

B 2953

KÉTDIMENZIÓS (2D) NMR SPEKTROSKÓPIA,

ALKALMAZÁSOK TERMÉSZETES ANYAGOK

SZERKEZETVIZSGÁLATÁBAN

egyetemi doktori értekezés

Készítette: Pelczer István
Gyógyszerkutató I. K.v.
Budapest

Benyújtva: József A. Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Szeged

1989.

INVESTIGATION



NO. 100

DATE

BY

RECEIVED

NO. 100

DATE

BY

RECEIVED

NO. 100

DATE

BY

RECEIVED

NO. 100

DATE

BY

RECEIVED

NO. 100

DATE

BY

Tartalomjegyzék

Bevezetés	1
Kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia	3
A 2D NMR módszerek csoportosítása	5
Növényekből izolált természetes anyagok szerkezetvizsgálata	8
Új alkaloidok a <u>Haplophyllum glabrinum</u> fajból	8
Új szeszkviterpén észterek és alkaloidok <u>Euonymus</u> fajokból	10
Több-spin kölcsönhatás a homonukleáris NOESY spektrumon	16
Vizsgálatok primycin komponensek körében	20
Az A ₁ komponens szerkezetbizonyítása	22
Csatolási korrelációs (COSY) kísérletek	23
Áttételes korrelációs (RELAY) spektrumok	28
Spin-lock típusú korrelációs mérések (SLCOSY)	30
Kétdimenziós NOE (NOESY) kísérletek	32
¹ H homonukleáris 2D mérésekkel tisztázott asszignációk az A ₁ komponensre	34
Az A, B, C és 1, 2, 3 komponens-csoportok	35
További vizsgálatok	38
Kísérleti körülmények	39
Összefoglalás	41
Irodalom	42
Köszönetnyilvánítás	49

Bevezetés

"A mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópia az elmúlt évtizedben egészen kivételes fejlődésen ment át. A kémiának nagyon kevés olyan ága maradt, ami nem függne erősen az NMR spektroszkópiai eredményektől."

A fönti idézet R.R. ERNST professzortól, a pulzus- és Fourier-transzformációs (PFT), valamint a két- (több-)dimenziós NMR spektroszkópia talán legnagyobb egyéniségétől származik, abból a Chimia folyóiratban publikált¹ összefoglalóból, amelyben a kétdimenziós NMR spektroszkópia rendkívüli alkalmazási lehetőségeit foglalta össze. Ezt éppen tizenkét évvel előzte meg ugyanitt az általa közzétett² első összefoglaló ismertetés a két- és több-dimenziós spektroszkópia (nem csak NMR-t beleértve) föltáruló lehetőségeiről.

Ez idő alatt a kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia (más több-pulzus eljárások hasonlóan³) óriási fejlődésen ment át, új szintre emelve az NMR alkalmazhatóságát. Ma a különböző 2D NMR módszerek alkalmazásával az oldatfázisú térszerkezet teljes asszignációja lehetséges több tízezres molekulasúlyok esetén is, s számtalan megoldás kínálkozik eddig nem hozzáférhető szerkezeti adatok, molekuláris dinamikai viszonyok vizsgálatára. A több-dimenziós NMR körébe tartoznak a leképezési (zeugmatography, imaging^{4,2}) eljárások is, s a térfókuszált NMR. Ezek ma már az orvosi tudományokban, diagnosztikában, s a biológiában, biokémiában alkalmazott kutatási eszközök, ezen dolgozat kereteit azonban messze túllépi.

A kétdimenziós NMR eljárások közül is csak olyanok tárgyalására szorítkozunk, amelyek izotróp közegű, nagyfölbontású vizsgálatokhoz kapcsolódnak - bár az elv, és sokszor a konkrét alkalmazott módszerek is részben közösek, pl. a szilárd fázisú méréseknél alkalmazottakkal.^{1,2,5}

Még az így körülhatárolt terület is rendkívül gaz-

dag, és állandóan bővül; napról napra közölnek új eljárásokat, módosításokat, s a 2D mérésekből kombinált⁶ illetve valódi mérésből származó több-dimenziós térspektrumok⁷ is megjelentek az irodalomban.

Jelen dolgozatban a kétdimenziós NMR technikát és főbb változatait próbáljuk ismertetni a legteljesebb általánosságban. A konkrét módszerekről, mérés technikai megoldásokról, amik vázlatos ismertetése is meghaladná a dolgozat lehetséges kereteit, kitűnő összefoglalók,⁸⁻¹⁴ és az utóbbi években A. BAX úttörő munkáját¹⁵ követő számos könyv is megjelent,^{5,16,17,18} illetve közvetlenül kiadás előtt áll. Magyar nyelvű közlés erről a területről alig van.^{19,20,21}

Az általános összefoglaló után két fő területen próbáljuk érzékeltetni a 2D NMR spektroszkópiai megoldások szükségességét és hasznát; kis mennyiségben izolált növényi természetes anyagok (viszonylag kis molekulák), illetve a primycin antibiotikum-komplex komponenseinek szerkezetazonosításában. Utóbbi, melynél pusztán terjedelmi okokból csak homonukleáris kísérletek részletezésére kerül sor, szimmetria-okokból, és az általában hozzáférhető 250 MHz-es térerőn már valamilyest a nagyobb molekulák eseteihez közelítő példa.

Kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia

A két(több-)dimenziós spektroszkópia mint elv, megközelítés nagyon általános, és belefér minden olyan eljárás, amely egynél több - nem föltétlenül frekvencia - paramétertől függő frekvencia típusú válaszfüggvényt ad.² Ezt az általános megközelítést az alább következő tárgyalásban leszűkítjük arra a gyakorlati körre, amikor a mérhető mágnesezettség két időparaméter függvénye, s a kétdimenziós spektrumot a két időparaméter szerinti 2D Fourier-transzformációval²² állítjuk elő.

A mérés négy fő szakaszból áll²³:

előkészítés - kifejlődés - átvitel - adatgyűjtés.

Az előkészítés során a vizsgált spinrendszert a szükséges kiindulási állapotba visszük (ami lehet éppen a nyugalmi, vagy valamilyen kiválasztott gerjesztettségű állapot), hogy a második szakaszban (amit a t_1 időparaméterrel jellemezhetünk) a megfelelő időfüggő Hamilton operátor szerint változzon. Az átviteli (mixing) szakasz sokféle lehet, ebben történik meg a mágnesezettség - esetleg többféle, többszörös - átvitele, "keverése", míg végül a rendszer a +1 vagy -1 kvantumállapotba jut, s megtörténik a detektálás (t_2). A detektált mágnesezettség így két (t_1 , t_2) időparaméter függvénye.

A mérés során a "kétdimenziós FID"-et úgy állítjuk elő, hogy a teljes fönti sorozatot megfelelően sok, általában ekvidisztáns t_1 idővel megismételjük, egyébként azonos paraméterek mellett.

A spinrendszernek a mérés során bekövetkező állapotváltozásainak leírására, illetve a kapott eredmény értelmezésére ma a gyakorlati igényeknek és szükségleteknek legtöbbször messze megfelelő, viszonylag egyszerű és kényelmesen kezelhető szorzatoperátoros módszer

használatos.²⁴

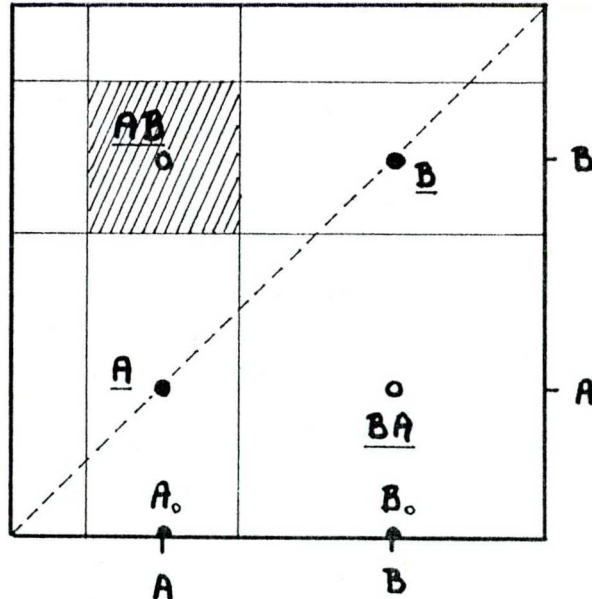
Attól függően, hogy a mágnesezettség-átvitel útja (coherence pathways²⁵) milyen, különböző jelenségeket észlelhetünk a 2D NMR spektrumon, köztük olyanokat (pl. több-kvantum korrelációkat), amelyeket szokásos 1D kísérleti körülmények között nem is lehet detektálni.

A 2D NMR spektrumon az 1. ábrán vázlatosan illusztrált jel-típusokat találjuk (a példa az eltolódás-korrelációk típusát mutatja):

- ha a mágnesezettség-átvitel kiinduló és végső pozíciója ugyanaz a spin, tehát a t_1 és t_2 szerint a moduláció azonos, ún. autokorrelációs (diagonális) jelet kapunk (A és B).

- ha az átvitel szakaszában a mágnesezettség átvődik másik spinre, s így a két időszakasz szerinti moduláció különbözik, korrelációs jeleket (keresztcsúcsokat) kapunk (AB, BA). A két átviteli irány nem föltétlenül ekvivalens.

- ha a detektált mágnesezettségnek t_1 szerint nem modulálódó része is van, ún. axiális jelek is mutatkoznak a spektrumon (A₀, B₀), amik a relaxációs viszonyokra vonatkozó információt tartalmaznak.



1. ábra. Vázlatos kétdimenziós (2D) NMR (kémiai eltolódás típusú) spektrum.

A spektrumok megjelenését befolyásoló, meghatározott jelenség kiválasztását szolgáló különböző technikai megoldásokkal itt nincs mód részletesen foglalkozni; a néhány alapvető megoldást²⁶ nagyon sokféle variáció bővíti.^{13,27,5}

A 2D NMR módszerek csoportosítása

A kétdimenziós eljárások a detektált jelenség típusa, illetve a két koordinátaként szereplő paraméterek szerint a következőképpen (is) csoportosíthatók:

- 2D-J spektroszkópia
 - eltolódás típusú korrelációk;
 - skaláris csatolás (COSY)
 - 1Q és MQ korrelációk
 - dipoláris csatolások (NOESY)
 - kémiai cserélődés (EXSY)
- szerint
- kombinált mérések
 - egyéb eljárások.

A 2D-J spektroszkópia⁸ a spin-echo módszerek közé tartozik; a kémiai eltolódás és a csatolási állandó elkülönítésére szolgál, s az első időben igen népszerű volt. Ma azonban sokkal ritkábban használják: főként a szoros csatolásokból eredő problémák miatt, és mert gyakran más, kémiai eltolódás típusú eljárásokkal is megkaphatók, megbízhatóbban, ugyanazok az adatok.^{1,27} Szelektív besugárzásos változatai azonban, főleg heteronukleáris távolható csatolások azonosításában jól használhatók.

A kémiai eltolódás típusú 2D módszerek közé tartozik az is, amelyet annak idején JEENER elsőként javasolt²⁸; ez a legegyszerűbb, bár azóta rendkívül sok változatban kidolgozott ún. COSY (CORrelated Spectroscopy) pulzusszekvencia.²⁹

Ha, az 1. ábra szerint, a gerjesztés az A és B magokat egyaránt érinti, homonukleáris, ha A és B magokat külön gerjesztjük, heteronukleáris mérésről beszélhetünk, bár (igen szelektív, ún. formázott pulzusokkal) ezt homonukleáris rendszerben is imitálni lehet.³⁰ A "heteronukleáris" változatban csak az árnyékolt tartományt (vagy a diagonálisra szimmetrikus párját) detektáljuk.

A több-kvantum (MQ) korrelációknál az előkészítő szakaszban különböző (homo- és/vagy heteronukleáris) több-kvantum átmeneteket gerjesztünk,^{31,32} s ezek t_1 időbeli modulációját közvetve detektáljuk t_2 során.

Ha az átvitel dipoláris csatolás (NOE)³³ révén megy végbe, olyan 2D térképet (v.ö. 1. ábra) kapunk, amelyben a keresztcsúcsok a térközelséget mutatják bizonyos spinek között (Nuclear Overhauser Effect correlated Spectroscopy: NOESY).^{34,35} A mérés megfelelő kalibrációval a térbeli távolságok kvantitatív meghatározására is alkalmas.

A NOE a térerőtől, a minta illetve a kölcsönhatásban lévő magok saját tulajdonságaitól, a mozgékonyagtól (korrelációs időtől), s így részben a molekulatömegtől függően lehet pozitív vagy negatív,³³ esetleg (^1H homonukleáris esetben nagy általánosságban 200-500 MHz és $M \approx 800-2000$ D tartományban) nulla, vagy ahhoz közeli érték. Ilyenkor az ún. spin-lock módszerek^{36,37} segíthetnek, amik mindig pozitív NOE (ROE)³⁷ értéket adnak. (Spin-lock technikák a skaláris csatolásokra alapozott módszerek körében is ismertek,^{38,39,40} és rendkívül hatásosnak bizonyultak.²⁰)

A 2D NOE spektroszkópia is alkalmazható mind homo-, mind heteronukleáris változatban is.

A fentihez nagymértékben hasonló technikai megoldást igényel az intra- vagy/és intermolekuláris cserére alapozódó korrelációs változat, az ún. EXSY (EXchange Spectroscopy).¹⁴ Ennek segítségével a molekuláris dina-

mikai jelenségek (konformációs és kémiai egyensúlyok, stb.) esetenként egyedülálló módon vizsgálhatók, beleértve az energetikai viszonyokat is.

A kombinált módszerek körébe nem soroljuk a mechanikusan egymásba ágyazott kísérleteket; vannak viszont olyan változatok, amelyek (két vagy több) független mágnesezettség-átviteli műveletet "sorbakapcsolnak", tehát az átviteli szakasz két (több) önálló részből áll - egyetlen detektálási (t_2) periódus mellett.⁴¹ Ha például COSY és NOESY típusú átviteleket kötünk össze, (peptid) szekvenálásra is alkalmas módszerhez jutunk,⁴¹ de az elv sokféleképpen kiterjeszthető és alkalmazható, különösen hatásosan, ha spin-lock módszerekkel kombináljuk.^{27,20}

Az eddig tárgyaltak közé nem férő, de az eredeti föltételeknek eleget tevő eljárásokat soroljuk az "egyéb" kategóriába; mint például a pulzus-hossz szisztematikus változtatásával készíthető kalibrációs 2D módszereket, vagy a 2D FT-vel összekötött relaxációs idő mérést.

Az eddigi, nagyon tömörített és általános összefoglaló után két területről való példákon szeretnénk bemutatni a 2D NMR módszerek alkalmazását; elsősorban COSY és NOESY típusú megoldásokról lesz szó, a bemutatott spektrumok mind homonukleáris kísérletek eredményei.

