

UJABB STABILIS PARAMÁGNESES VEGYÜLETEK SZINTÉZISE
ÉS FELHASZNÁLÁSA BIOLÓGIAI JELÖLÉSRE

Egyetemi doktori értekezés

Csekő József

P é c s

1984

TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
B E V E Z E T É S	1
C É L K I T Ü Z É S	4
E L M É L E T I R É S Z	5
1. NITROXID TIPUSU SZABAD GYÖKÖS VEGYÜLETEK . . .	5
1.1. Szabad gyökök, stabilis nitroxidok és felosztásuk	5
1.2. A paramágneses nitroxidcsoport stabilitása	8
1.3. A nitroxidcsoportot érintő kémiai reakciók	11
1.3.1. A nitroxidok oxidációja	12
1.3.2. A nitroxidok redukciója	13
1.3.3. A nitroxidok reakciója savakkal	14
2. AZ ELEKTRONSPIN-REZONANCIA /ESR/ SPEKTROSKÓPIA ALAPJAI	15
2.1. Az ESR spektrumból nyerhető információk .	17
3. SPINJELÖLÉS	21
3.1. A fontosabb spinjelölők csoportosítása . .	23
3.2. A spinjelölők biológiai alkalmazása . . .	28
3.2.1. Enzimek spinjelölése	28
3.2.2. Gyógyszermolekulák spinjelölése	30
3.2.3. Nukleinsavak spinjelölése	32
3.2.4. Biológiai membránok spinjelölése	32
4. ÚJ TIPUSU NITROXID SPINJELÖLŐK SZINTÉZISE . . .	34
4.1. Nitroxid alapvázak szintézise	34
4.1.1. Pirrolin-gyűrűs nitroxidok	35
4.1.2. Tetrahidropiridin-gyűrűs nitroxidok	35



4.2. Spinjelölésre alkalmas tetrahidropiridinvázis származékok szintézise	36
5. BIOLÓGIAILAG FONTOS MOLEKULÁK SPINJELÖLÉSE, PARAMÁGNESES ANALÓGOK ELŐÁLLÍTÁSA	41
5.1. Nitroxidcsoportot oldalláncként tartalmazó α -aminosav előállítása	41
5.2. Spinjelölt barbitursavszármazék szintézise .	46
5.3. Spinjelölt morfinszármazékok szintézise . .	47
5.4. Glicerín-szerű paramágneses vegyületek szintézise	52
6. PARAMÁGNESES KONJUGÁLT DIÉNEK SZINTÉZISE ÉS NÉHÁNY REAKCIÓJA	57
6.1. A nitroxid konjugált diének polimerkémiail alkalmazása; a paramágneses jelleg átmeneti megszüntetése	60
Ö S S Z E F O G L A L Á S	64
K I S É R L E T I R É S Z	65
IRODALOM	88

Ez a munka a Pécsi Orvostudományi Egyetem Elméleti Központi Kémiai Laboratóriumában, az MTA Természettudományi Főosztálya által támogatott "Paramágneses /nitroxid/ vegyületek kutatása" /301-A/82/ téma keretében készült. Ezután mondok köszönetet a POTE vezetésének, hogy dolgozatomat elkészíthettem.

Köszönetemet fejezem ki dr. Hankovszky Olga tudományos főmunkatársnak és dr. Hideg Kálmán tudományos tanácsadónak, a kémiai tud. doktorának a lehetőségért, hogy a kutatásban résztvehettem és a munkámhoz nyújtott szakmai irányításért.

Dr. Lex László tudományos munkatársnak köszönöm a mindennapi szakmai és technikai segítséget.

Köszönettel tartozom a laboratórium munkatársainak, Ott Miklósnénak a mikroanalízisekért, Lovas Lászlóné, Kneif Józsefné, Halász Aladárné technikusoknak a preparatív munkában való közreműködésért.

A dolgozat gépeléséért Tüske Gézőnének illeti köszönet.

Az ESR spektrumok felvételét dr. Belágyi József egyetemi docensnek, a biológiai tud. kandidátusának, a tömegspektroszkópiai vizsgálatokat dr. Jerkovich Gyulának /GyKI/ köszönöm meg.

B E V E Z E T É S

Az életjelenségekkel foglalkozó tudományok alapvető feladatai közé tartozik, hogy a biológiai rendszerek törvényszerűségeinek megismerésére új, érzékeny vizsgálati módszereket dolgozzanak ki. A biokémikus, biofizikus kutatók birtokában számos olyan módszer van, amellyel információt szerezhetnek a biológiai rendszereket felépítő kis- és nagymolekulákról.

Az információszerzés egyik módja, hogy megjelöljük a vizsgálandó biomolekulát és tulajdonságait valamilyen analitikai módszerrel vizsgáljuk.

A biológiai rendszerek radioaktív izotópokkal történő jelölése /Hevesy György 1923-ban végzett első kísérletei óta/ ismert és elterjedt módszer, amellyel tanulmányozhatjuk a mintában a sugárzó izotópok jelenlétét, mennyiségét, ill. követhetjük azok utját; pl. valamely anyagcserefolyamatban. Az izotópos technika, jellegéből adódóan nem ad felvilágosítást a molekula szerkezetéről.

Sok esetben azonban az élő szervezetben betöltött szerepük tisztázásához összetett, nagy molekulásulyu biomolekulák /pl. fehérjék/ szerkezetét, konformációját vagy annak megváltozását kell vizsgálnunk. Ehhez kis jelölőmolekulákat - ún. riporter csoportokat¹ - kell választanunk.

A riporter csoportok olyan vegyületek, amelyek érzékenyek a környezeti változásokra, és van valamilyen kitüntetett, az adott biológiai rendszerben jól detektálható /kémiai vagy fizikai/ tulajdonságuk. Emellett a riporter csoportnak minél tökéletesebben kell illeszkednie a biológiai környezetbe úgy, hogy ne, vagy csak minimálisan zavarja annak szerkezetét, tulajdonságait.

Ha riporter csoportnak olyan paramágneses szabad gyökös vegyületeket választunk, amelyek a kémiai reakciók körülményei között stabilisak, úgy az utóbbi 20 évben nagy fejlődésen átment elektronspin-rezonancia /ESR/ spektroszkópiával vizsgálhatjuk a velük jelölt biomolekulákat.

A paramágneses, stabilis szabad gyökök elektronspin-rezonanciája érzékenyen összefügg a molekula mozgásaival, mágneses térhez viszonyított helyzetével, így alkalmas ezen paraméterek biológiai rendszerben történő vizsgálatára, számos biokémiai és biofizikai probléma megoldására /pl. membránok szerkezetvizsgálata², fehérjék szerkezet- és konformációvizsgálata, fehérje-fehérje kölcsönhatás tanulmányozása, enzimek aktiv hely-geometriájának³ ill. az enzimek biokatalízisben való részvételének vizsgálata, nukleinsavak kutatása⁴/.

A spinjelölt biomolekulák tanulmányozása összetett feladat, amely magában foglalja a jelölő reagens előállítását, a biomolekulához való kapcsolását, az ESR spektrum értékelését. A vegyész feladata ezen belül, hogy minél tökéletesebb riporter-csoportokat szintetizáljon.

A riporter-csoportként használható paramágneses vegyületek közül a nitroxid típusú stabilis szabad gyökös vegyületekkel foglalkozik a dolgozat.

Az irodalmi áttekintésben nagyobb hangsúlyt kapnak a nitroxidok stabilitásával összefüggő eredmények mivel mind a spinjelölők előállításához alkalmazható szintézismódszerek számbavételénél, mind a biológiai felhasználásnál figyelembe kell venni a paramágneses csoport érzékenységét.

A spinjelölt molekulák ESR spektroszkópiával való tanulmányozása ma már olyan összetett tudomány, amely a spektrumok számítógépes analizisére és szimulációjára is kiterjedt. Értekezésemben csak a nitroxid molekulák ESR spektrum-vizsgálatának a preparatív munka tervezését érintő alapjait foglalom össze.

E L M É L E T I R É S Z

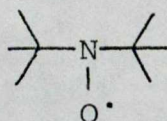
1. NITROXID TIPUSU SZABAD GYÖKÖS VEGYÜLETEK

1.1. Szabad gyökök, stabilis nitroxidok és felosztásuk

A szabad gyökös vegyületek a századforduló óta ismertek a szerves kémiában⁵. Tanulmányozásukat és felhasználásukat azonban megnehezítette nagy reakciókészségük és viszonylag rövid élettartamuk.

A gyökös folyamatok tanulmányozását nagymértékben elősegítette az ESR spektroszkópia fejlődése. Ennek hatására újabb szabad gyökös vegyületeket állítottak elő, amelyek közül több már a kémiai reakciók körülményei között is stabilnak bizonyult. A stabilis szabad gyökös vegyületek közül az >N-O^\bullet /nitroxid/^x csoportot tartalmazók alkalmazása terjedt el leginkább.

Elsők között Hoffmann⁸ 1961-ben állított elő ilyen típusu vegyületet, a di/*tercier*-butil/-N-oxilt /1. ábra/.



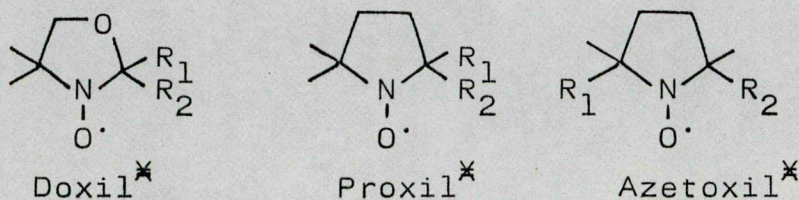
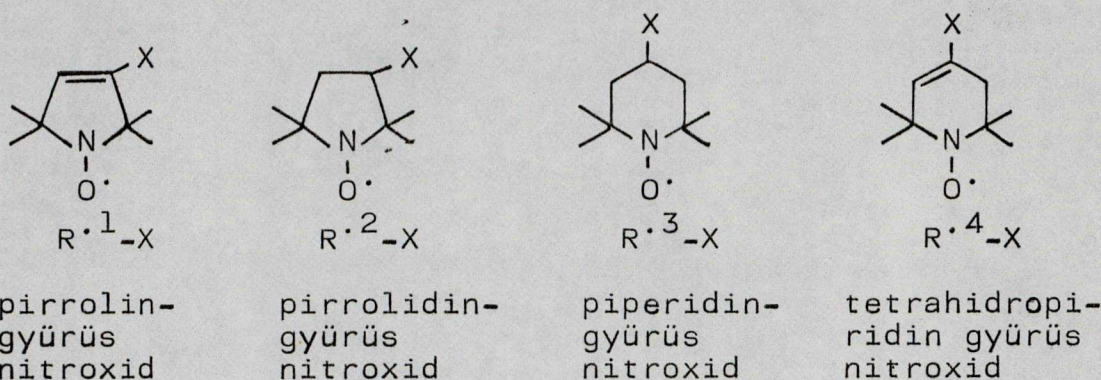
Di/*tercier*-butil/-N-oxil

1. ábra

^xAz IUPAC szabályai szerint⁶ ezeket a vegyületeket aminyl oxidoknak kellene nevezni. A szovjet irodalomban Rozancev állásfoglalása nyomán⁷ a nitroxyl ill. iminoxyl elnevezés használatos. Ebben a dolgozatban mi a nitroxid csoportnevet fogjuk használni, mert ez az irodalomban legáltalánosabban elterjedt. Az egyik utóbbi nemzetközi konferencia /International Symposium on Spin Trapping and Nitroxyl Radical Chemistry, Guelph, Ontario, Canada, July 12-17, 1981/ is ezt fogadta el és ajánlotta az IUPAC-nak. A vegyületek szisztematikus elnevezésénél az N-oxil, -oxil ill. N-oxi elnevezést használjuk.

A nitroxid típusu stabilis szabad gyökös vegyületek szintézisében, kémiai és fizikai tulajdonságaik megállapításában az 1960-as évektől a szovjet Rozancev és a francia Rassat uttörő szerepet töltött be. Azóta több könyv⁹⁻¹¹ ill. összefoglaló cikk^{7,12-15} foglalkozott a nitroxidok kémiájával, a reakcióképes funkciós csoportot is hordozó, tehát jelölésre alkalmas nitroxid szabad gyökös vegyületek szintézisével.

A leggyakrabban tanulmányozott típusokat a heteroggyűrűk telítettsége, tagszáma és a reakcióképes csoportok helyzete szerint csoportosítjuk /2. ábra/.



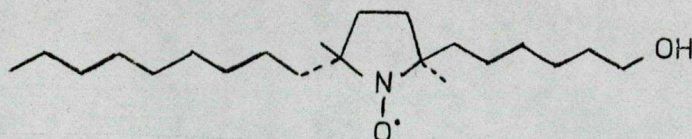
Nitroxid alapvázak

2. ábra

* A 4,4-dimetiloxazolidin-N-oxil /doxil/ vegyületek leegyszerűsített elnevezése¹⁶.

** A proxil elnevezést kezdetben Keana a 2,2-dialkil-5,5-dimetil-pirrolin-1-oxil vegyületek egyszerűsített nevéként használta. Ez azonban az újabb, más helyzetben szubsztituált pirrolidin N-oxilok elterjedésével minden pirrolidin-N-oxil vegyületre használatos, v.ö. Sigma katalógus, 1984. június, 47. oldal.

*** Keana és mtsai ezt a nevet a spinjelölt zsírsavak egyszerűsített elnevezésére vezették be²⁴.

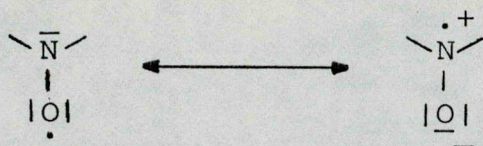


A fenti vegyület neve pl.: *transz-8-aza-7,9-dimetil-7,9-etano-1-oktadekanol-N-oxil* röviden: *transz-8-azetoxil-oktadekanol*. Az elnevezés előnye, hogy megjelöli a zsírsavban a spinjelölt pozícióját.

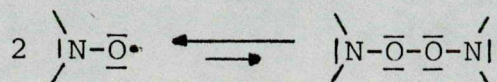
1.2. A paramágneses nitroxidcsoport stabilitása

Az előbbieken ismertetett nitroxidok szekunder aminok N-oxil származékai. A nitroxidok "stabilitása" alatt azt értjük, hogy a nitroxid vegyület tisztán előállítható, tárolható és a más szerves vegyületeknél is szükséges laboratóriumi elővigyázatossági rendszabályok mellett ill. reakció körülmények között bomlás nélkül kezelhető. Ez a definíció megegyezik a Griller és Ingold által a szén-központu gyökökre bevezetett meghatározással¹⁹.

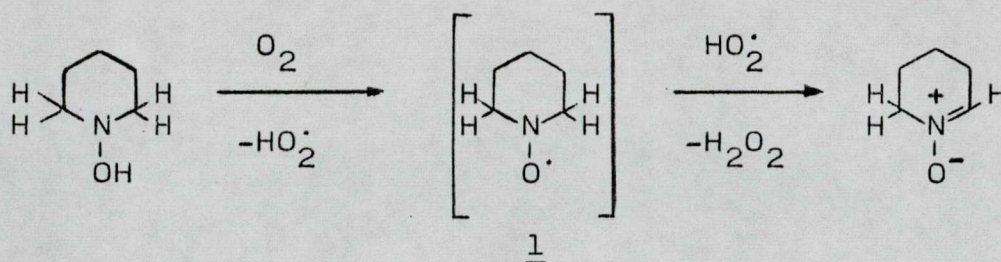
A nitroxidcsoport szerkezetét az alábbi mezomer hátszerkezetekkel írhatjuk le:



A szerkezet tehát rezonanciastabilizált, amelyben három π -elektron oszlik meg két atom között. A kötésrend másfél /egy σ - és fél π -kötés/, a kötési energia értéke kb. 100 kcal/mol [418,4 kJ/mol], a delokalizációs energia értéke pedig kb. 30 kcal/mol [125,5 kJ/mol]^{11,20}. A nitroxidok dimerizációja nem következik be /az O-O kötés nem alakul ki/, mivel az új kötés kialakulásával nyert energia nem kompenzálja a két nitroxid molekula delokalizációs energiájának elvesztését:

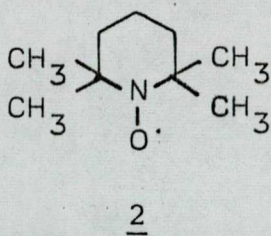


A nitroxid szabad gyökök szekunder aminok²¹ és hidroxil aminok oxidációjakor keletkeznek instabilis intermedierekként /3. ábra/.

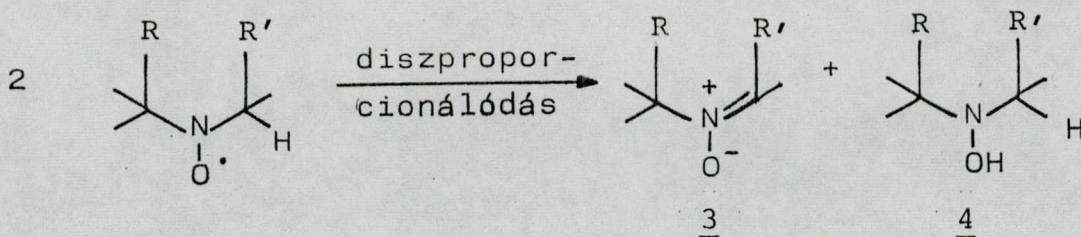


3. ábra

Rogers és mtsai rámutattak^{22,23}, hogy a nitroxid szabad gyök stabil lesz, ha az α -szénatomhoz nem kapcsolódik hidrogénatom. Pl. az 1-oxil-piperidin gyök /1/ stabilná válik, ha 2-és 6-helyzetben tetrametilezett származékká, 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidinné /2/ alakítják:

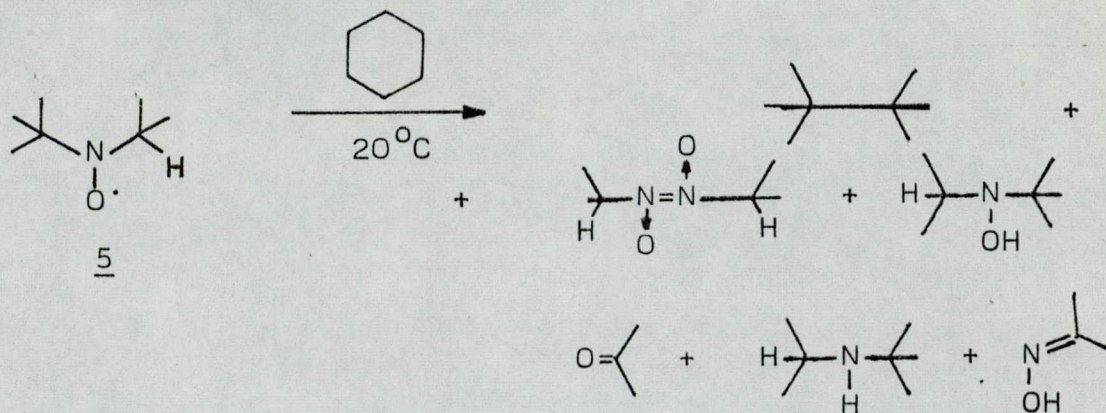


Amennyiben a nitrogénnel szomszédos α -szénatomokhoz egy vagy több hidrogénatom kapcsolódik - mint azt a fenti példa is bizonyítja - a nitroxid molekula nem stabil. Az ilyen vegyületek ugyanis diszproporcionálódással²⁴ bomlanak /4. ábra/:



4. ábra

A keletkező nitron /3/ ill. az N-hidroxil-amin /4/ típusu vegyület további reakcióba léphet. Briere és Rassat²⁵ részletesen tanulmányozták az N-/tercier-butil/-N-/izopropil/-aminoxil /5/ bomlását ciklohexánban, és az alábbi termékeket azonosították /5. ábra/:

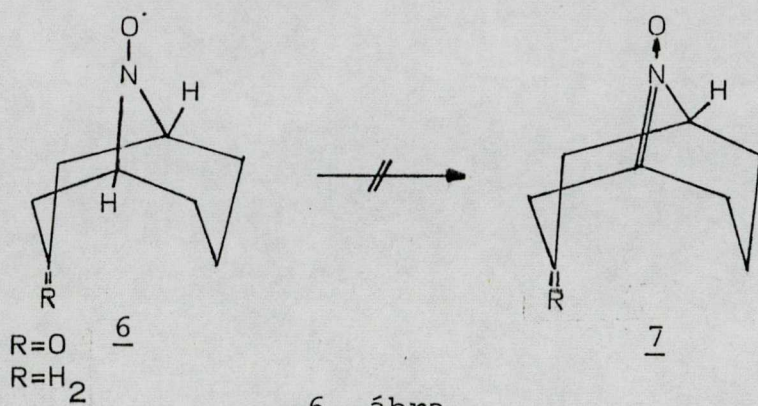


5. ábra

Összefoglalva, a nitroxidok stabilitását az alapállapot alacsony energiaszintje és a négy metilcsoport sztérikus gátló hatása együttesen biztosítja.



Előállíthatók azonban igaz, ritka kivételként olyan, viszonylag stabil szabad gyökös vegyületek /6/ is, amelyek a nitrogénnel szomszédos szénatomon hidrogén szubsztituenst hordoznak²⁶ /6. ábra/.



6. ábra

A stabilitás magyarázata ebben az esetben az, hogy a nitron /7/ nem képződhet, mivel a szén-nitrogén kettős kötés hidfő szénatomról indulna, és ez ellentmondana a Bredt-szabálynak.

1.3. A nitroxidcsoportot érintő kémiai reakciók

Az alábbiakban azokat a legfontosabb átalakulásokat kívánom bemutatni, amelyekben a szabad gyökös vegyület párosítatlan elektronja vesz részt, és amelyek a paramágneses jelleg megszűnését eredményezik. Ezeket a reakciókat a szintetikus munka során általában el kell kerülni. Ám a gyök átmeneti destrukciójával /reverzibilis átalakításával/ nyert diamágneses vegyületekkel gyökös folyamatok tanulmányozhatók /ld.6.1. fejezet/,

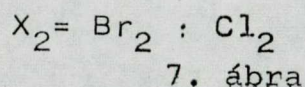
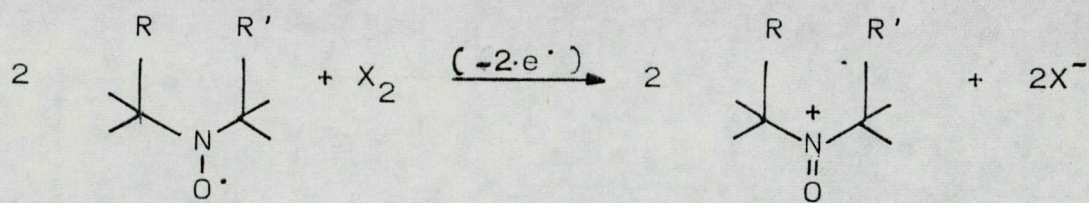
ill. szerkezetük NMR-spektroszkópiával vizsgálható.

