \theta + 60^\circ$ (vir *S*-gekonfigureerde aminosuurresidue)
- f: Hierdie moontlike hoekwaardes (θ en ϕ kan sterk deur die naasliggende tiasoolring beïnvloed word aangesien die Karplus-tipe hoekafhanklikheid van ${}^3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ slegs vir normale aminosuurresidue ontwikkel is.

TABEL 4.6: Moontlike ϕ Torsiehoeke van R-266 konsistent met $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ -waardes

$\phi_{\text{amino-suur}}$	Jobs (Hz)	$^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ (Hz)	<u>R-266</u>	
			ϕ (grade)d	O(grade)e (Dihedrale hoek)
$\phi_{\text{Val}}^{\text{a}}$	9.70	10.57	$-140^{\circ} \text{ -- } 104^{\circ}$	$+160^{\circ} \text{ -- } 164^{\circ}$
$\phi_{\text{Leu}}^{\text{a}}$	7.24	7.89	$(-160^{\circ} \text{ - } -152^{\circ})_{\text{0f}}$	$(+140^{\circ} \text{ - } +148^{\circ})_{\text{0f}}$
			$(-87^{\circ} \text{ -- } 80^{\circ})_{\text{0f}}$	$(-147^{\circ} \text{ - } -140^{\circ})_{\text{0f}}$
			$(+35^{\circ} \text{ - } +50^{\circ})_{\text{0f}}$	$(-25^{\circ} \text{ - } -10^{\circ})_{\text{0f}}$
			$(+64^{\circ} \text{ - } +83^{\circ})$	$(+4^{\circ} \text{ - } +23^{\circ})$
$\phi_{\text{Gln}}^{\text{a, f, g}}$ (Thz)	9.24	10.07	$(+148^{\circ} \text{ - } +130^{\circ})_{\text{0f}}$	$(-152^{\circ} \text{ - } -170^{\circ})_{\text{0f}}$
			$(+117^{\circ} \text{ - } +97^{\circ})$	$(+177^{\circ} \text{ -- } 157^{\circ})$
$\phi_{\text{Gly}}^{\text{S, r}}$ (Thz)	12.26	12.75	$\pm (130^{\circ} \text{ - } 113^{\circ})_{\text{0f}}$	$(+170^{\circ} \text{ -- } 173^{\circ})_{\text{0f}}$
			$\pm (68^{\circ} \text{ - } 60^{\circ})$	$(+70^{\circ} \text{ - } +53^{\circ})_{\text{0f}}$
				$(-128^{\circ} \text{ - } -120^{\circ})_{\text{0f}}$
$\phi_{\text{Pro}}^{\text{c}}$			-7.5° of -68°	-135° of -128°

- waar a: $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}} = 1.09$ Jobs en Jobs is die eksperimenteel bepaalde 1H-1H-koppelingskonstante (200 MHz)
- b: $\Sigma(^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}) = 1.04 \Sigma$ Jobs en Jobs = $J_{\text{AX}} + J_{\text{BX}}$
- c: Gepubliseerde waardes³²¹
- d: ϕ Torsiehoekwaardes is ooreenkomstig vir $^3J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ vanaf Skerna 4.5 en Skema 4.6 bepaal

- e: $\phi = () + 60^\circ$ (vir B-gekonfigureerde aminosuuresidue)
 $\phi = () - 60^\circ$ (vir R-gekonfigureerde aminosuuresidue)
- f: Hierdie moontlike hoekwaardes ($()$ en ϕ) kan sterk deur die naasliggende tiasoolring beïnvloed word aangesien die Karplus-tipe hoekafhanklikheid van $3J_{\text{HNC}\alpha\text{H}}$ slegs vir normale aminosuuresidue ontwikkel is.
- g: $\phi_{\text{R}} = -\phi_{\text{S}}$ (of $\phi_{\text{S}} = -\phi_{\text{R}}$).

In beginsel kan die probleem byvoorbeeld deur gebruikmaking van ${}^1\text{H}-{}^{13}\text{C}$ - en ${}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$ -koppelingskonstantes opgelos word.²⁹⁵ 'n Ander benadering behels die keuse van 'n selfkonsistente stel torsiehoeke deur die inspeksie van Dreiding-modelle in samehang met ander gegewens t.o.v. interatoomafstande (bv. NOE-data). Laasgenoemde benadering is in hierdie ondersoek gevoig. Dit sal egter onrealisties wees om In akkurate konformasionele analise langs hierdie weg te bewerkstellig aangesien die $\text{H}-\text{NC}^\alpha-\text{H}$ koppeling nie net slegs van die dihedrale hoek afhanklik is nie, maar ook deur inter- en intramolekulere interaksies soos waterstofbinding $\text{NH}\cdots\text{X}$, ioon-dipoolinteraksies $\text{C}'=\text{O}\cdots\text{M}^+$ ens. beïnvloed word. Sulke effekte speel gelukkig normaalweg slegs 'n minimale rol.^{314b}

In die algemeen is dit nie moontlik om direkte inligting oor die ψ torsiehoek ($\text{N}-\text{C}^\alpha-\text{C}'-\text{N}$) vanuit visinale koppelingsdata te verkry nie. Vir glisien is dit egter gevind dat die waarde van ψ wel met die geminale koppeling tussen die twee α -protone verband hou,³²² maar ongelukkig is geen wiskundige verwantskap daarvoor voorgestel nie. Net soos in die geval van ϕ , is voorgestel dat in die algemeen direkte ${}^{13}\text{C}-{}^1\text{H}$ -koppelingskonstantes³²³ en ${}^1\text{H}-{}^{15}\text{N}$ -koppelingskonstantes^{29.5} vir die bepaling van die ψ torsiehoek gebruik kan word. In hierdie ondersoek is die ψ torsiehoeke egter direk met behulp van 'n Dreiding-model bepaal (sien latere bespreking).

Die situasie in die geval van die sykettingkonformasies (X torsiehoek) is egter verskil-

lend. Dit is bekend dat die ${}^3J_{\text{HC}^\alpha\text{C}^\beta\text{H}}$ konstante nie net van die dihedrale hoek (ϕ), maar ook van die aard van die substituenten en hul orientasies³²⁴ sowel as van die valenshoeke en bindingslengtes, afhanglik is.^{316b} In hierdie geval is dit dus nodig om die voorafname te maak van 'n vinnige ewewig tussen verskeie konformasies wat deur interpretasie van visinale koppelingskonstantes (${}^1\text{H}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-{}^1\text{H}$, ${}^1\text{H}-\text{C}^\beta\text{C}^\alpha-{}^{13}\text{C}$ en ${}^{15}\text{N}-\text{C}^\alpha\text{C}^\beta-{}^1\text{H}$) analiseerbaar is.²⁹⁵ In konformasionele ondersoeke word dit aanvaar dat slegs die drie verstelde konformasies om die $\text{C}^\alpha\text{C}^\beta$ -binding beset word.^{295,325} Die benadering word normaalweg gevolg in gevalle waar sykettings nie in die sikliese struktuur ingesluit word nie. Byvoorbeeld, in oksitosien vertoon die sisteiensykettings (wat deel van die sikliese sisteem uitmaak) afwyking van die ideale verstelde konformasies.³²⁶ Elk van bostaande drie koppelingskonstantes, in isolasie beskou, voorsien slegs 'n gedeeltelike antwoord. Dit is byvoorbeeld in die reël moeilik om tussen die moontlike verstelde konformasies te onderskei op grond van 'n enkele koppelingskonstante. Dit is wel moontlik indien die informasie oor die bogenoemde drie koppelingskonstantes gelyktydig bekend is. Een van die belangrikste vereenvoudigings wat by die berekening van dihedrale hoeke vanuit koppelingskonstantes gemaak word, is die aanname van gelykwaardigheid van al die konstantes in die koppeling tussen *gauche* georiënteerde kerne.

In hierdie verband is dit egter nodig om Pro uit te sonder, veral in lig van die belangrikheid daarvan in die bepaling van die driedimensionele strukture van peptiede.³²⁷ Dit is ook nodig om kennis te neem van die vinnig opgestelde ewewig tussen verskeie konformasies van die pirrolidienring. Oorspronklik is besprekings oor die konformasie van prolienresidue in peptiede gebaseer op die aanname van twee vinnig ekwilibrerende Ramachandran-konformasies³²⁸ (Konformasie A: $\phi_{\text{Pro}} = -75^\circ$, $\chi_1 = +19^\circ$, *endo*- of *af*-konformasie; Konformasie B: $\phi_{\text{Pro}} = -68^\circ$, $\chi_1 = -6^\circ$, *ekso*- of *op*-konformasie; ψ_{Pro} kan varieer), maar dit is later deur eksakte analise aangetoon dat 'n groter gebied van pseudorotasie van die syketting in ag geneem moet word.³²⁹

Uit die bostaande bespreking is dit duidelik dat volledige inligting oor homo- en heterokernige koppelingskonstantes wel die moontlikheid skep om akkurate voorspellings ten opsigte van peptiedkonformasies te maak. Hierdie tipe inligting word steeds meer gereedlik beskikbaar met die ontwikkeling van nuwe 2-dimensionele (2D) k.m.r.-tegnieke.^{325,330} In hierdie ondersoek is egter grootliks van k.m.r.-tegnieke soos ROESY en ^1H - ^1H -NOE-verskilspektra, wat inligting oor interatoomafstande lewer, gebruik gemaak om die konformasies van die sykettings van die sikliese pentapeptiede te voorspel, waarna die modelle met behulp van kragveldberekeninge geminimiseer is.

e. 2D-k.m.r.-spektroskopie

Die bekendstelling van 2D-k.m.r.-tegnieke het 'n omwenteling op die gebied van konformasionele analise tot gevolg. Van die tegnieke is reeds in hierdie bespreking genoem en heelwat oorsigte in die literatuur het in die verband verskyn.^{288,331} Slegs die twee 2D-k.m.r.-tegnieke wat in hierdie ondersoek gebruik is, nl. ^1H - ^1H -NOE-verskilspektra en ROESY-spektra sal kortliks behandel word.

i) ^1H [^1H]-NOE-verskilspektra

NOE (Nuclear Overhauser Enhancement)-effekte word veroorsaak deur dipolere koppeling wat lei tot 'n intensiteitsverandering van een k.m.r.-sein wat gelinduseer word deur 'n ander kern in 'n nie-ewewigstoestand. Aangesien die homokernige intramolekulere NOE's tussen protone deur 'n dipolere relaksasiemeganisme veroorsaak word, is daar 'n korrelasie tussen die intensiteit van dié effek en die afstand tussen die protone.^{288,331} In meeste gevalle egter kan die NOE's slegs waargeneem word indien die afstande nie groter as 3–4 Å is nie.²⁸⁸ In kleiner molekules (bv. kleiner sikliese peptiede insluitend sikliese heksapeptiede) is die NOE's positief by medium-veldsterkte (bv. 270 MHz) en onder normale kondisies (kamertemperatuur, DMSO as oplosmiddel). In proteïene en by hoer-veldsterktes is die NOE's negatief.

Die resultate van 'n tweedimensionele ^1H - ^1H -NOE-verskilspektrum van dolastatien 3

(5-266) word in Tabel 4.7 opgesom. Die NOE-verskille ten opsigte van protone in Tabel 4.7 aangetoon en watnie direk spingekoppel is nie, word in Skema 4.7 geillustreer.

TABEL 4.7 Dolastatien 3 (5-266) toekennings in deuteriochloroformoplossing relatief tot tetrametielsilaan vir ^1H , ^1H - \leftrightarrow rde van samehang deur NOE-eksperimente

Posisie bestraal	^1H -chemiese verskuiwing (dpm)	Orde van samehang deur ^1H - ^1H -NOE verskille	%NOE
(1)	8.30	$\text{N}(1)\text{H}$, $\text{C}7\text{H}$ $\text{N}(1)\text{H}$, $\text{C}7\text{cH}$	0.8 0.8
7	4.75	$\text{C}7\text{H}$, $\text{C}7\text{bH}$ $\text{C}7\text{H}$, $\text{C}7\text{cH}$ $\text{C}7\text{H}$, $\text{C}5\text{H}$	1.1 1.1 2.7
2	4.00	$\text{C}2\text{H}$, $\text{N}(5)\text{H}$ $\text{C}2\text{H}$, $\text{C}3\text{H}$	1.3 0.8
(5)	6.39	$\text{N}(5)\text{H}$, $\text{C}2\text{H}$ $\text{N}(5)\text{H}$, $\text{C}19\text{H}$	4.1 3.3
(4)	7.83	$\text{N}(4)\text{H}$, $\text{C}19\text{H}$ $\text{N}(4)\text{H}$, $\text{N}(5)\text{H}$ $\text{N}(4)\text{H}$, $\text{C}17\text{H}$ $\text{N}(4)\text{H}$, $\text{C}17\text{aH}$	0.8 0.8 1.0 1.1
17	5.52	$\text{C}17\text{H}$, $\text{C}17\text{aH}$ $\text{C}17\text{H}$, $\text{C}17\text{bH}$	2.3 1.3
(3)	5.48 6.29	$\text{N}(3)\text{H}$, $\text{C}17\text{bH}$ $\text{N}(3)\text{H}$, $\text{C}17\text{bH}$	0.5 0.7
(2)	8.73	$\text{N}(2)\text{H}$, $\text{C}12\text{H}$ $\text{N}(2)\text{H}$, $\text{C}12\text{H}$	1.2 1.7
12	5.23	$\text{C}12\text{H}$, $\text{N}(2)\text{H}$	0.8

Die eerste van twee beduidende resultate is die NOE-effekte tussen H-7 en H-Sa,b.

ii) ROESY-k.m.r.-spektra

Ongunstige korrelasietye, wat byvoorbeeld in die geval van grater sikliese peptiede (penta- en groter) en by hoë veld (300- en 500 MHz) verkry kan word, gee aanleiding tot 'n situasie waarin daar geen kruiskorrelasies en dus geen NOE-effekte waargeneem word nie.³³¹ Die probleem word deur die CAMELSPIN-eksperiment³³³ wat deur Bothner-By *et al.* ontwikkel is, en na 'n voorstel deur Bax *et al.*³³⁴ na ROESY (Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) herdoop is, opgelos. Die ROESY-tegniek is veral geskik vir uitruilingspektroskopie, en sal verder aan hand daarvan verduidelik word.³³¹

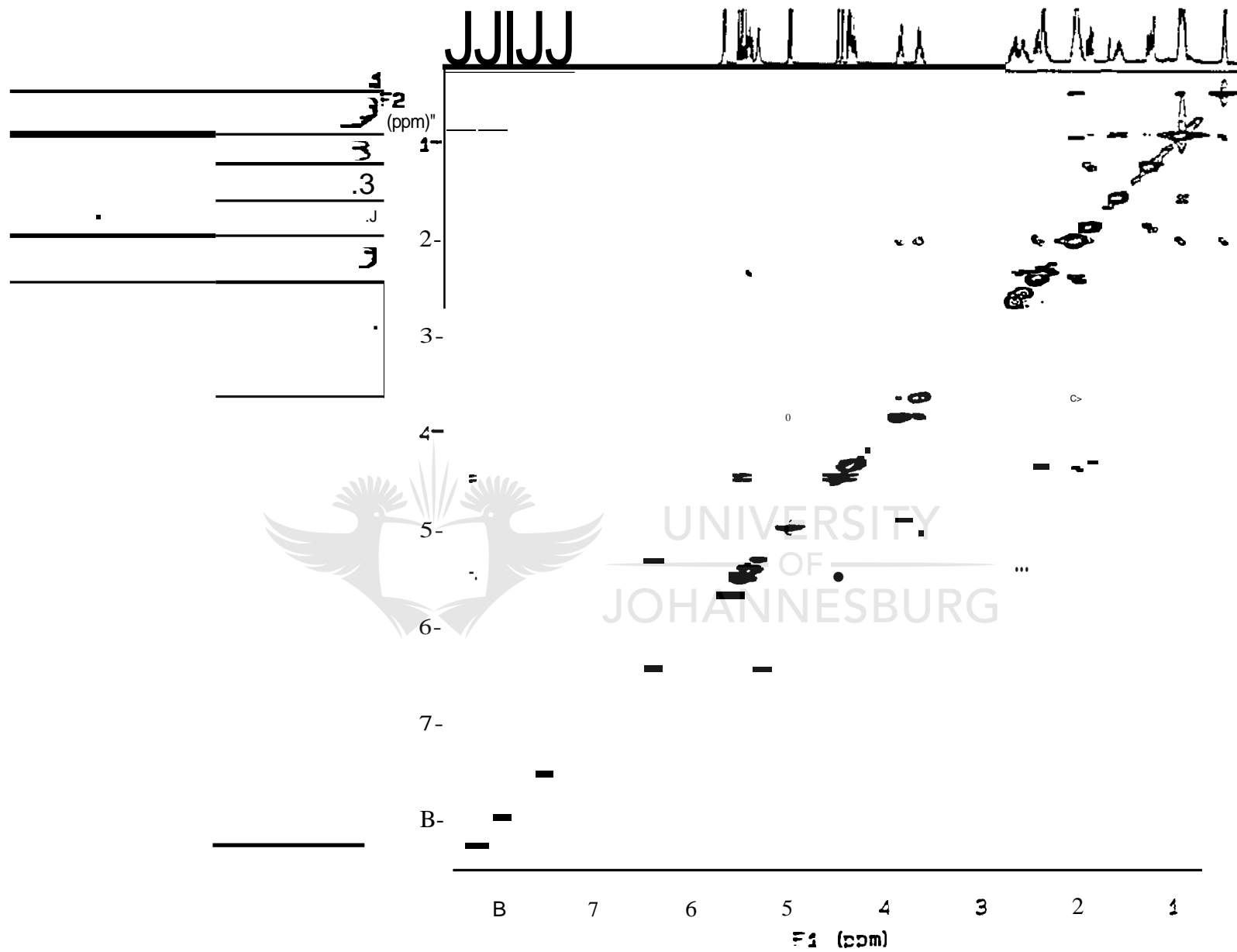
Chemiese uitruiling lei tot die oordrag van magnetisering van een spin na 'n ander. In 'n chemiese ewewig moet twee isomere of topomere redelik vinnig uitruil. Afhange van die tempo van uitruiling kan of aparte stelle seine (stadige uitruiling) of een stel van gemiddelde seine (vinnige uitruiling) in die k.m.r.-spektrum waargeneem word. Die variasie van die lynvorms in die intermediere gebied is al gebruik om die uitruilingskinetika te bepaal.³³¹ In die stadige uitruilingsgebied kan polarisasie van een posisie na die ander oorgedra word (bv. versadigingsoordrag).³³¹ Die NOESY-{Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy} en ROESY-sekwense kan in die bepaling van sulke uitruilingsprosesse gebruik word. Die voordeel van die 2D k.m.r.-tegniek is voor die hand liggend: gesamentlike toekennings kan vergelyk word, uitruilingsmeganismes is onmiddellik sigbaar en kwantitatiewe evaluering is moontlik. Kruisseine as gevolg van chemiese uitruiling, sowel as die te wyte aan negatiewe NOE-effekte (groot molekules, viskeuse oplosmiddels, lae temperatuur, hoë veld), het dieselfde teken as die diagonaalseine in spektra met suiwer fases. In NOESY-spektra van klein molekules in lae-viskeuse oplosmiddels (positiewe NOE-effekte), en in *alle* ROESY-spektra, is uitruilingsseine sowel as NOE's oor verskeie kerne geredelik onderskeidbaar van direkte NOE-kruisseine as gevolg van die verskil in tekens. Byvoorbeeld, in die ROESY-spektrum van 'n Pro-bevattende sikliese heksapeptied wat in 'n konformasionele ewewig verkeer, en waarin die Pro-amiedbinding in of die *trans*- of die *cis*-konfigurasie voor-

kom, korreleer die seine te wyte aan NH-uitruiling van die twee konformasies met positiewe (swart) kruisseine (ten opsigte van positiewe diagonale) terwyl die negatiewe (rooi) seine die NOE in die roterende raamwerk ('rotating frame', ROE) verteenwoordig.³³¹

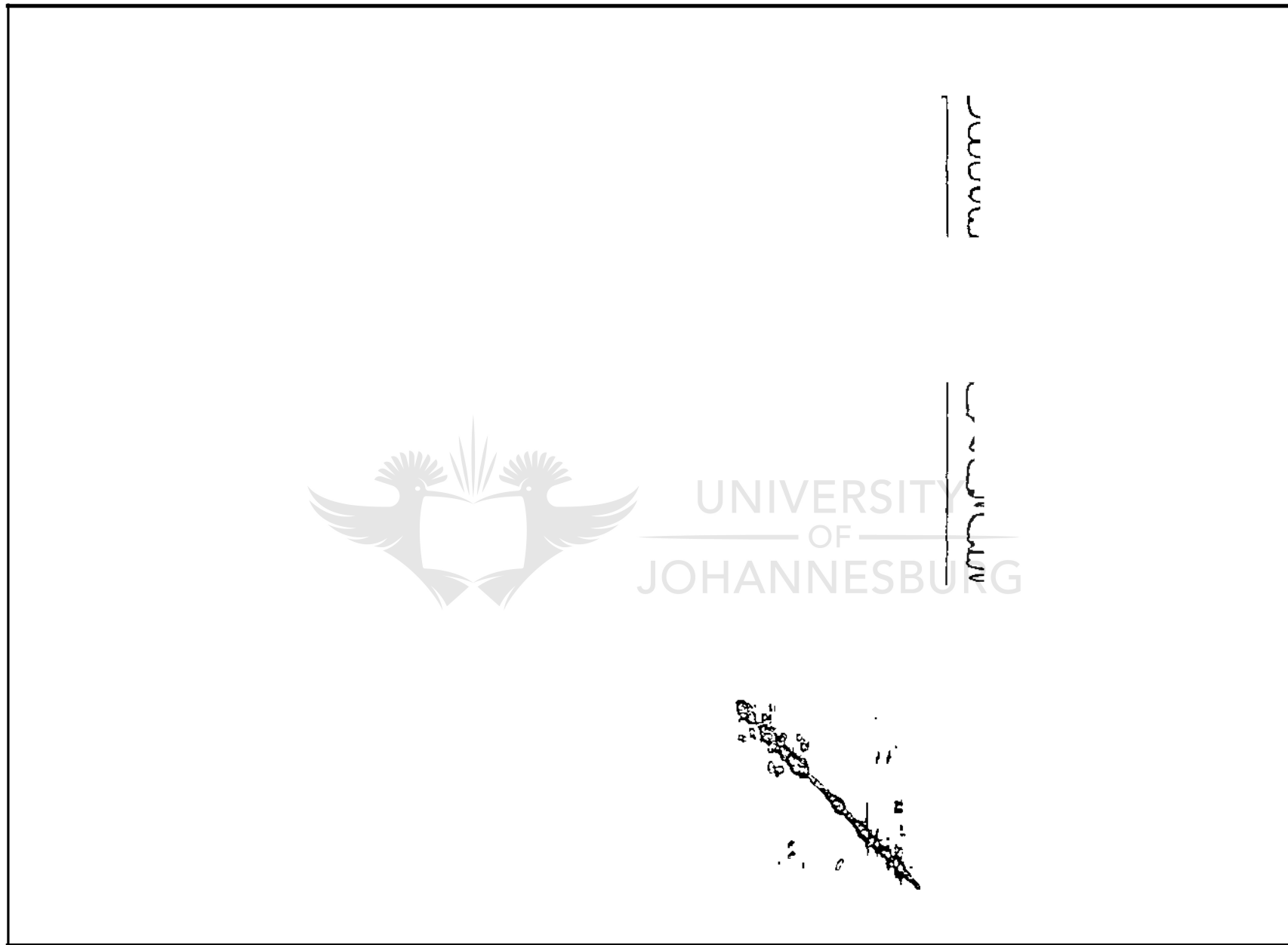
Nie net is dit moontlik om ook sekvensbepaling van peptiede met behulp van ROESY-spektra uit te voer nie³²⁵, maar die roterende raamwerk NOE-effekte (ROE) kan ook vir die bepaling van proton-protonafstande gebruik word.³³⁵ Dit word deur die kwantitatiewe evaluering van volume integrale van die kruisseine in die ROESY-spektra uitgevoer. Vanwee die onbeskikbaarheid van die benodigde rekenaarsagteware in hierdie laboratorium, kon dié belangrike produk van die ROESY-tegniek ongelukkig nie benut word nie en kon slegs kwalitatiewe vergelykings gemaak word. Die piekvolumes sal egter waardevolle inligting verskaf indien die proton-protonafstande wel later met behulp van die tegniek bepaal word.

Die ROESY-spektra van R-266 (Figuur 4.2) en 8-266 (Figuur 4.3) het belangrike inligting oor die konformasies van die twee sikliese peptiede in oplossing verskaf. Die sterkste negatiewe kruiskorrelasie ROE-pieke vir chemies nie-gekoppelde protone word in Skema 4.8 (vir R-266) en Skema 4.9 (vir 8-266) geïllustreer. Ooreenkomstig die gevolgtrekking uit die % NOE-verskilspektra, toon die ROESY-spektra van beide R-266 en 8-266 op die teenwoordigheid van sterk NOE-effekte tussen C7H en C5Ha, en C7H en C5Hb. In die geval van 8-266 word In verdere NOE-effek tussen C7bH en C5Hb waargeneem. Soos reeds genoem, is dié NOE-effekte slegs moontlik indien die Pro-amiedbinding die trans-konfigurasie besit.

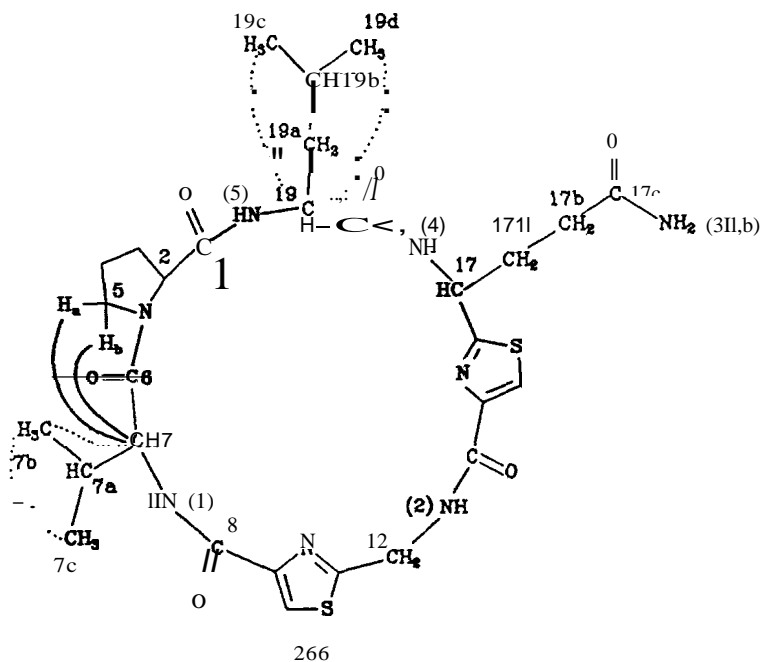
Talle ROE-effekte met laer negatiewe intensiteite is ook in die ROESY-spektra van die twee verbindings waarneembaar. As gevolg van die feit dat hierdie effekte nie altyd eenduidig onderskei kan word van valse pieke wat ook voorgekom het nie, is die swakker ROE-effekte nie in aanmerking geneem nie om die moontlikheid van verkeerde interpre-



Figuur 4.2 : Die 400 MHz ROESY-spektrum van *R*-266 in $CDCl_3$ -oplossing by 298 K. NOE-effekte in die ROE is negatief (swart kleur) , terwyl J-konnektiwiteitspieke positiewe (swart kleur) intensiteit besit.

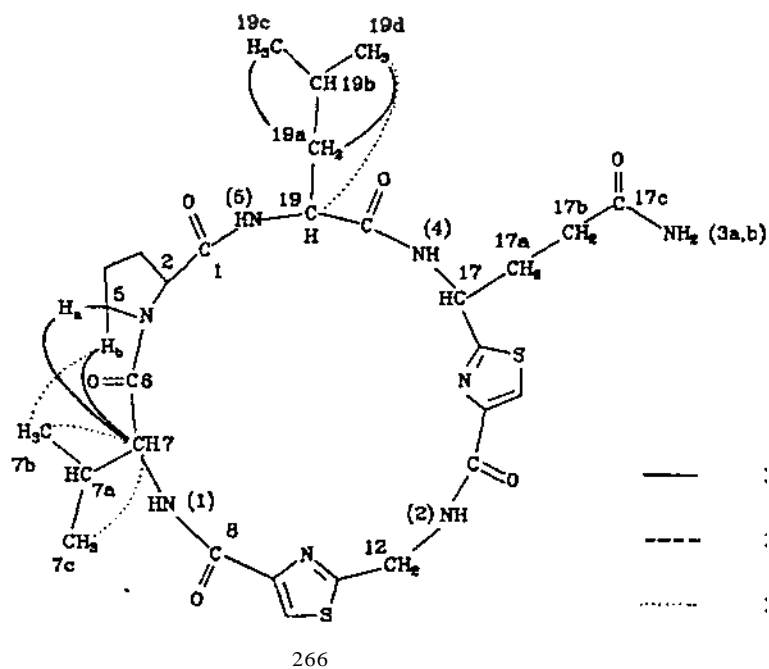


Figuur 4.3 : Die 400 MHz ROESY-spektrum van S-266 in $CDCl_3$ -oplossing by 298 K. NOE--effekte in die ROE is negatief (swart kleur) , terwyl J-konnektiwiteitspeke positiewe (swart kleur) intensiteit besit.



Sterk ROE-effek
 Medium ROE-effek
 Swak ROE-effek

Skema 4.8 : Negatiewe ROE-kruiskorrelasie pieke vir R-266



— : Sterk ROE-effekte
 - - - : Medium ROE-effekte
 : Swak ROE-effekte

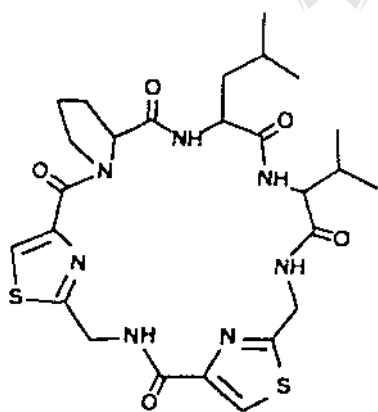
Skema 4.9 : Negatiewe ROE-kruiskorrelasie pieke vir 5-266 (dolastatien 3)

tasie te vermy. Uit die resultate het dit gou geblyk dat die ROESY-tegniek 'n baie waardevolle bydrae op die gebied van konformasionele analise kan lewer, en dit sal gou baie toepassing in navorsingslaboratoria vind.

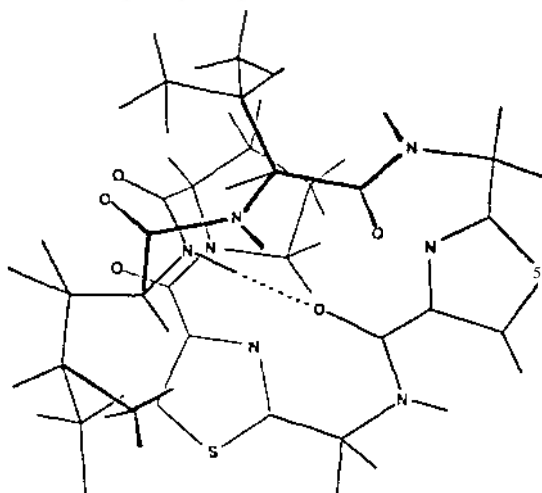
Nadat die eksperimentele inligting oor die konformasies in oplossing van *R-266* en *8-266* uitgelig is, is dit eers nodig om die bepaalde konformasies van analoe sikliese peptiede te bespreek, voordat bostaande inligting saamgevat kan word om die mees waarskynlike konformasies van die twee sikliese pentapeptiede te voorspel.

4.5 DIE KONFORMASIES VAN DOLASTATIEN 3 ISOMERE

Bernier *et al.*³³⁶ het in 1986 die konformasie in oplossing van 'n vereenvoudigde dolastatien 3 analoog, naamlik siklo[S-Pro-S-Leu-S-Val-(Gly)Thz-(Gly)Thz] (328), voorgestel. Die voorstelling is gegrond op ¹H-¹H-ehemiese koppelingskonstantes, NH-temperatuurafhanklike studies en die studie van 'n molekulere Dreiding-model. Kenmerke van die voorgestelde konformasie (329) sluit die volgende in:



326



329

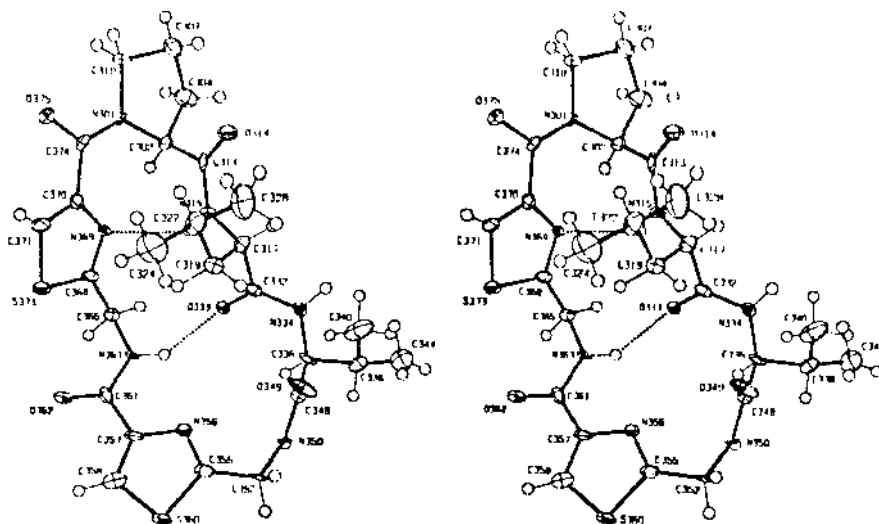
- (i) Intramolekulere waterstofbinding word deur die Leu-NH-proton met die teenoorstaande (Gly)Thz-karboniel op die sikliese ruggraat ondervind.
- (ii) Die metielgroepe van Leu is nie ekwivalent nie.

- (iii) Die verskuiwing na hoer veld van die Leu-sykettingprotone is toegeskryf aan skerming deur die koniese sone van 'n tiasoolring (ontstaan a.g.v. die ring-stroomeffek in tiasool).
- (iv) Die twee tiasooringvlakke is goed gedefinieer.
- (v) Die starheid van die konformasie word deur die nie-ekwivalensie van die geminale metileenprotone van die (Gly)Thz-residue bevestig.

Die voorstelling kan egter gekritiseer word op grond van die feit dat geen addisionele inligting ten opsigte van byvoorbeeld die *cis*- of *trans*-konfigurasië van die Pro-amiedbinding aangegee word nie. Die waardes van die visinale IU_IH-koppelingskonstantes wat in die ondersoek verkry is (van die waardes is van 14.7 tot 17.5 Hz), en gebruik is om die dihedrale hoeke te bepaal, kan egter in twyfel getrek word aangesien dit ons ondervinding is dat protone van hierdie tipe verbindings nie visinale IH-IH-koppelings van groter as 12 Hz ondergaan nie (sien hieropvolgende bespreking).

Schmidt *et al.*³²⁰ het die konformasie van siklo [S-Pro-S-Leu-S-Val-(Gly)Thz-(Gly)Thz] (328) baie meer deeglik as Bernier *et al.*³³⁶ ondersoek. In hierdie geval is meer omvattende spektroskopiese data oor die konformasie van 328 ingewin, terwyl 'n enkelkristal X-straalstruktuurbepaling ook uitgevoer is. Hieruit was dit moontlik om die konformasie wat in Skema 4.10 geïllustreer word, vir verbinding 328 voor te stel. Die volgende kenmerke kan uitgelig word:

- (i) Al die amiedbindings is *trans*, behalwe die vir (Gly)Thz[b]-Pro wat *cis* is. Beide die ¹³C-chemiese verskuiwings en X-straalstruktuur bevestig die verskynsel.
- (ii) Twee intramolekulere waterstofbindings, in teenstelling met net een in die geval van Bernier *et al.*, is met behulp van oplosmiddeleffekte (DMSO-d₆/CDCl₃ verskille), NH-temperatuurafhanklike studies en X-straalstruktuurbepaling vasgestel. Een van die bindings is tussen die NH van (Gly)Thz[b] en



Skema 4.10 : 'n Stereoskopiese projeksie van 'n verteenwoordigende molekule van 328.

Die spikkellyne dui die twee intramolekulere waterstofbindings aan,

die Leu-karboniel, en die ander een tussen Leu-NH en die endosikliese **N**-atoom van (Gly)Thz[b]. Eersgenoemde waterstofbinding lei tot 'n β -draai (d.w.s. H-binding tussen die 1-ste en 4-de aminosuurresidue)288 en laasgenoemde lei tot 'n γ -draai (d.w.s. H-binding tussen die 1-ste en 3-de aminosuurresidue).288 Soos reeds met die bespreking oor sikliese pentapeptiede (Skema 4.3) genoem, neem 'n steries veeleisende groep soos Pro normaalweg die 'middel posisie' van 'n γ -draai in en neem glisien normaalweg die posisie tussen 'n ' α '- en β -draai in. Dit is duidelik dat die voorgestelde konformasie van 328 geen uitsondering in die verband is nie.

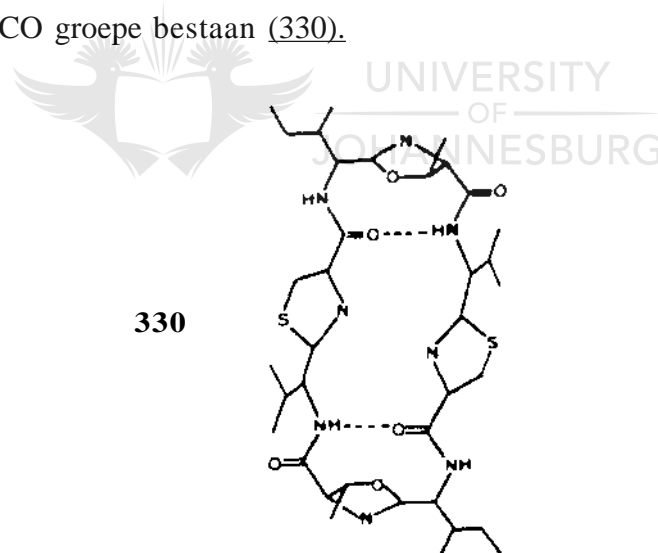
- (iii) Die gemiddelde dihedrale hoek tussen die twee vlakke van die tiasoolringe is 64° .
- (iv) Die ongewone verskuiwing na hoer veld van die Leu-protone is aan die anisotropiese effek van 'n tiasoolring toegeskryf.
- (v) Konformasionele homogeniteit van 328 is op grond van die diastereotopiese aard van die geminale (Gly)Thz-protone en oplosmiddeleffekte (CDCl_3 ! $\text{DMSO}-d_6$) aanvaar.
- (vi) Uit die ondersoek het dit verder geblyk dat die konformasie in oplossing van

328 feitlik identies is aan die in die kristallyne toestand.

Die ongewone groot IH-1H-koppelingskonstantes wat deur Bernier *et al.* aan sekere protone van 328 toegeken is, kan bevraagteken word deur vergelyking met die ooreenkomstige waardes van Schmidt *et al.*

Dit is interessant om die voorgestelde konformasies van askidiasiklamied (38) in oplossing³¹³ en in die kristallyne toestand⁴⁵ (reeds in Afdeling 1.4.2 bespreek, sien 43) te vergelyk. Die volgende belangrike aspekte van die konformasionele ondersoek van verbinding 38 in oplossing kan genoem word:

- (i) NH-temperatuurafhanklike, oplosmiddel-, verdunning- en NH-deuteriumuitruilstudies het daarop gedui dat twee intramolekulere waterstofbindings tussen NH en CO groepe bestaan (330).



- (ii) Die ϕ en X torsiehoeke is vanaf $J_{\text{HNC}^{\alpha}\text{H}}$ en $J_{\text{HC}^{\alpha}\text{C}^{\beta}\text{H}}$ respektiewelik met behulp van Karplus-tipe vergelykings bereken. Alhoewel die ϕ hoeke wat m.b.v. k.m.r.-spektroskopie en Xe-straalanalise bepaal is feitlik identies is, het die waardes van X grootliks verskil (vergelyk Afdeling 4.4.4.d).
- (iii) Behalwe vir verskille in die ruimtelike rangskikking van sommige van die sykettings, het die modelle verder goed ooreengekom.

Teen die agtergrond van bekende analoe sikliese peptiede, en strukturele inligting aan hand beskikbaar, kan die mees waarskynlike konformasies van R-266 en 5-266 in oplossing nou voorgestel word.

4.6 DIE MEES WAARSKYNLIKE KONFORMASIES VAN R-266 EN 5-266 IN OPLOSSING

Die resultate in Afdeling 4.4 bespreek het dit moontlik gemaak om realistiese Dreiding-modelle van beide R-266 en 5-266 met 'n redelike mate van vertroue te konstrueer. Inspeksie van sulke modelle het getoon dat indien minstens een van die waterstofgebonde NH's van beide R-266 en 5-266 (nl. (Gln)Thz-NH, (Glyj'l'ha-NH) en Val-NH) oor die middel van die ringsisteem 'n waterstofbinding moot vorm, soos in die geval van 328 (Skema 4.10), die Pro-amiedbinding dan ook soos in die geval van 328 'n cis-konfigurasië moot aanneem. Soos reeds genoem, sluit die resultate van ^{13}C -k.m.r.-spektroskopie sowel as die NOE- en ROE-effekte hierdie moontlikheid uit. Inspeksie van 'n Dreiding-model van 328 het getoon dat twee intramolekulere waterstofbindings oor die ring (Skema 4.10) geakkomodeer kan word slegs indien die Pro-amiedbinding die cis-konfigurasië aanneem. Inspeksie van Dreiding-modelle van beide R-266 en 5-266 het ook getoon dat met die Pro-amiedbinding in die trans-konfigurasië die volgende intramolekulere waterstofbindings moontlik is:

- (i) Val-NH met die endosikliese N-atoom van (Gly)Thz (die tipe waterstofbinding is in die geval van 328 deur Schmidt *et al.* bewys³²⁰).
- (ii) (Gly)Thz-NH met die endosikliese N-atoom van (Gln)Thz.
- (iii) (Gln)Thz-NH met die karboniel van die Pro-aminosuurresidu. Die waterstofbinding kom ooreen met die nou reeds bekende γ -draai wat in die geval van sikliese pentapeptiede waargeneem word.²⁸⁸ Dit is ook bekend dat die posisie in die middel van die γ -draai normaalweg deur 'n steries veeleisende groep ingeneem word.²⁸⁸ In die gevalle van R-266 en 5-266 is daar geen uitsondering nie omdat Leu die posisie inneem.

Uit bostaande redenasie, sowel as inspeksie van Dreiding-modelle op grond van bogenoemde oorwegings, is die gevolgtrekking gemaak dat al die amiedprotone, behalwe die van die nie-waterstofgebonde Leu-NH, na die binnekant van die ring gerig is. 'n Direkte konsekwensie hiervan is dat die karbonielgroep van die Pro-aminosuurresidu na binne, en dié van die (Gly)Thz-, (Gln)Thz-, Val-en Leu-aminosuurresidue na buite die ring gerig is.

Die aromatiese ringsisteme wat met amiedbindings gekonjugeer is, sowel as bogenoemde waterstofbindings, plaas 'n geweldige beperking op die konformasionele beweeglikheid van die sikliese peptiedruggraat. Dit het dit dus moontlik gemaak om die mees waarskynlike stel torsiehoeke vir beide R-266 en S-266 uit die wat met behulp van koppelingskonstantes bepaal is, en selfkonsistent met die toepaslike Dreiding-modelle is, uit te soek (Tabel 4.8).

TABEL 4.8: 'n Selfkonsistente stel torsiehoeke van die peptiedrugrate van R-266 en S-266

Tipe torsiehoek van die Aminosuurreidu	<u>R-266</u> (in grade)	<u>S-266</u> (in grade)
$\phi_{\text{Val}}^{\text{a}}$	-130	-130
$\psi_{\text{Val}}^{\text{b}}$	-45	-87
$\omega_{\text{Val}}^{\text{c}}$	+180	+180
$\phi_{\text{Leu}}^{\text{a}}$	-85	-70
$\psi_{\text{Leu}}^{\text{b}}$	+60	+50
$\omega_{\text{Leu}}^{\text{c}}$	+180	+180
$\phi_{(\text{Gln})\text{Thz}}^{\text{a}}$	+120	-120
$\psi_{(\text{Gln})\text{Thz}}^{\text{b}}$	+60	-35
$\omega_{(\text{Gln})\text{Thz}}^{\text{c}}$	+180	+180
$\phi_{(\text{Gly})\text{Thz}}^{\text{a}}$	+120	-135

TABEL 4.8 (vervolg) :

$\psi(\text{Gly})\text{Thz}^{\text{b}}$	-3	-15
$w(\text{Gly})\text{Thz}^{\text{c}}$	+180	+180
$\phi_{\text{Pro}}^{\text{d}}$	-60	-65
$\psi_{\text{Pro}}^{\text{b}}$	+175	+175
wProc	+180	+180

- waar:
- a - afgelei op grond van IH-IU-koppelingskonstantes en selfkonsistent met toepaslike Dreiding-model
 - b - afgelei op grond van toepaslike Dreiding-model
 - c - die hoek is in selfkonsistensie met die trans-amiedbindings
 - d - afgelei op grond van toepaslike Dreiding-model en is selfkonsistent met gepubliseerde waardes³²¹

Twee belangrike waarnemings betreffende die Dreiding-modelstudie kan op die stadium van die bespreking reeds uitgelig word:

- (i) Die ϕ torsiehoek van Pro in beide R-266 ($\phi_{\text{Pro}} = -60^\circ$) en 8-266 ($\phi_{\text{Pro}} = -65^\circ$) is byna ooreenkomstig met die literatuurwaarde van ϕ_{Pro} indien Pro in die *ekso*- of op-konformasie ($\phi_{\text{Pro}} = -68^\circ$) voorkom.³²¹
- (ii) Dit is verder ook in die literatuur bekend dat indien Leu die middelste posisie in 'n γ -draai inneem (soos in die geval van R-266 en 8-266), ϕ_{Leu} die waardes van $+70^\circ$ tot $+85^\circ$ en ψ_{Leu} die waardes van -60° tot -70° in die geval van die normale konformasie aanneem. In die geval van die ooreenkomstige inverse konformasie neem ϕ_{Leu} waardes van -70° tot -85° en ψ_{Leu} waardes van $+60^\circ$ tot $+70^\circ$ aan.³³⁷ Uit die afgeleide torsiehoekwaardes van die Leu-aminosuurresidu van beide R-266 ($\phi_{\text{Leu}} = -85^\circ$, $\psi_{\text{Leu}} = +60^\circ$) en 8-266 ($\phi_{\text{Leu}} = -70^\circ$, $\psi_{\text{Leu}} = +50^\circ$) blyk dit duidelik dat hierdie aminosuur-

residue in inverse γ -draaie betrokke is.

Tot dusver is nog geen kommentaar gelewer oor die moontlike X torsiehoeke van die Leu-, Val- en (Gln)Thz-sykettings van R-266 en S-266 nie. Soos reeds genoem is dit bekend dat in die geval van peptiede met starre ruggrate, die sykettings wel labiel kan optree. Pogings om tog wel met behulp van Karplus--tipe vergelykings die X torsiehoeke te bepaal^{313,335} was dus nie altyd suksesvol nie. Gevolglik kan slegs die relatiewe populasies van moontlike sykettingkonformasies bepaal word.³²⁸ Om bogenoemde redes is besluit om die minimumenergiekonformasies van R-266 en 8-266 verder met behulp van molekulere kragveld (MK)-berekeninge te verfyn

Die SYBYL-program(MAXIMIN 2)³³⁸ wat vir MK-berekeninge van R-266 en 8-266 gebruik is, beskou die energie (E) van 'n molekule in die kragveld as voortspruitend uit afwykings vanaf 'ideale' strukturele verskynsels wat deur 'n sommasie van energiebydraes soos volg benader kan word:

$$E = \sum E_{\text{str}} + \sum E_{\text{buig}} + \sum E_{\text{tors}} + \sum E_{\text{vdw}} + \sum E_{\text{ele}} + \sum E_{\text{afst-b}} + \sum E_{\text{hoek-b}} + \sum E_{\text{tor-b}} + \sum E_{\text{gebied-b}}$$

waar die sommasies oor alle bindings, bindingshoeke, torsiehoeke en nie-gebinde interaksies tussen atome wat nie aan mekaar of aan 'n gemeenskaplike atoom (bv. 1,4-interaksies en hoer) gebind is nie, uitbrei.

is die energie van 'n binding wat ten opsigte van die natuurlike bindingslengte daarvan gestrek of saamgedruk is

$E_{\text{brüg}}$ is die energie van buiging van bindingshoeke vanaf die natuurlike waardes daarvan


E_{tor} is die torsie-energie t.o.v. rotasie om bindings

E_{vdw} verteenwoordig die Van der Waals nie-gebinde interaksies

E_{ele}	is die energie vanwee elektrostatische interaksies
E_{afst-b}	is die energie wat met afstandbeperrings geassosieer is
E_{hoek-b}	is die energie wat met hoekbeperrings geassosieer is
E_{tor-b}	is die energie wat met torsiehoekbeperrings geassosieer is
$E_{gebied-b}$	is die energie wat met gebiedswaardebeperrings geassosieer is.

E is slegs 'n maatstaf van intramolekulere spanning relatief tot 'n hipotetiese situasie. Opsigself het E geen fisiese betekenis nie. Die waarde van E is dus die verskil in energie tussen die ware molekule en 'n hipotetiese molekule waarin al die strukturele eienskappe *SODS* bindingslengtes en bindingshoeke presies ideale of 'natuurlike' waardes het.