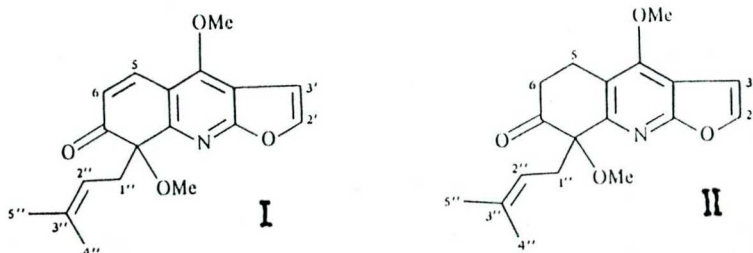
Növényekből izolált természetes anyagok szerkezetvizsgálata

A SZOTE (Szeged) Gyógynövény- és Drogismereti Intézetében intenzív izolációs munka folyik, melynek célja különböző növényi eredetű természetes anyagok elválasztása és azonosítása. Ebbe a munkába kapcsolódtunk be az - általában csak néhány, vagy néhány tíz mg mennyiségben - elválasztott különböző anyagok NMR szerkezetvizsgálatával, -azonosításával.

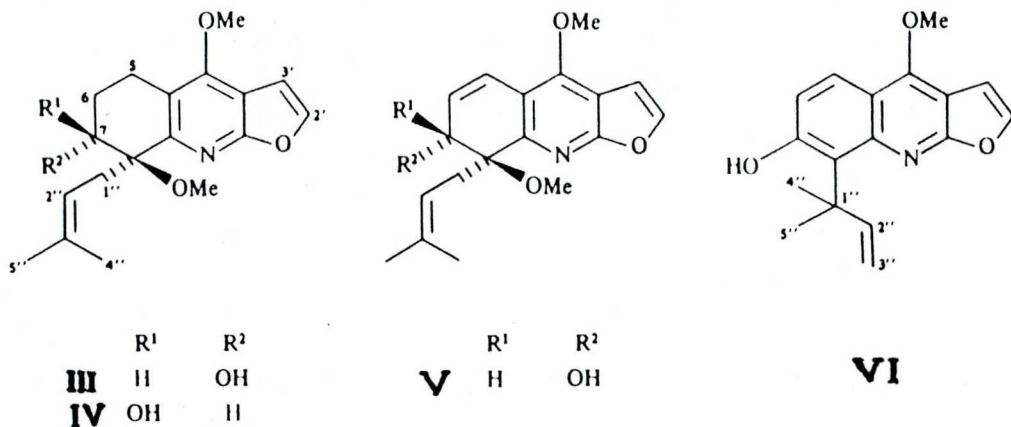
A rendszerint nem túl nagy molekulák ($M < 700$) spektrumainak elemzéséhez gyakran elegendő volt szelektív besugárzásos módszerek (lecsatolás, DDS, NOEDS⁴²) alkalmazása, de esetenként, átfedő jelcsoportok, illetve közeli, szelektíven nem besugározható jelek miatt érdemes és szükséges volt kétdimenziós csatolási (COSY)²⁹ illetve 2D NOE³⁴ korrelációs spektrumokat készíteni.

Új alkaloidok a Haplophyllum glabrinum fajból

Az iráni eredetű Haplophyllum glabrinum fajból (Rutaceae) származó vegyületeket dr. Rózsa Zsuzsa és munkatársai izolálták és elemezték először. Ismert alkaloidok, kumarin, és lignán-származékok mellett új alkaloidot is találtak, a szintén izolált, furokinolin származék perfamin (I) közeli rokonát, a dihidroperfamint (II).⁴³



További kromatográfiás elválasztások eredményeként ugyanebből a fajból az alábbi négy, szintén furokinolin származék alkaloidot sikerült izolálni, és elsősorban NMR spektroszkópiai módszerekkel a szerkezetüket azonosítani⁴⁴: **III-VI**.



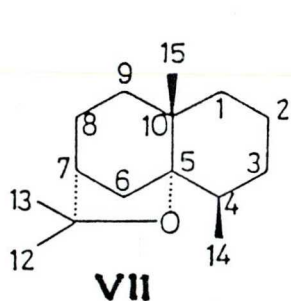
Bár az ¹H spinrendszerek ezekben a szerkezetekben nem különösebben bonyolultak, a részben átfedő jelek egyértelmű asszignálásához egyszerű abszolút érték COSY⁴⁵ kétdimenziós spektrumot használtunk. A 4-OMe pozícióját, illetve a C(7), C(8) centrumok relatív konfigurációját NOEDS mérésekkel⁴² bizonyítottuk.

A **III-IV** diasztereomer pár közül a **III** spektroszkópiai adatai megegyeztek a korábban már izolált, de a relatív konfiguráció azonosítása nélkül közölt⁴⁶ haplophyllidin adataival, míg **IV** annak diasztereomerjének bizonyult,⁴⁴ s eddig le nem írt anyag. Szintén új alkaloidnak bizonyult az **V**, az előző 5,6-telítetlen kötést tartalmazó származéka. A **VI** is új, emellett olyan értelemben különlegesség, hogy a kinolin alkaloidok között korábban csak a buhapi⁴⁷ esetében írtak le 1,1-dimetilallil oldalláncot. A három új alkaloidnak a dihidroperfaminol (**IV**), perfaminol (**V**) és 8(1'',1''-dimetilallil)-confusamelin (**VI**) triviális neveket javasoltuk.⁴⁴

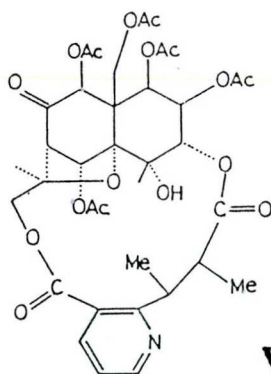
Új szeszkviterpén észterek és alkaloidok Euonymus fajokból

A dihidroagarofurán alapvázra (VII) visszavezethető szeszkviterpén észterek és alkaloidok elsősorban a Celastraceae családban fordulnak elő. Ilyen típusú vegyületeket izoláltak több Euonymus fajból, így például az E. europaeus, E. alatus, E. sieboldianus, E. latifolia, E. oxyphyllus és E. verrucosus fajokból.^{48,49,50} A SZOTE Gyógynövény- és Drogismereti Intézetében az említett munkacsoportban az E. japonicus, E. europaeus és E. latifolius fajokat vizsgálták.

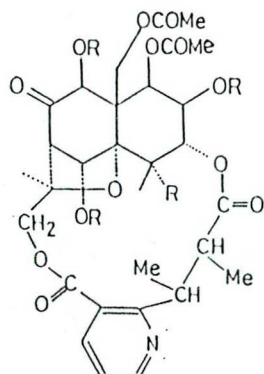
Az elsőből korábban az irodalomban csak az evonin alkaloid (VIII) izolálását közölték.⁴⁸ Az E. europaeus fajból több, a IX általános képlettel jellemezhető, illetve a X alkaloidokat,⁴⁸ valamint a XI, XII és a XIII alkoholok ($R^n = H$) különböző észtereit⁵¹⁻⁵⁴ izolálták. Az E. latifolius fajból csak a XIV szeszkviterpén alkoholt írták le.⁴⁹



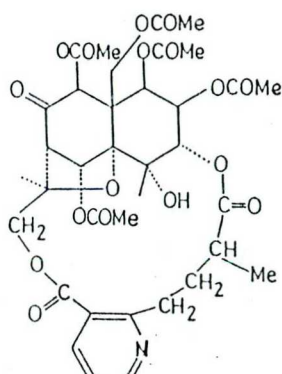
VII



VIII

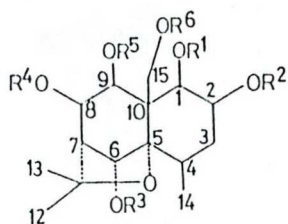


IX

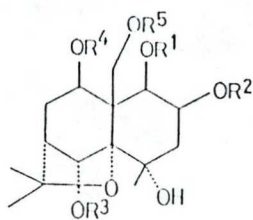


X

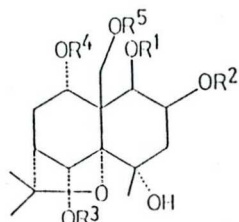




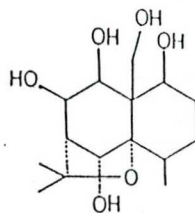
XI



XII

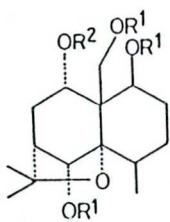


XIII

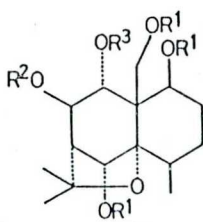


XIV

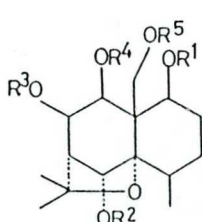
A Szegeden folyó, műszeres szerkezetvizsgálatokkal összekötött izolációs munka eredményeként tizenkilenc új vegyületet sikerült azonosítani (már korábban közölt származékok mellett), s szerkezetüket NMR spektroszkópiái, esetenként röntgen-kristallográfiai, valamint tömegspektroszkópiái módszerekkel meghatározni^{55,56} (ld. 1. táblázat). Az új vegyületek között a fentebb felsoroltakon kívül a következő szeszkviterpén alkoholok fordultak elő alapvázként: **XV-XXII** ($R^n = H$ valamennyi esetben).



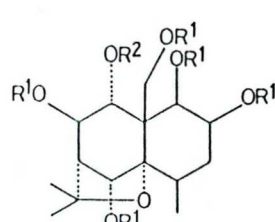
XV



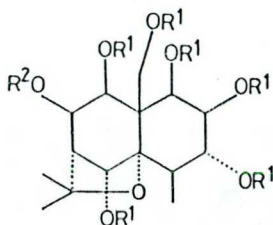
XVI



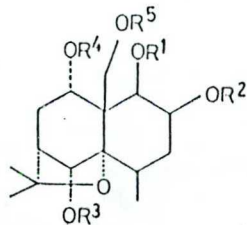
XVII



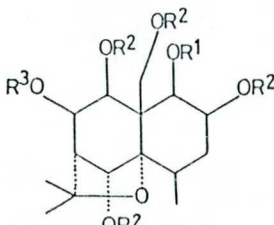
XVIII



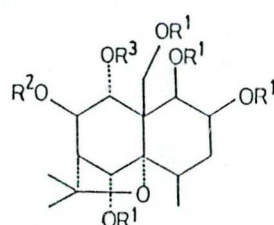
XIX



XX



XXI



XXII

1. táblázat

Uj szeszkviterpén észterek és alkaloidok Euonymus
fajokból^{55,56}

vegyület		
alkohol	index	észterező szubsztituensek ^x
XI	a	$R^1 = H, R^{2,4} = PhCO, R^{3,5,6} = MeCO$
XIII	a	$R^{1-5} = 3 \times Fu, 2 \times MeCO$
	b	$R^{1-5} = 2 \times PhCO, 3 \times MeCO$
	c	$R^{1-5} = 2 \times Fu, 2 \times MeCO, 1 \times Bu^S$
	d	$R^{1-5} = 2 \times Fu, 2 \times MeCO, 1 \times Bu^S$
	e	$R^{1-5} = 1 \times PhCO, 2 \times MeCO, 2 \times Bu^S$
	f	$R^{1-5} = 1 \times Fu, 2 \times MeCO, 2 \times Bu^S$
XV	a ^{xx}	$R^1 = MeCO, R^2 = PhCO$
	b	$R^1 = MeCO, R^2 = Nic$
XVI	a ^{xx}	$R^{1,2} = MeCO, R^3 = PhCO$
	b	$R^{1,2} = MeCO, R^3 = Nic$
	c ^{xx}	$R^1 = MeCO, R^2 = H, R^3 = PhCO$
XVII	a	$R^{1-5} = 1 \times PhCO, 1 \times Nic, 3 \times MeCO$
XVIII	a ^{xx}	$R^1 = MeCO, R^2 = PhCO$
XIX	a ^{xx}	$R^1 = MeCO, R^2 = PhCO$
XX	a	$R^{1,2,3,5} = MeCO, R^4 = PhCO$
	b	$R^{1,3,5} = MeCO, R^{2,4} = PhCO$
XXI	a	$R^1 = H, R^2 = MeCO, R^3 = PhCO$
XXII	a	$R^1 = MeCO, R^{2,3} = PhCO$

^x rövidítések: $Bu^S = \alpha$ -metilbutiril

Nic = nikotinoil

Fu = 3-furoil

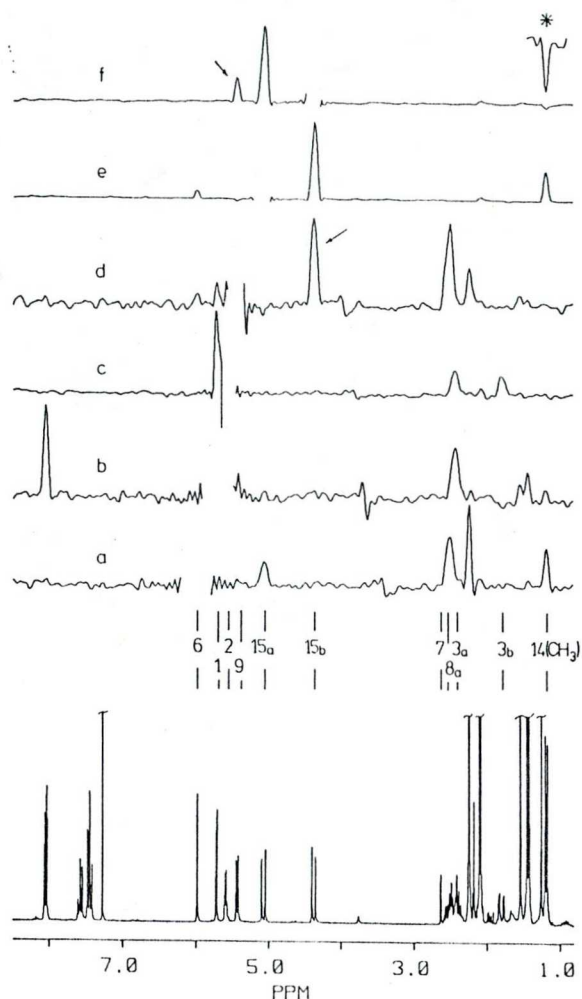
Ph = fenil

^{xx} röntgen-krisztallográfiai szerkezetbizonyítás is történt

Mint látható, számos esetben az észterezési pozíciókat még nem sikerült megállapítani. Ez, ha NMR spektroszkópiai megoldást keresünk, esetleg a NOE kölcsönhatások elemzése, de biztosabban az észter-karbonil szerek és a vázprotonok távolható (3J) csatolásai azonosításával oldható meg⁵⁷; ilyen kísérletek még folyamatban vannak.

A fenti vegyületek köréből (XX.a) egy tipikus 1D 1H NMR spektrumot a 2. ábra alsó részén láthatunk. A csatolási kölcsönhatások esetenként 1D lecsatolási különbség-spektrumok (DDS⁴²) segítségével is egyértelműen tisztázhatók voltak, de - különösen a kevesebb O-funkciót hordozó származékoknál, mint pl. a XV, XVI, stb. alkoholok észtereinél - átfedések miatt jobb megoldás volt COSY típusú⁴⁵ spektrumokat készíteni. Előnyösnek mutatkozott a 2D eljárás alkalmazása kis értékű csatolások azonosítása esetén (pl. rendszerint a H-6 és H-7 párosnál), s ráadásul egyetlen, viszonylag rövid (abszolút érték változatú) kísérletből a teljes csatolási háló azonosítható.