A paramágneses jelleg visszaalakítása után a most már jelölt rendszer ESR-rel vizsgálható.

A redox átalakulásokkal számolnunk kell a biológiai rendszerekben is.

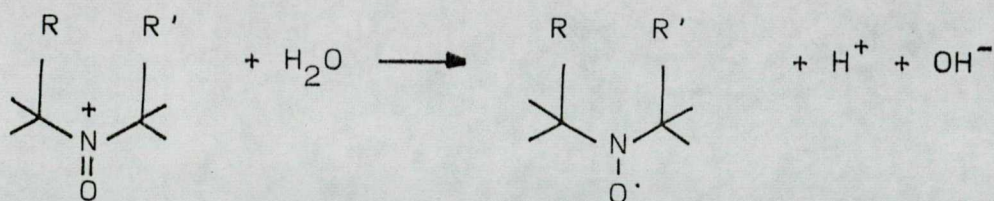
1.3.1. A nitroxidok oxidációja

A nitroxidcsoport Cl_2 -ral, Br_2 -mal^{11,27} vizes Ag_2O -dal²⁸ és elektrokémiai módszerekkel²⁹ könnyen oxidálható. Az oxidáció a következő általános egyenlettel írható le: /7. ábra/:



A képződött immónium-oxid sók nagyon reakcióképesek, ezért nehezen izolálhatók, tisztíthatók.

Az immónium-oxid vegyület visszalakítható a kiindulási nitroxiddá /8. ábra/:

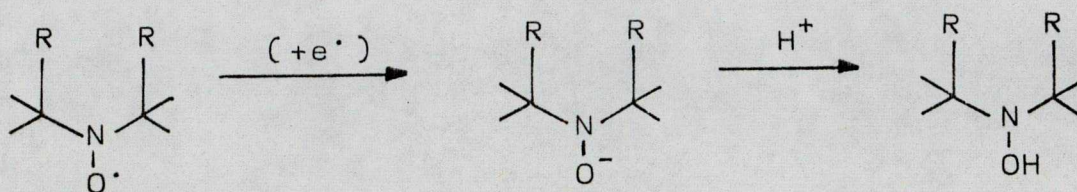


8. ábra

A reakció mechanizmusa a kinonoknál vagy más elektron-akceptoroknál leirtakhoz hasonló³⁰.

1.3.2. A nitroxidok redukciója

A nitroxidok hidroxil-amin -vegyületté redukálhatók
/9. ábra/:



9. ábra

A redukcióhoz a legtöbb esetben nemcsak elektrondonor, hanem protondonor is szükséges. Ezért a redukció könnyen lejátsszódik savas közegben és katalitikus hidrogénezés körülményei között. A reakciót végezhetjük hidrazin felesleggel¹¹, fenil-hidrazinnal³¹, szulfhidrilcsoporttal³², aszkorbinsavval^{33,34}, csepegő higanyelektroddal³⁵, katalitikus hidrogénezéssel: platina¹¹- és palládium/C³⁶ katalizátoron.

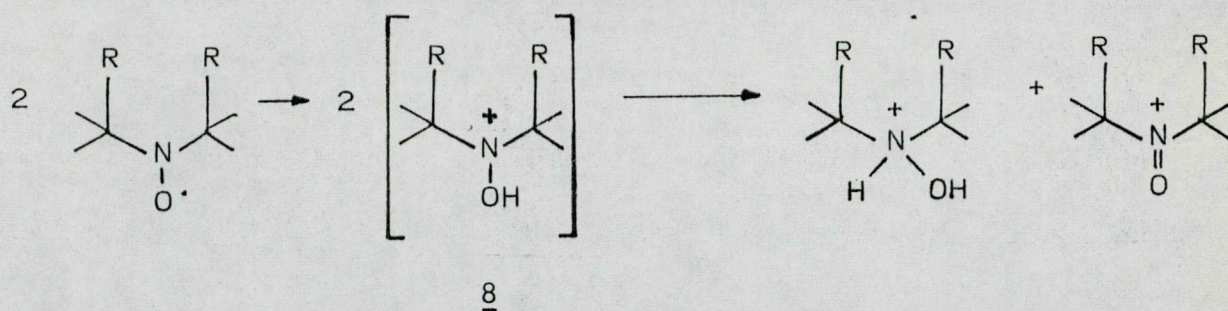
Vizes oldatban aszkorbinsav Na-sójának fölöslegével redukált nitroxidokkal Kornberg és McConnell foszfolipid membránok transzportfolyamatait vizsgálták³³. Mivel a NADPH redukálja az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidint³⁷, a lipofil nitroxidok felhasználhatók NADPH-függő folyamatok tanulmányozására.

A lymphocyták is redukálják a nitroxidokat. Ez a gyors redukció visszafordítható 1 mM kálium-[hexaciano-ferrát (III)] feleslegben való alkalmazásával³⁸.

A nitroxidok stabilak a nátrium-bór-hidrides¹¹, a nátrium-ciano-bór-hidrides³⁹, a litium-aluminium-hidrides⁴⁰ és a borán-dimetil-szulfidos³¹ redukcióval szemben.

1.3.3. A nitroxidok reakciója savakkal

Erős savak a paramágneses jelleget megszüntetik³⁵. A változás a nitroxid és a sav között valószínűleg a protonált nitroxid /8/⁴² diszproporcionálódásán keresztül játszódik le¹³ /10, ábra/:



10. ábra

A preparatív munka során ezért a pH-t állandóan ellenőriznünk kell. Ha szükséges, a keletkezett terméket a savas közegből mielőbb el kell távolítani, pl. szerves fázisba átextrahálni, vagy szilárd terméként kicsapatni. Emellett ajánlatos hidegen is dolgozni és ügyelni arra, hogy a sav koncentrációja ne legyen nagyobb 1 N-nál¹³. Amennyiben sav hatására a szabad gyökös jelleg megszűnik, esetleg van még lehetőség a paramágneses jelleg visszanyerésére. /ld. 6. fejezet/

2. AZ ELEKTRONSPIN-REZONANCIA/ESR/ SPEKTROSKÓPIA ALAPJAI

A paramágneses jelölőanyagot tartalmazó biológiai mintákat ESR spektroszkópiával vizsgálhatjuk.

Az ESR spektroszkópia a mágneses rezonancia módszerével vizsgálja a paramágneses jelenségeket. A paramágnesség elektronoktól származó hatás, amely kompenzálatlan spinű atomok, szabad gyökök /a vegyérték elektronrendszer egy, pár nélküli elektront tartalmaz/, részlegesen betöltött belső héju fémionok /pl. átmeneti fémek 3d héja/ tulajdonsága. Az ESR spektroszkópia e rendszerek mágneses térben észlelhető energianívóit tanulmányozza alkalmasan választott frekvenciájú elektromágneses térben. A módszer előnye a nagy érzékenység mellett arra vezethető vissza, hogy a vizsgált rendszer energianívói a paramágneses centrum környezetében lévő elektromos és mágneses terek perturbáló hatása folytán többé-kevésbé specifikusan változnak meg. Ez lehetőséget nyújt a molekulaszervezet finomabb részleteinek vizsgálatára, a kölcsönhatások mélyebb megértésére, valamint biológiai problémák tanulmányozására.

A párosítatlan spinű elektronnak mágneses térben két lehetséges energiaállapota lehet annak következtében, hogy a spin mágneses momentum a térrel azonos,

vagy ellentétes irányba mutat. Külső elektromágneses tér jelenlétében átmenetek indukálhatók e két energiaállapot között. Az átmenetek létrehozásának feltétele az alábbi egyenletekkel írható le:

$$\Delta E = h\nu$$

$$h\nu = g\beta H_0$$

ahol g : ~ 2 ; β : Bohr magneton; H_0 : mágneses térerősség

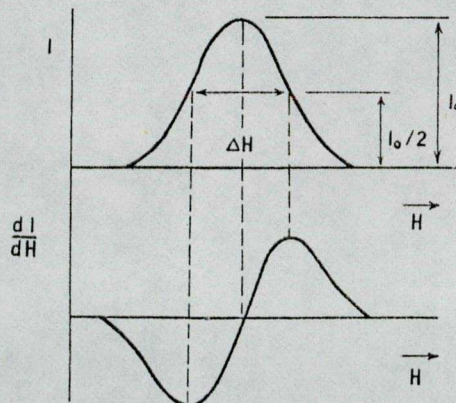
Ha H_0 a leggyakrabban alkalmazott 3.300 Oe, akkor

$$\nu = \frac{g\beta H_0}{h} = 9,5 \cdot 10^9 \text{ Hz} \quad \text{és}$$

$$\lambda = \frac{c}{\nu} = 3,2 \text{ cm}$$

azaz a mérés mikrohullámu tartományban /30 cm - 1 mm/ valósítható meg.

Az energiaabszorpció észlelését a gyakorlatban rögzített frekvenciánál, a mágneses térerősség /H/ változtatásával valósítják meg. Technikai okokból az abszorpciós görbe első differenciálhányadosát ábrázolják /11. ábra/:



ESR abszorpció görbe $[I = I(H)]$ és első differenciálhányadosa $[dI/dH = f(H)]$

11. ábra

2.1. Az ESR spektrumból nyerhető információk

1. Integrált intenzitás: az abszorpciós görbe alatti terület a mintában lévő párosítatlan elektronok számával arányos. Modern spektrométerekkel 10^{10} párosítatlan elektron mutatható ki egy mintában 1 gauss vonalszélesség mellett. Vonalszélesség alatt az abszorpciós görbe félértékszélességét értjük ΔH ld. 11. ábra/.

2. A spektrumvonal szélessége és alakja: a spektrumvonalak szélességét és alakját a párosítatlan elektronnak a környezetével való kölcsönhatása szabja meg.

A párosítatlan elektronok rendszere a mikrohullámu térből felvett energiát spin-pálya csatoláson keresztül átadhatja a minta többi molekulája által alkotott ún. rácsnak. Ezt az energiaátadási folyamatot a spin-rács relaxációs idővel T_1 jellemezhetjük, amely szabad gyököknél alacsony hőmérsékleten néhány másodperc is lehet.

A másik - a spin-pálya csatolással egyidejűleg végbemenő - energiaátadási folyamat a spin-spin csatolás. Ez a párosítatlan elektronnak más elektronspínekkel vagy magspínekkel való dipól-dipól kölcsönhatása az u.n. spin-spin relaxációs idővel T_2 jellemezhető, amely szilárd fázisban egykristályok esetén, szabad gyököknél $\sim 10^{-8}$ sec.

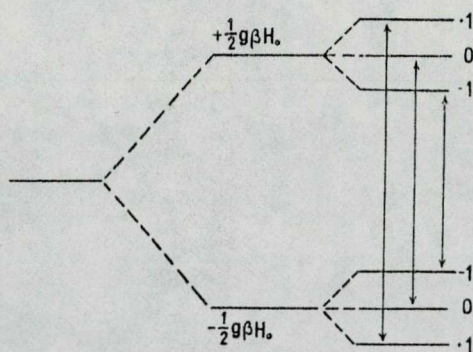
3. g-faktor: teljesen szabad elektron esetén $g = 2,0023$.

Molekulában vagy atomokban azonban a környező

ionok elektromos tere is befolyásolja az elektron pályamozgását és a spin-pálya csatoláson keresztül a mágneses energiákat megváltoztatja. Mivel a g -faktor anizotróp, mérése főleg egykristályok esetében a szabad gyök térbeli helyzetéről és szimmetriaviszonyairól szolgáltat információt.

4. Az ESR spektrumok hiperfinom szerkezete: a hiperfinom szerkezet a párosítatlan elektron mágneses momentumának és a környezetében lévő zérustól különböző mágneses momentumu mag [pl. N^{14}] kölcsönhatásának eredményeként jön létre.

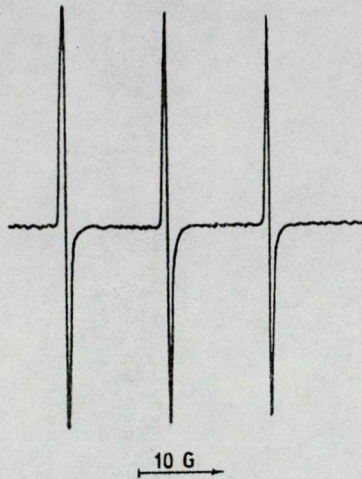
Egy párosítatlan elektron és egy vele kölcsönhatásban lévő mag esetén a hiperfinom szerkezetet a 12. ábra mutatja:



Hiperfinom szerkezet értelmezésének sémája a nitrogénoxid szabad gyök esetében $I = 1$

12. ábra

A N^{14} magspinje külső mágneses térben három beállással rendelkezik az $m = 1, 0, -1$ mágneses kvantumszámoknak megfelelően. A hat energianívó között három megengedett energiaátmenet lehetséges. A kapott spektrumot a 13. ábra mutatja peroxilamin diszulfonát ionradikál $/SO_2/2NO^{2-}$ esetében vizes oldatban 10^{-4} M koncentráció mellett.

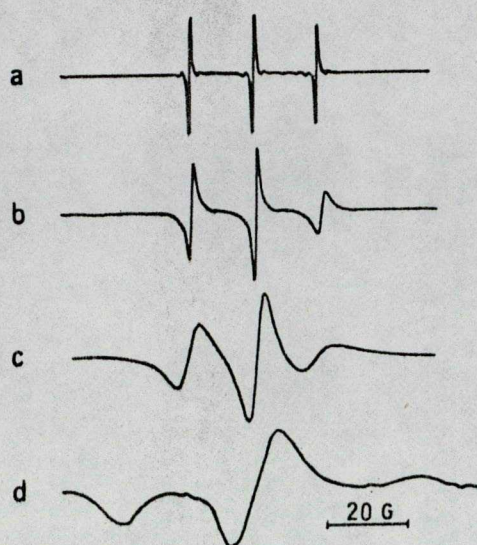


13. ábra

Az N-oxil gyököt hordozó kis molekulák oldatainak tipikus ESR spektruma tehát három azonos intenzitású szimmetrikus /izotróp/ jelből áll.

Mint az a fentiekből kiderül, a gyök igen érzékeny a mobilitását befolyásoló tényezőkre. Ha pl. az oldat hőmérsékletét csökkentjük, nő a viszkozitás, a gyök forgómozgása lelassul, az immobilitás növekszik.

A struktúra kitüntetett konformációkkal rendelkezik, ezért a spektrum aszimmetrikussá válik /anizotrópia/. A spektrumban bekövetkező változást Griffith és Waggoner munkája alapján⁴³ a 14. ábrán szemléltetjük:



Etilénglikolban oldott nitroxid szabad gyök ESR spektruma: a. 25°C , b. -25°C , c. -80°C , d. -150°C hőmérsékleten.

14. ábra

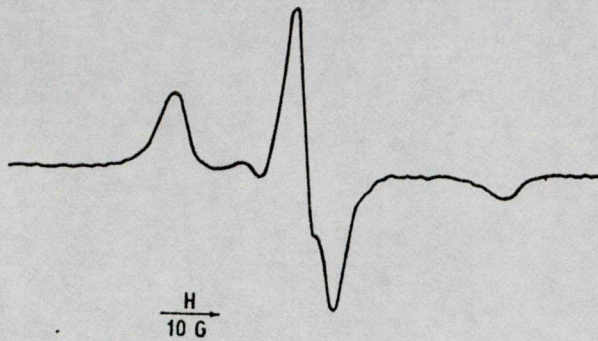
A szabad gyök forgómozgásában ehhez hasonló immobilitás fokozódás lép fel akkor is, amikor a gyök valamilyen makromolekulához kapcsolódik /ld. Spinjelölés 3. fejezet/. Ma már különféle elméleti és kísérleti kutatómunka eredményeként a gyök mozgásaihoz tartozó spektrumváltozásokat jól lehet szimulálni. Így a spektrumok számítógépes analízisével a makromolekulához kötött

spinjelölő molekula mozgását befolyásoló környezetről értékes, pontos információk nyerhetők.

3. SPINJELÖLÉS

A biológiai rendszer valamely makromolekulájához kapcsolt szabad gyökös vegyületet spinjelölőnek vagy spinjelzőnek /spin label/, magát a kapcsolást spinjelölésnek /spin labeling/ nevezzük. A spinjelölő és a biomolekula kapcsolata lehet kovalens, ekkor jelölt /"spin labeled"/ molekuláról, ill. nem kovalens /ionos, molekula asszociációs, pl. hidrogénhid kötésű/, ekkor "spin probe"-ről beszélünk¹⁴. A spinjelölőnek specifikusan és a biológiai rendszer stabilitását biztosító körülmények /pH, T/ között stabilan kell kötődnie a biomolekulához. A jelölés további feltétele, hogy a spinjelölő minimálisan változtassa meg a jelölés helyét, így a jelölt molekula biológiai funkcióját ill. aktivitását.

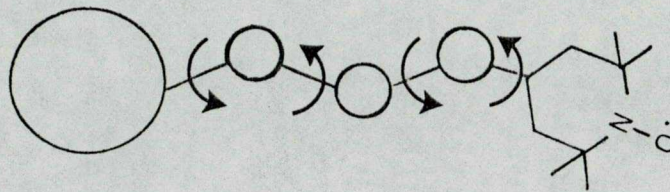
Ha a jelölés megtörténik, a kis paramágneses molekula jellegzetes ESR spektruma /ld. 2.1. fejezet/ megváltozik, a spektrum anizotróppá válik, szimmetriája megszűnik. A változás oka ugyanaz, mint a hőmérséklet csökkentése esetén: az immobilitás fokozódása /15. ábra/⁴⁴.



Immobilizált gyökspektrum

15. ábra

A szabad gyök "saját" mozgását befolyásolják a környezetében lévő atomcsoportok, a spinjelölő és a makromolekula közti kötések körüli mozgás lehetősége /16. ábra/, ill. az, hogy maga a makromolekula is mozoghat.



Makromolekula

„Láb”

Spinjelölő

Forgási modell Wallach nyomán⁴⁵

16. ábra

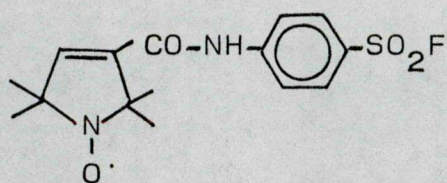
Ezen hatások tükröződnek az ESR spektrum megváltozásában.

A biomolekulák funkcióscsoportjainak szelektív jelöléséhez reagensekre van szükség. Ezért a biokémiában már ismert anyagokhoz hasonló szabad gyökkel jelölt, specifikus csoportot hordozó reagensek széles körének előállítását és alkalmazását igényli a biokémia, ill. a biofizika.

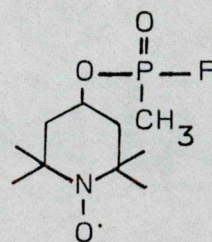
3.1. A fontosabb spinjelölők csoportosítása

Az irodalomban a spinjelölés módja szerint megkülönböztetnek kovalensen- és nem kovalensen kötődő spinjelölőket³.

A spinjelölőket ugyanugy reagensként^x kezelhetjük, mint pl. a fehérjemódosító reagenseket, szem előtt tartva, hogy paramágneses vegyületek, amelyek reakcióképes csoportot /csoportokat/ hordoznak. Főbb típusaikat a 17., 18., 19. ábrákon mutatjuk be.