Indien berekening van die aard uitgevoer wil word, moet twee punte egter in gedagte gehou word:

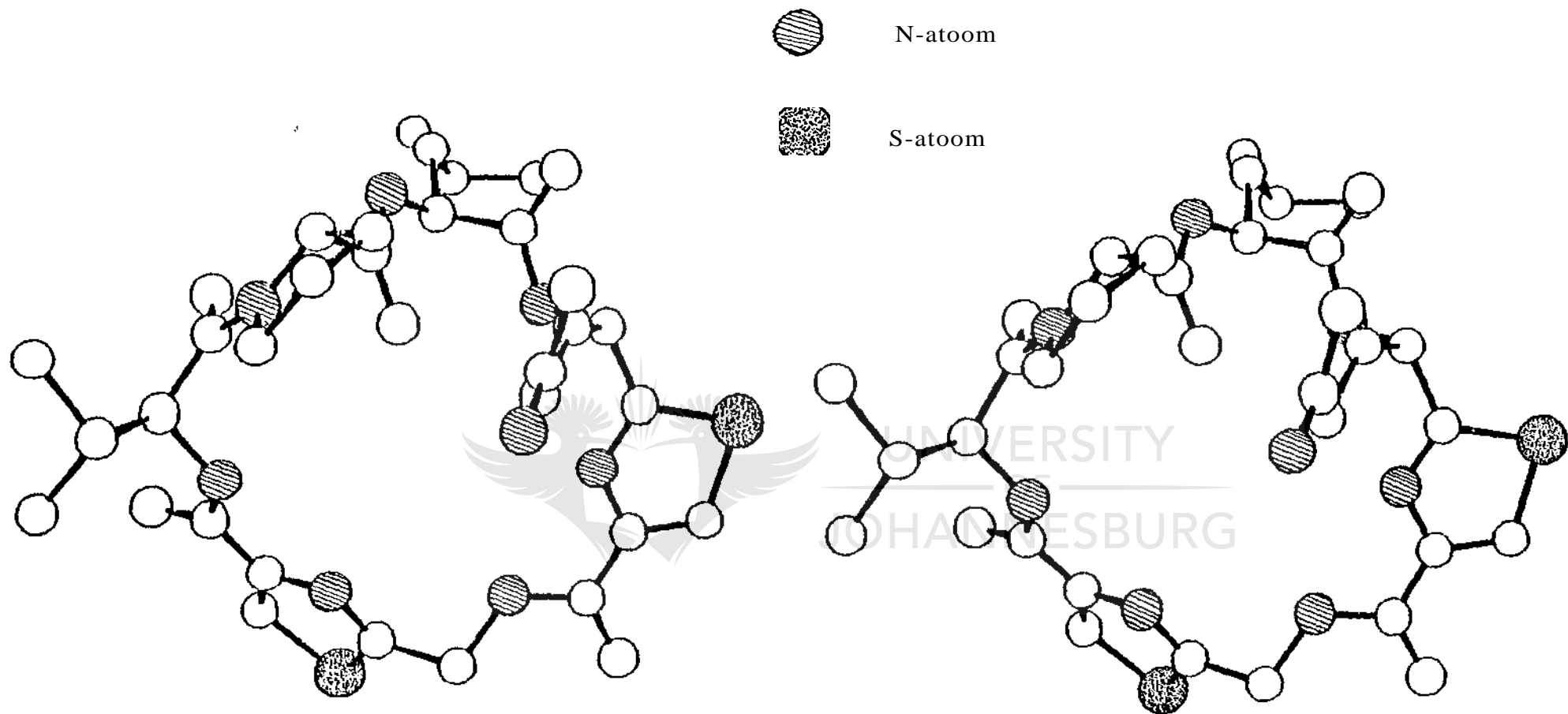
- 
- (i) In die praktyk besit molekules gewoonlik genoeg kinetiese-energie om energieversperrings tussen konformere in die orde van $k_B T$ binne 'n paar pikosekondes te oorkom. Hoe hoer die energieversperring is, hoe meer moet die **MK**-simulasie egter uitgebrei word om 'n oorgang van een konformasie na 'n ander te akkomodeer. Byvoorbeeld, die *cis/trans*-versperring van Pro is te hoog om binne die normale rekenaarprogram gehanteer te word.³³⁵ Dit is dus verkieslik om met 'n struktuur te begin wat nie te veel van die verwagte resultaat verskil nie.
- (ii) Die Mlv -berekening het betrekking op konformasies van verbindings *in vacuo*.

Wat die eerste punt betref kan genoem word dat die Dreiding-modelle van beide R-266 en 5-266 aan die vereiste voldoen. Die modelle is vanuit eksperimenteel bepaalde konformasionele data opgebou, wat dit moontlik gemaak het om die minimumenergie-

konformasies van die peptiedruggrate met In redelike mate van vertroue te voorspel. Uit die NOE- en ROE-data (kyk Skemas 4.7, 4.8 en 4.9) kon ook afgelei word dat die Val-syketting (a.g.v. ROE-effekte met C5Ha), asook die Leu-syketting, weg vanaf die middelpunt van die ring gerig is. Die enigste werklike verskille tussen die voorlopige konformasies van R-266 en 8-266 is eerstens tussen die ϕ en ψ torsiehoeke van die (Gln)Thz-aminosuurresidue as gevolg van die teenoorgestelde chiraliteit ($\phi_S = -\phi_R$)²⁹⁵, wat natuurlik tot In verskil in die relatiewe orientasies van dié aminosuurresidue se sykettings aanleiding gee. In die geval van 5-266 is die (Gln)Thz-residu se syketting na bo die ring (d.w.s. die peptiedruggraat) gerig, en in die geval van R-266 skuins na onder die ring gerig. Aangesien die amiedprotone van die (Gln)Thz-residue se sykettings geen waterstofbindings ondervind nie, kan aanvaar word dat MK-berekening die relatiewe orientasies daarvan, sowel as die van die ander sykettings, tot geskikte minimumenergiekonformasies sou beperk.

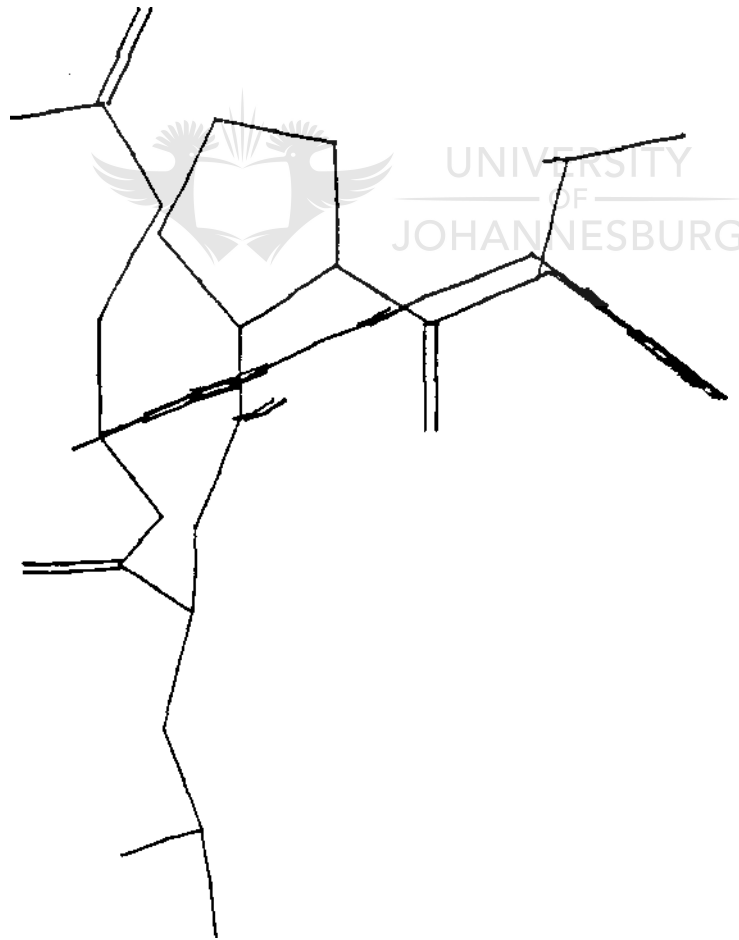
Die MK-berekening van R-266 en 5-266 is by die WNNR deur Dr. M. Roos met behulp van die SYBYL-program uitgevoer, Die benadering wat gevolg is het eerstens die konstruksie van die lineere peptiedruggrate op grond van die bepaalde torsiehoeke (Tabel 4.8) en standaard bindingslengtes^{320,338} en _hoeke³³⁸ behels, waarna siklisering tussen die Pro- en Leu-aminosuurresidue bewerkstellig is. Die minimumenergiekonformasies van die resulterende sikliese peptiede (R-266 en 5-266) is dan vervolgens met behulp van MK-berekening bepaal.

Die mees waarskynlike minimumenergiekonformisasie van dolastatien 3 (5'-266) neem In saalvormige konformisasie aan met draaipunte op die posisies tussen die twee tiasool-aminosuurresidue en by die γ -draai waarin die Leu-residu betrokke is (kyk Figuur 4.4). Die twee endosikliese stikstofatome van die twee tiasoolringe is effens uit die viak en na In punt bo die viak van die peptiedruggraat gerig. Die Pro-residu is in die *ekso*- of op-konformisasie en is effens bo-oor die ring gebuig. Die syketting van die Val-residu is effens hoer en weg van die peptiedruggraat, en duidelik ook weg van die Pro-residu se



Figuur 4.4 : In ORTEP340-Stereoskopiese projeksie van dolastatien 3 (5-266). Om eenvoudigheidshalwe word die waterstofatome nie aangetoon nie,

syketting, gerig. Die Leu-residu se syketting is byna direk na onder die ring gerig en met die (Gln)Thz-residu se syketting weer amper reguit na bo die ring uitgestrek (Figuur 4.5). Al die NH-waterstofatome van die peptiedbindings, behalwe dié van die Leu-aminosuurresidu, is na die middel van die ring gerig, terwyl al die karboniele van die peptiedbindings, behalwe dié van die Pro-aminosuurresidu, weg van die ring gerig is. Dit is opmerklik dat die sykettings van die Leu-, (Gln)Thz- en Pro-aminosuurresidue byna in dieselfde vertikale vlak le. Die stel torsiehoeke (Tabel 4.9) en dihedrale hoeke (Tabel 4.9) van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van dolastatien 3 (8-266) stem baie goed met die voorgestelde waardes (kyk Tabel 4.8) ooreen.



Figuur 4.5

TABEL 4.9 Die torsiehoeke van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van dolastatien 3 (8-266)

Tipe Torsiehoek van die Aminosuurresidu	8-266 (in grade)	Grade verskil van voorgestelde waardes in Tabe14.8
ϕ_{Val}	-118	12
ψ_{Val}	-83	4
ω_{Val}	+175	5
ϕ_{Leu}	-66	4
ψ_{Leu}	+101	51
ω_{Leu}	-158	22
$\phi_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	-161	41
$\psi_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	-61	26
$\omega_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	+179	1
$\phi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	-143	8
$\psi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	-60	45
$\omega_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	+170	10
ϕ_{Pro}	-52	13
ψ_{Pro}	+139	36
ω_{Pro}	+178	2
$\frac{\text{N}_{(\text{Gln})\text{Thz}}}{\text{N}(\text{Gly})\text{Thz}} \frac{\text{C}_{\text{CONVal}}}{\text{C}_{\text{CON}(\text{Gln})\text{Thz}}}$	0	0
$\frac{\text{N}_{(\text{Gln})\text{Thz}}}{\text{N}(\text{Gly})\text{Thz}} \frac{\text{C}_{\text{CON}(\text{Gln})\text{Thz}}}{\text{C}_{\text{CONVal}}}$	0	0

TABEL 4.10 Die dihedrale hoeke (θ) van die $\text{NH}-\text{C}^{\alpha}\text{H}$ aminosuurkomponente" van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van dolastatien 3 (8-266)

Dihedrale hoek (θ) van tipe aminosuur-residu	Voorgestelde hoekwaarde (in grade)	Minimum-energiekonformasiehoekwaarde (in grade)	$^1\text{H}-^1\text{H}$ -koppelingskonstante (in Hertz)
NH-CH (Val)	+170	+173	9.2 Hz
NH-CH (Leu)	-135	-129	7.0 Hz
NH-eH (Gln)Thz	+170	+138	9.2 Hz
NH-CHa (Gly)Thz	+160	+156	7.3 Hz
NH-eHb (Gly)Thz	-90	-82	2.4 Hz

Waar a: vergelyk met Skema 4.4

Uit vergelyking van die stellinghoekwaardes in Tabelle 4.9 en 4.10 met die voorgestelde torsiehoeke in Tabel 4.8, is dit duidelik dat die minimumenergiekonformasie-model heel goed met die voorgestelde Dreiding-model ooreenkom. Die waardes van die dihedrale hoeke (θ) is ook grootliks met die proton-protonkoppelingskonstantes (Tabel 4.10) in ooreenstemming. Ten spyte van die feit dat klein hoekveranderinge deur die MK-berekening teweeg gebring is, het inspeksie van Dreiding-modellie gctoon dat dit essensieel min konformasionele veranderinge tot gevolg het. Dit moet egter in gedagte gehou word dat waterstofbindings nie eksplisiet deur die MK-berekening in ag geneem word nie. Teen die agtergrond is die afwykings in hoeke dus geenslins dramaties nie.

Dit is interessant om sekere aspekte van die minimumenergiekonformasie van dolastatien 3 uit te lig. Benewens die feit dat die Pro-aminosuurreidu steeds 'n *endo*- (of op-) konformasie aanneem en dat die γ -draai van die Leu-aminosuurreidu behoue gebly het, is die *trans*-konfigurasië van die peptiedbindings, behalwe van die Leu-residu

(ω_{Leu})' asook die vlakkige aard van die tiasoolkarboksamiede ook grootliks onveranderd. Indien S-aminosuurresidue in γ -draai in spesifieke peptiedkonformasie aanneem, is dit nit die literatuur³³⁹ bekend dat:

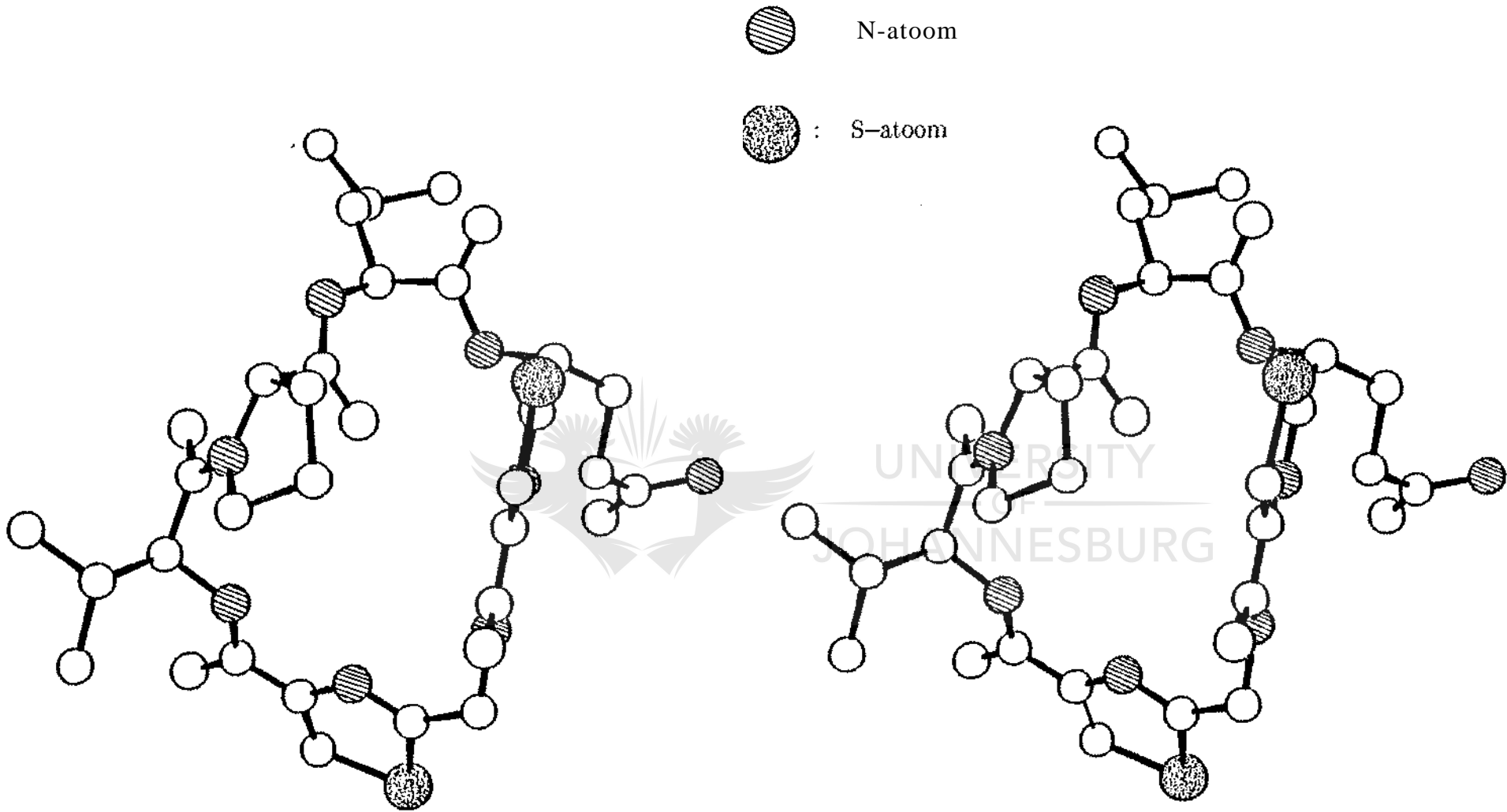
- (i) Normaalweg die inverse γ -draai aangeneem word (en soos bewys in beide die gevalle van 8-266 en R-266)
- (ii) Die amiedbinding tussen die 2-de en 3-de aminosuurresidue wat in die γ -draai betrokke is, d.w.s. ω_{Leu} in die beide gevalle van R-266 en 8-266, karakteristieke afwykings vanaf die normale trans-konfigurasië toon ($+156^\circ \leq \omega_{\text{amino}} \leq -160^\circ$). Die waarde van $\omega_{\text{Leu}} = -1.58^\circ$ van die minimumenergiekonformasie-model van 8-266 dien as verdere bewys van die akkuraatheid van die voorgestelde model.

Interessant genoeg vorm die twee vlakkige tiasoolresidue 'n torsiehoek van -143° om die CH-NH binding van die (Gly)Thz-residu (d.w.s. $\phi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$). Daar kan tog oor die relatiewe orientasies van die tiasoolringe gespekuleer word. Indien die twee tiasoolkarboksamiedkomponente in die vlak van die peptiedruggraat, of die endosikliese stikstofatome na onder die ring gerig sou wees het, sou vanweë die vlakkigheid van hierdie komponente, steriese interaksie tussen die sykettings van die Val- en Pro-aminosuurresidue plaasgevind het. Inspeksie van 'n Dreiding-model het getoon dat tot die verskynsel aanleiding gegee word in 'n poging om die $\text{HC}^\alpha\text{Val-NHVal}$ proton-protonkoppelingskonstante van 9.2 Hz te akkomodeer. In so 'n geval sou moontlik dan ook NOE- en ROE-effekte van byvoorbeeld tussen die protone van die Val-residu se syketting en die tiasoolproton van die (Gly)Thz-residu, asook tussen die protone van die (Gln)Thz-residu se syketting met die tiasoolproton van die (Gln)Thz-residu, waargeneem word.

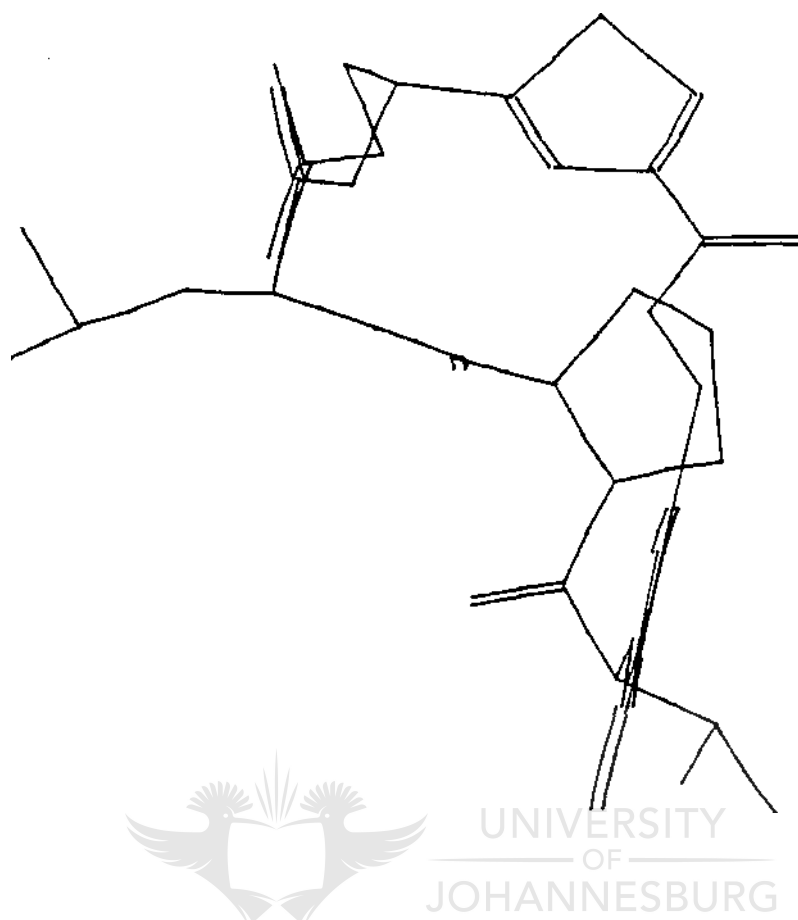
Dit was verder ook interessant om die afstande deur die ruimte tussen die waterstofgebonde atome, sowel as tussen atome met sterk NOE- en ROE-effekte, direk met behulp van die SYBYL-program te bepaal. Schmidt *et al.*³²⁰ het die afstand tussen twee

waterstofgebonde atome as in die orde van 2.04-2.47 Å met behulp van X-straalanalise bepaal. In die geval van dolastatien 3 (8-266) is die afstande tussen die amiedproton van die (Gln)Thz-aminosuurresidu en die karbonielsuurstof van die Pro-aminosuurresidu 2.641 Å, terwyl die afstand tussen die amiedproton van die Val-aminosuurresidu en die endosikliese stikstof van die (Gly)Thz-aminosuurresidu 2.472 Å is. Die interatoomafstand tussen die amiedproton van die (Gly)Thz-aminosuurresidu en die endosikliese stikstof van die (Gln)Thz-aminosuurresidu is 2.245 Å. Soos reeds genoem is geen spesiale voorsorg geneem om die waterstofbindings in die model wat deur die MK geminimiseer is, in te bou nie. Bostaande resultate dien dus as 'n duidelike bewys van die getrouheid van die voorgestelde minimumenergiekonformasie-model van dolastatien 3. In die meeste gevalle word NOE's waargeneem indien die interprotonafstande nie groter as 3–4 Å is nie.²⁸⁸ Die afstand deur die ruimte tussen C7H en C5Ha, en C7H en C5Hb, wat albei sterk ROE-effekte toon, is 1.887 Å en 2.384 Å onderskeidelik. Die afstande deur die ruimte van ander atome wat NOE- en ROE-effekte toon is ook in ooreenstemming met die literatuurwaardes van 3–4 Å.

Die mees waarskynlike minimumenergiekonformasie van R-266 neem, analoog aan dolastatien 3, 'n saalvormige konformasie aan met draaipunte op die posisies tussen die twee tiasoolaminosuurresidue en by die γ -draai waarin die Leu-residu (kyk Figure 4.6 en 4.7) betrokke is. Die konformasie van die (Gly)Thz-Val-Pro-Leu-komponent is essensieel byna dieselfde as in die geval van dolastatien 3 (8-266). Wat wel ten opsigte van 8-266 verskil, is die konformasie van die (Gln)Thz-residu deurdat die syketting van hierdie residu nou na onder die ring gerig is en dat die vlak van hierdie tiasoolkarboksamiedresidu van so 'n aard is dat die endosikliese stikstofatoom nou na 'n punt byna direk onder die peptiedruggraat gerig is. Die endosikliese swaelatoom van hierdie tiasoolring is dus na 'n punt bo die peptiedruggraat, maar effens weg daarvan, gerig. Deur inspeksie van Dreiding-modelle het dit duidelik geblyk dat die tiasoolring van die (Gln)Thz-residu so 'n orientasie inneem om moontlike steriese interaksie tussen die sykettings van die Leu- en (Gln)Thz-residue, wat albei non aan dieselfde kant van die



Figuur 4.6 : 'n ORTEP:HO-Stereoskopiese projekslle van *R-266*. Om eenvoudigheidshalwe word die waterstofatome nie aangetoon nie.



Figuur 4.7

peptiedruggraat en beide na onder gerig is, tot 'n minimum te beperk.

Die stel torsiehoeke (Tabel 4.11) en dihedrale hoeke (Tabel 4.12) van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van R-266 is in groot ooreenstemming met die voorgestelde waardes (kyk Tabel 4.8). Deur die stelle hoekwaardes in Tabelle 4.11 en 4.12 met die voorgestelde torsiehoeke in Tabel 4.8 te vergelyk, is dit duidelik dat die minimumenergiekonformasie-model van R-266 baie goed met die voorgestelde Dreiding-model ooreenkom. Die waardes van die dihedrale hoeke (θ) is ook grootliks met die proton-protonkoppelingskonstantes in ooreenstemming. Inspeksie van 'n Dreiding-model van die minimumenergiekonformasie-model van R-266 het getoon dat hierdie model 'n meer akkurate voorstelling van die minimumenergiekonformasie

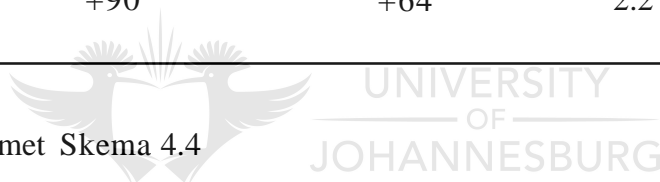
TABEL 4.11 Die torsiehoeke van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van *R-266*

Tipe torsiehoek van die Aminosuuresidu	<i>R-266</i> (in grade)	Grade verskil van voorgestelde waardes in Tabe14.8
ϕ_{Val}	-142	12
ψ_{Val}	-63	18
ω_{Val}	+172	8
ϕ_{Leu}	-72	12
ψ_{Leu}	+82	22
ω_{Leu}	-170	10
$\phi_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	+116	4
$\psi_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	+69	6
$w_{(\text{Gln})\text{Thz}}$	+177	3
$\phi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	+124	4
$\psi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	-38	35
$w_{(\text{Gly})\text{Thz}}$	+177	3
ϕ_{Pro}	-55	5
ψ_{Pro}	+144	31
w_{Pro}	+178	2
$\frac{\text{N}_{(\text{Gln})\text{Thz}}}{\text{C}_{\text{CONVal}}}$	0	0
$\frac{\text{N}_{(\text{Gly})\text{Thz}}}{\text{C}_{\text{CON}(\text{Gln})\text{Thz}}}$	0	0

TABEL 4.12 Die dihedrale hoeke (θ) van die $\text{HC}^\alpha\text{-NH}$ aminosuurkomponente" van die peptiedruggraat van die minimumenergiekonformasie van R-266

Dihedrale hoek (θ) van tipe aminosuur- residu	Voorgestelde hoekwaarde (in grade)	Minimum- energie- konformasie- hoekwaarde (in grade)	$^1\text{H-}^3\text{H}$ -koppe- lingskonstante (in Hertz)
NH-eH (Val)	+170	+154	9.7 Hz
NH-eH (Leu)	-135	-132	7.2 Hz
NH-eH (Gln)Thz	+170	+179	9.2 Hz
NH-CHa (Gly)Thz	-180	-176	10.0 Hz
NH-eHb (Gly)Thz	+90	+64	2.2 Hz

Waar a : vergelyk met Skema 4.4



verteenvoordig. Die enigste werklike verskil is die ψ torsiehoek wat die (Gly)Thz-aminosuurresidu aanneem. Soos reeds in die bespreking van die minimumenergiekonformasie van dolastatien 3 genoem is, is die relatiewe orientasie van die twee tiasoolamino-suurreidue tentatief op grond van $^1\text{H-}^3\text{H}$ -koppelingskonstantes en steriese faktore bepaal. Dit kon dus verwag word dat MK-berekeninge wel tog veranderinge in die torsiehoeke van hierdie twee tiasoolamino-suurreidue tot gevolg sou hê.

Die twee vlakkige tiasoolresidue vorm 'n torsiehoek van $+124^\circ$ om die CH-NH binding van die (Gly)Thz-aminosuurresidu (d.w.s. $\phi_{(\text{Gly})\text{Thz}}$). Soos in die geval van dolastatien 3, is dit interessant om ook die afstande deur die ruimte tussen die waterstofgebonde atome van R-266 te vergelyk. Die afstand deur die ruimte tussen die amiedproton van die (Gln)Thz-aminosuurresidu en die karbonsuurstof van die Pro-aminosuur-

residu is 2.056 Å, terwyl die afstand tussen die amiedproton van die Val-aminosuurresidu en die endosikliese stikstof van die (Gly)Thz-aminosuurresidu 2.211 Å is. Die interatoomafstand tussen die amiedproton van die (Gly)Thz-aminosuurresidu en die endosikliese stikstof van die (Gln)Thz-aminosuurresidu is 2.323 Å. Die interatoomafstande tussen bogenoemde waterstofgebonde atome kom baie goed ooreen met die gerapporteerde waardes van 2.04-2.47 Å.³²⁰ Soos in die geval van dolastatien 3, is alle NOE- en ROE-effekte goed in ooreenstemming met die bepaalde interatoomafstande tussen die betrokke atome.

Aangesien die fisiologiese aktiwiteit van 'n molekule grootliks deur die konformasie wat dit aanneem bepaal word, kan verwag word dat R-266 en 5-266 tog wel in aktiwiteit sal verskil. Die verskil in konformasies van die twee verbindings word duidelik in die ¹H- en ¹³C-k.m.r.-spektra daarvan weerspieel. Die verskille in k.m.r.-spektra, en die rol wat dit speel om konformasionele verskille te kan voorspel, is die onderwerp van die laaste bespreking. Dit is ook verder interessant om die ¹H- en ¹³C-k.m.r.-spektra van die lineere pentapeptiede met dié van die sikliese analoe te vergelyk en om sodoende dus In aanduiding te kan kry van tot welke mate konformasionele veranderinge met siklisering gepaard gegaan het.

4.7 DIE ¹H- EN ¹³C-K.M.R.-SPEKTRA VAN 5-266 EN R-266 : 'N VERGELYKENDE STUDIE

Die ¹H- en ¹³C-k.m.r.-spektra van die lineere pentapeptiede *N-t-Boc-5-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5-Val-5-Pro-OMe* (R-324) en *N-t-Boc-5-Leu-5-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5-Val-5-Pro-OMe* (5-324), sowel as dié van die sikliese peptiede R-266 en 5-266 (dolastatien 3), word in Tabela 4.13-4.16 aangegee. Die atome is so genommer am in al die tabelle ooreenkomstig te wees. (Vergelyk met sketse van R-266 en 5-266 in Hoofstuk 3). Die toekennings van ¹H-resonansies aan die protone is deur spinontkoppelingseksperimente, COSY-spektra en vergelykende studies met korter sintetiese fragmente moontlik gemaak. Die ¹³C-k.m.r.-toekennings is met behulp van bekende ¹³C-waardes vir aminosure³⁰⁸, DEPT- en HETCOR-spektra uitgevoer.

TABEL 4.13: ^1H _ en ^{13}C -k.m.r.-toekenning relatief tot tetramctielslaan in deuteriochloroformoplossing van die lineere pentapeptied *R-324* (200 MHz)

Toekennings-nommervan koolstowwe	Chemiese verskuiwings (dpm)		1H-multiplisiteit (J, Hz)
	^1H	^{13}C	
1a	3.71	52.30(kj	3H, s
1		170.87(s	
2	4.49	59.02(d	III, dd, J = 8.2 en 5.2 Hz
3	1.90-2.40	29.11(t)	2H, m
4	1.90-2.40	24.95(t)	2H, m
5	b: 3.75 a: 3.92	47.52(t)	HI, m HI, m
6		172.49(s)	
7	4.75	55.73(d)	HI, del, J = 9.3 en 7.8 Hz
7a	2.00	31.59(d	1H, m
7b	0.99	18.24(k	3H, d, J=6.7 Hz
7e	1.07	19.09(k	3II, d, J = 6.7 Hz
8			
9		160.76 s	
10	7.98	124.00 d)	1H, S
11		148.84 s)	
12	b: 4.76 a: 4.87	40.61(t)	1H, dd, J = 11.8 en 6.1 Hz HI, dd, J = 11.8 en 6.1 Hz
13		174.90(s)	
14		161.05(s)	
15	8.02	124.37(d)	1H, S
16		149.00(s)	
17	5.15	53.85(d)	III, m
17a	2.30	29.93(t)	2II, m
17b	2.20	31.59(t)	2H, m
17e		173.27(s)	
18		172.29(s)	
19	4.21	50.88(d)	1H, m
19a	1.65	41.12 t)	2H, m
19b	1.35	24.51 d)	1H, m
isc	0.93	21.92 k)	3H, d, J = 5.9 Hz
19d	0.94	22.94 k)	3H, d, J = 5.9 Hz
20		155.98(s)	
20a		80.51(s)	
20b	1.39	28.28(k)	9H, s
(1)	7.95		1H, d, J = 9.3 Hz
(2)	8.22		1H, br t, J = 6.1 Hz
(3)	b: 5.62 a: 6.49		HI, br s 1H, br s
(4)	7.79		1H, d, J = 7.8 Hz

TABEL 4.13 (vervolg):

(5) 5.30 IH,d, J = 7.6 Hz

TABEL 4.14: ¹H- en ¹³C-k.m.r.-toekennings relatief tot tetrametielsilaan in deuteriochloroformoplossing van die lineere pentapeptied S-324 (200 MHz)

Toekennings- nommer van koolstowwe	Chemiese verskuiwings (dpm)		¹ H-multiplisiteit (J, Hz)
	¹ H	¹³ C	
1a	3.69	52.27(kj	3H, s
1		170.78(8	
2	4.55	55.99(r	1H,m
3	1.80-2.40	29.12(t)	2H,m
4	1.80-2.40	24.92(t)	2H,m
5	b: 3.68 a: 3.89	47.54(t)	1H,m 1H,m
6		172.57(s)	
7	4.78	55.53(d)	1H, dd, J = 9.3 en 7.7 Hz
7a	2.00	31.74(d)	1H, m
7b	0.98	18.08(k	3H, d, J = 6.8 Hz
7e	1.06	19.18(k	3H, d, J = 6.6 Hz
8		167.34 s	
9			
10	8.01	123.90 d)	1H, s
11		148.92 s)	
12	4.87	40.82(t)	2H, d, J = 5.7 Hz
13		175.00(s)	
14		161.12(s)	
15	8.03	124.34(d)	1H, s
16		148.92(s)	
17	5.21	52.51(d)	1H,m
17a	2.30	30.21(t)	2H,m
17b	2.20	31.68(t)	2H,m
17e		173.47(s)	
18		172.28(8)	
19	4.22	51.00(d)	1H,m
19a	1.53	41.78(t)	2H,m
19b	2.14	24.63 d)	1H,ffi
Ige	0.80	21.90 k)	3H, d, J = 5.4 Hz
I9d	0.80	22.79 k)	3H, d, J = 5.4 Hz
20		155.72(s)	
20a		80.10(s)	
20b	1.36	28.30(k)	9H, s
(1)	7.90		1H, d, J = 9.3 Hz
(2)	8.43		1H,br t, J = 5.7 Hz
(3)	b: 5.82 a: 6.60		1H, br s in, br s

TABEL 4.14 (vervolg:

8.11	III, d, J = 7.9 Hz
5.31	1H, d, J = 7.6 Hz

TABEL 4.15: ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-toekennings relatief tot tetrametielsilaan in deuteriochloroformoplossing van die sikliese pentapeptied R-266 (400 MHz)

Toekennings- nommer van koolstowwe	Chemiese verskuiwings (dpm)		1H-multiplisiteit (J, Hz)
	^1H	^{13}C	
1		170.13(s)	
2	4.38	62.28(d)	1H, dd, J = 8.2 en 6.9 Hz
3	2.04	29.49(t)	1H, m
	2.37		1H, m
4	2.03	25.54(t)	2H, m
5	b: 3.65	48.43(t)	1H, dt, J = 10.4 en 6.9 Hz
	a: 3.85		1H, dt, J = 10.4 en 6.1 Hz
6		171.20(s)	
7	4.98	54.17(d)	1H, dd, J = 9.8 en 2.4 Hz
7a	2.03	32.37(d)	1H, m
7b	0.95	20.28(k)	3H, d, J = 6.8 Hz
7c	0.49	15.22(k)	3H, d, J = 6.9 Hz
8			
9		160.21 s	
10	8.01	124.10 d)	1H, s
11		147.76 s)	
12	b:4.47	40.17(t)	1H, dd, J = 17.6 en 2.2 Hz
	a: 5.48		1H, dd, J = 17.6 en 10.1 Hz
13		174.96(s)	
14		162.15(s)	
15	8.07	124.75(d)	1H, s
16		148.09(s)	
17	5.41	52.91(d)	1H, ddd, J = 11.5, 9.2 en 3.8 Hz
lia	a ₂ : 2.57	27.97(t)	1H, ddt, J = 18.8, 9.5 en 3.9 Hz
	a ₁ : 2.67		1H, ddt, J = 18.8, 7.0 en 4.8 Hz
lib	2.40	31.40(t)	2H, m

TABEL 4.15 (vervolg):

17e		173.10(s)	
18		171.05(s)	
19	4.33	48.23(d)	1H, ddd, J = 10.9, 7.2 en 4.0 Hz
19a	a ₂ : 1.26 at: 1.88	40.96(t)	1H, ddd, J = 14.3, 10.9 en 5.3 Hz 1H, ddd, J = 14.3, 9.1 en 4.0 Hz
19b	1.59	25.54(d)	1H, ddk, J = 9.1, 6.6 en 5.3 Hz
1ge	0.91	21.38(k)	3H,d, J = 6.6 Hz
19d	0.93	23.18(k)	3H,d, J = 6.6 Hz
(1)	7.98		1H,d, J = 9.7 Hz
(2)	8.27		1H,dd J = 10.0 en 2.2 Hz
(3)	b: 5.31 a: 6.44		1H, br s 1H, br s
(4)	7.54		1H, d, J = 9.2 Hz
(5)	5.67		1H, d, J = 7.2 Hz

TABEL 4.16:

¹H- en ¹³C-k.m.r.-toekennings relatief tot tetrametielsilaan in deuteriochloroformoplossing van die sikliese pentapeptied 5-266 (dola-station 3) (400 MHz)

Toekennings- nommer van koolstowwe	Chemiese verskuiwings (dpm)		1U-multiplisiteit (J, Hz)
	¹ H	¹³ C	
1		169.40(s)	
2	4.00	62.61(d)	1H,t,J = 7.8 Hz
3	2.24	28.41 t)	2H,m
4	1.94	25.45 t)	2H,m
5	b: 3.69 a: 3.87	48.26 t)	1H,dt,J = 9.6 en 5.9 Hz 1H,ddd,J = 9.6, 7.5 en 3.3 Hz
6		170.92(s)	
7	4.75	55.62 d)	1H,dd,J = 9.2 en 7.2 Hz
7a	2.05	31.88 d)	1H, m
7b	1.04	21.18 k)	3H, d, J = 6.7 Hz
7e	1.15	23.30 k)	3H, d, J = 6.8 Hz
8		165.7i s)	
9		160.30 s)	
10	8.05	123.71 d)	1H, s
11		148.30 s)	
12	b: 4.65 a: 5.23	40.97(t)	1H,dd,J = 18.1 en 2.4 Hz 1H,dd,J = 18.1 en 7.3 Hz
13		174.30(s)	

TABEL 4.16 (vervolg) :

14		160.80(s)	
15	8.07	124.26(d)	IH, s
16		149.00(s)	
17	5.52	54.97(d)	IH,ddd,J = 10.9, 9.2 en 4.6 Hz'
17a	2.13	29.62(t)	2H, m
17b	2.40-2.70	33.27(t)	2H, m
17c		171.09(s)	
18		172.00(s)	
19	3.83	48.61(d)	IH,ddd,J = 11.0, 7.0 en 4.0 Hz
19a	1.55		2H, m
19b	2.33	37.77(d)	IH, m
19c	0.90	25.43(d)	3H, d, J = 6.6 Hz
19d	0.95	18.55(k)	3H, d, J = 6.6 Hz
(1)	8.30		IH, d, J = 9.2 Hz
(2)	8.73		IH, dd, J = 7.3 en 2.4 Hz
(3)	b: 5.48 a: 6.29		IH, br s IH, br s
(4)	7.83		IH, d, J = 9.2 Hz
(5)	6.39		IH, d, J = 7.0 Hz

Alhoewel die lineere pentapeptiede R-324 (Tabel 4.13) en 8-324 (Tabel 4.14) diastereomere is, verskil die IH_ en ¹³C-chemiese verskuiwings, sowel as die protou-protonkoppelingskonstantes, nie veel van mekaar nie. Die enigste werklike verskil is dat die twee metileenprotone van die (Gly)Thz-residu in die geval van R-324 diastereotopies van aard is ($\delta H_{12a} = 4.87$, IH, dd, J = 11.8 en 6.1 Hz; $\delta H_{12b} = 4.76$, IH, dd, J = 11.8 en 6.1 Hz), waarteenoor hierdie protone van 8-324 chemies ekwivalent ($\delta H_{12a,b} = 4.87$, 2H, d, J = 5.7 Hz) is. Uit vorige besprekings blyk dit dat eersgenoemde geval 'n aanduiding van konformasionele homogeniteit (of starheid) en laasgenoemde geval 'n aanduiding van konformasionele labiliteit is. Soos reeds genoem, plaas die vlakkige aard van die twee tiasoolkarboksamiede sowel as die intramolekulere waterstofbindings in die molekules teenwoordig 'n geweldige beperking op die konformasionele labiliteit van die klas van verbindings. Alhoewel geen temperatuurafhanklike studies op R-324 en 8-324 uitgevoer is, kan gespekuleer word dat die teenoorgestelde konfigurasie van die

(Gln)Thz-aminosuurresidu in die geval van R-324 tot 'n addisionele, of sterker, intramolekulere waterstofbinding aanleiding gee. Konformasionele homogeniteit in die geval van lineere pentapeptiede beteken nie noodwendig dat hierdie verbindings net so fisiologies aktief as die sikliese analoe sal wees nie, omrede die degradasie van sikiiese peptiede in organismes heelwat stadiger as in die geval van die lineere analoe²⁸⁸ plaasvind. Die gevolg is dat die biologiese aktiwiteit van sikliese peptiede langer in die organismes gehandhaaf kan word.

Soos reeds volledig bespreek, is die twee geminale protone van die (Gly)Thz-residue in beide R-266 (Tabel 4.15) en 5-266 (Tabel 4.16) diastereotopies van aard. Merkbare verskille in die ^1H - en ^{13}C -chemiese verskuiwings van die chirale sentra, veral van C17H en C19H, word duidelik waargeneem. Verder meer is die ^{13}C -resonansies van die (Gln)Thz-residu (d.w.s. C17H, C17aH, C17bH en C17eH) van R-266 ± 2 dpm na laer veld as in die geval van 5-266 verskuif. Uit die besprekings van die minimumenergiekonformasionele modelle van R- en 5-266 volg dit duidelik dat die syketting van die (Gln)Thz-residue in beide gevalle in verskillende chemiese omgewings verkeer. Hierdie syketting is direk na bo die peptiedruggraat in die geval van 3-266, en direk na onder die peptiedruggraat in die geval van R-266, gerig.

Die opmerklikste verskil tussen die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van R-266 en 5-266 word egter in die chemiese verskuiwings van die twee metielgroepe van die Val-aminosuurresidue waargeneem. Vir 5-266 is die twee metielgroepe (C7bH₃ en C7cH₃) in byna chemies ekwivalente omgewings, maar in die geval van R-266 ondergaan beide die twee groepe se resonansies (^1H - en ^{13}C -) verskuiwings na hoer veld. Veral die een metielgroep (C7cH₃) word sterk geskerm en resoneer in die ^1H -k.m.r.-spektrum van R-266 by δ 0.49 (S-266 : δ 1.04) en in die ^{13}C -k.m.r.-spektrum by δ 15.22 (5-266 : δ 21.18). Die verskynsel is geredelik verklaarbaar in terme van die relatiewe orientasie van die karbonielgroep van die vlakkige (Gly)-tiasoolkarboksamiedkomponent ten opsigte van die syketting van die Val-residu. In die geval van 5-266 (dolastatien 3) is die vlakkige

(Gly)-tiasoolkarboksamiedkomponent so georieer dat die karbonielgroep van hierdie komponent byna parallel aan die C7-H binding gerig is (kyk Tabel 4.10 : $\angle(\text{NH-GH})\text{Val} = +173^\circ$). Gevolglik is die C7H-e7aH binding byna loodreg ten opsigte van die karbonielgroep gerig. In die geval van R-266 is die situasie ietwat anders. Inspeksie van die minimumenergiekonformasie-model van R-266 toon dat die (Gly)-tiasoolkarboksamiedkomponent teen 'n kleiner hoek uit die vlak van die peptiedruggraat gerig is (kyk Tabel 4.12 : $\angle(\text{NH-GH})\text{Val} = +154^\circ$), met die gevolg dat die karbonielgroep teen 'n baie kleiner hoek na die een metielgroep van die Val-residu (C7cH_3) gerig is (interatoomafstand = 2.399 Å). Die anisotropiese effek van hierdie karbonielgroep gee dus tot die verskuiwings na hoer veld van die ^1H - en ^{13}C -resonansies van die C7cH_3 groep aanleiding. Aangesien die ander metielgroep van die syketting van die Val-residu (C7bH_3) ook in die vlak van C7cH_3 , maar verder van die karbonielgroep gelee is, ondervind dit 'n kleiner anisotropiese effek wat die kleiner verskuiwings na hoer veld van die ^1H - en ^{13}C -resonansies van die groep verklaar. Verdere inspeksie van In Dreiding-model van die minimumenergiekonformasie van R-266 het aangetoon dat die relatiewe orientasie van die syketting van die (Gln)Thz-residu geen invloed op bogenoemde verskynsels kan uitoefen nie.

Dit is verder ook interessant om die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van die lineere pentapeptiede met die van die sikliese analoë te vergelyk. Dit behoort In goeie aanduiding te gee van die konformasionele verandering wat die lineere pentapeptiede moes ondergaan om te kon sikliseer. Natuurlik, indien slegs minimale verskille tussen dié spektra voorkom kan afgelei word dat die konformasie van elke lineere pentapeptied baie met die van die onderskeie sikliese analoog ooreenkom, d.w.s, die konformasie van die lineere pentapeptied is van so 'n aard dat dit geredelik siklisering kan ondergaan (en d.w.s. in hoë opbrengs).

Klein verskille in die ^1H - en ^{13}C -chemiese verskuiwings van die chirale sentra (d.w.s. CH's) word tussen die spektra van die lineere R-324 en die sikliese R-266 waargeneem.

Die grootste verskille tussen die spektra van die twee verbindings word in die resonansies van die twee metielgroepe van die Val-residu (die chemiese verskuiwings van die sykettings van die Leu-residu se metielgroepe verskil baie min in die twee spektra) en die twee geminale protone van die (Gly)Thz-residu waargeneem. Die eerste verskynsel is reeds in die voorafgaande bespreking behandel. Die tweede verskynsel word verklaar deur die groter relatiewe konformasionele starheid van die sikliese pentapeptied met die gevolg dat die metileenprotone in dié geval groter diastereotopiese karakter aanneem. By die lineere pentapeptied neem die NH-proton van die (Gly)Thz-residu dihedrale hoeke van ongeveer $+120^{\circ}$ of -120° ten opsigte van elke metileenproton in, maar in die geval van die sikliese analoog is die dihedrale hoeke -176° en $+64^{\circ}$. Die groter N(4)H-koppelingskonstante van 9.2 Hz in die geval van die sikliese peptied (teenoor 7.8 Hz in die lineere pentapeptied), kan moontlik aan vorming van die intramolekulere waterstofbinding tussen hierdie amienwaterstof en die Pro-residu se karbonielgroep toegeskryf word. Die resulterende γ -draai behoort heelwat beperking op die relatiewe konformasionele mobiliteit van die amiedproton ten opsigte van die lineere analoog te plaas. Behalwe vir die resonansies van C17H en C19H, sowel as van die twee geminale protone van die (Gly)Thz-residu, verskil die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektra van die lineere pentapeptied 8-324 egter baie min met die van die sikliese analoog (5-266). In die geval van die lineere pentapeptied 5-324 is die twee geminale protone van die (Gly)[Tha-aminosuurresidu chemies ekwivalent, waarteenoor in die geval van die sikliese pentapeptied 8-266 die protone diastereotopies van aard is. Die amiedproton van die (Gly)Thz-aminosuurresidu van 5-266 vorm dihedrale hoeke van $+156^{\circ}$ en -82° met die twee geminale protone. Die verskil in die koppelingskonstantes van N(4)H tussen 8-324 en 8-266 (7.9 Hz teenoor 9.2 Hz onderskeidelik) kan soos in die geval van R-266 aan die vorming van die γ -draai (d.w.s. 'n intramolekulere waterstofbinding tussen die amiedproton van die (Gln)Thz-aminosuurresidu en die karbonielsuurstof van die Pro-aminosuurresidu) na siklisering, toegeskryf word.

Uit bostaande bespreking kan tot die gevolgtrekking gekom word dat die konformasies

van beide R-266 en 8-266 baie goed met die konformasies van die analoe lineere pentapeptiede ooreenkom. Die gevolgtrekking word gestaaf deur die gemak van siklisering (d.w.s. relatiewe kort reaksietye en onverdunde reaksienengsels) en hoë opbrengste in die bereiding van die sikliese pentapeptiede behaal. Uit die bespreking blyk dit verder dat al hoe minimaal die verandering in samestelling van sikliese pentapeptiede (bv. R-(Gln)Thz vs. S-(Gln)Thz), dit tog tot merkbare verskille in die konformasies van die molekules aanleiding gee wat op sy beurt weer tot 'n verskil in fisiologiese aktiwiteit kan lei.



HOOFSUK 5EKSPERIMENTEEL5.1 ALGEMEEN

Die opname van spektra is met behulp van die volgende instrumente uitgevoer:

- | | | |
|-------|-------------------------------------|---|
| (i) | Infrarooispektra (IR) | : Perkin-Elmer-297!841 |
| (ii) | Ultravioletspektra (UV) | : Hitachi 150-20 |
| (iii) | Massaspektra (MS) | : Varian MAT-212!SS-188 |
| (iv) | Kernmagnetieseresonansspektra (KMR) | : Bruker \VP-80
Bruker \VP-500
Varian VXS-200 |



UNIVERSITY
OF
JOHANNESBURG

Tensy anders vermeld, is CDCl_3 as oplosmiddel gebruik met tetrametielsilaan (TMS) as interne standaard by bepaling van die k.m.r.-spektra. Die volgende notasies is gebruik om die k.m.r.v-seine aan te dui:

s	singulet
d	doeplet
dd	doeplet van doebllette
ddd	doeplet van doeplet van doebllette
t	triplet
dt	doeplet van triplctte
ddt	doeplet van doeplet van triplete
k	kwartet
dk	doeplet van kwartette

ddk	doeplet van doeplet van kwartette
dkk	doeplet van kwartet van kwartette
m	multiplet

Optiese rotasies ($[\alpha]_D^t$) is met 'n Perkin-Elmer 141 polarimeter bepaal vir oplossings in chloroform, tensy anders gespesifiseer. Smeltpunte is m.b.v. In Kofler mikrowarmplaat bepaal en word ongekorrigeerd weergegee. Tensy anders vermeld, is kwalitatiewe dunlaagchromatografie (die) op kommersiele Whatrnan silikajel KSF ($250 \mu\text{m}$) plaatjies uitgevoer. Die dlc plaatjies is met gekonsentreerde chroomsuur en/of 1% palladiumchloried spuitreagense ontwikkel, tensy anders vermeld. "Chromatografie" ver-wys na preparatiewe kolomechromatografie op silikajel (ongeveer 100-voudige hoeveelheid Merck 'Kieselgel 60', 60-200 11m). Oplosmiddels is in 'n volume:volume verhouding gemeng wanneer dit vir ehromatografiese doeleindes gebruik is.

5.2


 DROOG VAN OPLOSMIDDELS

 UNIVERSITY OF JOHANNESBURG

OPLOSMIDDEL

METHODE

Chloroform, koolstoftetraehloried, dichloormetaan.	P205' distillasie
Benseen, heksaan, dioksaan, dimetoksietaan (DME).	Natrium, distillasie
Etiel asetaat	Anhidriese natriumsulfaat, kaliumkarbonaat, distillasie
Dimetielsulfoksied (DMSO), dimetielformamied (DMF).	Kalsiumhidried, distillasie (<i>in vacuo</i>)
Tetrahidrofuraan (THF)	Natriumhidried

5.3 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.4

Etiel 2-bensamidometieltiasool-4-karboksielsuur (110) is ooreenkomstig die sintese van Brookes *et al.*^{4d} vanaf glisinonitriëlhidrochloried berei.