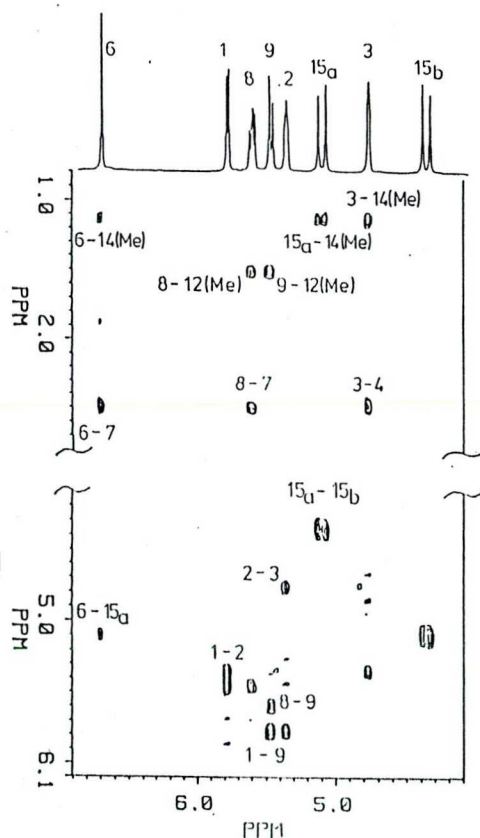
Még inkább érdemes volt 2D kísérleteket végezni a térbeli (NOE) kölcsönhatások (relatív konfigurációk és konformáció) vizsgálatához. Mint a szerkezeti képletek összehasonlításából kitűnik, a relatív konfigurációk megállapítása ezen molekulák esetében központi kérdés, s ez részben a vicinális csatolási állandók elemzésével,^{55,56} részben a relatív térbeli viszonyok tisztázásával lehetséges. Ha a megfelelően szelektív besugárzás feltételei adva voltak, végeztünk 1D NOEDS⁴² méréseket, de a csatolási kölcsönhatásoknál már említett okokból gyakran 2D mérés látszott célszerűbbnek.



2. ábra. A **XX.a** izolált szeszkviterpén észter 1D ^1H spektruma CDCl_3 oldószerben, 303 K hőmérsékleten. Az 1D spektrum fölött - azonos léptékben - a fázisos NOESY spektrum kiválasztott, F1 dimenzió szerinti metszetei vannak föltüntetve a következő eltolódásoknál; a.: H-6, b.: H-1, c.: H-2, d.: H-9, e.: H-15_a, f.: H-15_b. A csillaggal jelzett, kierősített, negatív fázisú korreláció közvetített ("indirekt") NOE-t jelez.⁵⁸

A 2. ábrán látható, hogy a 2D NOE spektrumon számos kölcsönhatás egyidejűleg azonosítható, amelyekből le lehet vezetni a vázon elhelyezkedő protonok relatív térhelyzetét, sőt, - korlátozottan - az észterező szubsztituensek pozícióira is lehet következtetni.

Az izolált anyagoknál gyakori kérdés volt a C(9) relatív konfigurációja, amit rendszerint a H-9 és a 15-CH₂ protonok valamelyikének a kölcsönhatása alapján lehetett legegyszerűbben eldönteni. (A 2. ábrán az ezt mutató korrelációs csúcsokat nyíllal jeleztük.) A 3. ábrán egy olyan epimer (XIX.a) hasonló 2D spktrum részlete látható, amelyiken a C(9) relatív konfigurációja ellentétes. Emellett szól, hogy nincs keresztcsúcs H-9 és a 15-CH₂ protonok között, bár ez még önmagában nem tekinthető meggyőző bizonyítéknak.¹⁷ Bizonyíték viszont a H-9 és a 12-Me protonok kölcsönhatását mutató "9-12(Me)" korreláció, aminek a megjelenése csak H-9(α) térhelyzet esetén képzelhető el.



3. ábra. A XIX.a izolált szeszkviterpén észter fázisos NOESY spktrumának részlete néhány asszignált kölcsönhatás föltüntetésével. A 2D térképen csak pozitív szintek vannak kirajzolva. A kölcsönhatási (mixing) idő 800 ms volt.

ban

Több-spin kölcsönhatás a homonukleáris NOESY spektrumon

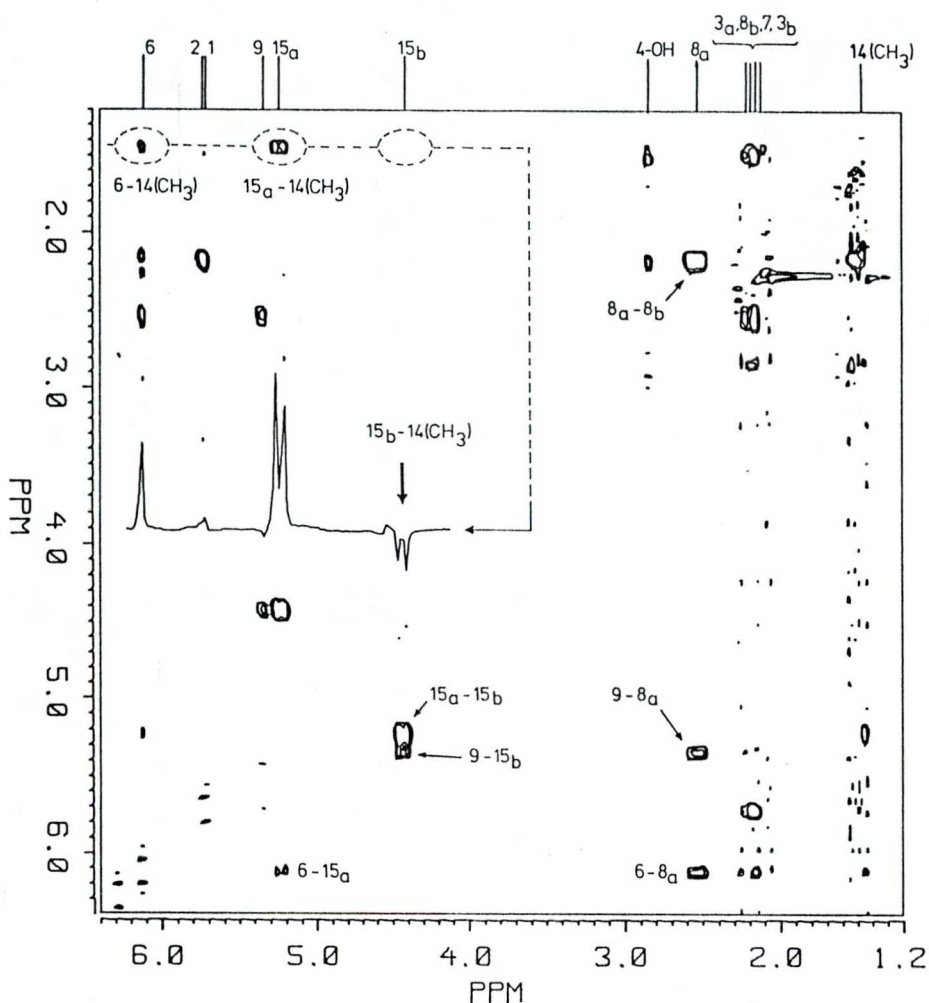
Érdekes jelenséget (4. ábra) sikerült detektálnunk a 2D NOE fölvételek elemzésekor, tudomásunk szerint az irodalomban még más által nem közölt változatban.⁵⁸ Az ún. homonukleáris "indirekt",⁵⁹ vagy közvetített NOE kétdimenziós, NOESY spektrumon való megjelenéséről van szó, amit inkább több-spin kölcsönhatásnak lehetne pontosabban és általánosabban nevezni.⁵⁸

A megfigyelhető NOE csak két spin esetén a köztük lévő távolság egyszerű (r^{-6}) függvénye,³³ de ha több spin együtteséről van szó, az egész rendszert együtt kell tekintetbe venni. Másképp a mért NOE értékekből számított távolságadatokban komoly hiba mutatkozhat,⁶⁰ de akár kvalitatív tévedések is lehetnek a következményei.^{17,18} Másfelől nézve; ezek a földerített összetett kölcsönhatások a vizsgált szerkezetre vonatkozó újabb információt jelenthetnek.¹⁷

A több-spin kölcsönhatás a NOE spektrumokon önmagában nem újdonság; irodalmi közlésekben találkozhatunk 1D homonukleáris,^{59,61} 1D heteronukleáris^{62,63} esetek példáival, utóbbival még három különböző atomfajta egyidejű részvételével is.⁶⁴ A legutóbbi években került előtérbe a jelenség a heteronukleáris kétdimenziós NOE (HOESY) spektroszkópiában.^{65,66}

A homonukleáris 2D NOE spektroszkópia (NOESY) körében a jelenség említésre kerül, de csak kémiai cserereakcióval összefüggésben, már MACURA és ERNST alapvető közleményében,³⁵ míg nagymolekulák esetére (hosszú korrelációs idők, negatív NOE) közöltek ugyan példát, de csak mellékesen, minden részletezés nélkül.⁶⁷ Szintén nagymolekulák körében, de spin-lock NOE (CAMELSPIN),³⁶ elterjedtebb néven ROESY³⁷ kísérletben való megjelenését tárgyalták BAX és munkatársai⁶⁸ mint áttélezett ("relayed") NOE-t, amit az ún. HOHAHA³⁹ mágneszettség-átviteli folyamat komplikálhat.⁶⁹

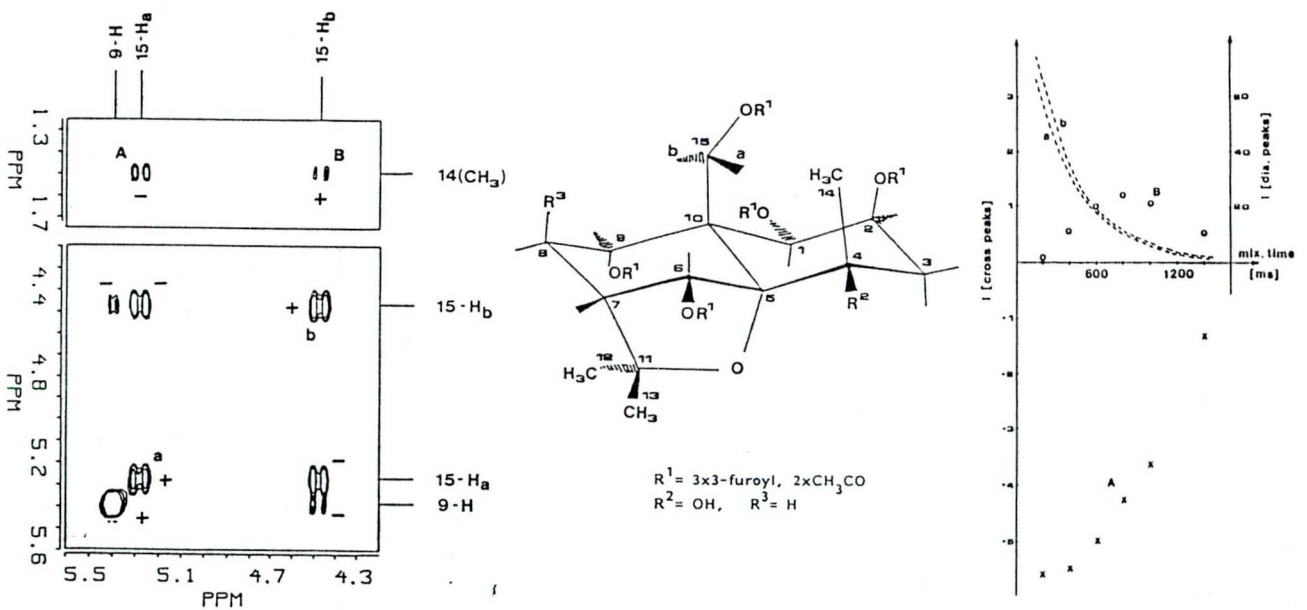




4. ábra. A XIII.a szeszkviterpén észter fázisos NOESY spektruma CDCl_3 oldószerben, 303 K hőmérsékleten, 800 ms kölcsönhatási (mixing) idővel. Néhány jellemző NOE korrelációt asszignáltunk a 2D térképen. A betétrajzon a $14(\text{CH}_3)$ eltolódásánál vett (F2) metszet látható; míg a H-6 és H- 15_a a kismolekulák esetében jellemző pozitív NOE keresztcsúcsot ad, H- 15_b jellel ellentétes fázisú, "indirekt" NOE kölcsönhatása látszik. (A 2D térképen csak pozitív szintvonalakat rajzoltunk ki.)

Olyan esetet, amikor kis molekulák (rövid korrelációs idők, pozitív NOE) kétdimenziós spektrumán detektáltak volna több-spin ("indirekt") kölcsönhatási jelenséget, tudomásunk szerint korábban az irodalomban nem publikáltak.⁵⁸

Az 5. ábrán a **XIII.a** már bemutatott (4. ábra) NOESY spektrumának részletei láthatók, pozitív és negatív szintek egyidejű föltüntetésével. Szokásos - azaz pozitív - NOE keresztcsúcsok (H-9/H-15_b: ez bizonyítja H-9(β) relatív térhelyzetét!, H-15_a/H-15_b, és H-15_a/14(CH₃):A) mellett antifázisú (negatív) korrelációs jel is azonosítható (H-15_b/14(CH₃):B). (Alacsonyabb szinteken is vizsgálva a spektrumot hasonló detektálható a H-9/H-15_a között is.) Az ábrán föltüntettük a **XIII.a** szerkezetet, valamint az A és B korrelációs jelek, s a H-15_a, H-15_b diagonális jelek (kölsönhatási) idő függését. A diagonális jelek intenzitása monoton csökken, a közvetlen ("direkt") NOE keresztcsúcsoké erős maximum után szintén. A közvetített ("indirekt") kölsönhatás jelintenzitása tipikus "lappangás" után nő késleltetett maximumig, majd fokozatosan lecsökken. Bár a mérhető adatok kvantitatív értékelése még nem történt



5. ábra. A **XIII.a** minta előzőleg bemutatott (ld. 4. ábra) NOESY spektrumának részletei a jelek relatív fázisainak föltüntetésével. A jobboldali részen kiválasztott diagonális és korrelációs jelek intenzitása, mint a kölsönhatási (mixing) idő függvénye látható.

meg, a fentiekben leírt jelenségek a 14(CH₃) - 15-CH₂ - H-9 spineknek az 5. ábrán föltüntetett relatív térhelyzetét mutatják.