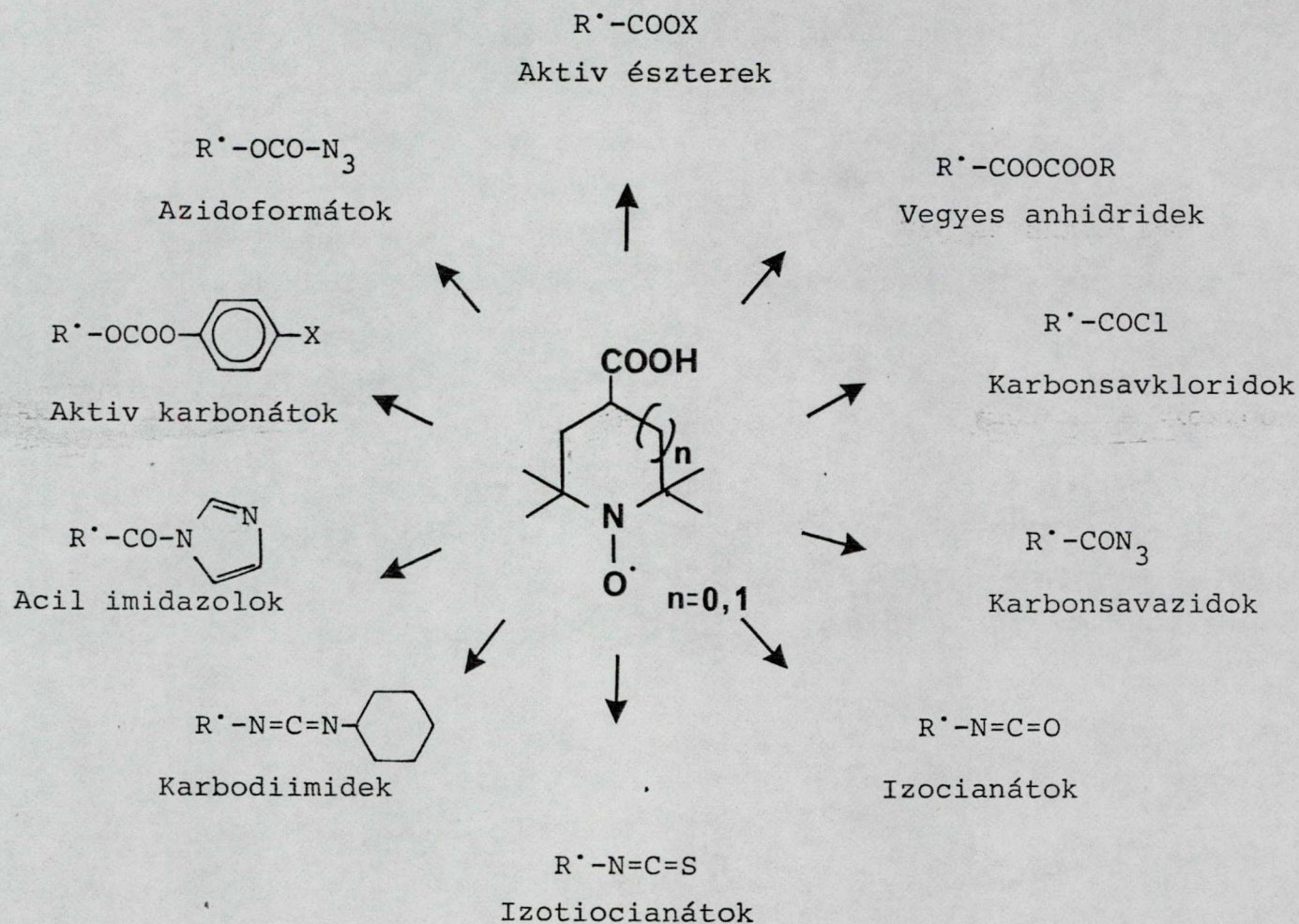
spin label szulfonilezőszer



spin label foszforilezőszer

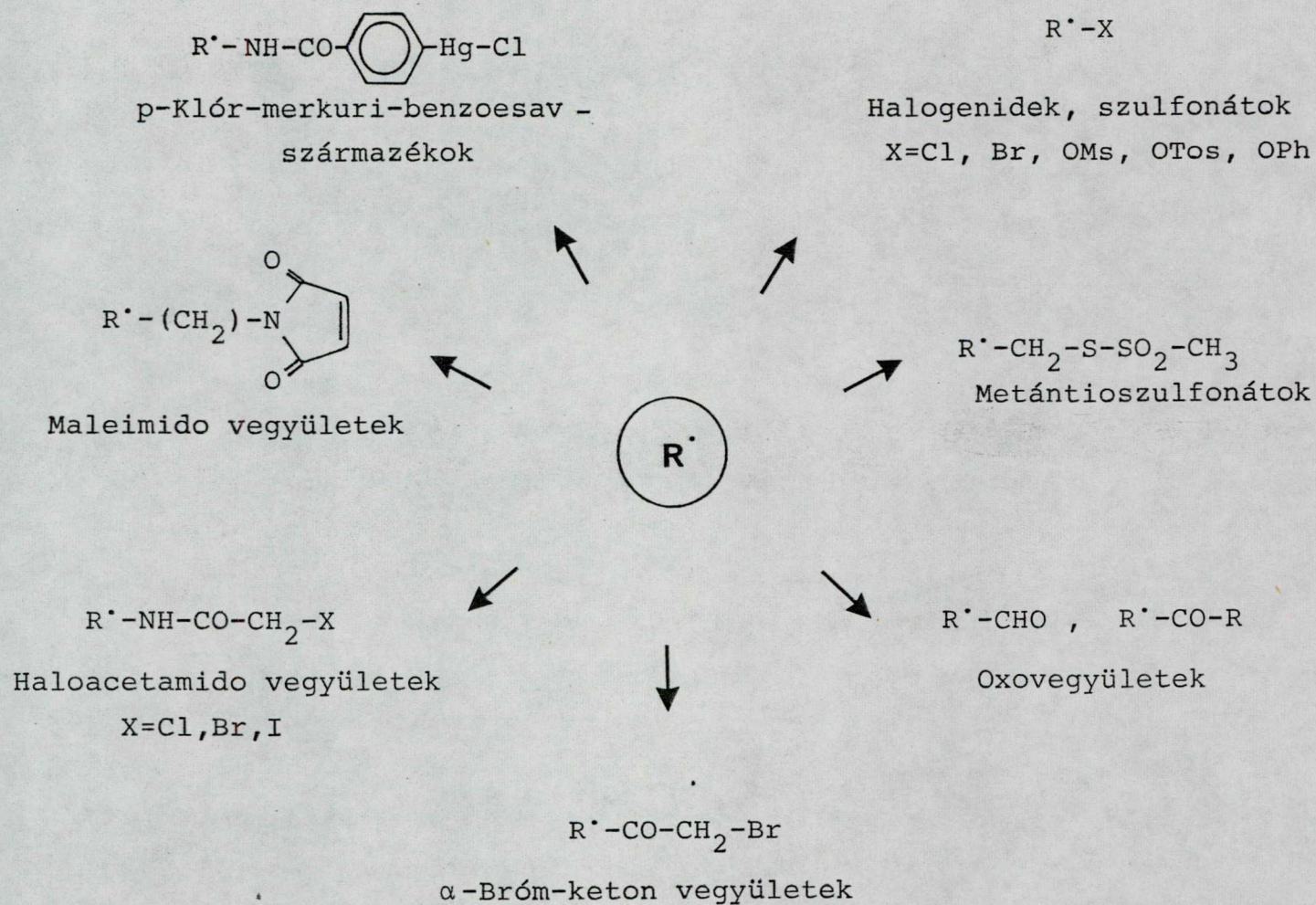
17. ábra

^x Ezt látszik alátámasztani, hogy a vegyületeket ma már katalógusokból /Reanal, Sigma/ rendelhetik meg a felhasználók.



Spin label acilezőszerek

18. ábra

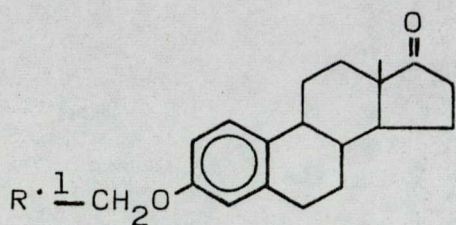


Spin label alkilezőszerek / $\text{R}^{\bullet} = \text{R}^{\bullet 1}, \text{R}^{\bullet 2}, \text{R}^{\bullet 3}, \text{R}^{\bullet 4}$ ld.5.old./

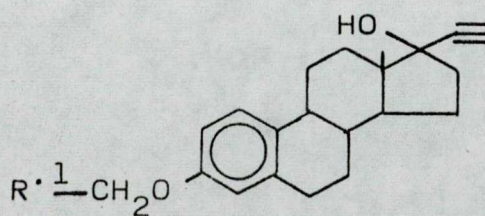
19. ábra

A spin labelek kutatásának egyik területe az újabb, szelektivebb reagensek kifejlesztése. Másik területe a biológiai, kémiai szempontból fontos molekulák paramágneses analógjainak szintézise /pl. jelölt aminosavak /ld. 3.2.1./ gyógyszermolekulák /3.2.2./ nukleinsavak /3.2.3./ zsírsavak, polimerizálható monomerek/.

Ezek egy részéhez úgy jutunk, ha megfelelő funkcióscsoportján a fenti reagensek valamelyikével jelöljük meg a molekulát, pl.:



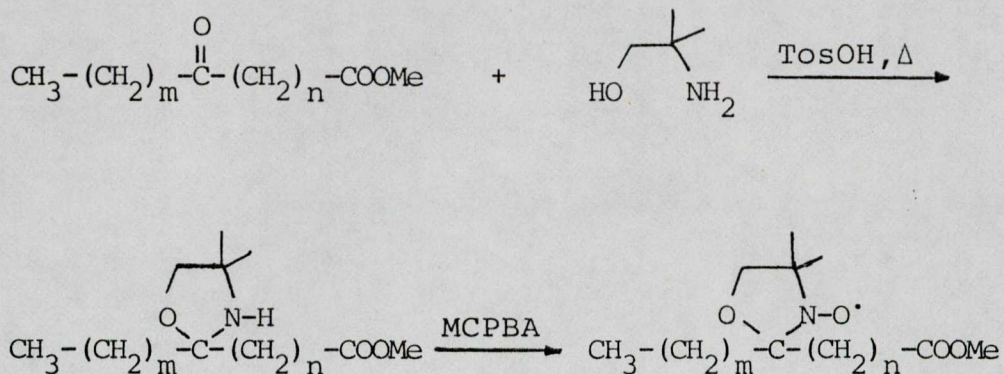
spinjelölt ösztrol⁴⁶



spinjelölt etinil-ösztrol⁴⁶

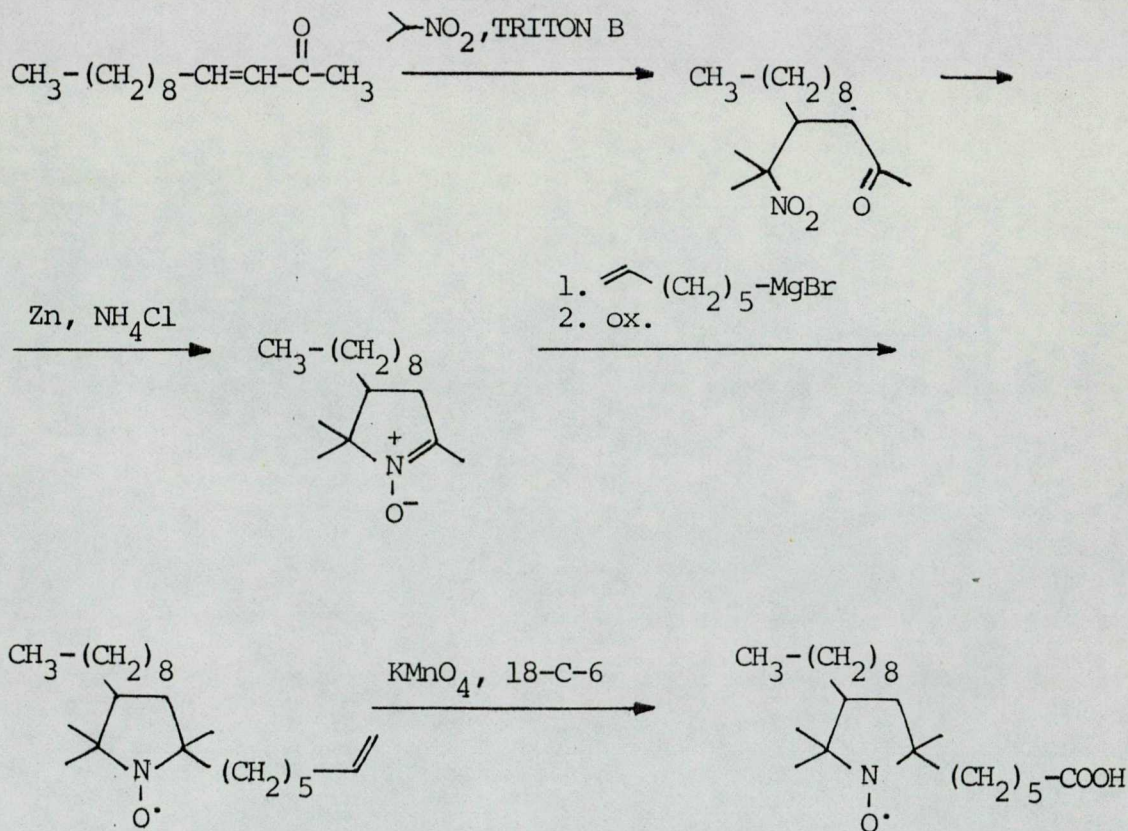
20. ábra

Más képviselőik esetében a molekula paramágneses részének kialakítása a szintézis valamelyik lépésében történik /21. ábra/



Doxil zsírsavszármazék szintézise¹³

21.a ábra



Új típusú nitroxid zsírsav szintézise⁴⁷

21.b ábra

3.2. A spinjelölők biológiai alkalmazása

A következőkben a spinjelölők biológiai alkalmazásai közül ismertetek néhányat azzal a céllal, hogy bemutassam széleskörű felhasználhatóságukat.

Ohnishi és McConnell⁴⁸ első vizsgálatait óta nemcsak számos közleményben számoltak be a kutatók a biomolekulák jelölése terén elért eredményükről, hanem néhány kitűnő könyv^{49,49a,50} és összefoglaló közlemény^{20,51,52} segíti a tájékozódást ezen a területen.

3.2.1. Enzimek spinjelölése

Az enzimek jelölésének módját az határozza meg, hogy az aktiv helyen, vagy annak közelében milyen reakcióképes csoportokat hordozó aminosavak alkotják a polipeptid láncot.

A jelölésnek lehetőség szerint szelektívnek kell lennie. A szelektivitás legtöbbször nem valósítható meg, de a jelölő reagens célzott kiválasztásával, ill. a reakciókörülmények /pH, reakcióidő, hőmérséklet, koncentráció/ alkalmas megválasztásával javítható.

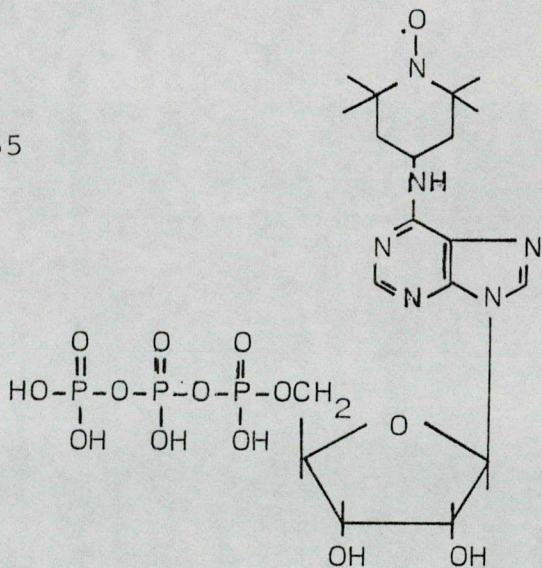
A kovalens jelölés általában ugyanolyan feltételek között végezhető, mint a fehérjemódosító reagensek alkalmazásakor. Azonban figyelembe kell venni a nitroxidok stabilitását veszélyeztető feltételeket /ld. 1.3. fejezet/.

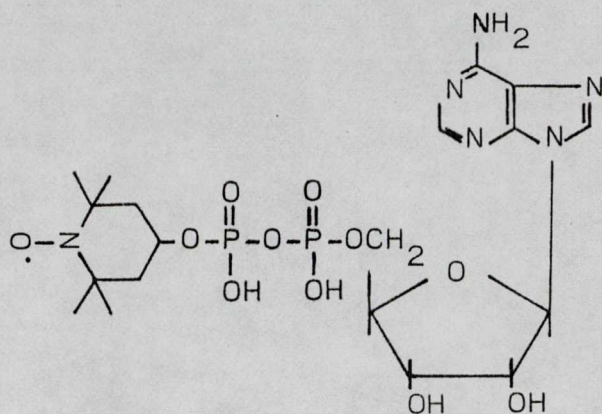
Az ESR spektrum nehezen értékelhetővé válik más paramágneses ion, pl. paramágneses fémion jelenlétében. A zavaró fémionokat a spinjelölt fehérje mellől etilén-diamin-tetraacetát /EDTA/ hozzáadásával komplex vegyület formájában, az el nem reagált spinjelölt a spinjelölés után pl. dializissal vagy molekulaszűrővel távolítják el.

A spinjelölő az egyik esetben az aktiv centrum közelében kötődik a fehérjélánchoz, ekkor nem befolyásolja lényegesen annak biológiai funkcióját⁵³. A másik esetben a spinjelölő az aktiv centrumban kapcsolódik a fehérjéhez, és az enzimaktivitás részben vagy teljesen megszűnik⁵⁴.

A nem kovalens kötésű jelölésnél a spinjelölőnek szelektív affinitást kell mutatnia az enzim kötőhelyéhez. Ilyenek pl. az alábbi vegyületek:

spinjelölt ATP-analóg⁵⁵





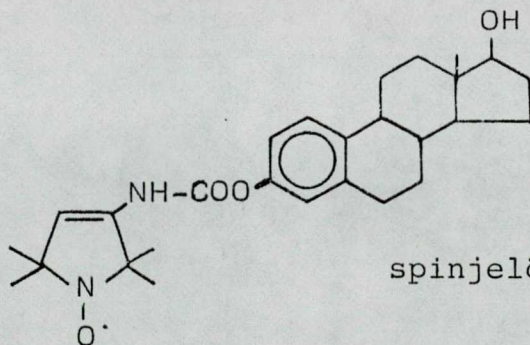
spinjelölt NAD-analóg⁵⁶

3.2.2. Gyógyszermolekulák spinjelölése

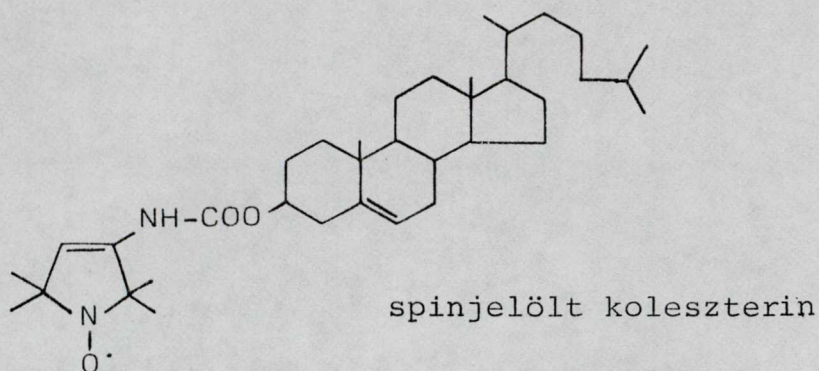
A szervezetbe jutott gyógyszermolekulák a vérárammal eljutnak a célszövetekhez. Kapcsolatba lépnek receptoraikkal, a sejtek makromolekuláival /kifejezésre jut farmakológiai aktivitásuk/. Sorsuk: átalakulás, felhalmozódás, kiválasztódás.

A spinjelöléssel nyomon követhetjük a gyógyszermolekulák sorsát ezeken a szinteken.

Benson⁵⁷ és Defaye⁵⁸ aktiv nitroxid savszármazékokat használtak szteroidok spinjelölésére. Laboratóriumunkban ösztradiolt és koleszterint jelöltek nitroxid izocianáttal⁵⁹ /22. ábra/:

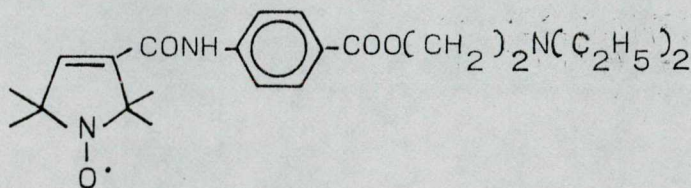


spinjelölt ösztradiol



22. ábra

Gargiulo és mtsai helyi érzéstelenítő hatásu gyógyszermolekula bázisos oldalláncában /a vizoldékony, dietil-amino-csoportot tartalmazó részben/ nitroxidcsoporttal módosított vegyületet irtak le.⁶⁰ Laboratóriumunkban, 1979-ben a Magyarországon is terápiásan kiterjedten használt prokain molekulát a hidrofób részében módosították⁶¹, nitroxid savkloriddal vagy vegyes anhidrid észterrel végzett acilezéssel:



Ezt a vegyületet felhasználták izolált tengerimalac és béka ideg ingerületvezetésének tanulmányozásához^{62,63}.

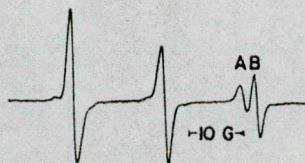
3.2.3. Nukleinsavak spinjelölése

A nukleinsavak kovalens kötésű spinjelölésére az acilező- és alkililezőszerek egyaránt alkalmasak. A molekula jelölhető csoportjai a purin és pirimidin bázisok primer aminocsoportjai ill. a ribóz és glukóz gyűrűk hidroxil-csoportjai.

A jelölt nukleinsavak ESR spektrumaiból - többek között - a kettős spirál konformációs változásaira, a terciér szerkezet megszűnésére /hőmérséklet, kémiai ágensek hatása/, fémionok kötődésére lehet következtetni^x.

3.2.4. Biológiai membránok spinjelölése

A spinjelzési technika felhasználható membránszerkezet és membrán-transzportfolyamatok vizsgálatára is. Így pl. Hubbell és McConnell ideg- és izommembránokat jelöltek az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin /TEMPO/-nel⁶⁷.



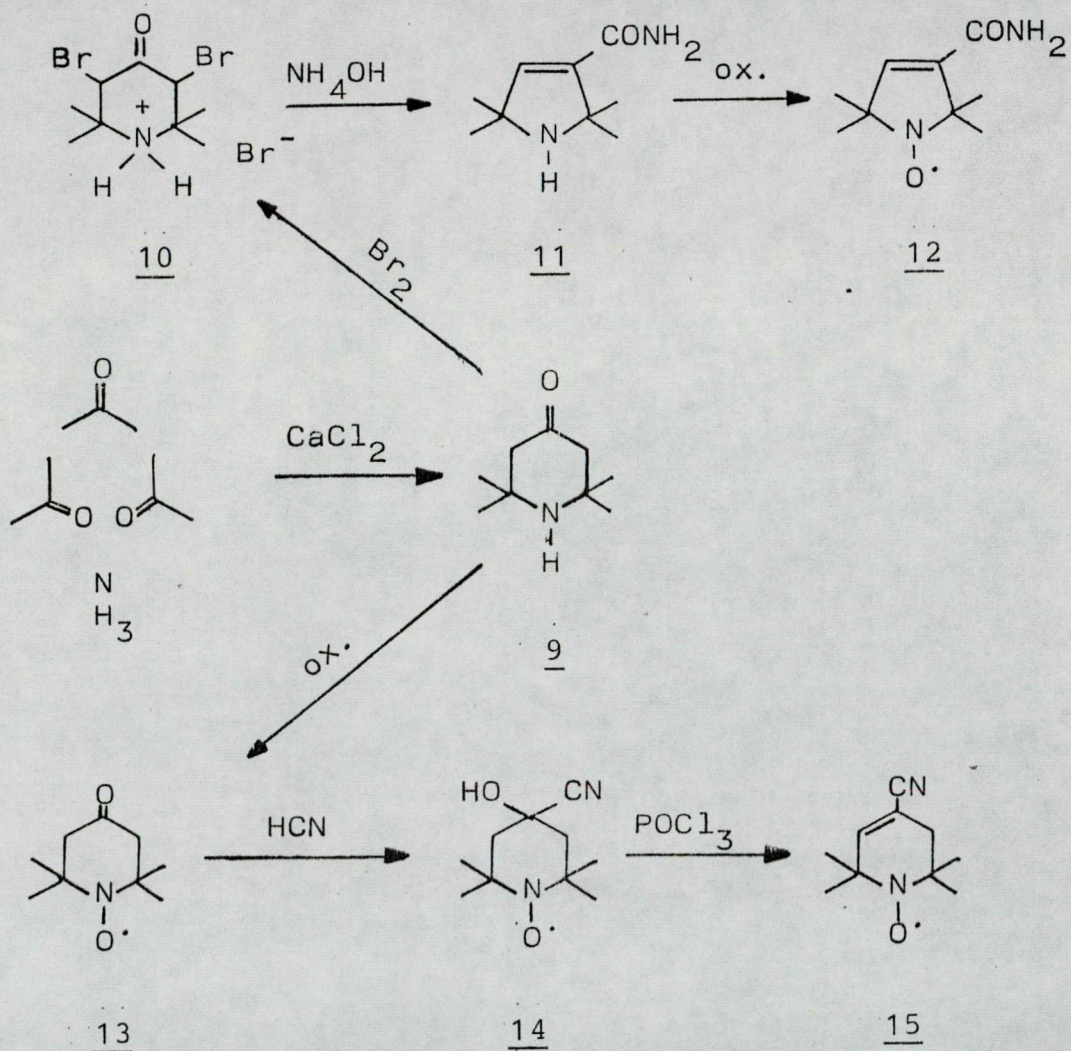
^xRészletesen ld. 64, 65, 66 irodalmi hivatkozásokat.