2-Aminometieltiasool-4-karboksielsuurhidrochloried (111)

Etiel 2-bensamidometieltiasool-4-karboksielsuur (110, 2.14 g, 7.4 mmol) en 5.5 N waterstofchloried (25 ml) is geroer en in 'n H₂ atmosfeer onder terugvloei verhit vir 16 uur. Die oplossing is toegelaat om af te koel en by 00C vir 3 uur gelaat. 'n Groot hoeveelheid kleurlose kristalle het uit die oplossing gekristalliseer en is afgefiltreer. Die kristalle is met eter (150 ml) gewas. Dłc het getoon dat die eteroplosbare gedeelte uit suiwer bensoesuur bestaan het. Die waterige filtraat is met eter (2x50 ml) geekstraheer, die waterige fase drooggedamp en die residu uit metanol-eter gekristalliseer. Beide groepe van eteronoplosbare kristalle (1.16 g en 0.13 g onderskeidelik, totaal 1.29 g, 90%) is as 2-aminometieltiasool-4-karboksielsuurhidrochloried (111) bewys deur smp. 268-270^{oC} ontbinding. (Lit.^{7a} smp. 269-270^{oC}); FAB (in gliserolmatriks), m/z 159 (vry basis + H+).

24,N-t-butoksikarboniel-1'-aminometiel)tiasool-4-karhoksielsuur (112)

By 'n yskoue oplossing van 2-aminometieltiasool-4-karboksielsuurhidrochloried (111, 5.0 g, 25.7 mmol) en 1 N natriumhidroksied (52 ml) in droe dimetoksietaan (50 ml) is di-t-butieldikarbonaat (5.6 g, 25.7 mmol), opgelos in dimetoksietaan (10 ml), drupsgegewys bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 30 minute by 00C, gevolg deur 1 uur by kamertemperatuur geroer. Die mengsel is met 2.7 N waterstofchloried na pH 2 aangesuut en met chloroform (2x 80 ml) geekstraheer. Die gekombineerde chloroformekstrakte is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en onder verminderde druk afgedamp. Die residu (suiwer volgens dec) is eenmalig vanuit metanol-eter-pentaaengeherkristalliseer om suiwer N-t-Boc-(Gly)Thz (112, 2 g, 35%) te lewer. Smp. 185-186^{oC} (Lit.³³⁶ smp. 184^{oC}); UV: $\lambda_{\text{maks}} = 235 \text{ nm}$; ν_{maks} (KBr) 3470 (N-H), 3390 (O-H, breed), 1720 en 1693 (C=O) em-I; IH-k.m.r. (DMSO-d₆) δ 1.37 (9H, s,

$\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 4.35 (211, d, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 7.80 (111, br t, $J = 6.1 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 8.30 (111, s, tiasoolproton); ^{13}C -k m.r. (DMSO- d_6) δ 28.04 (3x, k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.83 (t, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 78.56 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.04 (d, C-5), 146.71 (s, C-2), 155.65 (s, NHOCO), 161.94 (s, C-4), 171.43 (s, COGH); m/z 258 (1, M^+), 185 (55, $\text{M}^+ - \text{oC}(\text{CH}_3)_3$), 142 (17, $\text{M}^+ - \text{NHOCOC}(\text{CH}_3)_3$); Analise bereken vir $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_1$:
C 46.50, H 5.46, N 10.85. Gevind: C 46.73, H 5.37, N 10.91.

N-t-butoksikarboniel-glisinonitriël (113)

In Mengsel van glisinonitriëlhidroehloried (108, 5 g, 54 mmol) en trietielarnien (32.5 ml) in anhidriese dimetielformamied (32.5 ml) is vir 5 minute by kamertemperatuur geroer, waarna di-t-butieldikarbonaat (23.57 g, 108 mmol) tydens hewige roering, by 60°C , daarby gevoeg is. Na 'n reaksietyd van 35 minute by dié temperatuur is die reaksiemengsel na kamertemperatuur laat afkoel en die vlugtige komponente verwyder *in vacuo*. Die residu is vir 10 minute in yskoue waterstofehloried (pH 2.2, 25 ml) geroer waarna die produk met etiel asetaat (3x120 ml) geekstraheer is. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Chromatografie van die residu op silika (heksaan: etiel asetaat 7:3) het 8.39 g (99%) N-t-Boe-glisinonitriël (113) as 'n kleurlose stroop gelewer. ν_{maks} 3440 (N-H), 2230 (C:N), 1720 (C=O) en 1180 (C-o-e) cm^{-1} ; ^1H -k m.r. δ 1.40 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.99 (2H, d, $J = 5.8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.41 (1H, br t, $J = 5.8 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-NH}$); ^{13}C -k.m.r. δ 28.17 (3x, k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.10 (t, C-2), 81.18 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 116.72 (s, C-1), 155.14 (s, NHOCO); m/z 157 (1, MH^+), 83 (3, $\text{M}^+ - \text{OC}(\text{CH}_3)_3$); Analise bereken vir $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$: C 53.83, H 7.74, N 17.94. Gevind: C 53.75, H 7.71, N 18.03.

N-t-butoksikarboniel-glisinotioamied (114)

Absolute etanol (160 ml) is eers met ammoniak (gas) en daarna met waterstofsulfied (gas) by 0°C versadig. Kristalle van ammoniumwaterstofsulfied (NH_4HS) het in groot

hoeveelhede gevorm. N-t-butoksikarboniel-glisinonitriël (113, 7 g, 44.82 mmol) is in etanol (200 ml) opgelos en by die NH_4HS suspensie gevoeg. Die reaksiemengsel het vinnig heldergeel geword en die meeste van die kristalle van NH_4HS het opgelos. Die volledige reaksie na 5 uur by kamertemperatuur getoon. Die reaksiemengsel is met water (500 ml) verdun en met chloroform (2x250 ml) geëkstraheer. Die organiese fase is met water (100 ml) gewas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp om 'n kleurlose stroop te lewer. Kristallasie uit etiel asetaat-heksaan het 7.61 g (89.3%) suiwer tioamied (114) gelewer. Smp. 124°C (Lit.³³⁶ smp. 124°C); ν_{maks} 3440 (N-H), 3360 (NH_2 , doeblet), 1700 (C=O), 1500 (C=S) en 1180 (C-Q-C) cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 1.37 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.06 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.62 (1H, br t, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 8.07 (2H, br s, -NH_2); ^{13}C -k.m.r. δ 28.21 (3x, k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 51.00 (t, C-2), 80.60 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.15 (s, NaCO), 210.24 (s, C-1); *m/z* 190 (65, M⁺), 75 (72, MH⁺-NHOCOC(CH₃)₃); Analise bereken vir C₇H₁₄N₂O₂S₁: C 44.19, H 7.42, S 16.85. Gevind: C 44.07, H 7.48, S 16.79.



Etiel 2-:fN-t-butoksikarboniel-1'-aminometielhiasool-4-karboksielsullr (115)

Metode A : Standaard Hantzsch-reaksie

Die tioamied (114, 3 g, 15.77 mmol) en etiel broompiruvaat (2.36 mL, 18.92 mmol) in absolute etanol (6 mL) is vir 15 minute onder terugvloei verhit. Die oplossing het liggeel geword en die volledige reaksie aangetoon. Die oplosmiddel is onder verminderde druk verwyder en die residu tussen chloroform (50 ml) en 5% natriumbikarbonaat (20 ml) verdeel. Die organiese fase is *in vacuo* drooggedamp en die residu uit etiel asetaat-heksaan gekristalliseer om die suiwer tiasoolester (115) in 'n opbrengs van 63% (2.84 g) te lewer. Smp. 133°C (Lit.³³⁶ smp. 133°C); ν_{maks} 3450 (N-H), 1720 (C=O) en 1180 (C-o-e) cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 1.39 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 1.43 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 4.41 (2H, k, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 4.64 (2H, d, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.25 (IR, br t, $J = 6.4$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 8.11 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. δ 14.31 (k, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 28.25 (3x, k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42.36 (t, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 61.44 (t, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 80.40 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.80 (d, C-5), 146.89 (s, C-2), 155.58 (s, NHOCO).

161.23 (8, C-4), 170.02 (8, CO-GEt)_i m/z 286 (16, M⁺), 241 (39, M⁺-GEt), 230 (92, MH⁺-C(CH₃)₃)_i Analise bereken vir C₁₂H₁₈N₂O₄S₁: C 50.34, H 6.34, N 9.78. Gevind: C 50.39, H 6.37, N 9.70.

Metode B : Gemodifiseerde Hantzsch-reaksie

By In hewig geroerde heterogene mengsel van die tioamidc (114, 3 g, 15.77 mmol) en fyngemaalde kaliumwaterstofkarbonaat (12.63 g, 126.14 mmol) in anhidriese dimetoksietaan (6 ml) is etiel broompiruvaat (5.91 ml, 47.30 mmol) gevoeg. Na 'n reaksietyd van 1 minuut by kamertemperatuur is die liggeel reaksiemengsel na OOC afgekoel en 'n voorafbereide mengsel van trifluorasynsuuranhidridc (8.91 ml, 63.07 mmol) en piri-dien (11.48 ml, 141.91 mmol) in dimetoksietaan (2 ml), is bygevoeg. Die reaksiemengsel het rooi-bruin van kleur geword en *dfc* het aangetoon dat tiasoolvorming byna onmiddellik volledig plaasgevind het. Die mengsel is laat opwarm na kamertemperatuur en die vlugtige komponente versigtig onder verminderde druk afgedamp. Die residu is gesuspendeer in etiel asetaat (1x50 ml) en geekstraheer met water (2x25 ml). Die organiese fase is gedroog (anhidriese natrlumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp *in vacuo*. Kristallasie uit etiel asetaat-heksaan het suiwer tiasoolester (115) in 'n opbrengs van 86.2% (3.89 g) gelewer; Smp. 133°C (Lit.³³⁶ smp. 133°C).

2-(N-t-butoksikarboniel-1'-aminometielltiasool-4-karboksieIsuur (112)

Die tiasoolester (115, 0.7 g, 2.45 mmol) is in 'n dioksaan (5 ml) en water (5 ml) mengsel opgelos. 1 N Natriumhidroksied (2.45 ml) is by die helder oplossing gevoeg en die reaksiemengsel is vir 3 uur by kamertemperatuur geroer. Die mengsel is met eter geekstraheer en die waterige fase is met 3 N waterstofchloried na pH 2 aangesuur. Die tiasoolsuur het spontaan uitgepresipiteer en die presipitaat is afgefiltreer. Kristallasie van hierdie produk uit etanol-heksaan het suiwer N-t-Boc-(Gly)Thz (112, 0.54 g, 85.9%) gelewer. Smp. 185-186°C (Lit.³³⁶ smp. 184°C).

5.4 **EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.5****N-Bensieloksikarboniel-S=glutamiensuur (120)**

s-Glutamiensuur (13.2 g, 90 mmol) en magnesiumoksied (11.2 g, 270 mmol) is gesuspendeer in gedistilleerde water (150 ml) en met 'n magnetiese roerder geroer. Etieleter (45 ml) is bygevoeg en die mengsel in 'n ysbad geroer. Bensielchloorformiaat (30.7 g, 180 mmol) is drupsgewys oor 'n tydperk van 30 minute bygevoeg. Die ysbad is verwyder en roering vir een uur voortgesit. Die mengsel is aangesuur (gekonsentreerde waterstofchloried) na pH 5 en met etiel asetaat (3x150 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is met 5% waterstofchloried (2x50 ml) en water (2x50 ml) gewas en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). Die organiese oplosmiddel is *in vacuo* verwyder. Die residu is na triturering met petroleumeter as 'n vaste stof verkry. Herkristallasie van hierdie vaste stof uit etiel asetaat-petroleumeter het N-ebz-8-glutamiensuur (120, 19.4 g, 78%); Smp. 118-120°C (Lit.¹⁰⁷ smp. 120°C); $[\alpha]_D^{25} -5.9^\circ$ (c 10, ysasynsuur) (Lit.¹⁰⁷ $[\alpha]_D^{19} -7.1^\circ$ (c 10, ysasynsuur)) gelewer.

N-Bensieloksikarboniel-S=glutamiensuuranhidried (121)

N-ebz-8-glutamiensuur (120, 5.6 g, 20 mmol) is opgelos in tetrahydrofuraan (droog, 50 ml) en disikloheksielkarbodiimid (4.12 g, 20 mmol), opgelos in tetrahydrofuraan (10 ml), is by die eerste oplossing gevoeg. Die mengsel is teen vog beskerm (kalsiumchlorieddroogbuis) en 14 uur by kamertemperatuur gelaat, waarna dit na OoC afgekoel is. Die gepresipiteerde urium is deur filtrasie verwyder. Die vaste stof is met tetrahydrofuraan (2x8 ml) gewas en die gekombineerde filtrate *in vacuo* by 43°C gekonsentreer. Die residu (5.15 g) is uit chloroform-eter gekristalliseer by OoC om die anhidried (121, 3.94 g, 75%) te lewer. Smp. 93-94°C (Lit.¹⁰⁶ smp. 94-95°C); $[\alpha]_D^{25} -39.5^\circ$ (c 10, ysasynsuur) (Lit.¹⁰⁶ $[\alpha]_D^{25} -43.0^\circ$ (c 10, HAc)).

N-Bensieloksikarboniel-S-isogIntamien (122)

N-ebz-5-glutamiensuuranhidried (121, 3.5 g) is opgelos in chloroform (40 ml, vars gedistilleer van natriumkarbonaat) en eter (60 ml, vars gedistilleer van natrium). Die

geroerde oplossing is na -60°C afgekoel (asetoon-droe ys). $\text{NH}_3(\text{gas})$ is vir 30 minute deur die oplossing geborrel. In Eksotermiese reaksie het plaasgevind en die interne temperatuur het vir In kort tydjie na -45°C gestyg gedurende die eerste vyf minute. Die oplossing is toegelaat om na kamertemperatuur op te warm en die oplosmiddel *in vacuo* by 40°C verwyder. Die residu is met 37 ml water behandel. Die oplossing wat verkry is, is gefiltreer om onopgeloste materiaal te verwyder en met 1N waterstofchloried na pH 3.4 by 0°C aangesuur. Die gepresipiteerde jel is deur filtrasie versamel en met water (100 ml) en eter (50 ml) gewas. Die vaste stof is *in vacuo* gedroog. Hierdie materiaal (2.12 g) is met dunlaag (metanol:ysasynsuur:etiel asetaat 6:3:93) geanaliseer, wat een hoofproduk asook 'n klein onsuiverheid aangetoon het. Die produk is uit 'n minimum water geherkristalliseer om suiwer N-ebz-5-isoglutamien (122, 2.48 g, 69%) te lewer. Smp. $173-175^{\circ}\text{C}$ (Lit. ¹⁰⁶ smp. $174-175^{\circ}\text{C}$): $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -6.5^{\circ}$ (c 2, metanol) (Lit. ¹⁰⁶ $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -7.1^{\circ}$ (c 2, metanol)).

N-Bensielokskarboniel-5-isoglutamien metielester (123)

Metode A

In Oormaat van In eteroplossing van diasometaan is by 1 g fynverdeelde N-bensielokskarboniel-5-isoglutamien (122) in metanol (25 ml) gevoeg en die oplossing vir 30 minute by kamertemperatuur gehou. Die oormaat diasometaan is met asynsuur ontbind. Die mengsel is gefiltreer en *in vacuo* drooggedamp, Die residu, wat uit 1:1 metanol-water gekristalliseer is, het N-ebz-5-isoglutamien metielester (123, 786 mg) gelewer. Smp. $118-119^{\circ}\text{C}$ (Lit. smp. $110-118-120^{\circ}\text{C}$); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5.5^{\circ}$ (c 1, metanol)(Lit. ¹¹⁰ $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -5.7^{\circ}$ (c 1, metanol)).

Metode B

N-ebz-B-glutamiensuur (120, 22.4 g) in droe tetrahydrofuraan (150 ml) is met disikloheksielkarbodiimid (17.68 g) in tetrahydrofuraan (25 ml) behandel en die oplossing vir 12 uur by kamertemperatuur gelaat, gevolg deur 2 uur by DoC. Die gepresipiteerde disikloheksielureum is met filtrasie verwyder. Die vaste stof is met chloroform (150

ml) gewas en die gekombineerde filtrate tot -60°C afgewol (asetoon/droë ys). Die geroerde oplossing is met 'n kalsiumchlorieddroogbuis teen vog beskerm. $\text{NH}_3(\text{gas})$ (gedroog deur oar natriumhidroksiedkorrels te stuur) is vir 30 minute dour die oplossing geborrel en het die vorming van 'n dik, wit presipitaat tot gevolg gehad. Die oplosmiddel is *in vacuo* by 40°C verwyder en die residu in water (150 ml) opgeneem. Onoplosbare materiaal is deur filtrasie verwyder en die waterige fase aangesuur (3N waterstofchloried) tot pH 2 by 0°C . Die presipitaat wat verkry is, is afgefiltreer met water gewas en *in vacuo* gedroog. Die vaste suur (19.5 g) is sonder verdere suiwering in 2:1 metanol-chloroform (150 ml) opgeneem en met 'n oormaat diasometaan (wat uit 20 g nitrometielureum berei is volgens die metode wat in Organic Synthesis Col. Vol. 11 beskryf is) behandel. Verwydering van die oplosmiddels en kristallisering van die vaste residu uit 1:1 metanol-water het N-ebz-S-isoglutamien metielester (123, 13.9 g, 60%) gelewer. Smp. $118-120^{\circ}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -5.8^{\circ}$ (c 1, metanol); m/z 294 (M^+ , $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_5$ vereis M: 294).

N-Bensieloksikarboniel-S- γ -amino- γ -sianobottersuur (125)

N-ebz-S-isoglutamien metielester (123, 1.16 g, 3 mmol) is opgelos in dimetielformiamied (2.5 ml) en N-metielmorfolien (0.78 ml, 8.4 mmol) is bygevoeg. Die geroerde oplossing is teen vog beskerm en by 0°C gehou. Tionielchloried (0.3 ml, 4.2 mmol vars gedistilleer) is drupsgewys oar 'n tydperk van 3 minute bygevoeg. Die temperatuur van die reaksiemengsel het na 30°C gestyg. Die oplossing is vir 2 uur by 0°C gehou en het ligbruin van kleur geword. Dlc op hierdie stadium het 'n hoeveelheid onveranderde aanvangsmateriaal aangetoon. Nog tionielchloried (0.1 ml) is bygevoeg en die reaksiemengsel toegelaat om tot kamertemperatuur op te warm. Na 1 uur is die oplossing in 'n mengsel van fyn ys (50 g) en natriumbikarbonaat (10 g) gegooi. Die mengsel is met etiel asetaat (60 ml) geëkstraheer. Die organiese fase is met water (2x50 ml) gowas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp om 'n bruin olie (1.24 g) te lewer. Chromatografie oar silika (50 g) en eluering met hekseen- β -etiel asetaat (1:1) het die nitriëlester (124, 0.795 g, 70%) as 'n kleurlose olie gelewer wat met verloop van

tyd gesolidifiseer het. In Monster wat uit eter-heksaan geherkristalliseer is het smp. 50-51°C gehad (Lit.¹⁰⁹ smp. 51-52°C).

Die bogenoemde ru nitrielester (891 mg) is opgelos in aseton (4.5 ml) en water (1.5 ml). 1 N Natriumhidroksied (3 ml, 3 mmolekwivalente) is drupsgewys oor 15 minute by die geroerde oplossing gevoeg. Die mengsel is vir nog 30 minute geroer, met water verdun (10 ml) en met eter (2x20 ml) geekstraheer. Die waterige fase is aangesuur met verdunde waterstofchloried en met chloroform (2x25 ml) geekstraheer. Die organiese fase is met water (13 ml) gewas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp. Die residu (802 mg) is uit etiel asetaat-heksaan gekristalliseer om die suiwer N-Cbz-S- γ -amino- γ -sianobottersuur (125,615 mg, 78.2% totale opbrengs) te lewer. Smp. 116-117°C (Lit.¹⁰⁹ smp. 110.5-112°C); $[\alpha]_D^{25}$ -48.9° (c 1, metanol) (Lit.¹⁰⁹ $[\alpha]_D^{25}$ -49.7° (c 0.8, metanol)); m/z 262 (M+, C₁₃H₁₄N₂O₄ vereis M: 262).

N-Bensieloksikarboniel-S- γ -amino- γ -sianobutiramied (126)

Die nitrielsuur (125, 4.93 g, 18.8 mmol) is in droe tetrahydrofuraan (80 ml) opgeneem en die oplossing na -23°C afgekoel met voortdurende roering. N-metielmorfolien (1.9 ml, 18.8 mmol) en isobutielchloroformiaat (2.44 ml, 18.8 mmol) is bygevoeg en die mengsel vir 25 minute by -23°C gehou. NH_{3(gas)} is by hierdie temperatuur vir 30 minute deurgeborrel. Die mengsel is toegelaat om tot kamertemperatuur op te warm en gepresipiteerde soute is deur filtrasie verwyder. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder en die mengsel in chloroform (300 ml) opgeneem. Die chloroform is met water (2x30 ml) gewas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* verwyder om die amied as In vaste stof (4.64 g) te lewer. Dunlaagchromatografie (asetoon:chloroform 1:1) het die suiwerheid van die verbinding bevestig. Dit is uit aseton-chloroform gekristalliseer en het smp. 147-148°C gehad; $[\alpha]_D^{25}$ -41.5° (c 1, metanol); ν_{maks} 3400, 3310, 3220, 2225, 1715, 1650 en 1540 cm⁻¹; ¹H-k.m.r. (DMSO-d₆) δ 1.98 (2H, m), 2.27 (2H, m), 4.68 (1H, dt, J = 7.5 Hz, CH-NH), 5.18 (2H, s, C₆H₅CH₂O-), 8.3 (1H, d, J = 7.5 Hz, NH-eH); m/z 261 (M+).

Gevind: C 59.44, H 5.68, N 15.88, Bereken vir C₁₃H₁₅N₃O₃: C 59.76, H 5.79, N 16.08.

N-Bensieloksikarboniel-8-γ-amino-γ-tiokarbamoielbottersuoramied (127)

Absolute etanol (120 ml) is eers met ammoniak(gas) en dan met waterstofsulfied(gas) by OoC versadig. Kristalle van ammoniumwaterstofsulfied het in groot hoeveelhede gevorm. ~~N-Cbz-S-γ-amino-γ-sianobutiramied (126, 6 g)~~ is in kokende etanol (150 ml) opgelos. Die afgekoelde oplossing is by die bogenoemde NH₄HS suspensie gevoeg. Die reaksiemengsel het vinnig heldergeel geword en die meeste van die kristalle van NH₄HS het opgelos. **Dlc** het volledige reaksie na 5 uur by kamertemperatuur getoon. Die mengsel is met water (500 ml) verdun en met chloroform (2x250 ml) geekstraheer. Die organiese fase is met water (100 ml) gewas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp om 'n gom (5.87 g) te lewer. Kristallasie uit etiel asetaat het die suiwer tioamied (127, 4.2 g) gelewer. Smp. 12D-1210C; $[\alpha]_D^{25} -8.0^\circ$, (c 1, etanol); v_{rnaks} 3412, 3300, 3225, 1714, 1658 en 1535 cm⁻¹; IH-k.m.r. (DMSO-d₆) δ 4.65 (IH, dt, J = 7.5 Hz, CH-NH), 6.92 (IH, d, J = 7.5 Hz, NH-eII), 7.3 (IH, br s) en 7.9 OH, br s (CONH₂), 9.25 (IH, br s) en 9.75 (IH, br s) (CSNH₂); m/z 295 (M+).

Gevind: C 52.98, H 5.67, N 14.37, S 10.61. Bereken vir C₁₃H₁₇N₃O₃S: C 52.87, H 5.80, N 14.22, S 10.86.

Ornsetting van die tioamied (127) na die nitriël (126)

Die tioamied (127, 295 mg, 1 mmol) is opgelos in dlmetoksietaan (1 ml). Dietielkarbonaat (0.7 ml, 7 mmol vars gedistilleer) en N-rietielmorfolien (0.2 ml, 2 mmol) is bygevoeg. Die oplossing is vir 48 uur by kamertemperatuur geroer. Die reaksiemengsel is met water (20 ml) verdun en met etiel asetaat (2x20 ml) geekstraheer. Die organiese fase is met 2% sitroensuur (20 ml) en water (20 ml) gewas. Die etiel asetaat is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en afgedamp. Die gom wat verkry is, is deur silika (30 g) in etiel asetaat gefiltreer om die nitriël (126, 40.1 mg) te lewer. Smp. 146-147°C; $[\alpha]_D^{25} -39.2^\circ$ (c 1, metanol). Die produk is geïdentifiseer deur direkte vergelyking (IR, k.m.r.) met werklike monster.

Etiel R/S-2--{N-bensieloksikarboniel-1'-amino-3'-amidopropielltiasool-4-karb-oksieelsuur (128)}

Metode A

Die tioamied (127, 590 mg, 2 mmol) en etiel broornpiruvaat (0.28 ml, 2.2 mmol) in absolute etanol (9 ml) is vir 15 minute onder terugvloei verhit. Die oplossing het liggeel geword en *dtc* het volledige reaksie aangetoon. Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder en die residu tussen chloroform (50 ml) en 5% natriumbikarbonaat (20 ml) verdeel. Die chloroformfase is *in vacuo* drooggedamp en die residu (745 mg) uit etiel asetaat-eter gekristalliseer om die suiwer N-ebz-R/5-(Gln)Thz-QEt (128, 950 mg) te lewer. Smp. 154-155 °C; ν_{maks} 3420, 3300, 3210, 1720, 1690, 1660, 1620 en 1540 cm^{-1} ; $^1\text{H-NMR}$ δ 1.43 (3H, t, $J = 7 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 1.8-2.7 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-eH}_2$), 4.38 (2H, k, $J = 7 \text{ Hz}$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-}$), 4.95 (1H, m, NH-eIT), 5.15 (2H, s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{-O}$), 6.9 (1H, br s) en 7.4 (IR, br s) (CONH_2), 8.35 (1H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, NH-eH), 8.52 (1H, s, tiasoolproton); EI m/z 391 (M⁺); FAB m/z (NaI-gliserolmatriks): 392 (MH⁺) en 414 (MNa⁺).

Gevind: C 55.45, H 5.37, N 10.57, S 8.07. Bereken vir $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C 55.23, H 5.41, N 10.73, S 8.19.

Metode B

Dieselfde as metode A, behalwe dat metanol i.p.v. etanol gebruik is.

Metode C

Metode A by kamertemperatuur vir 1 uur in die teenwoordigheid van I molekwivalent silwertetrafluoroboraat.

Metode D

Die tioamied (127, 1.04 g, 3.53 mmol) is in droe dimetielformamied (10 ml) opgelos. By die geroerde oplossing is etiel broompiruvaat (0.6 ml, 40% oormaat) gevoeg. Die reaksiemengsel het vinnig geel geword en *dtc* het getoon dat alle aanvangsmateriaal

binne 40 minute verdwyn het. Die reaksiemengsel is met etiel asetaat (150 ml) verdun en die organiese oplossing met 1% natriumbikarbonaat (100 ml) en water (3x100 ml) gewas. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en drooggedamp onder verminderde druk. Die residu is uit etiel asetaat-eter gekristalliseer om die tiasool (128, 1.19 mg) te lewer. Smp. 155-1.56°C.

RIS-2-{N-bensieloksikarboniel-1'-amino-3'-amidopropiel)tiasool-4-karboksiel-suur (129a)

Die tiasoolester (128, 3.5 g, 9.33 mmol) is in 'n dioksaan (60 ml) en water (60 ml) mengsel opgelos. 1 N Natriumhidroksied (10 ml) is by die helder oplossing gevoeg en die mengsel by kamertemperatuur gelaat. Die volledige reaksie na 2 uur aange-toone Die reaksiemengsel is met eter (200 ml) geekstrahcer. Die waterige fase is met 3 N waterstofchloried aangesuur en die presipitaat afgefiltreer. Kristallasie van hierdie materiaal uit etanol-heksaan het die suiwer *N-Gbz-R/S-(Gln)Thz* (129a, 2.8 g, 86%) gelewer. Smp. 185-186°C; ν_{maks} 3475, 3352, 3132, 1720, 1660, 1634, 1586, 1543 en 1338 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r. (DMSO-}d_6)$ δ 1.89-2.33 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 4.90 (1H, m, CH-NH), 5.07 (2H, s, PhCH_2O), 6.86 (1H, br s) en 7.35 (1H, br s) (CONH_2), 8.30 (1H, d, $J = 7 \text{ Hz}$, NH-GH), 8.46 (1H, s, tiasoolproton); $^{13}\text{C-k.m.r. (DMSO-}d_6)$ δ 29.9 (t), 31.1 (t), 53.0 (d), 65.6 (t), 127.5 (d,2x), 127.7 (d,2x), 128.3 (d), 128.7 (d), 136.8 (s), 147.0 (s), 155.9 (s), 162.0 (s), 173.3 (s), 174.4 (s); FAR m/z (NaI-gliserolmatriks) m/z 386 (MNa+) en 364 (MH+). Gevind: C 52.67, H 4.50, N 11.52, S 8.55. Bereken vir $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$: C 52.88, R 4.71, N 11.56, S 8.82.

RIS-2-{N-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-amidopropifil)tiasool-4-karboksiel-suur(129b)

N-ebz-R/S-(Gln)Thz-QEt (128, 1.96 g, 0.5 mmol) is in droe dichloormetaan (20 ml) by OoC gesuspendeer. 32% Waterstofbromied in ysasynsuur (20 ml) is bygevoeg en die mengsel vir 4 uur by OoC geroer. 'n Helder liggeel oplossing is verkry. Eter (60 ml) is stadig bygevoeg en die gepresipiteerde wit hidrobromied (1.77 g) afgefiltreer en *in*

vacuo gedroog. Die hidrobromied is sonder verdere suiwing in 'n mengsel van dioksaan (20 ml) en water (20 ml) opgelos. Die oplossing is met verdunde natriumhidroksied geneutraliseer en 'n addisionele 5 ml 1 N natriumhidroksied is bygevoeg. Die oplossing is vir 4 uur by kamertemperatuur geroer totdat hidrolise van die estergroep, soos deur *dlc* aangetoon, volledig was. Die reaksiemengsel is hierna afgekoel na 0°C en di-*t*-butiëldikarbonaat (1.4 g) in dioksaan (3 ml) is bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 24 uur by DoC geroer en met 3 N waterstofchloried na pH 2 aangesuur. Die gepresipiteerde materiaal (1.64 g) is afgefiltreer en gedroog. Kristallasie uit metanol-eter het suiwer *N-t-Boc-R/S*-(Gln)Thz (129b, 1.36 g, 83%) gelewer. Smp. 124-126°C; ¹H-k.m.r. (DMSO-*d*₆) δ 1.52 (9H, s, (CH₃)₃C), 4.77 (1H, m, CH-NH), 8.25 (1H, d, J = 7.5 Hz, CH-NH), 8.49 (1H, s, tiasoolproton); FAB (gliserolmatriks) *m/z* 330 (MH⁺).

Gevind: C 47.60, H 5.75, N 12.70, S 10.08. Bereken vir C₁₃H₁₉N₃O₅S: C 47.41, H 5.81, N 12.76, S 9.73.



N-Bensieloksikarboniel-*S*-2-amino-3-metiëlbütiramied (131)

N-ebz-*S*-valien (130, 10 g, 40 mmol) in droë tetrahidrofuraan (150 ml) is geroer en na -23°C afgekoel. *N*-metiëlmorfolien (4.4 ml, 40 mmol) en isobutiëlkloorformiaat (5.2 ml, 40 mmol) is bygevoeg. 'n Wit presipitaat het onmiddellik gevorm. Die mengsel is vir 25 minute by -23°C geroer. Droë NH_{3(gas)} is vir 30 minute by -23°C deur die mengsel geborrel. Die reaksiemengsel is toegelaat om tot kamertemperatuur op te warm en die wit presipitaat afgefiltreer. Die vaste stof is met water (200 ml) en dichloormetaan (100 ml) gewas. Dit is uit etanol geherkristalliseer om die amied (131) as fyn naalde (6.8 g, 68%) te lewer. Smp. 218-219°C; [α]_D²⁵ -21.2° (c 5, dimetiëlfornamied); ¹H-k.m.r. δ 0.82 (3H, d, J = 7 Hz) en 0.91 (3H, d, J = 7 Hz) (CH₃)₂CH, 3.87 *nn*, dd, J = 7 en J = 9 Hz, CH-NH), 5.09 (2H, s, PhCH₂), 7.15 (1H, d, J = 9 Hz, NH-eH); *m/z* 250 (M⁺).

Gevind: C 62.26, H 7.30, N 11.08. Bereken vir C₁₃H₁₅N₂O₃: C 62.38, H 7.25, N 11.19.

N-Bensieloksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutironitriël (132)

Die amied (131, 5 g, 20 mmol) is in 'n mengsel van dimetielformamied (30 ml) en dimetoksietaan (20 ml) by OOC gesuspendeer. Die grootste gedeelte van die materiaal het nie opgelos nie. By hierdie geroerde suspensie (teen vog beskerm met 'n kalsium-chlorieddroogbuis) is tioniëlchloried (3 ml, 33 mmol) oor 'n tydperk van 1 minuut gevoeg. Die interne temperatuur het tot 20°C gestyg oor 'n periode van 3 minute. Die ysbad is verwyder en die reaksiemengsel, wat stadig donkerbruin geword het, is vir 2 uur by karnertemperatuur gelaat. Die reaksiemengsel is op fyn ys (200 g) en natriumbikarbonaat (50 g) gegooi en die mengsel met etiel asetaat (300 ml) geëkstraheer. Die organiese fase is met water (2x300 ml) gewas, gedroog (anhydriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp. Die oranje olie wat verkry is, is oor silika (200 g) gechromatografeer met heksaarr-etiel asetaat (1:1) as elueermiddel om die nitriël (132, 3.3 g, 72%) te lewer. Na kristallisatie uit eter-heksaan het dit smp. 55-56°C gehad. $[\alpha]_D^{25} -35.4^\circ$ (c 11.5, dimetielformamied); ¹H-k.m.r. δ 1.07 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃CH), 1.10 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃CH), 2.10 (1H, m, (CH₃)₂CH), 4.5.5 $\eta\eta$, dd, J = 7 en J = 9 Hz, CH-NH), 5.21 (2H, s, C₆H₅-CH₂-); m/z 232 (M⁺). Gevind: C 57.13, H 6.86, N 12.18. Bereken vir C₁₃H₁₆N₂O₂: C 62.22, H 6.94, N 12.04.

N-Bensieloksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutirotioamied (133)

Droë etanol (50 ml) is eers met ammoniak(gas) by OoC en daarna met waterstofsulfied(gas) by OoC versadig. Kristalle van ammoniumwaterstofsulfied (NH₄HS) het gevorm. By die geroerde oplossing is die nitriël (132, 4.5 g, 19 mmol) in dimetoksietaan (15 ml) gevoeg. Die mengsel is toegelaat om tot karnertemperatuur op te warm. Na 3 uur is die mengsel met water (20 ml) verdun en met etiel asetaat (200 ml) geëkstraheer. Die organiese fase is met water (100 ml) gewas en gedroog (anhydriese natriumsulfaat). Die oplosmiddel is *in vacuo* afgedamp om 'n bruin olie (5.5 g) te lewer, wat op silika (200 g) in etiel asetaat-heksaan (1:3) gechromatografeer is om die tioamied (133, 4.65 g, 92%) te lewer. Smp. 112-113°C (uit eter-heksaan); $[\alpha]_D^{25} +10.0^\circ$ (c 10.5, dimetielformamied); ¹H-k.m.r. δ 0.98 (6H, d, 2x, J = 7 Hz, (CH₃)₂CH-), 2.10 $\eta\eta$, m,

(CH_3) $_2$ CH-), 4.36 (IH, dd, $J = 7$ en $J = 9$ Hz, CII-NII), 5.13 (2H, s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -), 5.80 (IH, d, $J = 9$ Hz, CH-NH), 8.30 (IH, br s) en 8.65 (HI, br s) (CSNH_2); m/z 266 (M+).

Gevind: C 58.41, H 6.57, N 10.32, S 11.72. Bereken vir C₁₃H₁₅N₂O₂S : C 58.62, H 6.81, N 10.51, S 12.04.

Etiel RIS-2-(N-bensieloksikarboniel-1'-amino-2'-metielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur (134)

Die tioamied (133, 710 mg, 2.67 mmol) is opgelos in droe dimetielformamied (7 ml). Etiel broompiruvaat (0.4 ml, 3 mmol) is bygevoeg. Na 1.5 uur by kamertemperatuur is die reaksiemengsel met etiel asetaat (40 ml) verdun en met water (25 ml), waterige 5% natriumbikarbonaat (50 ml) en water (50 ml) gewas, Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en *in vacuo* drooggedamp om 'n geel olie te lewer wat op silika (50 g) in etiel asetaat-heksaan (1:3) gechromatografeer is om die *R/S*-tiasool (134, 905 mg, 93%) te lewer. Smp. 85-87°C (uit etcr-hrksaan); ν_{maks} 3410, 3300, 1715 en 1695 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 0.93 (3II, d, $J = 7$ Hz, $\text{C}_{\text{TI}}\text{CH}_3$), 0.95 (3H, d, $J = 7$ Hz, CH_3CH -), 1.42 (3H, t, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2), 2.45 (III, m, (CH_3) $_2$ CH-), 4.45 (2H, k, $J = 7$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O}$) 5.02 uN, dd, $J = 6$ en $J = 9$ Hz, CH-NH), 5.20 (2H, s, $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2$ -), 5.65 (IH, d, $J = 9$ Hz, CH-NH), 8.17 (III, s, tiasoolproton); FAB (in gliserolmatriks) m/z 363 (MH+).

Gevind: C 59.48, H 6.03, N 7.54, S 8.60. Bereken vir C₁₈H₂₂N₂O₄S : C 59.65, H 6.12, N 7.72, S 8.85.

R/S-2-(1'-amino-2'-metielpropiel)tiasool-4-karhoksj('lsumhidroehloried (135)

Die tiasoolester (134, 950 mg) in dimetoksietaan (10 ml) en gekonsentreerde soutsuur (10 ml) is in 'n argonatmosfeer vir 6 uur onder terugvloei verhit. Die reaksiemengsel is afgekoel en met eter (3x20 ml) geekstraheer, Die waterige fase is drooggedamp en die residu uit etanol-eter gekristalliseer om *R/S*-(Val)Thz.HCl (135, 566 mg, 85%) te lewer. Smp. 268-270°C (ontbinding) (Lit.^{4g} smp. 269-272°C); λ_{maks} 235 nm ((5850

in water); FAB (in gliserolmatriks) m/z 200 (vry basis + $n+$).

Etiel *R/S*-2-(N-benskarboniel-1'-amino-2'-metielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur
S-2-Bensamido-3-metielbutirotioamied (200 mg, $[\alpha]_D^{24} +83.0^\circ$ (c 1, etanol)), wat volgens die metode van Dean *et al.*^{4g} berei is, is vir 30 minute onder terugvloei verhit met etiel broompiruvaat (175 mg) in etanol (4 ml). Die oplosmiddel is *in vacuo* verwyder en die residu (255 mg) in chloroform (20 ml) opgelos. Die organiese fase is met waterige natriumbikarbonaat (2x10 ml) en water (20 ml) gewas. Die chloroform is afgedamp en die residu op silika (3 g) gechromatografeer. Eluering met etiel asetaat-heksaan (1:3) het N-benskarboniel-*R/s*-(Val)Thz-DEt (206 rug) gelewer. Na kristallisatie uit waterige etanol was die smp. 120-121°C (Lit.^{4g} smp. 119-120°C); $[\alpha]_D^{25} -0.9^\circ$ (c 3, etanol), (Lit.^{4g} $[\alpha]_D^{24} -3.7^\circ$ (c 2.5, 95% etanol)); 1H k.m.r. δ 0.95 (6H, d, 2x, $J = 7$ Hz, (CH₃)₂CH), 5.08 (1H, dd, $J = 6$ en $J = 9$ Hz, CH-NH), 6.80 (1H, d, $J = 9$ Hz, CH-NH), 8.19 (s, 1H, tiasoolproton); m/z 332 (M+).

Die bogenoemde reaksie is ook in deuterometanol uitgevoer. Die produk het smp. 118-120°C, m/z 332 en 333 (ca. 1:9 M+ en (M-H+D)+) gehad. Die 1H-k.m.r. spektrum (CDCl₃) van die verbinding was identies aan dié wat hierbo beskryf is, behalwe dat die intensiteit van die singulet by δ 5.02 met moer as 80% afgeneem het en die doeblet by δ 6.80 hoofsaaklik deur 'n singulet vervang is.

5.5 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.6

Penta-D-pivaloieel-B-D-galaktose (136)

Fyngemaalde en watervrye D-galaktose (13.52 g, 75.0 mmol) is gesuspendeer in droe piridien (150 ml). Die suspensie is verhit na 75°C en pivaloieelchloried (83.1 ml, 675.4 mmol) is drupsgewys oor 'n tydperk van 30 minute bygevoeg. Die volledige oplossing van D-galaktose na 10 minute het met die gliktydige vorming van piridiniumchloriedsoute gepaard gegaan. Na in reaksietyd van 2 dae by 75°C is die

reaksiemengsel na kamertemperatuur laat afkoel, en die oplosmiddel verwyder onder verminderde druk. Die residu is met eter (3x1.50 ml) deurgeroer en gefiltreer. Die gekombineerde filtrate is met 2 N swaelsuur (1x100 ml), versadigde waterige natriumbikarbonaat (5x100 ml) en water (1x100 ml) geekstraheer. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp. Die residu is uit absolute etanol by OoC gekristalliseer om 32.46 g (72%) van die penta-Oe-pivaloielderivaat (136) te gee. Smp. 120°C; $[\alpha]_D^{25} +12.41^\circ$ (c 2.0, chloroform); ν_{maks} 1738 (C=O), 1143 (C-o-e) en 1079 (C-Q-C) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 1.08 (ISH, s, 2x, $\underline{\text{C}(\text{CR}_3)_3}$), 1.13 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.16 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.25 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 3.95 (1R, dd, $J_{6a,6b} = 8.2$ en $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-6b), 4.07 (IH, dd, $J_{5,6a} = 5.8$ en $J_{5,6b} = 5.4$ Hz, H-5), 4.14 (IH, dd, $J_{6a,6b} = 8.2$ en $J_{5,6a} = 5.8$ Hz, H-6a), 5.14 (IH, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3), 5.33 (IH, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-2), 5.40 (IH, d, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-4), 5.69 (IH, d, $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1)j ^{13}C -k.m.r. δ 27.05 (k, .5x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 38.73 (s, 4x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 39.06 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 60.65 (t, C-6), 66.43 (d), 67.65 (d), 71.02 (d) en 71.73 (d) (C-2 - C-5), 92.09 (d, C-1), 176.46 (s, $\underline{\text{OC-Q}}$), 176.52 (s, $\underline{\text{OC-G}}$), 176.81 (s, $\underline{\text{OC-Q}}$), 177.14 (s, $\underline{\text{OC-Q}}$) en 177.76 (s, $\underline{\text{OC-Q}}$); m/z 543 (1, $\text{M}^+ - \text{C}(\text{CH}_3)_3$)j Analise bereken vir $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}$ U: C 61.98, H 8.72. Gevind: C 61.69, H 8.81.

2.3.4.6-Tetra-O-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielchJoried(142a)

Penta-Q-pivaloïel-,O-D-galaktose (136, 2.0 g, 3.33 mmol) is opgelos in ysasynsuur (20 ml), waarna 'n kontinue stroom waterstofchloried (gas) vir 7 uur by kamertemperatuur deur die mengsel geborrel is. Die vlugtige komponente is versigtig verwyder *in vacuo*. Die residu is opgelos in eter (30 ml) en met versadigde waterige natriumbikarbonaat (3x30 ml) en water (1x30 ml) geekstraheer. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Die residuele stroop is gekristalliseer uit heksaan hy DoC om die suiwer chloorderivaat (142a) in 'n opbrengs van 68% (1.21 g) te lewer. Smp. 101-102°C; $[\alpha]_D^{23} +113.9^\circ$ (c 12.9, chloroform); ν_{maks} 1736 (C=O), 1156 (C-Q-e) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 1.12 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.17 (18H, s, 2x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.25 (9R, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 4.04 $\underline{\text{un}}$, dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6b} = 6.8$ Hz, H-6b), 4.12 (IH, dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6a} = 6.8$ Hz, H-6a),

4.54 (IH, dd, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.8$ Hz, H-5), 5.19 (IH, dd, $3_{2,3} = 10.2$ en $J_{1,2} = 3.9$ Hz, H-2), 5.50 (IH, dd, $J_{2,3} = 10.2$ en $3_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3), 5.52 (IH, d, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4), 6.36 (IH, d, $J_{1,2} = 3.9$ Hz, **a-n**, ^{13}C -k.m.r. δ 26.90 (k, 4x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 38.61 (s, 3x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 38.94 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 60.48 (t, C-6), 66.66 (d), 67.10 (d), 67.85 (d) en 69.66 (d) (C-2 - C-5), 91.29 (d, C-1), 176.49 (s, $\underline{\text{OC-O}}$), 176.80 (s, $\underline{\text{OC-o}}$), 177.32 (s, $\underline{\text{OC-O}}$) en 177.57 (s, $\underline{\text{OC-o}}$); m/z 536 (0.3, M+ met 37Ce), 534 (1, M+ met 35Cf); Analise bereken vir *C26H43O9Cl*: C 58.36, H 8.10, Cl 6.63. Gevind: C 58.41, H 8.05, Cl 6.73.

2.3.4.6-Tetra-o-pivaloïel-a-D-galaktopiranosielbromied (142b)

By 'n meganies geroerde oplossing van penta-Q-pivaloïel-/3-D-galaktose (136, 1.0 g, 1.66 mmol) in anhidriese dichloormetaan (1.5 ml) by 0°C is 'n oplossing van 45% waterstofbromied in ysasynsuur (1.5 ml) drupsgewys gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 24 uur by kamertemperatuur geroer, waarna anhidriese toluen (10 ml) bygevoeg is en die vlugtige komponente *in vacuo* verwyder is. Die prosedure is herhaal met toluen (10 ml) en eter (10 ml). Die residuele vaste stof is opgeios in eter (10 ml) en geëkstraheer met waterige versadigde natriumwaterstofkarbonaat (3x10 ml) en water [1x10 ml]. Die organiese fase is gedroog met anhidriese natriumsulfaat, gefiltreer deur selliet en die filtraat ingedamp onder verminderde druk. Die residuele stroop is gekristalliseer nit warm heksaan om die suiwer broomderivaat (142b) in 'n opbrengs van 85.5% (0.825 g) te lewer. Smp. 114-116°C; $[\alpha]_D^{20} +19.7^\circ$ (c 16.5, chloroform); ν_{maks} 1737 (C=O), 1137 (C-o-e) cm⁻¹; ^{13}C -k.m.r. δ 1.11 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.19 (1H, s, 2x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.24 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 4.04 (IH, del, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6b} = 6.9$ Hz, H-6b), 4.13 (IH, dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6a} = 6.9$ Hz, H-6a), 4.50 (IH, dd, $J_{5,6a} \simeq J_{5,6b} \simeq 6.9$ Hz, H-5), 5.01 (IH, dd, $J_{2,3} = 10.0$ en $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-2), 5.48 (IH, dd, $J_{2,3} = 10.0$ en $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-3), 5.52 (IH, d, $J_{3,4} = 3.4$ Hz, H-4), 6.68 (IH, d, $J_{1,2} = 4.0$ Hz, H-1); ^{13}C -k.m.r. δ 27.05 (k, 4x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 38.01 (s, 3x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 39.06 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 60.51 (t, C-6), 66.60(d), 67.83(d), 68.10(d) en 71.55(d) (C-2 - C-5), 88.38 (d, C-1), 176.52 (s, $\underline{\text{OC-o}}$), 176.81 (s, $\underline{\text{OC-O}}$), 177.14 (s, $\underline{\text{OC-O}}$), 177.76

(s, OC-Q); m/z 580 (1, M+ met 81Br), 578 (1, M+ met 79Br); Analise bereken vir C₂₆H₄₃O₉Br₁: C 53.89, H 7.48, Br 13.79. Gevind: C 53.82, H 7.39, Br 13.80.

Die bereiding van 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielasiC'd (137) vanaf 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielchloried (I42a)

'n Oplossing van 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielchloried (I42a), 2.02 g, 3.78 mmol) in droë dronkformamied (5 ml) is oor 'n tydperk van 30 minute drupsgewys by 'n suspensie van natriumasied (1.30 g, 20.0 mmol) in dimetielformamied (15 ml) by 120°C gevoeg. Na 'n reaksie tyd van 2 uur by 120°C het substitusie volledig plaasgevind, waarna die reaksie mengsel na kamertemperatuur laat afkoel is. Die mengsel is gefiltreer deur selliet en die filtraat gekonsentreer *in vacuo*. Die residuele stroop is op silika gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 5:1), en daaropvolgende kristallisering van die suiwer produk ($R_f = 0.58$, heksaan:etiel asetaat 4:1) uit heksaan het 1.86 g (91%) van die asied (137) gelewer. Smp. 88-89°C; $[\alpha]_D^{22} -14.3^\circ$ (c 5.7, chloroform); ν_{maks} 2121 (-N₃), 1737 (C=O), 1140 (C-O-e) cm⁻¹; ¹H-k.m.r. (500 MHz) δ 1.07 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.14 (18H, s, 2x, C(CH₃)₃), 1.23 (9H, s, C(CH₃)₃), 4.00 (1H, dd, J_{5,6b} = 10.1 en J_{6a,6b} = 6.9 Hz, H-6b), 4.04 (1H, dd, J_{6a,6b} = 6.9 en J_{5,6a} = 5.9 Hz, H-6a), 4.15 (1H, dd, J_{5,6b} = 10.1 en J_{5,6a} = 5.9 Hz, H-5), 4.59 (1H, d, J_{1,2} = 8.6 Hz, H-1), 5.08 (1H, dd, J_{2,3} = 10.4 en J_{3,4} = 3.0 Hz, H-3), 5.16 (1H, dd, J_{2,3} = 10.4 en J_{1,2} = 8.6 Hz, H-2), 5.39 (1H, d, J_{3,4} = 3.0 Hz, H-4); ¹³C-k.m.r. δ 27.10 (k, 4x, C(CH₃)₃), 38.72 (s, C(CH₃)₃), 38.76 (s, C(CH₃)₃), 38.82 (s, C(CH₃)₃), 39.09 (s, C(CH₃)₃), 60.92 (t, C-O), 66.49(d), 67.92(d), 70.1(d) en 13.05(d) (C-2 - C-5), 88.51 (d, C-1), 176.70 (s, 2x, OC-O), 177.18 (s, OC-O), 177.82 (s, OC-Q); m/z 542 (1, M+); Analise bereken vir C₂₆H₄₃N₃O₉: C 57.66, H 8.00, N 7.76. Gevind: C 57.56, H 7.95, N 7.81.

2,3,4,6-Tetra-O-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielbromied (142b) is op soortgelyke wyse as bogenoemde, na die asledderivaat (137) omgesit. Hierdie produk is deur analise as identies aan bogenoemde bewys.