Mindez azért érdemel figyelmet, mert kis molekulák esetén, ahol a T₁ relaxációs idő (átlagos) értéke az optimális kölcsönhatási (mixing) idő a 2D NOE mérésekben,¹⁷ várhatóan (különösen szóró T₁ értékeket mutató molekulákban) gyakran találhatóak volnának ilyen kölcsönhatási jelek. Esetenként érdemes lehet külön párhuzamos mérést végezni, amelyben a kölcsönhatási idő a - lassúbb kiépülésű - "indirekt" kölcsönhatások megjelenítésére van optimalizálva. Mindenképp fontos azonban, hogy kis molekulák vizsgálatakor is ajánlott a fázisos NOESY mérés alkalmazása, mert az abszolút érték megjelenítés félrevezető lehet a kétféle kölcsönhatás megkülönböztethetlensége miatt.⁵⁸

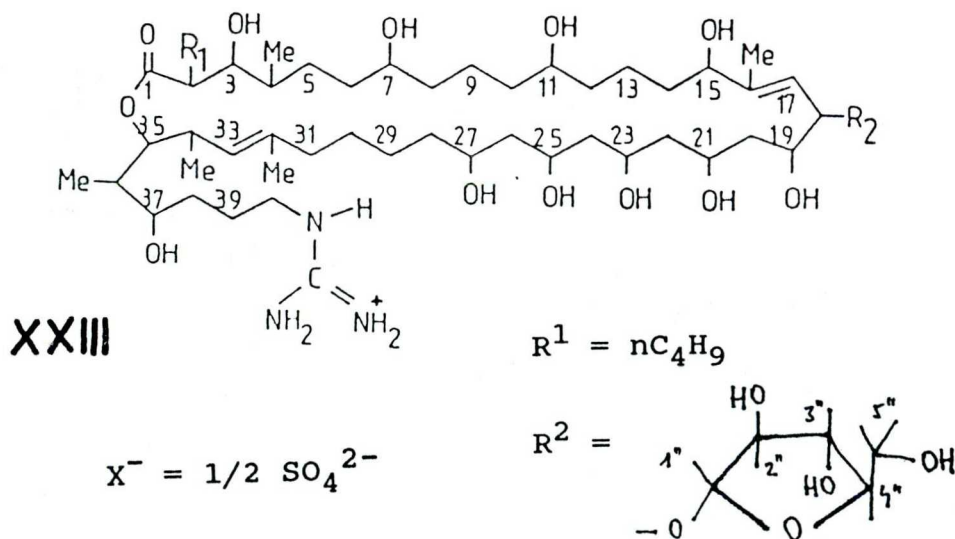
Meg kell jegyezni, hogy a fentebb is használt, általánosan elterjedt direkt/indirekt kategorizálás nem szigorúan következetes,^{17,18} s mindenképpen csak a teljes kölcsönható spinrendszer együttes elemzése, szimulációja⁷⁰ adhat pontos, kvantitatív eredményt a térszerkezetre vonatkozóan.

Vizsgálatok primycin komponensek körében

A primycin makrolid antibiotikumok keveréke, amely erős baktericid hatású gram-pozitív mikroorganizmusokkal és mykobaktériumokkal szemben, s más kedvező hatásokat is mutat (pl. ezidáig nem jeleztek rezisztenciát vele szemben). Szulfát sója a CHINOIN gyártmányaként jelenleg már forgalomban van mint az EBROMYCIN^R antiszeptikus gél hatóanyaga, amely erős külsődleges gyulladáscsökkentő.

Ezt az anyagot Magyarországon izolálták⁷¹ 1954-ben, s először egységes fermentációs terméknek vélték⁷²; utóbb is, miután komplex anyagkeverék volta bebizonyosodott, csak homológok elegyeként azonosították.⁷³

A (főkomponens) szerkezetére (XXIII) elsősorban szeko-primycinek nagyfölbontású tömegspektrometriai vizsgálatai alapján tettek javaslatot, amiket kiegészítettek töredék-származékok ¹H NMR méréseivel.⁷⁴ A β-D(-)-arabinóz cukor-szubsztituens szerkezetét savas hidrolízis után referens mintákkal való közvetlen összehasonlítás útján azonosították.^{74a,b} A teljes molekula NMR szerkezetvizsgálatára nem került sor.



Dr. Frank Judit és munkacsoportja (CHINOIN) intenzív vékonyréteg-kromatográfiás (TLC) vizsgálatokkal kiderítették, hogy az eredetileg egységesnek vélt fer-

mentációs termék több, mint húsz azonosítható komponenset tartalmaz. Ezek - elsősorban NMR spektroszkópiái, majd párhuzamosan FAB-MS - szerkezetvizsgálata már a szétválasztási próbálkozások kezdeti szakaszában megkezdődött.^{75,76} Később egyre több elválasztott komponens szerkezetvizsgálata járt több-kevesebb sikerrel,⁷⁷ míg a legalkalmasabb kromatográfiás körülmények illetve az elválasztáshoz legalkalmasabb só (acetát) megtalálása után a fermentációs termék 90%-át adó kilenc fő komponenset (ld. 2. táblázat) sikerült azonosítani,⁷⁸ illetve egyértelműen asszignálni az NMR spektrumadatok túlnyomó többségét.⁷⁹ A természetes eredetű komponensek vízben nem, vagy csak nagyon rosszul oldódnak. Kémiai módosítás révén valamelyest csökkent biológiai aktivitású, de vízben oldódó származék képzését sikerült megoldani,^{80,81} s bizonyítani annak szerkezetét.⁸²

2. táblázat

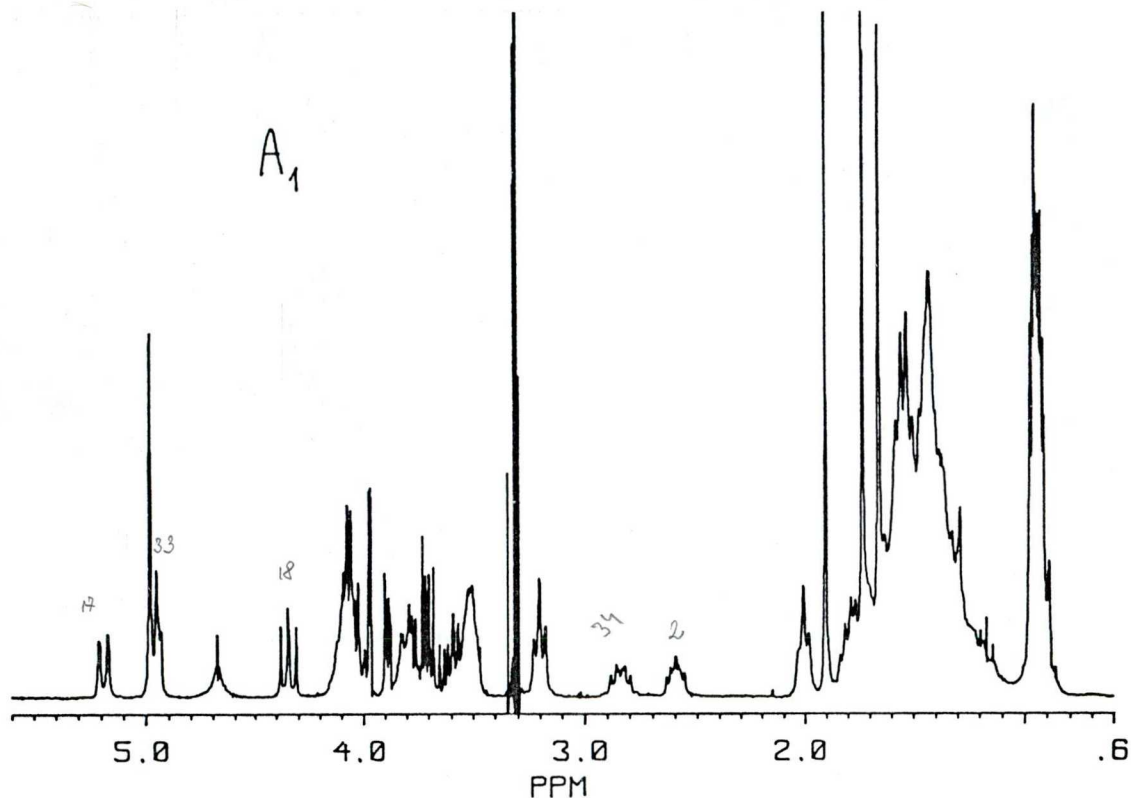
Primycin komponensek szerkezetei XXIII szerint, molekulatömegei (szabad bázis) és azonosító jelölésük

index	R ¹ \ R ²	A	B	C
		O-arabinóz	H	OH
1	butil	1078	930	946
2	pentil	1092	944	960
3	hexil	1106	958	974

Az alábbiakban az említett komponensek elsősorban ¹H homonukleáris NMR szerkezetvizsgálatának menetét és eredményeit ismertetjük, különös tekintettel a kétdimenziós technikák alkalmazására.

Az A_1 komponens szerkezetbizonyítása

Az elválasztott A_1 komponens deuterált metanolban, a relaxációs viszonyok javítása céljából 323 K-en készített egydimenziós (1D) ^1H NMR spektruma (250 MHz) a



6. ábrán látható.

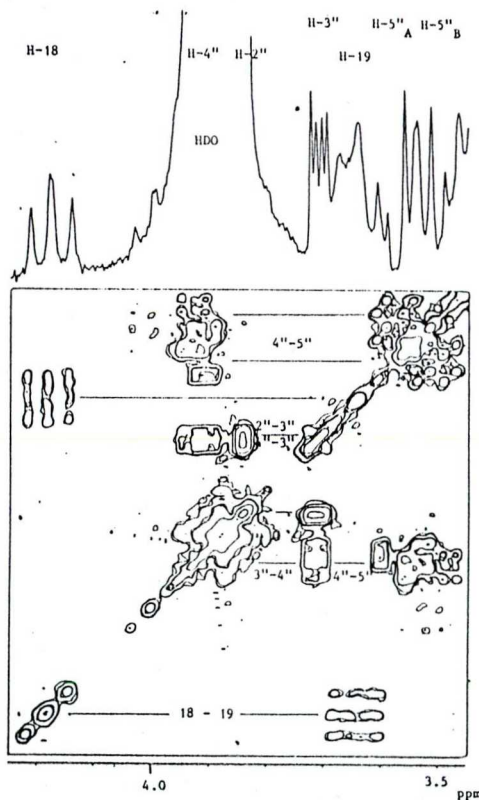
A spektrum kvalitatív képe megfelel a **XXIII** szerkezetnek; több jelcsoport közvetlenül azonosítható. Így az sp^3 szénatomhoz kötő metilcsoportok 1.0-0.9 ppm körül, alifás metilén-protonok kb. 2.0-1.1 ppm tartományban és valószínűleg oxigénatommal geminális helyzetű, illetve sp^2 szénatomhoz kötődő protonok jelei 3.5 ppm-nél nagyobb eltolódásoknál. A két olefinos metilcsoport kis távolható csatolásokat mutató jelei is megtalálhatók 1.72 és 1.66 ppm eltolódásoknál, de asszignálásuk nem lehetséges további mérés nélkül.

Az igen erős, elsősorban a 4.2-3.4 és 1.8-1.1 ppm tartományokban mutatkozó átfedések miatt (ami főleg a monoton C(6)-C(15) és C(20)-C(28) szakaszok következménye) szelektív besugárzásos 1D mérések (lecsatolás,

DDS, NOEDS⁴²) csak igen korlátozottan alkalmazhatók. Ezért különböző kétdimenziós (2D) NMR méréseket végeztünk.

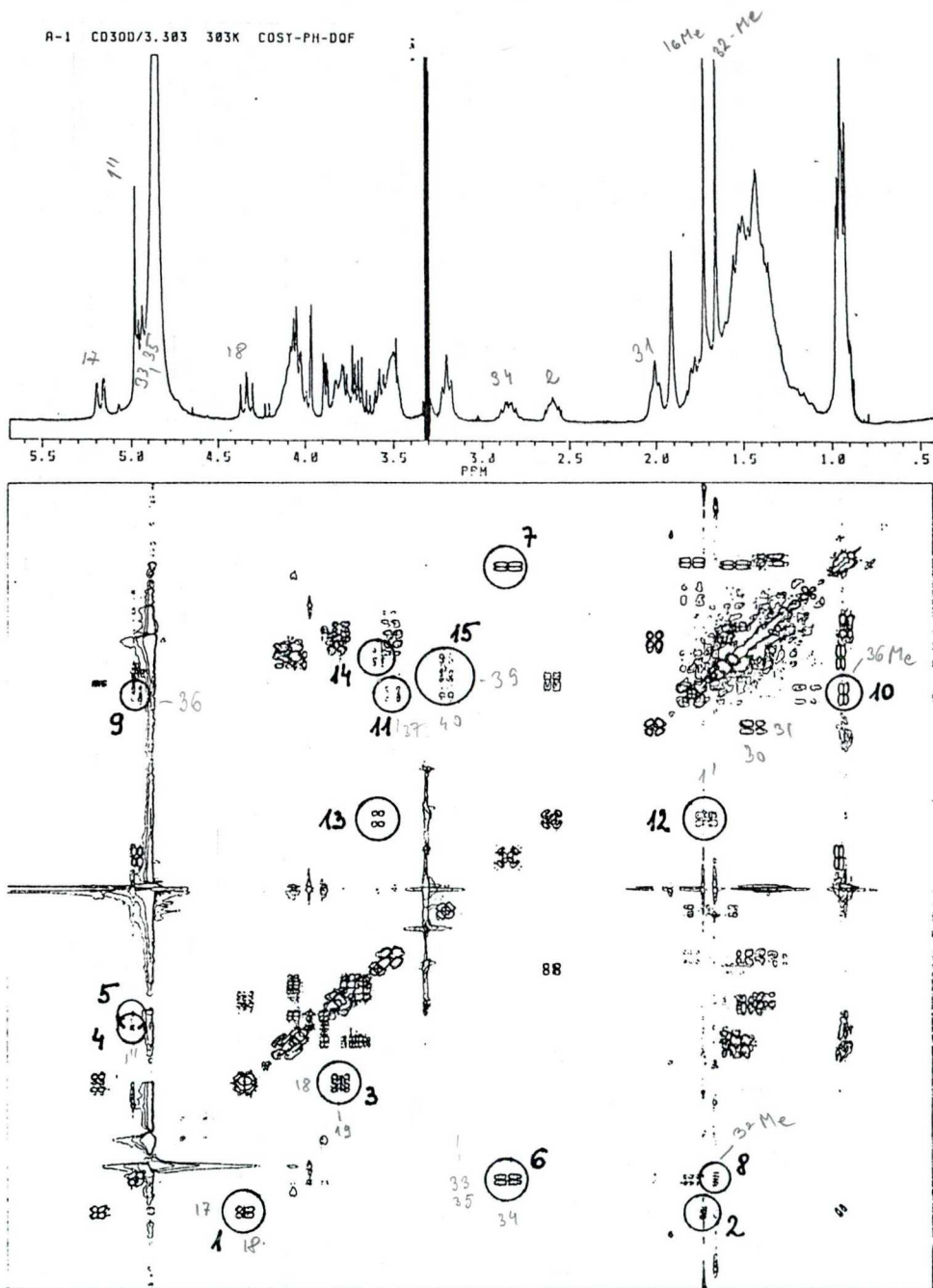
Csatolási korrelációs (COSY) kísérletek

Már a legegyszerűbb, abszolút érték H,H-COSY(45)^{29,45} változat is több egyértelmű asszignációt lehetővé tesz, mint pl. a cukor-protonok jeleinek azonosítását (7. ábra), de általános előnyeik¹⁹ (elsősorban a jobb fölbontás) miatt inkább fázisos spektrumok készítése látszott célszerűnek.