Az ábra a TEMPO ESR spektrumát mutatja patkány vagus ideg membránjában. A B jel az idegmembránt körülvevő vizes oldatban /Ringer-oldat/ feloldott TEMPO-tól származik, az A jelet a hidrofób környezetben oldott TEMPO-nak tulajdonítják a szerzők. A vizsgálatból azt a következtetést vonták le, hogy a membrán folyékony, hidrofób régiókat tartalmaz, amelyek valószínűleg a kettős-rétegű foszfolipid membrán lipid alkotórészei.

4. ÚJ TIPUSU NITROXID SPINJELŐLŐK SZINTÉZISE

4.1. Nitroxid alapvázak szintézise

Munkám során pirrolin- és tetrahidropiridinvázas nitroxidszármazékokkal dolgoztam. Ezen alapvázak előállítását mutatja be a 23. ábra:



23. ábra

4.1.1. Pirrolingyűrűs nitroxidok

A szintézis kiindulási vegyülete a 2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-on /triacetonamin/ /9/, amelynek ammóniából és foronból, ill. acetontól kiinduló szintézise régóta ismert⁶⁸⁻⁷⁰. *

A 9 brómozásával nyert 3,5-dibrómszármazékot /10/ ammónium-hidroxiddal reagáltatva, Favorszki-típusú gyűrűszűkülési reakcióban, 2,2,5,5-tetrametil-pirrolin-3-karboxamid /11/ képződik⁷². E vegyület metanolos oldatban Selecton B₂/etilén-diamin-tetraecetsav dinátrium só/ és nátrium-wolframát katalizátorok jelenlétében, 30%-os hidrogén-peroxiddal 1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolin-3-karboxamiddá¹¹ /12/ oxidálható.

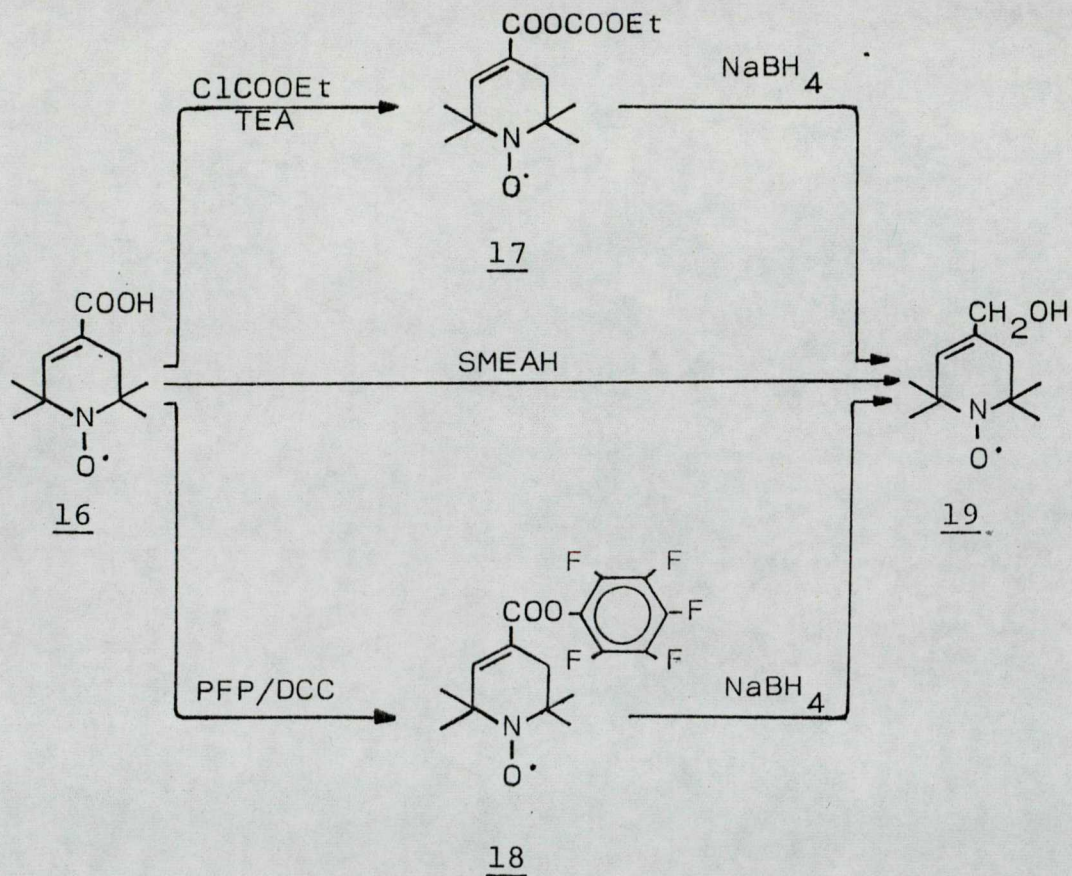
4.1.2. Tetrahidropiridingyűrűs nitroxidok

Triacetonaminból oxidációval, az előbbi katalizátorok alkalmazásával nyerhető az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-on¹¹ /13/. Kanadai kutatók a 13 cianohidrin-származékán /14/ keresztül, a hidroxilcsoport eliminációjával állították elő az 1-oxil-4-ciano-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridint⁷³ /15/.

* A Sosnovsky és mtsai által leírt módon⁷¹ a termelés 40 %-ra növelhető és az el nem reagált acetont vissza nyerhető /ami nagy mennyiséget figyelembe véve nem elhanyagolható/.

4.2. Spinjelölésre alkalmas tetrahidropiridinváz- zas-származékok szintézise

Az allil típusú alkoholok és halogenidek reakcióképesebbek, mint telített analógjaik⁷⁴. Így alkalmasabbnak mutatkoztak a spinjelölők szintézisében, mivel a biomolekulákkal enyhébb körülmények között lépnek reakcióba. A szintézisek kiindulási anyagaként a Wong és mtsai⁷³ által előállított 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-karbonsav /16/ szolgált. /24. ábra/:



24. ábra

A karboxilcsoportot klór-hangyasav-etilészterrel acilezve nyertük a 17 vegyes anhidrid észtert.

A módszert 1-oxil-2,2,5,5-tetrametil-3-pirrolin-3-karbonsavra Griffith és mtsai írták le⁷⁵.^x

A 16 karbonsavat diciklohexil-karbodiimides /DCC/ kapcsolással pentafluór-fenollal /PFP/ reagáltatva állítottuk elő az aktiv észter származékát /18/.

Mindkét aktiv savszármazék /17, 18/ felhasználható aminoszerek /N-terminálisok, lizin ε-aminocsoportja⁷⁵/ acilezésére.

A 17 és 18 nátrium-bór-hidriddel a 19 allil-alkohollá redukálható. Az alkalmazott reakciókörülmények között a gyűrűben lévő kettős kötés változatlan maradt.

A 19 egyszerűben egy lépésben is előállítható, 16-ból nátrium-dihidro-bis-/2-metoxi-etoxi/-aluminátos /SMEA, Red-Al/ redukcióval.

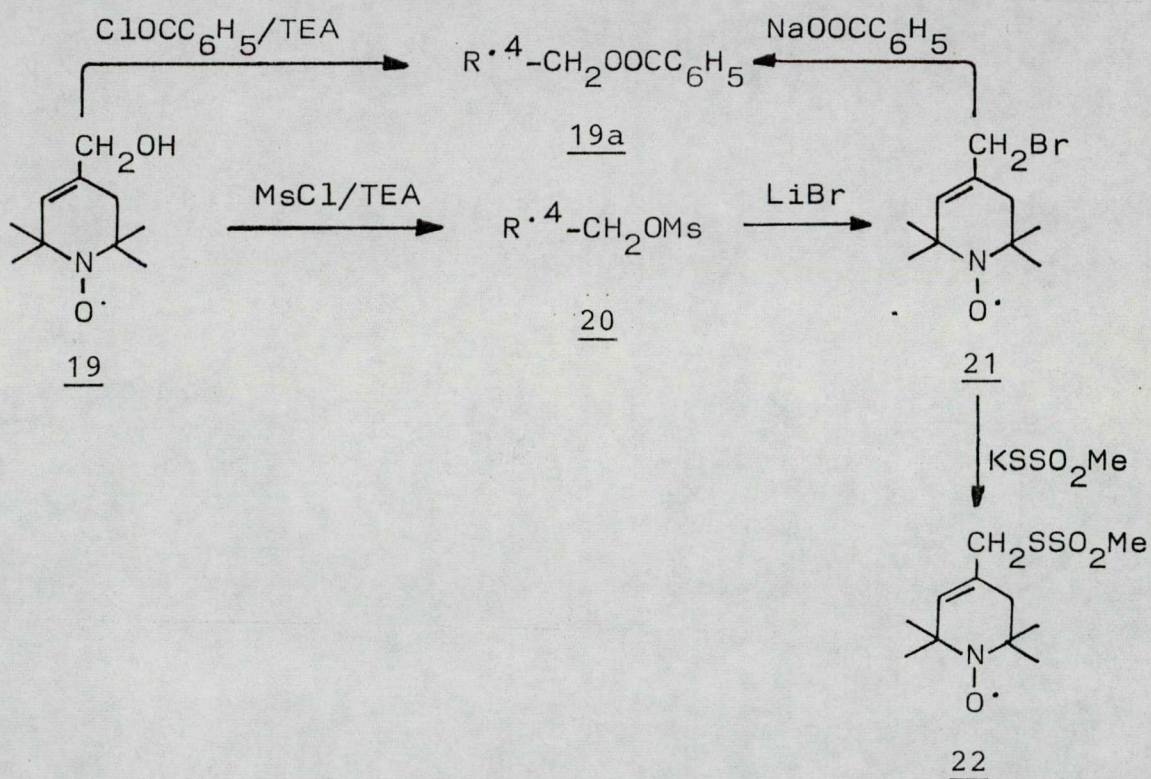
Igy eljutottunk további szintéziseink kulcsvegyületéhez.

Kenyon összefoglaló munkájából⁷⁶ ismert, hogy az alkil-alkán-tioszulfonátok /R-S-SO₂-R'/ szelektív tiol reagensek. A cisztein SH-csoportokkal enyhe körülmények

^x A reakcióban nem alkalmaztak savmegkötőszert, így a termelés 50%-os volt. Laboratóriumunkban azt tapasztalták⁵⁹, hogy trietil-amin használva a termelés javítható /kb. 80%-ra/.

között, a fehérje tönkremenetele nélkül, gyorsan, kvantitatíven, a reagens nagy feleslege nélkül reagálnak. A csoport kvantitatíven lehasítható tiolok /pl. β -merkapto-etanol/ hozzáadásával.

A nitroxid analóg előállítását - a laboratóriumi munkban kidolgozott módszerek⁴⁶ felhasználásával a következő módon valósítottuk meg /25. ábra/:



25. ábra

Első lépésben a metánszulfonát /mezilát/ származékot /20/ állítottuk elő Crossland és mtsai módszerével⁷⁷, melynek lényege, hogy az alkoholt trietil-amin jelenlétében reagáltatjuk a metánszulfonil-kloriddal. A mezil-kloridból - HCl E₂ eliminációjával - keletkező rendkívül reakcióképes szulfénre addicionál az alkohol.

A módszer előnye, hogy a termelés 90% fölötti, gyors, és alkalmas reakcióképes /érzékeny/ szulfonátok előállítására.

A 20 mezilát származékból nyerhető a hidrolízisre kevésbé érzékeny nitroxid allil-bromid származék /21/, amely emiatt jobban használható alkilezőszerként /ld. 5. fejezet/.

A 19 allil-alkoholból benzoil-kloriddal, ill. a 21 allil-bromidból nátrium benzoáttal végzett reakcióval ugyanazt a kromatográfiásan egységes, azonos infraspektrumú, azonos elemvizisű terméket /19a/ nyertük. Így feltételezhetjük, hogy 21 keletkezésekor nem történt allil-átrendezés. Az allil rendszer α -szénatomja a nukleofil ágensek számára kedvezőbb, mivel a γ -helyzetű szénatomon való támadást a metilcsoportok nagymértékben gátolják.

A 21 vegyületet kálium-metántioszulfonáttal reagáltatva kaptuk az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-metil-metántioszulfonátot /22/.

A pirrolinvázas nitroxidszármazékot papain aktiv helyének jelölésére használták⁷⁸. A tapasztalatok szerint a ciszteinil-oldallánc és a nitroxid között létrejött diszulfid kötés gyorsan és teljesen elhasítható kis

^x De Wolfe, R.H. and Young, W.G., Allylic reactions, in "The chemistry of functional groups, The chemistry of alkenes", /Patai, S. ed./ J. Wiley and Sons, London /1972/, 10. fejezet, 681. oldal

koncentrációju ditiotreitollal. A felszabaduló nitroxid koncentrációja arányos az enzimben lévő reakcióképes tiol csoportok számával. A spinjelölő eltávolításakor a teljes enzimaktivitás visszaáll. Így a vegyület érzékeny, és szelektív tiol titráló reagensként használható.

5. BIOLÓGIAILAG FONTOS MOLEKULÁK SPINJELŐLÉSE, PARAMÁGNESES ANALÓGOK ELŐÁLLÍTÁSA

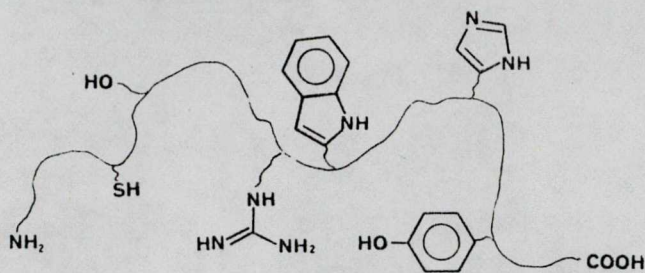
A megfelelően megválasztott nitroxidszármazékokkal igen eltérő típusu biomolekulák spinjelölése valósítható meg. Lehetőség van arra is, hogy a molekula diamágneses részét a szintézis során megfelelően kialakítva, fiziológiás hatásu anyagok paramágneses analógjait nyerjük.

A következőkben paramágneses α -aminosavszármazék, spinjelölt barbitursav- és morfinszármazékok, ill. glicerinszerű nitroxidszármazék előállításáról számolunk be.

5.1. Nitroxidcsoportot oldalláncként tartalmazó α -aminosav előállítása

Az α -aminosavak, ill. peptidek, fehérjék spinjelölésére három lehetőség kínálkozik: az α -amino- és α -karboxil-csoporton, illetve - ha ilyen van - az oldallánc funkciós csoportján.

Az oldallánc jelölése előtérbe kerül, ha az amino- és karboxil-végcsoportok a biológiai funkció szempontjából fontosak. A polipeptid láncban a reakcióképes csoportokat az aminosavak hordozzák /26. ábra/.



26. ábra

Ezek a következők:

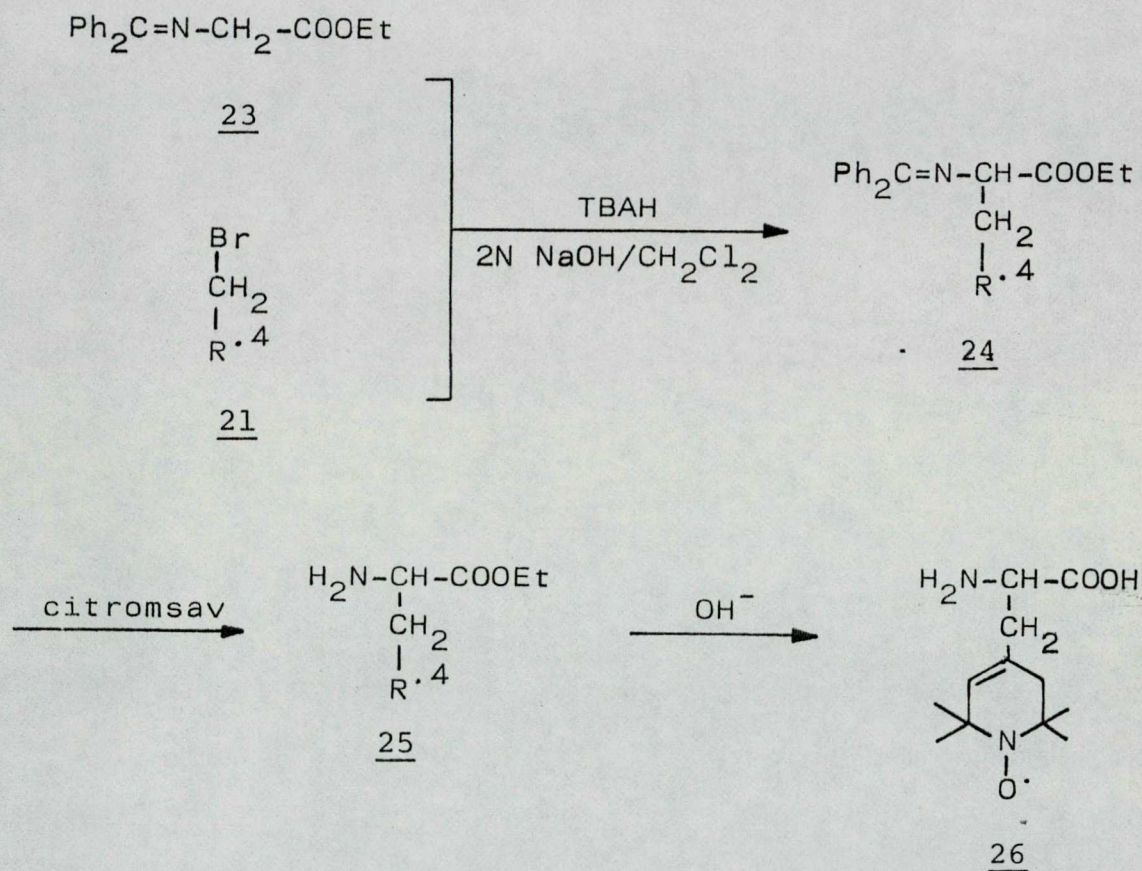
- a lizin ϵ -aminocsoportja,
- a cisztein SH-csoportja,
- az arginin guanidincsoportja,
- a tirozin, a szerin, a treonin hidroxilcsoportja,
- a hisztidin imidazolgyűrűje,
- a triptofán indolgyűrűjének NH-csoportja.

A jelölés pontos helye az aminosav szekvenciában elég fáradságos módon határozható meg, pl. triptikus fragmentációval és aminosavanalízissel.

Ha azonban olyan spinjelölt aminosavakat állítunk elő, amelyek nem jelölt társaikhoz hasonló térkitöltésű, de paramágneses oldalláncot tartalmaznak, a jelölés tervezhető. A spinjelölt aminosav várhatóan kis mértékben változtatja meg a molekula szerkezetét, biológiai aktivitását.

A spinjelölt aminosavak továbbépíthetők olyan biológiailag aktív peptidekké, amelyekben csak a kívánt aminosav hordoz paramágneses csoportot.

A következőkben ilyen α -aminosav szintéziséről /27. ábra/ a módszert korábban laboratóriumunkban dolgozták ki/ és dipeptiddé való kapcsolásáról számolunk be.



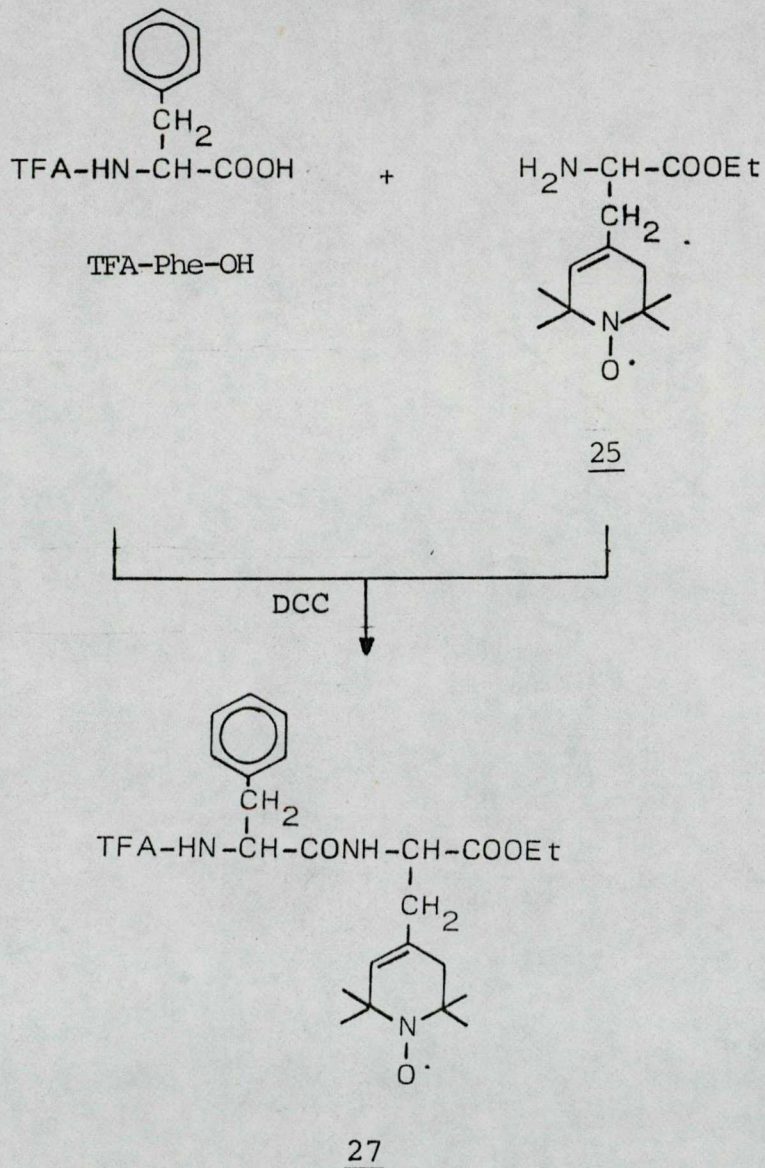
27. ábra

A 21-gyel jól alkilezhető az O'Donnell és mtsai munkája⁸⁰ alapján elkészített Schiff-bázis /23/. Az alkilezést kétfázisú rendszerben végeztük, fázistranszfer katalizátorként tetra-butil-ammónium-hidrogénszulfátot /TBAH/ használ-



tunk. A metilénecsoponton alkilezett Schiff-bázis /24/ citromsavas hidrolizisével jutottunk a nitroxid paramágneses spinjelölőt oldalláncként tartalmazó DL- α -aminosav etilészteréhez /25/. Az észtercsoport $\text{Ba}(\text{OH})_2$ - dal végzett hidrolizisével a spinjelölt D,L- α -aminosavat /26/ nyertük.