Die bereiding van 2,3,4,6-tetra-Q-pivaloïel-8=D-galaktopiranosielasied (137) vanaf penta O-pivaloïel-β-D-galaktose (136)

Titaantetrachloried (1.4 ml, 11.82 mmol) en trimetiëlsilieliasied (1.6 ml, 11.82 mmol) is drupsgewys by 'n oplossing van penta-Q-pivaloïel-,LJ-D-galaktose (136, 7.10 g, 11.82 mmol), afgekoel na -70°C , gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 4.5 uur onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer. Die mengsel is laat opwarm na 0°C , verdun met water (70 ml) en geekstraheer met dichloormetaan (3x100 ml). Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en onder vakuurn afgedamp. Die residu is gechromatografeer op SiO_2 (heksaan:etiel asetaat 5:1) om die suiwer produk (137) as 'n olie te gee. Kristallasie nit heksaan en droging van die kristalle *in vacuo* het 5.69 g (90%) 2,3,4,6-tetra-o-pivaloïel-,LJ-D-galaktopiranosielasied (137) gelewer. Hierdie produk is deur analise as identies aan bogenoemde produkte, wat berei is vanaf die 1-halogeengesubstitueerde derivate (142a en 142b), bewys.



2,3,4,6-Tetra-Q-pivaloïel-B-D-galaktopiranosielami<n (138)

'n Oplossing van 2,3,4,6-tetra-Q-pivaloïel-,LJ-D-galaktopiranosielasied (137, 4.58 g, 8.45 mmol) in anhidriese etiel asetaat (20 ml) is met 207 mg platnumdioksied (monohidraat) vir 2 uur by kamertemperatuur gehidrogeneer onder 100 kPa H_2 druk. Die mengsel is deur selliet filtreer, gewas met etiel asetaat (50 ml) en die filtraat ingedamp. Die homogene produk (138) is in 74% (3.22 g) opbrengs as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.31$, heksaan:etiel asetaat 4:1) verkry na chromatografie op SiO_2 met heksaan-etiel asetaat (4:1). $[\alpha]_D^{19} +9.2^{\circ}$ (c 9.8, chloroform); ν_{rnaks} 3431 en 3350 ($-\text{NH}_2$, doeplet), 1731 (C=O), 1149 (C-o-C) em-I; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 1.04 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.09 (ISH, 5, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.18 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.86 (2H, br m, $-\text{NH}_2$), 3.90 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 13.5$ en $J_{5,6b} = 9.2$ Hz, H-6b), 3.92 (1H, dd, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 9.2$ Hz, H-5), 4.04 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 13.5$ en $J_{5,6a} = 9.2$ Hz, H-6a), 4.11 (1H, d, $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-1), 4.95 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{1,2} = 8.7$ Hz, H-2), 5.09 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3), 5.34 (1H, d, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4); $^{13}\text{C-k.m.r.}$ δ 27.10 (k, 4x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$),

38.70 (s, 3x, $\underline{C(CH_3)_3}$), 39.03 (s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 61.21 (t, C-6), 67.06(d), 69.76(d), 71.21 (d) en 71.54(d) (C-2 - C-5), 85.41(d, C-1), 176.85 (s, $\underline{OC-o}$), 177.00 (s, $\underline{OC-o}$), 177.75 ($\underline{OC-o}$, s), 177.85 ($\underline{OC-o}$, s); m/z 516 (1, M+); Analise bereken vir C₂₆H₄₅N₁₀₉: C 60.56, H 8.80, N 2.72. Gevind: C 60.67, H 8.74, N 2.71.

Die bereiding van N-{3'-metielbutilideen)-2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielamien (143) vanaf 2,3,4,6-tetra-o-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielamien

By 'n heterogene mengsel van 2,3,4,6-tetra-o-pivaloïel-,B-D-galaktopiranosielamien (138, 700 mg, 1.36 mmol) en anhidriese natriumsulfaat (2 g) in droe hekseen (2 ml) is ysasynsuur (0.05 ml van 'n voorafbereide ysasynsuur (1 ml) oplossing in hekseen (2 ml, 0.27 mmol)) en isovaleraldehyd (0.15 ml, 1.36 mmol) gevoeg. Na 'n reaksietyd van 30 sekondes is die mengsel verdun met droe eter (20 ml) en gefiltreer deur selliet. Die filtraat is onmiddellik ingedamp onder verminderde druk by kamertemperatuur om die Schiff-basis (143) bevattende residu as 'n kleurlose stroop te lewer. Infrarooi-spektroskopie van die produk in chloroform het die afwesigheid van die -NH₂ absorpsiebande by 3431 en 3350 cm⁻¹ en die teenwoordigheid van die sterk C=N absorpsieband by 1670 cm⁻¹ vertoon. Die Schiff-basis (143) is onmiddellik vir die volgende reaksie gebruik.

Die bereiding van N-{3'-metielbutilideen)-2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielamien (153) en N-{3'-metielbutilideen)-2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielamien (143) vanaf 2,3,4,6-tetra-O-pivaloïel-8-D-galaktopiranosielamien (137)

2,3,4,6-Tetra-O-pivaloïel-,B-D-galaktopiranosielamien (137, 510 mg, 0.94 mmol) is opgelos in anhidriese tetrahydrofuraan (2 ml), waarna trifenielfosfen (247 mg, 0.94 mmol) bygevoeg is. Vorming van die β-aminofosforaan-tussenproduk (155), wat met hewige vrystelling van N_{2(gas)} gepaard gaan het, het na 'n reaksietyd van 30 minute by kamertemperatuur volledig plaasgevind. Die tussenproduk (155) is normaalweg nie

geïsoleer nie, maar 'n analitiese monster is wel verkry deur die mengsel *in vacuo* droog te damp en die residu te chromatografeer op silika (heksaan:etiel asetaat:triëtielamien 100:15:2). ¹H-k.m.r. δ 1.02 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.06 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CR}_3)_3}$), 1.08 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CR}_3)_3}$), 1.26 (9R, s, $\underline{\text{C}(\text{CR}_3)_3}$), 3.72 (1H, dd, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 7.2$ Hz, R-5), 3.91 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.5$ en $J_{5,6b} = 7.2$ Hz, H-6b), 3.97 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.5$ en $J_{5,6a} = 7.2$ Hz, H-6a), 4.33 (1H, dd, $J_{1,p} = 18.8$ en $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-1), 5.00 (1R, dd, $J_{2,3} = 10.4$ en $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-3), 5.33 (1R, d, $J_{3,4} = 3.5$ Hz, H-4), 5.43 (1R, dd, $J_{2,3} = 10.4$ en $J_{1,2} = 8.2$ Hz, H-2), 7.25-7.75 (15H, m, $\underline{\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3}$).

Isovaleraldehid (0.1 ml, 0.94 mmol) is by die β -iminofosfooraanbevattende reaksiemengsel gevoeg. Die mengsel is vir 4 dae by kamertemperatuur onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer. Die vlugtige komponente is verwyder *in vacuo* om 'n mengsel van die α - en β -Schiff-basisse (153 en 143 onderskeidelik) as 'n kleurlose residuele stroop te lewer. Infrarooi-spektroskopie van die ru-produk in chloroform het die afwesigheid van die $-\text{N}_3$ absorpsieband by 2121 cm^{-1} en die teenwoordigheid van die sterk $\text{C}=\text{N}$ absorpsieband by 1670 cm^{-1} vertoon. Die ru-produk is onmiddellik en sonder enige suiwing vir die volgende reaksie gebruik.

2.3:4.5-Di-o-isopropilideen-1-o-rnesiel-B-D-fruktopiranose (158)

'n Oplossing van 2,3;4,5-di-o-isopropilideen-,8-D-fruktopiranose¹⁷⁴ (157, 5 g, 19.1 mmol) in droë piridien (15 ml) is afgekoel na 0°C en mesiehloriesied (1.6 ml, 21.0 mmol), opgelos in piridien (4 ml), is oor 'n tydperk van 20 minute drupsgewys bygevoeg. Die reaksiemengsel is oornag by kamertemperatuur meganies geroer. Alhoewel die produk wat vorm dieselfde R_f waarde het as die uitgangsmateriaal wat *dte* aanbetref ($R_f = 0.26$, heksaan:etiel asetaat 7:3), is daar 'n kleurverandering van swart na mosterd-bruin (ehroomsuur as sproei-indikator en verhitting). Die mengsel is ingedamp onder verminderde druk en die residu tussen etiel asetaat (100 ml) en water (2x50 ml) verdeel. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en afgedamp onder verminderde druk. Die residu is gechromatografeer (hek-

saan:etiel asetaat 7:3) om, na kristallasie van die suiwer produk uit heksaan-etiel asetaat, 5.91 g (95.8%) 2,3;4,5-di-o-isopropilideen-1-o-mesiel-, β -D-fruktopiranose (158) te lewer. Smp. 118°C; $[\alpha]_D^{21} -201.4^\circ$ (c 1.6, chloroform); ν_{maks} 2296 (C-H), 1178 (C-o-e) cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 1.30 (3H, s, C-CH_3), 1.38 (3R, s, C-CH_3), 1.44 (3H, s, C-eH_3), 1.51 (3H, s, C-eH_3), 3.02 (3H, s, OSO-eH_3), 3.72 (1H, d, $J_{6a,6b} = 12.9$ Hz, H-6b), 3.87 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 12.9$ en $J_{5,6a} = 1.7$ Hz, H-6a), 4.17 (1H, d, $J_{1a,1b} = 11.0$ Hz, H-1b), 4.20 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{5,6a} = 1.7$ Hz, H-5), 4.27 (1H, d, $J_{1a,1b} = 11.0$ Hz, H-1a), 4.27 (nr, d, $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-3), 5.58 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{3,4} = 2.7$ Hz, H-4); ^{13}C -k.m.r. δ 23.92 (k, C-eH_3), 25.15 (k, C-CH_3), 25.80 (k, C-CH_3), 26.45 (k, C-CH_3), 37.48 (k, OSO-CH_3), 61.34 (t, C-6), 69.63 (t, C-1), 69.77(d), 70.21(d) en 70.49(d) (C-3 - C-5), 100.61 (s, C-2), 114.81 (s, 2x, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); m/z 323 (100 MH^+); Analise bereken vir $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{O}_7\text{S}_1$: C 48.44, H 6.88, S 9.95. Gevind: C 48.39, H 6.91, S 9.91.

1-Asido-2,3:4,5--di-O-isopropilideen-8=D-fruktopiranose (159)

By 'n suspensie van natriumasied (2.76 g, 42.4 mmol) in anhidriese dimetielformamied (20 ml) by 120°C is 'n oplossing van 2,3;4,5-di-O-isopropilideen-1-O-mesiel- β -D-fruktopiranose (158, 5.46 g, 16.9 mmol) in dimetielformamied (10 ml) oar 'n tydperk van 30 minute bygedrup. Na 'n reaksietyd van 24 uur by 120°C is die reaksiemengsel afgekoel tot by kamertemperatuur, gefiltreer deur selliet en die filtraat gekonsentreer *in vacuo*. Die residuele stroop is op silika gechromatografeer met heksaan:etiel asetaat (4:1) as elueermiddel. Die suiwer asiedderivaat (159) is in 'n opbrengs van 74% (3.58 g) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.51$, heksaan:etiel asetaat 7:3) verkry. $[\alpha]_D^{21} -94.6^\circ$ (c 1.6, chloroform); ν_{maks} 2111 ($-\text{N}_3$), 1178 (C-o-e) cm^{-1} ; ^1R -k.m.r. δ 1.33 (3R, s, C-CH_3), 1.46 (3H, s, C-CH_3), 1.48 (3R, s, C-CH_3), 1.55 (3R, s, C-CH_3), 3.25 (1H, d, $J_{1a,1b} = 13.0$ Hz, H-1b), 3.58 (1H, d, $J_{1a,1b} = 13.0$ Hz, H-1a), 3.75 (1H, $J_{6a,6b} = 13.0$ en $J_{5,6a} \approx 0.8$ Hz, H-6b), 3.91 (1R, dd, $J_{6a,6b} = 13.0$ en $J_{5,6a} = 1.7$ Hz, H-6a), 4.22 (1H, ddd, $J_{4,5} = 7.5$, $J_{3,6a} = 1.7$ en $J_{5,6b} \approx 0.8$ Hz, H-5), 4.28 (1H, d, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-3), 4.59 (1H, dd, $J_{4,5} = 7.5$ en $J_{3,4} = 2.6$ Hz, H-4); ^{13}C -k.m.r. δ 23.97 (k,

$\underline{\text{C-eH}_3}$, 24.75 (k, $\underline{\text{C-eH}_3}$), 25.81 (k, $\underline{\text{C-eH}_3}$), 26.56 (k, $\underline{\text{C-eH}_3}$), 55.50 (t, C-1), 61.49 (t, C-6), 70.04(d) en 70.74(d,2x) (C-3 - C-5), 102.63 (s, C-2), 109.08 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_2}$), 109.17 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_2}$); m/z 270 (100, M+-15), 229 (94, M+-eH₂N₃); Analise bereken vir C₁₂H₁₉N₃O₅ : C 50.52, H 6.71, N 14.73. Gevind: C 50.59, H 6.65, N 14.79.

1'-R/S-N-(1'-nitriIo-3'-metielbutie1)-2,3:4,5-di-Q-isopropilideen-8-D-fruktopiranosielamien (162)

Trifenielfosfien (139 mg, 0.53 mmol) is by 'n meganies geroerde oplossing van l-asido-2,3:4,5-di-Q-isopropilideen-,8-D--fruktopiranosie (159, 151 mg, 0.53 mmol) in droe dimetoksietaan gevoeg. Na 'n reaksietyd van 30 minute, waartydens hewige vrystelling van N_{2(gas)} plaasgevind het, is isovalcraldehyd (0.06 ml, 0.53 mmol) bygevoeg en die mengsel is vir 'n verdere 18 uur by kamertemperatuur geroer. 'n Infrarooi-spektrum van 'n monster van die Schiff-basis (161) bevattende reaksiemengsel in chloroform het die mediumintensiteitabsorpsiehand van die C=N groep by 1670 cm⁻¹ vertoon. Die reaksiemengsel is direk en sonder enige suiwering gebruik vir die bereiding van die α -aminonitriël (162).

Die Schiff-basis (161) bevattende reaksiemengsel is afgekoel na -78°C (asetoon-droey) onder 'n inerte atmosfeer en trimetielsilielsianied (0.13 ml, 1.1 mmol) en watervrye tintetrachloried (0.12 ml, 1.1 mmol) is bygevoeg. Die mengsel is vir 10 uur by -78°C geroer. Fyngernaalde kaliumwaterstofkarbonaat (500 mg) is porsiegewys by die mengsel gevoeg, waarna die mengsel na -30°C laat opwarm en met water (15 ml) verdun is. Die waterige reaksiemengsel is geekstraheer met chloroform (3x30 ml). Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder vakuum. Chromatografie van die residuele stroop op silika (heksaan: etiel asetaat 4:1) het suiwer α -aminonitriël (162, 121 mg, 64.5%) as 'n kleurlose stroop (R_f = 0.27, heksaan:etiel asetaat 4:1) gelewer. Spektroskopiese analise (¹H- en ¹³C-k.m.r.) het aangetoon dat die produk (162) uit 'n mengsel van 2 diastereomere in 'n 3:2

verhouding (diastereomeer A:diastereomeer B) bestaan. Geen paging is aangewend om die diastereomere te skei nie. $[\alpha]_D^{22} -19.8^\circ$ (e 1.0, chloroform); ν_{maks} 3340 (N-H), 2220 (C \equiv N), 1060 (C-o-e) ern-I; $tn]_D^{22} 354$ (3, M $^+$), 171 (100, M $^{+}$ -eH $_2$ NHCH(CN)-CH $_2$ CH(CH $_3$) $_2$ -OC(CH $_3$) $_2$); MS(EI) : Akkurate massa m/z 354.2161 (1\|+, bereken 354.2155 vir C $_{15}$ H $_{30}$ N $_2$ O $_5$)'

Diastereomeer A: ^1H -k.m.r. δ 0.91 (3H, d, $J_{3,,4'} = 6.4$ Hz, CH $_3$ -4'), 0.95 (3H, d, $J_{3',1''} = 6.4$ Hz, CH $_3$ -1''), 1.33 (3H, s, C-CH $_3$), 1.37 (3H, s, C-CH $_3$), 1.47 (3H, s, C-CH $_3$), 1.51 (3H, s, C-CH $_3$), 1.61 (2H, dd, $J_{1',2'} = 7.8$ en $J_{2',3'} = 7.5$ Hz, H-2'a en H-2'b), 1.79-2.00 (1H, m, H-3'), 2.80 (1H, d, $J_{1a,1b} = 12.0$ Hz, H-1b), 3.24 (1H, d, $J_{1a,1b} = 12.0$ Hz, H-1a), 3.57 (1H, t, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, H-1'), 3.74 (1H, d, $J_{6a,6b} = 13.0$ Hz, a-eu; 3.86 un, dd, $J_{6a,6b} = 13.0$ en $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, H-6a), 4.21 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, H-5), 4.24 (1H, d, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-3), 4.57 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4); ^{13}C -k.m.r. δ 21.77 (k, CH $_3$ -4'), 22.62 (k, CH $_3$ -1''), 23.94 (k, C-CH $_3$), 24.91 (d, C-3'), 25.30 (k, C-CH $_3$), 25.85 (k, C-CH $_3$), 26.46 (k, C-CH $_3$), 41.71 (t, C-2'), 49.24 (d, C-1'), 52.94 (t, C-1), 61.20 (t, C-6), 70.11(d), 70.81(d) en 71.73(d) (C-3 - C-5), 102.61 (s, C-2), 108.26 (s, C(CH $_3$) $_2$), 108.96 (s, C(CH $_3$) $_2$), 120.10 (s, C \equiv N).

Diastereomeer B: ^1H -k.m.r. δ 0.92 (3H, d, $J_{3,,4'} = 6.4$ Hz, CH $_3$ -4'), 0.96 (3H, d, $J_{3,,1''} = 6.4$ Hz, CH $_3$ -1''), 1.33 (3H, s, C-CH $_3$), 1.38 (3H, s, C-CH $_3$), 1.48 (3H, s, C-CH $_3$), 1.51 (3H, s, C-CH $_3$), 1.65 (2H, dd, $J_{1',2'} = 7.8$ en $J_{2',3'} = 7.5$ Hz, H-2'a en H-2'b), 1.79-2.00 (1H, m, H-3'), 3.02 (1H, s, H-1a en H-1b), 3.73 (1H, t, $J_{1',2'} = 7.8$ Hz, H-1'), 3.75 un, d, $J_{6a,6b} = 13.0$ Hz, H-6b), 3.87 un, dd, $J_{6a,6b} = 13.0$ en $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, H-6a), 4.21 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{5,6a} = 1.9$ Hz, H-5), 4.26 (1H, d, $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-3), 4.80 (1H, dd, $J_{4,5} = 8.0$ en $J_{3,4} = 2.4$ Hz, H-4); ^{13}C -k.m.r. δ 21.86 (k, CH $_3$ -4'), 22.70 (k, CH $_3$ -1''), 23.99 (k, C-CH $_3$), 25.00 (d, C-3'), 25.30 (k, C-CH $_3$), 25.85 (k, C-CH $_3$), 26.46 (k, C-CH $_3$), 42.41 (t, C-2'), 49.32 (d, C-1'), 54.00 (t, C-1), 61.20 (t, C-6), 70.18(d), 70.81(d) en 71.73(d) (C-3 - C-5), 102.97 (s, C-2),

108.46 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_2$), 109.80 (s, $\underline{C}(\text{CH}_3)_2$), 120.40 (s, $\underline{C}\equiv\text{N}$).

2-Trimetielsilielbensotiasool (171)178

'n Oplossing van n-butiellitium (45.4 ml, 1.6 M) in heksaan is verdun met anhidriese tetrahydrofuraan (10 ml) en die oplossing is na -78°C (asetoon-droë ys) afgekoel onder 'n inerte atmosfeer. Bensotiasool (7.9 ml, 72.64 mmol) is verdun met tetrahydrofuraan (10 ml) en drupsgewys oor 'n tydperk van 20 minute by die meganies geroerde oplossing by -78°C gevoeg. Sorg is geneem dat die temperatuur van die mengsel nie hoër as -65°C styg nie. Trimetielsiëlchloried (9.7 ml, 72.64 mmol) is onmiddellik hierna by die mengsel gevoeg. Die reaksiemengsel is oor 'n tydperk van 5 uur na kamertemperatuur laat opwarm. Die mengsel is gekonsentreer onder verminderde druk, waarna heksaan (20 ml) bygevoeg is en die litiumchloriedsoute deur filtrasie (selliet) verwyder is. Die filtraat is gekonsentreer onder verminderde druk en gedistilleer om 10.85 g (72%) 2-trimetielsilielbensotiasool (171) te lewer. K.p. $146^\circ\text{C}/30\text{ mm}$; ^1H -k.m.r. δ 0.45 (gII, s, $\underline{\text{Si}}(\text{CH}_3)_3$), 7.20-8.20 (4H, m, aromatiese protone); m/z 207 (13, M+); MS(EI): Akkurate massa *titlz* 207.0521 (M+, bereken 207.0538 vir $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_1\text{Si}_1\text{Si}$)'

$\text{N}=\{\text{I}\}$ -Nitrilo-3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-D-pivaloieI-B-D-galaktopiranosiel-amien (174a)

Die Schiff-basis(143) bevattende reaksiemengsel, berei volgens die reeds genoemde eksperimentele prosedure vanaf 2,3,4,6-tetra-D-pivaloieI-B-D-galaktopiranosiel-amien (138, 700 mg, 1.36 mmol), is afgekoel na -78°C (asetoon-droë ys) onder 'n inerte atmosfeer en trimetielsiëlsianied (0.34 ml, 2.72 mmol) en watervrye tetrachloried (0.18 ml, 1.49 mmol) is bygevoeg. Na 'n reaksietyd van 10 uur by -78°C is fyngeernaalde kaliumwaterstofkarbonaat (400 mg) vorsigewys bygevoeg, waarna die mengsel na -30°C laat opwarm is. Die reaksiemengsel is met water (20 ml) verdun en met chloroform (3x50 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en onder verminderde druk ingedamp.

Chromatografie van die residu op silika (heksaan:etiel asetaat 5:1) en kristallisatie van die suiwer produk ($R_f = 0.42$, heksaan:etiel asetaat 100:15) uit heptaan het 612 mg (74%) kristallyne α -aminonitriël (174a) gelever. Met chromatografie is 84 mg (12%) 2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel-{J-D-galaktopiranosielamien (138) geïsoleer. Die analise van die α -aminonitriël (174a) is as volg: Smp. 154°C ; $[\alpha]_D^{20} +20.8^\circ$ (c 4.4, chloroform); ν_{maks} 3380 (N-H), 2254 (C \equiv N), 1735 (C=O), 1150 (C-o-e) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 0.89 (6H, 2x, d, $J_{3,4} = J_{3,1} = 6.5$ Hz, CH₃-4¹ en CH₃-1¹), 1.09 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.13 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.16 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.24 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.58 (2H, m, H-2'a en H-2'b), 1.83 (1H, m, H-3¹), 2.16 (1H, dd, $J_{1,NH} = 10.5$ en $J_{NH,1'} = 8.0$ Hz, NH), 3.58 (1H, dt, $J_{NH,1'} = J_{1,2} = 8.0$ Hz, H-1'), 4.02 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.1$ en $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-6b), 4.07 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.1$ en $J_{5,6a} = 7.8$ Hz, H-6a), 4.11 (1H, dd, $J_{5,6a} = 7.8$ en $J_{5,6b} = 6.0$ Hz, H-5), 4.17 (1H, dd, $J_{1,NH} = 10.5$ en $J_{1,2} = 8.8$ Hz), 5.00 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{1,2} = 8.8$ Hz, H-2), 5.16 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.3$ en $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-3), 5.40 (1H, d, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4); ¹³C-k.m.r. δ 21.89 (k, CH₃-4¹), 22.20 (k, CH₃-1¹), 24.41 (d, C-3'), 27.10 (k, 4x, C(CH₃)₃), 38.70 (s, 3x, C(CH₃)₃), 39.04 (s, C(CH₃)₃), 43.64 (t, C-2'), 46.16 (d, C-1'), 61.20 (t, C-6), 66.90(d), 68.38(d), 70.99(d) en 71.92(d) (C-2 - C-5), 88.92 (d, C-1), 120.66 (s, C \equiv N), 176.80 (8, OC-0), 177.00 (s, OC-o), 177.68 (s, OC-D), 177.80 (s, OC-o); m/z 610 (1, M⁺), 449 (16, M⁺-NHCH(CN)CH₂CH(CH₃)₂); Analise bereken vir C₃₂H₅₃N₂O₉: C 63.03, H 8.76, N 4.59. Gevind: C 63.11, H 8.67, N 4.61.

Die bereiding van 'n mengsel van N-(1'-nitriël-3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel- α -D-galaktopiranosielamien (174c) en N-(1'-nitriël-3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel- β -D-galaktopiranosielamien (174a) vanaf 2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel- β -D-galaktopiranosielasied (137)

In Mengsel van die α - en β -Schiff-basisse (153 en 143 onderskeidelik) is volgens die asa-Vittig-roete vanaf 2,3,4,6-tetra-0-pivaloïel-{J-D-galaktopiranosielasied (137, 510 mg, 0.94 mmol) berei (die eksperimentele prosedure is reeds bespreek). Die ru-produkte is onmiddellik en sonder enige suiwing vir die Strecker-reaksie gebruik.

Die Schiff-basisse bevattende mengsel in anhidriese tetrahidrofuraan (2 ml) is afgekoel na -75°C (asetoon-droë ys) onder 'n inerte atmosfeer. Trimetielsiliensianied (0.27 ml, 2.17 mmol) en watervrye tintetrachloried (0.26 ml, 2.17 mmol) is by die mengsel gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 10 uur by -75°C meganies geroer. Fyngemaalde kaliumwaterstofkarbonaat (700 mg) is porsiegewys bygevoeg, waarna die mengsel na -30°C laat opwarm is en met water (30 ml) verdun is. Die waterige reaksiemengsel is met chloroform (3x50 ml) geekatraheer. Die gekornbineerde chloroformfases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Chromatografie van die residuele stroop op silika (heksaan:etiel asetaat 10:1) het 235 mg (40.9%) N-(1'-nitril0--3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-G-pivaloel-a--D-galaktopiranosielamien (174c; $R_f = 0.49$, heksaan:etiel asetaat 100:15) en 201 mg (35%) N-(1'-nitril0--3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-G-pivaloel- β -D-galaktopiranosielamien (174a; $R_f = 0.42$, heksaan:etiel asetaat 100:15) gelewer. Die β -produk (174a) is reeds gekarakteriseer. Die ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-analise van die α -produk (174c) is as volg:

^1H -k.m.r. δ 0.91 (6H, d, 2x, $J_{3',1''} = J_{3',4'} = 6.5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}4'$ en $\text{CH}_3\text{-}1''$), 1.11 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.14 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.17 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.25 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.67 (2H, dd, $J_{1',2'} = J_{2',3'} = 8.2$ Hz, H-2'a en H-2'b), 1.89 (1H, d, $J_{\text{NH},1'} = 12.2$ Hz, NH-eH-eN), 1.92 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.68 (1H, lt , $J_{\text{NH},1'} = 12.2$ en $J_{1',2'} = 8.2$ Hz, H-1'), 3.94 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6b} = 6.9$ Hz, H-6b), 4.10 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 11.2$ en $J_{5,6a} = 6.9$ Hz, H-6a), 4.37 (1H, dd, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 6.9$ Hz, H-5), 5.00 (1H, d, $J_{3,4} = 4.6$ Hz, H-4), 5.31 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.8$ en $J_{1,2} = 3.2$ Hz, H-2), 5.43 (1H, d, $J_{1,2} = 3.2$ Hz, H-1), 5.45 (1H, dd, $J_{2,3} = 10.8$ en $J_{3,4} = 4.6$ Hz, H-3);

^{13}C -k.m.r. δ 22.08 (k, $\text{CH}_3\text{-}4'$), 22.13 (k, $\text{CH}_3\text{-}1''$), 24.90 (d, C-3'), 27.07 (k, 4x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.65 (8, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.73 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 38.79 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.06 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42.42 (t, C-2'), 44.95 (d, C-1'), 61.74 (t, C-6), 66.61 (d), 66.78 (d), 67.67 (d) en 67.73 (d) (C-2 - C-5), 82.34 (d, C-1), 119.73 (s, $\text{C}\equiv\text{N}$), 176.42 (s, OC-G), 176.88 (8, OC-Q), 177.41 (8, OC-G), 177.82 (s, OC-G); Analise bereken vir $\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{N}_{209}$: C 63.03, H 8.76, N 4.59. Gevind: C 62.95, H 8.66, N 4.65.

N-(1'-nitriilo-3'-metielbutiel)-N-trifluorasetiel-2,3,4,6-tetra-O-pivaloiel- β -D-galaktopiranosielamien (174b)

By 'n meganies geroerde oplossing van N-(1'-nitriilo-3'-metielbutiel)-2,3,4,6-tetra-O-pivaloiel- β -D-galaktopiranosielamien (174a, 240 mg, 0,39 mmol) in droe dichloormetaan (1 ml) by OoC is trifluorasynsuuranhidried (0.5 ml) drupsgewys gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 30 minute by OoC en vir 9 uur by kamertemperatuur geroer. Die vlugtige komponente van die mengsel is verwyder *in vacuo*. Suiwer N-trifluorasetaatderivaat (174b, 261 mg, 94%) is as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.48$, hekseen:etielasetaat 100:15) verkry deur chromatografie (hekseen:etielasetaat 10:1) van die residuele stroop. $[\alpha]_D^{18} +13.8^\circ$ (c 5.2, chloroform); ν_{maks} 30-10 (N-H), 2254 (C=N), 1741 (C=O), 1156 (C-Q-e) cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 0.98 (3H, d, $J_{3,4'} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}4'$), 0.99 (3H, d, $J_{3',1''} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}1''$), 1.11 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.14 (18H, s, 2x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.28 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40-1.80 (2H, m, H-2'a en H-2'b), 2.20-2.40 (1H, m, H-3'), 3.92 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 10.8$ en $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.15 [1H, dd, $J_{5,6a} = 7.5$ en $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-5), 4.26 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 10.8$ en $J_{5,6a} = 7.5$ Hz, H-6a), 4.36 (1H, dd, $J_{1,2'a} = 10.2$ en $J_{1,2'b} = 5.1$ Hz, H-1'), 5.12 (1H, d, $J_{1,2} = 9.9$ Hz, H-1), 5.16 (1H, dd, $J_{2,3} = 9.9$ en $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-3), 5.47 (1H, d, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-4), 5.56 (1H, dd, $J_{1,2} = J_{2,3} = 9.9$ Hz, H-2); ^{13}C -k.m.r. δ 21.90 (k, $\text{CH}_3\text{-}4'$), 23.51 (k, $\text{CH}_3\text{-}1''$), 25.94 (d, C-3'), 27.80 (k, 4x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.50 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.63 (t, C-2'), 39.88 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.14 (8, 2x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 44.99 (d, C-1'), 61.41 (t, C-6), 65.20 (d), 67.41 (d), 72.17 (d) en 75.15 (d) (C-2 - C-5), 85.3.5 (d, C-1), 117.41 (k, CF_3), 119.09 (s, $\text{C}\equiv\text{N}$), 157.91 (k, CO-eF_3), 177.08 (s, OC-Q), 177.28 (8, OC-Q), 177.93 (s, OC-Q), 178.44 (8, OC-Q); m/z 707 (1, MH^+); Analise bereken vir $\text{C}_{34}\text{H}_{52}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{F}_3$: C 57.86, H 7.43, F 8.08. Gevind C 57.97, H 7.39, F 8.11.

N-(1'-tioamido-3'-metielbutiel)-N-trifluorasetiel-2,3,4,6-tetra-O-pivaloiel- β -D-galaktopiranosielamien (171b)

Waterstofsulfied(gas) is vir 20 minute deur 'n mengsel van dimetielformamied (2 ml) en trietielamien (1 ml) by OoC geborrel, waartydens wit kristallyne trietielammonium-

waterstofsulfied gevorm het. 'n Oplossing van N-{1'-nitrilo-3'-metielbutiel)-N-tri-fluorasetiel-2,3,4,6-tetra-o-pivaloiel-,B-D-galaktopiranosielamien (174b, 202 mg, 0.29 mmol) in anhidriese dimetielformamied (1 ml) is by die triotielamrnoniumwaterstofsulfied gevoeg. Die kristallyne sulfledreagens het onmiddellik opgelos en die mengsel het 'n blou-groen kleur aangeneem. Die reaksiemengsel is vir 12 uur by kamertemperatuur meganies geroer. Die oplosmiddel is afgedamp *in vacuo*. Die residu is op silika gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 4:1) om die tioamied (177b) in In opbrengs van 84.5% (179 mg) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.36$, heksaan:etiel asetaat 4:1) te lewer. $[\alpha]_D^{21} +12.7^\circ$ (c 6.7, chloroform); ν_{maks} 3420 en 3403 (-NH₂, doeblet), 1737 (C=O), 1154 (C-o-e) em-I; 1H-k.m.r. δ 0.94 (3R, d, $J_{3',4'} = 5.7$ Hz, CH_{3-4'}), 0.97 (3H, d, $J_{3',1''} = 6.0$ Hz, CH_{3-1''}), 1.10 (9H, s, C(CH₃)₃)', 1.12 (9H, s, C(CH₃)₃)', 1.16 (9H, s, C(CH₃)₃)', 1.26 (9R, s, C(CH₃)₃)', 1.40-1.60 (2H, m, H-2'a en H-2'b), 1.80-2.10 (1H, m, H-3'), 3.95 uu, dd, $J_{6a,6b} = 10.1$ en $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-6b), 4.05 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 10.1$ en $J_{5,6a} = 7.3$ Hz, H-6a), 4.11 (1H, dd, $J_{5,6a} = 7.3$ en $J_{5,6b} = 5.5$ Hz, H-5), 4.45 (1H, d, $J_{1,2} = 9.8$ Hz, H-1), 4.99 (1H, dd, $J_{2,3} = 9.5$ en $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-3), 5.37 (1H, d, $J_{3,4} = 2.5$ Hz, H-4), 5.66 (1H, t, $J_{1',2'} = 7.3$ Hz, H-1'), 5.69 (1H, dd, $J_{1,2} = 9.8$ en $J_{2,3} = 9.5$ Hz, H-2), 8.45 en 8.69 (2H, br s, CS-NH₂); 13C-k.m.r. δ 21.78 (k, CH_{3-4'}), 24.29 (k, CH_{3-1''}), 24.72 (d, C-3'), 27.75 (k, 4x, C(CH₃)₃)', 39.60 (8, 2x, C(CH₃)₃)', 39.86 (s, 2x, C(CIL₃)₃)' 46.62 (t, C-2'), 61.00 (d, C-1'), 61.83 (t, C-6), 67.79 (d), 68.18 (d), 74.22 (d) en 74.66 (d) (C-2 - C-5), 92.46 (d, C-1), 121.00 (k, CF₃)' 159.00 (k, CO-GF₃)' 177.00 (s, OC-G), 177.61 (s, OC-o), 178.62 (8, OC-Q), 178.99 (s, OC-O), 204.60 (s, CS-NH₂); m/z 740 (2, M+); Analise bereken vir C₃₄H₅₄N₂O₁₀S₁F₃: C 55.20, H 7.36, F 7.70. Gevind: C 55.29, H 7.41, F 7.68.

N-[1'-(4''-etoksikarbonielti asolieI-2')]-3'-metielbltietiel-N-t.rifllloorasetiel-2.3.4.6-tetra-Q-pivaloiel-B--D-galaktopiranosielamien (178b)

By 'n hewig geroerde heterogene mengsel van N-{1'-tioamido-3'-metielbutiel)-N-tri-fluorasetiel-2,3,4,6-tetra-Q-pivaloiel-,B-D-galaktopiranosielamien (177b, 69 mg,

0.093 mmol) en fyngemaalde kaliumwaterstofkarbonaat (75 mg, 0.75 mmol) in anhidriese dimetoksietaan (1 ml) is etiel broompiruvaat (0.04 ml, 0.28 mmol) gevoeg. Na 'n reaksietyd van 1 minuut by kamertemperatuur is die liggeel reaksiemengsel na 0oC afgekoel en 'n voorafbereide mengsel van trifluoorasynsuuranhidried (0.05 ml, 0.37 mmol) en piridien (0.07 ml, 0.85 mmol) in anhidriese dimetoksietaan (0.5 ml) is bygevoeg. Die reaksiemengsel het rooi-bruin van klenr geword en dic het aangetoon dat tiasoolvorming byna onmiddellik volledig plaasgevind het. Die mengsel is opgewarm na kamertemperatuur en die vlugtige komponente is versigtig onder vakuum afgedamp. Die residu is gesuspendeer in chloroform (10 ml) en met water (2x5 ml) geekstraheer. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en afgedamp *in vacuo*. Chromatografie van die residu op silika met hekaan:etiel asetaat (4:1) as elueermiddel het die tiasooklerivaat (178b) in 'n opbrengs van 73.1% (57 mg) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.42$, heksaan:etiel asetaat 4:1) gelewer. $[\alpha]_D^{16} -32.7^\circ$ (c 2.9, chloroform); ν_{maks} 1735 (C=O), 1706 (C=O), 1154 (C-o-e) cm^{-1} ; IH-k.m.r. (500 MHz) δ 0.82 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.91 (3H, d, $J_{3,4'} = 6.5$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}4'$), 0.95 (3H, d, $J_{3,1''} = 6.6$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}1''$), 1.06 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.17 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.36 (3H, dd, $J_{2'''a,3'''} = J_{2'''b,3'''} = 7.2$ Hz, $\text{CH}_3\text{-}3'''$), 1.40 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.48 (1H, m, H-3'), 2.09 (2H, m, H-2'a en H-2'b), 4.09 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 10.0$ en $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-6b), 4.14 (1H, dd, $J_{5,6a} = 7.5$ en $J_{5,6b} = 5.0$ Hz, H-5), 4.19 (1H, dd, $J_{6a,6b} = 10.0$ en $J_{5,6a} = 7.5$ Hz, H-6a), 4.31 (1H, dk, $J_{2'''a,2'''b} = 10.8$ en $J_{2'''b,3'''} = 7.2$ Hz, H-2'''b), 4.40 (1H, dk, $J_{2'''a,2'''b} = 10.8$ en $J_{2'''a,3'''} = 7.2$ Hz, H-2'''a), 5.01 (1H, dd, $J_{2,3} = 9.8$ en $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-3), 5.19 (1H, d, $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-1), 5.36 (1H, dd, $J_{1',2'a} = J_{1',2'b} = 7.3$ Hz, H-1'), 5.43 (1H, d, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-4), 5.64 (1H, dd, $J_{2,3} = 9.8$ en $J_{1,2} = 9.0$ Hz, H-2), 8.04 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. δ 15.12 (k, $\text{CH}_3\text{-}3'''$), 23.14 (k, $\text{CH}_3\text{-}4'$), 23.29 (k, $\text{CH}_3\text{-}1''$), 25.72 (d, C-3'), 27.64 (k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.81 (k, 2x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 28.16 (k, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.19 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.53 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.56 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 39.98 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 42.41 (t, C-2'), 58.80 (d, C-1'), 61.75 (t, C-6), 62.01 (t, C-2'''), 66.70 (d), 67.43 (d), 73.56 (d) en 74.26 (d) (C-2 - C-5), 85.45 (d, C-1), 117.81 (k, CF_3), 129.99 (d, C-5'''), 147.03

(s, C-2'''), 159.00 (k, CO-GF₃), 162.21 (s, C-4'''), 167.99 (s, CO-QEt), 174.76 (s, OC-o), 177.80 (s, OC-o), 178.22 (s, OC-o), 178.60 (s, OC-o); m/z 836 (31, MH⁺); MS(EI): Akkurate massa m/z 835.3658 (M⁺, bereken 835.3662 vir C₃₉H₅₈N₂O₁₂S₁F₃)'

5.6 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.7

N TIPIESE PROSEDURE VIR DIE BEREIDING VAN N-BESKERMDE α -AMINOKARBOKSAMIEDE (201) VANAF N-BESKERMDE α -AMINOKARBOKSIELSURE (200)

N-t-Butoksikarboniel-5-feniellalanien (200a, 5.0 g, 18.85 mmol) is in anhidriese dimetoksietaan (40 ml) opgelos en afgekoel na -13°C (asetoon-droë ys).. By die meganies geroerde oplossing onder inerte atmosfeer is N-metiëlmorfolien (2.1 ml, 18.85 mmol) en isobutiëlkloorformiaat (2.5 ml, 18.85 ml) gevoeg. In dik wit presipitaat het onmiddellik gevorm. Na in reaksietyd van 15 minute is ammoniak(gas) vir 5 minute by -13°C en 15 minute by kamertemperatuur deur die reaksiemengsel geborrel. Water (30 ml) is by die mengsel gevoeg en die amied is met chloroform (3x5 ml) geëkstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en die filtraat onder verminderde druk ingedamp. Die wit residuele presipitaat is uit heksaan-etiëla setaat geherkristalliseer om 4.85 g (97.4%) *N-t-but*-oksikarboniel-5-2-amino-3-feniëpropionamied (201a) te lewer.

N-t-Butoksikarboniel-5-2-amino-3-feniëpropionamied (201a)

Smp. 148°C (Lit.¹¹² smp. 148°C); $[\alpha]_D^{21} +13.9^\circ$ (c 1.3, chloroform); ν_{maks} 3522 (NH₂), 3409 en 3360 (NH₂, doeblet), 3015 (aromatiese C-H), 1691 (C=O), 1164 (C-o-e) cm⁻¹; ¹H-k.m.r. δ 1.38 (9H, s, C(CH₃)₃), 3.05 (2H, d, J = 6.8 Hz, CH₂-C₆H₅), 4.38 (m, m, CH-NH), 5.12 (1H, d, J = 8.1 Hz, CH-NH), 5.68 (1H, br s) en 5.95 (1H, br s) (CO-NH₂), 7.19–7.34 (5H, m, CH₂-C₆H₅); ¹³C-k.m.r. δ 29.08 (k, 3x, C(CH₃)₃), 39.27 (t, CH₂-C₆H₅), 56.00 (d, CH-NH), 81.40 (s, C(CH₃)₃), 127.79 (d, CH van C₆H₅), 129.49 (d, 2x, CH van C₆H₅), 130.14 (d, 2x, CH van C₆H₅), 137.44 (s, C van C₆H₅), 156.15 (s, N-e-o), 174.62 (CO-NH₂); m/z 264 (2, M⁺); MS(EI):

Akkurate massa m/z 264.1491 (M^+ , bereken 264.1474 vir $C_{14}H_{20}N_2O_3$).

N-t-Butoksikarboniel-2S,3B-2-amino-3-metieloentanamied (201 b)

Opbrengs 94%; Smp. 166°C (Lit. 112 smp. 166°C); n_D^{20} 1.4300 (c 2.4, chloroform); ν_{max} 3526 (N-H), 3430 en 3410 (NH_2 , doeblet), 1688 (C=O), 1163 (C-o-e), em-I; 1H -k.m.r. δ 0.90 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, $\underline{CH_2-eH_3}$), 0.94 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\underline{CH-eH_3}$), 1.00-1.30 (2H, m, $\underline{CH_2-eH_3}$), 1.43 (9H s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 1.45-1.90 (1H, m, $\underline{CH-eH_3}$), 3.99 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 5.06 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 5.67 un, br s) en 6.09 (1H, br s) ($\underline{CO-NH_2}$); ^{13}C -k.m.r. δ 12.26 (k, $\underline{CH_2-eH_3}$), 16.39 (k, $\underline{CH-eH_3}$), 25.50 (t, $\underline{CH_2-eH_3}$), 29.12 (k, 3x, $\underline{C(CH_3)_3}$), 37.85 (d, $\underline{CH-eH_3}$), 59.99 (d, $\underline{CH-NH}$), 80.53 (s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 156.90 (s, $\underline{N-eO-D}$), 174.20 (s, $\underline{CO-NH_2}$); m/z 230 (1, M^+), 186 (49, M^+-eONH_2); MS(EI): Akkurate massa m/z 230.1615 (M^+ , bereken 230.1630 vir $C_{11}H_{22}N_2O_3$)

N-t-Butoksikarboniel-B-2-amino-3-metielbutiramied (201c)

Opbrengs 89%; Smp. 156°C (Lit. 112 smp. 157°C); n_D^{20} 1.4200 (c 2.4, chloroform); ν_{max} 3520 (N-H), 3440 en 3405 (NH_2 , doeblet), 1680 (C=O), 1160 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H -k.m.r. (DMSO- d_6) δ 0.78 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, $\underline{CH_3-4}$), 0.82 (3H, d, $J = 7.6$ Hz, $\underline{CH_3-1}$), 1.35 (9H, s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 1.87 (1H, dkk, $J = 7.6$, $J = 7.1$ en $J = 6.9$ Hz, $\underline{CH-CH(CH_3)_2}$), 3.71 (1H, dd, $J = 9.0$ en $J = 6.9$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 6.47 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 7.00 (1H, br s) en 7.26 (1H, br s) ($\underline{CO-NH_2}$); ^{13}C -k.m.r. (DMSO- d_6) δ 18.67 (k, $\underline{CH_3-4}$), 20.03 (k, $\underline{CH_3-1}$), 28.89 (k, 3x, $\underline{C(CH_3)_3}$), 31.03 (d, $\underline{CH(CH_3)_2}$), 60.20 (d, $\underline{CH-NH}$), 78.61 (s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 156.14 (s, $\underline{N-eO-G}$), 174.22 (s, $\underline{CO-NH_2}$); m/z 216 (1, M^+), 172 (32, M^+-eONH_2); MS(EI): Akkurate massa m/z 216.1469 (M^+ , bereken 216.1474 vir $C_{11}H_{20}N_2O_3$).

In Tipiese nrosedure vir die bereiding van N-beskernde α -aminokarboksamiede (202) vana! N-beskernde α -aminokarboksamiede (201)

By In oplossing van N-t-butoksikarboniel-B-2-amino-3-fenielpropionamied (201a,

4.73 g, 17.89 mmol) in anhidriese dirnetoksietaan (35 ml) is 2,4-bis-(p-metoksifeniel)-1,2,3,4-ditiadifosfetaan-2,4-disulfied (203, 3.62 g, 8.95 mmol) gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 4 uur by kamertemperatuur onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer, waarna die oplosmiddel onder verminderde druk verwyder is. Die residuele stroop is in diehloormetaan (100 ml) opgelos en met waterige natriumhidroksied (1% (1 g per 100 ml), 70 ml) gewas. Die waterige fase is herhaaldelik met dichloormetaan (4x100 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is met water (1x70 ml) gewas, gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en afgedamp onder vakuüm. Die residu is op silika gehromatografeer (heksaan:etiel asetaat 3:2) en die suiwer produk ($R_f = 0.43$, heksaan:etiel asetaat 1:1) uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer om 4.47 g (89.1%) tioamied (202a) te lewer.

N-t-Butoksikarboniel-5-2-amino-:l-fenielpentantioamied (202a)

Smpt. 101°C (Lit. ¹¹² smp. 101°C); $[\alpha]_D^{23} +31.9^\circ$ (c 1.5, chloroform); v_{maks} 3420 (NH), 3360 en 3300 (NH₂, doeblet), 3000 (aromatiese C-H), 1680 (C=O), 1250 (C=S), 1160 (C-o-e) cm⁻¹; 1H-k.m.r. δ 1.37 (9H, s, C(CH₃)₃), 3.10 (2H, d, J = 6.5 Hz, CH₂-G_{6H5}), 4.67 (1H, dd, J = 8.5 en J = 6.5 Hz, CH-NH), 5.39 (1H, d, J = 8.5 Hz, CH-GH), 7.15-7.35 (5H, m, CH₂-C_{6H5}), 7.54 (1H, br s) en 7.69 (1H, br s) (CS-NH₂); ¹³C-k.m.r. δ 29.10 (k, 3x, C(CH₃)₃), 42.60 (t, CH₂-e_{6H5}), 62.00 (d, CH-NH), 81.60 (s, C(CH₃)₃), 127.85 (d, CH van C_{6H5}), 129.46 (d, 2x, CH van C_{6H5}), 130.11 (d, 2x, CH van C_{6H5}), 137.32 (s, C van C_{6H5}), 156.22 (s, N-eO-D), 209.24 (s, CS-NH₂); m/z 280 (16, M⁺), 164 (31, M⁺-NHOCOC(CH₃)₃); MS(EI): Akkurate massa m/z 280.1231 (M⁺, bereken 280.1245 vir C₁₄H₂₀N₂O₂S₁)'

N-t-Butoksikarboniel-2S,3S-2-amino-3-metielpentantioamied (202b)

Opbrengrs 87%; $R_f = 0.51$ (heksaan:etiel asetaat 1:1); Smpt. 131°C (Lit. ¹¹² smp. 132°C); $[\alpha]_D^{20} -61.1^\circ$ (c 11.8, chloroform); v_{maks} 3435 (N-H), 3300 en 3199 (NH₂, doeblet), 1692 (C=O), 1247 (C=S), 1164 (C-o-e) cm⁻¹; 1H-k.m.r. δ 0.85 (3H, t, J = 7.2 Hz, CH₂-CH₃), 0.89 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH-CH₃), 1.00-1.20 (2H, m, CH₂-GH₃),

1.38 (9H, s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 1.50-1.85 (1H, m, $\underline{CH-CII_3}$), 4.27 (1H, dd, $J = 9.0$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 5.43 (III, d, $J = 9.0$ Hz, $\underline{CII-NII}$), 8.15 (HI, br s) en 8.66 (IH, br s) ($\underline{CS-NH_2}$); ^{13}C -k.m.r. δ 11.87 (k, $\underline{CH_2-CU_3}$), 16.29 (k, $\underline{CH-GH_3}$), 25.58 (t, $\underline{CH_2-CH_3}$), 29.17 (k, 3x, $\underline{C(CH_3)_3}$), 40.18 (d, $\underline{Cn-CH_3}$), 64.70; (d, $\underline{CII-NII}$), 81.01 (s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 156.86 (s, $\underline{N-CO-o}$), 210.49 (s, $\underline{CS-NH_2}$); m/z 246 (16, M+), 186 (27, M+-CSNH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 246.1421 (M+, bereken 246.1402 vir C₁₁H₂₂N₂O₂S₁)'

N-t-Butoksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutirotioamied (202c)

Opbrengrs 93%; R_f = 0.47 (heksaan.etiel asetaat 1:1); Smpt. 108°C (Lit.¹¹² smp. 108°C); $[\alpha]_D^{20} -40.3^\circ$ (c 2.3, chloroform); ν_{maks} 3440 (N-H), 3360 en 3290 (NH₂, doeblet), 1690 (C=O), 1250 (C=S), 1160 (C-Q-C) em-1; 1H -k.m.r. δ 0.95 (6H, d, 2x, $J = 6.5$ Hz, $\underline{CH(CH_3)_2}$), 1.39 (9H, s, $\underline{C(CII_3)_3}$), 2.15 (1R, m, $\underline{CH(CH_3)_2}$), 4.29 (1H, dd, $J = 8.8$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 5.42 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, $\underline{CH-NH}$), 7.99 (1H, br s) en 8.51 (1H, br s) ($\underline{CS-NR_2}$); ^{13}C -k.m.r. δ 19.12 (k, CH₃-4), 20.30 (k, CH₃-1'), 29.17 (k, 3x, $\underline{C(CH_3)_3}$), 34.30 (d, $\underline{CH(CH_3)_2}$), 65.87 (d, $\underline{CH-NII}$), 81.10 (s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 156.84 (s, $\underline{N-CO-G}$), 210.24 (s, $\underline{CS-NH_2}$); m/z 232 (39, M+), 172 (3.5, M+-eSNH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 232.1239 (M+, bereken 232.1245 vir C₁₀H₂₀N₂O₂S₁)'

Bepaling of Lawesson-reaksie met behoud van optiese suiwerheid van die substraat gepaard gaan:

N-t-Butoksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutironitriël (210)

N-t-Butoksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutiramied (201c, 5.0 g, 23.1 mmol) is in In mengsel van anhidriese dimetielformamied (30 ml) en anhidriese dimetoksletaan (30 ml) opgelos. Die meganies geroerde oplossing is onder In inerte atmosfeer na OoC afgekoel en gedistilleerde tionielchloried (2.7 ml, 38.0 mmol) is drupsgewys bygevoeg. In Temperatuurstyging is waargeneem. Na 3 minute is die ysbad verwyder en is die reaksiemengsel vir 3 uur by kamertemperatuur geroer. Ys (200 g) en natriumwaterstofkarbonaat (50 g) is gemeng en hy die reaksiemengsel gevoeg. Die waterige mengsel is met etiel asetaat (2x300 ml) geëkstraheer en die gekombineerde

organiese fases is gedroog (anhidricse natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en afgedamp *in vacuo*. Die residuele stroop is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer om, na droging van die kristalle *in vacuo*, 3.90 g (S.5%) van die nitriël (210) te lewer. $R_f = 0.41$ (heksaan:etiel asetaat 4:1); Smp. 75.0°C; $[\alpha]_D^{19} -68.2^\circ$ (c 1.5, chloroform); "maks 3447 (N-H), 2255 (C=N), 1715 (C=O), 1155 (C-O-e) em-I; IH-k.m.r. δ 1.02 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3-4), 1.05 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH_3-1), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.57 (1H, dkk, J = 6.6 Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.42 (1H, dd, J = 7.9 en J = 6.6 Hz, CH-NH), 5.05 (1H, br d, J = 7.9 Hz, CH-NH); 13C-k.m.r. δ 17.56 (k, CH_3-4), 18.44 (k, CH_3-1), 28.12 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.69 (d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 45.38 (d, CH-NH), 50.97 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 117.99 (s, $\text{C}\equiv\text{N}$), 154.45 (s, N-eO-Q); m/z 199 (1, M^+), 143 (52, $\text{MH}^+-\text{e}(\text{CH}_3)_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 198.1359 (M^+ , bereken 198.1368 vir $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$)

N-t-Butoksikarboniel-5-2-amino-3-metielbutirotioamied (202c)

Absolute etanol (20 ml) is na OOC afgekoel en met ammoniak(gas) versadig. Waterstofsulfied(gas) is by OOC deur die mengsel geborel, waartydens wit kristallyne ammoniumwaterstofsulfied (NH_4SH) gevorm het. N-t-butoksikarboniel-5-2-amino-3-metielbutironitriël (210, 1.0 g, 5.04 mmol) is in kokende absolute etanol (25 ml) opgelos, dié oplossing toegelaat om tot kamertemperatuur af te koel, en by die NH_4SH suspensie gevoeg. Die magneties geroerde reaksiemengsel het geleidelik geel geword en meeste van die NH_4SH kristalle het opgelos. Die (heksaan:etiel asetaat 3:2) het aange-toon dat die tioneeringsreaksie na 4 uur by kamertemperatuur volledig verloop het. Die reaksiemengsel is met water (50 ml) verdun en met chloroform (2x40 ml) geëkstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog met anhidriese natriumsulfaat, gefiltreer deur selliet en afgedamp onder verminderde druk. Die residuele stroop is op silika gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 1:1) en die suiwer produk is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer om die tioamied (202c) in 'n opbrengs van 56.3% (1.01 g) te lewer. Smp. 105.0°C (Lit. ¹¹² smp. 105.0°C); $[\alpha]_D^{20} -41.8^\circ$ (c 3.1, chloroform). Die optiese rotasie van die produk (202c) wat met die Lawessori-reaksie berei is, is $[\alpha]_D^{20} -40.3^\circ$ (c 2.3, chloroform).