7. ábra. Az A₁ komponens abszolút érték COSY(45) spektrumának részlete a cukor-protonok hozzárendeléseinek föltüntetésével. A fölvétel DMSO-d₆ oldószerben, 303 K hőmérsékleten készült. A részleten nem látható H-1'' közvetlen korrelációt mutat a H-2'' protonnal, ez az asszignáció kiindulópontja.

Az A₁ komponens metanol-d₄ oldószerben készült fázisos, kettős-kvantum szűrésű COSY⁸³ spektruma a 8. ábrán látható, néhány fontosabb korreláció bejelölésével (a szimmetrikus pozíciók egyikén).

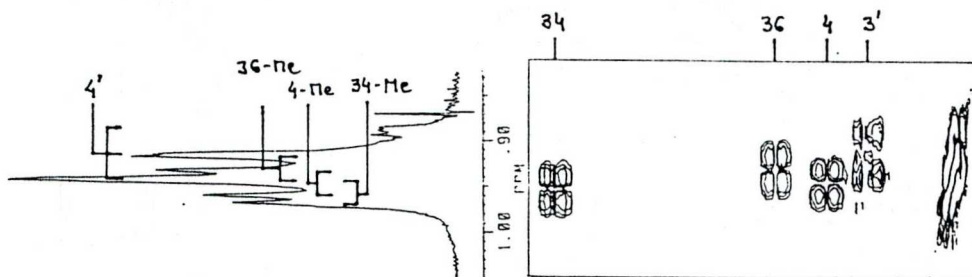


8. ábra. a.) Az A₁ komponens fázisos, kettős-kvantum szűrésű COSY spektruma, metanol-d₄ oldószerben, 303 K hőmérsékleten. A rajzon nincsenek megkülönböztetve az ellentétes fázisú jelek.

nem szimmetrikus spektrum, miért?

Azaz 1" csatolásai

d.v.B. ? savas kóda?



8.b.) A metil-korrelációk nagyított részletrajza.

Az olefines H-17, amelynek csak egy vicinális csatoló partnere van (H-18), s a 16-Me csoporttal mutathat még távolható (4J) csatolást, feltételezhetően a legnagyobb eltolódású, d multiplicitású jel (5.19 ppm). Ezt a feltételezést alátámasztja, hogy az említett korrelációk egyértelműen azonosíthatók (8.a. ábra; 1 és 2). Ebből a két olefines metilcsoport hozzárendelése is adódik, azaz a 16-Me a nagyobb, a 32-Me a kisebb eltolódású.

A H-18 további korrelációja (3) kijelöli H-19 eltolódását, annak további keresztcsúcsa viszont az igen zsúfolt, még a 2D spektrumon is átfedő $OCH-CH_2$ korrelációs területre esik.

Az 5.0-4.9 ppm közötti szakaszon 3H relatív intenzitású jelcsoport van. Közülük a fölhasadást nem mutató jel megfelel a cukor anomer protonjának, s további korrelációi (4: 1"-2" és 5: 1"-3") révén, amelyeket bejelöltünk az ábrán, valamennyi, a cukor-részhez tartozó proton-jel egyértelműen azonosítható (ld. előbb is; 7. ábra).

Különleges helyzetű a javasolt XXIII szerkezetben a H-34; vicinális (3J) csatoló partnerei egyidejűleg egy olefin-proton (H-33), egy metilcsoport (34-Me) és egy észteres pozícióban lévő, tehát várhatóan nagy eltolódású proton (H-35). Ilyen kölcsönhatásokat mutató jelet találunk 2.84 ppm eltolódásnál (6: 33-34 és 34-35, 7: 34 - 34-Me), bár H-35 és H-33 eltolódásai csaknem tökék-

letesen egybeesnek (4.98 és 4.96 ppm). (DMSO- d_6 oldószerben H-33 és H-35 eltolódásai valamelyest jobban elkülönülnek.)

H-33 további korrelációt mutat a 32-Me jellel (8), megerősítve az olefines metilcsoportok előbbi hozzárendelését, míg H-35 segítségével (9) H-36, azon keresztül (10) a 36-Me eltolódását lehet azonosítani. H-36 további korrelációt mutat (11) H-37-hez, az pedig a H-38 protonokhoz, de ennek a korrelációnak az azonosítása bizonytalan a H-37-tel átfedő más OCH jelek miatt.

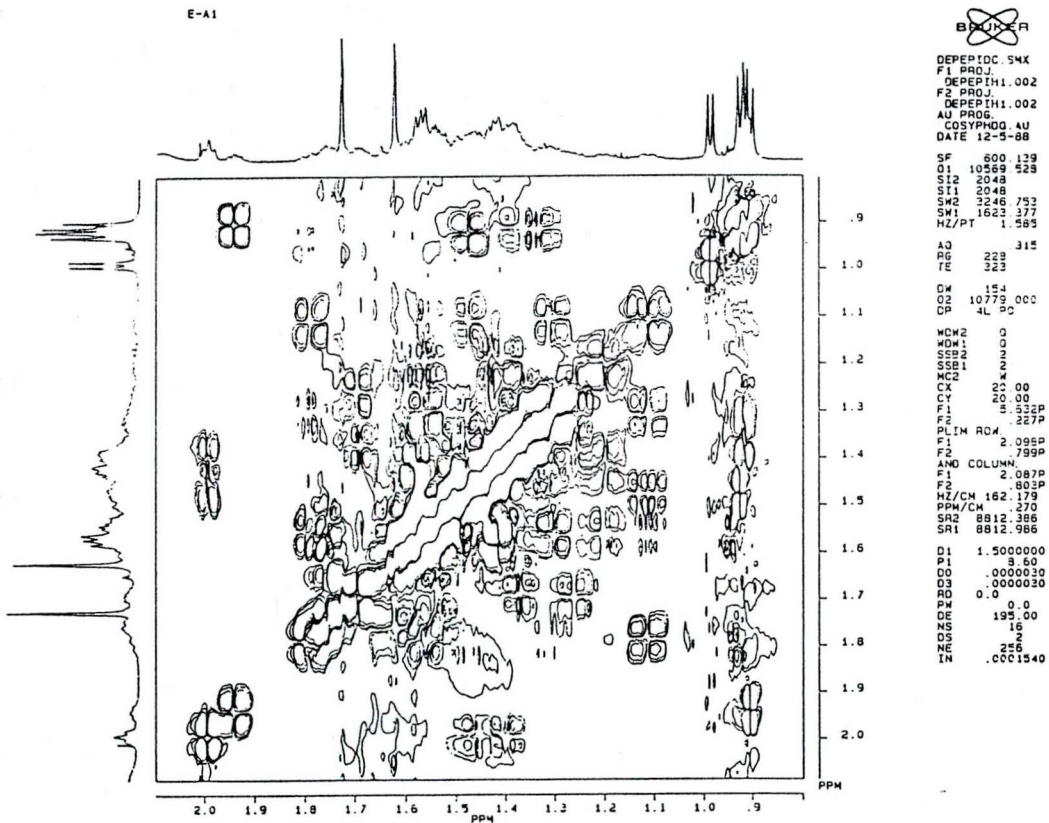
A karbonil-funkció melletti proton (H-2) jeleként azonosítható a 2.60 ppm eltolódású multiplett, ami egyezésben van a két azonosítható korrelációjával: egyik (12) alacsony eltolódási tartományba mutat, az 1'-CH₂ jelhez (1.70 ppm), a másik (13) az OH-csoporttal geminális H-3-hoz (3.60 ppm). Utóbbi nem túl intenzív, de azonosítható korrelációt (14) mutat H-4 proton jellel (1.57 ppm).

Egy további jel azonosítható viszonylag egyszerűen még a spektrumon, a 40-CH₂ protonok \underline{t} multiplicitású, 2H relatív intenzitású jele 3.20 ppm-nél: ennek eltolódása jellegzetes, s összehasonlítható pl. az Arg megfelelő CH₂ eltolódásával (3.3 ppm⁸⁴). Korrelációja (15) segítségével azonosítható az egyébként igen erősen átfedő tartományon elhelyezkedő 39-CH₂.

Alacsonyabb metszési szinteken is vizsgálva a spektrumot, illetve nagyobb (400 MHz) térerőn megismételve hasonló mérést⁷⁶ távolható csatoláson alapuló korreláció azonosítható a 2.00 ppm eltolódású, közel \underline{t} multiplicitású, 2H relatív intenzitású jel, és a 32-Me már asszignált rezonanciája között, előbbi tehát bizonyára a 31-CH₂-hoz tartozik. Intenzív további keresztcsúcsa viszont kijelöli 30-CH₂-t.

A javasolt XXIII szerkezetű molekulában található metilcsoportok erősen átfedő jeleit és a hozzájuk tartozó közvetlen korrelációs multipletteket tartalmazó kinagyított 2D térkép részletet a 7.b. ábrán láthatjuk; ennek segítségével valamennyi metil-eltolódás pontosan meghatározható.

A földérintetlenül maradt hozzárendelések száma - csak egyszerű COSY típusú spektrumok alkalmazásával - az oldószer illetve a hőmérséklet (alkalmazható) változtatásával sem volt csökkenthető. A monoton szakaszok következtében föllépő erős átlapolások még 600 MHz-es mérési frekvencián sem szűntek meg, mint azt a 9. ábrán az A₁ komponensből készített vízdékony származék spektrumrészlete mutatja.



9. ábra. Az A₁ komponens vízdékony származékának fázisos, kettős-kvantum szűrésű COSY spektrum részlete 600 MHz térerőn⁸⁵ metanol-d₄ oldószerben 323 K hőmérsékleten, az ellentétes fázisú jelek megkülönböztetése nélkül.

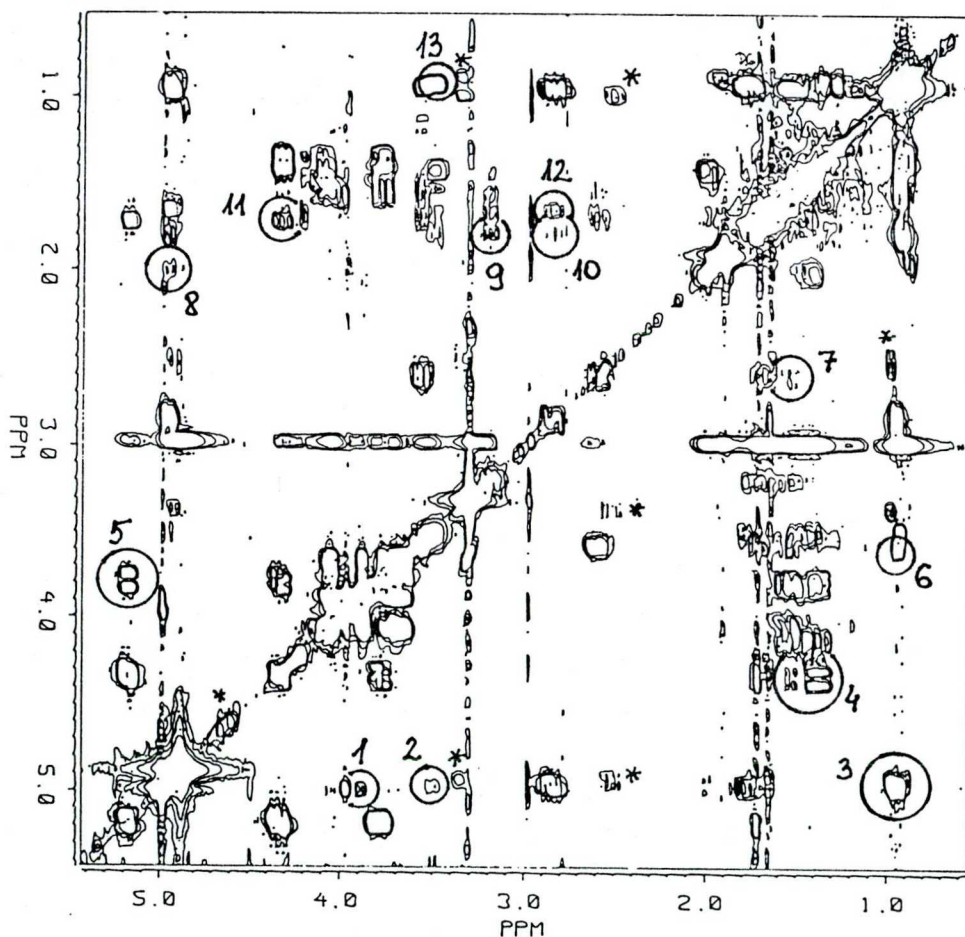
Bár a fönti mérések néhány távolható (⁴J) csatolási kölcsönhatás azonosítását is lehetővé tették, s a COSY típusú mérések optimalizálhatók kis értékű csatolások-



ra,⁸⁶ a nagyobb molekulákra jellemző relatíven rövid relaxációs idők miatt ez nem bizonyult igazán használható megoldásnak a hiányzó hozzárendelések megkeresésére. Számos új korreláció volt detektálható viszont az ún. RELAY spektrumokon,⁸⁷ amik a közvetlen kölcsönhatásokon túl kétlépéses, áttételes (relayed) mágnesezettség-átviteli kapcsolódásokat is mutatnak.

Áttételes korrelációs (RELAY) spektrumok

A 10. ábrán az A_1 komponens abszolút érték RELAY spektruma látható. Számozott karikákkal jeleztük az



10. ábra. Az A_1 komponens metanol- d_4 oldószerben, 303 K hőmérsékleten, 20 ms várakozási idővel készült abszolút érték RELAY spektruma, néhány áttételes korreláció (ld. 3. táblázat) megjelölésével. A csillag a minta lassú átalakulásából származó szennyező mellékkomponens jeleit mutatja. A felezővonalban mutatkozó viszonylag intenzív axiális jel-maradékok a nem pontos pulzus-kalibráció illetve a gyors relaxáció következményei.

Wegm. mellet? nehezebb?
20 ok?

~

áttételes korrelációk egy részét (a diagonálisra szimmetrikus pozíciók közül csak az egyiket), amelyeket a 3. táblázat sorol föl.

3. táblázat

A 10. ábrán számmal jelzett áttételes korrelációk azonosítása a mágnesezettség-átviteli út növekvő számozási sorrendben való föltüntetésével.

1: 1" - 2" - 3" (x)	6: 3 - 4 - 4-Me
2: 35 - 36 - 37	7: 2 - 3 - 4
3: 33 - 34 - 34-Me	8: 31 - 32-Me - 33 (x)
34-Me - 34 - 35	9: 38(a) - 39 - 40
35 - 36 - 36-Me	10: 34 - 35 - 36
4: 18 - 19 - 20	11: 16-Me - 17 - 18 (x)
5: 17 - 18 - 19	12: 32-Me - 33 - 34 (x)
	13: 36-Me - 36 - 37

az előző COSY peal-2

A fölsorolásban (x) jelzi azokat a hármásokat, amelyek esetében az áttételes mágnesezettség-átvitel helyett (vagy mellett) a közvetlen, távolható csatoláson alapuló korreláció játszik szerepet ami összefügg a RELAY szekvenciának a szokásos COSY-hoz képest megnövekedett időtartamával.⁸⁸

A föntebb fölsorolt áttételes korrelációkon kívül több más is megfigyelhető a spektrumon, mint pl. a teljes cukorgyűrű mentén és a már említett átfedő tartomány(ok)on, elsősorban az OCH-CH₂ korrelációs területen. Ezen a szakaszon a RELAY kísérlet kevéssé változtatott a már ismert helyzeten; a 18-19-20 (4) áttételes korreláció az egyedüli, ami megbízhatóan azonosítható, s új információt ad (: a 20-CH₂ két eltolódását). A 2D spektrumból leolvasható fölsorolt (3. táblázat) áttételes korrelációk mindenesetre megerősítik a COSY fölvételekből azonosított hozzárendeléseket, s néhány további megtételére (pl. az egybeeső H-38(a) és H-36 azonosítása, ld. 9 és 10 áttételes korrelációkat) nyújtanak lehetőséget.