A peptidké kapcsolás lehetőségét a következő példán mutatjuk be / 28. ábra/:



28. ábra

A nitroxid α -aminosav-etilészter /25/ primer aminocsoportját acileztük aminocsoportján védett L-fenilalaninnal /TFA-Phe-OH/. Az L-fenilalanin aminocsoportját előzőleg trifluór-acileztük Weygand módszerével⁸¹ trifluór-ecetsavban, trifluór-ecetsav-anhidriddel.

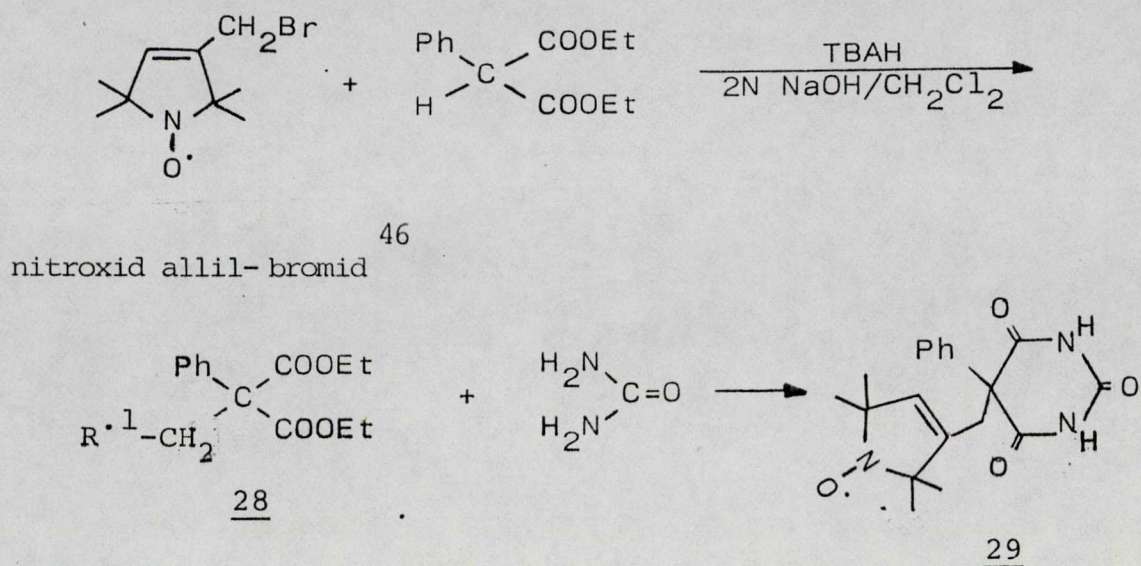
A védett aminosavat /TFA-Phe-OH/ kapcsoltuk - diklohexil-karbodiimidet /DCC/ használva - a spinjelölőhöz /25/ , és így nyertük a 27 dipeptidet.^x Az alkalmazott reakciókörülmények között diketo-piperazin típusu termék keletkezését is tapasztaltuk.

A trifluór-acetil védőcsoport enyhe körülmények között - luggal - lehasítható, így eltávolítása a paramágneses jelleg megszűnésének veszélye nélkül valósítható meg és a spinjelölt dipeptidhez további aminosavak kapcsolhatók.

^x A diasztereomerek szétválasztása folyamatban van.

5.2. Spinjelölt barbitursavszármazék szintézise

Célul tűztük ki spinjelölt barbitursavszármazék előállítását /29. ábra/:



29. ábra

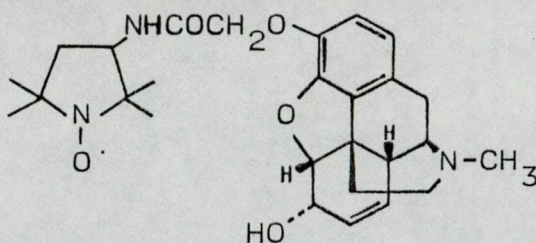
A kereskedelemben is elérhető fenil-malonsav-dietil-észtert a nitroxid allil-bromiddal⁴⁶ reagáltattuk fázistranszfer katalizátor /TBAH/ jelenlétében.

A malonészterek fázistranszfer körülmények közötti alkilezése lényegében már 1954 óta ismert, mikor Babayan és mtsai etil-malonátot alkileztek szubsztituált alkil-kloridokkal kvaterner ammónium-só /NR₄X/ és 40 %-os vizes KOH jelenlétében⁸².

A karbamidos gyűrűzárási reakcióra a barbiturátok körében számos bevált eljárás ismeretes. Mi az N-metil karbamid és fenil-malonsav-dietil-észter közötti reakcióra leírt körülményeket /vizmentes alkoholban nátrium-etoxiddal főzve a két reakciópartnert⁸³/ alkalmaztuk.

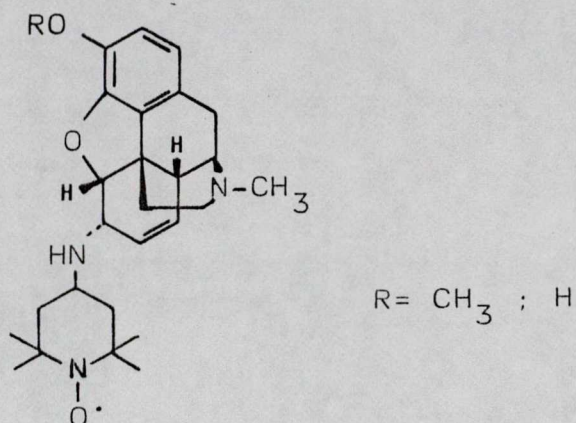
5.3. Spinjelölt morfinszármazékok szintézise

Montgomery és Holtzman pirrolidingyűrűs nitroxid jó-d-acetil-amido vegyülettel alkilezték a morfinfenolos hidroxilcsoportját és vizsgálták a vegyület /30. ábra/ plazmához való kötődését⁸⁴.



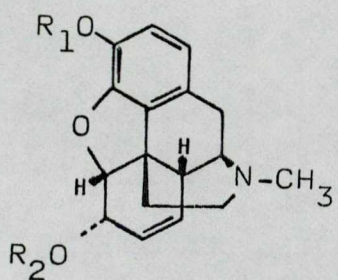
30. ábra

Ugyanezt a vegyületet Leute és mtsai spin immunoassay vizsgálatokra⁸⁵, Copeland és munkatársai opiát receptorok vizsgálatára használták^{86,87}. Cella és Kelley morfint /R = CH₃/ és kodeint /R = H/ jelölték a 6-os helyzetű OH-csoport aminoalkil-nitroxidcsoportra /-NH-R³/ való cseréjével⁸⁸. A jelölt származékok /31. ábra/ kötődését vizsgálták agy homogenizátum receptoraihoz.

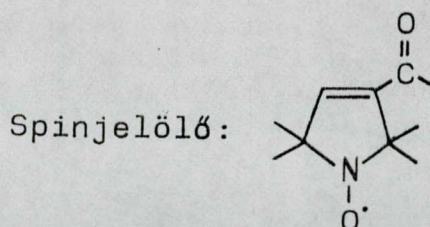


31. ábra

Wu és munkatársai nitroxid savkloriddal acilezték a kodein 3-as helyzetű hidroxilcsoportját. Elkészítették a morfin 3-as és 6-os mono- ill. di-acilezett származékait is /32. ábra/ és vizsgálták izolált szinaptikus membránhoz való kötődésüket⁸⁹.

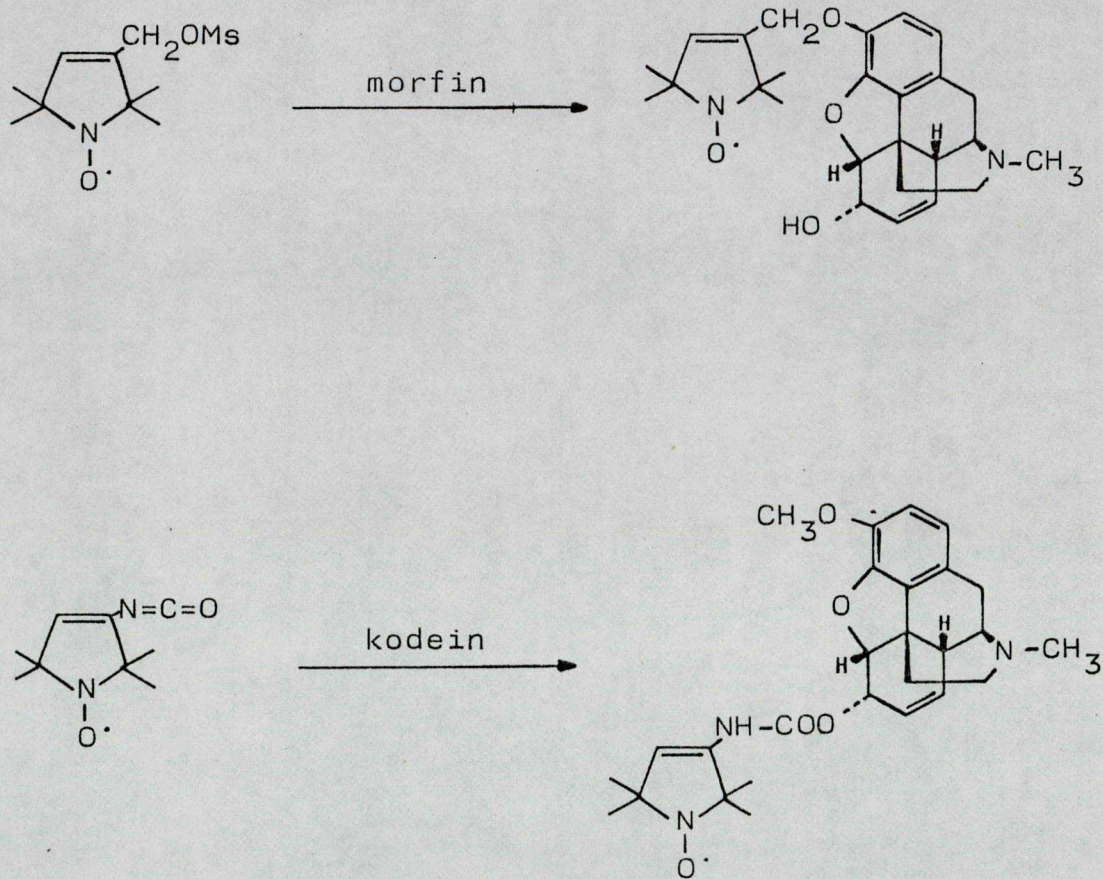


R ₁	R ₂
spinjelölő	H
spinjelölő	spinjelölő
H	spinjelölő
CH ₃	spinjelölő



32. ábra

Laboratóriumunkban korábban a pirrolingyűrűs nitroxid metánszulfonáttal⁴⁶ és izocianáttal^x jelölték morfint ill. kodeint /33. ábra/.



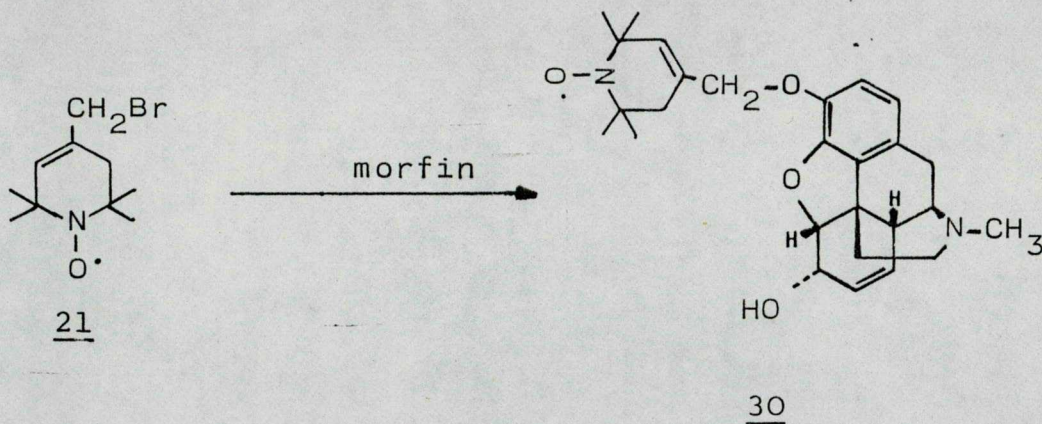
33. ábra

^xCatalog of nitroxide spin labels, REANAL, HO-202

Ilyen előzmények után újabb származékok előállítását végeztük el. Közismert, hogy a morfin molekula hatás-szerkezet összefüggéseinek eddigi eredményei alapján a molekula három fő funkcióscsoportját tartják a hatás hordozójának, ezek nevezetesen:

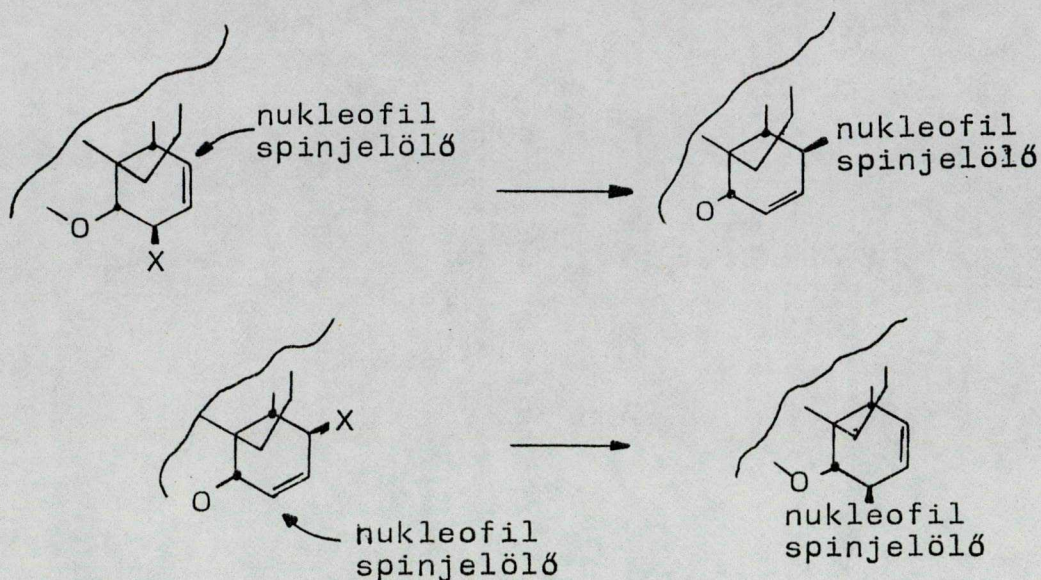
- a / a fenolos hidroxilcsoport
- b / az allil-alkoholt hordozó molekularész
- c / a piperidingyűrű N-szubsztituense

ad a/ a morfint fenolos hidroxilcsoportján lúgos közegben szelektíven éteresítettük 21-gyel /34. ábra/:



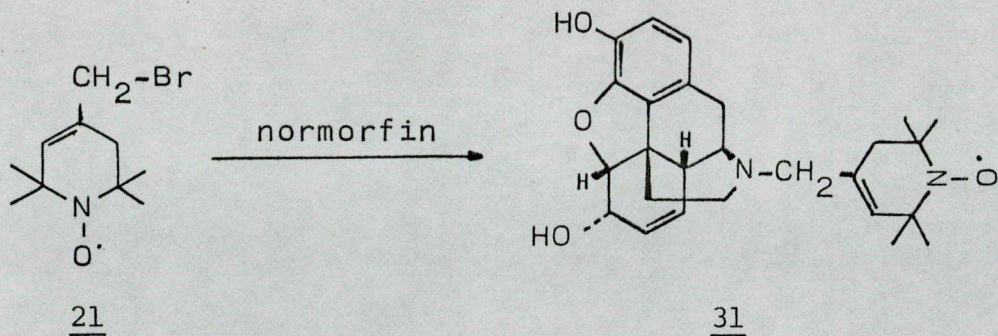
34. ábra

ad b/ Cella és mtsai nemrég megállapították, hogy a morfin allil-hidroxil-csoportját halogénatomra, majd aminocsoportra cserélve a spinjelölt vegyület lényegében elveszti a biológiai hatását - emellett részben allil átrendeződés is lejátszódik⁸⁸ /35. ábra/. Ezért a 6-os helyzet módosításával nem foglalkoztunk.



35. ábra

ad c/ A normorfin molekula N-alkilezését Green módszerének⁹⁰ alkalmazásával végeztük 21-gyel dimetil-formamidos közegben. Így spinjelölt morfin antagonistá nalogot /31/ kívántunk nyerni /36. ábra/:



36. ábra

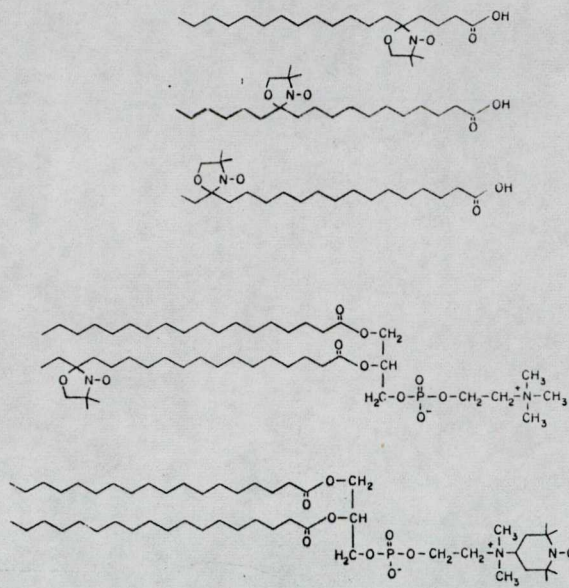
A vegyületek szerkezetét spektroszkópiai módszerekkel /IR, ESR, tömeg/ valószínűsítettük. Érdekes és szerencsés módon a 30 és 31 típusu vegyületek biokémiai teszten a nem jelölt molekulákkal lényegében azonos nagyságrendű biológiai aktivitást mutattak^x.

5.4. Glicerín-szerű paramágneses vegyületek szintézise

Apoláros láncukon spinjelölt zsírsavak és lipidek előállítására számos szintézis-módszert írtak le^{2,15,36,91-94}. Ezek fontossága kétségtelenül beigazolódott. Sőt újabb, az eddigieknél kisebb perturbációt okozó, ill. nagyobb stabilitást mutató származékok szintézise is igen jelentősnek ígérkezik^{xx}. A foszfolipidek poláros fejcsoportján történő jelölésekre olyan példák ismertek, amikor kolaminon, vagy a kolin aminocsoportján végezték a jelölést³³ /37. ábra/.

^x A vizsgálatokat dr. Borsodi Anna /MTA, SzBK Biokémiai Intézete/ végezte.

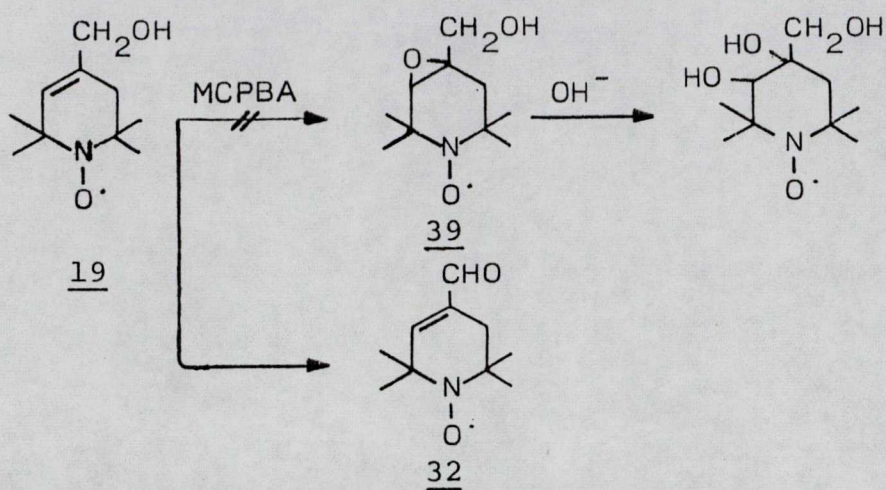
^{xx} Laboratóriumunkkal több biofizikus működik együtt /pl. Dr. Marsh, Max-Planck-Institute, Göttingen/ a témában. A szintetikus munka dr. Lex László tud. mts. kandidátusi értekezésének egyik része.



37. ábra

Mi három értékű - glicerinre emlékeztető - nitroxid alkoholok előállítását tüztük ki célul azért, hogy a későbbiekben lehetőséget keressünk olyan lipidek előállítására, amelyek a glicerin helyén hordozzák a paramágneses csoportot.

Ehhez előbb az allil-alkohol /19/ epoxialkohollá /39/ való oxidációját végeztük el m-klór-peroxi-benzoesavval /MCPBA/ /38. ábra/:



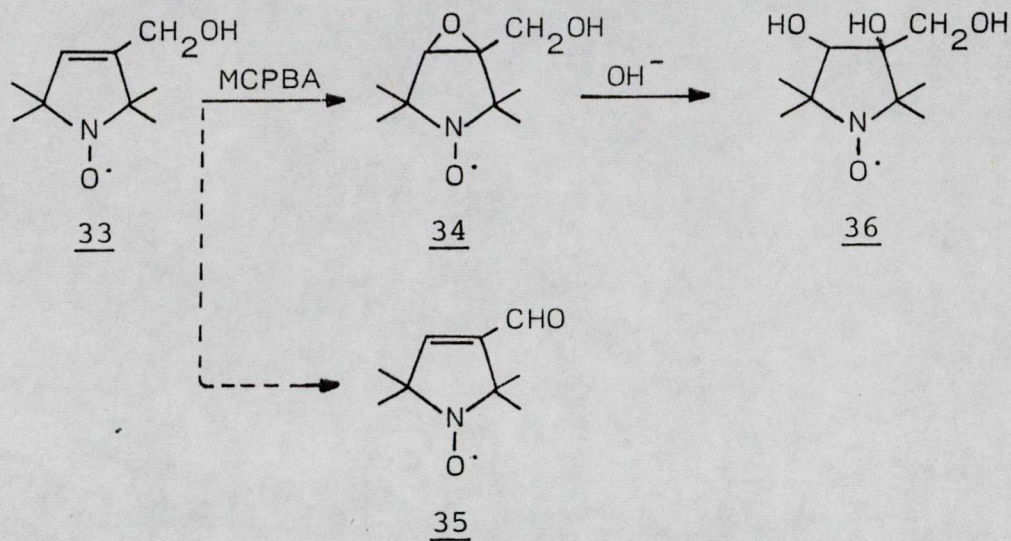
38. ábra

Erre számos példát találunk az irodalomban^{95,96}.

A várt termék /39/ helyett azonban az α, β -teli-
tetlen aldehid /32/ keletkezett^x, ezért kerülő utat
kellett választanunk. Mielőtt azonban ezen elindul-
tunk volna, a megfelelő, már korábban leirt 2-hidroxi-
-metil-pirrolinra /33/ is kiterjesztettük vizsgálá-
tinkat^{xx} /39. ábra/:

^xA reakció előrehaladását vékonyréteg kromatográfiával
követtük, a várt termékből nyomnyi mennyiség keletke-
zését tapasztaltuk.