1'S,2'S-4-Metiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-metieibutie)triasool (218)

Chloorpropanoon (0.16 ml, 2.03 ml) is by 'n oplossing van litiumbromied (176 mg, 2.03 ml) in droe dimetoksietaan (1 ml) gevoeg en die reaksiemengsel is oornag by 80°C verhit. Die reaksiemengsel, bevattende die gevormde I-broompropanoon, is na kamertemperatuur afgekoel en N-t-butoksikarboniel-2S,3S-2-amino-3-metielpentantioamied (202b, 100 mg, 0.41 mmol), opgelos in deuterio-etanol (2 ml), is bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 8 uur by kamertemperatuur meganies geroer, waarna die vlugtige komponente *intacuo* verwyder is. Die residuele stroop is gechromatografeer [heksaan:etiel asetaat 5:1) om suiwer 4-metieltiasool (218) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.5$, heksaan:etiel asetaat 4:1) in 'n opbrengs van 85% (98 mg) ge lewer. $[\alpha]_D^{20} -54.4^\circ$ (c 2.9, chloroform); ν_{maks} 3430 (N-H), 1700 (C=O), 1160 (C-o-e) em-I; IH-k.m.r. (80 MHz) δ 0.88 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-GH}_3$), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH-CH_3), 1.00-1.35 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.43 (9R, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.95-2.20 (1H, m, CH-CH_3), 2.43 (3H, s, C-CH_3), 4.89 (1R, dd, $J = 8.9$ en $J = 6.7$ Hz, CH-NH), 5.32 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, CH-NH), 6.75 (1H, s, tiasoolproton); m/z 284 (5, M+), 227 (42, M+-C(CH₃)₃); MS(EI): Akkurate massa m/z 284.1578 (M+, bereken 284.1558 vir C₁₄H₂₄N₂O₂S₁)'

1'S,2'S-4-Feniel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)triasool (219)

By 'n meganies geroerde oplossing van N-t-butoksikarboniel-2S,3S-2-amino-3-metielpentantioamied (202b, 100 mg, 0.41 mmol) in deuterio-etanol (1 ml) is fenielasielbromied (81 mg, 0.41 mmol) gevoeg. Na In reaksietyd van 7 uur by kamertemperatuur is die oplosmiddel verwyder *in vacuo*. Die residu is gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 5:1) om 117 mg (83%) stroperige 4-fenieltiasool (219; $R_f = 0.49$, heksaan:etiel asetaat 4:1) te lewer. $[\alpha]_D^{20} -52.6^\circ$ (c 4.9, chloroform); ν_{maks} 3430 (N-H), 2980 (aromatiese C-H), 1710 (C=O), 1160 (C-o-C) em-I; IH-k.m.r. (80 MHz) δ 1.00 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 1.05 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, CH-CH_3), 1.10-1.40 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.52 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.00-2.30 (1H, m, CH-CH_3), 5.00 un, dd, $J = 8.2$ en $J = 6.0$ Hz, CH-NH), 5.40 (1H, hr d, $J = 8.2$ Hz, CH-NH),

7.25-8.00 (5H, m, $\underline{C_6H_5}$), 7.35 (1R, s, tiasoolproton): m/z 316 (13, M^+), 290 (37, $MH^+ - eH(CH_3)CH_2CH_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 346.1701 (M^+ , bereken 346.1715 vir $C_{19}H_{26}N_2O_2S_1$).

1.3-Dibroom-2-propanoon (229b)

1,3-Dibroom-2-propanoon is volgens die metode van Kim *et al.*²¹⁹ berei. By 'n hewig geroerde yskoue oplossing van 1,3-dichloor-2-propanoon (5.0 g, 39.4 mmol) in aseton (150 ml) is verpoeierde litiumbromied (50 g) porsiegewys bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 3 dae by 18-20^oC meganies geroer. Afdamping van die oplosmiddel onder verminderde druk het 'n residuele bruin vaste stof gelewer, wat vervolgens tussen water (120 ml) en dichloormetaan (200 ml) verdeel is. Die waterfase is weer eens met dichloormetaan (2x100 ml) gewas. Die gekombineerde organiese fases is gewas met yskoue water (1x100 ml), gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en afgedarnp onder verminderde druk. Suiwer kristallyne 1,3-dibroom-2-propanoon (6.13 g, 72.1%) is verkry deur die tweemalige kristallisatie van die ru-produk uit petroleum eter. Smp. 25-27^oC.

1' RIS.2'5-4-Broommetiel-2:=N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)-tiasool (220)

1,3-Dibroom-2-propanoon (88 mg, 0.41 mmol) is by 'n oplossing van N-t-butoksikarboniel-2S,35-2-amino-3-metielpentantioamied (202b, 100 mg, 0.41 mmol) in deuterio-etanol (1.5 ml) gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 24 uur by kamertemperatuur meganies geroer. Die oplosmiddel is afgedamp *in vacuo* en die residuele stroop is op 'n koue silikakolom (-WoC) gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 4:1) om 'n stroperige diastereomeriese mengsel (diastereomeer A:diastereomeer B ca. 7:3) van 4-broommetieltiasool (220, 88 mg, 59.7%) as 'n enkel kol volgens dlc ($R_f = 0.38$, heksaan:etiel asetaat 4:1) te lewer. Geen poging is aangewend om die twee diastereomere te skei nie aangesien die verhouding waarin dit voorkom geredelik met behulp van k.m.r.- en m.s.-analise bepaalbaar was. $[\alpha]_D^{15} -14.1^\circ$ (c 6.2, chloroform); v_{maks}

3440 (N-H), 1710 (C=O), 1160 (C-o-e) em-I. MS(EI): Akkurate massa m/z 362.0669 (M+, bereken 362.0664 vir C₁₄H₂:3N2O2S1Br1)

Diastereomeer A: ¹H-k.m.r. (500 MHz) δ 0.90 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH₂-eH₃), 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH-eH₃), 1.10-1.20 (2H, m, CH₂-eH₃), 1.44 (9H, s, C(CH₃)₃), 2.00-2.10 (1H, m, CH-eH₃), 4.53 (2H, s, CH₂-Br), 4.88 (ea. 70% van die intensiteit van 1H vanwee deuteriumuitruiling, m, CH-NH), 5.23 (1H, br m, CH-NH en CD-NH), 7.17 (1H, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. (500 MHz) δ 11.64 (k, CH₂-eH₃), 15.66 (k, CH-eH₃), 24.69 (t, CH₂-eH₃), 27.18 (t, CH₂-Br), 28.12 (k, 3x, C(CH₃)₃), 39.97 (d, CH-eH₃), 57.35 (d, CH-NH), 79.96 (s, C(CH₃)₃), 116.99 (d, C-5), 128.56 (s, C-2), 152.15 (s, C-4), 155.31 (s, N-GO-Q); m/z 364 (4.1, M+ met SIBr), 362 (4.0, M+ met 7gBr) en 365 (0.8, (M-H+D)+ met 81 Br), 363 (0.8, (M-H+D)+ met 79Br).

Diastereomeer B: ¹H-k.m.r. (500 MHz) δ 0.85 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH-eH₃), 0.95 (3H, t, J = 7.5 Hz, CH₂-eH₃), 1.21-1.30 (2H, m, CH₂-eH₃), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 2.10-2.20 (1H, m, CH-eH₃), 4.64 (2H, s, CH₂-Br), (CH-NH is volledig met deuterium uitgeruil), 5.15 (1H, br s, CD-NH), 7.18 (1H, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. (500 MHz) δ 11.64 (k, CH₂-eH₃), 13.60 (k, CH-GH₃), 26.50 (t, CH₂-eH₃), 27.18 (t, CH₂-Br), 27.94 (k, 3x, C(CH₃)₃), 39.92 (d, CH-eH₃), 57.35 (d, CD-NH), 79.96 (s, C(CH₃)₃), 116.64 (d, C-5), 128.56 (s, C-2), 152.15 (s, C-4), 155.31 (s, N-eO-Q); m/z 365 (0.8, (M-H+D)+ met 81 Br), 363 (0.8, (M-H+D)+ met 79Br).

11 RIS,2'8-4-ehloornetiel-2dN-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)-tiasool (221)

By In oplossing van N-t-butoksikarboniel-2S,35-2-amin()-3-metielpentantioamied (202b, 100 mg, 0.41 mmol) in deuterio-etanol (1 ml) is 1,3-dichloor-2-propanoon (52 mg, 0.41 mmol) gevoeg. Die reaksienengsel is vir 34 uur by kamertemperatuur meganies geroer, waarna die oplosmiddel verwyder is *in vacuo*. Die residuele stroop is op In koue silikakolom (-10°C) gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 4:1) om 'n stroepe-

rige diastereomeriese mengsel van 4-chloormetieltiasool (221, 66 mg, 51%) as In enkele kol volgens d_{lc} ($R_f = 0.44$, hekasaan.etiel asetaat 4:1) te lewer. Die diastereomere is nie geskei nie. $[\alpha]_D^{25} -11.6^\circ$ (c 5.9, chloroform); v_{maks} 3440 (N-H), 1710(C=O), 1160 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H -k.m.r. (80 MHz) δ 1.00 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, $\underline{CH_2CH_3}$), 1.05 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, $\underline{CH-eH_3}$), 1.25-1.50 (2H, m, $\underline{CH_2-eH_3}$), 1.58 (9H, s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 2.00-2.35 (1H, m, $\underline{CH-GH_3}$), 4.75 (2H, s, $\underline{CH_2-Cl}$), 5.20 (ca. 50% van die intensiteit van 1H vanwee deuteriumuitruiling, m, $\underline{CH-NH}$), 5.20 (1H, br m, $\underline{CH-NH}$ (50%) en $\underline{CD-NH}$ (50%)), 7.30 (1H, s, tiasoolproton); MS(EI): Akkurate massa m/z 318.1144 (M^+ , bereken 318.1169 vir $C_{14}H_{23}N_2O_2S_1Cl_1$).

Diastereomeer A: m/z 320 (0.9, M^+ met ^{37}Cl), 318 (2.6, M^+ met ^{35}Cl), 321 (0.4, $(M-H+D)^+$ met ^{37}Cl), 319 (1.3, $(M-H+D)^+$ met ^{35}Cl);

Diastereomeer B: m/z 321 (0.4, $(M-H+D)^+$ met ^{37}Cl), 319 (1.3 $(M-H+D)^+$ met ^{35}Cl).



Etiel 1' R/S , 2' S -2-(N - t -butoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)tiasool-4-karboksielsuur (222)

N - t -Butoksikarboniel-2 S ,3 S -2-amino-3-metielpentantioamied (202b, 100 mg, 0.41 mmol) is opgelos in deuterio- β -etanol (1 ml). Etiel broompiruvaat (0.05 ml, 0.41 mmol) is by die oplossing gevoeg en die reaksiemengsel is vir 30 uur by kamertemperatuur meganies geroer. Die oplosmiddel is onder verminderde druk verwyder en die residu gechromatografeer (hekasaan:etiel asetaat 4:1). Die suiwer etielester (222, 109 mg, 78.4%) is uit hekasaan-etiel asetaat gekristalliseer om, na droging *in vacuo*, kristalle te lewer met 'n smeltpunt $108^\circ C$ (lit. 112 smp. $103^\circ C$). $[\alpha]_D^{25} -7.9^\circ$ (c 1.3, chloroform); v_{maks} 3442 (N-H), 1712 (C=O), 1165 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H -k.m.r. (80 MHz) δ 0.95 (3H, t, $J = 7.2$, $\underline{CH_2-eH_3}$), 1.00 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, $\underline{CH-eH_3}$), 1.30 (2H, ill, $\underline{CH_2-GH_3}$), 1.35 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, $\underline{OCH_2-GH_3}$), 1.45 (9H, s, $\underline{C(CH_3)_3}$), 2.00-2.35 (1H, ill, $\underline{CH-GH_3}$), 4.31 (2H, k, $J = 7.1$ Hz, $\underline{O-GH_2-GH_3}$), 5.10 (ca. 28% van die intensiteit van 1H vanwee deuteriumuitruiling, m, $\underline{CH-NH}$), 5.20 (1H, br m, $\underline{CH-NH}$

(28%) en CD-NH (72%)), 7.91 (1H, s, tiasoolproton);

Diastereomeer A: m/z 342 (2.7, M⁺), 343 (3.5, (M-H+D)⁺);

Diastereomeer B: m/z 343 (3.5, (M-H+D)⁺); MS(EI): Akkurate massa m/z 342.1620 (M⁺, bereken 342.1613 vir C₁₆H₂₆N₂O₄S₁)'

I' RIB-4-Broommetiel-2-{N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)-tiasool (223)

By 'n meganies geroerde oplossing van N-t-butoksikarboniel-5-2-amino-3-feniel-propiontioamied (202a, 200 mg, 0.71 mmol) in deuterio-etanol (1.5 ml) by 90°C is 'n oplossing van 1,3-dibroom-2-propanoon (154 mg, 0.71 mmol) in deuterio-etanol (1 ml) drupsgewys gevoeg. Na 'n reaksietyd van 15 minute by 90°C is die reaksiemengsel afgekoel tot by kamertemperatuur en die oplosmiddel verwyder *in vacuo*. Die donker bruin residuele stroop is op 'n koue silikakolom (-10°C) gechromatografeer (heksaan: etiel asetaat 4:1) om suiwer broomtiasool (223, 153 mg, 53.9%) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.33$, heksaan:etiel asetaat 4:1) te lewer. Die suiwer produk (223) is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer om kristalle met smeltpunt 118-119°C te gee. $[\alpha]_D^{21} -18.4^\circ$ (c 1.6, chloroform); vmaks 3420 (N-H), 3000 (aromatiese C-H), 1720 (C=O), 1160 (C-o-C) ern-1; 1H-k.m.r. (80 MHz) δ 1.50 (9H, s, C(CH₃)₃), 3.34 (2H, s, CH₂-C₆H₅), 4.61 (2H, s, CH₂-Br), 5.25 (ca. 75% van die intensiteit van 1H vanwee deuteriumuitruiling, m, CH-NH), 5.25 (1H, m, CH-NH (75%) en CD-NH (25%)), 7.10-7.40 (5H, m, CH₂-C₆H₅), 7.14 (1H, s, tiasoolproton); MS(EI): Akkurate massa m/z 396.0499 (M⁺, bereken 396.0508 vir C₁₇H₂₁N₂O₂S₁Br₁).

Enantiomeer A: m/z 398 (1.6, M⁺ met SIBr), 396 (1.5, M⁺ met ⁷⁹Br) en 399 (0.3, (M-H+D)⁺ met SIBr), 397 (0.3, (M-H+D)⁺ met ⁷⁹Br);

Enantiomeer B: m/z 399 (0.3, (M-H+D)⁺ met SIBr), 397 (0.3, (M-H+D)⁺ met ⁷⁹Br).

1' R/B-4-ehloormetiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1 I-amino-2'-fenieletiel)-tiasool (224)

By 'n meganies geroerde oplossing van N-t-butoksikarboniel-S-2-amino-3-fenielpropiontioamied (202a, 100 mg, 0.36 mmol) in deuterio-etanol (1 ml) by 90°C is 'n oplossing van 1,3-dichloor-2-propanoon (45 mg, 0.36 mmol) in deuterio-etanol (0.5 ml) drupsgewys bygevoeg. Na 'n reaksietyd van 3 uur by 90°C is die reaksiemengsel na kamertemperatuur afgekoel en die oplosmiddel verwyder *in vacuo*. Die residuele stroop is op 'n koue silikakolom (-10°C) gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 4:1) om suiwer chloortiasool (224, 65 mg, 51.6%) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.31$, heksaan:etiel asetaat 4:1) te lewer. Die suiwer produk (224) is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer. Smp. 109-111°C; $[\alpha]_D^{20} -16.5^\circ$ (c 2.4, chloroform); ν_{maks} 3420 (N-H), 1720 (C=O), 1160 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H-k.m.r. (80 MHz) δ 1.25 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.15 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-e}_{6\text{H}5}$), 4.57 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-Cl}$), 5.15 (ca. 45% van die intensiteit van 1H vanwee deuteriumuitruiling, m, CH-NH), 5.15 (1H, m, CH-NH (45%) en CD-NH (55%)), 6.95-7.13 (.5H, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.13 (1H, s, tiasoolproton); MS(EI): Akkurate massa m/z 352.1025 (M+, bereken 352.1012 vir $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_1\text{Cl}_1$)

Enantiomeer A: *tnlz* 354 (0.7, M+ met ^{37}CO), 352 (2.0, M+ met ^{35}Cl), 366 (0.4, (M-H+D)+ met ^{37}Cl), 353 (1.1, (M-H+D)+ met ^{35}Cl);

Enantiomeer B: m/z 355 (0.04, (M-H+D)+ met ^{37}Cl), 353 (1.1, (M-H+D)+ met ^{35}Cl).

Etel 1' R/S-2-{N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool-4-karboksiesuur(225)

N-t-butoksikarboniel-S-2-amino-3-fenielpropiontioamied (202a, 100 mg, 0.36 mmol) is opgelos in deuterio-etanol (1 ml), waarna die oplossing verhit is na 90°C. Etel broompiruvaat (0.04 ml, 0.36 mmol) is by die oplossing gevoeg en die reaksiemengsel is vir 15 minute by 90°C meganies geroer. Die oplosmiddel is verwyder *in vacuo* en die residuele stroop gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 7:3). Die suiwer etielester (225, 95.2 mg, 70.9%) is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer. Smp.

111 °C (mp. 112 °C); $[\alpha]_D^{20} -7.4^\circ$ (c 1.5, chloroform); ν_{maks} 3435 (N-H), 1716 (C=O), 1167 (C-O-G) cm⁻¹; 1H-NMR (80 MHz) δ 1.35 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.39 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂-eH₃), 3.31 (2H, d, J = 6.0 Hz, CH₂-G6H₅), 4.40 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-eH₂-GH₃), 5.25 (ca. 2.5% van die intensiteit van 1H vanwee deuterium-uitruiling, m, CH-NH), 5.25 (1H, br m, CH-NH (25%) en CD-NH (75%)), 7.00-7.35 (5H, m, CH₂-C₆H₅), 8.03 (1H, s, tiasoolproton);

Enantiomeer A: m/z 376 (4, M+), 377 (6, (M-H+D)+);

Enantiomeer B: m/z 377 (6, (M-H+D)+); MS(EI): Akkurate massa m/z 376.1468 (M+, bereken 376.1457 vir C₁₉H₂₄N₂O₄S₁)'

5.8 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.8

1,3-Dibroom-2-propanoon (229b)

Die benadering tot die bereiding van 229b is in bostaande afdeling (kyk Eksperimenteel van Afdeling 2.7) volledig bespreek.

1) R/S-4-Chloormetiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)-tiasool (230a)

Die verbinding (230a) is in anhidriese dimetoksietaan soortgelyk aan die gedeutereerde analoog (224, kyk Eksperimenteel van Afdeling 2.7) in 'n opbrengs van 52% berei, Smp. 110-111 °C; $[\alpha]_D^{20} -16.3^\circ$ (c 2.5, chloroform).

1) R/S-4-Broommetiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)-tiasool (230b)

Die verbinding (230b) is in anhidriese dimetoksietaan, soortgelyk aan die gedeutereerde analoog (223, kyk Eksperimenteel van Afdeling 2.7) in 'n opbrengs van 54.5% berei. Smp. 118-119 °C; $[\alpha]_D^{20} -19.1^\circ$ (c 1.9, chloroform).

1'R/s-4-Metielalkohol-2=fN-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)-tiasool (231) en 1'R/S-4-Formiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool (232)

Silwertosilaat (203 mg, 0.73 mmol) is by In oplossing van 11 R/S-4-broommetiel-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool (230b, 262 mg, 0.66 mmol) in anhidriese dimetielsulfoksied (1 ml, 2x gedistillcer vanaf kalsiumhidried *in vacuo*) gevoeg. Die reaksiemengsel is onder 'n inerte atrnosfeer vir 12 uur by kamertemperatuur meganies geroer, waartydens In fyn wit presipitaat ontwikkel het. Na die byvoeging van trietielamien (0.1 ml) is die rnengsel vir 15 minute geroer en daarna verdun met eter (2ml). Die eterfase is afgeskei en die oplosmiddel is verwyder *in vacuo*. Die residuele stroop is opgelos in heksaan-etiel asetaat (2:3), waartydens die alkoholderivaat (231, 51 mg) spontaan uitgekristalliseer het. Die kristalle is afgeskei deur filtrasie en die filtraat is ingedamp onder verminderde druk. Chromatografie van die residu op watervrye silika (heksaan:etiel asetaat 2:3) en kristallasie van die suiwer fraksies uit heksaan-etiel asetaat het die 4-formielderivaat (232, $R_f = 0.32$, heksaan:etiel asetaat 2:3) in 'n opbrengs van 57% (125 mg) en die alkoholderivaat (231, $R_f = 0.27$, heksaan:etiel asetaat 2:3) in 'n totale ophrengs van 33% (22 mg + 51 mg) gelewer.

Analise van die 4-rnetielalkoholderivaat (231):

Smp. 118-120 °C; $[\alpha]_D^{21} -4.0^\circ$ (c 1.5, chloroform); ν_{maks} 3440 (N-H), 3400 (O-H, waterstofgebind, breed), 3000 (aromatiese C-H), 1720 (C=O), 1160 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H-k.m.r. (80MHz) δ 1.35 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.30 (1H, br s, volledig uitruilbaar met D_2O , $\text{CH}_2\text{-DH}$), 3.19 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-e}_{6\text{H}5}$), 4.70 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-GH}$), 5.20 (1H, m, CH-NH), 5.20 (1H, m, CH-NH), 7.00-7.30 (.5H, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.05 (1H, s, tiasoolproton): m/z 261 (4, $\text{M}^+\text{-DC}(\text{CH}_3)_3$), 243 (24, $\text{M}^+\text{-eH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$) MS(EI): Akkurate massa m/z 334.1349 (M^+ , bereken 334.1351 vir $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_1$)'

Analise van die 4--formielderivaat (232)

Smp. 113-114°C; $[\alpha]_D^{21} -4.3^\circ$ (c 1.9, chloroform); v_{maks} 3420 (N-H), 1700 (C=O), 1150 (C-Q-C) cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ (80 MHz) δ 1.41 (gII, s, $\text{C}(\text{CII}_3)_3$), 3.35 (2H, d, J = 6.0 Hz, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 5.30 (1H, m, CII-NII), 5.30 (III, m, CH-NH), 7.10-7.040 (5H, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.08 (1H, s, tiasoolproton), 10.05 (III, s, cn-Q); m/z 332 (5, M+), 241 (57, M+- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); MS(EI): Akkurate massa tu]: 332.1211 (M+, bereken 332.1195 vir C17H20N2O3S1).

Die oksidasie van 1'*R/S*-4--chloormetiel-2--(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool (230a) onder dieselfde kondisies as bostaande, het die 4-metielalkoholderivaat (231; smp. 119-120°C; $[\alpha]_D^{20} -4.3^\circ$ (c 0.9, chloroform)) in 'n opbrengs van 27% en die 4-formielderivaat (232; smp. 113-114°C; $[\alpha]_D^{21} -4.7^\circ$ (c 1.5, chloroform)) in 'n opbrengs van 46% gelewer.

Metiel 1'R/B-2-dN-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool-1--4-karboksielsuur (233)

'n Mengsel van 1'*R/B*-4-metielalkohol-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenieletiel)tiasool (231, 100 mg, 0.3 mmol) en aktiewe mangaandioksied²²⁷ (530 mg, 6.10 mmol) in droe heksaan (2 ml) en droe asetoon (1 ml) is vir 5 uur by 0°C onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer. Die reaksiemengsel is deur selliet filtreer en die filtraat ingedamp onder verminderde druk. $^1\text{H-k.m.r.}$ -analise (80 MHz) van die residuele stroop ($R_f = 0.32$, heksaan:etiel asetaat, 2:3) het bevestig dat die produk die ooreenkomstige 4-formieltiasoolderivaat (232, >95% suiwerheid) is.

Die ongesuiwerde 4-formieltiasoolderivaat (232, 110 mg) is opgelos in anhidriese metanol (2 ml) en natriumsianied (73 mg, 1.5 mmol), ysasynsuur (27 mg, 0.045 mmol) en aktiewe mangaandioksied²²⁷ (530 mg, 6.1 mmol) is bygevoeg. Die mengsel is vir 12 uur by kamertemperatuur onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer, waarna die vlugtige komponente onder vakuüm verwyder is. Die residu is tussen water (5 ml) en etiel asetaat (30 ml) verdeel. Die organiese fase is gedroog; (anhidriese natriumsulfaat),

gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Die residuele stroop is gechromatografeer met heksaan-etiel asetaat (3:2) as elueermiddel. Die suiwer produk ($R_f = 0.14$, heksaan:etiel asetaat 4:1) is uit heksaan-etiel asetaat gekristalliseer om 92 mg (85%) metielester (233) te lewer. Smp. 116°C ; $[\alpha]_D^{19} -2.4^\circ$ (c 1.0, chloroform); v_{maks} 3435 (N-H), 1718 (C=O), 1167 (C-o-e) cm^{-1} ; IH-k.m.r. (80 MHz) δ 1.32 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.25 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-eH}_5$), 3.90 (3H, s, CO-eH_3), 5.23 (1H, m, CH-NH), 5.23 (1H, m, CH-NH), 7.00–7.35 (5H, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.0S (1H, s, tiasoolproton); m/z 362 (3, M^+), 271 (34, $M^+ - e\text{H}_{2\text{C}_6\text{H}_5}$); Akkurate massa m/z 362.1289 (M^+ , bereken 362.1300 vir $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)

1,3,4-Tribroom-but-2-oon (240)

By 'n meganies geroerde oplossing van 2-trimetielsieloksibutadien (0.14 ml, 0.81 mmol) in dichloormetaan (1 ml) by -30°C (asetoon/droë ys) is broom (ca. 0.04 ml, 0.81 mmol) gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 5 minute by -30°C geroer, waarna dit na kamertemperatuur opgewarm is. Water (1 ml) is by die mengsel gevoeg en daarna met dichloormetaan (2x2 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp by kamertemperatuur onder verminderde druk. IH-k.m.r.-analise het die produk (240, 250 mg) met 'n suiwerheid van > 97% bevestig. IH-k.m.r. (80 MHz) δ 3.67 (1H, dd, $J_{4a,4b} = 10.0$ en $J_{3,4b} = 4.4$ Hz, H-4b), 3.96 (1H, dd, $J_{3,4a} = 10.3$ en $J_{4a,4b} = 10.0$ Hz, H-4a), 4.08 (1H, d, $J_{1a,1b} = 12.0$ Hz, H-1b), 4.34 (1H, d, $J_{1a,1b} = 12.0$ Hz, H-1a), 4.99 (1H, dd, $J_{3,4a} = 10.3$ en $J_{3,4b} = 4.4$ Hz, H-3).

4-(1',2'-Dibroometiel)-1'*R*/S-2-(*N*-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenietiel)-tiasool (243)

1,3,4-Tribroom-but-2-oon (240, 250 mg, 0.81 mmol) is opgelos in anhidriese dimetoksietaan (1.5 ml) en *N*-t-butoksikarboniel-5-2-amino-3-fenielpiontioamied (202a, 151 mg, 0.54 mmol) is bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 10 uur by kamertemperatuur onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer. Die vlngtige komponente is ver-

wyder *in vacuo* en die residu is tussen chloroform (5 ml) en waterige natriumbikarbonaat (2 ml) verdeel. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Chromatografie van die residuele stroop op 'n koue silikakolom (-10°C) met heksaan-etiel asetaat (4:1) as elueermiddel het 'n diastereomeriese mengsel van die dibroomntiasoolderivaat (243) in 'n opbrengs van 43% (114 mg) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.42$, heksaan:etiel asetaat 4:1) gelewer. Geen poging is aangewend om die diastereomeriese mengsel te skei nie aangesien beide diastereomere m.b.v. ^1H - en ^{13}C -k.m.r.-spektroskopie (diastereomeer A : diastereomeer B ~ 1:1) gekarakteriseer kon word. $[\alpha]_D^{17.9} -18.2^\circ$ (c 1.9, chloroform); ν_{maks} 3433 (N-H), 3012 (aromatiese C-H), 1712 (C=O), 1163 (C-O-G) cm^{-1} ; m/z 330 (8, $\text{M}^+ - 2 \text{ Br}$), 301(10), 299(20) en 297(10) ($\text{MH}^+ - \text{GH}_2\text{C}_6\text{HS} - \text{oCOC}(\text{CH}_3)_3$), 214 (3S, $\text{M}^+ - 2 \text{ Br} - \text{NH} - \text{t} - \text{Boc}$); MS(EI): Akkurate massa *m/z* 487.9761 (M^+ , bereken 487.9770 vir $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_1\text{Br}_2$).

Diastereomeer A: ^1H -k.m.r. (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.31 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.29 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-G}_{6\text{HS}}$), 4.17 (1H, dd, $J_{2''\text{a},2''\text{b}} = 10.0$ en $J_{1'',2''\text{b}} = 5.0$ Hz, H-2''b), 4.28 (1H, dd, $J_{2''\text{a},2''\text{b}} = J_{1'',2''\text{a}} = 10.0$ Hz, H-2''a), 4.96 (1H, m, CH-NH), 4.96 (1H, m, CH-NH), 5.61 (1H, dd, $J_{1'',2''\text{a}} = 10.0$ en $J_{1'',2''\text{b}} = 5.0$ Hz, H-1''), 7.15-7.27 (SH, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.27 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. (200 MHz, CDCl_3) δ 29.12 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.70 (t, $\text{CH}_2\text{-G}_{6\text{HS}}$), 42.05 (t, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 45.50 (d, CH-Br), 54.33 (d, CH-NH), 81.13 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 118.65 (d, C-5), 127.66 (d, CH van $\text{C}_{6\text{HS}}$), 129.16 (d, 2x, CH van $\text{C}_{6\text{HS}}$), 130.41 (d, 2x, CH van $\text{C}_{6\text{HS}}$), 130.56 (s, C-4), 136.68 (s, C van $\text{C}_{6\text{HS}}$), 153.43 (s, C-2), 155.74 (8, N-eO-o).

Diastereomeer B: ^1H -k.m.r. (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.31 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 3.29 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-G}_{6\text{HS}}$), 4.19 (1H, dd, $J_{2''\text{a},2''\text{b}} = 10.0$ en $J_{1'',2''\text{b}} = 5.0$ Hz, H-2''b), 4.33 (1H, dd, $J_{2''\text{a},2''\text{b}} = J_{1'',2''\text{a}} = 10.0$ Hz, H-2''a), 4.96 (1H, m, CH-NH), 4.96 (1H, m, CH-NH), 5.63 (1H, dd, $J_{1'',2''\text{a}} = 10.0$ en $J_{1'',2''\text{b}} = 5.0$ Hz, H-1''), 7.15-7.27 (SH, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 7.27 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. (200 MHz, CDCl_3) δ 29.12 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.70 (t, $\text{CH}_2\text{-e}_{6\text{HS}}$), 42.41 (t, $\text{CH}_2\text{-Br}$), 45.66 (d, CH-Br), 54.49 (d,

CH-NH), 81.17 (s, C(CH₃)₃), 118.72 (d, C-5), 127.75 (d, CH van C₆H₅), 129.35 (d, 2x, CH van C₆H₅), 130.53 (d, 2x, CH van C₆H₅), 130.56 (s, C-4), 136.89 (s, C van C₆H₅), 153.57 (s, C-2), 155.74 (s, N-CO-o).

5.9 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.9

Die volgende N-beskernde α -aminokarboksamiede (201eJ) is vanaf die ooreenkomstige N-beskernde α -aminokarboksielsure (200e,f) volgens die standaard prosedure (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.7) berei:

N-t-Butoksikarboniel-S-2-aminopropionamied (201 e)

Opbrenns 87%; Smp. 124°C (Lit. 112 smp. 123.5°C); $[\alpha]_{\text{D}}^{19} -25.0^{\circ}$ (e 6.7, chloroform); ν_{maks} 3485 (N-H), 3438 en 3342 (NH₂, doeblet), 1686 (C=O), 1163 (C-o-C) em-1; ¹H-k.m.r. δ 1.31 (3H, d, J = 7.1 Hz, CH-CH₃), 1.38 (9H, s, C(CH₃)₃), 4.19 (1H, m, CH-NH), 5.45 (1H, d, J = 6.6 Hz, CH-NH), 6.34 (1H, br s) en 6.67 (1H, br s) (CO-NH₂); ¹³C-k.m.r. δ 19.35 (k, CH-CH₃), 29.12 (k, 3x, C(CH₃)₃), 50.48 (d, CH-NH), 80.79 (8, C(CH₃)₃), 156.40 (s, N-CO-D), 176.80 (8, CO-NH₂); m/z 188 (2, M⁺), 144 (100, M⁺-CONH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 188.1139 (M⁺, bereken 188.1161 vir C₈H₁₆N₂O₃).

N-t-Butoksikarboniel-S-2-amin-4-metielpentanami(d (201 f)

Opbrenns 92%; Smp. 144°C (Lit. 112 smp. 144°C); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -36.8^{\circ}$ (e 2.5, chloroform); ν_{maks} 3487 (N-H), 3443 en 3411 (NH₂, doeblet), 1692 (C=O), 1163 (C-o-C) em-I; ¹H-k.m.r. δ 0.91 (3H, d, J = 6.1 Hz, CH₃₋₅), 0.93 (3H, d, J = 6.3 Hz, CH_{3-1'}), 1.42 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.40-1.60 (2H, m, CH-CH₂-CH), 1.60-1.75 (1H, m, CH(CH₃)₂), 4.14 (1H, m, CH-NH), 5.08 (1H, br d, J \approx 8.3 Hz, CH-NH), 5.90 (1H, br s) en 6.43 (1H, br s) (CO-NH₂); ¹³C-k.m.r. δ 22.69 (k, CH_{3-S}), 23.77 (k, CH_{3-1'}), 25.53 (d, CH(CH₃)₂), 29.12 (k, 3x, C(CH₃)₃), 42.07, (t, CH-CH₂-CH), 53.43 [d, CH-NH], 80.50 (s, C(CH₃)₃), 156.62 (s, N-CO-o), 176.35 (s, CO-NH₂); *ui*: 230 (1, M⁺), 186 (42, M⁺-CONH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 230.1639 (M⁺, bereken 230.1630 vir C₁₁H₂₂N₂O₃).

Die volgende N-beskernde α -aminokarboksioamide (202d-f) is vanaf die ooreenkomstige N-beskernde α -aminokarboksamiede (201d-f) volgens die standaard prosedure(sien Eksperimenteel van Afdeling 2.7) berei:

N-Bensieloksikarboniel-S-2-amino-3-metielbutirotioarnirri (202d)

Opbrengs 85%; $R_f = 0.43$ (heksaan:etiel asetaat 1:1); Smp. 100-101°C; $[\alpha]_D^{21} -51.1^\circ$ (e 12.2, chloroform); ν_{maks} 3435 (N-H), 3368 en 3302 (NH_2 , doeblet), 3036 (aromatiese C-H), 1709 (C=O), 1228 (C=S) em-I; IH-k.r.n.r. δ 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-4}$), 0.97 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{-1'}$), 2.06 (1H, dkk, $J = 8.6$, $J = 6.8$ en $J = 6.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.32 (1H, dd, $J = 9.0$ en $J = 8.6$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 5.05 (2H, s, $\text{CH}_2\text{-e}_{\text{6H5}}$), 5.83 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, CH-NH), 7.20-7.40 (SH, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.04 (1H, br s) en 8.36 (1H, br s) (CO-NH_2); ^{13}C -k.m.r. δ 19.11 (k, $\text{CH}_3\text{-4}$), 20.33 (k, $\text{CH}_3\text{-1'}$), 34.29 (d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 66.23 (d, CH-NH), 68.04 (t, $\text{CH}_2\text{-e}_{\text{6H5}}$), 128.52 (d, 2x, CH van C_6H_5), 129.25 (d, CH van C_6H_5), 129.43 (d, 2x, CH van C_6H_5), 136.91 (s, C van C_6H_5), 157.41 (s, N-eO-D), 209.42 (s, CS-NH_2); m/z 266 (20, M^+), 206 (31, M^+-CSNH_2); MS(EI): Akkurate massa m/z 266.1099 (M^+ , bereken 266.1089 vir $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)

N-t-Butoksikarboniel-S-2-aminopropiontioamied (202e)

Opbrengs 87%; $R_f = 0.37$ (heksaan:etiel asetaat 1:1); Smp. 103°C (Lit. ¹¹² smp. 103°C); $[\alpha]_D^{21} -36.8^\circ$ (e 8.7, chloroform); ν_{maks} 3439 (N-H), 3305 en 3201 (NH_2 , doeblet), 1693 (C=O), 1238 (C=S), 1159 (C-o-e) em-I; IH-k.r.n.r. δ 1.38 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, CH-eH_3), 4.56 (1H, m, CH-NH), 5.55 (1H, br d, $J \approx 6.6$ Hz, CH-NH), 8.19 (1H, br s) en 8.44 (1H, br s) (CS-NH_2); ^{13}C -k.r.n.r. δ 22.77 (k, CH-CH_3), 29.16 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 55.93 (d, CH-NH), 51.24 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.34 (s, N-CO-O), 211.36 (s, CS-NH_2); m/z 204 (68, M^+), 144 (61, M^+-eSNH_2); MS(EI): Akkurate massa m/z 204.0950 (M^+ , bereken 204.0932 vir $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$)

N-t-Butoksikarboniel-S--2-amin0-4-meti('lpentantioamied (202f)

Opbrengrs 93%; $R_f = 0.52$ (heksaan:etiel asetaat 1:1); Smp. 158°C (Lit. 112 smp. $157.5^{0\text{C}}$): $[\alpha]_D^{25} 1-46.9^\circ$ (c 8.1, chloroform); ν_{maks} 3437 (N-H), 3367 en 3301 (NH_2 , doeblyct), 1697 (C=O), 1249 (C=S), 1163 (C-O-C) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 0.80 (6H, 2x, br d, $J \simeq 4.8$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.28 (sn, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.40-1.55 (2H, m, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}$), 1.55-1.70 (IH, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 4.53 (III, m, CII-NIT), 5.55 (III, br d, $J \simeq 8.2$ Hz, CH-NH), 8.49 (1H, br s) en 8.85 (III, br s)(CS-NH_2); ^{13}C -k.m.r. δ 22.78 (k, CH_{3-5}), 23.75 (k, CH_{3-1}), 25.56 (d, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 29.13 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 45.49 (t, $\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}$), 58.62 (d, CH-NH), 80.89 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 156.79 (s, N-eO-Q), 211.55 (s, CS-NH_2); rn/z 246 (6, M+), 190 (41, $\text{MH}^+-\text{e}(\text{CH}_3)_3$), 186 (8, M^+-eSNH_2); MS(EI): Akkurate massa m/z 246.1397 (M+, bereken 246.1402 vir $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{SI}$)'

'n Tipiese prosedure vir die bereiding van etiel I'S-2-(N-beskernde l'-aminoalkieII-tiasool-4-karboksielsure (246a-f) vanaf N-heskernde a-aminokarhokstioamiede (202a-f) (Gemodifiseerde Hantzsch-reaksie)

'n Heterogene mengsel van N-t-butoksikarboniel-5-2-amin0-3-fenielpentantioamied (202a, 307 mg, 1.09 mmol) en fyngemaalde kaliurnwaterstofkarbonaat (877 mg, 8.76 mmol) in anhidriese dimetoksietaan (2 ml) is vir 5 minute onder 'n inerte atmosfeer meganies geroer, waarna etiel broompiruvaat (0.4 ml, 3.28 mmol) bygevoeg is. Na 'n reaksietyd van 1 minuut by kamertemperatuur, is die hewig geroerde liggeel reaksiemengsel na 0° afgekoel en 'n voorafbereide mengsel van trifluoorasynsuuranhidried (0.6 ml, 4.38 mmol) en piridien (0.8 ml, 9.85 mmol) in dimetoksietaan (1 ml) bygevoeg. Die reaksiemengsel het rooi-bruin van kleur geword en dlc het aangetoon dat tiasoolvorming byna onmiddellik volledig plaasgevind het. Die mengsel is na kamertemperatuur laat opwarm en die vlugtige komponente is versigtig onder verminderde druk afgedamp. Die residu is gesuspendeer in chloroform (50 ml) en geekstraheer met water (2x20 ml). Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriurnsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp *in vacuo*. Chromatografie van die residuele stroop met heksaan-etiel asetaat (7:3) as elueermiddel het die produk ($R_f = 0.53$, heksaan:etiel

asetaat 3:2) as In kleurlose stroop gelewer. Kristallisasie uit heksaan-etiel asetaat het 388 mg (94.3%) van die opties suiwer tiasoolamino-suurderivaat (246a) gegee.

Etiel 1'-8-2=CN-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-fenielctieOtiasool-4-karboksielsuur (246a)

Smp. 111°C (Lit.¹¹² smp. 111°C); $[\alpha]_D^{20} -20.1^\circ$ (c 1.0, chloroform); ν_{maks} 3435 (N-H), 1718 (C=O), 1167 (C-o-e) cm^{-1} ; 1H-k.m.r. (500 MHz) δ 1.37 (9R, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.39 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{-eH}_3$), 3.31 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 4.41 (2H, k, $J = 7.2$ Hz, $\text{O-eH}_2\text{-CH}_3$), 5.26 (1H, m, CH-NH), 5.26 (1H, m, CH-NH), 7.10-7.32 (5R, m, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 8.01 (1H, s, tiasoolproton); 13C-k.m.r. (500 MHz) δ 14.37 (k, $\text{OCH}_2\text{-GH}_3$), 28.26 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 41.60 (t, $\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5$), 53.95 (d, CII-NH), 61.44 (t, $\text{O-GH}_2\text{-CH}_3$), 81.00 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 126.96 (d, C-5), 127.10 (d, CH van C_6H_5), 128.59 (d, 2x, CH van C_6H_5), 129.41 (d, 2x, CH van C_6H_5), 136.20 (s, C van C_6H_5), 147.30 (s, C-2), 155.80 (8, N-eO-D), 161.32 (s, C-4), 172.90 (s, CO-OEt); m/z 376 (14, M⁺), 331 (11, M⁺- oCH_2CH_3), 285 (74, M⁺- $\text{GH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); MS(EI): Akkurate massa m/z 376.1465 (M⁺, bereken 376.1457 vir C₁₉H₂₄N₂O₄S₁)

Etiel 1'S, 2'S-2=(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)tiasool-4-karboksielsuur (246b)

Opbrengs 94.3%; $R_f = 0.57$ (heksaan:etiel asetaat 3:2); Smp. 103°C (Lit.¹¹² smp. 103°C); $[\alpha]_D^{17} -35.4^\circ$ (c 2.6, chloroform); ν_{maks} 3442 (N-H), 1712 (C=O), 1165 (C-Q-C) cm^{-1} ; 1H-k.m.r. δ 0.86 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-eH}_3$), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH-CH_3), 1.00-1.30 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-GH}_3$), 1.36 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, $\text{O-GH}_2\text{-GH}_3$), 1.40 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 2.00-2.20 (1H, m, CH-CH_3), 4.38 (2H, k, $J = 7.2$ Hz, $\text{O-GH}_2\text{-CH}_3$), 4.89 (1H, dd, $J = 8.6$ en $J = 6.1$ Hz, CH-NH), 5.30 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, CH-NH), 8.04 (1H, s, tiasoolproton); 13C-k.m.r. δ 12.34 (k, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 15.17 (k, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 16.59 (k, Cn-eH_3), 25.24 (t, $\text{CH}_2\text{-GH}_3$), 29.10 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 40.55 (d, CH-eH_3), 58.27 (d, CH-NH), 62.17 (t, $\text{O-CH}_2\text{-GH}_3$), 80.82 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.57 (d, C-5), 148.5 (8, C-2), 156.12 (s, N-CO-O), 162.1 (s, C-4), 173.71 (s, CO-oEt); m/z

342 (7, M+), 297 (8, M+-oCH₂CH₃); MS(EI): Akkurate massa m/z 342.1629 (M+, bereken 342.1613 vir C₁₆H₂₆N₂O₄S₁)'

Etiel 1'S-Z-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-Z'-metielpropiel)tiasool-4-karboksiel-sliur (246c)

Opbrengrs 89%; R_f = 0.54 (heksaan:etiel asetaat 3:2); Smp. 125°C (Lit.¹¹² smp. 125.5°C); [α]_D²² -42.0° (c 2.7, chloroform); ν_{maks} 3441 (N-H), 1715 (C=O), 1165 (C-o-e) cm⁻¹; IH-k.m.r. (500 MHz) δ 0.89 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH_{3-3'}), 0.96 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH_{3-1''}), 1.38 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH_{2-eH3}), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 2.42 (IH, m, CH(CH₃)₂), 4.39 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-GH_{Z-eH3}), 4.88 (IH, m, CH-NH), 5.29 (IH, br m, CH-NH), 8.04 (IH, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. (500 MHz) δ 14.38 (k, OCH_{2-eH3}), 17.32 (k, CH_{3-3'}), 19.44 (k, CH_{3-1''}), 28.34 (k, 3x, C(CH₃)₃), 33.33 (d, CH(CH₃)₂), 58.90 (d, CH-NH), 61.39 (t, O-GH_{2-eH3}), 81.07 (s, C(CH₃)₃), 126.70 (d, C-5), 147.80 (8, C-2), 155.60 (8, N-eO-Q), 161.35 (s, C-4), 175.61 (8, CO-oEt); m/z 328 (8, 1'+), 285 (68, M⁺-eH(CH₃)₂), 272 (49, MH⁺-e(CH₃)₃); MS(EI): Akkurate massa m/z 328.1451 (M+, bereken 328.1457 vir C₁₅H₂₄N₂O₄S₁)'

Etiel 1'5'-2-{N-bensieloksikarboniel-1'-amino-Z'-metielpropiel)tiasool-4-karboksiel-sliur (246d)

Opbrengrs 92%; R_f = 0.44 (heksaan:etiel asetaat 3:2); Smp. 85°C; [α]_D²⁴ -28.0° (c 2.1, chloroform); ν_{maks} 3436 (N-H), 1720 (C=O), 1207 (C-o-e) cm⁻¹; IH-k.m.r. (500 MHz) δ 0.91 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH_{3-3'}), 0.95 (3H, d, J = 6.8 Hz, CH_{3-1''}), 1.38 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH_{2-eH3}), 2.40 (IH, m, CH(CH₃)₂), 4.39 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-CH_{2-GH3}), 4.93 (IH, dd, J = 8.2 en J = 6.1 Hz, CH-NH), 5.10 (2H, s, CH_{2-e6H5}), 5.55 (IH, d, J = 8.2 Hz, CH-NH), 7.25-7.40 (5H, m, CH_{2-C₆H₅}), 8.05 (IH, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. (500 MHz) δ 14.36 (k, OCH_{2-GH3}), 17.45 (k, CH_{3-3'}), 19.39 (k, CH_{3-1''}), 33.44 (d, CH(CH₃)₂), 58.65 [d, CH-NH), 61.43 (t, O-GH_{Z-GH3}), 67.19 (t, CH_{2-e₆H₅}), 126.83 (d, C-5), 128.08 (d, 2x, CH van C₆H₅), 128.22 (d, CH van C₆H₅), 128.54 (d, 2x, CH van C₆H₅), 136.00 (s, C van C₆H₅), 147.46 (8, C-2), 156.04

(s, N-eO-o), 161.29 (s, C-4), 174.50 (s, CO-QEt); $ta] \gg 362$ (42, M⁺), 319 (42, M⁺-eH(CH₃)₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 362.1318 (M⁺, bereken 362.1300 vir C₁₈H₂₂N₂O₄S₁)'

Etiel 11S-2=εN-t-butoksikarbonieI-1'-aminoetieDtiasool-'-kARBOKSIELSUUR (246e)

Opbrengs 87%; R_f = 0.41 (heksaan:etiel asetaat 3:2); Smp. 89°C (Lit. ¹¹² smp. 89.5^{0C}); $[\alpha]_D^{21} -41.8^\circ$ (c 5.1, chloroform); ν_{maks} 3443 (N-H), 1716 (C=O), 1169 (C-Q-e) em-I; IH-k.m.r. (500 MHz) δ 1.35 (3H, t, J = 7.2 Hz, OCH₂-eH₃), 1.40 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.58 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH-CH₃), 4.37 (2H, k, J = 7.2 Hz, O-CH₂-eH₃), 5.06 (1H, m, CH-NH), 5.22 (1H, br d, J \simeq 6.6 Hz, CH-NH), 8.05 (1H, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. (500 MHz) δ 14.83 (k, OCH₂-eH₃), 22.19 (k, CH-eH₃), 28.67 (k, 3x, C(CH₃)₃), 49.20 (d, CH-NH), 61.48 (t, O-CH₂-eH₃), 80.20 (s, C(CH₃)₃), 126.62 (d, C-5), 146.52 (s, C-2), 154.14 (8, N-CO-Q), 160.54 (s, C-4), 174.03 (s, CO-QEt); m/z 300 (3, M⁺), 255 (7, M⁺-QCH₂CH₃), 244 (73, MH⁺-e(CH₃)₃); MS(EI): Akkurate massa m/z 300.1137 (M⁺, bereken 300.1144 vir C₁₃H₂₀N₂O₄S₁)'

Etiel 118-24N-t-blitoksikarbonieI-1'-amino-3'-m<.tielhntieIltiasool-4-kARBOKSIELSUUR (246f)

Opbrengs 90%; R_f = 0.58 (heksaan:etiel asetaat 3:2); Smp. 92°C (Lit. ¹¹² smp. 92°C); $[\alpha]_D^{23} -44.0^\circ$ (c 5.8, chloroform); ν_{maks} 3440 (N-H), 1714 (C=O), 1167 (C-Q-e) em-I; IH-k.m.r. δ 0.93 (3H, d, J = 6.2 Hz, CH₃-4'), 0.95 (3H, d, J = 6.2 Hz, CH₃-1''), 1.36 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂-eH₃), 1.40 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.70 (2H, m, CH-eH₂-eH), 1.90 (1H, ill, CH(CH₃)₂), 4.37 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-eH₂-eH₃), 5.02 (1H, m, CH-NH), 5.06 (1H, d, J = 8.6 Hz, CH-NH), 8.04 (1H, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. δ 14.43 (k, OCH₂-eH₃), 21.75 (k, CH₃-4'), 23.06 (k, CH₃-1''), 24.96 (d, CH(CH₃)₂), 28.36 (k, 3x, C(CH₃)₃), 44.44 (t, CH-CH₂-eH), 51.33 (d, CH-NH), 61.47 (t, O-CH₂-eH₃), 80.12 (s, C(CH₃)₃), 126.95 (d, C-5), 147.19 (s, C-2), 155.05 (s, N-CO-Q), 161.30 (s, C-4), 175.91 (s, CO-QEt); $tn] \gg 342$ (13, M⁺), 297 (19,

$M^{+}-oCH_2CH_3$, 286 (72, $MH^{+}-G(CH_3)_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 342.1637 (M^{+} , bereken 342.1613 vir $C_{16}H_{26}N_{2}O_4S_1$)'

Die bereiding van die rasemiese analoe van bostaande tiasoolaminosuurderivate (246a-f) is volgens die standaard Hantzsch-reaksie kondisies (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.4) berei. Die analyses van dié verbindings is identies aan dié van die opties suiwer analoe, behalwe die spesifieke optiese rotasies wat vanwee die rasemiese aard van die verbindings baie laag is.