*is ?
JMR 74 1 352*

*Me-relay
a lipins*

A RELAY spektrum fölbontását javítani lehetne,¹⁹ ha fázisos változatban⁸⁹ készítjük el, de ebben az esetben a közvetlen és áttételes (relayed) korrelációt jelző keresztcsúcsok egymáshoz képest 90° -kal eltolt fázissal (out-of-phase) jelentkeznek,⁸⁹ ami az amúgy is bonyolult spektrumon további komplikációkat okoz. A várakozási idő változtatása, illetve a többszörös áttételes (multiple relay)^{89,90} korrelációs kísérlet (amelyben a mágneszettség-átvitel kettőnél több lépcsőben is megtörténik) ad némi esélyt további asszignációkra, de ezeknél egyszerűbb, és kedvezőbb sajátságokat mutat²⁰ a SLCOSY (TOCSY³⁸/HOHAHA³⁹) típusú mérés.

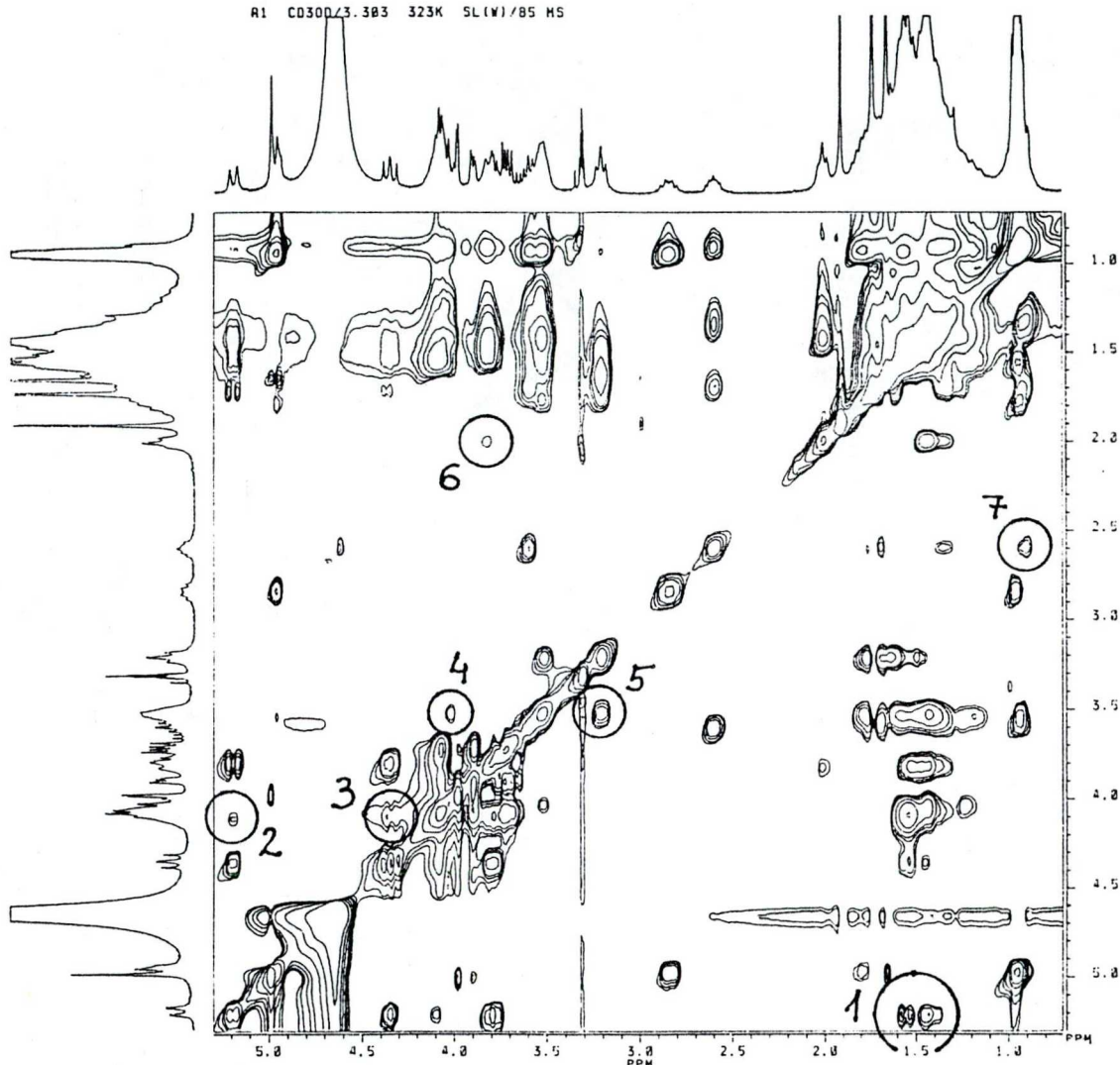
*diag. is COSY eset
in / anti phase
abs / disp jónál
superpozíciója*

Spin-lock típusú korrelációs mérések (SLCOSY)

A 11. ábrán az A_1 komponens spin-lock típusú csatolási korrelációs (SLCOSY) 2D spektruma látható.

Ezen - a RELAY fölvételen már azonosított áttételes korrelációkon kívül - néhány új kapcsolódás is megfigyelhető. Intenzív korrelációt mutat H-17 a 20- CH_2 -vel (1: 17-18-19-20), de kb. 4.1 ppm-hez is ad keresztcsúcsot (2), ahová a H-18 is (3). Az ott található jel minden bizonnyal a H-21 (: 17-18-19-20-21). A cukorprotonok "totális korrelációján"³⁸ kívül egy további keresztcsúcs egyértelműen azonosítható (4) egy OCH proton-pár között, de hozzárendelése bizonytalan. (A 2D NOE fölvétel segítségével - ld. később - valószínűsíthető, hogy ezek a H-11 és H-15 protonok.) Fontos viszont a 40- CH_2 és a H-37 közötti mágneszettség-átvitelt bizonyító intenzív keresztcsúcs (5: 37-38-39-40), ami ugyan többszörös áttételt jelent, de a 38- és 39- CH_2 jelek közel azonos eltolódásaiból eredő szoros csatolás és a köztük mindenképpen előforduló nagy csatolási állandók kedveznek a gyors mágneszettség-átvitelnek.⁴⁰

R1 CD300/3.383 323K SL(W)/85 HS



11. ábra. Az A_1 komponens SLCOSY⁹¹ spektruma metanol- d_4 oldószerben, 323 K hőmérsékleten. A gerjesztő és SL-térhez erősítetlen (low power) pulzusokat használtunk a megfigyelő (observe) csatornán.²⁰ Az adattábla - zéró töltés előtt - 512x128 adatpontból állt.

Mindkét szimmetrikus pozícióban azonosítható egy viszonylag gyenge keresztcsúcs (6), ami a korábban már 31- CH_2 -ként azonosított 2.00 ppm eltolódású triplétt és egy OCH között mutatkozik. Mivel a még szóba jöhető H-35 és H-37 eltolódása más, ez a H-27 lehet, ami ugyan legalább négyszeres áttételt jelent (:27-28-29-30-31),

C6: exp!
kérető?
SL idő?
nem szimmetrikus!
deklaráció a víz felől!
500 SL idő + lehet vészes próbák!

de az előbb említettek⁴⁰ alapján, a 28-, 29- és 30-CH₂ rezonanciák igen szoros csatolásaival értelmezhető a korreláció megjelenése.

A H-2 - H-4 átvitel nem mutatkozik ezen a főlvételel, de intenzív keresztcsúcsok azonosíthatók a 4-Me jelhez (7: 2 - 3 - 4 - 4-Me), valamint az erősen átfedő jelek tartományában kis eltolódásoknál. Utóbbi(ak) asszignálása nem egyértelmű, mert 2'-CH₂ és 3'-CH₂ egyaránt lehet.

Továbbra is maradnak bizonytalanságok az OCH-CH₂ és a CH₂-CH₂ korrelációs tartományokban, ahol az átfedések igen erősek.

Az eddig ismertetteken kívül készültek más, eredetileg COSY típusú homonukleáris mérések (az F1 dimenzióban skálázott^{92,76} illetve "lecsatolt"⁴⁵ COSY) is, de ezek új információt nem adtak. Tovább bővítette viszont az asszignációk körét, s a kettőskötések konfigurációját is tisztázták a 2D NOE (NOESY)³⁴ mérések.

Kétdimenziós NOE (NOESY) kísérletek

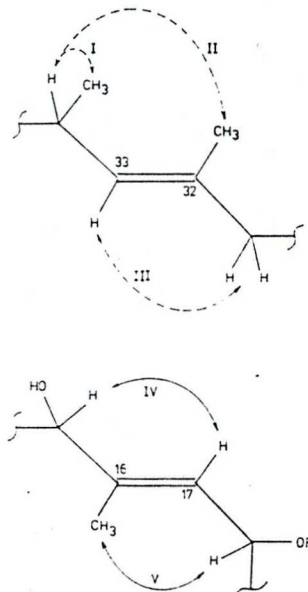
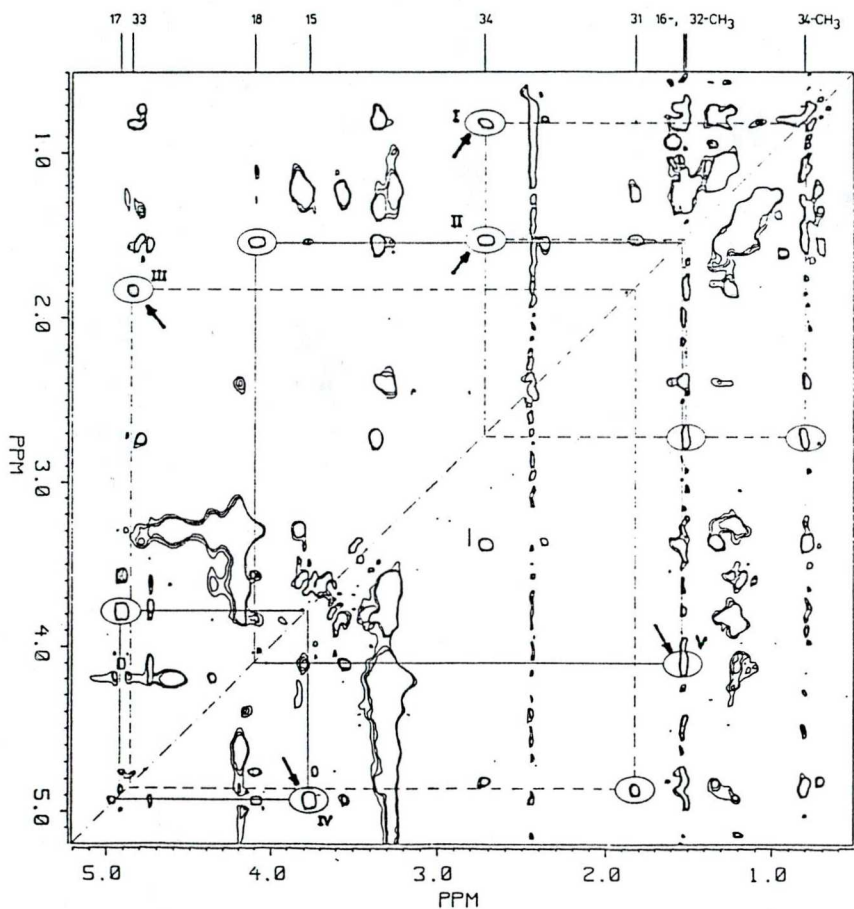
minci és leterve

A primycin komponensek esetében metanolban, szobahőmérséklet közelében a detektálható NOE nagyon kicsi vagy nulla, ami ilyen - közepes - méretű molekuláknál gyakori eset.¹⁷ Több lehetséges megoldás kínálkozik⁹³ ennek megkerülésére; az eddigi vizsgálatok során egyrészt metanolban 253 K-en, illetve DMSO-d₆-ban (ahol a viszkozitás eleve nagyobb és az erős szolvatáció miatt is csökken a mozgékonyág) szobahő körül (303 K) végeztünk 2D NOE méréseket. Mindkét esetben kis negatív NOE detektálható.

Tisztább, t₁-zajtól és -vonulatoktól mentesebb 2D spektrum előállítására céljából egy kivonásos eljárást⁹⁴ használtunk, ami a diagonális relatív nagyságát a korrelációs csúcsokkal összemérhetővé csökkenti, s a negatív NOE keresztcsúcsokkal antifázisúvá teszi.

JMR 62 350

Az A_1 komponens $DMSO-d_6$ -ban, 303 K hőmérsékleten, 300 ms kölcsönhatási (mixing) idővel készített 2D NOE (NOESY) spektruma a 12. ábrán látható.



más szám!

12. ábra. Az A_1 komponens kivonásos módszerrel⁹⁴ készített NOESY spektruma ($\tau_m = 300$ ms) a kettőskötések konfigurációját bizonyító kölcsönhatások bejelölésével. Csak pozitív szintek vannak a 2D térképen kirajzolva.

Számos, térbeli közelséget bizonyító kölcsönhatás azonosítható a spektrumon, amelyek megerősítik a korábbi hozzárendeléseket. Külön említést érdemelnek azok, amelyek a kettőskötések konfigurációját bizonyítják. Ezek szerint mindkét olefinkötés E konfigurációjú.

A 12. ábrán bejelölt kölcsönhatások egy további asszignációt is lehetővé tesznek: a H-15 és H-17 NOE kölcsönhatása az előbbi eltolódását is megadja. H-15 eltolódásának ismeretében viszont valószínűsíthető, hogy a 11. ábrán nem asszignált, OCH jelek közti át- (W.) teles korreláció a H-11 - H-15 párhoz tartozik, s a megjelenése összefügg a közvetítő, szorosan csatolt CH₂ protonok által kedvezővé tett átviteli mechanizmussal (ld. előbb).

¹H homonukleáris 2D mérésekkel tisztázott asszignációk az A₁ komponensre

Az eddig felsorolt ¹H homonukleáris 2D NMR mérések eredményeként az alábbi rezonanciák megbízható asszignálása sikerült - egyébként a XXIII javasolt⁷⁴ szerkezettel összhangban -: ld. 4. táblázat.