^{xx}Gyakorlati okok is vezettek bennünket: ugyanis koráb-
bi munkáink eredményeként a pirrolinvázis nitroxid-
-allil-alkohol /33/ nagyobb mennyiségben állt rendelkezésünkre.



39. ábra

Ugy találtuk, hogy a 6-tagu gyűrűs vegyülettől /19/ eltérően itt az epoxialkohol /34/ a reakció főterméke, bár melléktermékként aldehid /35/ itt is keletkezik^x.

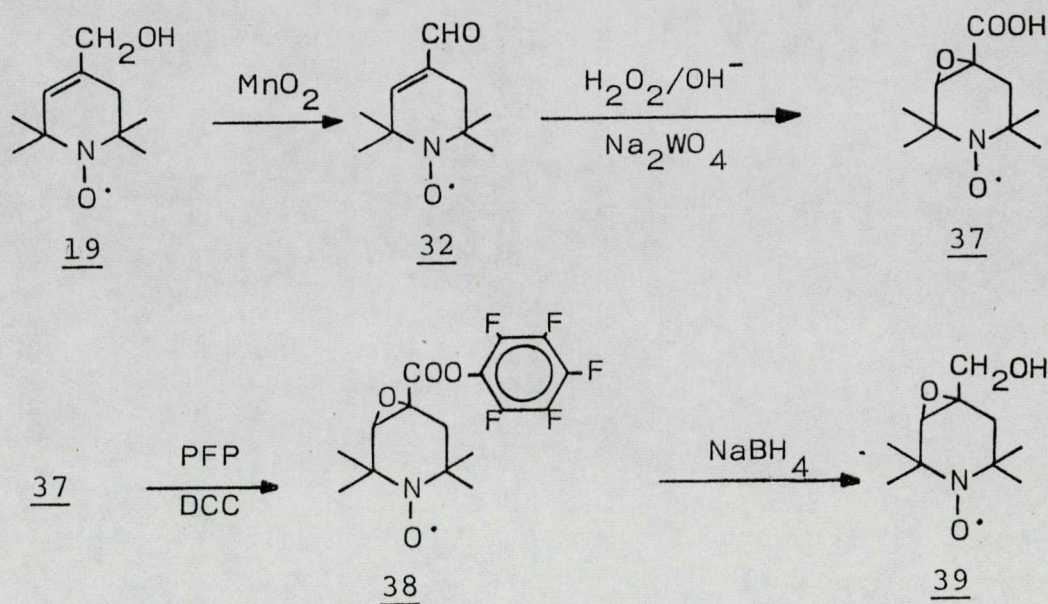
Az epoxidgyűrű felnyitására is számos módszer ismert^{95,96}. A mi esetünkben, mivel a gyűrűvel anellált epoxidgyűrű felnyitása elég erélyes körülményeket igényelt /feltehetően a nagy térigényű metilcsoportok közelsége is okozza ezt/, a gyűrűfelnyitást 85 % DMSO-viz, 0,3 N KOH oldatban való főzéssel tudtuk csak elvégezni⁹⁷. A gyűrűfelnyitást 0,3 N KOH oldatban való főzéssel végezve a termelés nem változott.^{xx}

^x A MCPBA oxidációban keletkezett aldehidek szerkezete azonos volt a megfelelő alkoholok /19, 33/ aktiv MnO_2 -os oxidációjával nyert aldehidekével /32, 35/.

^{xx} A reakcióban elvileg több sztereoizomer keletkezése várható. Vékonyréteg kromatográfiásan csak egy izomer képződését tapasztaltuk. Ennek szerkezetvizsgálata további kísérleteket igényel.

Mindkét esetben kromatográfiásan egységes, glicerinszerű, paramágneses, háromértékű alkoholhoz /36/ jutottunk.

Az eredeti célvegyületet az alábbi uton nyertük /40. ábra/:



40. ábra

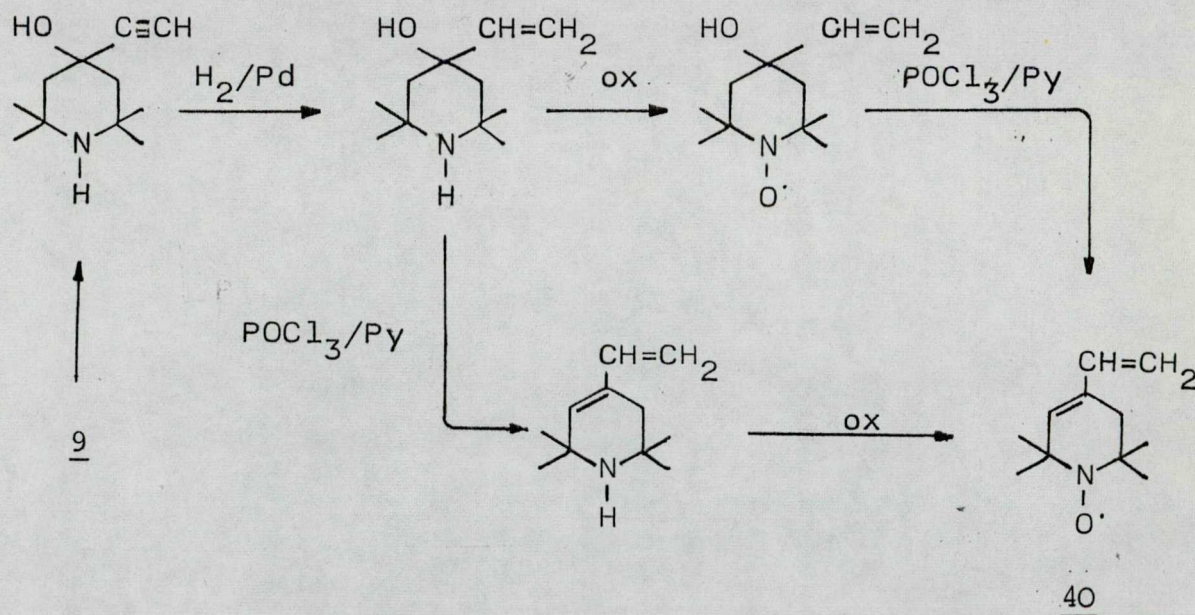
A 19ből Attenburrow-féle aktív MnO_2 -os oxidációval⁹⁸ nyert, α, β -telítetlen aldehidet /32/ epoxisavvá /37/ alakítottuk, lugos H_2O_2 és Na_2WO_4 katalizátor segítségével. Majd előállítottuk 37 aktív észter származékát /38/, melynek NaBH_4 -del végzett redukciója szolgáltatta az epoxialkoholt /39/.

Az epoxidgyűrű felnyitása elvben itt is ugyanugy elvégezhető, mint 34 esetében, azonban a korábbi biológiai vizsgálatok tapasztalatai szerint a 36 alkalmasabb a spinjelölt lipidszármazékok előállítására.

6. PARAMÁGNESES KONJUGÁLT DIÉNEK SZINTÉZISE ÉS
NÉHÁNY REAKCIÓJA

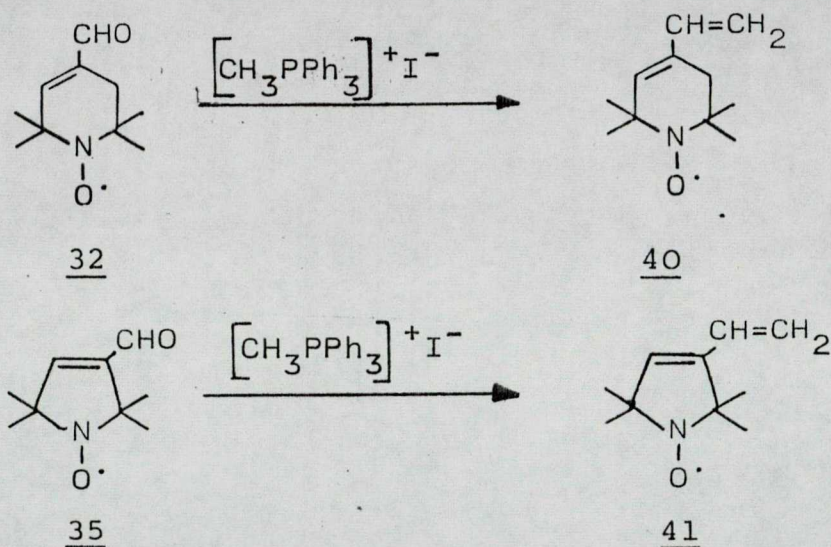
A spinjelölt 1,3-diének előállítására több szempontból is érdeklődésre tarthat számot. Így pl. belőlük számos új reagens állítható elő, diencfilekkel végzett 1,3-dipoláris cikloaddícióval. A polimerizációs folyamatok tanulmányozásához hasznos spinjelölő lehet a dién maga is.

A tetrahidropiridinek körében Shapiro és mtsai 1979-ben irtak le nitroxid konjugált dién szintézist⁹⁹
/41. ábra/:



A reakció előnye abban áll, hogy az olcsó triacetonaminból /9/ indul ki. Az öttagú gyűrűs vegyületből is célszerűnek látszott ezt a dién típust előállítani. Ebben az esetben a kiindulási diaqmáneses keton

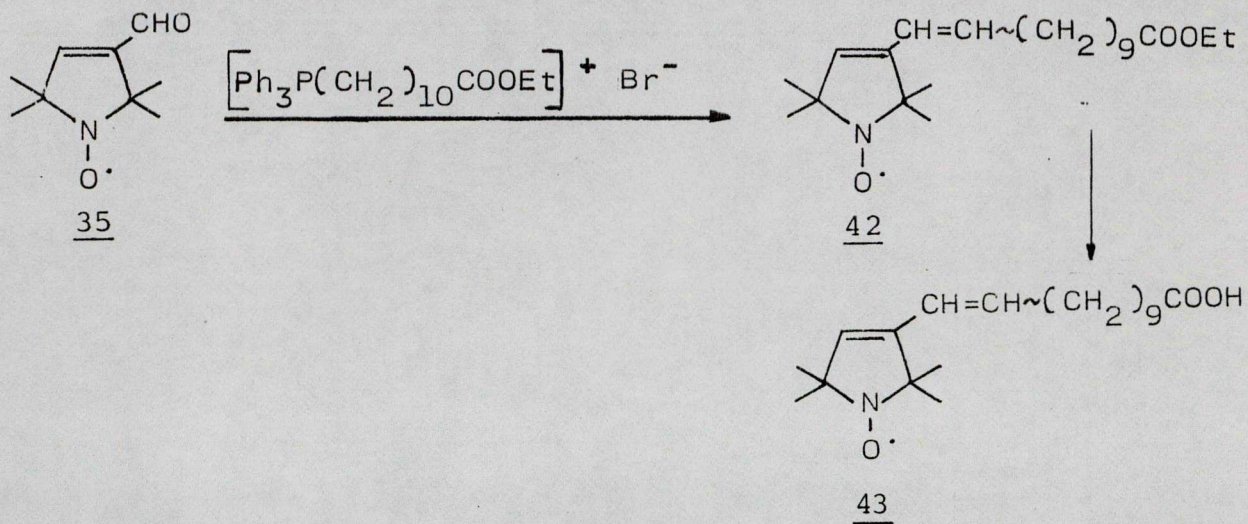
nem ilyen egyszerűen hozzáférhető. Ezért paramágneses telítetlen aldehideket és trifenil-metil-foszfónium sőt használtunk kiindulási anyagokként. A reakcióelegyben - a LeBigot által leirt¹⁰⁰ fázis-transzfer reakció körülmények között - képződött foszforán az aldehidekkel /32, 35/ diénné alakul. A termékek /40, 41/ kromatográfiás tisztítás után mintegy 60 %-os termeléssel nyerhetők /42. ábra/:



42. ábra

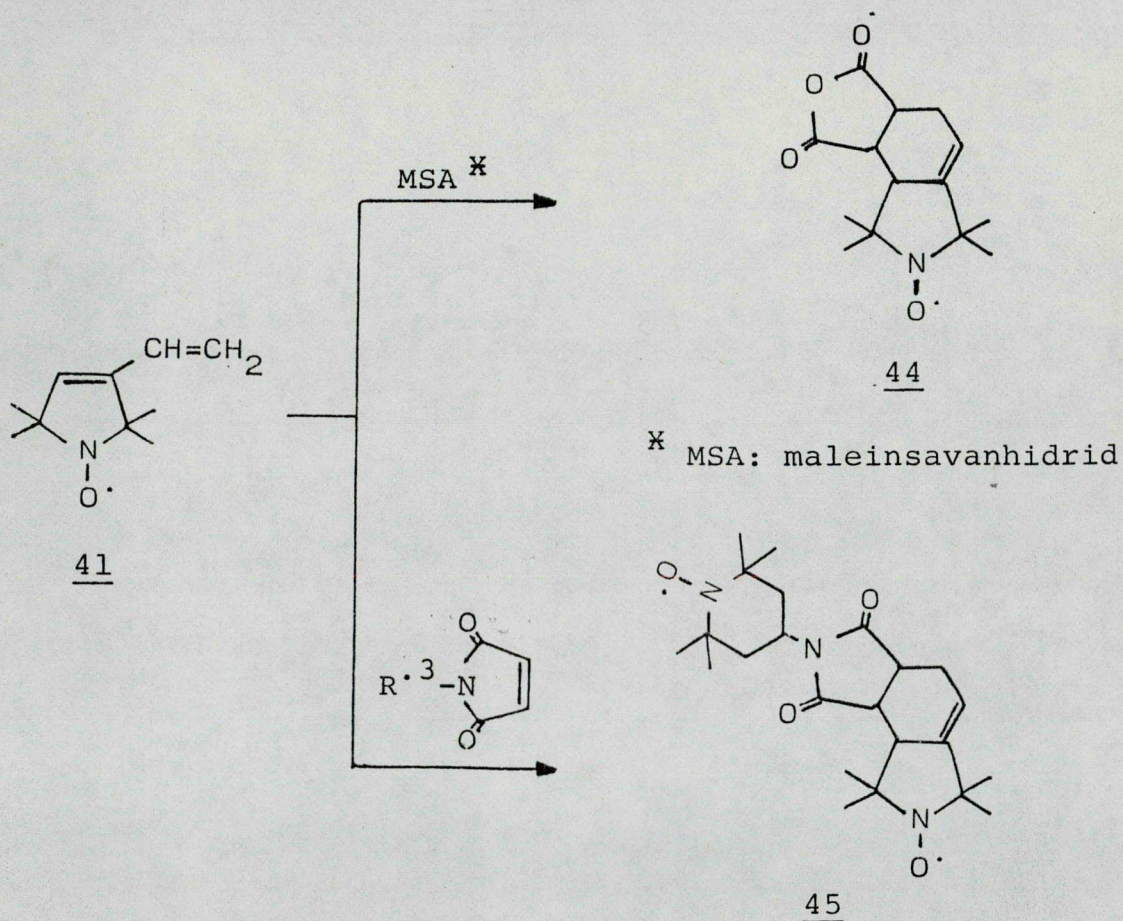
Ennek a reakciónak az az előnye, hogy más diének szintézisére is alkalmas. Így pl. olyan spinjelölt hosszuláncu karbonsav-észtert /42/ állítottunk elő, amelyben a funkciós csoport nincs konjugációban az olefinkötésekkel /43. ábra/:





43. ábra

A pirrolin típusú dién /41/ reakciókészségét dienofilekkel vizsgáltuk /44. ábra/:



44. ábra

A Diels-Alder reakciókban általánosan alkalmazott maleinsav-anhidriddel a megfelelő triciklusos termékhez /44/ jutottunk. Spinjelölt maleimiddel reagáltatva a diént nitroxid biradikál származékot /45/ nyertünk. A vegyület ESR spektruma a két paramágneses centrum közötti erős spin-spin kölcsönhatás miatt jellegzetes szimmetrikus ötvonalas, 1:2:3:2:1 intenzitásarányu volt.

Mindkét esetben a más konjugált diénekre is jellemző reakció játszódott le. A 44 származékból a gyűrű felnyitása után bifunkciós, keresztkötések kialakítására alkalmas /cross linking/ reagens alakítható ki.

6.1. A nitroxid konjugált diének polimerkémiail alkalmazása; a paramágneses jelleg átmeneti megszüntetése

A nitroxid spinjelölőket a 60-as évek közepe óta használják a polimerkémiában¹⁰¹. A spinjelölt polimerek ESR spektrumából - elsősorban - a makromolekulák mozgására, valamint a polimerizáció mechanizmusára vonatkozó információk nyerhetők.

A paramágneses csoportot is tartalmazó polimerek kialakítására a következő lehetőségek adódnak¹⁰²:

1. a kopolimerizációhoz kis mennyiségű spinjelölt monomert használunk,

2. kis mennyiségben olyan speciális komonomert használunk, amely a polimerizáció után nitroxiddá alakítható,
3. a preformált polimert jelöljük,
4. a polimerizációt nitroxid vegyülettel vagy prekursorával indítjuk, vagy fejezzük be.

Az eddig alkalmazott nitroxid jelölőmolekulák valamely funkcióscsoportjuk /pl. karboxil/ reakciókészsége révén voltak felhasználhatók, és velük /a 2. módszer kivételével/ csak ionos mechanizmusú folyamatokat tanulmányozhattak, mivel a nitroxidok inhibitorai a gyökös mechanizmusú polimerizációknak¹⁰².

A 41 dién alkalmas komonomernek tűnt, hiszen az 1,3-diének polimerkéimiai felhasználása jól ismert¹⁰³:



Változatlanul meg kellett oldani a szabad gyökös jelleg átmeneti megszüntetését.

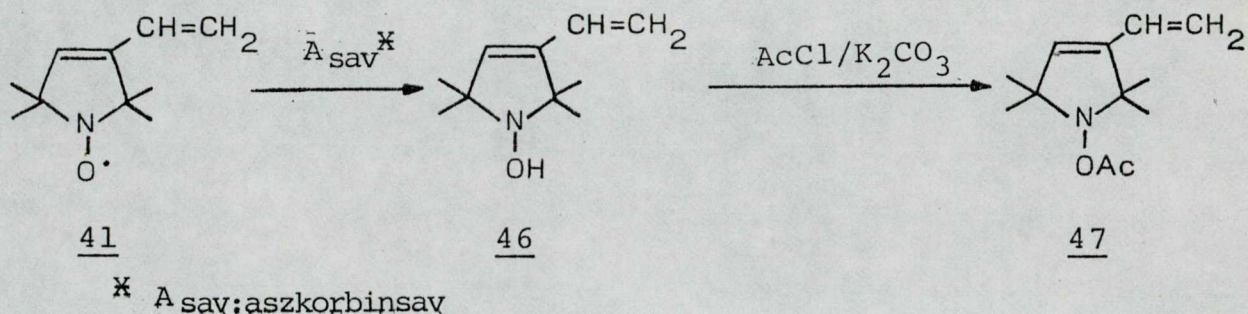
Lee és mtsai a nitroxidcsoportot 10% Pd/C-en végzett katalitikus hidrogénezéssel redukálták a megfelelő N-hidroxil vegyületté, amelyből acetil-kloriddal - TEA jelenlétében - nyerték az N-acetoxiszármazékot¹⁰⁴.

A módszer polimerek spinjelölésekor nem alkalmazható, mert a polimerhez kapcsolt nitroxid katalitikus hidrogénezésekor a makromolekula és a spinjelölő kettőskötései is telítődhetnek. A biológiai rendszerek érzékenysége sem teszi lehetővé a módszer alkalmazását.

Ugyanakkor ismert volt, hogy a nitroxidcsoport aszkorbinsav Na-sójával N-hidroxilvegyületté redukálható³³.

Az így előállított N-hidroxil vegyület azonban levegőn visszaoxidálódik a paramágneses nitroxiddá, tehát stabilizálni kell a diamágneses állapotot.

Ezért vizes metil-alkoholban aszkorbinsavval elvégeztük a redukciót, majd az N-hidroxil vegyületet /46/ azonnal N-acetoxiszármazékká /47/ alakítottuk /45. ábra/:



45. ábra

Ö S S Z E F O G L A L Á S

Dolgozatomban új paramágneses vegyületek szintéziséről számoltam be. Ezek közül az 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridin származékok a spinjelölők új típusát képviselik, amelyekkel biomolekulák megfelelő funkcióscsoportjai acilezhetőek és alkilezhetőek.

Közülük néhányat felhasználva, spinjelölt peptiddé továbbépíthető paramágneses csoportot oldalláncként hordozó α -aminosavat, spinjelölt barbitursav- és morfin-származékokat állítottunk elő.

A nitroxid típusú glicerín-szerű származék példáján egy biológiai szempontból fontos vegyület paramágneses analógjának előállítását kívántam bemutatni. A stabilis szabad gyökös konjugált diének paramágneses jellegének átmeneti megszüntetésével egy új polimer-kémiai alkalmazással sikerült bővíteni a nitroxidok felhasználásának körét.

K I S É R L E T I R É S Z

A termékek olvadáspontjait Boetius mikro-op meghatározó készüléken mértük meg és azokat nem korrigáltuk. Az infravörös-szinképeket paraffin olajos szuszpenzióban kloroformos oldatban és KBr pasztillában Carl-Zeiss Specord IR-71 készüléken vettük fel.

Az anyagok tisztaságát C, H, N, /S/ elemanalizissal, egységességét pedig vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltuk. A vékonyréteg kromatográfiához gyárilag készített szilikagép-réteg lapokat /Merck DC-Alufolien Kieselgel 60/ használtunk. Futtató oldószerként leggyakrabban kloroformot, kloroform-éter-, széntetraklorid-éter-, kloroform-metanol elegyét használtuk.

A preparatív rétegekromatográfiás elválasztásokat Kieselgel lapon /20x20 cm, 0,20 mm/ végeztük. Az oszlopkromatográfiás elválasztásokat Kieselgel 60-nal /0,2-0,5 mm; Reanal/ töltött oszlopokon végeztük.

A tömegspektroszkópiai vizsgálatok Varian-MAT-SM-1 berendezésen készültek.

A szabad gyök jelenlétét és koncentrációját Carl-Zeiss E-9 ESR spektrométerrel állapítottuk meg. A gyök-koncentrációkat 10^{-4} mol/l kloroformos oldathat határoztuk meg. A gyökök oldatban felvett szinképe a nitroxil monoradikálokra jellemző három, azonos intenzitású szimmetrikus jelet mutatott / a_N : 14,3-14,9 G/.