5.10 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.10

γ -Bensiel-*R*-glutamaat (*R*-250)

Die bereiding van die koper(II)sout van die *R*--glutamiensnurkoper(II)-kompleks tetrahidraat (*R*-251*c*):

'n Oplossing van koper(II)asetaat monohidraat (9.926 g, 49.72 mmol) in water (130 ml) is drupsgewys oor 'n tydperk van 1 uur by 'n meganies geroerde oplossing van *R*-glutamiensuur (*R*-247, 7.0 g, 47.58 mmol) in water (45 ml) by 70°C gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 3 dae by kamertemperatuur geroer om volledige presipitasie van *R*-251*c* te verkry. Die produk is gelsoleer deur filtrasie en die presipitaat is gewas met water (1x20 ml), etanol (1x20 ml) en eter (1x20 ml). Droging van die presipitaat by 50°C vir 24 uur *in vacuo* het *R*-251*c* as 'n fyn blou poeier in 'n opbrengs van 94.6% (11.0 g) gelewer.

Die bereiding van die N,N,N',N'-tetrametielguanidiniumsout van die *R*-glutamiensnurkoper(II)kompleks (*R*-252):

N,N,N',N'-Tetrametielguanidien (2.77 ml, 22.01 mmol) is drupsgewys oor 'n tydperk van 30 minute by 'n geroerde mengsel van die koper(II)sout van die *R*-glutamiensnurkoper(II)kompleks tetrahidraat (*R*-251*c*, 2.7 g, .552 mmol) en *R*-glutamiensuur (*R*-247, 1.62 g, 11.04 mmol) in dimetielformamied (10 ml) en water (1.6 ml) gevoeg. Na die oplos van al die vaste stowwe (~ 3 uur) is die reaksiemengsel met 'n dimetiel-

formamied/water (9/1) mengsel (30 ml) verdun. Geen poging is aangewend om die produk (R-252) te isoleer nie.

Die bereiding van die γ -bensiel-*R*-glutamiensuurkoper(II)sout (R-253):

By 'n geroerde oplossing van die *R*-glutamiensuurkoper(II)kompleks (R-2.52), berei soos bo vermeld, is bensielbromied (2.75 ml, 23.18 mmol) bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 30 uur by kamertemperatuur meganies geroer, waartydens 'n blou pap gevorm het. Die O-gealkileerde produk (R-2.53) is nie gelseer nie, en is direk in die volgende stap gebruik.

Die bereiding van vry γ -bensiel-*R*-glutamaat (R-2.50):

Die blou pap, bevattende R-253, is na 'n versadigde waterige oplossing van die dinatriumsout van etileendiamlentetra-asynsuur (EDTA), vars berei deur die porsiege- wese byvoeging van etileendiamientetra-asynsuur (3.15 g) by 'n geroerde oplossing van natriumwaterstofkarbonaat (1.77 g) in water (21.5 ml), oorgedra. Die mengsel is hewig geroer totdat ontbinding van R-253 volledig plaasgevind het (~ 45 minute). Asetoon (10 ml) is bygevoeg om die ontbinding te versnel. Die mengsel is in yswater afgekoel en gefiltreer, waarna die kristalle met yskoue water (20 ml) gewas is. Herkristallisatie van die produk uit water het 7.90 g (70%) γ -bensiel-*R*-glutamaat (R-2.50) gelewer. Die geïsoleerde produk (R-2.50) is homogeen bewys deur die ($R_f = 0.56$, *t*-butanol:ysasynsuur:water 18:2:5). Smp. 176°C (Lit.²³⁵,²³⁶ smp. 174.5-176°C); $[\alpha]_D^{26} - 21.2^\circ$ (c 1.2, ysasynsuur).

γ -Bensiel-*S*-glutamaat (5-250)

Smp. 176°C (Lit.²³⁵,²³⁶ smp. 174.5-176°C); $[\alpha]_D^{25} + 19.9^\circ$ (c 2.1, ysasynsuur) (Lit.²³⁵ $[a]_D + 19.9^\circ$ (c 6.0, ysasynsuurj).

1-Bensiel-*N*-*t*-butoksikarboniel-5'-glutamaat (S-254)

Trietielarnien (11.73 ml) is by 'n hewig geroerde suspensie van γ -bensiel-*S*-glutamaat

(5-250, 5.0 g, 21.1 mmol) in droe dimetielformamied (10.5 ml) by kamertemperatuur gevoeg. Na byvoeging van di-t-butioldikarbonaat (9.21 g, 42.2 mmol) is die reaksiemengsel vir 30 minute by 60°C verhit, waartydens die uitgangsmateriaal (5-250) volledig opgelos het. Die vlugtige komponente is verwyder *in vacuo*, waarna die residu vir 10 minute met yskoue waterstofchloried (pH 2.15, 30 ml) behandel is. Die waterige fase is met etiel asetaat (5x150 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Chromatografie van die residu met etiel asetaat-metanol (93:7) as elueermiddel het 7.0 g (98.5%) van die N-t-Boc-derivaat (8-2.54) as In kleurlose stroop ($R_f = 0.24$, chloroform:metanol:water 100:10:1) gelewer. In Analitiese monster is uit metanol-eter by 0°C gekristalliseer. Smp. 64°C (Lit.²⁴³ smp. 65-66°C); $[\alpha]_D^{25} +12.9^\circ$ (c 2.2, chloroform); IH-k.m.r. (80 MHz) δ 1.42 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1.90-2.70 (4H, m, CH_2-CH_2), 4.30 un, m, $CH-NH$), 5.10 (2H, s, $CH_2-C_6H_5$), 5.20 (1H, m, $CH-NH$), 7.35 (5H, m, $CH_2-C_6H_5$), 8.55 (1H, br s, volledig uitruilbaar met D₂O, $CO-OH$).

1-Bensiel-N-I-butoksikarboniel-R-glutamaat (R-254)

Smp. 65°C (Lit.²⁴³ smp. 65-66°C); $[\alpha]_D^{19} -12.6^\circ$ (c 1.5, chloroform) {Lit.²⁴³ $[\alpha]_D^{25} -13.2^\circ$ (c 6.0, chloroform)}.

N-I-Butoksikarboniel-8-2-amin0-4-bpsieloksikarbonielhlltiramied (S-255)

Die verbinding (8-2.5.5) is ooreenkomstig die standaard prosedure vir die bereiding van karboksamiede (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.7) vanaf γ -bensiel-N-t-butoksikarboniel-5-glutamaat (8-254) in In opbrengs van 82% berei. Smp. 126-127°C (Lit.¹⁸⁸ smp. 122.5-124.0°C); $[\alpha]_D^{21} -8.6^\circ$ (c 1.9, chloroform), (Lit.¹⁸⁸ $[\alpha]_D^{25} -0.3^\circ$ (c 1.1, metanolj): vmaks 3400 (N-H), 3350 en 3180 (NH_2 doeblet), 1690 (C=O), 1180 (C-O-C) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 1.40 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1.80-2.70 (4H, m, CH_2-CH_2), 4.22 un, m, $CH-NH$), 5.09 (2H, s, $CH_2-C_6H_5$), 5.44 un, br d, J = 7.4 Hz, $CH-NH$), 5.96 un, br s) en 6.47 (IR, br s) ($CO-NH_2$), 7.32 (SH, m, $CH_2-C_6H_5$); 13C-k.m.r. δ 27.89 (t, CH_2-eH_2O), 28.29 (k, 3x, $C(CH_3)_3$), 30.43 [t, CH_2-eH_2O), 53.19 Cd,

CH-NH), 66.55 (t, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$), 80.14 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 128.27 (d, 2x, CH van C_{6H_5}), 128.30 (d, CH van C_{6H_5}), 128.57 (d, 2x, CH van C_6H_5), 135.68 (s, C van C_{6H_5}), 155.75 (s, N-eO-O), 173.09 (s, CO-DBn), 174.16 (s, CO-NH₂); m/z 337 (1, MH⁺), 292 (11, M⁺-eONH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 336.1674 (M⁺, bereken 336.1685 vir C₁₇H₂₄N₂O₅)'

N-t-Butoksikarboniel-R-2-amin0--4-bensieloksikarbonielbutiramied (R-255)

Smp. 127°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +10.1^\circ$ (c 1.0, chloroform); MS(EI): Akkurate massa m/z 336.1678 (M⁺, bereken 336.1685 vir C₁₇H₂₄N₂O₅)'

N-t-Butoksikarboniel-5-2-amin0-4-bensieloksikarbonielhutirotioamied (S-256)

Die verbinding (5-256) is ooreenkomstig die standaard prosedure vir die bereiding van karbokstioamiede (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.7) vanaf N-t-butoksi-karboniel-5-2-amin0-4-bensieloksikarbonielbutiramied (S-255) in 'n opbrengs van 90.9% berei ($R_f = 0.38$, hekasaan:etiel asetaat 1:1); Smp. 133-134°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} -11.3^\circ$ (c 1.6, chloroform); ν_{maks} 3420 (N-H), 3300 en 3200 (NH₂, doeblet), 1700 (C=O), 1160 (C-o-e), 1050 (C=S) em-I; 1H- k.m.r. δ 1.34 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.80-2.70 (4H, m, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$), 4.42 (1H, dt, J = 7.5 Hz, CH-NH), 5.05 (2H, s, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$)' 5.48 (1H, br d, J = 7.5 Hz, CH-NH), 7.27 (5H, m, $\underline{\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5}$), 7.51 (1H, br s) en 7.88 (1H, br s) (CO-NH₂); 13C-k.m.r. δ 28.15 (k, 3x, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 30.27 (t, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$), 30.50 (t, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$), 58.41 (d, CH-NH), 66.39 (t, $\underline{\text{CH}_2-\text{e}_{6\text{H}_5}}$), 80.17 (s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 128.01 (d, 2x, CH van C_{6H_5}), 128.09 (d, CH van C_{6H_5})' 128.37 (d, 2x, CH van C_{6H_5}), 135.46 (s, C van C_{6H_5}), 155.48 (s, N-eO-O), 172.85 (s, CO-OBn), 208.37 (s, CS-NH₂); m/z 352 (2, M⁺), 292 (39, M⁺-GSNH₂); MS(EI): Akkurate massa m/z 352.1469 (M⁺, bereken 352.1457 vir C₁₇H₂₄N₂O₄S₁)'

N-t-Butoksikarboniel-R-2-amin0-4-bensieloksikarbonielbutirotioamied (R-256)

Smp. 134.5°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{22} +10.1^\circ$ (c 4.2, chloroform); MS(EI): Akkurate massa m/z 352.1463 (M⁺, bereken 352.1457 vir C₁₇H₂₄N₂O₄S₁)'

Etel 8-2={N-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-bensieloksikarbonielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur (8-257)

Die verbinding (8-2.57) is ooreenkomstig die gemodifiserde Hantzsch-reaksieondisies (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.9) vanaf N-f-butoksikarboniel-8-2-amin0-4-bensieloksikarbonielbutirotioamied (8-2.56) in 'n opbrengs van 91.9% berei. $R_f = 0.39$ (heksaan:etiel asetaat 4:3); Smp. 119-120^{oC} (Lit.¹⁸⁸ smp. 118-120^{oC}): $[\alpha]_D^{25} -36.6^\circ$ (c 2.4, chloroform); ν_{maks} 3440 (N-H), 1720 (C=O), 1180 (C-o-e) cm^{-1} ; IH-k.m.r. δ 1.36 (3H, t, J = 7.2 Hz, OCH_2-eH_3), 1.40 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 2.10-2.60 (4H, m, CH_2-eH_2), 4.37 (2H, k, J = 7.2 Hz, $O-eR_2-eH_3$), 5.04 (1H, m, $CH-NH$), 5.09 (2H, s, $CH_2-G_{6H_5}$), 5.47 (1H, br d, J = 7.5 Hz, $CH-NT-I$), 7.31 (5R, m, $CH_2-C_6H_5$), 8.05 (1H, s, tiasoolproton); 13C-k.m.r. δ 14.43 (k, OCH_2-CH_3), 28.35 (k, 3x, $C(CH_3)_3$), 30.56 (t, CH_2-eH_2), 30.69 (t, CH_2-CH_2-o), 52.59 (d, $CH-NH$), 61.47 (t, $O-eH_2-eH_3$), 66.62 (t, $CH_2-G_{6H_5}$), 81.10 (s, $C(CH_3)_3$), 127.20 (d, C-5), 128.23 (d, 3x, CH van C_6H_5), 128.54 (d, 2x, CII van C_6H_5), 135.63 (s, C van C_6H_5), 147.32 (s, C-2), 155.50 (s, $N-GO-o$), 161.17 (s, C-4), 172.69 (s, $CO-OBn$), 173.51 (s, $CO-oEt$); m/z 448 (8, M+), 392 (83, $MH^+ - e(CH_3)_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 448.1641 (M+, bereken 448.1668 vir C22H28N2O6S1).

Etel R-2-(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-bensieloksikarbonielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur (R-257)

Smp. 118-119^{oC} (Lit.¹⁸⁸ smp. 118-120^{oC}): $[\alpha]_D^{25} +48.6^\circ$ (c 0.8, chloroform); MS(EI): Akkurate massa m/z 448.1671 (M+, bereken 448.1668 vir C22H28N2O6S1).

Etel 8-2=fN-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-karboksielpropiel)tiasool-1-karboksielsuur (8-258)

'n Mengsel van etiel 8-2-{N-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-bensieloksikarbonielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur (8-257, 750 mg, 1.67 mmol), ammoniumformiaat (527 mg, 8.36 mmol) en 10% palladium op koolstof (585 mg) in anhidriese metanol (30 ml) is vir 5 minute by 85^{oC} verhit. Gedurende die tylperk het volledige hidrolise van

die γ -bensiel substituent plaasgevind (dfe, heksaan:etiel asetaat 5:3). Die katalis is afgefiltreer (selliet) en die filtraat is ingedamp onder vermindcrde druk. Die γ -suur (5-258) is in 'n opbrengs van 95.9% (575 mg) vanuit etanol-heksaan gekristalliseer. Smp. 138°C; $[\alpha]_D^{25} -32.1^\circ$ (c 1.0, metanol); ν_{maks} (KBr) 3344 (N-H), 3400-2400 (O-H, breed), 1700 (C=O), 1237 (C-o-e) em-I; In-k.m.r. (DMSO- d_6) δ 1.27 (3H, t, J = 7.1 Hz, $\text{OCH}_2\text{-eH}_3$), 1.39 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.80-2.40 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-eH}_2$), 4.39 (2H, k, J = 7.1 Hz, $\text{O-eH}_2\text{-eH}_3$), 4.78 (1H, m, CH-NH), 7.86 (1H, br d, J = 7.8 Hz, CH-NH), 8.39 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. (DMSO- d_6) δ 19.39 (k, $\text{OCH}_2\text{-GH}_3$), 33.34 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 34.74 (t, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$), 35.91 (t, $\text{CH}_2\text{-eH}_2\text{-G}$), 57.58 (d, CH-NH), 65.89 (t, $\text{O-CH}_2\text{-eH}_3$), 83.79 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 133.96 (d, C-5), 151.01 (s, C-2), 160.59 (s, N-eO-G), 165.95 (s, C-4), 180.00 (s, CO-GEt), 181.01 (s, CO-GH); m/z 358 (9, M+), 330 (10, $\text{MH}^+-\text{C}_2\text{H}_5$), 302 (26, $\text{MH}^+-\text{C}(\text{CH}_3)_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 358.1193 (M^+ , bereken 358.1198 vir $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_1$)'

Etiel R-2--(N-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-karhoksielpropiel)tiasool-4-karhoksielsuur (R-258)

Smp. 138°C; $[\alpha]_D^{25} +36.3^\circ$ (c 0.5, metanol); MS(EI): Akkurate massa m/z 358.1210 (M+, bereken 358.1198 vir $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_1$)'

Etiel 5-2-fN-t-butoksikarboniel-1'-amino-3'-amidopropiel)tiasool-4-karhoksielsuur (5-259) (N-t-Boc-S-(Gln)Thz-OEt)

Die verbinding (5-259) is ooreenkomstig die standaard prosedure vir die bereiding van karboksamiede (sien Eksperimenteel van Afdeling 2.7) vanaf etiel 5-2-(N-t-butoksi-karboniel-1'-amino-3'-karboksielpropiel)tiasool-4-karboksielsuur (S-258) in 'n opbrengs van 88.8% berei. In hierdie geval egter is dimetielformamied in plaas van dimetoksieraan as oplosmiddel gebruik vanwee die onoplosbaarheid van die uitgangsmateriaal ($R_f = 0.32$, etiel asetaat:metanol 95:5); Smp. 143°C; $[\alpha]_D^{25} -31.9^\circ$ (c 1.4, chloroform); ν_{maks} 3400 (N-H), 3340 en 3190 (NH_2 , doeblet), 1720 (C=O), 1180 (C-G-e) em^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 1.36 (3H, t, J = 7.1 Hz, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 1.40 (9H, s,

$\text{C}(\text{CH}_3)_3$, 2.10-2.50 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 4.36 (2H, k, $J = 7.1 \text{ Hz}$, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 5.00 (1H, m, CH-NH), 5.68 un, br s) en 6.22 (1H, br s) (CO-NH_2), 5.94 (1H, br d, $J = 7.1 \text{ Hz}$, CH-NH), 8.04 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. δ 14.45 (k, $\text{OCH}_2\text{-CH}_3$), 28.36 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.15 (t, $\text{CIT}_2\text{-CH}_2\text{O}$), 32.05 (t, $\text{CII}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 52.84 (d, CH-NH), 61.53 (t, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$), 80.38 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 127.31 (d, C-5), 147.07 (s, C-2), 155.57 (s, N-CO-o), 161.22 (s, C-4), 173.80 (s, CO-oEt), 174.84 (s, CO-NH_2); m/z 357 (3, M^+), 301 (74, $\text{MH}^+\text{-C}(\text{CH}_3)_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 357.1346 (M^+ , bereken 357.1358 vir $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_1$)'

Etietl R-2-dN-t-butoksikaroonieI-1'-amino-3'-amirpropiel)tiasool-4-karboksieel-suur (R-259) (N-t-Boc-R=fGln)Thz-0Et)

Smp. 142°C ; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +34.1^\circ$ (c 1.5, chloroform); MS(EI): Akkurate massa m/z 357.1349 (M^+ , bereken 357.1358 vir $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_1$)'

5-2={N-t-ButoksikarbonieI-1'-amino-3'-amidopropiel)tiasool-4-karboksieel-suur (5-260) (N-t-Boc-S=(Gln)Thz)

'n Reaksiemengsel van etiel 5-2-(N-t-butoksikarbonieI-1'-amino-3'-amidopropiel)-tiasool-4-karboksieel-suur (S-259, 125 mg, 0.38 mmol) en 1 N natriumhidroksied (0.38 ml) in dioksaan (2.5 ml) en water (2.5 ml) is vir 1.5 uur by kamertemperatuur meganies geroer. Die mengsel is met eter (1x15 ml) geekstraheer, waarna die waterige fase na oOC afgekoel is en na pH 2 met 3 N waterstofchloried aangesuur is. Die ontskermdesuur (5-260) het onmiddellik spontaan uitgekristalliseer en is geisoleer deur filtrasie. Die kristalle ($R_f = 0.24$, chloroform:metanol:water 100:10:1) is met water (1x5 ml) gewas en oornag gedroog *in vacuo*. Herkristallasie uit etanol-heksaan het 107 mg (85.6%) suiwer N-t-Boc-S-(Gln)Thz (8-260) gelewer. Smp. $169\text{-}170^\circ\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -35.8^\circ$ (c 2.7, dimetielformamied); ν_{maks} 3410 (N-H), 3357 en 3246 (NH_2 , doeblet), 3200 (O-H, breed), 1683 (C=O), 1166 (C-o-C) cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (DMSO-d_6) δ 1.38 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.80-2.30 (4H, m, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 4.73 (1H, m, CH-NH), 6.78 (1H, br s) en 7.29 (1H, br s) (CO-NH_2), 7.79 (1H, d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, CH-NH), 8.31 (1H, s, tiasool-

proton); ^{13}C -k.m.r. (DMSO- d_6) δ 28.10 (k, 3x, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.69 (t, $\text{CH}_2\text{-GH}_2\text{O}$), 31.18 (t, $\text{CH}_2\text{-eU}_2\text{-D}$), 52.51 (d, CII-NH), 78.48 (s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.18 (d, C-5), 146.86 (s, C-2), 155.27 (s, N-CO-G), 162.03 (s, C-4), 173.39 (s, CO-NH_2), 175.33 (s, CO-oH); m/z 329 (8, M^+), 312 (2, $\text{M}^+\text{-GII}$), 273, (30, $\text{MII}^+\text{-GCCH}_3$); MS(EI): Akkurate massa m/z 329.1026 (M^+ , bereken 329.1045 vir $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_1$).

R-2-(N-t-Butoksikarboniel-1'-amino-3'-amidopropiel)tiassoel-4-karboksielsuur

(*R-260*) (*N-t-Boc-R=!*Gln)Thz)

Smp. 169-170°C; $[\alpha]_D^{25} +38.5^\circ$ (c 1.4, dimetielformamied); MS(EI): Akkurate massa m/z 329.1054 (M^+ , bereken 329.1045 vir $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_1$).

Dunlaagchromatografiese resolusie van 5-260 en R-260 op chirale plate (sien Afdeling 2.7.2.b) is geredelik bewerkstellig.

- (i) Ontwikkelingsmedium - metanol:water:asetonitriël 50:50:200
- (ii) Sproeireagens - 0.1% ninhidrien, opgemaak met 0.1 g ninhidrien, 98 ml n-butanol of etanol en 1 ml ysasynsuur,
- (iii) Prosedure - Die chirale plate is vooraf vir 15 minute by 100°C verhit, waarna die monster ($\sim 2 \mu\text{L}$ van 'n 1% oplossing van die monster in metanol-/water) aangebring is. Na die skeiding is die plate gedroog en met die 0.1% ninhidriensproeireagens behandel. Verhitting van die plate vir 10 minute by 110°C bet die aminosure as rooi-bruin kolle teen 'n wit agtergrond gelewer.
- (iv) Resolusie - 5-260 : $H_f = 0.62$
R-260 : $H_f = 0.33$.

5.11 EKSPEIUMENTEEL VAN AFDELING 2.11

Die bereiding van etiel 1'S,2'5-2-(N-t-hlltoksikarboniel-1'-amino-2'-metielbutiel)tiasool-4-karboksielsuur (1'S,2'5-246b)(N-t-Boc-1'S,2'5-(Ile)Thz-GEt) volgens die gemodifiseerde Hantzsch-reaksiekonrlisies

Die prosedure vir die reaksie is volledig by die Eksperimenteel van Afdeling 2.9 bespreek. Smp. 103°C (Lit.¹¹² smp. 103°C); $[\alpha]_D^{17} -35.4^\circ$ (c 2.6, chloroform).

Die bereiding van N-t-Boc-1'R/S,2'S-(Ile)Thz-OEt (1'R/S,2'5-246b) volgens die standaard Hantzsch-reaksiekondisies

Die bereiding van 1'R/S,2'S-246b is soortgelyk aan die prosedure vir die standaard Hantzsch-reaksie beskryf in die Eksperimenteel van Afdeling 2.4 uitgevoer. Die produk (1'R/S,2'S-246b) is nie gekristalliseer nie, aangesien dit die diastereomeriese samestelling kon verander. Die twee diastereomere is nie chromatografies geskei nie.

$[\alpha]_D^{14} -7.9^\circ$ (c 1.2, chloroform). Die twee diastereomere (S-diastereomeer R-diastereomeer 1: 1) is met behulp van 1U-k.m.r.-analise vanuit die totale produk (1'R/S,2'5-246b) gekarakteriseer.

S-diastereomeer: 1H-k.m.r. δ 0.88 (3H, t, J = 7.3 Hz, CH₂-CH₃), 0.91 (3H, d, J = 6.6 Hz, CH-eH₃), 1.00-1.40 (2H, m, CH₂-CH₃), 1.38 (3H, t, J = 7.1 Hz, OCH₂-CH₃), 1.42 (9H, s, C(CH₃)₃), 2.00-2.40 (UI, m, Cn-eH₃), 4.39 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-CH₂-eH₃), 4.91 (1H, dd, J = 9.0 en J = 6.1 Hz, CH-NH), .532 (III, d, J = 9.0 Hz, CH-NH), 8.05 (1H, s, tiasoolproton)

R-diastereomeer: 1H-k.m.r. δ 0.81 (3II, d, J = 6.8 Hz, Cn-CH₃), 0.94 (3H, t, J = 7.6 Hz, CH₂-eH₃), 1.00-1.40 (2H, m, CH₂-CH₃), 1.38 (3II, t, J = 7.1 Hz, O-CH₂-CH₃), 1.44 (9H, s, C(CH₃)₃), 2.00-2.40 un, m, CH-eH₃), 4.39 (2H, k, J = 7.1 Hz, O-eH₂-eH₃), .504 (IH, dd, J = 9.0 en J = 4.5 Hz, CH-NH), .523 (UI, br d, J = 9.0 Hz, CH-NH), 8.05 (1H, s, tiasoolproton).

Die bereiding van *N-t-Boc-I'RIS,2'8-me)Thz-oEt* (246b) volgens die metode van Schmidt *et al.*¹³³

Etiel broompiruvaat (0.05 ml, 0.36 mmol) is by 'n meganies geroerde oplossing van *N-t-butoksika:rboniel-2S,38-2-arnino-3-metielpentantioamied* (201h, 80 mg, 0.33 mmol) in anhidriese aseton (of dlmetoksietaan) (0.8 ml) by -10°C gevoeg. Na 'n reaksietyd van 1 uur by DoC is die mengsel na 'n vinnig geroerde oplossing van chloroform (2 ml) en water (2 ml), versadig met kaliumwaterstofkarbonaat, oorgedra. Die organiese fase is afgeskei en die waterige fase is met chloroform (3x2 ml) gewas. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer en ingedamp onder verminderde druk. Die residu is onmiddellik in droe dichloormetaan (1 ml) opgelos en afgekoel na -20°C. Piridien (0.06 ml, 0.72 mmol) en trifluoorasynsuuranhidried (0.05 ml, 0.36 mmol) is bygevoeg terwyl die mengsel meganies geroer is. Die temperatuur is oor 'n tydperk van 1 uur na 00C laat opwarm. Die vlugtige komponente is versigtig verwyder *in vacuo* en die residu is in dichloormetaan (2 ml) opgelos. Die organiese fase is met waterige versadigde natriumbikarbonaat gewas tot pH 7, gevolg met koue waterige 1 N kaliumwaterstofsulfaat (1 ml). Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk. Die residuele stroop is op silika gechromatografeer (heksaan:etiel asetaat 7:3) om 89 mg (80%) suiwer tiasool (*I'R/S,2'8-246b*) te lewer. Die produk is nie gekristalliseer nie, aangesien dit die diastereomeriese samestelling kon verander.

N-t-Boc-I'RjS,2's-{Ile)Thz-0Et (246b) berei in aseton: $[\alpha]_{\text{D}}^{19} -31.9^{\circ}$ (c 0.7, chloroform); In die IH-k.m.r.-spektrum van die produk word die volgende duplisering van seine waargeneem: δ 4.89 (IH, dd, J = 8.6 en J = 6.0 Hz, CH-NH, *S*-diastereomeer (100%)), 4.90-5.25 (IH, m, eH-NH, *R*-diastereomeer (9.8%)).

N-t-Boc-I'RjS,2's-{Ile)Thz-oEt (216b) berei in dirnetoksietaan:

$[\alpha]_{\text{D}}^{19} -32.2^{\circ}$ (c 6.2, chloroform); In die IH-k.m.r.-spektrum van die produk word die volgende duplisering van seine waargeneem: δ 4.90 (IH, dd, J = 8.5 en J = 6.0 Hz, CH-NH, *S*-diastereomeer (100%)), 4.96-.5.10 (IH. m, CH-NH, *R*-diastereomeer

(7.8%)).

5.12 EKSPERIMENTEEL VAN AFDELING 2.12

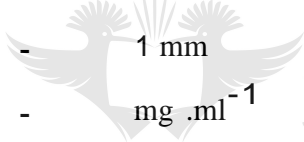
Op 'n eenvoudige manier kan sirkulere dichroïsme (S.D.) voorgestel word deur die verskil in die molekule absorpsiekoeffisient ϵ :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_{\ell} - \epsilon_{\tau}$$

$\Delta\epsilon$ is as volg bereken:

$$\Delta\epsilon = \frac{\text{piekhoogte} \times \text{sensitiwiteit} \times \text{molekulêre massa}}{\text{Konsentrasie} \times \text{padlengte} \times 33}$$

waar:

sensitiwiteit	-	0.002° cm ⁻¹	 UNIVERSITY OF JOHANNESBURG
padlengte	-	1 mm	
konsentrasie	-	mg .ml ⁻¹	
piekhoogte	-	eenheidsafstand waarmee S.D.-kurwe vanaf die basislyn afwyk (+ of -).	

Die SD-spektra is m.b.v, 'n Jaseo J-20 outomatiese spektropolarimeter te WNNR, Pretoria opgeneem.

5.13 EKSPERIMENTEEL VAN HOOFSTUK 3

Die aanvangsmateriaal *N-t-Boc-S-Leu*, *S-Pro-OMe.HCl* en *N-t-Boc-S-Val* is van die Sigma Chemical Company verkry. Kolomchromatografie is met Merck silikajel (70-230 mesh) of Sephadex LH-20 [Pharrnacia Fine Chemicals, AB, Uppsala, Swede) uitgevoer. Instrumentasie en droog van oplosmiddels is soortgelyk as in Afdelings 5.1 en .j.2 onderskeidelik beskryf. EI- en FAB-massaspektra is op 'n Finnigan Mat 312 instrument en 'n Varian MAT-212j.5-188 massaspektrometer

(Au-kroesies) bepaal, maar akkurate massabepalings is met 'n Micromass 7070 E of 'n Finnigan Mat 8200 dubbelfokuserende massaspektrometer bepaal. Elementanalises is deur die Mikro-analitiese laboratorium te WNNR, Pretoria, uitgevoer.

a. Eksperimenteel van Afdeling 3.1.2 : Die Sintese van siklo[B-Pro-8-(Gln)Thz::(Glv)Thz-S-Val-B-Leu] (46):

N-t-Boc-B-Leu-B-Pro-OMe (299)

By 'n afgekoelde (-23°C) en geroerde oplossing van *N-t-Boc-B-Leu* (298, 5.15 g, 22.3 mmol) in anhidriese tetrahydrofuraan (120 ml) is N-metielformolien (2.45 ml, 22.3 mmol) en isobutielchlorformiaat (2.89 ml, 22.3 mmol) respektiewelik onder 'n stikstofatmosfeer gevoeg. Na 'n reaksietyd van 15 minute by -23°C is 'n oplossing van S--Pro-OMe.HCl (297, 3.69 g, 22.3 mmol) in droe dimetielformamied (15 ml), gevolg deur N-metielformolien (2.45 ml, 22.3 mmol), bygedrup. Die reaksiefles is na 'n ysbad oorgedra en vir 16 uur meganies geroer. Die reaksiemengsel is na kamertemperatuur laat opwarm, deur selliet gefiltreer en die vaste stof met tetrahydrofuraan gewas. Die filtraat is ingedarnp en die residu is opgelos in etiel asetaat (325 ml). Die organiese fase is gewas met water (2 x 100 ml), 1% sitroensuur (2 x 100 ml), 2% natriumbikarbonaat (2 x 100 ml), versadigde sout (NaCl) water (1 x 100 ml) en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). Na verwydering van die oplosmiddel onder verminderde druk, is die residuele stroop gesuiwer deur chromatografie met etiel asetaat-metileenchloried (1:9 \rightarrow 1:3) as elueermiddel. Die fraksie met $R_f = 0.31$ (die, etiel asetaat:metileenchloried 1:5) is in 'n opbrengs van 80% (6.07 g) as 'n kleurlose stroop geïsoleer en as die dipeptiedderivaat 29.9 gekarakteriseer, $[\alpha]_D^{25} - 70.6^{\circ}$ (chloroform); ν_{max} cm^{-1} 3310, 2960, 1750, 1710, 1650, 1513 br, 1437 br, 1170, 1050 en 1025 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 0.96 (3H, d, $J = 5$ Hz, CHCH_3), 1.03 (3H, d, $J = 5$ Hz, CHCH_3), 1.44 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.52 (1R, m, $\text{CR}(\text{CH}_3)_2$), 1.57-2.37 (6H, m), 3.58-3.99 (5H, m, -QMe singulet by δ 3.75), 4.35-1.69 (2H, m, asimmetriese waterstowwe), 5.19 (LII, d, $J = 9$ Hz, CH-NH). Bevredigende elementanalises is verkry na omskakeling na die ooreenkomstige hidrochloriesout (300).

B-Leu-B-Pro-OMe.HCl (300) : Metode A

By In oplossing van eter (3 ml) by OOC wat met droe waterstofchloried versadig is, is N-t-Boc-B-Leu-B-Pro-OMe (299, 200 mg, 0.58 mmol) met roering gevoeg. Die mengsel is laat opwarm na kamertemperatuur en geroer vir 15 minute, waarna dietiel-eter (30 ml) bygevoeg is en die resulterende wit presipitaat deur filtrasie geïsoleer is. Die presipitaat is eenmalig vanuit dichloormetaan-eter gekristalliseer om 140 mg (86%) van die hidroehloried 300 as kleurlose kristalle te lewer: Smp. 186-194 °C (ontbind); $[\alpha]_D^{25} -87.7^\circ$ (chloroform); ν_{maks} (KBr) 3340 br, 3280-2500 br, 1766, 1758, 1670, 1576, 1506, 1455, 1373 en 1178 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 1.02 (6H, 2x, d, $J = 5$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1.24-2.60 (7H, m), 3.51 (1H, m), 3.78 (3H, s, OMe), 3.96 (1H, m), 4.42 (1H, m, asimmetriese waterstof), 4.69 (1H, m, asimmetriese waterstof), 7.47-9.12 (3H, br s, $-\text{NH}_3^+$), $^{13}\text{C-k.m.r.}$ δ 22.16(k), 23.20(k), 24.24(d), 24.99(t), 29.05(t), 39.84(t), 47.35(t), 50.79(d), 52.19(k), 59.24(d), 168.88(s), 172.32(s); FAB massaspektrum m/z 243 (M-CI)+.

Bereken vir $\text{C}_{12}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_3$: C 51.70, H 8.32, Cl 12.72, N 10.05. Gevind: C 51.66, H 8.19, Cl 12.52, N 9.91.

Metode B

N-t-Boc-B-Leu (298, 4.88 g, 21.1 mmol) is opgelos in droe tetrahydrofuraan (100 ml) en onder inerte atmosfeer (N_2) afgekoel na -23°C . N-metiilmorfolien (2.32 ml, 21.1 mmol) is bygevoeg gevolg deur isobutiëlchloroformiaat (2.74 ml, 21.1 mmol). Na in reaksietyd van 15 minute by -23°C is 'n oplossing van S-Pro-oMe.HCl (297, 3.49 g, 21.1 mmol) in droe dimetielformamied (15 ml), sowel as N-metiilmorfolien (2.32 ml, 21.1 mmol), bygevoeg. Die reaksiefles is na 'n ysbad oorgedra en die reaksiemengsel is vir 18 uur geroer. Die reaksiemengsel is na kamertemperatuur laat opwarm, die oplossing gefiltreer deur selliet en die vaste stowwe gewas met tetrahydrofuraan. Die filtraat is ingedamp onder verminderde druk en die residu is opgelos in etiel asetaat (300 ml). Die organiese fase is opeenvolgens gewas met water (2 x 100 ml), 1% sitroensuur (2 x 100 ml), 2% natriumbikarbonaat (2 x 100 ml), versadigde sout (NaCl) water

(1 x 100 ml) en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). Die oplosmiddel is afgedamp *in vacuo*, waarna die resulterende olie (6.7 g) opgelos is in 'n versadigde oplossing van waterstofchloried in etieleter (75 ml) by DoC. Na 'n reaksityd van 10 minute by OoC en 15 minute by kamertemperatuur (monitor met dte) is etieleter (400 ml) bygevoeg met gepaardgaande onmiddellike presipitasie. Die mengsel is vir 1 uur by DoC gelaat, waarna filtrasie gevolg deur was van die kristalle met etieleter, 4.02 g (68%) van die hidrochloried 300 gelewer het (eenmalig vanuit dichloormetaan-eter gekristalliseer). Hierdie monster is m.b.v. analise as identies aan die produk deur bostaande metode A verkry, bewys.

N-t-Boc-B-Val-S-Leu-S-Pro-OMe (302)

By 'n geroerde oplossing van N-t-Boc-B-Leu-B-Pro--OMe (299, 4.37 g, 12.76 mmol) in dichloormetaan (22 ml) by OoC is trifluorasynsuur (22 ml) drupsgewys gevoeg. Die oplossing is na kamertemperatuur laat opwarm en vir 40 minute meganies geroer. Koolstoftetrachloried (25 ml) is bygevoeg, waarna die vlugtige komponente onder verminderde druk verwyder is. Die byvoeging van koolstoftetrachloried (25 ml) en verwydering van die vlugtige komponente *in vacuo* is nog twee maal herhaal om die oormaat trifluorasynsuur te verwyder. Die resulterende dik stroop (B-Leu-S-Pro.TFA) is *in vacuo* vir 1 uur gedroog.

'n Meganies geroerde oplossing van N-t-Boc-B-Val (301, 2.52 g, 11.6 mmol) in droe tetrahydrofuraan (60 ml) onder 'n stikstof atmosfeer is afgekoel na -23°C , waarna N-metielformolien (1.28 ml, 11.6 mmol) en isobutielchlorformiaat (1.50 ml, 11.6 mmol) bygevoeg is. Na 'n reaksityd van 15 minute by -23°C is bogenoemde bereide dipeptied (299) trifluorasetaatsout in droe dimetielformamied (20 ml) opgelos, waarna N-metielformolien (1.28 ml, 11.6 mmol) bygevoeg is. Die reaksiefles is na 'n ysbad oorgedra en die reaksiemengsel vir 16 uur meganies geroer waartydens die mengsel na kamertemperatuur opgewarm het. Die oplossing is gefiltreer deur selliet, die vaste star gewas met tetrahydrofuraan en die filtraat gekonsentreer na 'n stroop *in vacuo*. Die

residuele stroop is opgelos in etiel asetaat (300 ml) en die organiese fase is gewas met water (1 x 100 ml), 1% sitroensuur (2 x 100 ml), 1% natrinmbikarbonaat (2 x 100 ml), versadigde sout (NaCl) water (1 x 100 ml) en gedroog (anhidriese natriurnsulfaat). Na afdamping van die oplosmiddel onder verminderde druk is die residuele geel stroop gechromatografeer met etiel asetaat-dichloormetaan (1:5 → 1:2 → 1:1) as elueermiddel. Die fraksies met $R_f = 0.30$ (*dec*, etiel asetaat:dichloormetaan 1:2) is geïsoleer en verwydering van oplosmiddel het 2.4 g (27%) as 'n wit vaste stof gelewer. Pogings om die produk uit 'n verskeidenheid van oplosmiddels te kristalliseer was onsuksesvol. Smp. 76-79°C; $[\alpha]_D^{25} -73.4^\circ$ (chloroform); $^1\text{H-k.m.r. } 0.8.5-1.08$ (12H, m), 1.46 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.60 (1H, m), 1.88-2.39 (7H, m), 3.60-4.10 (5R, m, OMe singulet by δ 3.77), 4.40-4.73 (2H, m, asimmetriese waterstowwe), 4.67 (1H, m, asimmetriese waterstof), 5.11 (1H, d, $J = 9$ Hz, CH-NH), 6.64 (1H, d, $J = 9$ Hz, CH-NH); $^{13}\text{C-k.m.r. } \delta$ 17.7(k), 19.3(k), 21.9(k), 23.3(k), 24.6(d), 25.0(t), 28.3(k), 29.0(t), 31.3(d), 41.8(t), 46.9(t), 49.1(d), 52.2(k), 58.8(d), 60.0(d), 79.8(s), 155.7(s), 171.0(s), 171.50(s), 172.4(s); FAB massaspektrum m/z 442 (M+H)⁺;
Bereken vir C₂₂H₃₉N₃O₆ : C .59.84, H 8.90, N 9.52. Gevind: C .59.77, H 8.88, N 9.59.

B-Val-S-Leu-S-Pro-OMe.HCl (303):

Metode A

By 'n geroerde oplossing van N-t-Boc-B-Val-B-Leu-S-Pro-OMe (302, 1.67 g, 3.8 mmol) in droe etieleter (40 ml) by oOC is 'n versadigde oplossing van droe waterstofchloried in eter (20 ml) met roering gevoeg. Die mengsel is laat opwarm na kamertemperatuur en geroer vir 1.5 uur, waarna die vaste stowwe deur filtrasie verwyder is, gewas is met water en geherkristalliseer is vanuit etiel asetaat-metanol-pentaaan om 0.4 g van die hidrochloried 303 te lewer. Addisionele versadigde droe waterstofchloried in eter (10 ml), gevoig deur pentaaan, is by die filtraat gevoeg totdat 'n wolkerigheid waargeneem is. Die reaksiemengsel is oornag gelaat by kamertemperatuur, die vaste stof verwyder deur filtrasie, gewas met eter en eenmalige vanuit etiel asetaat-metanol-pentaaan geherkristalliseer om 0.99 g kleurlose kristalle in 'n totale opbrengs van 1.39

g (303,98%) te lewer. Smp. 221-229^{oC} (ontbind); $[\alpha]_D^{25} -81.2^{\circ}$ (chloroform); v_{maks} (KBr) 3490 br, 3370, 2990, 1756, 1695, 1658, 1547, 1499 en 1477 cm⁻¹; ¹H-k.m.r. δ 0.88-1.24 (12H, m), 1.31-2.56 (SB, m), 3.40-4.11 (6H, m, bevat OMe singulet by δ 3.74), 4.53 (LH, m, asimmetriese waterstof), 4.83 (IH, m, asimmetriese waterstof), 8.01, (IH, d, J = S Hz, CH-NH), 8.21-9.24 (3H, br s, -NH₃), ¹³C-k.m.r. δ 16.68(k), 18.91(k), 22.06(k), 23.23(k), 24.60(d), 25.05(t), 29.08(t), 30.35(d), 40.52(t), 47.18(t), 49.59(d), 52.23(k), 59.17(d), 60.05(d), 167.61(s), 170.89(s), 172.71(s); FAB massaspektrum m/z 342 (M-GI)+; Bereken vir C₁₇H₃₂ClIN₃O₄: C 54.03, H 8.54, Cl 9.38, N 11.12. Gevind: C 53.76, H 8.61, Cl 9.57, N 10.91.

Metode B

N-t-Boc-S-Val (301, 2.34 g, 10.8 mmol) is opgelos in droe tetrahydrofuraan (50 ml) en afgekoel na -23^{oC} met magnetiese roering onder 'n stikstofatmosfeer. N-metielmorfolien (1.18 ml, 10.8 mmol) en isobutielchloroformiaat (1.40 ml, 10.8 mmol) is by die oplossing gevoeg. Na 'n reaksietyd van 15 minute by -23^{oC} is 'n oplossing van S-Leu-S-Pro-OMe.HCl (300, 3.00 g, 10.8 mmol) in 'n mengsel van droe dimetielformamied (10 ml) en droe chloroform (10 ml) bygevoeg, gevolg deur N-metielmorfolien (1.18 ml, 10.8 mmol). Die reaksiefels is na 'n ysbad oorgedra. Na 'n reaksietyd van 18 uur, waartydens die mengsel na kamertemperatuur laat opwarm is, is die oplossing gefiltreer en die vaste stof met tetrahydrofuraan gewas. Die filtraat is ingedamp en die residuele stroop is in etiel asetaat (2.50 ml) opgelos. Die organiese fase is gewas met water (2 x 75 ml), 1% sitroensuur (2 x 75 ml), 2% natriumbikarbonaat (2 x 75 ml), versadigde sout (NaCl) water (2 x 75 ml) en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). D \acute{e} het op een kol, R_f = 0.30 (etiel asetaat:dichloormetaan 1:2), gedui. Na verwydering van die vlugtige komponente onder verminderde druk, is die amorfe wit poeier (4.53 g) in 'n versadigde oplossing van waterstofchloried in eter (35 ml) by OoC opgelos. Die mengsel is vir 10 minute by DoC en 23 minute by kamertemperatuur geroer (gemonitor met dzc), waarna etieleter (200 ml) bygevoeg is en die mengsel vir 1.5 uur by OoC gestoor is om volledige presipitasie te bewerkstellig. Na verwydering (filtrasie) en was

(etieleter) van die vaste stof, het eenmalige kristallisatie vanuit etiel asetaat-metanol-pentaan die hidrochloried 303 in 'n opbrengs van 86% (3.52 g) gelewer. Hierdie monster is m.b.v. analise as identies aan die produk deur bostaande metode A verkry, bewys.