4. táblázat

A primycin A₁ komponensének ¹H NMR spektrumában (metanol-d₄/=3.30 ppm, 323 K) azonosított eltolódások

proton	δ	proton	δ	proton	δ
2	2.60	21	4.10	37	3.52
3	3.60	27	3.82	39	1.75, 1.62
4	1.57	30	1.43	40	3.20
4-CH ₃	0.94 ₅	31	2.00	1'	1.70
11	3.53	32-CH ₃	1.66	3'	1.37
15	4.02	33	4.96	4'	0.91 ₅
16-CH ₃	1.72	34	2.84	1''	4.99
17	5.19	34-CH ₃	0.95 ₅	2''	3.98
18	4.35	35	4.98	3''	3.89
19	3.80	36	1.79	4''	4.07
20	1.56, 1.41	36-CH ₃	0.93 ₀	5''	3.73, 3.68

0
↓
Heteronukleáris (^{13}C és $^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ kétdimenziós) NMR - elsősorban DEPT,⁹⁵ összehasonlító spin-rács relaxációs idő (T_1), $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY típusú⁹⁶ és $^{13}\text{C}, ^{13}\text{C}$ kettős-kvantum korrelációs (2D-INADEQUATE)⁹⁷ - mérésekkel, amelyek ismertetése meghaladná ezen dolgozat kereteit, a hozzárendelések köre gyakorlatilag teljessé tehető (a fenti eredmények többoldalú megerősítése mellett).⁷⁹ Ez alól kivételek maradtak a C(8)-C(12) és a C(21)-C(25) szakaszok, ahol a nagyfokú szimmetria következtében a megmaradó átlapolások továbbra is csak bizonytalan (fölcserélhető) asszignációkat tesznek lehetővé.

C(5)...C(14)
C(22)...C(23)

Ezen megmaradó bizonytalanságok ellenére is levonható a következtetés; 1D és főleg 2D NMR mérések kombinált alkalmazásával, analógiák alkalmazása és kémiai degradációs műveletek nélkül azonosítható a primycin antibiotikum-komplex főkomponensének szerkezete (XXIII), a korábbi irodalomban egyetlenként megadottal⁷⁴ egyezésben.

az OH-2 pozíciója sem bizonyított

A méréseink eredményeképpen meg tudtuk adni gyakorlatilag a teljes, érintetlen molekula ^1H és ^{13}C NMR eltolódásait (ami a további komponensek, esetleges származékok összehasonlító szerkezetanalíziséhez rendkívül fontos), illetve a főkomponens szerkezetére vonatkozó ismereteket pontosítani tudtuk a kettőskötések E konfigurációjának bizonyításával.

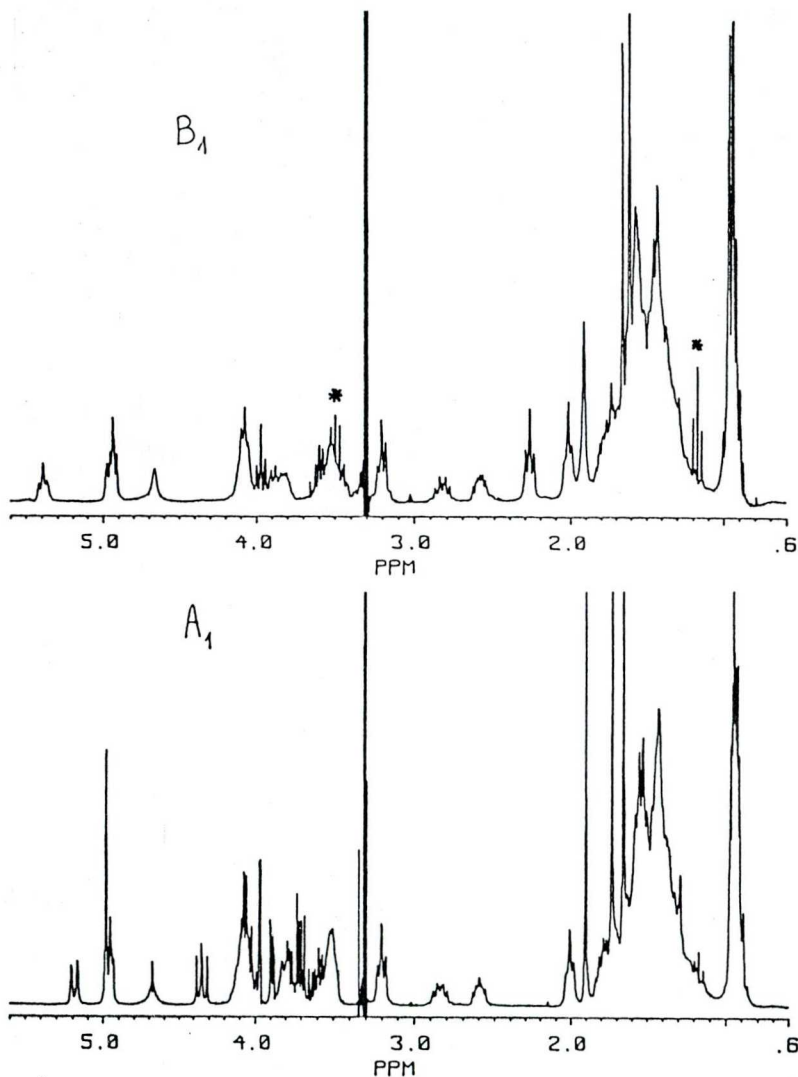
megfalsolt a megfelelő kékelti ismertetést ✓

Az A, B, C és 1, 2, 3 komponens-csoportok

A kromatográfiás elválasztás során a primycin anyagkeverék fő tömege (kb. 90%) három komponens-csoportba volt elkülöníthető (A, B, C), amelyeken belül hasonló további hármass elkülönítés volt lehetséges (1, 2, 3; ld. 2. táblázat) .

A szerkezeti különbségek azonosítása az A₁ komponens NMR asszignációja birtokában már viszonylag egyszerű feladat volt; ehhez ^1H és ^{13}C homo- és heteronuk-

leáris méréseket végeztünk. Az A_1 és B_1 komponensek azonos körülmények között készített ^1H NMR fölvételeit a 13. ábrán találjuk.



13. ábra. A primycin A_1 és B_1 komponensei ^1H NMR spektrumai metanol- d_4 oldószerben, 323 K hőmérsékleten. A B_1 csekély szennyezését csillag jelzi.

Jól látható, hogy a B_1 komponensben az 5.19 ppm-es \underline{d} (H-17) hiányzik, a H-18 és a cukor-protonok jelei sem találhatóak, viszont egy új, 2H relatív intenzitású, \underline{t} multiplicitású jel mutatkozik 2.27 ppm-nél. Mindez, valamint a könnyen azonosítható csatolási korrelációk,

s a C(18)-től távolabb eső rezonanciák (^1H és ^{13}C) változatlansága teljes összhangban van egy olyan szerkezettel, amiben az O-arabinóz szubsztituens helyett csak H van.⁷⁹ Ezt a FAB-MS mérés eredménye is alátámasztja.⁷⁸

A C_1 komponens megfelelő ^1H (és ^{13}C) spektrumai az A_1 -éihez nagyon hasonlóak, annyi különbséggel, hogy a cukor-részhez tartozó jelek ott is hiányoznak, a H-18 4.15 ppm-nél található, s a H-17 d fölhasadással 5.30 ppm eltolódásnál jelentkezik. Az összehasonlító ^1H és ^{13}C , 1D és 2D mérések, valamint a FAB-MS molekulatömeg-meghatározás szerint a C_1 az A_1 főkomponens aglikonjának felel meg.^{78,79}

Az A, B, C komponens-csoportokon belüli további hármastagozódás, mint azt elsősorban FAB-MS molekulatömeg-meghatározás bizonyította,⁷⁸ a C(2)-n szubsztituált alifás oldallánc homológjaitól ered. Ezt az összehasonlító ^1H és ^{13}C NMR vizsgálatok is alátámasztották, bár esetenként az igen kis mennyiségű minta miatt nem egyértelműen. Párhuzamos bizonyítékot szolgáltatott a primycin anyagkeverék lúgos hidrolízisével nyert reakciótermék GC-MS analízise,^{77d,78} amely a hexánsav mellett heptán- és oktánsav jelenlétét is igazolta, míg a tiszta A_1 komponensből csak hexánsav képződött.

További vizsgálatok

A primycin anyagkeverék kilenc fő komponensének NMR asszignációja teljessé tételére további (főleg heteronukleáris és spin-lock típusú) méréseket tervezünk, lehetőleg nagyobb térerőn, illetve ún. inverz detektálású heteronukleáris több-kvantum korrelációs (HMBC)⁹⁸ mérést, ami kis értékű (2J , 3J) 1H - ^{13}C csatolásokra optimalizálva rendkívül hatásos asszignációs lehetőségnek bizonyult hasonló makrolidok esetében is.⁹⁹

A csatolási állandók az eddig készített 1D spektrumokon csak néhány jel esetében olvashatók le, a hozzárendelések fentebb ismertetett menetében nem is használtuk a konkrét értéküket. Számos 2D NMR eljárás ismert a csatolási állandók értékeinek azonosítására a korrelációs jelek (manipulált) finomszerkezetének elemzésével²⁷; ezek célszerű alkalmazásával illetve további szisztematikus NOESY (illetve ennek spin-lock változata: ROESY^{37,20}) mérésekkel vizsgálni kívánjuk a királis centrumok relatív konfigurációját, az egyes molekuláris részek és a teljes szerkezet konformációját, molekuláris dinamikáját.

Vannak - igen kis mennyiségben elválasztott - további komponensek is, amelyek szerkezetvizsgálata, azonosítása még nem lezárt. Kémiai módosítással⁸¹ sikerült - a biológiai aktivitás javarészeinek megőrzésével - vízóldékonnyá tenni az eredeti molekulá(ka)t; a szerkezetben létrehozott változást NMR módszerekkel azonosítottuk.⁸² Ez utóbbi, módosított szerkezet szabadalmi védettségének biztosítása folyamatban van.⁸⁰

ambiciós
lett

Kísérleti körülmények

A bemutatott mérések - egy kivétellel, ld. 9. ábra⁸⁵ - 250.13 MHz térerőn, Bruker WM-250 illetve Bruker AC(P)-250 készülékeken lettek fölvéve, szabályozott, az ábráknál föltüntetett hőmérsékleten.

Tipikus 1D spektrum készítési adatok a növényi izolátumok esetében: 3 kHz spektrumablak, a gyűjtött adatpontok száma 32K. Általában 0.2-0.5 Hz-es exponenciális súlyozófüggvényt használtunk a FT előtt.

A 2D abszolút érték COSY fölvételekhez általában 2 kHz spektrumablak mellett 1K x 128 adatpontot gyűjtötünk, 16-64 ismétléssel minden ciklusban. A 2D FT előtt zéró töltést használtunk 1K x 512 pont méretig, a súlyozáshoz szinusz-függvényt használtunk mindkét dimenzió szerint.

A fázisos NOESY fölvételek hasonló körülmények között, általában 1K x 256 adatpont gyűjtésével készültek, 0.8-1.0 s kölcsönhatási (mixing) idővel, amit 3%-os arányban véletlenszerűen változtattunk a skaláris csatolási maradék-jelek kiszűrése céljából. A t_2 dimenzió szerint optimalizált Lorentz-Gauss, a t_1 dimenzió szerint négyzetes koszinusz súlyozófüggvényt használtunk, s zéró töltéssel 1K x 1K méretűre töltöttük föl az adattáblát. Kivétel az 5. ábra 2D spektruma, ahol a jobb digitális fölbontás kedvéért 2K x 2K méretet használtunk.

A primycin komponensek bemutatott 1D fölvételein az oldószer víz-jelét szelektív besugárzással előzetesen telítettük.

Tipikus 2D fölvételi körülmények a fázisos spektrumok készítésénél: 1K x 256 begyűjtött adatpont (zéró töltéssel 1K x 1K méretre növelve) 1.5 kHz spektrumszélesség mellett, 32-64 gyűjtéssel egy cikluson belül. A 2D FT előtt súlyozásra általában $\pi/6$ - $\pi/8$ értékkel eltolt maximumú szinuszfüggvényt alkalmaztunk. A spin-

lock (SLCOSY, ld. 11. ábra) fölvetelt RANCE módszere szerint⁹¹ készítettük, az AC(P)-250 készülék erősí-
tlen teljesítményű (low power) pulzus kimenetet használ-
va mind a gerjesztő, mind a SL-tér (kb. 2.2 kHz) előál-
lítására, így kerülve ki a vevővel való fáziskoherecia
problémáját.²⁰

JMR 27, 557

A fázisos spektrumok előállításánál mindig a TPPI
(time proportional phase incrementation) módszert^{100,13}
alkalmaztuk.

Összefoglaló

A kétdimenziós (2D) NMR spektroszkópia az elmúlt másfél évtized során rendkívüli fejlődést hozott az NMR alkalmazásában; a legkülönbözőbb szerkezetvizsgálati, molekuláris, orvosdiagnosztikai vizsgálatokra nyílt lehetőség.

A dolgozatban igen tömören és teljes általánosságban kíséreltük meg összefoglalni a 2D NMR alapelveit és főbb változatait (izotróp közegű nagyfölbontású mérésekre).

A második részben növényekből izolált, új alkaloidok és szeszkviterpén észterek körében végzett szerkezetvizsgálatainkról számoltunk be. Ezek során elsősorban egyszerű COSY, illetve fázisos NOESY 2D spektrumokat készítettünk, tisztáztuk a molekulák szerkezetét, beleértve a királis centrumok relatív konfigurációját. A NOESY spektrumokon - ilyen változatban korábban nem publikált - "indirekt" NOE típusú kölcsönhatásokat azonosítottunk.

A dolgozat harmadik részében a primycin antibiotikum-komplex kilenc fő komponensének szerkezetvizsgálata során végzett homonukleáris 2D NMR méréseinket mutatuk be és értelmeztük, egyszerű COSY(45) méréstől a RELAY változaton át a spin-lock (SLCOSY) módszerekig. Be tudtuk mutatni, hogy csak homonukleáris mérések alkalmazásával is jelentős részben asszignálni lehet a spektrumokat (az erős átfedések ellenére), itt nem részletezett heteronukleáris (2D) mérésekkel kombinálva pedig gyakorlatilag a teljes molekula ^1H és ^{13}C NMR asszignációját meg lehet adni. Sikerült tisztáznunk - jórészt 2D NMR módszerekkel - az elválasztott kilenc fő komponens szerkezeti adatait, s különbségeiket.