/Szénsav-1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetra-
hidropiridin-4-karbonsav/-anhidrid-etilészter /17/



A 16 karbonsav /1,98 g, 0,01 mol/ éteres /20 ml/ oldatához TEA-t /1,21 g, 0,012 mol/ adunk. Az elegyhez hűtés /0°C/ és kevertetés közben klór-hangyasav-etil-észter /1,30 g, 0,012 mol/ éteres /10 ml/ oldatát csepegtetjük. A kevertetést folytatjuk szobahőn 3 órán át. A kivált trietil-amin-hidrokloridot szűrjük, éterrel mosuk. A szűrletet vákuumban bepároljuk, majd kevés n-hexán hozzáadásával kristályosítva nyerjük a 17 vegyes anhidrid észtert.

Termelés: 2,43 g /90 %/

Op: 43-44°C

Analízis: C₁₃H₂₀NO₅ /270,31/

Számított: C 57,76; H 7,46; N 5,18.

Mért: 57,79; 6,80; 5,66.

I.R. /nujol/: ν COCO 1805, 1730 cm⁻¹

M⁺: 270

1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-
-4-karbonsav-pentafluor-fenol-észter /18/



A 16 karbonsav /0,594g, 0,003 mol/ és pentafluor-fenol /0,552g, 0,003 mol/ vizmentes etil-acetátos /10 ml/

0°C-ra hűtött oldatához kevertetés közben DCC /0,619g, 0,003 mol/ vízmentes etil-acetátos /3 ml/ oldatát adjuk. Hagyjuk szobahőre melegedni és 3 órán át kevertetjük. A kivált DCU-t szűrjük, a szűrletet mossuk 5 %-os NaHSO₄ oldattal, vízzel, majd a szerves fázist szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk. A terméket kloroform-éter elegyből kristályosítjuk.

Termelés: 0,82 g /75 %/
Op: 113-114°C
Analízis: C₁₆H₁₅F₅NO₃ /364,31/
Számított: C 52,75; H 4,15; N 3,85.
Mért: 52,40; 4,22; 3,80.
I.R. /nujol/: ν CO 1745 cm⁻¹

1-Oxil-4-hidroximetil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-
-tetrahidropiridin /19/
R⁴-CH₂OH

A módszer: Az aktív savszármazékot /17, 18/ /0,01 mol/ kevertetés közben etanolban /30 ml/ szuszpendált, 0°C-ra hűtött NaBH₄-hez /0,5 g/ adjuk. Szobahőn kevertetjük 1 órán át, majd szárazra pároljuk. A maradékhoz vizet /10 ml/ adunk, extraháljuk kloroformmal /30 ml/, a szerves fázist elválasztjuk és szárítjuk /Na₂SO₄/. A kloroformot vákuumban lepároljuk, majd

nagyvákuumban szárítjuk és a terméket éter-n-hexán elegyből kristályosítjuk.

Termelés: 1,6 g /87 %/
Op: 37-38°C
Analízis: C₁₀H₁₈NO₂ /184,26/
Számított: C 65,19; H 9,85; N 7,60.
Mért: 65,39; 9,70; 7,89.
I.R. /nujol/: ν OH 3100-3500 cm⁻¹

B módszer: a nitroxid karbonsav /16/ /4,950g, 0,025 mol/ vizmentes toluolos /300 ml/ szuszpenziójához hűtés és kevertetés közben csepegtetjük a SMEAH /13,75 ml, 70 %/ toluolos /45 ml/ oldatát. Visszacsepegtés közben forraljuk 2 órán át, majd a reakcióelegyet kevertetés és hűtés közben 5%-os NaOH oldathoz /125 ml/ csepegtetjük. A toluolos fázist elválasztjuk és szárítjuk /Na₂SO₄/, az oldószert vákuumban bepároljuk, majd nagyvákuumban szárítjuk, és a terméket éter-n-hexán elegyből kristályosítjuk.

Termelés: 2,73 g /59%/

A termék azonos az "A módszerrel" nyert 19 alkohollal.

1-Oxil-4-formil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-
-tetrahidropiridin /32/
R⁴-CHO

A telitetlen alkohol /19/ /1,84 g, 0,01 mol/
tetraklór-metános /30 ml/ oldatához aktiv MnO₂-ot
/18,4 g/ adunk és kevertetés közben visszacsepegés
mellett forraljuk, kb. fél órán át, amíg a vékonyréteg
lapon végzett futtatás alapján teljes az átalakulás,
majd szűrjük. A szűrletet szárazra pároljuk. A maradék
gyakorlatilag a tiszta aldehid /32/, amit éter-n-hexán
elegyből átkristályosítunk.

Termelés: 1,21 g /56% /
Op: 69-70°C
Analízis: C₁₀H₁₆NO₂ /182,25/
Számított: C 65,90; H 8,85; N 7,69.
Mért: 66,01; 8,88; 7,61.
I.R. /nujol/: v CO 1670 cm⁻¹
M⁺: 182

1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidro-
pirid-4-il-metil-benzoát /19a/
R⁴-CH₂OCC₆H₅

A módszer:

A 19 nitroxid allil-alkohol /0,184 g, 0,001 mol/
vizmentes piridines /3 ml/ oldatához hűtés, kevertetés

közben benzoil-kloridot /0,154 g, 0,0011/ csepegtetünk. A reakcióelegyet állni hagyjuk 3 órán át, jégre öntjük, majd extraháljuk éterrel. Az éteres fázist mossuk 1N HCl oldattal, vízzel, szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk, és olajként nyerjük 19a-t;

Termelés: 0,22 g /76 %/

Analízis: C₁₇H₂₂NO₃ /288,38/

Számított: C 70,81; H 7,69; N 4,86.

Mért: 70,75; 7,58; 4,49.

I.R./oldat/: ν CO 1720 cm⁻¹

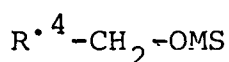
B módszer:

A 21 nitroxid allil-bromidot /0,247 g, 0,001 m/ és nátrium-benzoátot /0,173g, 0,0012 m/ vízmentes dimetilformamidban /3 ml/ 60°C-on tartjuk 2 órán át, majd higitjuk vízzel /6 ml/, éterrel /3x10 ml/ extraháljuk. Az egyesített éteres fázisokat szárítjuk /Na₂SO₄/ és bepároljuk.

Termelés: 0,20 g /69 %/

A termék azonos az "A módszerrel" nyert vegyülettel.

1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidro-
piridin-4-metil-metánszulfonát /20/



A telitetlen alkohol /19/ /2,764 g, 0,015 mol/
TEA-t /1,670g, 0,0165 mol/ tartalmazó diklór-metános

/25 ml/ oldatához -10°C -on, kevertetés közben metán-szulfonsav-kloridot /1,890g, 0,0165 mol/ csepegtetünk. Szobahőn kevertetjük 3 órán át, majd a szerves fázist mossuk 5%-os NaHCO_3 oldattal /20 ml/, vízzel /15 ml/. A szerves fázist szárítjuk Na_2SO_4 /, az oldószert lepároljuk. A maradék sötétvörös olaj a 20 metánszulfonát.

Termelés: 3,55 g /90%/

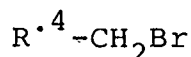
Analízis: $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{S}$ /262,36/

Számított: C 50,36; H 7,69; N 5,34; S 12,23.

Mért: 49,84; 7,70; 5,01; 12,37.

I.R. /film/: νOSO_2 1160 cm^{-1}

1-Oxil-4-bromometil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-
tetrahidropiridin /21/



A 20 mezilát /3,411g, 0,013 mol/ és litium-bromid /3,387g, 0,039 mol/ vízmentes acetonos oldatát vissza-csepegés mellett forraljuk fél órán át. Vizet adunk hozzá, majd extraháljuk éterrel /2x20 ml/, szárítjuk MgSO_4 /, bepároljuk. A maradék sötétvörös olaj a 21 nitroxid allil-bromid vegyület.

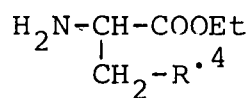
Termelés: 2,67 g /83 %/
Analízis: $C_{10}H_{17}BrNO$ /247,17/
Számított: C 48,59; H 6,93; N 5,67; Br 32,33.
Mért: 48,47; 6,80; 5,51; 32,77.
I.R./film/: ν C=C 1620 cm^{-1}

/1-Oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-
-metil/-metántioszulfonát /22/
 $R^4-CH_2-SSO_2Me$

A 20 metánszulfonát /0,262g, 0,001 mol/ és kálium-
-metán-tioszulfonát /0,150g, 0,001 mol/ vízmentes
etil-alkoholos /10 ml/ oldatát visszacsepegés mellett
3 órán át forraljuk. Telített NaCl oldatot adunk hozzá,
majd extraháljuk éterrel /3x10 ml/, szárítjuk /MgSO₄/,
bepároljuk. A maradékot preparatív rétegekromatográfiá-
val tisztítva [futtatószer: éter-n-hexán /1:1/] nyertük
a 22 terméket.

Termelés: 0,16 g /59%/
Op: 38-40°C
Analízis: $C_{11}H_{20}NO_3S_2$ /278,42/
Számított: C 47,45; H 7,24; N 5,04; S 23,03.
Mért: 47,35; 7,14; 4,08; 21,29.
I.R./oldat/: ν SO₂ 1325 cm^{-1}

Etil-2-amino-3-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-
-1,2,5,6-tetrahidropirid-4-il/-propionát /25/



Az irodalomban leirt módon⁸⁰ /23/ frissen elő-
állított Schiff-bázis /0,267 g, 0,001 mol/, a TBAH
/0,407 g, 0,0012 mol/ és a 21 nitroxid allil-bromid
/0,297 g, 0,0012 mol/ diklór-metános /3 ml/ oldatához
kevertetés közben NaOH oldatot /2N, 1,2 ml, 0,0024 mol/
adunk, majd kevertetjük 3 órán át. A reakcióelegyhez
diklór-metánt /15 ml/ adunk, elválasztjuk, a szerves
fázist mossuk vízzel, szárítjuk /MgSO₄/, bepároljuk,
majd étert adunk hozzá. A kiváló kvaterner ammónium
sót szűrjük, a szűrletet bepároljuk, tetrahydrofurán-
ban /10 ml/ oldjuk, 10%-os citromsav oldatot /3 ml/
adunk hozzá, majd kevertetjük 1 órán át. Hígítjuk vízzel,
extraháljuk kloroformmal /2x30 ml/. A vizes fázist 2N
NaOH oldattal pH=8-ig lugosítjuk, extraháljuk kloro-
formmal, szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk. Preparatív
rétegekromatográfiával [futtatószer: kloroform-metanol
/9:1/] tisztítva nyerjük a terméket /25/, mint vörös
színű olajat.

Termelés: 0,13 g /48%/

Analízis: $C_{14}H_{25}N_2O_3$ /269,36/

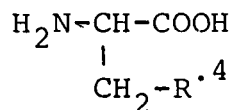
Számitott: C 62,43; H 9,36; N 10,40.

Mért: 62,09; 8,25; 10,47.

I.R. /film/: ν CO 1730 cm^{-1} ν NH 3380 cm^{-1}

M⁺: 269

2-Amino-3-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropirid-4-il)-propionsav /26/



A 25 nitroxid α -aminosav-etil-észter / 0,269 g, 0,001 m/ metanolos oldatához Ba(OH)₂ oldatot adunk és állni hagyjuk egy éjszakán át. Szárazjeget adunk hozzá, a kivált BaCO₃ csapadékot szűrjük, a szűrletet vákuumban szárazra pároljuk, majd a maradékot etil-alkoholból kristályosítjuk.

Termelés: 0,17 g /71 %/

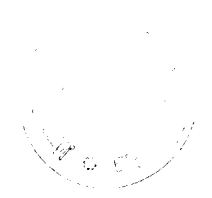
Op: 198-200°C

Analízis: $C_{12}H_{21}N_2O_3$ /241,32/

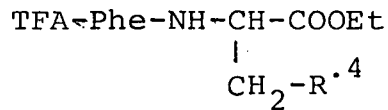
Számitott: C 59,73; H 8,77; N 11,61.

Mért: 59,97; 8,28; 11,43.

I.R./oldat/: ν OH 3100-3500 cm^{-1} ν CO 1720 cm^{-1}
 ν NH 3380 cm^{-1}



Trifluor-acetil-fenilalanil-[2-amino-3-(1-oxil-
-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidropirid-4-il]
etil-propionát /27/



A N-TFA-L-Phe-OH /0,26 g, 0,001 mol/ és a 25 nitroxid α -aminosav-észter /0,27, 0,001 mol/ tetrahidrofurános /5 ml/ oldatához 0°C-on, kevertetés közben DCC /0,206 g, 0,001 mol/ tetrahidrofurános /5 ml/ oldatát csepegtetjük. Szobahőn kevertetjük 3 órán át, a kiváló DCU-t szűrjük, a szűrletet bepároljuk, felvesszük etil-acetátban, mossuk 1N HCl oldattal /0°C-on!/, NaHCO₃ oldattal, vízzel, majd szárítjuk /Na₂SO₄/ és szárazra pároljuk. Preparatív rétegekromatográfiával tisztítjuk. [futtatószer: kloroform-éter /9:1]]

Termelés: 0,16 g /31%/

Op: 57-59°C

Analízis: C₂₅H₃₃F₃N₃O₅ /512,56/

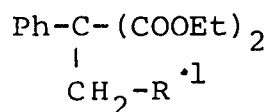
Számított: C 58,58; H 6,49; N 8,20.

Mért: 58,32; 6,52; 8,25.

I.R./oldat/: ν CONH 3400 cm⁻¹, ν CO 1730 cm⁻¹

M⁺: 512

Fenil-[(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil- Δ^3 -pirrolin-3-il)-metil] -malonsav-dietyl-észter /28/



A fenil-malonsav-dietyl-észter /0,71 ; 0,003 mol/ a TBAH /1,222g, 0,0036 m/ és az 1-oxil-3-bromometil-2,2,5,5-tetrametil- Δ^3 -pirrolin /0,839 g, 0,0036 mol/ diklór-metános /9 ml/ oldatához kevertetés közben NaOH oldatot /2N, 3,6 ml/ adunk és 16 órán át kevertetjük. A reakció előrehaladását vékonyréteg-kromatográfiával követjük.

A két fázist elválasztjuk, a szerves fázist szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk, oszlopkromatográfiával tisztítjuk /oldószerkelegy: tetraklór-metán, növekvő mennyiségű éter/.

Termelés:	0,7 g /60%/
Op:	100-101°C
Analízis:	C ₂₂ H ₃₀ NO ₅ /388,49/
Számított:	C 68,02; H 7,78; N 3,61.
Mért:	68,00; 7,49; 3,56.
I.R./nujol/:	v CO 1725 cm ⁻¹

5-fenil-5-[(1-oxil-2,2,5,5-tetrametil- Δ^3 -pirrolin-3-il)metil]-barbitursav /29/

5-Ph-5-(CH₂-R¹)-barbitursav

A karbamidot /0,30g, 0,005 m/ kevertetés közben, száraz N₂ atmoszférában feloldjuk a nátrium-etoxidban /3 ml, 0,003 m/ és hozzácsepegtetjük a 28 /0,388g, 0,001 m/ vízmentes etil-alkoholos /5 ml/ oldatát, majd visszacsepegtetés mellett főzzük 15 órán át. Jeges hűtés mellett 1N HCl-val savanyítjuk, kloroformmal extraháljuk. A kloroformos fázist vízzel mossuk, szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk, oszlopkromatográfiával tisztítjuk. /Oldószerkelet: kloroform, növekvő mennyiségű éter/

Termelés: 0,15 g /43%/

Op: 138-140°C

Analízis: C₁₉H₂₂N₃O₄ /356,41/

Számított: C 64,03; H 6,22; N 11,79.

Mért: 63,89; 6,94; 12,27.

IR /oldat/: ν NH 2700-330 cm⁻¹, ν CO 1690-1750 cm⁻¹,
 ν C=C 1600 cm⁻¹

M⁺: 355

Morfin-3-(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetra-
hidropirid-4-il)metil-éter /30/
morfin-3-O-CH₂-R⁴

A morfint /0,143 g, 0,0005 mol/ és K₂CO₃-ot /0,1 g/ dimetilformamidban szuszpendáltuk és melegítettük, majd hozzáadtuk a 21 nitroxid-allil-bromidot /0,124g, 0,0005 mol/. A reakciókeveréket 2 órán át 70°C-on tartottuk, ezután telített NH₄Cl oldattal hígítottuk, majd kloroformmal /3x10 ml/ extraháltuk. Az egyesített kloroformos extraktokat szárítottuk /Na₂SO₄/, bepároltuk. A maradékot preparatív rétegekromatográfiával tisztítottuk [futatószer: kloroform-éter-etanol /4:4:1/]. Az így nyert terméket kloroform-n-hexán elegyből kristályosítottuk.

Termelés: 0,11 g /48%/

Op: 156-157°C

Analízis: C₂₇H₃₅N₂O₄ /451,59/

Számított: C 71,81; H 7,81; N 6,20.

Mért: 72,05; 7,51; 5,98.

IR /nujol/: ν OH 3200-3400 cm⁻¹, ν C=C 1620 cm⁻¹

M⁺: 451

N- [(1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-tetrahidro-
pirid-4-il)-metil] normorfin /31/
normorfin-N-CH₂-R⁴

A normorfint /0,135g, 0,0005 mol/ és K₂CO₃-ot /0,1 g/ dimetil-formamidban szuszpendáltuk és melegítettük, majd hozzáadtuk a nitroxid allil-bromidot /0,124g, 0,0005 mol/. A reakciókeveréket 2 órán át 70°C-on tartottuk, ezután telített NH₄Cl oldattal hígítottuk, majd kloroformmal /3x10 ml/ extraháltuk. Az egyesített kloroformos extraktokat szárítottuk /Na₂SO₄/, bepároltuk. A maradékot preparatív réteg-kromatográfiával tisztítottuk [futtatószer: kloroform-éter/etanol /4:4:1/]. Az így nyert terméket kloroform-n-hexán elegyből kristályosítottuk.

Termelés: 0,1 g /45%/
Op: >200°C
Analízis: C₂₆H₃₃N₂O₄ /437,56/
Számított: C 71,37; H 7,60; N 6,40.
Mért: 71,28 7,72 5,99
IR /nujol/: ν OH. 3100-3500 cm⁻¹
M⁺: 437

1-Oxil-3-hidroximetil-3,4-epoxi-2,2,5,5-
-tetrametil-pirrolidin /34/

A pirrolyingűrös alkohol /33/ /3,4 g, 0,02 mol/ és MCPBA /5,1 g, 0,03 mol/ diklór-metános /100 ml/ oldatát főzzük 12 órán át. A reakcióelegyet mossuk K_2CO_3 oldattal /3x150 ml/, extraháljuk éterrel, az egyesített éteres és diklór-metános fázisokat mossuk telített NaCl oldattal, a szerves fázist szárítjuk / Na_2SO_4 /, szűrjük, bepároljuk. A kapott sárga olajat oszlopkromatográfiával tisztítjuk /oldószerkeleg: kloroform, növekvő mennyiségű éter/. Az epoxialkoholt /34/ éter-n-hexán elegyből kristályosítjuk.

Termelés: 1,4 g /38%/

Op: 104-106°C

Analízis: $C_9H_{16}NO_3$ /186,24/

Számított: C 58,04; H 8,66; N 7,52.

Mért: 57,95; 8,67; 7,41.

IR /nujol/: ν OH 3100-3500 cm^{-1}

1-Oxil-3-hidroximetil-3,4-dihidroxi-2,2,5,5-
-tetrametil-pirrolidin /36/

A 34-et /0,931g, 0,005 mol/ DMSO-viz /85 ml-15 ml/ elegyében kálium-hidroxid /1,68 g/ jelenlétében vissza-

Számított: C 56,06; H 7,53; N 6,54.
Mért: 55,53; 7,27; 7,26.
I.R. /KBr/: ν OH 3100-3500 cm^{-1} ν CO 1720 cm^{-1}
M⁺: 214

1-Oxil-3,4-epoxi-2,2,6,6-tetrametil-1,2,5,6-
-tetrahidropiridin-4-karbonsav-pentafluor-fenol-
-észter /38/

A 37 /1,071g, 0,005 mol/ és pentafluór-fenol /0,920g, 0,005 m/ vizmentes etil-acetátos /15 ml/ C^oC-ra hűtött oldatához kevertetés közben DCC /1,03 g, 0,005 m/ vizmentes etil-acetátos /5 ml/ oldatát adjuk. Feldolgozás, mint 18-nál.

Termelés: 1,3 g /68%/
Op: 87-89^oC
Analízis: C₁₆H₁₅F₅NO₄ /380,30/
Számított: C 50,53; H 3,98; N 3,68.
Mért: 50,21; 4,13; 3,49.
I.R. /oldat/: ν CO 1780 cm^{-1}

1-Oxil-3,4-epoxi-4-hidroximetil-2,2,6,6-tetrametil-
-piperidin /39/

A 38 aktiv savszármazékot /0,608g, 0,0016 m/ hűtés /0^oC/ és kevertetés közben etil-alkoholban /5 ml/ szuszpendált NaBH₄-hez /0,08 g/ adjuk. Szobahőn kevertetjük.

1 órán át. Feldolgozás: mint 19 A-módszer.

Termelés: 0,1 g /31%/

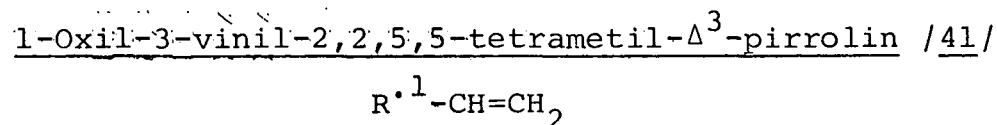
Op: 99-101°C

Analízis: C₁₀H₁₈NO₃ /200,26/

Számított: C 59,98; H 9,06; N 7,00.

Mért: 59,72; 8,97; 6,89.

I.R. /oldat/: ν 3100-3500 cm⁻¹



A trifenil-metil-foszfónium-jodid /8,4 g; 0,02 m/
dioxános /20 ml/ oldatához /K₂CO₃-ot /3,5 g/ és 35
aldehidet /3,36 g; 0,02 m/ adunk. Kevertetés közben
visszacsepegés mellett főzzük 24 órán át. Szűrés és az
oldószer bepárlása után oszlopkromatográfiával tisztít-
va /oldószerkelegy: kloroform, növekvő mennyiségű éter/
nyerjük a 41-et, sötétvörös olajként.

Termelés: 1,8 g /54%/

Analízis: C₁₀H₁₆NO /166,25/

Számított: C 72,25; H 9,70; N 8,43.

Mért: 70,82; 9,59; 8,27.

I.R. /oldat/: ν C=C-C=C 1630, 1590 cm⁻¹

M⁺: 166

csepegés mellett főzzük 16 órán át. Extraháljuk kloroformmal /3x50 ml/, szárítjuk /MgSO₄/, bepároljuk.

Kloroform-n-hexán elegyből kristályosítjuk.