N-t-Boc-(Gly)Thz-S-Val-5-Leu-5-Pro-OMe (304)

N-t-Boc-(Gly)Thz (112, 1.16 g, 0.45 mmol) is opgelos in droe tetrahydrofuraan (20 ml) en N-metielmorfolien (0.47 ml, 0.47 mmol) is bygevoeg. Die mengsel is afgekoel na -23°C . Isobutielchlorformiaat (0.69 ml, 0.47 mmol) is bygevoeg en na 3 minute, N-hidroksisuksienimied (494 mg, 0.47 mmol). Die mengsel is na kamertemperatuur laat opwarm. Na 'n reaksietyd van 12 uur is die mengsel gefiltreer om die gepresipiteerde materiaal te verwyder. Die vaste stof is met tetrahydrofuraan gewas en die gekombineerde filtraat gekonsentreer *in vacuo*. Die residuele geel stroop is opgelos in droe tetrahydrofuraan (20 ml) en droe dimetielformamied (4 ml) en N-metielmorfolien (0.47 ml, 0.47 mmol) is bygevoeg. Terwyl die oplossing meganies geroer is by kamertemperatuur, is fyn verdeelde S-Val-S-Leu-S-Pro-OMe.HCl (303, 1.5 g, 4 mmol) porsiegewys oor 'n tydperk van 5 minute bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 16 uur by kamertemperatuur geroer. Die oplosmiddels is verwyder *in vacuo* en die residu opgelos in chloroform (200 ml). Die chloroformoplossing is gewas met 3% sitroensuur (3 x 10 ml), waterige natriumbikarbonaat (2 x 10 ml) en water (1 x 10 ml) en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). Die oplosmiddel is verwyder *in vacuo* en die residuele stroop op silika (100 g) gechromatografeer. Eluering met 2.5% metanol in chloroform het die beskermde tetrapeptied (304, 1.98 g, 86%) as 'n kleurlose skuim gelewer. Smp. 111-113°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -62.2^{\circ}$ (c 2, metanol); ¹H-k.m.r. δ 0.85 (3H, d, J = 6.9 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 0.89 (3H, d, J = 7.5 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 0.90 (3H, d, J = 6.7 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 0.93 (3H, d, J = 7.0 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 1.43 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.55 (2H, m, $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-GH}}$), 1.80-2.30 (6H, m) ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-eH}_2\text{N}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH}(\text{CH}_3)_2}$ en $\underline{\text{CH-CH}(\text{CH}_3)_2}$), 3.60 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GHa=NCO}}$), 3.73 (3H, s, $\underline{\text{OMe}}$), 3.85 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CHb=NCO}}$), 4.50-5.11 (3H, 3x, m, $\underline{\text{CH-N-eO}}$), 4.6.5 (2H, d, J = 6.0 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NHCO}}$), 6.8.5 (1H, br t, J = 6.0 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-}}$

NH), 6.90 (1H, br d, J = 8.0 Hz, CII-NH-eO), 7.52 (1H, br d, J = 7.0 Hz, CH-NH-CO), 8.18 UN, s, tiasoolproton); ¹³C-k.m.r. δ 18.1(k), 19.4(k), 22.0(k), 23.3(k), 24.6 (t), 25.0(d), 18.4(k, 3x), 29.0(t), 31.6(d), 41.6(t), 42.5(t), 46.9(t), 49.2(d), 52.2(k), 58.3(d), 58.8(d), 80.6(s), 124.2(d), 149.4(s), 155.6(s), 160.9(s), 169.3(8), 170.9(8), 171.1(s), 172.5(s); EI m/z 581 (1+); MS(EI): Akkurate massa *ta*» 581.2856 (M⁺, bereken 581.2883 vir C₂₇H₄₃N₅O₇S₁)'

N-t-Boc-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu-S-Pro-OMe (305)

'n Meganies geroerde oplossing van N-t-Boc-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu-S-Pro-OMe (304, 510 mg, 0.88 mmol) in droe dichloornetaan (3 ml) is afgekoel na 0°C en tri-fluorasynsuur (3 ml) is drupsgewys bygevoeg. Die reaksiemengsel is vir 15 minute by 0°C geroer, waarna dit na kamertemperatuur laat opwarm is. Na 'n reaksietyd van 1 uur is die mengsel verdun met droe koolstoftetrachloried (20 ml) en die vlugtige komponente verwyder onder verminderde druk. Die residuele tetrapeptied (304) trifluorasetaat is oornag gedroog *in vacuo*. By'n oplossing van (Gly)Thz-S-Val-S-Leu-S-Pro-OMe.TFA in droe dimetielformamied (1.5 ml) is N-t-Boc-S-(Gln)Thz (5-260, 318 mg, 0.97 mmol) gevoeg en die mengsel is afgekoel na 0°C. Dietielfosforielsianied (292, 0.15 ml, 0.97 mmol) en trietielamien (0.27 ml, 1.94 mmol) is drupsgewys bygevoeg. Na 'n reaksietyd van 1 uur by 0°C is die reaksiemengsel laat opwarm na kamertemperatuur en na 'n verdere 4 uur is die mengsel verdun met etiel asetaat (20 ml). Die organiese fase is geëkstraheer met 5% waterstofehloried (1 x 15 ml), waterige kaliumbikarbonaat (1 x 15 ml) en versadigde sout (NaCl) oplossing (1 x 15 ml) en gedroog (anhidriese natriumsulfaat). Die vlugtige komponente is verwyder onder verminderde druk. Chromatografie van die residuele stroop op silika (etiel asetaat + 5% metanol) het 305 (H_f = 004.5, chloroform:metanol:water 100:10:1) in 'n opbrengs van 91% (633 mg) as 'n wit amorfe poeier gelewer. Die beskermde pentapeptied (305) is eenrnalig vanuit etiel asetaat-heksaan gepresipiteer. Smp. 131-132°C; [α]_D²¹ -52.5° (C 2.8, chloroform); ν_{rnaks} 3400, 3300 br, 3000, 2980, 1740, 1650 br, 1540, 1490, 1450, 1370, 12-10 br en 1170 em-I; 1H-k.m.r. δ 0.90 (3H, d, J = 6.6 Hz, CHCH₃), 0.93 (3R,

d, J = 6.3 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 0.95 (3H, d, J = 6.2 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 0.99 (3H, d, J = 5.4 Hz, $\underline{\text{CHCH}_3}$), 1.42 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.60 (2fT, m, $\underline{\text{CH-CH}_2\text{-eH}}$), 1.80-2.50 (10H, m) ($\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{N}}$, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2}$, $\underline{\text{CH-CH}(\text{CH}_3)_2}$, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CONH}_2}$), 3.60 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_a\text{-NCO}}$), 3.69 (3H, s, $\underline{\text{OMe}}$), 3.85 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-eHb-NCO}}$), 4.31 (2H, d, J = 5.5 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NHCO}}$), 4.40-5.11 (4H, 3x, m, $\underline{\text{CH-NH}}$), 5.92 (1H, br s) en 6.39 (1H, br s)($\underline{\text{CONH}_2}$), 6.18 (1H, br d, J = 8.1 Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 7.43 **un**, br d, J = 7.8 Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 7.93 (1H, br d, J = 9.3 Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 8.33 **un**, s, tiasoolproton), 8.35 (1H, s, tiasoolproton), 8.35 (1H, br t, J = 5.5 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$); $^{13}\text{C-k.m.r. } \delta$ 18.38(k), 19.36 (k), 21.79(k), 23.27(k), 24.55(d), 24.91(t), 28.30(k,3x), 28.96(t), 30.44(t), 31.78(t), 31.78(d), 40.87(t), 41.02(t), 46.92(t), 49.23(d), 52.24(k), 52.59(d), 58.40(d), 58.77(d), 80.28(s), 124.00(d), 124.67(d), 148.50(s, 2x), 155.61(s), 160.72(s), 161.23(s), 167.97(s), 171.22(s), 171.31(s), 172.32(s), 173.44(s), 174.87(s); MS (EI) : Akkurate massa m/z 792.3311 (M⁺, bepaal 792.3298 vir C₃₅H₅₂N₈O₉S₂)'

Siklo [S-Pro-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Leu] (46)

Die pentapeptied metielester (**305**, 83 mg, 0.105 mmol) is opgelos in In mengsel van dioksaan (1 ml) en water (1 ml). IN Natriumhidroksied (0.11 ml, 0.11 mmol) is bygevoeg en die reaksiemengsel is vir 3 uur by kamertemperatuur meganies geroer. Die mengsel is met eter (5 ml) verdun en die waterige fase is afgeskei. Die waterige fase is met yskoue 3N waterstofchloried aangesuur na pH 2 en onmiddellik met chloroform (3x8 ml) **geëkstraheer**. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat), gefiltreer (selliet) en ingedamp onder verminderde druk om **72 mg** (88.3%) van die ontskermdde suur (**306**) as 'n amorfe wit poeier te lewer. Na 'n eenmalige presipitasie vanuit etanol-eter het **306** 'n smeltpunt van 164°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{21} -49.4^\circ$ (c 1.0, metanol).

Die ontskermdde pentapeptiedsuur (**306**, 72 mg, 0.093 mmol) is in droe dimetoksietaan (1 ml) en droe dimetielformamied (0.5 ml) opgelos en na -20°C afgekoel. By die meganies geroerde oplossing, onder 'n inerte atmosfeer (N₂), is pentafluoorfenol (17

mg, 0.093 mmol) en N,N'-disikloheksielkarbodiïmied (19 mg, 0.093 mmol) gevoeg en die reaksiemengsel is oornag laat opwarm na kamertemperatuur. Na filtrasie deur selliet (gewas met 5 ml droe dimetoksietaan) en verwydering van die vlugtige komponente *in vacuo* by kamertemperatuur, is die residuele stroop op Sephadex LH-20 (in chloroform) gechromatografeer om byna, suiwer (> 95% volgens dlc) pentafluoorfenielester (307, 76 mg, 87%) as 'n kleurlose stroop ($R_f = 0.37$, etiel asetaat + 7% metanol) te lewer. Hierdie reaktiewe verbinding is sonder enige verdere suiwering en droging direk in die volgende reaksie gebmik.

Die pentafluoorfenielester (307, 76 mg, 0.081 mmol) is met trifluoorasynsuur (3 ml) vir 1 uur by 0°C laat reageer. Die reaksiemengsel is verdun met koolstoftetrachloried (10 ml) en die vlugtige komponente verwyder *in vacuo*. Na herhaling van hierdie procedure (koolstoftetrachloried, 10 ml) is die residuele stroop van die pentapeptiedtrifluoorasetaat vir 2 uur *in vacuo* (308) gedroog. In Oplossing van die trifluoorasynsuursout (308) en droe dioksaan (10 ml) is oor 'n tydperk van 1 uur m.b.v. In motoraangedrewe spuit by 'n hewig geroerde mengsel van dioksaan (22,1 ml), i-butanol (11 ml) en 4-pirrolidinopiridien (11.9 mg, 0.081 mmol) by 95°C gevoeg. Die reaksiemengsel is vir 'n verdere 2.5 uur by die temperatuur hewig gercer, waarna dit na kamertemperatuur laat afkoel is. Die reaksiemengsel is filtreer deur selliet en die filtraat ingedamp onder verminderde druk. Na droging *in vacuo* is die residuele stroop opeenvolgens op Sephadex LH-20 (in chloroform) en silika (etiese asetaat + 7% metanol) gechromatografeer om die sikliese pentapeptied (46, 38 mg, 71%) as 'n amorfe wit poeier te lewer. Na presipitasie vanuit etiel asetaat-hekasaan het dit srop, 129-130°C; $R_f = 0.42$ (chloroform:metanol:water 100:10:1); $[\alpha]_D^{24} -147.4^\circ$ (c 1.4, chloroform); ν_{maks} 3390, 3275 br, 3000, 2980, 1670, 1645, 1540, 1490 en 1440 cm^{-1} ; IR-k.m.r. 00.80-1.20 (12H, m, 4 x CH_3), 1.20-2.90 (12H, m), 3.35-3.80 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-NCO}$), 4.20-.5.60 (6H, m, 4 x CH-NO + $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), .5.64 (1H, br s), en 5.78 en 6.41 (totaal 1H, br s) (CO-NH_2), 7.47, 7.62, 7.82, 7.98, 8.55 en 8.90 (totaal 4H, d, NH-eO), 8.06 un, m) en 8.08 (1H, m) (2x, tiasoolprotone): ^{13}C -k.m.r. δ 18.24(k), 19.09(k), 21.92(k), 22.94(k), 24.81(d),

24.95(t), 28.27(t), 29.11(t), 29.93(d), 31.59(t), 40.61(t), 41.12(t), 47.51(t), 50.8S(d), 52.23(d), 53.51(d), 55.73(d), 59.02(d), SO.23(s), 123.75(d), 123.S4(d), 124.S1(d). 124.91 (d), 148.13(8), 14S.26(s), 149.40(s), 150.07(s), 159.94(s), 160.17(s), 160.70(s), 161.46(s), 164.95(s), 166.52(s), 16S.33(s), 169.41(s), 170.12(s), 170.50(s), 170.S1(s), 172.69(s), 173.28(s), 173.S0(s), 174.01(s); MS(EI) m/z 660 (M+); MS(EI): Akkurate massa m/z 660.2503 (M^+ , bereken 660.2512 vir C₂₉H₄₀NS₀S₂)'

b. Eksperimenteel van Afdeling 3.1.3

i) Die sintese van siklo[S-Pro-S-Leu-R=(Gln)Thz-(Glv)Thz-S-Vall (R-266):

N-t-Boc-S-Leu-oMe (310)

Tionielchloried (10.9 ml, 0.15 mol) is drupsgewys by absolute metanol (150 ml) by OoC gevoeg. *N-t-Eoc-S-Leu* (13.12 g, 0.1 mol) is by die mengsel gevoeg, waarna dit vir 3 uur onder terugvloei verhit is. Die reaksiemengsel is laat afkoel na kamertemperatuur en die vlugtige komponente is verwyder *in vacuo*. Die metielester (310) is vanuit dirnetoksietaan gekristalliseer in 'n opbrengs van 97% (14.0S g). Smp. 130°C; $[\alpha]_D^{21} +19.3^\circ$ (c 6.2, metanol); ¹H-k.m.r. (CD₃-GD) (50 MHz) δ 0.53 (6H, d, 2x, J = 5.0 Hz, CH(CH₃)₂), 1.63 (2H, m, CH-eTI₂), 3.68 (3TI, s, OCH₃), 3.90 (1H, t, J = 6.4 Hz, CH-NH₃⁺), 4.70 (3H, br s, CH-NH₃⁺); MS : m/z 146 (5, M+); MS(EI): Akkurate rnassa m/z 146.1199 (M+, bereken 146.1181 vir C₇H₁₆NI₀2)'

Die eksperimentele prosedures van die onderstaande reeks eksperimente word nie beskryf nie, omrede dit grootliks met dié aangegee in die Eksperimenteel van Afdeling 3.1.2 en die beskrywing van die sintese van siklo[S-Pro-S-Leu-s-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (S-266) ooreenkom.

N-t-Boc-5'-Pr({)-S-Leu-oMe (312)

Opbrengs: 73%; Smp. 121-122^oC (etiel asetaat-heksaan); R_f = 0.35 (etiel asetaat: heksaan 1:1); $[\alpha]_D^{22} -84.7^\circ$ (c 4.9, chloroform); ν_{rnaks} 3420, 3000, 2960, 1840, 17S0,

1750, 1680, 1510, 1400, 1370 en 1160 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (500 MHz) δ 0.85 (6H, d, 2x, $J = 4.0$ Hz, $\underline{\text{CH}(\text{CH}_3)_2}$), 1.42 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.45-1.60 (2H, m, $\underline{\text{CH-eH}_2\text{-eH}}$), 1.80-2.30 (4H, m, $\underline{\text{CH-eH}_2\text{-eH}_2}$), 2.29 (3H, m, $\underline{\text{CII}(\text{CH}_3)_2}$), 3.20-3.60 (2H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-NCO}}$), 3.67 (3H, s, $\underline{\text{OCH}_3}$), 4.21 (1H, br d, $J \approx 8.8$ Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 4.18 (1H, m, $\underline{\text{CH-eOOCH}_3}$), 4.50 (1H, dd, $J = 8.8$ en 3.6 Hz, $\underline{\text{CH-NCO}}$); ^{13}C -k.m.r. (500 MHz) δ 21.70(k), 22.70(k), 24.72(t), 25.8(d), 27.91(t), 28.16(k), 41.35(t), 46.88(t), 50.59(d), 51.99(k), 57.04(d), 80.29(s), 154.00(s), 168.63(s), 172.1(s); MS: m/z 342 (25, M^+); MS (EI): Akkurate massa m/z 342.2139 (M^+ , bepaal 342.2155 vir $\text{C}_{17}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_5$)

N-t-Boc-S-Val-S-Pro-S-Leu-oMe (313)

Opbrenings: 91.6%; Stroop; $R_f = 0.47$ (heksaan:etiel asetaat 3:7); $[\alpha]_D^{22} -71.4^\circ$ (c 3.2, chloroform); ν_{maks} 3420, 3300 br, 3000, 2980, 1740, 1700, 1680, 1630, 1500, 1440, 1370 en 1160 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (500 MHz) δ 0.87 (3H, d, $J = 5.9$ Hz, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 0.88 (3H, d, $J = 5.9$, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 0.90 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\underline{\text{CH-CH}_3}$), 0.96 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 1.40 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.45-1.65 (2H, m, $\underline{\text{CH-GH}_2\text{-CH}}$), 1.80-2.30 (5H, m, $\underline{\text{CH-CH}_2\text{CH}_2}$ en $\underline{\text{CH-eH}(\text{CH}_3)_2}$), 2.33 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH}(\text{CH}_3)_2}$), 3.55 (1H, ddd, $J = 9.9, 8.0$ en 4.30 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-eHa-NCO}}$), 3.68 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CHb-NCO}}$), 3.68 (3H, s, $\underline{\text{OCH}_3}$), 4.26 (1H, dd, $J = 10.4$ en 6.2 Hz, $\underline{\text{CH-eH-NH}}$), 4.48 (1H, ddd, $J = 8.9, 7.8$ en 5.2 Hz, $\underline{\text{CH-eOOCH}_3}$), 4.57 (1H, dd, $J = 8.2$ en 2.9 Hz, $\underline{\text{CH-NCO}}$), 5.19 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, $\underline{\text{CH-CH-NH}}$), 7.11 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, $\underline{\text{NH-eH-COOCH}_3}$); ^{13}C -k.m.r. (500 MHz) δ 17.37(k), 19.45(k), 21.89(k), 22.75(k), 24.71(t), 25.15(d), 26.99(t), 28.35(k), 31.47(d), 41.55(t), 47.65(t), 50.99(d), 52.16(k), 56.79(d), 59.75(d), 79.59(s), 155.79(s), 170.74(s), 172.54(s), 173.08(s); MS: m/z 581 (6, M^+); MS (EI): Akkurate massa m/z 581.2898 (M^+ , bepaal 581.2883 vir $\text{C}_{21}\text{H}_{43}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$).

N-t-Boc-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-S-Leu-OMe (314)

Opbrenings: 87.8%; Stroop; $R_f = 0.53$ (etiel asetaat + 6% metanol); $[\alpha]_D^{21} -65.1^\circ$ (c 1.2, chloroform); ν_{maks} 3450, 3396, 3300 br, 3121, 3012, 2964, 2875, 2359, 1710, 1678, 1504, 1244 en 1162 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (500 MHz) δ 0.89 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 0.90

(3H, d, J = 6.3 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 0.99 (3H, d, J = 6.8 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 1.02 (3H, d, J = 6.8 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 1.44 (9H, s, $\underline{\text{C(CH}_3)_3}$), 1.48-1.64 (2H, m, $\underline{\text{CH-GH}}_2\text{-GH}$), 1.80-2.30 (5H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-GH}_2\text{N}}$ en $\underline{\text{CH-GH(CH}_3)_2}$), 2.33 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH(CH}_3)_2}$), 3.68 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH}_a\text{-NCO}}$), 3.69 (3H, s, $\underline{\text{OCH}_3}$), 3.81 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH}_b\text{-NCO}}$), 4.51 (1H, ddd, J = 8.9, 7.9 en 5.2 Hz, $\underline{\text{CH-GOOCH}_3}$), 4.55 (2H, m, $\underline{\text{CR}_2\text{-NH}}$), 4.58 **ua**, dd, J = 8.1 en 2.9 Hz, $\underline{\text{CH-NCO}}$), 4.73 (1H, dd, J = 9.3 en 7.2 Hz, $\underline{\text{CH-GH-GH}}_3$), 5.32 (1H, br t, $\underline{\text{CR}_2\text{-NH}}$), 7.15 (1H, d, J = 7.9 Hz, $\underline{\text{NH-GHCOOCH}_3}$), 7.80 (1H, d, J = 9.3 Hz, $\underline{\text{CH-GH-NR}}$), 7.97 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. (500 MHz) δ 18.06(k), 19.35(k), 21.90(k), 22.76(k), 24.74(t), 25.11(d), 27.09(t), 28.32(k), 31.72(d), 41.54(t), 42.30(t), 47.67(t), 51.00(d), 52.17(k), 55.57(d), 59.85(d), 80.52(s), 123.85(d), 149.30(s), 155.57(s), 160.78(s), 169.31(s), 170.71(s), 171.85(s), 173.10(s); MS: m/z 581 (6, M⁺); MS(EI): Akkurate massa m/z 581.2867 (M⁺, bepaal .581.2883 vir $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}^{507}\text{S1}$)'

N-t-Boe-R={Gln}Thz-fGlv)Thz-5-Val-5-Pro-S-Leu-oMe (R-31.5)

Opbrengs 86%; Smp. 130°C (metanol); $R_f = 0.14$ (etiel asetaat + 6% metanol); $[\alpha]_D^{21} -46.4^\circ$ (e 0.3, ysasynsuur); ν_{maks} (KBr) 3400, 1740, 1660 en 1640 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (500 MHz, DMSO- δ) δ 0.84 (3H, d, J = 6.5 Hz, $\underline{\text{CH-GR}}_3$), 0.87 (3H, d, J = 6.7 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 0.90 (3H, d, J = 6.7 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 0.96 (3H, d, J = 6.7 Hz, $\underline{\text{CH-GH}}_3$), 1.40 (9H, s, $\underline{\text{C(CH}_3)_3}$), 1.48-1.60 (2H, m, $\underline{\text{CH-eH}}_2\text{-GH}$), 1.60-2.00 (4H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-GONH}_2}$), 1.80-2.30 (6H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-eH(CH}_3)_2}$, $\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-GH}_2\text{-N}}$ en $\underline{\text{CH-eH(CH}_3)_2}$), 3.60 (3H, s, $\underline{\text{OCH}_3}$), 3.62 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_a\text{-NCO}}$), 3.71 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-GH}_b\text{-NCO}}$), 4.25 (1H, ddd, J = 9.9, 7.5 en 5.2 Hz, $\underline{\text{CH-GOOCH}_3}$), 4.37 (1H, dd, J = 8.5 en 4.4 Hz, $\underline{\text{CH-NCO}}$), 4.59 (1H, dd, J = 8.9 en 6.3 Hz, $\underline{\text{CR-GH-GH}}_3$), 4.76 (2H, dd, J = 5.9 en 4.9 Hz, $\underline{\text{CR}_2\text{-NH}}$), 4.80 (1H, m, $\underline{\text{CH-GH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2}$), 6.75 (1H, br s) en 7.25 (1H, br s) ($\underline{\text{CO-NH}_2}$), 7.80 $\eta\eta$, d, J = 7.7 Hz, $\underline{\text{NH-t-Boc}}$), 7.86 (1H, d, J = 8.9 Hz, $\underline{\text{NH-GH-GH}}$), 8.21 (1H, d, J = 7.5 Hz, $\underline{\text{NH-eHCOOCH}_3}$), 9.25 $\eta\eta$, t, J = 5.9 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$), 8.17 (1H, s, tiasoolproton), 8.22 (1H, s, tiasoolproton); ^{13}C -k.m.r. (500 MHz, DMSO- δ) δ 17.76(k), 19.07(k), 21.28(k), 22.72(k), 24.05(t), 24.36(d), 28.12(k), 28.93 (t), 29.77(t), 30.70(t), 31.24(d), 40.08(t), 40.76(t), 47.13(t), 50.22(d), 51.68(k),

52.60(d), 54.97(d), 58.90(d), 78.54(s), 124.31(d, 2x), 148.52(s), 148.81(s), 155.25(s), 159.75(8), 160.93(8), 169.13(s), 170.43(s), 171.85(s), 172.85(s), 173.35(8), 175.31(s); MS: m/z 793 (1, MH⁺); MS(EI): Akkurate massa m/z 792.3276 (M⁺, bepaal 792.3298 vir C35H52NS09S2).

N-t-Boc-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-S-Leu (316)

Smp. 146°C (gepresipiteer vanuit metanol-eter); $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -16.8^{\circ}$ (c 2.9, ysasynsuur).

Siklo[S-Pro-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val] (R-266)

Die onsuksesvolle siklisering van die lineere pentapeptied (316) as die ooreenkomstige 2,4,5-trichloorfenolester (317) is volgens die metode van Pettit *et al.*⁵⁴ uitgevoer.

Siklisering van die lineere pentapeptied (316) as die ooreenkomstige pentafluorfeniel-ester (319; R_f = 0.38, etiel asetaat + 7% metanol) is suksesvol in 'n opbrengs van 46% uitgevoer. Die analise van die sikliese peptied (R-266), sowel as dié van die lineere peptiedvoorlopers van R-266 wat volgens die alternatiewe roete gesintetiseer is, word in die Eksperimenteel van 5.13.b(ii) volledig bespreek.

- ii) Die sintese van siklo[S-Pro-S-Leu-S-{Gln}Thz-{Gly}Thz-5-Val (5-266) asook die analyses van die lineêre peptiedvoorlopers van R-266 volgens hierdie roete gesintetiseer:

N-t-Boc-5-Val-5-Pro-OMe (321)

By 'n meganies geroerde oplossing van 5-Pro metielester (297, 4.0 g, 24.15 mmol) en N-t-Boc-5-Val (301, 5.29 g, 24.15 mmol) in 1,2-dimetoksietaan by 0°C, is trietielamien (7.07 ml, .50.72 mmol) en dietielfoaforielsianied (4.03 ml, 26.56 mmol) gevoeg. Na 1 uur by 0°C en 4 uur by kamertemperatuur is die reaksiemengsel met etiel asetaat (250 ml) verdun en opeenvolgens met 5% waterstofchloried (1x50 ml), waterige natriumwaterstofkarbonaat (1x50 ml) en versadigde sout (NaCl) oplossing (1x50 ml) gewas. Verwydering van die oplosmiddel *in vacuo* en chromatografie van die residuele stroop het die beskennde dipeptied (321) as 'n kieurlose stroop (R_f = 0.35,

heksaan:etiel asetaat 1:1) in In opbrengs van 92% (7.29 g) gelewer. $[\alpha]_D^{25} -70.0^\circ$ (c 4.0, chloroform); v_{maks} 3420, 1740, 1700 en 1640 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. δ 0.91 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH-eH_3), 1.00 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH-eH_3), 1.40 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.85-2.30 (4H, m), 2.00 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.55-3.80 (2H, m, $\text{CH}_2\text{-N}$), 3.69 (3H, s, OCH_3), 4.25 (1H, dd, $J = 9.2$ en 6.3 Hz, N-eH-eON), 4.50 (1H, m, N-eH-eOOCH_3), 5.18 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, NH-eO); ^{13}C -k.m.r. δ 17.33(k), 19.24(k), 24.96(t), 28.31(k,3X), 29.00(t), 31.31(d), 47.08(t), 52.12(k), 56.77(d), 58.74(d), 79.41(s), 155.84(s), 171.15(s), 172.44(s); MS(EI): Akkurate massa m/z 328.1984 (M^+ , bereken 328.1998 vir $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_{2}\text{O}_5$)'

N-t-Boe={Gly}Thz-B-Val-5-Pro-OMe (322)

By In meganies geroerde oplossing van N-t-Boc-5-Val-5-Pro-OMe (321, 3.93 g, 11.96 mmol) in droe dichloornetaan (20 ml) by OOC, is trifluorasynsuur (20 ml) drupsgewys gevoeg. Na In reaksietyd van 1 uur by OOC en 1 uur by kamertemperatuur is die mengsel verdun met droe koolstoftetraehloried (100 ml) en die vlugtige komponente verwyder *in vacuo*. Die residu, In kleurlose stroop, is onder vakuüm vir 12 uur gedroog en daarna direk, sonder enige verdere suiwering, in die daaropvolgende reaksie gebruik.

Die dipeptied (321) trifluorasetaat en N-t-Boc-(Gly)Thz (112, 3.09 g, 11.96 mmol) is in droe dimetoksietaan (9 ml) opgelos. Die oplossing is na OOC afgekoel en trietielamien (3.66 ml, 26.31 mmol) en dietielfosforielsianied (2.0 ml, 13.16 mmol) is drupsgewys bygevoeg. Na 1 uur by OoC is die mengsel na kamertemperatuur laat opwarm. Na In reaksietyd van 4 uur is die reaksiemengsel verdun met etiel asetaat (100 ml) en opeenvolgens met 5% waterstofchloried (1x.50 ml), waterige natriumwaterstofkarbonaat (1x50 ml) en versadigde sout (NaCl) oplossing (1x.50 ml) gewas. Die organiese fase is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en die oplosmiddel verwyder *in vacuo*. Chromatografie van die residuele stroop op In kolom van silikajel (250 g) in heksaan-etiel asetaat (3:7) het die beskermde tripeptied (322, 5.09 g, 91%) as In kleurlose stroop (R_f

= 0.57, etiel asetaat + 7% metanol) gelewer. $[\alpha]_D^{25} -39.8^\circ$ (c 2.4, chloroform); ν_{maks} 3440, 3380, 1740, 1720 en 1640 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH-eH_3), 1.06 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, CH-eH_3), 1.43 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.88-2.30 (4H, m), 2.00 (1H, m, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.69 (1H, m) en 3.85 (1H, m) ($\text{CH}_2\text{-NCO}$), 3.70 (3H, s, OCH_3), 4.51 **un**, ill, N-GH-eOOCCH_3), 4.52 (2H, ill, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), 4.72 (1H, dd, $J = 9.2$ en 7.1 Hz, CH-NHCO), 5.40 (1H, br t, NH-Boc), 7.90 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, CH-NH-eO), 7.95 **un**, s, tiasoolproton): $^{13}\text{C-k.m.r.}$ δ 17.93(k), 19.24(k), 24.99(t), 28.29(k, 3x), 29.05(t), 31.57(d), 42.24(t), 47.30(t), 52.18(k), 55.55(d), 58.87(d), 80.10(s), 123.72(d), 149.33(s), 155.52(s), 160.82(s), 169.00(s), 170.4g(s), 172.41(s); MS(ED): Akkurate massa *infz* 468.2029 (M^+ , bereken 468.2043 vir $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_1$).

N-t-Boc-B-(Gln)Thz=fGlv)Thz-S-Val-5-Pro-OMe (S-323)

Trifluorasynsuur (4 ml) is drupsgewys by 'n geroerde oplossing van *N-t-Boc*-(Gly)Thz-5-Val-S-Pro-OMe (322, 500 mg, 1.07 mmol) in droe diehloormetaan (4 ml) by OoC gevoeg. Na 'n reaksietyd van 1 uur by OoC en 1 uur by kamertemperatuur is die reaksiemengsel verdun met droe koolstoftetraehloried (20 ml) en die vlugtige komponente verwyder *in l'acuo* om die tripeptied (322) trifluorasetaat as 'n kleurlose stroop te lewer. Die produk is gedroog onder vakuum vir 24 uur en direk, sonder enige verdere suiwing, in die daaropvolgende reaksie gebruik.

In Oplossing van die tripeptied (322) trifluorasetaat en *N-t-Boc*-5-(Gln)Thz (5-260, 350mg, 1.07 mmol) in droe dimetielformamied (3 ml) is afgekoel na OoC, en trietielamien (0.33 ml, 2.35 mmol) en dietielfosforielsianied (0.18 ml, 1.18 mmol) is drupsgewys oor 'n periode van 0.5 uur bygevoeg. Na In reaksietyd van 1 uur by OoC en 6 uur by kamertemperatuur is die oplosmiddels verwyder *in vacuo*. Die residuele stroop is gechromatografeer op Sephadex LH-20 in chloroform-metanol (2:1) om die beskermde tetrapeptied (S-323, 674 mg, 93%) te lewer. Smp. 129-130 $^\circ\text{C}$ (etiel asetaat-heksaan); $R_f = 0.47$ (ehloroform:metanol:water 100:10:1); $[\alpha]_D^{26} -70.6^\circ$ (c 1.3, chloroform); ν_{maks} 3400, 1740, 1665 en 1640 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 1.01 (3H, d, $J = 6.8$

Hz, $\underline{\text{CR-eH}_3}$), 1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, $\underline{\text{Cn-eH}_3}$), 1.41 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.80-2.40 (9R, m), 3.68 (1H, m) en 3.79 (1H, m)($\underline{\text{CH}_2\text{-NCO}}$), 3.72 (3H, s, $\underline{\text{OCH}_3}$), 4.55 (1H, m, $\underline{\text{N-eR-eOOCH}_3}$), 4.76 (1H, dd, $J = 9.3$ en 7.1 Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 4.77 (1H, dd, $J = 16.5$ en 5.2 Hz) en 4.95 (1H, dd, $J = 16.5$ en 6.1 Hz)($\underline{\text{CH}_2\text{-NHCO}}$), 4.94 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH-NH}}$), 5.55 (1H, br s) en 6.36 (1R, br s)($\underline{\text{CO-NH}_2}$), 6.26 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, $\underline{\text{NH-Boe}}$), 7.88 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 8.03 (1H, s) en 8.04 (1H, s)(tiasoolprotone, 2x), 8.33 (1R, dd, $J = 6.1$ en 5.2 Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NH}}$); ^{13}C -k.m.r. δ 18.02(k), 19.22(k), 24.88(t), 28.30(k, 3x), 29.08(t), 30.18(t), 31.75(t), 31.89(d), 40.67(t), 47.48(t), 52.31(k), 52.50(d), 55.42(d), 58.70(d), 80.17(s), 123.75(d), 124.23(d), 148.97(8), 149.05(8), 155.80(s), 160.53(s), 161.01(s), 166.82(s), 170.76(s), 172.48(s), 173.21(s), 174.89(8); MS: m/z 679 (M^+); Analise bereken vir $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$: C 51.23, H 6.09, N 14.44. Gevind: C 51.34, H 6.18, N 14.30.

N-t-Boc-R-(Gln)Thz-(Giv)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (R-323)

Opbrengs: 86%; Smp. 129-130 $^{\circ}\text{C}$ (etanol-etiël asetaat-heksaan); $R_f = 0.47$ (chloroform:metanol:water 100:10:1); $[\alpha]_D^{22} -26.8^{\circ}$ (c 3.0, ysasynsuur); ν_{maks} 3400, 1740, 1665 en 1640 cm^{-1} ; ^1H -k.m.r. (DMSO-d_6) δ 0.87 (3R, d, $J = 6.7$ Hz, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 0.95 (3R, d, $J = 6.8$ Hz, $\underline{\text{CH-eH}_3}$), 1.38 (9H, s, $\underline{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$), 1.70-2.30 (9H, m), 3.60 (3H, 8, $\underline{\text{OCH}_3}$), 3.60 (1H, m) en 3.77 (1H, m)($\underline{\text{CH}_2\text{-NCO}}$), 4.33 (1H, dd, $J = 8.5$ en 5.3 Hz, $\underline{\text{CH-eOOCH}_3}$), 4.59 (1H, dd, $J = 8.6$ en 7.5 Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 4.71 (2R, br d, $J = 6.0$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NHCO}}$), 4.78 (1H, m, $\underline{\text{CH}_2\text{-eH-NH}}$), 6.76 (1H, br s) en 7.27 (1R, br s)($\underline{\text{CO-NH}_2}$), 7.82 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, $\underline{\text{NH-Boc}}$), 7.90 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, $\underline{\text{CH-NH}}$), 9.27 (1R, br t, $J = 6.0$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-NH-eO}}$), 8.16 (1H, s) en 8.21 (1H, s)(tiasoolprotone, 2x); ^{13}C -k.m.r. (DMSO-d_6) δ 17.71(k), 18.89(k), 24.57(t), 28.09(k, 3x), 28.56(t), 29.74(t), 30.54(d), 31.21(t), 40.75(t), 46.91(t), 51.71(k), 52.58(d), 58.95(d), 58.46(d), 78.56(8), 124.40(d), 124.46(d), 148.41(8), 148.81(8), 155.29(s), 159.82(8), 160.96(8), 169.50(8), 170.52(8), 172.06(8), 173.40(8), 175.92(s); MS : m/z 679 (2, M^+); MS(EI) : Akkurate massa m/z 679.2439 (M^+ , bepaal 679.2458 vir $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_2$)'

N-t-Boc-S-Leu-S-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val-S-Pro-OMe (5'-324)

N-t-Boe-S'-(Gln)Thz-(Gly)Thz-5'-Val-5'-Pro-OMe (8-323, 531 mg, 0.78 mmol) is opgelos in trifluoorasynsuur (4 ml) by OoC. Na 'n reaksietyd van 15 minute by OoC en 45 minute by kamertemperatuur is die reaksiemengsel verdun met droe koolstoftetra-chloried (40 ml) en die vlugtige komponente verwyder onder verminderde druk. Die residu, die tetrapeptied (5'-323) trifluoorasetaat as 'n kleurlose glas, is vir 24 uur gedroog *in vacuo* en sonder enige verdere suiwing in die daaropvolgende reaksie gebruik.

'n Meganies geroerde oplossing van die tetrapeptied (5-323) trifluoorasetaat en *N-t-Boe-S'-Leu* (298, 217 mg, 0.94 mmol) in droe dimetielformamied (8 ml) is afgekoel na OoC en trietielamlen (0.26 ml, 1.88 mmol) en dietielfosforielsianied (0.14 ml, 0.94 mmol) is drupsgewys bygevoeg. Na 1 uur by OoC en 4 uur by kamertemperatuur is die vlugtige komponente verwyder *in vacuo*. Die residuele stroop is op Sephadex LH-20 in chloroform-metanol (2:1) gechromatografeer. Die hooffraksie ($R_f = 0.52$, ehloroform:metanol:water 100:10:1) is verder gesuiwer deur chromatografie op In silikakolom (50 g) in 7% metanol in etiel asetaat om die beskermde pentapeptied (S-324, 533 mg, 86%) as In amorfe wit poeier te lewer. Smp. 125-126°C (gepresipiteer vanuit etiel asetaat-heksaan); $[\alpha]_D^{26} -75.0^\circ$ (c 3.7, chloroform); v_{maks} 3400, 1740, 1660 en 1640 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ δ 0.80 (6H, d, 2x, $J = 5.4$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, CH-eH_3), 1.06 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, Cn-eH_3), 1.36 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.53 (2H, m, $\text{CH-CH}_2\text{-CH}$), 1.8D-2.40 (IOH, m), 3.68 (1H, m) en 3.89 (1H, m)($\text{CH}_2\text{-NCO}$), 3.69 (3H, s, OCH_3), 4.22 (1H, m, CH-NH-Boe), 4.55 (1H, m, N-CH-COOCH_3), 4.78 (1H, dd, $J = 9.3$ en 7.7 Hz, CH-Cn-NH), 4.87 (2H, d, $J = 5.7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-NHCO}$), 5.21 (1H, m, $\text{CH}_2\text{-CH-NH}$), 5.31 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, NH-Boe), 5.82 (1H, br s) en 6.60 (1H, br s)(CO-NH_2), 7.90 (1H, d, $J = 9.3$ Hz, CHCH-NH), 8.01 (1H, s) en 8.03 (1H, s)(tiasoolprotone, 2x), 8.11 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, CH-NH-CO), 8.43 (1H, br t, $J = 5.7$ Hz, CHZ-NH); $^{13}\text{C-k.m.r.}$ δ 18.08(k), 19.18(k), 21.90(k), 22.79(k), 24.63(d), 24.92(t), 28.30(k.3x), 29.12(t), 30.21(t), 31.6S(t), 31.74(d), 40.82(t),

41.7S(t), 47.54(t), 51.00(d), 52.27(k), 52.51(d), 55.53(d), 58.99(d), 80.10(s), 123.90(d), 124.34(d), 148.92(s,2x), 155.72(s), 160.65(s), 161.12(s), 167.34(8), 170.78(s), 172.28(s), 172.57(s), 173.47(8), 175.00(s); MS: m/z 792 (1, M+); Analise bereken vir C₃₅H₅₂N₈O₉S₂: C 53.00, H 6.62, N 14.13, S 5.09. Gevind C 53.08, H 6.74, N 14.27, S 8.21.

N-t-Boc-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Glv)Thz-S-Vai-S-Pro-OMe (R-324)

Opbrengs 85%; Smp. 125-126°C (gepresipiteer vanuit etiel asetaar-heksaan); $R_f = 0.52$ (chloroform:metanol:water 100:10:1); $[\alpha]_D^{22} -31.0^\circ$ (e 1.4, ysasynsuur); ν_{maks} 3400, 1740, 1660 en 1640 cm⁻¹; IH-k.m.r. δ 0.93 (3H, d, J = 5.9 Hz, CH-eH₃), 0.94 (3H, d, J = 5.9 Hz, CH-eH₃), 0.99 (3H, d, J = 6.7 Hz, CH-GH₃), 1.07 (3H, d, J = 6.7 Hz, CR-eH₃), 1.35 (1H, m, CH₂-eH-GH₃), 1.39 (9R, s, C(CH₃)₃), 1.65 (2H, m, CH-eH₂-eH), 1.90-2.40 (9H, m), 3.71 (3H, s, OCH₃), 3.75 (1H, m) en 3.92 (1H, m)(CH₂-NCO), 4.21 (1H, m, CTI-NH-Boc), 4.49 (1H, dd, J = 8.2 en 5.2 Hz, CH-COOCH₃), 4.75 (1R, dd, J = 9.3 en 7.8 Hz, CH-eH-NH), 4.76 (1H, dd, J = 11.8 en 6.1 Hz) en 4.87 (1H, dd, J = 11.5 en 6.1 Hz)(CR₂-NHCO), 5.15 (1H, ill, CH₂-eH-NH), 5.30 (1H, d, J = 7.6 Hz, CH-NH-Boc), 5.62 (1H, br s) en 6.49 (1H, br s)(CO-NH₂), 7.79 (1H, d, J = 7.8 Hz, CH₂-eH-NH), 7.95 uu, d, J = 9.3 Hz, CHCH-NH), 8.22 (1H, br t, J = 6.1 Hz, CH₂-NH-GO), 7.98 (1H, s) en 8.02 (1H, s)(tiasoolprotone, 2x); 13C-k.m.r. δ 15.24(k), 19.09(k), 21.92(k), 22.94(k), 24.51(d), 24.95(t), 28.28 (k,3x), 29.11(t), 29.93(t), 31.59(d), 31.59(t), 40.61(t), 41.12(t), 47.52(t), 50.88(d), 52.30(k), 53.85(d), 55.73(d), 59.02(d), 80.51 (s), 124.00(d), 124.37(d), 148.84(8), 149.00 (s), 155.98(8), 160.76(s), 161.05(8), 167.35(s), 170.87(s), 172.29(s), 172.49(s), 173.27(5), 174.90(s); MS: m/z 792 (2, M+); MS(EI): Akkurats massa m/z 792.3313 (M+, bepaal 792.3298 vir C₃₅H₅₂N₈O₉S₂)

siklo[S-Pro-S-Leu-S-(Gln)Thz-(Glv)Thz-S-VaII (S-266: doJastatien 3)

Die N-t-Boc pentapeptied metielester (S-324, 250 mg, 0.315 mmol) in dioksaan (1.5 ml) en water (1.5 ml) is met IN natriumhidroksied (0.315 ml) by kamertemperatuur

vir 3 uur behandel. Die reaksiemengsel is verdun met eter (5 ml). Die waterige fase is afgeskei, aangesuur na pH 2 met yskoue 3N waterstofchlorid en met chloroform (3x5 ml) geekstraheer. Die gekombineerde organiese fases is gedroog (anhidriese natriumsulfaat) en die oplosmiddel verwyder *in vacuo* om die *N-t-Boc* pentapeptied (5-325, 230 mg, 94%) te lewer. Na presipitasie vanuit etanol en eter het 5-325 In smeltpunt van 168-170°C; $[\alpha]_D^{25} -37.7^\circ$ (c 1.6, metanol).

Die *N-t-Boc* pentapeptied (5-325, 200 mg, 0.256 mmol) is opgelos in droe dimetoksietaan (3 ml) en droe dimetielformamied (1 ml), afgekoel na -20°C onder In stikstof atmosfeer en met pentafluorfenol (47.2 mg, 0.256 mmol) en N,NI-disikloheksielkarbo-diimied (52.8 mg, 0.256 mmol) behandel. Die reaksiemengsel is laat opwarm na kamertemperatuur. Na In reaksietyd van 12 uur is die mcngsel deur selliet filtreer om die disiklohekslelurea te verwyder. Die vlugtige komponente van die filtraat is verwyder *in vacuo* en die residu gechromatografeer op Sephadex LH-20 in chloroform om die pentafluorfenielester (5-326, 210 mg, 87%) as 'n kleurlose olie met $R_f = 0.42$ (7% metanol in etiel asetaat) te lewer.

Die pentafluorfenielester (326, 114 mg, 0.120 mmol) is met trifluorasynsuur (6 ml) vir 0.5 uur by kamertemperatuur behandel. Verdunning van die reaksiemengsel met koolstoftetrachloried (20 ml) en verwydering van die oplosmiddels *in vacuo* het die pentapeptied trifluorasetaateter (5-327) as 'n kleurlose glas gelever. Na droging van die materiaal vir 2 uur onder vakuüm, is dit opgelos in droe dioksaan (10 ml). Hierdie oplossing is drupsgewys oor 'n periode van 1 uur m.b.v. 'n motoraangedrewe spuit by In hewig geroerde oplossing van 4-pirrolidinopiridien (11.7 mg, 0.120 mmol) in *t-butanol* (11 ml) en dioksaan (225 ml) by 95°C gevoeg. Na 'n reaksietyd van 2.5 uur by 95°C is die reaksiemengsel na kamertemperatuur laat afkoel, gefiltreer deur selliet en die vlugtige komponente van die filtraat verwyder *in vacuo*. Die residu is opeenvolgens gechromatografeer op Sephadex LH-20 in chloroform en op silika in 7% metanol in chloroform, om die sikliese pentapeptied (5-266, 60 mg, 75.6%) as In amorfe wit poeier

($R_f = 0.41$, chloroform:metanol:water 100:10:1) te lewer. Na presipitering vanuit etanol-eter asetaat (1:1) met heksaan het S-266 'n smeltpunt van 187-188°C; $[\alpha]_D^{25} -53.3^\circ$ (c 0.94, chloroform); ν_{maks} 3427, 3379, 3330, 3090, 3020, 1670, 1629, 1544, 1501, 1494, 1445 en 1065 cm^{-1} ; IH-k.m.r. (400 MHz) δ 0.90 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19c), 0.95 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19d), 1.04 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-7b), 1.15 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7c), 1.55 (2H, m, H-19a), 1.94 (2H, m, H-4), 2.05 (1H, m, H-7a), 2.13 (2H, m, H-17a), 2.24 (2H, m, H-3), 2.33 (1H, m, H-19b), 2.53 (2H, m, H-17b), 3.69 (1H, dt, $J = 9.6$ en 5.9 Hz, H-5b), 3.83 (1H, ddd, $J = 11.0, 7.0$ en 4.0 Hz, H-19), 3.87 (1H, ddd, $J = 9.6, 7.5$ en 3.3 Hz, H-5a), 4.00 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-2), 4.65 (1H, dd, $J = 18.1$ en 2.4 Hz, H-12b), 4.75 (1H, dd, $J = 9.2$ en 7.2 Hz, H-7), 5.23 (1H, dd, $J = 18.1$ en 7.3 Hz, H-12a), 5.48 (1H, br s, H-(3a)), 5.52 (1H, ddd, $J = 10.9, 9.2$ en 4.6 Hz, H-17), 6.29 (1H, br s, H-(3b)), 6.39 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-(5)), 7.83 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-(4)), 8.05 (1H, s, H-10), 8.07 (1H, s, H-15), 8.30 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-(1)), 8.73 (1H, dd, $J = 7.3$ en 2.4 Hz, H-(2)); ^{13}C -k.m.r. δ 18.55(k, C-19c), 19.53(k, C-19d), 21.18(k, C-7b), 23.30 (k, C-7c), 25.43(d, C-19b), 25.45(t, C-19a), 28.41(t, C-3), 29.62(t, C-17a), 31.88(d, C-7a), 33.27(t, C-17b), 37.71(t, C-4), 40.97(t, C-12), 48.26(t, C-5), 48.61(d, C-17), 54.97(d, C-19), 55.62(d, C-7), 62.61(d, C-2), 123.71(d, C-10), 124.26(d, C-15), 148.30(s, C-11), 149.00(s, C-16), 160.30(s, C-9), 160.50(s, C-14), 165.77(s, C-17c), 169.4(s, C-1), 170.92(s, C-6), 171.09(s, C-8), 172.00(s, C-15), 174.30(s, C-13); MS(EI): m/z 660 (M^+); MS (Sp-SIMS) (gliserol): Akkurate massa m/z 661.2576 ($[M+H]^+$, bereken 661.2591 vir C₂₉H₄₁NS₀₆S₂); Analise bereken vir C₂₉H₄₁NS₀₆S₂: C 52.70, H 6.11, N 16.96, S 9.70. Gevind: C 52.82, H 6.30, N 16.80, S 9.55.

N-t-Boc-S-Leu-R-(Glu)Thz-(Glu)Thz-S-Val-S-Pro (R-325)

Opbrengs 96%; Smp. 170°C (geprespteer vanuit etanol en eter); $[\alpha]_D^{21} -22.2^\circ$ (c 0.6, metanol).

Pentapeptied pentafluorfenielester (R-326)

Opbrengs 91%; $R_f = 0.33$ (etiel asetaat + 7% metanol).

siklo[~~S-Pro-S-Leu-R-(Gln)Thz-(Gly)Thz-S-Val~~] (R-266)

Opbrengs 71.3%; Smp. 180-181°C (gepresipiteer vanuit etanol-etiel asetaat-heksaan);
 $R_f = 0.35$ (chloroform:metanol:water 100:10:1); $[\alpha]_D^{21} +24.3^\circ$ (c 0.7, chloroform);
 ν_{maks} 3427, 3379, 3330, 3090, 3020, 1670, 1629, 1544, 1501, 1494, 1445, 1390 en 1065
 cm^{-1} ; $^1\text{H-k.m.r.}$ (400 MHz) δ 0.49 (3R, d, $J = 6.9$ Hz, H-7c), 0.91 (3H, d, $J = 6.6$
 Hz, H-19c), 0.93 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-19d), 0.95 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-7b), 1.26
 un, ddd, $J = 14.3, 10.9$ en 5.3 Hz, H-19a₁), 1.59 (1H, ddk, $J = 9.1, 6.6$ en 5.3 Hz,
 H-19b), 1.88 (3H, ddd, $J = 14.3, 9.1$ en 4.0 Hz, H-19a₂), 2.03 (3H, m, H-4 en H-7a),
 2.04 (1R, m, H-3a), 2.37 (1H, m, H-3b), 2.40 (2H, m, H-17b), 2.57 (1H, ddt, $J =$
 $18.8, 9.5$ en 3.9 Hz, H-17a₁), 2.67 (1H, ddt, $J = 18.8, 7.0$ en 4.8 Hz, H-17a₂), 3.65
 un, dt, $J = 10.4$ en 6.9 Hz, H-5b), 3.85 nn, dt, $J = 10.4$ en 6.1 Hz, H-5a), 4.33 un,
 ddd, $J = 10.9, 7.2$ en 4.0 Hz, H-19), 4.38 (1H, dd, $J = 8.2$ en 6.9 Hz, H-2), 4.47 (1H,
 dd, $J = 17.6$ en 2.2 Hz, H-12b), 4.98 (1H, dd, $J = 9.8$ en 2.4 Hz, H-7), 5.31 [1H, br s,
 H-(3a)], 5.41 (1H, ddd, $J = 11.5, 9.2$ en 3.8 Hz, H-17), 5.48 [1H, dd, $J = 17.6$ en 10.0
 Hz, H-12a), 5.67 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-(5)), 6.44 (1H, br s, H-(3b)), 7.54 (1H, d, $J =$
 9.2 Hz, H-(4)), 7.98 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-(1)), 8.01 (1H, s, H-10), 8.07 (1H, s,
 H-15), 8.27 (1H, dd, $J = 10.0$ en 2.2 Hz, H-(2)); $^{13}\text{C-k.m.r.}$ δ 15.22(k, C-7c), 20.28-
 (k, C-7b), 21.38(k, C-19c), 23.18(k, C-19d), 25.54(d, C-19b), 25.54(t, C-4), 27.97(t,
 C-17a), 29.49(t, C-3), 31.40(t, C-17b), 32.37(d, C-7a), 40.17(t, C-12), 40.96(t,
 C-19a), 48.23(d, C-19), 48.43(t, C-5), 52.91(d, C-17), 54.17(d, C-7), 62.28(d, C-2),
 124.10(d, C-10), 124.75(d, C-15), 147.76(s, C-11), 148.09(s, C-16), 160.21(s, C-9),
 162.15(s, C-14), 167.00(s, C-8), 170.13(s, C-1), 171.05(s, C-18), 171.20(s, C-6),
 173.10(s, C-17c), 174.96(s, C-13); MS(EI): m/z : 660 (M⁺); MS(EI): Akkurate massa
 m/z 660.2521 (M⁺, bepaal 660.2512 vir C₂₉H₄₀NS₆S₂)'

5.14 EKSPERIMENTEEL VAN HOOFSTUK 4

Die SD-spektra is m.b.v. 'n Jasco J-20 outomatiese spektropolarimeter te WNNR, Pretoria opgeneem. Die MK-berekeninge met die SYBYL- en ALCHEMY-rekenaarprogramme is m.b.v. 'n MicroVax 2 rekenaar te WNNR, Pretoria uitgevoer.