Irodalom

- [1] R.R. Ernst; *Chimia* 41(1987)323
- [2] R.R. Ernst; *Chimia* 29(1975)179
- [3] C.J. Turner; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 16(1984)311
- [4] P.C. Lauterbur; *Nature* 242(1973)190
- [5] R.R. Ernst, G. Bodenhausen, A. Wokaun; "Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions", Clarendon, Oxford, 1987.
- [6] S. Szalma, I. Pelczer; *J. Magn. Reson.*, 76(1988)416
- [7] G.W. Wuister, R. Boelens, R. Kaptein; *J. Magn. Reson.*, 80(1988)176, és idézetei.
- [8] W.P. Aue, J. Karhan, R.R. Ernst; *J. Chem. Phys.*, 64(1976)4226
- [9] R. Freeman; *Proc. R. Soc. London*, A373(1980)149
- [10] R. Benn, H. Günther; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 22(1983)350
- [11] D.L. Turner; *Prog. Magn. Reson. Spectrosc.*, 17(1985)281
- [12] G.A. Morris; *Magn. Reson. Chem.*, 24(1986)371
- [13] A. Bax; *Bull. Magn. Reson.*, 7(1985)167
- [14] R. Willem; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 20(1987)1, és idézetei.
- [15] A. Bax; "Two-Dimensional NMR in Liquids", Delft University, Delft, 1982.
- [16] K. Wüthrich; "NMR of Proteins and Nucleic Acids", Wiley, New York, 1986.
- [17] J.K.M. Sanders, B.K. Hunter; "Modern NMR Spectroscopy", Oxford University Press, Oxford (U.K.), 1987.
- [18] A.E. Derome; "Modern NMR Techniques for Chemistry Research", Pergamon Press, Oxford, 1987.
- [19] Pelczer I.; *MTA Kémiai Közlemények* 66(1986)113

- [20] Pelczer I.; MTA Kémiai Közlemények (közlésre elküldve)
- [21] Batta Gy.; "Mono- és oligoszacharidok szerkezet-vizsgálata egy- és kétdimenziós NMR módszerekkel", egyetemi doktori értekezés, KLTE, Szerves Kémia Tanszék, Debrecen, 1984.
- [22] G. Bodenhausen, R. Freeman, R. Niedermeyer, D.L. Turner; J. Magn. Reson., 26(1977)133
- [23] Általában a megfelelő szakkifejezéseknek nincs általánosan elterjedt magyar változatuk; az itt és a következőkben használt szavak a jól-rosszul magyarított angol kifejezésekből származnak.
- [24] O.W. Sørensen, G.W. Eich, M.H. Levitt, G. Bodenhausen, R.R. Ernst; Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 16(1983)163
- [25] G. Bodenhausen, H. Kogler, R.R. Ernst; J. Magn. Reson., 58(1984)370
- [26] G. Wider, S. Macura, A. Kumar, R.R. Ernst, K. Wüthrich; J. Magn. Reson., 56(1984)207
- [27] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger; Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 27(1988)490
- [28] J. Jeener; Ampere International Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, 1971.
- [29] W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst; J. Chem. Phys., 64(1976)2229
- [30] C. Griesinger, O.W. Sørensen, R.R. Ernst; J. Magn. Reson., 73(1987)574
- [31] A. Wokaun, R.R. Ernst; Mol. Phys., 36(1978)317
- [32] G. Bodenhausen; Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 14(1981)137
- [33] J.H. Noggle, R.E. Schirmer; "The Nuclear Overhauser Effect", Academic Press, New York, 1971.
- [34] B.H. Meier, R.R. Ernst; J. Amer. Chem. Soc., 101(1979)6441
- [35] S. Macura, R.R. Ernst; Mol. Phys., 41(1980)95

- [36] A.A. Bothner-By, R.L. Stephens, J.T. Lee, C.D. Warren, R.W. Jeanloz; *J. Amer. Chem. Soc.*, 106(1984)811
- [37] A. Bax, D.G. Davis; *J. Magn. Reson.*, 63(1985)207
- [38] L. Braunschweiler, R.R. Ernst; *J. Magn. Reson.*, 53(1983)521
- [39] D.G. Davis, A. Bax; *J. Amer. Chem. Soc.*, 107(1985)2820
- [40] A. Bax, D.G. Davis; in: *Advanced Magnetic Resonance Techniques in Systems of High Molecular Complexity (Progress in Inorganic Biochemistry and Biophysics, vol. 2.)* (Eds.: N. Niccolai and G. Valensin), Boston, Birkhauser, 1986., pp. 21-48.
- [41] O.W. Sørensen, C. Griesinger, R.R. Ernst; *Chem. Phys. Lett.*, 135(1987)313
- [42] J.K.M. Sanders, J.D. Merish; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 15(1982)353
- [43] Zs. Rózsa, M. Rábik, K. Szendrei, A. Kálmán, Gy. Argay, I. Pelczer, M. Aynechi, I. Mester, J. Reisch; *Phytochemistry* 25(1986)2005
- [44] Zs. Rózsa, M. Rábik, K. Szendrei, M. Aynechi, I. Pelczer; *Phytochemistry* 27(1988)2369
- [45] A. Bax, R. Freeman; *J. Magn. Reson.*, 44(1981)542
- [46] K.L. Seitanidi, M.R. Yagudaev, S.Yu. Yunusov; *Khim. Prir. Soedin.*, (1973)507; *Chem. Abstr.*, 80, 60054g
- [47] E.F. Nesmelova, I.A. Bessonova, S.Yu. Yunusov; *Khim. Prir. Soedin.*, (1982)532
- [48] R. Brüning, H. Wagner; *Phytochemistry* 17(1978)1821
- [49] W. Olechnowicz-Stepien, H. Rządowska-Bodalska, L. Novotny, M. Masojdkova; *Pol. J. Chem.*, 52(1978)1161

- [50] M.J. Begley, L. Crombie, R.A. Fleming, D.A. Whiting, Zs. Rózsa, M. Kelényi, J. Hohmann, K. Szendrei; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, (1986)535
- [51] A. Römer, H. Thomas, H. Budzikiewicz; Z. Naturforsch., Teil B, 31(1976)607
- [52] A. Römer, H. Thomas, B. Kreuels, H. Budzikiewicz; Z. Naturforsch., Teil B, 36(1981)379
- [53] L. Dubravkova, L. Dolejs, Z. Voticky; Phytochemistry 18(1979)1740
- [54] K. Sugiura, Y. Shizuri, K. Yamada, Y. Hirata; Chem. Lett., (1975)471
- [55] Zs. Rózsa, A. Perjési, I. Pelczer, Gy. Argay, A. Kálmán; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, (1989) (nyomdában)
- [56] Zs. Rózsa, I. Pelczer; J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, (1989) (nyomdában)
- [57] ld. pl.: Y. Takaishi, K. Ujita, H. Noguchi, K. Nakanao, T. Tomimatsu, S. Kadota, K. Tsubono, T. Kikuchi; Chem. Pharm. Bull., 35(1987)3534
- [58] I. Pelczer, Zs. Rózsa; 9th EENC, Bad Aussee, Austria, 16-20. May 1988., P21, abst.: p.60. (közlésre elküldve: Magn. Reson. Chem.)
- [59] J.D. Merish, J.K.M. Sanders; Org. Magn. Reson., 18(1982)122
- [60] J.D. Merish, J.K.M. Sanders, S.A. Matlin; J. Chem. Soc., Chem. Commun., (1983)306
- [61] D. Neuhaus, R.N. Sheppard, I.R.C. Bick; J. Amer. Chem. Soc., 105(1983)5996
- [62] C. Cattivola, F. Sánchez-Ferrando; Magn. Reson. Chem., 23(1985)1072
- [63] K.E. Kövér, Gy. Batta; Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc., 19(1987)223, és idézetei.
- [64] F. Sánchez-Ferrando, J.K.M. Sanders; Magn. Reson. Chem., 24(1987)539

- [65] K.E. Kövér, Gy. Batta; J. Magn. Reson.,
69(1986)519
- [66] Gy. Batta, K.E. Kövér, Z. Mádi; J. Magn. Reson.,
73(1987)477
- [67] A. Kumar, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich; J.
Amer. Chem. Soc., 103(1981)3654
- [68] A. Bax, V. Sklenár, M.F. Summers; J. Magn.
Reson., 70(1986)327
- [69] D. Neuhaus, J. Keeler; J. Magn. Reson., J. Magn.
Reson., 68(1986)568
- [70] M.P. Williamson; Magn. Reson. Chem., 25(1987)356
- [71] T. Vályi-Nagy, J. Uri, I. Szilágyi; Nature
(London) 174(1954)1105
- [72] I. Szilágyi, T. Vályi-Nagy, T. Keresztes; Nature
205(1965)1225
- [73] I. Szilágyi, E. Mincsovics, G. Kulcsár; J.
Chrom., 295(1984)141
- [74] a.) J. Aberhart, T. Fehr, R.C. Jain, P. de Mayo,
O. Motl, L. Baczynskyj, D.E.F. Gracey, D.B.
MacLean, I. Szilágyi; J. Amer. Chem. Soc.,
92(1970)5816
- b.) J. Aberhart, R.C. Jain, T. Fehr, P. de Mayo,
I. Szilágyi; J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.,
(1974)816
- c.) D.E.F. Gracey, L. Baczynskyj, T.I. Martin,
D.B. MacLean; J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.,
(1974)827
- d.) T. Fehr, R.P. Jain, P. de Mayo, O. Motl, I.
Szilágyi, L. Baczynskyj, D.E.F. Gracey, H.L.
Holland, D.B. MacLean; J. Chem. Soc., Perkin
Trans. I., (1974)836
- [75] A vizsgálatok eredményeiről több alkalommal
(1982, 1984 május és december, és 1985) készült -
más formában közvetlenül nem publikált - kutatási
jelentés illetve beszámoló.

- [76] I. Pelczer, P. Sohár, Gy. Dékány, J. Frank; 7th International Meeting on NMR Spectroscopy, Cambridge (U.K.), 8-12. July 1985., P112
- [77] a.) J. Frank, Gy. Dékány, I. Pelczer, J.W. ApSimon; 15th IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Hague (Holland), 17-22. August 1986., PA-114
- b.) Gy. Dékány, I. Pelczer, J.W. ApSimon, J. Frank; ibid., PA-123
- c.) Frank J., Dékány Gy., Pelczer I., ApSimon, J.W.; Vegyészkonferencia, Debrecen, 1987. július 8-10., kiv.: 50. o.
- d.) J. Frank, Gy. Dékány, Gy. Bujtás, I. Pelczer, J.W. ApSimon; Fourth International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, Budapest, 10-14. August 1987., A3, abst.: p. 11.
- e.) I. Pelczer, Gy. Dékány, J.W. ApSimon, J. Frank; ibid., A4, abst.: p. 12.
- [78] J. Frank, Gy. Dékány, I. Pelczer, J.W. ApSimon; Tetrahedron Lett., 28(1987)2759
- [79] J. Frank, Gy. Dékány, J.W. ApSimon, I. Pelczer; közlésre előkészítve
- [80] Dékány Gy., Frank J., Pelczer I., Kulcsár G.; szabadalmi bejelentés alatt (OTH 3036/88)
- [81] J. Frank, Gy. Dékány, I. Pelczer; közlésre előkészítve
- [82] I. Pelczer, Gy. Dékány, J. Frank; közlésre előkészítve
- [83] M. Rance, O.W. Sørensen, G. Bodenhausen, G. Wagner, R.R. Ernst, K. Wüthrich; Biochem. Biophys. Res. Commun., 117(1983)479
- [84] A. Bundi, K. Wüthrich; Biopolymers 18(1979)285
- [85] A mérés a Bruker (Rheinstetten, NSZK) cég, személy szerint pedig dr. Dvortsák Péter segítségével készült, AM-600 műszeren, 1988-ban, amiért ezúton

is köszönetünket fejezzük ki.

- [86] Gy. Batta, K.E. Kövér; Magn. Reson. Chem., 25(1987)125, és idézetei.
- [87] G. Eich, G. Bodenhausen, R.R. Ernst; J. Amer. Chem. Soc., 104(1982)3731
- [88] K.V.R. Chary, R.V. Hosur; J. Magn. Reson., 74(1987)352
- [89] G. Wagner; J. Magn. Reson., 55(1983)151
- [90] S.W. Homans, R.A. Dwek, J. Boyd, N. Soffe, T.W. Rademacher; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84(1987)1202
- [91] M. Rance; J. Magn. Reson., 74(1987)557
- [92] L.R. Brown; J. Magn. Reson., 57(1984)513
- [93] I. Pelczer, B. Penke, M. Zarándi, K.G. Tóth, K. Kovács; in: Proceedings of 50th Anniversary Symposium of the Nobel Prize of Albert Szent-Györgyi Devoted to the Peptide Research (Eds.: B. Penke, A. Török), Walter de Gruyter, Berlin (nyomdában)
- [94] W. Denk, G. Wagner, M. Rance, K. Wüthrich; J. Magn. Reson., 62(1985)350
- [95] D.M. Doddrell, D.T. Pegg, M.R. Bendall; J. Magn. Reson., 48(1982)323
- [96] A.A. Maudsley, L. Müller, R.R. Ernst; J. Magn. Reson., 28(1977)463
- [97] A. Bax, R. Freeman, T.A. Frenkiel; J. Amer. Chem. Soc., 103(1981)2102
- [98] a.) A. Bax, M.F. Summers; J. Amer. Chem. Soc., 108(1986)2093
b.) M.F. Summers, L.G. Marzilli, A. Bax; J. Amer. Chem. Soc., 108(1986)4285
- [99] A. Bax, A. Aszalos, Z. Dinya, K. Sudo; J. Amer. Chem. Soc., 108(1986)8056
- [100] D. Marion, K. Wüthrich; Biochem. Biophys. Res. Commun., 113(1983)967

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni dr. Szabó Józsefnek (JATE, Szeged) azt, hogy a figyelmemet az NMR spektroszkópiára irányította; szakmai és emberi dolgokban egyaránt sokat tanultam tőle.

Köszönöm témavezetőmnek, dr. Göndös Györgynek (JATE, Szeged) a dolgozat elkészítéséhez való hozzájárulását, szíves közreműködését.

Köszönöm mindazon kollégáimnak, elsősorban dr. Rózsa Zsuzsának[†] (SZOTE, Szeged) valamint Dr. Frank Juditnak és dr. Dékány Gyulának (CHINOIN, Budapest), akikkel a dolgozatban szereplő témákban munkatársak voltunk, az együttműködést, s az időnként szükséges türelmüket. Külön köszönöm dr. Horváth István Tamásnak (akkor CHINOIN, Budapest), hogy a primycinnel kapcsolatos kutatásokra fölhívta a figyelmemet, s a közös munkát kezdeményezte. Itt köszönöm meg Jerkovich Gyulának (GYKI K.v., Budapest) baráti, s a tömegspektroszkópiai mérések zömében nyújtott segítségét.

Ezúton szeretném tiszteletemet és köszönetemet kifejezni Dr. Sohár Pál professzornak (EGIS, ELTE, Budapest), akinek két ízben is munkatársa lehettem korszerűen felszerelt NMR spektroszkópiai laboratóriumokban, az együtt töltött időkből nyújtott minden segítségért és támogatásért.

Azon két munkahelyem (Gyógyszerkutató Intézet K.v., EGIS) vezetőinek, ahol a dolgozatba foglalt munkák túlnyomórészt készültek, köszönetemet fejezem ki azért, hogy általában jó körülmények között, támogatásukkal, viszonylagos szabadsággal dolgozhattam.

Szeretném megköszönni Dr. J.K.M. Sanders professzornak (Cambridge University, Cambridge, U.K.) az ösztöndíjasként nála töltött három hónap alatt nyújtott minden segítséget és támogatását.

Külön köszönet illeti dr. Neszvényi András (KKKI, Budapest), akitől nem csak a PFT és ^{13}C NMR spektroszkópiai módszerek körében tanultam sokat, hanem ezen dolgozat időben való elkészültéhez is nagy segítséget kaptam.