VERWYSINGS

- 1.a R.R. Williams en J.K. Cline, *J. Am. Chem. Soc.*, 1936, 58, 1504.
- b R.R. Williams, J.K. Cline en J. Finkelstein, *ibid.*, 1937, 59, 1052.
2. J. Jadot, J. Casimir en R. Warin, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1969, 78, 299.
3. Y. Hamada, N. Seki, T. Kitahari, M. Takahashi en M. Matsui, *Agric. Bioi. Chem.*, 1970, 35, 780; *Chem. Abstr.*, 1970, 73, 35 265.
- 4.a J. Brooks, A.T. Fuller en J. Walker, *J. Chem. Soc.*, 1957, 689.
- b M.P.V. Mijovic en J. Walker, *ibid.*, 1960, 909.
- c P. Brookes, R.J. Clark, A.T. Fuller, M.P.V. Mijovic en J. Walker, *ibid.*, 1960, 916.
- d P. Brookes, R.J. Clark, B. Majhofer, M.P.V. Mijovic en J. Walker, *ibid.*, 1960, 925.
- e M.H. Palmer en J.A. Reid, *ibid.*, 1960, 931.
- f M.P.V. Mijovic en J. Walker, *ibid.*, 1961, 3381.
- g B.M. Dean, M.P.V. Mijovic en J. Walker, *ibid.*, 1961, 3394.
- h M.N.G. James en K.J. Watson, *ibid.*, 1966, 1361.
- G.E. Hall, N. Sheppard en J. Walker, *ibid.*, 1966, 1371.
5. J. Walker, A. Olesker, L. Valente, R. Rahanal en G. Lukacs, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1977, 706.
- 6.a J. Pagano, M. Weinstein, H. Stout en R. Donovick, *Antibiotics Annual, 1955–1956*, 554.
- b J. Vandeputte en J. Dutcher, *ibid.*, 1955–1956, 560.
- c B. Steinberg, W. Jambor en L. Suydam, *ibid.*, 1955–1956, 562.
- d M. Bodansky, J. Sacozzie en I. Muramatso, *J. Antibiot.*, 1970, 23, 9.
- 7.a G.V. Kenner, R.C. Sheppard en C.E. Stehr, *Tetrahedron Lett.*, 1960, 23.
- b D.F.vV. Cross, G.W. Kenner, R.C. Sheppard en C.E. Stehr, *J. Chem. Soc.*, 1963, 2143.
8. C. Pascard, A. Ducruix, J. Lunel en T. Prangé, *J. Am. Chem. Soc.*, 1977, 99, 608.
- 9.a O.D. Hensens en C. Albers-Schonberg, *J. Antibiot.*, 1983, 36, 814.
- b O.D. Hensens en G. Albers-Schonberg, *J. Antibiot.*, 1983, 36, 832.

10. H. Umezawa, Y. Suhara, T. Takita en M. Maeba, *J. Antibiot.*, 1966, Ser.a.19, 210.
11. S.M. Hecht in '*Bleomycin: Chemical, Biochemical and Biological Aspects*', S.M. Hecht (Ed), Springer-Verlag, New York, 1979.
- 12.a H. Arai, W. Hagmann, H. Suguna en S. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6631.
- b T. Shomura, S. Omoto, K. Ohba, H. Ogino, M. Kohima en S. Inoiye, *J. Antibiot.*, 1980, 33, 1243.
- c K. Katano, P. Chang, A. Millar, V. Pozsgay, D. Minster, T. Ohgi en S. Hect, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 5807.
- 13.a J.M. Waisvisz, M.G. van der Hooven, J. van Peppen en V.C. Zwennis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79,4520.
- b J.M. Waisvisz, M.G. van der Hooven, J.F. Hölscher en B. te Nijenhuis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79, 4522.
- c J.M. Waisvisz, M.G. van der Hoeven en B. te Nijenhuis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, 79,4524.
- d S. Nakamura en H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 1966, 19, 10.
- e S. Nakamura, T.Yajima, Y.C. Lin en H. Umezawa, *ibid.*, 1967, 20, 1.
- 14.a S. Nakamura, T. Chikaike, H. Yonehara en H. Umezawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1965, 13,599.
- b Y. Seto, K. Torii, K. Bori, K. Inabata, S. Kuwata en H. Watanabe, *Bull. Chim. Soc. Japan*, 1974, 47, 151.
15. D. Schipper, *J. Antibiot.*, 1983, 36, 1076.
16. H. Sakakibara, H. Naganawa, M. Ohno, K. Maeda en H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 1974, 27,897.
17. N. Nakamura, Y. Litaka, H. Sakakibara en H. Umezawa, *J. Antibiot.*, 1974, 27, 891.
18. D.J. Faulkner, *Natural Product Reports*, 1984, 1, .551.
19. R. Kazlauskas, R.O. Lidgard en R.J. Wells, *Tetrahedron Lett.*, 1977, 3183.
20. C. Charles, J.C. Braekman, D. Daloze, B. Tursch en R. Karlsson, *Tetrahedron* **11**, 1978, 1519.
21. C. Charles, J.C. Braekman, D. Daloze en B. Tursch, *Tetrahedron*, 1980, 36, 2133.

22. J.E. Biskupiak en C.M. Ireland, *Tetrahedron Lett.*, 1984,2935.
23. J.E. Biskupiak en C.M. Ireland, *J. Org. Chern.*, 1983, **48**, 2302.
24. K.L. Erikson en R.J. Wells, *Aust. J. Chem.*, 1982, 35, 31.
25. Roche Navorsingsinstituut vir Marine Farmakologie, '*Final Research Report*', J.T. Baker (Ed), Dee Why, Australie, 1981, bl. 30.
26. S.E. de Laszlo en P.G. Williard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 199.
27. H. Kleinkauf en H. van Doeren, '*Pept. Amibiot. Biosynth. Funct.*', de Gruyter, Berlyn, 1982.
28. U. Schmidt, *Pure and Appl. Chem.*, 1986, 58, 295.
29. G.R. Pettit, Y. Kamano, P. Brown, D. Gust, **M.** Inoue en C.L. Herald, *J. Am. Chern. Soc.*, 1982, **104**, 905.
30. U. Schmidt, A. Lieberknecht, H. Griesser, R. Utz, T. Beuttler en F. Bartkowiak, *Synthesis*, 1986, 361.
31. C. Ireland en P.J. Scheuer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102,5688.
32. C. Ireland, A. Durso, R. Newman en M. Hacker, *J. Ore. Chern.*, 1982, 47, 1807.
33. J. Wasylyk, J. Biskupiak, C. Costello en C.M. Ireland, *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 4445.
34. Y. Hamada, M. Shibata en T. Shioiri, *Tetrahedron Lett*; 1985, 26,6501.
35. Y. Hamada, M. Shibata en T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.*, 1985, 26, 5155.
36. U. Schmidt, R. Utz en P. Gleich, *Tetrahedron i-u.* 1985,26,4367.
37. Y. Hamada, M. Shibata en T. Shioiri, *Tetrehedron u«*, 1985, 26, .5159.
38. U. Schmidt en H. Griesser, *Tetrehetlron Lett.*, 1986, 27, 163.
39. S. Kato, Y. Hamada en T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 2653.
40. U. Schmidt en D. Weller, *Tetrahedron Leii.*, 1986, 27, 3195.
41. U. Schmidt en P. Gleich, *Angew. Chern. Int. Ed. Engl.*, 1985, 24,569.
42. T. Sugiura, Y. Hamada en T. Shioiri, *Tetrahedron Lett*; 1987, 28,2251.
43. Y. Hamamoto, M. Endo, M. Nakagawa, T. Nakanishi en K. Mizukawa, *J.Chem.Soc., Chem. Commun.*, 1983, 323.
44. Y. Hamada, S. Kato en T. Shioiri, *Tetrahedron uuu.* 1985, 26, 3223.
45. T. Ishida, **M.** Inoue, Y. Hamada, S. Kato en T. Shioiri, *J.Chem.Soc., Chern.*

- Commun.*, 1987,370.
46. G.R. Pettit, Y. Kamano, Y. Fujii, C.L. Herald, M. Inoue, P. Brown, D. Gust, K. Kitahara, J. Schmidt, D.L. Doubek en C. Michel, *J. Nat. Prod.*, 1981, 44,482.
47. Pliny, *Historia Naturalis*, Lib. IX, Lib. XXXII, ca. 60 A.D.
48. N.B. Eales, L.M.B.C. Memoirs, Vol. XXIV oor 'Typical British Marine Plants and Animals', Alypsia, W.A. Hardman en J. Johnstone (Eds), Livermore University Press, 1921.
49. U. Schmidt en R. Utz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1984, 23, 725.
50. Y. Hamada, K. Kohda en T. Shioiri, *Tetrahedron **UU***; 1984, 25, 5303.
51. U. Schmidt, R. Utz, A. Lieberknecht, H. Griesser, B. Potzolli, J. Bahr, K. Wagner en P. Fischer, *Synthesis*, 1987, 236.
52. G.R. Pettit en C.W. Holzapfel, *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 4580.
53. G.R. Pettit, P. Nelson en C.W. Holzapfel, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2654.
54. G.R. Pettit en C.W. Holzapfel, *J. Org. Chem.*, 1986, 51, 4586.
55. G.R. Pettit, Y. Kamano, C. Herald, A. Tuinnan, F. Boettner, H. Kizu, J. Schmidt, L. Baczynskyj, K. Tomer en R. Bontems, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 6883.
56. J. Metzger, 'Heterocyclic Compounds', J. Metzger (Ed), Wiley, New York, 1979, 2, 1-164.
- 57.a G. Borgen en S. Gronowitz, *Acta Chem. Scand.*, 1966, 20, 259.
- b K. Nishimoto en L.S. Forster, *Theor. Exp. Chem.*, 1966, 4, 155.
- c E.J. Vincent, R. Phan Tan Luu, J. Metzger en J.M. Surzer, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1966, 11, 3524.
58. Y. Hamada, M. Shibata, T. Sugiura, S. Kato en T. Shioiri, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 1252.
59. G.R. Pettit en C.W. Holzapfel, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2323.
60. P.S. Nelson, Ph.D. tesis, Arizona Staat.-Universiteit, V.S.A., 1983.
- 61.a E.J. Vincent, R. Phan Tan Luu en J. Metzger, *Acad. Sci., Ser. C.*, 1970, 270, 666.
- b R. Garnier, R. Faure, A. Babadjamian en E.J. Vincent, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1972,3, 1040.

- 62.a J. Chouteau, G. Davidovics, J. Metzger, M. Azzaro en M. Poite, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1962, 1794.
- b G. Davidovics, C. GarriguoLagrange, J. Chouteau en J. Metzger, *Spectrochim. Acta*, 1967, A23, 14i7.
- c J. Chouteau, G. Davidovics, J. Metzger en A. Bonzom, *Spectrochim. Acta*, 1966, 22, 719.
- d M. Conte, G. Mille, J. Lafon, J. Chouteau en J. Metzger, *J. Chim. Phys.*, 1976, 73, 569.
- 63.a G.M. Clarke, R. Gribb en D.H. Williams, *J. Chem. Soc. (B)*, 1966,4, 339.
- b R. Graham, I. Cooks, S. Howe, W. Tam en D. Williams, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, 90,4064.
- c R.G. Buttery, L. Ling en R. Lundin, *J. Agric. Food. Chem.*, 1973, 21, 488.
- d R. Tabacchi, *Helv. Chim. Acta*, 1974, 57, 324.
- e A. Haag en P. Werkhoff, *Org. Magn. Reson.*, 1976, 11, 511.
64. J. Aune en J. Metzger, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1972,9,3536.
65. J.M. Sprague en A.H. Land, *'Heterocyclic Compounds'*, R.C. Elderfield (Ed), Wiley, New York, 1957, 5,484.
66. M.M. Campbell, *'Comprehensive Organic Chemistry'*, D. Barton, W.D. Ollis en P.G. Sammes (Eds), Pergamon Press, Oxford, 1979, 4, deel 20.1, 985.
67. A. Hantzsch en J.H. Weber, *Ber.*, 1887, 20, 3118.
68. R.H. Wiley, *'Organic Reactions'*, Wiley, New York, 1951.
- 69.a R. Willstatter en T. Wirth, *Ber.*, 1909, 42, 1908.
- b V.S.A. Patent No.2 160867; *Chem. Absir.*, 33, 7320.
70. K. Hubacher, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1890, 259, 228.
71. T. Roubleff, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1890, 259, 253.
72. G. Schwarz, *Org. Synth.*, 1945, 25, 35.
- 73.a R.P. Kurkjy en E.V. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5778.
- b J. Metzger en J. Beraud, *Compt. Rend.*, 1956, 242,2362.
74. G. Pappalardo, B. Tometta en G. Scapini, *Farm. Poria Ed. Sci.*, 1966, 21, 740;

- Chem. Abstr.*, 66, 46363.
75. G. Vernin, *'Heterocyclic Compounds'*, J. Metzger (Ed), Wiley, New York, 1979, 2, 165.
76. J. Gasteiger en C. Herzig, *Tetrahedron*, 1981, 37, 2607.
77. R. Bogner, I. Farkas, I. Szilagy, M. Menyhart, E.N. Nemes en I.F. Szabo, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.*, 1969, 62, 179; *Chem. Abstr.*, 1970, 72, 90 801.
78. A. Babadjamian, R. Gallo, J. Metzger en M. Chanon, *J. Heterocyclic Chem.*, 1976, 13, 1205.
- 79.a M. Steude, *Annalen*, 1891, 261, 22.
- b A. Todd, F. Bergel en Karrimullah, *Chem. Ber.*, 1936, 69B, 217.
- c A. Schober! en M. Stock, *ibid.*, 1940, 73B, 1240.
- d H. Beyer en W. Lassig, *ibid.*, 1951, 84, 463.
- e H. Beyer en A. Reese, *ibid.*, 1951, 84, 518.
- 80.a A. Benko en A. Levente, *Annalen*, 1968, 717, 148.
- b K. Brown en R. Newberry, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 32, 2797.
- c Britse Patent No. 1137529.
- d B. Drach, I. Dolgushina en A. Kirsanov, *Zh. Drg. Khim.*, 1973, 9, 414.
- e I. Sirmity, M. Coman en I. Schwartz, *Rev. Roumaine Chim.*, 1973, 18, 685.
81. H. Baganz en J. Rueger, *Chem. Ber.*, 1968, 101, 3872.
82. A.R. Katritzky en C.W. Rees, *'Comprehensive Heterocyclic Chemistry'*, K.T. Potts (Ed), Pergamon Press, Oxford, 1984, 6, (4B), 23.5.
- 83.a T.S. Griffin, T.S. Woods en D.L. Klayman, *Adv. Heterocyclic Chem.*, 1975, 18, 109.
- b V. Traumann, *Liebigs Ann. Chem.*, 1888, 249, 31.
84. H. Beyer, H. Höhn en W. Lässig, *Chem. Ber.*, 1952, 85, 1122.
85. G. Marchesini, *Gazz. Chim. Ital.*, 1893, 23, 437.
86. A. Mirolati, *Gazz. Chim. U«*, 1893, 23, 437.
87. P. Bastianelli, M. Chanon en J. Metzger, *BuY. Soc. Chim. Fr.*, 1967, 1948.
88. J. Tchermiac, *Ber.*, 1892, 25, 2607.
89. L. Arapides, *Liebigs Ann. Chem.*, 1888, 249, 27.

90. A. Cook, I. Heilbron en A.L. Levy, *J. Chem. Soc.*, 1947, 1594.
- 91.a S. Gabriel, *Ber.*, 1910, 43, 134.
- b S. Gabriel, *Ber.*, 1910, 43, 1283.
92. K. Gewalt, H. Spies en R. Mayer, *J. Prakt. Chem.*, 1970, 312, 776; *Chem. Abstr.*, 1971, 74, 141 622.
93. H. Hartke en B. Seib, *Arch. Pharm. (Weinheim Ger.)*, 1970, 303, 625; *Chem. Abstr.*, 1970, 73, 98 859.
94. K. Gewalt, P. Blauschmit en R. Mayer, *J. Prakt. Chem.*, 1967, 309, 97; *Chem. Abstr.*, 1967, 66, 85 721.
95. J. Liebscher en H. Hartmann, *Z. Chem.*, 1974, 14, 470.
96. K. Hirai en T. Ishiba, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 1971, 1318.
97. K. Bunge, R. Huisgen, R. Raab en H.J. Sturm, *Chem. Ber.*, 1972, 105, 1307.
98. U. Schollkopf, P.H. Porsch en E. Blume, *Liebigs Ann. Chem.*, 1976, 2122.
99. G.C. Barrett en R. Walker, *Tetrahedron*, 1976, 32, 583.
100. H. Hartmann, *J. Prakt. Chem.*, 1971, 313, 730.
101. H. Hartmann, H. Schäfer en K. Gewalt, *J. Prakt. Chem.*, 1973, 315, 497.
102. A. Lawson en C.E. Searle, *J. Chem. Soc.*, 1957, 1556.
103. E. Ponnusamy, U. Fotadar, A. Spisni en D. Fiat, *Synthesis (Communications)*, 1986, 48.
104. E. Pretsch, T. Clerc, J. Steibl en W. Simon, *'Tabel/en zur Strukturaufklärung Organischer Verbindungen mit Spektroskopischen Methoden'*, Springer-Verlag, Berlyn, 1976, C200.
- 105.a W. Hausmann, J.R. Weisiger en L.C. Craig, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 723.
- b W. Konigsberg, R.J. Hill en L.C. Craig, *J. Chem. Soc.*, 1961, 83, 3867.
106. Y.F. Shealy, C.E. Oplinger en J.A. Montgomery, *J. Pharm. Sci.*, 1968, 57, 757.
107. M. Bergmann en L. Zervas, *Ber.*, 1932, 65, 1192.
108. C. Ressler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 1641.
109. C. Ressler, G.R. Nagarajan, M. Kirisawa en D.V. Kashelkar, *J. Org. Chem.*, 1961, 36, 3960.

110. E. Sondheimer en R.W. Holley, *J. Arn. Chern. Soc.*, 1954, 76, 2467.
111. C. Ressler en D.V. Kashelkar, *J. Arn. Chern. Soc.*, 1966, 2025.
112. R. Houssin, M. Lohez, J.L. Bernier en J.P. Henichart, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 2787.
113. U. Schmidt, P. Gleich, H. Griesser en R. Utz, *Synthesis*, 1986, 992.
114. J. Apsimon en R. Seguin, *Tetrahedron*, 1979, 35, 2797.
- 115.a J. Martens, *Top. Curro Chem.*, 1984, 125, 165.
- b D.A. Evans en A.E. Weber, *J.Am. Chern. Soc.*, 1986, 108, 6757.
- 116 U. Schollkopf, *Top. Curro Chem.*, 1983, 109,65.
- 117 K. Harada, *Nature (London)*, 1963, 200, 1201.
- 118.a K. Harada en T. Okawara, *J. Org. Chem.*, 1973, 38, 707.
- b J. Ojima en S. Inaba, *Chern. Lett.*, 1975, 737.
- c D.M. Stout, L.A. Black en W.L. Matier, *J. Org. Chetn.*, 1983, 48, 5369.
119. K. Weinges en H. Blackholm, *Chem. Ber.*, 1980, 113,3098.
120. M.S. Patel en M. Worsley, *Can. J. Chem.*, 1970, **48**, 1881.
- 121.a K. Weinges, H. Brachmann, P. Stahnecker, H. Rodewald, M. Nixdorf en H. Irgartinger, *Justus Liebiqs Ann. Chem.*, 1985, 566.
- b P.K. Subramanian en R.W. Woodard, *Synth. Comm.*, 1986, 16,337.
- 122.a H. Kunz, *Angew. Chern. Int. Ed. Engl.*, 1987, 26, 294.
- b H. Kunz, B. Miiller en D. Schanzenbach, *ibid.*, 1987, 26, 267.
- 123.a S. Brandange, S. Josephson, L. Morch en S. Vallen, *Acta Chem. Scand., Ser. B*, 1981, 35, 1296.
- b C.H.Heathcock, C.T. White, J.J. Morrison en D. van Derveer, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 1296.
- c I. Hoppe, U. Schollkopf en R. Tolle, *Synthesis*, 1983, 789.
- d A. Vasella, R. Huber, A. Knierzinger en J.-P. Obrecht, *Helo. Chim. Acta*, 1985, 68, 1730.
- e H. Felber, G. Kresze, R. Prewo en A. Vasella, *ua« Chim. Acta*, 1986, 69, 1137.
- f R.C. Gupta, A.M. Slawin, R.J. Stoodley en J.D. Williams, *J. Chern. Soc., Chem. Comm.*, 1986, 668 en 1116.

124. H. Kunz en W. Sager, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1987,26,557.
125. H. Kunz en U. Harreus, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1982, 41.
- 126.a T.E. Acree, R.S. Shallenberger, C.Y. Lee, en J.W. Einset, *Carbohydrate Res.*, 1969, 10,355.
- b A.S. Hill en R.S. Shallenberger, *ibid.*, 1969, 11, 541.
127. W.G. Overend, 'The Carbohydrates', W. Pigman en D. Horton (Eds), Academic, New York, 1972, 1A, hoofstuk 9.
- 128.a B. Capon, G.W. Loveday en W.G. Overend, *Chem. and Ind. (London)*, 1962, 1537.
- b B. Capon, *Chem. Rev.*, 1969, 69, 407.
- 129.a R.U. Lemieux, *Molecular Rearrangements Part If*, P. De Mayo (Ed), Interscience, New York, 1963, 735.
- b P.L. Durette en D. Horton, *Adv. Carbohydrate Chem.*, 1971, 26, 49.
- 130.a K. Nishiyama en H. Karigomi, *Chem. Lett.*, 1982, 1477.
- b F. Rolla, *J. Org. Chem.*, 1982,47,4327.
- c J.A. Miller, *Tetrahedron Lett.*, 1975, 2959.
131. J. Baddiley, J.G. Buchanan, R. Hodges en J.F. Prescott, *J. Chem. Soc.*, 1957, 4769.
132. N.J. Cusak, B.J. Hildick, D.H. Robinson, P.W. Rngg en G. Shaw, *J.Chem.Soc., Perkin Trans. I*, 1973, 1720.
133. E.J. Corey, K.C. Nicolaou, R.D. Balanson en Y. Machida, *Synthesis*, 1975, 590.
134. H. Bayley, D. Standring en J. Knowles, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 3633.
135. T. Adachi, Y. Yamada, I. Inoue en M. Saneyoshi, *Synthesis*, 1977, 45.
136. M. Vaultier, N. Knouzi en R. Carrie, *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24, 763.
137. M.S. Patel en M. Worsley, *Can. J. Chem.*, 1970, 48, 1881.
138. E. Benzing, *Angew. Chem.*, 1959, 71, 521.
139. K. Taguchi en F. Westheimer, *J. Org. Chem.*, 1971,36, 1570.
140. E.J. Corey en A.V. Gross, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 5391.
141. H. Weingarten, J. Chupp en W. White, *J. Org. Chem.*, 1967, 32, 3246.
142. C. Stetin, B. de Jeso en J.G. Pommier, *Synth. Commun.*, 1982, 12,495.
143. J. Yaozhong, L. Guilan, L. Jinchu en Z. Changyou, *Synfh. Commun.*, 1987, 17, 1545.

144. S. Dayagi en Y. Degani, *'The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond'*, S. Patai (Ed), Interscience, New York, 1970, hoofstuk 2, 61.
145. P.A.S. Smith, *'Open Chain Nitrogen Compounds'*, Benjamin, New York, 1965, 1, hoofstuk 7, 327.
146. R.W. Layer, *Chem. Rev.*, 1963, 63,489.
- 147.a R.A. Abramovitch en E.P. Kyba, *'The Chemistry of the Azido Group'*, S. Patai (Ed), Interscience, New York, 1971, hoofstuk 5, 221.
- b T. Sheradsky, *ibid.*, hoofstuk 6, 342.
- c P.A.S. Smith, *'Molecular Rearrangements'*, P. de Mayo (Ed), Interscience, New York, 1963, deel 1, hoofstuk 8, 462.
- 148.a R.L. Reeves, *'The Chemistry of the Carbonyl Group'*, S. Patai (Ed), Interscience, New York, 1966, 1, hoofstuk 12,600.
- b P.Y. Sollenberger en R.B. Martin, *'The Chemistry of the Amino Group'*, S. Patai (Ed), Interscience, New York, 1968, hoofstuk 7, 367.
- 149.a R.K. Chaturvedi en E.H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89,4631.
- b A.F. Noels, J.N. Braham, A.J. Hubert en P. Teyssie, *J. Org. Chem.*, 1977,42, 1527.
- c M. Cocivera, C.A. Fyfe, A. Effio, S.P. Vaish en H.E. Chen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98,1573.
150. P.A.S. Smith en C. Van Dang, *J. Org. Chem.*, 1976,41,2013.
151. C.G. McCarty, *'The Chemistry of the Carbon-Nitrogen Double Bond'*, S. Patai (Ed), Interscience, New York, 1970, hoofstuk 9, 363.
152. F.L. Scott, *'Organic Reaction Mechanisms'*, A.R. Butler en M.J. Perkins (Eds), Interscience, New York, 1973, hoofstuk 13,470.
153. M. Kobayashi, M. Yoshida en H. Minato, *J. Org. Chem.*, 1976,41, 3322.
154. J. Bjorgo, D.R. Boyd, C.G. Watson, W.B. Jennings en D.M. Jerina, *J. Chem. Soc., Perkin Trans II*, 1974, 1081.
155. K. Narasaka, Y. Ukaji en S. Yamazaki, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1986, 59, 525.
156. M.D. Broadhurst en D.J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, 96, 581.
157. R.M. Kellogg, *Tetrahedron*, 1976, 32, 2180.

158. R.A. Clark en D.C. Parker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, 93, 7257.
- 159.a H. Simon en D. Palm, *Chem. Ber.*, 1965, 98, 433.
- b B. Capon en B.E. Connet, *Tetrahedron Lett.*, 1964, 1395.
160. R.T. Walker, in verwysing 66,5, deel 22.2,88.
161. L. Hough en A.C. Richardson, in verwysing 66, 5, deel 26.1, 687.
162. P. Pochlauer, E. Miiller en P. Peringer, *Helv. Chim. Acta*, 1984, 67, 1238.
- 163.a D. Hickey, R. MacKenzie, C. Moody en C. Rees, *J. Chem.Soc., Perkin Trans. I*, 1987, 921.
- b T. Aubert, M. Farnier, B. Hanquet en R. Guillard, *Synth. Commun.*, 1987, 17, 1831.
- c D. Hickey, R. MacKenzie, C. Moody en C. Rees, *J. Chem.Soc., Perkin Trans. I*, 1984, 776.
164. P. Molina, M. Alajarin en A. Ferao, *Synthetic*, 1986, 843.
165. P.H. Lambert, M. Voultier en R. Carrie, *J. Org. Chem.*, 1985, 50, 5352.
166. S.A. Foster, L.J. Leyshon en D.G. Saunders, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1973, 29.
167. L.J. Leyshon en D.G. Saunders, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1971, 1608.
168. E. Zbiral en E. Stroh, *Liebigs Ann. Chem.*, 1969, 727, 231.
169. P.H. Lambert, M. Vaultier en R. Carrie, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 1224.
170. A.W. Johnson, *'Ylid Chemistry'*, Academic Press, New York en London, 1966, 222.
171. Verwysing 104, H360.
172. S. Wong en W. Johnson, *J. Org. Chem.*, 1972, 37, 1850.
173. H. Paulsen, Z. Gyorgydeak en M. Friedmann, *Chem. Ber.*, 1974, 107, 1590.
174. L. den Drijver, Ph.D.-tesis, Randse Afrikaanse Universiteit, Johannesburg, 1985.
175. A. Dondoni, G. Fantin, M. Fogagnolo en A. Medici, *Tetrahedron*, 1987, 43, 3533.
- 176.a A. Medici, P. Pedrini en A. Dondoni, *J. Chem.Soc., Chem. Commun.*, 1981, 656.
- b A. Medici, G. Fantin, M. Fogagnolo en A. Dondoni, *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24, 2901.
- c A. Dondoni, T. Dall'Occo, G. Fantin, M. Fogagnolo en A. Medici, *ibid.*, 1984, 25, 3633.

- d A. Dondoni, T. Dall'Occo, G. Galliani, A. Mastellari en A. Medici, *ibid.*, 1984, 25, 3637.
- e A. Dondoni, *Phosphorus and Sulfur*, 1985, **24**, 1.
177. R.P. Kurkijy en E.V. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 5778.
178. F. Pinkerton en S. Thames, *J. Heterocyclic Chem.*, 1971, 8, 257.
179. A. Ricci, M. Fiorenza, A. Grifagni, G. Bartolini en G. Seconi, *Tetrahedron Lett.*, 1982, 23, 5079.
180. T. Sasaki, A. Usuki en M. Ohno, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 3559.
181. G. Tennant, in verwysing 66, 2, deel 8.1, 385.
- 182.a A.E.S. Fairfull, J.L. Lowe en D.A. Peak, *J. Chem. Soc.*, 1952, 742.
- b W. Walter en K.-D. Bode, *Angew. Chem. Inter. Ed. Engl.*, 1966, **5**, 447.
183. L. Cassar, S. Panossian en C. Giordano, *Synthesis*, 1978, 917.
184. G. Tennant, in verwysing 66, 2, deel 8.2, 528.
185. Alchemy Molecular Modeling Software, Tripos Associates Inc., St. Louis, Missouri, V.S.A., 1987.
186. P.J. Wheatly, *J. Chem. Soc.*, 1961, 5027.
187. H. Kunz en W. Pfrengle, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 651.
188. R.C. Kelly, L. Gebhard en N. Wicnienski, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 4590.
189. U. Schmidt en P. Gleich, *Monatsh. Chem.*, 1985, **116**, 1459.
- 190.a O. Mitsunobu, *Synthesis*, 1981, 1.
- b H. Loibner en E. Zbiral, *Helv. Chim. Acta*, 1976, **59**, 2100.
191. M.S. Pavlin, Ph.D. tesis, Universiteit van Illinois, Urbana, V.S.A., 1972.
- 192.a G.M. Whitesides en D.W. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 5915.
- b H.L. Goering, J.N. Eikenberry en G.S. Koermen, *ibid.*, 1971, 5913.
193. J. Dale, M. Dull en H.S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 512.
194. R. Charles, B. Beitler en E.J. Gil-Av, *J. Chromatogr.*, 1978, **112**, 121.
195. I.W. Wainer, *J. Chromatogr.*, 1980, **202**, 478.
196. B. Silber en S. Riegelman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1980, **215**, 643.
197. L.S. Krull, 'Advances in Chromatography', J.E. Giddings, E. Grushka, J. Cazes en

- P.R. Brown (Eds), J.B. Lippincott Co., Philadelphia, Pennsylvania, 1977, 16, 416.
198. C.E. Dalglish, *J. Chem. Soc.*, 1952, 137. 3940.
- 199.a 'V.H. Pirkle, D.W. House en J.M. Finn, *J. Chromatogr.*, 1980, 192, 143.
- b W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner en B.C. Hamper, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103,3964.
200. W.H. Pirkle, J.M. Finn, B.C. Hamper, J. Schreiner en J.R. Pribish, '*ACS Symposium Series, No. 185, Asymmetric Reactions and Processes in Chemistry*', E.L. Eliel en S. Otsuka (Eds), A.C.S., Washington, D.C., 1982, 245.
- 201.a H.B. Weems en S.K. Yang, *Anal. Biochem.*, 1982, 125, 156.
- b M. Kasai, C. Froussios en H. Ziffer, *J. Org. Chem.*, 1983,48, 459.
- c I.W. Wainer, T.D. Doyle, Z. Hamidzadeh en M. Aldridge, *J. Chromatogr.*, 1983, 268, 154.
202. I. Wainer en T.D. Doyle, *J. Chromatogr.*, in druk.
- 203.a K. Gunther, J. Martens en M. Schickedanz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1984, 23, 506.
- b K. Gunther, J. Martens en M. Schickedanz, *ibid.*, 1986, 25, 278.
204. A.L.J. Beckwith, '*The Chemistry of Amides*', J. Zabicky (Ed), Interscience Publishers, New York, 1970.
205. R. Pellegata, A. Italia, M. Villa, G. Palmisano en G. Lesma, *Synthesis*, 1985, .517.
206. S. Scheibye, B.S. Pedersen en S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, 87, 229.
- 207.a K. Clausen en S.-O. Lawesson, *Nouv. J. Chim.*, 1980,4,43.
- b B.S. Pedersen, S. Scheibye, K. Clausen en S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, 87, 293.
- c S.L. Baxter en J.S. Bradshaw, *J. Org. Chem.*, 1981,46,831.
208. R. Shabana, S. Scheibye, K. Clausen, S.O. Olesen en S.-O. Lawesson, *Nouv. J. Chim.*, 1980,4,47.
209. B.S. Pedersen, S. Scheibye, N.H. Nilsson en S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, 87, 223.
- 210.a R. Shabana, J.B. Rasmussen, S.O. Olesen, en S.-O. Lawesson, *Tetrahedron*, 1980, 36,

- 3047.
- b W. Walter en T. Proll, *Synthesis*, 1979, 941.
- c J.B. Rasmussen, R. Shabana en S.-O. Lawesson, *Tetrahedron*, 1981, 37, 197.
211. A.A. EI-Barbary, S. Scheibye, S.-O. Lawesson en H. Fritz, *Anal. Chern. Scand.*, 1980, B47, 597.
- 212.a H. Fritz, P. Hug, S.-o. Lawesson, E. Logemann, B.S. Pedersen, H. Sauter, S. Scheibye en T. Winkler, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, 87, 525.
- b St. Rancher en P. Klein, *Tetrahedron Lett.*, 1980, 31, 4061.
213. K. Clausen, M. Thorsen en S.-o. Lawesson, *Chern. Scr.*, 1982, 14.
- 214.a R.A. Cherkasov, G.A. Kuttyreven A.N. Pudovik, *Tetrahedron*, 1985, 41, 2567.
- b M.P. Cava en M.L. Levinson, *Tetrahedron*, 1985, 41, 5061.
- c T.B. Rauchfuss en G.A. Zank, *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27, 3445.
215. J.C. Thurman, *Chern. Ind. (London)*, 1964, 752.
216. K. Arakawa, T. Miyasaka en H. Ohtsuka, *Chern. Pluirm. Bull.*, 1972, 20, 1041.
217. H.D. House, 'Modern Synthetic Reactions', W.A. Benjamin, London, 1972, 575.
218. P.A. Levene, *Org. Synth.*, 1943, Coll. Vol. II, 88.
219. K.S. Kim en W.A. Szarek, *Can. J. Chern.*, 1981, 59, 878.
220. N. Kornblum, W.J. Jones en G.J. Anderson, *J. Am. Chern. Soc.*, 1959, 81, 4113.
221. A.P. Johnson en A. Pelter, *J. Chern. Soc.*, 1964, 520.
222. C.R. Johnson en W.G. Phillips, *J. Am. Chern. Soc.*, 1969, 91, 682.
223. K. Torsell, *Acta Chern. Scand.*, 1967, 21, 1.
224. B. Ganem en R.K. Boeckman, *Tetrahedron Lett.*, 1974, 917.
225. E. Campaigne en W.M. Le Suer, *Org. Synth.*, 1963, Coll. Vol. IV, 919.
226. E.J. Corey, N.W. Gilman en B.E. Ganem, *J. Am. Chern. Soc.*, 1968, 90, 5616.
227. J. Attenburrow, A.F.B. Cameron, J.H. Chapman, R.M. Evans, B.A. Hems, A.B.A. Jansen en T. Walker, *J. Chern. Soc.*, 1952, 1094.
228. L.F. Fieser en M. Fieser, 'Reagents for Organic Synthesis', John Wiley and Sons, New York, N.Y., 1967, 1012.
229. S. Guttman en R.A. Boissonas, *Helv. Chim. Acta*, 1958, 41, 1852.

- 230.a J. Feijen, *Makromol. Chem.*, 1974, 175, 3193.
b F. Weygand en K. Hunger, *Chem. Ber.*, 1962, 95, 1 en 7.
c F.E. King, J.W. Clark-Lewis en G.R. Smith, *J. Chem. Soc.*, 1954, 1046.
- 231.a J. Taylor-Papadimitriou, L. Zervas, C. Yovanidis en A. Paganou, *J. Chem. Soc [C]*, 1967, 1830.
b C.C. Yang en R.B. Merrifield, *J. Drg. Chem.*, 1976, 41, 1032.
232. R.L. Prestidge, D.R.K. Harding, J.E. Battersby en W.S. Hancock, *J. Org. Chem.*, 1975, 40, 3287; 1976, 41, 2579.
- 233.a R. Ledger en F.H.C. Stewart, *Aust. J. Chem.*, 1965, 18, 1477.
b M.H. Loucheux en M.J. Parrod, *C.R. Acad. Sci. Sere C*, 1968, 267, 614.
234. G.H.L. Nefkens en B. Zwanenburg, *Tetrahedron*, 1983, 39, 2995.
235. W.A.R. van Heeswijk, M.J.D. Eenink en J. Freijen, *Synthesis*, 1982, 744.
236. E.R. Blout en R.H. Karlson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 941.
237. W.H. Hartung en R. Simonoff, *Org. Reactions*, 1953, VII, 263.
- 238.a G.M. Anantharamaiah en K.M. Sivanandaiah, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1977, 490.
b A.M. Felix, E.P. Heimer, T.J. Lambros, C. Tzougraki en J. Meienhofer, *J. Org. Chem.*, 1978, 43, 4194.
239. B. ElAmin, G.M. Anantharamaiah, G.P. Royer en G.E. Means, *J. Org. Chem.*, 1979, 44, 3442.
240. T. Bieg en W. Szeja, *Synthesis*, 1985, 76.
241. B.M. Adger, C. O'Farrell, N.J. Lewis en M.B. Mitchell, *Synthesis*, 1987, 53.
242. U. Schmidt, R. Utz, A. Lieberknecht, H. Griesser, B. Potzolli, J. Bahr, K. Wagner en P. Fischer, *Synthesis*, 1987, 233.
243. P.M. Hardy, H.N. Rydon en R.C. Thompson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1972, 5.
244. R.C. Sheppard, in verwysing 66, 5, deel 23.6, 321.
245. *'The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology'*, E. Gross en J. Meienhofer (Eds), Academic Press, New York, 1979, 1 en 2.
246. J.C. Sheehan en G.P. Hess, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, 77, 1067.

247. G.W. Anderson en F. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1958, 80, 2902.
248. G.W. Anderson, J.E. Zimmerman en F.M. Callahan, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 89, 178.
249. A.M. El-Naggar, F.S. Ahmed, A.M. Abd El-Salam, B.M. Haroun en M.S. Latif, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1982, 19, 408.
250. T. Miyazawa, T. Otomatsu, T. Yamada en S. Kuwata, *Tetrahedron Lett.*, 1984, 25, 771.
251. R. Paul en G.W. Anderson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 4596.
252. R. Schwyzer, M. Feurer, B. Iselin en H. Kagi, *Helvetica Chim. Acta*, 1955, 38, 80.
- 253.a M. Bodanszky, *Nature*, 1955, 175, 685.
- b J.A. Farrington, P.J. Hextall, G.W. Kenner en J.M. Turner, *J. Chem. Soc.*, 1957, 1407.
254. Th. Wieland, W. Schafer en E. Bokelmann, *Annalen*, 1951, 573, 99.
255. J. Pless en R.A. Boissonnas, *Helvetica Chim. Acta*, 1963, 46, 1609.
256. J. Kovacs en A. Kapoor, *J. Am. Chem. Soc.*, 1965, 87, 118.
257. I. Kisfaludy, J.E. Roberts, R.H. Johnson, G.L. Mayers en J. Kovacs, *J. Org. Chem.*, 1970, 35, 3563.
258. M. Rothe en F.W. Kunitz, *Annalen*, 1957, 609, 88.
259. M. Zaoral, *Colloq. Czech. Chem. Commun.*, 1962, 27, 1273.
260. J.R. Vaughan en R.L. Osato, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 676.
261. N. Sole, J.L. Torres, J.M. Garcia Anton, G. Valencia en F. Reig, *Tetrahedron*, 1986, 42, 193.
262. L. Benoiton, *J. Org. Chem.*, 1983, 48, 2939.
263. H. Chantrenne, *Nature*, 1949, 164, 576.
264. J.C. Sheehan en V.S. Frank, *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, 72, 1312.
- 265.a G.W. Anderson, J. Blodinger, R.W. Young en A.D. Welcher, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, 74, 5304.
- b G.W. Anderson en R.W. Young, *ibid.*, 1952, 74, 5307.
- c G.W. Anderson, J. Blodinger en A.D. Welcher, *ibid.*, 1952, 74, 5309.

- 266.a A.G. Jackson, G.W. Kenner, G.A. Moore, R. Ramage en W.F. Thorpe, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 3627.
- b R. Ramage, D. Hopton, M.J. Parrot, R.S. Richardson, G.W. Kenner en G.A. Moore, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1985, 461.
267. S. Kim, H. Chang en Y. Kwan Ko, *Tetrahedron Lett.*, 1985, 26, 1341.
268. T. Shioiri, K. Ninomiya en S. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, 94, 6203.
- 269.a S. Yamada, Y. Kasai en T. Shioiri, *Tetrahedron Lett.*, 1973, 1595.
- b T. Shioiri, Y. Yokoyama, Y. Kasai en S. Yamada, *Tetrahedron*, 1976, 32, 2211.
- 270.a G.R. Pettit, '*Synthetic Peptides*', Elsevier Sci. Pub. Co., Amsterdam, 1976, 1980 en 1982; volumes 4–6 respektiewelik.
- b M. Bodanszky, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1983, 22, 590.
- c D.H. Rich en J.H. Gardner, *Tetrahedron Lett.*, 1983, 24, 5305.
- d T. Mukaiyama, K. Kamekawa en Y. Watanabe, *Chem. Lett.*, 1981, 1367.
271. J.C. Lagarias, R.A. Houghten en H. Rapoport, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100, 8202.
272. J. Pastuszak, J.H. Gardner, J. Singh en D.H. Rich, *J. Org. Chem.*, 1982, 47, 2982.
- 273.a H. Mihara, H. Aoyagi, T. Ueno, T. Kato en N. Izumiya, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1986, 59, 2651.
- b T. Kanmera en N. Izumiya, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1982, 19, 79.
274. S.F. Brady, R.M. Freidinger, W.J. Paleveda, C.D. Colton, C.F. Homnick, W.L. Whitter, P. Curley, R.F. Nutt en D.F. Verber, *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 764.
275. J.H. Jones, '*Amino Acids, Peptides and Proteins*', G.T. Young (Ed), The Chemical Society, Burlington House, London, 1970, 2, 166.
276. U. Schmidt, A. Lieberknecht, H. Griesser en J. Talbiersky, *J. Org. Chem.*, 1982, 47, 3261.
277. H.R. Morris, D.H. Williams en R.P. Ambler, *J. Biochem.*, 1971, 125, 189.
278. B.J. Millard, *Tetrahedron Lett.*, 1965, 3041.
279. B.V. Rozynov, V.M. Burikov, V.V. Shilin en A.A. Kiryushkin, *Zhur. Obsh. Khimii*, 1968, 38, 2690.
280. K. Eckart, U. Schmidt en H. Schwarz, *Liebigs Ann. Chem.*, 1986. 1940.

281. M.C. Etter en P.W. Baures, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 639.
282. H. Kunz, W. Sager, W. Pfrengle en D. Schanzenbach, *Tetrahedron Lett.*, 1988, 29, 4397.
- 283.a Y.C. Martin, '*Quantitative Drug Design*', Marcel Dekker, New York, 1978.
- b H. Konig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1980, 19, 749.
- c I. Gros, H. Ringsdorf en H. Schupp, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1981, 20, 305.
284. D.H.R. Barton, *Angew. Chem.*, 1970, 82, 827; '*Nobel Lectures Chemistry 1963-1970*', Elsevier, Amsterdam, 1972, 298.
285. A.J. Hopfinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 7196, en verwysings daarin vervat.
286. D.H. Rich, P.K. Bhatnagar en M.S. Bernatowicz, *Peptides*, 1978, 349.
- 287.a C. Bosch, L.R. Brown en K. Wiithrich, *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 603, 298.
- b G. Wider, K.H. Lee en K. Wiithrich, *J. Mol Biol.*, 1982, 155, 367.
288. H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1982, 21, 512.
289. R.F. Nutt, D.F. Veber en R. Saperstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, 102, 6539.
290. IUPAC-IUB Kommissie op Biochemiese Nornenklatur, *J. U« Biol.*, 1970, 52, 1; *Biochemistry*, 1970, 9, 3471.
291. O. Jardetzky, *Biochim. Biophys Acta*, 1980, 621, 227.
- 292.a H. Kessler, W. Hehle en R. Schuck, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 4534.
- b Y.A. Bara, A. Friedrich, H. Kessler en M. Molter, *Chem. Ber.*, 1978, 111, 1045.
- c H. Kessler en P. Kondor, *Chem. Ber.*, 1979, 112, 3541.
- d L.G. Pease, C.H. Niu en G. Zimmermann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, 101, 184.
- e H. Kessler en G. Holzemann, *Liebigs Ann. Chem.*, 1981, 2028.
- f J.P. Meraldi, R. Schwyzer, A. Tun-Kyi en K. Wiithrich, *Helv. Chim. Acta*, 1972, 55, 1962.
- g D. Demel en H. Kessler, *Tetrahedron Lett.*, 1976, 2801.
- h L.G. Pease en C. Watson, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100, 1279.
293. Yu. A. Ovchinikov en V.T. Ivanov, *Tetrahedron*, 1975, 31, 2177.
294. J.A. Joule en B.F. Smith, '*Heterocyclic Chemistry*', Van Nostrand Reinhold, 1973, p 18.

295. V.F. Bystrov, *Progress in NMR Spectroscopy*, 1976, 10, 41.
296. H. Kessler, M. Gehrke en C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 490.
297. G. Wider, R. Baumann, K. Nagayama, R.R. Ernst en K. Wiithrich, *J. Magn. Reson.*, 1981, 42, 73.
298. H. Kessler en D. Ziessow, *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, 1982, 30, 488.
299. L. Müller, A. Kumar en R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1976, 65, 839.
300. G.A. Morris en L.D. Hull, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 4703.
301. A. Bax en G.A. Morris, *J. Magn. Reson.*, 1981, 42, 501.
302. M. Kuo en W.A. Gibbons, *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 6278.
- 303.a J. Jeener, R.H. Meier, P. Bachmann en R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1979, 71, 4546.
b S. Macura, K. Wiithrich en R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1982, 46, 269.
304. S. Forsen en A. Hoffmann, *J. Chem. Phys.*, 1966, 45, 2049.
305. H. Kessler, P. Kondor, G. Krack en P. Kramer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100, 2548.
306. E.R. Stimson, Y.C. Meinwald, G.T. Montelione en H.A. Scheraga, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1986, 27, 569.
307. C.M. Deber, F.A. Bovey, J.P. Carver en E.R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, 92, 6191.
308. O.V. Howarth en D.M. Lilley, *Progress in NMR Spectroscopy*, 1978, 12, 1.
309. A. Otter, P.G. Scott en G. Kotovych, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109, 6995.
310. I.Z. Siemion, T. Wieland en K.H. Pook, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1975, 14, 702.
311. J.A. Poppe, W.G. Schneider en H.J. Bernstein, *'High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance'*, McGraw-Hill, New York, 1959, p 400.
312. O. Jardetzky en C.G.K. Roberts, *'NMR in Molecular Biology'*, Academic Press, New York, 1981, 163.
313. T. Ishida, M. Tanaka, M. Nabae, M. Inoue, S. Kato, Y. Hamada en T. Shioiri, *J. Org. Chem.*, 1988, 53, 107.
- 314.a V.F. Bystrov, S.L. Portnova, T.A. Balashova, S.A. Koz'min, Yu D. Gavrilov en V.A. Afanas'ev, *Pure Appl. Chem.*, 1973, 36, 1.
b V.F. Bystrov, V.T. Ivanov, S.L. Portnova, T.A. Balashova en Yu A. Ovchinnikov,

Tetrahedron, 1973, 29, 873.

- 315.a M.T. Cung, M. Marraud en J. Néel, *Macromolecules*, 1974, 7, 606.
- b G.N. Ramachandran, '*Conformation of Biological Molecules and Polymers*', E.D. Bergmann en B. Pullman (Eds), Die Israeliese Akademie van Wetenskappe en Geesteswetenskappe, Jerusalem, 1973, 1.
- 316.a M. Karplus, *J. Chern. Phys.*, 1959, 30, 11.
- b M. Karplus, *J. Am. Chern. Soc.*, 1963, 85, 2870.
317. V.N. Solkan en V.F. Bystrov, *Bull. Acad. Sci. USSR, tn« Chern. Sci.*, 1974, 23, 1232.
318. K.D. Kepple, A. Go, R.H. Logan Jr. en J. Savrda, *J. Am. Chern. Soc.*, 1972, 94, 973.
319. J.W. Emsley, J. Feeney en L.H. Sutcliffe, '*High Resolution NMR Spectroscopy*', Pergamon Press, Oxford, 1965, 1, Afdelings 8.13.2 en 8.1.5.L
320. J.J. Stezowski, H.W. Pohlman, E. Haslinger, H. Kalchhauser, U. Schmidt en B. Pozzoli, *Tetrahedron*, 1987, 43, 3923.
321. S.S. Zimmerman en H.A. Scheraga, *Biopolymers*, 1977, 16, 811.
- 322.a J. Dale en K. Titlestad, *J. Chern. Soc., Chern. Comtnun.*, 1970, 1403.
- b LZ. Siemion, *Justus Liebig's Ann. Chern.*, 1971, 748, 88.
- c K. Titlestad, P. Groth, J. Dale en M.L. Ali, *J. Chern. Soc., Chern. Commun.*, 1973, 346.
323. H. Egli en W. von Philipsborn, *Helv. Chim. Acta*, 1981, **64**, 976.
324. H. Booth, *Tetrahedron Lett.*, 1965, 411.
325. H. Kessler, C. Griesinger en K. Wagner, *J. Am. Chern. Soc.*, 1987, 109, 6927.
326. A.J. Fishman, D.H. Live, H.R. Wyssbrod, W.C. Agosta en D.J. Cowburn, *J. Am. Chern. Soc.*, 1980, 102, 2533.
327. K.D. Kepple, A. Go en D.R. Pilipauskas, *J. Am. Chern. Soc.*, 1975, 97, 6830.
328. R. Balasubramanian, A.V. Lakshminarayanan, M.N. Sabesan, G. Tegoni, K. Venkatesan en G.N. Ramachandran, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1971, **3**, 25.
- 329.a D.F. De Tar en N.P. Luthra, *J. Am. Chern. Soc.*, 1977, 99, 1232.
- b M.J.O. Anteunis, R. Callens, V. Asher en J. Sleenckx, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, 87, 41.

330. A. Bax en R. Freeman, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 1099.
331. H. Kessler, M. Gehrke en C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1988, 27, 490; en verwysing daarin vervat.
332. P. Balaram, *Proc.-Indian. Acad. Sci. Chem. Sci.*, 1985, 95, nr. 1-2, 21-38.
333. A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J. Lee, C.D. Warren en R.W. Jeanloz, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 811.
334. A. Bax en D.G. Davis, *J. Magn. Reson.*, 1985, 63, 207.
335. H. Kessler, J.W. Bats, C. Griesinger, S. Koll, M. Will en K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 1033.
336. J.-L. Bernier, J.-P. Henichart en R. Houssin, *Tetrahedron*, 1986, 42, 2695.
337. G. Nemethy en M.P. Printz, *Macromolecules*, 1972, 5, 755.
338. Sybyl, Tripos Kragveld plus MAXIMIN 2, Tripos Associates, St. Louis, Missouri, V.S.A.
339. *G.R. C. Critical Reviews in Biochemistry*, 1980, 8, 315-399.
340. C.K. Johnson, 'ORTEP-II: A FORTRAN Thermal Ellipsoid Plot Program for Crystal Structure Illustrations', Oak Ridge Nationale Laboratorium, Oak Ridge, TN; *Technical Report ORNL-5138*, 1971.