Termelés: 0,4 g /39%/

Op: 186-188°C

Analízis: C₉H₁₈NO₄ /204,26/

Számított: C 52,93; H 8,88; N 6,86.

Mért: 52,77; 8,05; 6,45.

IR /KBr/: ν OH 3100-3600 cm⁻¹

M⁺: 204

1-Oxil-3,4-epoxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidin-
-4-karbonsav /37/

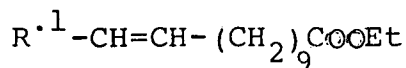
A 32 telitetlen aldehidet /1,82 g, 0,01 mol/ oldottuk metil-alkoholban /20 ml/, katalitikus mennyiségű nátrium-wolframátot és 30%-os H₂O₂-ot /1-2 ml/ adtunk hozzá, majd rövid kevertetés után 10%-os NaOH oldatot /1-2 ml/ adunk a reakcióelegyhez. Kevertetjük 2 napon át. Extraháljuk kloroformmal, a vizes részt 1N HCl oldattal savanyítjuk pH=5-ig, extraháljuk éterrel /3x30 ml/, mossuk telített NaCl oldattal, szárítjuk /MgSO₄/, bepároljuk, a maradék olajat éter-n-hexán elegyből kristályosítva kapjuk a 37-et.

Termelés: 0,89 /41,6%/

Op: 172-174°C

Analízis: C₁₀H₁₆NO₄ /214,25/

11-(1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil- Δ^3 -pirrolin-3-il)-
-10-undecénsav-etil-észter /42/



A frissen preparált 10-etoxikarbonil-dekanoil-trifenil-foszfónium-bromidot /2,77 g; 0,005 mol/ feloldjuk dioxánban /5 ml/ majd K_2CO_3 -ot /0,87 g/ és a 35 aldehidet /0,84 g; 0,005 mol/ hozzáadva kevertetjük és visszacsepegés mellett főzzük 24 órán át. Szűrés és oldószer bepárlása után oszlopkromatográfiával tisztítjuk /oldószerkelegy: tetraklór-metán, növekvő mennyiségű éter/ és vöröses olajként nyerjük 42-t.

Termelés: 1,00 g /55%/

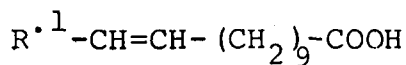
Analízis: $C_{22}H_{38}NO_3$ /364,55/

Számított: C 72,48; H 10,51; N 3,84.

Mért: 72,66; 9,53; 3,03.

I.R. /film/: ν CO 1730 cm^{-1} C=C ν 1625 cm^{-1}

11-(1-Oxil-2,2,5,5-tetrametil- Δ^3 -pirrolin-3-il)-
-10-undecénsav /43/



A 42 karbonsav-észter /0,20g, 0,00055 mol/ metil-alkoholos oldatához NaOH-oldatot /2N, 5 ml/ adunk és állni hagyjuk egy éjszakán át. Kloroformos extrahálás

után a vizes fázist savanyítjuk 1N HCl-oldattal /pH=2/, majd kloroformmal extraháljuk, /3x10 ml/, szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk. A maradék olaj a 43 karbonsav.

Termelés: 0,07 g /38%/

Analízis: C₂₀H₃₄NO₃ /336,50/

Számított: C 71,39; H 10,18; N 4,16.

Mért: 71,14; 9,92; 4,31.

IR /film/: ν CO 1710, cm⁻¹, ν C=C 1625 cm⁻¹

1-Oxil-3-vinil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolin,
maleinsav-anhidrid-addukt /44/

A 41 dién /0,166 g, 0,001 m/ vízmentes benzolos /2 ml/ oldatához maleinsav anhidridet /0,06 g, 0,0007 m/ és katalitikus mennyiségű p-toluol-sulfonsavat adunk, majd N₂-atmoszférában visszacsepegés mellett főzzük 4 órán át.

Az oldószer lepárlása után preparatív vékonyréteg lapon tisztítjuk.

Termelés: 0,07 g /27%/

Op: 136-137°C

Analízis: C₁₄H₁₈NO₄ /264,32/

Számított: C 63,62; H 6,86; N 5,30.

Mért: 63,68; 6,97; 5,14

IR /oldat/: ν CO 1870; 1795 cm⁻¹

M⁺: 264

1-Oxil-3-vinil-2,2,5,5-tetrametil-pirrolin, 1-oxil
2,2,6,6-tetrametil-piperidin-4-il-maleimid addukt

/45/

A 41 dién /0,166 g; 0,001 mol/ és az N-/1-oxil-
-2,2,6,6-tetrametil-piperid-4-il/-maleimid /0,251g,
0,001 mol/ vizmentes benzolos /2 ml/ oldatához katali-
tikus mennyiségű p-toluol-szulfonsavat adunk és N₂
atmoszférában visszacsepegés mellett főzzük 12 órán át.

Az oldószer lepárlása után preparatív vékonyréteg
lapon tisztítjuk [Futtatószer: tetraklór-metán-éter/1:1//

Termelés: 0,11 g /26%/
Op: 108-110°C
Analízis: C₂₃H₃₅N₃O₄ /417,55/
Számított: C 66,16; H 8,45; N 10,06.
Mért: 66,07; 9,41; 10,21.
I.R. /oldat/: v CO 1860, 1790 cm⁻¹
ESR: biradikál

N-acetil-oxi-3-vinil-2,2,5,5-tetrametil-Δ³-pirrolin

/47/

A 41 dién /1,66 g, 0,01 mol/ metil-alkoholos /5 ml/
oldatához hozzáadjuk az aszkorbinsav /3,52 g, 0,02 mol/
vizes /10 ml/ oldatát, majd az oldat elszintelenedése
/kb. 10 perc/ után kloroformmal extraháljuk, szárítjuk

/MgSO₄/, gyorsan szűrjük, a kloroform egy részét bepároljuk, majd ezt az oldatot adjuk kevertetés közben az acetyl-klorid /1,17 g, 0,015 mol/ vízmentes K₂CO₃-ot /2,76 g, 0,02 mol/ tartalmazó vízmentes kloroformos /10 ml/ oldatához. Néhány perc után vizet adunk hozzá, mossuk telített NaHCO₃ oldattal, a kloroformos fázist szárítjuk /Na₂SO₄/, bepároljuk.

Termelés: 1,15 g /55%/

Analízis: C₁₂H₁₉NO₂ /209,29/

Számított: C 68,87; H 9,15; N 6,69.

Mért: 68,70; 8,55; 7,49.

IR /oldat/ : ν CO 1760 cm⁻¹, C=C-C=C 1635, 1590

M⁺: 209

IRODALOM

1. Burr, M., and Koshland, D.E.Jr., Use of "reporter groups" in structure-function studies of proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 52, 1017 /1964/
2. Griffith, O.H., Jost, P.C., "Lipid spin labels in biological membranes", Spin Labeling: Theory and applications /L.J. Berliner, ed./, Vol. 1. 454, Academic Press, New York, /1976/
3. Morrisett, J.D., "The use of spin labels for studying the structure and function of enzymes", Spin Labeling: Theory and applications /L.J. Berliner, ed./ Vol. 1. 274, Academic Press, New York, /1976/
4. Bobst, A.M., "Applications of spin labeling to nucleic acids", Spin Labeling: Theory and applications /L.J. Berliner, ed./, Vol. 2. 291, Academic Press, New York, /1979/
5. Gomberg, M., J. Am. Chem. Soc., 22, 757 /1900/
6. IUPAC-Szabály C 81.2.
7. Rozantsev, E.G., and Sholle, V.D., Synthesis and reactions of stable nitroxyl radicals, I. Synthesis, Synthesis, 190, /1971/
8. Hoffman, A.K., A new stable free radical: di-~~t~~-butyl-nitroxide, J. Am. Chem. Soc., 83, 4671 /1961/
9. Buchacenko, A.L., Stable radicals, Consultants Bureau, New York, /1965/
10. Forrester, A.R., Hay, J.M., and Thomson, R.H., Organic chemistry of stable free radicals, Academic Press, New York, /1968/
11. Rozantsev, E.G., Free nitroxyl radicals, /Translated from Russian by B.J. Hazzard/, Plenum Press, New York, /1970/

12. Rozantsev, E.G., and Sholle, V.D., Synthesis and reactions of stable nitroxyl radicals, II. Reactions, Synthesis, 401 /1971/
13. Gaffney, B.J., "The chemistry of spin labels", Spin Labeling: Theory and applications /L.J. Berliner, ed./, Vol. 1, 183, Academic Press, New York, /1976/
14. Keana, J.F.W., Newer aspects of the synthesis and chemistry of nitroxide spin labels, Chem. Rev., 78, 37 /1978/
15. Keana, J.F.W., "New aspects of nitroxide chemistry", Spin Labeling: Theory and Applications /L.J. Berliner, ed./, Vol. 2, 115, Academic Press, New York /1979/
16. Keana, J.F.W., Keana, S.B., Beetham, D., A new versatile ketone spin label. J. Am. Chem. Soc., 89, 3055 /1967/
17. Keana, J.F.W., Lee, T.D., Bernard, E.M., Side chain substituted 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine-N-oxyl /proxyl/ nitroxides. A new series of lipid spin labels showing improved properties for the study of biological membranes, J. Am. Chem. Soc., 98, 3052 /1976/
18. Lee, T.D., Keana, J.F.W., Nitroxides from 3,4-dihydro-2,6-dimethyl-2H-pyrrole 1-oxide. A new series of minimum steric perturbation lipid spin labels, J. Org. Chem., 43, 4226 /1978/
19. Griller, D., Ingold, K.U., Persistent carbon-centered radicals, Acc. Chem. Res., 9, 13 /1976/
20. Aurich, H.G., Nitroxides, in "The chemistry of functional groups, Suppl. F.: The chemistry of amino, nitroso and nitro compounds and their derivatives," /Patai, S. ed./ J. Wiley and Sons, London /1982/, Chapter 14, p. 565

21. De La Mare, H.E., Reaction of some aliphatic amines with *tert*-butyl hydroperoxide. The fate of the amine, *J. Org. Chem.*, 25, 2114 /1960/
22. Johnson, D.H., Rogers, M.A.T., and Trappe, G., Aliphatic hydroxylamines. Part II. Autoxidation, *J. Chem. Soc.*, 1093 /1956/
23. Rogers, M.A.T., Aliphatic hydroxylamines. Part III. Reaction with diazotised aromatic amines. A novel synthesis of acylbenzenes from the corresponding amine, *J. Chem. Soc.* 2784 /1956/
24. Bowman, T.D.F., Gillan, T., Ingold, K.U., Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy, III. Self-reactions of dialkyl nitroxide radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 93, 6555 /1971/
25. Briere, R., and Rassat, A., Synthèse et étude cinétique de la décomposition du *t*-butyl isopropyl nitroxide. Effect isotopique, *Tetrahedron*, 32, 2891 /1976/
26. Mendenhall, G.D., Ingold, K.U., Reversible dimerization and some solid-state properties of two bicyclic nitroxides, *J. Am. Chem. Soc.* 95, 6390 /1973/
27. Golubev, V.A., Rozantsev, E.G., Neiman, M.B., Some reactions of free iminoxyl radicals with the participation of the unpaired electron, *Akad Nauk. SSSR. /Eng/*, 1898 /1965/
28. Rassat, A., Rey, P., Nitroxides LXIII. Oxydation de nitroxides isoquinuclidiniques par l'oxyde d'argent humide. Préparation de nitroxydes Aza-6-bicyclo [3.2.1] octeniques, *Tetrahedron*, 30, 3597 /1974/

29. Sümmerman, W., Deffner, U., Die Electrochemische Oxidation aliphatischer nitroxyl Radikale, Tetrahedron, 31 593 /1975/
30. Fomin, G.V., Blumenfeld, L.A., Szokorukov, B.N., Electron-donor properties of the hydroxyl ion. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 157, 1199 /1964/
31. Daniel, W.E., Cohn, M., Changes in tertiary structure accompanying a single base change in transfer RNA. Proton magnetic resonance and aminoacylation studies of Escherichia coli tRNA^{Met}_{f1} and tRNA^{Met}_{f3} and their spin-labeled /s⁴U8/ derivatives, Biochemistry, 15, 3917 /1976/
32. Morrisett, J.D., Drott, H.R., Oxidation of the sulfhydryl and disulfide groups by the nitroxyl radical, J. Biol. Chem., 244, 5083 /1969/
33. Kornberg, R.D., McConnell, H.M., Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes, Biochemistry, 10, 1111 /1971/
34. Paleos, C.M., Pais, D., Ready reduction of some nitroxide free radicals with ascorbic acid, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 428 /1977/
35. Neimann, M.B., Mairanovskii, S.G., Kovarskaya, B.M., Rozantsev, E.G., Gintsberg, E.G., Polarographic study of certain N-oxide free radicals, Akad. Nauk. SSSR. Bull., /Eng./, 1424 /1964/
36. Lee, T.D., Birrell, G.B., Keana, J.F.W., A new series of minimum steric perturbation nitroxide spin labels, J. Am. Chem. Soc., 100 1618 /1977/
37. Stier, A., and Reitz, I., Radical production in amine oxidation by liver microsomes, Xenobiotica, 1, 499 /1971/

38. Kaplan, J., Canonico, P.G., Caspary, W.J.,
Electron spin resonance studies of spin-labeled mammalian cells by detection of surface-membrane signals,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70, 66 /1973/
39. Rosen, G.M., Use of sodium cyanoborohydride in the preparation of biologically active nitroxides. J. Med. Chem., 17 358 /1974/
40. Rauchman, E.J., and Rosen, G.M., Synthesis of spin labeled probes: Esterification and reduction, Synth. Commun., 6, 325 /1976/
41. Keana, J.F.W., Bernard, E.M., Roman, R.B.,
Selective reduction of doxyl and proxyl nitroxide carboxylic acids to the corresponding alcohols with borane methyl sulfide, Synth. Commun., 8, 169 /1978/
42. Hoffman, B.M., Eames, T.B., Protonated nitroxide free radical, J. Am. Chem. Soc., 91, 2169 /1969/
43. Griffith, O.H., Waggoner, A.S., Nitroxide free radicals: Spin labels for probing biomolecular structure. Accounts Chem. Res., 2, 17 /1969/
44. Belágyi, J., Modern fizikai módszerek /EPR, NMR/ a membránok szerkezetének vizsgálatánál, MTA Biol. Oszt. Közl. 18, /1975/
45. Wallach, D., Effect of internal rotation on angular correlation functions, J. Chem. Phys. 47, 5258 /1967/
46. Hankovszky, H.O., Hideg, K., and Lex, L., Nitroxyls. VII. Synthesis and reactions of highly reactive 1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydropyrrole-3-ylmethyl sulfonates, Synthesis, 914 /1980/

47. Hideg, K. közlés alatt
48. Ohnishi, S., McConnell, H.M., Interaction of the radical ion of chlorpromazine with deoxyribonucleic acid, J. Am. Chem. Soc., 87, 2293 /1965/
49. Berliner, L.J. /Editor/ Spin labeling, theory and application, Vol. I. Academic Press, New York, 1976
- 49a. Berliner, L.J. /Editor/ Spin labeling, theory and application, Vol. II. Academic Press, New York, 1979.
50. Likhtenshtein, G.I., Spin labeling methods in molecular biology, Wiley-Interscience, New York, 1976
51. Hideg, K., and Hankovszky, H.O., The chemistry of spin-labelled amino acids, peptides. Some newer mono-, and bifunctionalized nitroxide free radicals, in: "Paramagnetic Models of Drugs and Biochemicals" /Zhdanov, R.I. ed./, in press
52. Wenzel, H.R., Tschesche, H., and Goldammer, E., Spin labelled amino acids, peptides and proteins - Synthesis and applications in "Modern Methods in Protein Chemistry" Tschesche, H.E. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1983
53. Jones, R., Dwek, R.A., and Walker, I.O., Spin-labelled phosphofruktokinase and its interactions with ATP and metal-ATP complexes as studied by magnetic resonance methods, Eur. J. Biochem., 34, 28 /1973/

54. Berliner, L.J., and Wong, S.S., Spin labeled sulfonyl fluorides as active site probes of protease structure, I. Comparison of the active site environments in α -chymotrypsin and trypsin, *J. Biol. Chem.* 249, 1668/1974
55. Krugh, T.R., Proximity of the nucleoside monophosphate and triphosphate binding sites on deoxyribonucleic acid polymerase, *Biochemistry*, 10, 2594 /1971/
56. Weiner, H., Interaction of a spin-labeled analog of nicotinamide-adenine dinucleotide with alcohol dehydrogenase, I. Synthesis, kinetics, and electron paramagnetic resonance studies, *Biochemistry*, 8, 527 /1969/
57. Benson, W.R., Maienthal, M., Synthesis of spin-labeled nitroxyl esters of steroids, *J. Med. Chem.*, 20, 1308 /1977/
58. Defaye, G., Bassct, M., Chambaz, E.M., Nitroxide derivatives of corticosteroids, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, /9-10, Pt. 2/, 471 /1978/
59. Hankovszky, H.O., Hideg, K., and Tigyi, J., Nitroxides, II. 1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrroline-3-carboxylic acid derivatives, *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 98, 339 /1978/
60. Gargiulo, R.J., Giotta, C.J., Wang, H.H., Spin labeled analogs of local anesthetics, *J. Med. Chem.*, 16, 707 /1973/
61. Hideg, K., Lex, L., Hankovszky, H.O., Tigyi, J., Synthesis of spin labelled procaine and its derivatives, *Synth. Commun.*, 9, 781 /1979/

62. Gombos-Gál, É., Lakatos, T., Tigyí, J.,
On the effectiveness of spin-labelled
procaine, Acta Biochim. Biophys. Acad.
Sci. Hung., 14, 201 /1979/
63. Lakatos, T., Gombos-Gál, É., Horváth, L.,
Procaine molecules in the nerve membrane,
Biophys. Membr. Transp., 303 /1979/
64. Smith, I.C.P., and Yamane, T., Spin labeled
nucleic acids. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 58, 884 /1967/
65. Schofield, P., Hoffman, B.M., and Rich, A.,
Spin-labeling studies of aminoacyl trans-
fer ribonucleic acid, Biochemistry,
9, 2525 /1970/
66. Dugas, H., Spin-labeled nucleic acids,
Acc. Chem. Res., 10, 47 /1976/
67. Hubbell, W.L., McConnell, H.M., Spin-label
studies of the excitable membranes of
nerve and muscle, Proc. Natl. Acad. Sci.
USA, 61, 12 /1968/
68. Sokoloff, N., Latschinoff, P., Ueber die
Einwirkung des Ammoniaks auf Aceton,
Ber. dtsh. Chem. Ges., 7, 1384 /1874/
69. Guareschi, I., Ueber das Triacetonamine und
seine Alkylabkömmlige, Ber. dtsh. Chem.
Ges., 28, ref. 160 /1895/
70. Asinger, F., Saus, A., Michcl, E., Combined
action of elemental sulfur and gaseous
ammonia on ketones. LXII. Action of sulfur
and ammonia on cyclic ketones. 6. Action
of sulfur and ammonia on triacetonamine,
Monatsh. Chem., 99 1436 /1968/

71. Sosnovsky, G., Konieczny, M., Preparation of triacetoneamine /4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidine/, an improved method, *Synthesis*, 735 /1976/
72. Pauly, H., Studien in der Reihe der Hydropyrrole, *Ann. Chem.*, 322, 77 /1902/
73. Wong, L.T.L., Schwenk, R., Hsia, J.C., New synthesis of nitroxyl radicals of the piperidine and tetrahydropyridine series, *Can. J. Chem.*, 52, 3381 /1974/
74. De Wolfe, R.H., and Young, W.G., Substitution and Rearrangement Reactions of allylic compounds, *Chem. Rev.*, 56, 753 /1956/
75. Griffith, O.H., Keana, J.F.W., Noall, D.L., and Ivey, J.L., Nitroxide mixed carboxylic-carbonic acid anhydrides. A new class of versatile spin labels, *Biochim. Biophys. Acta*, 148, 583 /1967/
76. Kenyon, G.L., Bruice, T.W., Novel sulfhydryl reagents, *Meth. Enzymol.*, 47E, 407 /1977/
77. Crossland, R.K., and Servies, K.L., A facile synthesis of methanesulfonate esters, *J. Org. Chem.*, 35, 3195 /1970/
78. Berliner, L.J., Grünwald, J., Hankovszky, H.O., Hideg, K., A novel reversible thiol-specific spin label: Papaine active site labeling and inhibition, *Anal. Biochem.*, 119, 450 /1982/
79. Lex, L., Hideg, K., Hankovszky, H.O., Nitroxides, IX. Synthesis of nitroxide free radical α -amino acids, *Can. J. Chem.*, 60, 1448 /1982/

80. O'Donnell, M.I., Boniece, J.M., and Earg, S.E.,
The synthesis of amino acids by phase-
-transfer reactions, *Tetrahedron Lett.*,
2641 /1978/
81. Weygand, F., Geiger, W., N-Trifluoroacetyl-
-aminosäuren, IV. Mitteil: N-Trifluoro-
acetylierung von Aminosäuren in wasser-
freier Trifluoressigsäure, *Chem. Ber.*,
89, 647 /1956/
82. Babayan, A.T., Gambaryan, N., and Gambaryan, N.P.
Alkylation in aqueous medium in the presence
of quaternary ammonium salts.
Zh. Obsch. Khim. 24, 1887 /1954/
83. Tietze, L.-F., Eicher, Th., Reaktionen und
Synthesen im organisch-chemischen Praktikum,
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, /1981/
84. Montgomery, M.R., Holtzman, J.L., Determination
of serum morphine by the spin-label technique.
Drug. Metab. Dispos., 2, 391 /1974/
85. Leute, R.K., Ullman, E.F., Goldstein, A., Herzen-
berg, L.A., Spin immunoassay technique for
determination of morphine, *Nature New
Biology*, 236, 93 /1972/
86. Copeland, E.S., Boykin, M.E., Kelley, J.A.,
Kullberg, M.P., An electron spin resonance
study of synaptosome opiate receptors.
The preparation and use of a spin labeled
morphine, *Biophys. J.*, 15, /11/ 1125 /1975/
87. Copeland, E.S., DeBaare, L., Electron spin
resonance study of the synaptosome opiate
receptor, *Biophys. J.*, 16, 1245 /1976/

88. Cella, J.A., Kelley, J.A., Preparation of spin labeled opiates morphine and codeine, J. Pharm. Sci., 66, 1054 /1977/
89. Wu, W.Y., Abood, L.G., Gates, M., Kreilick, R.W., Spin-labeled narcotics, Mol. Pharmacol., 13, 766 /1977/
90. Green, A.F., Ruffell, G.K., and Walton, E., Morphine derivatives with antianalgesic action, J. Pharmacy and Pharmacol. 390 /1954/
91. Keith, A.D., Waggoner, A.S., and Griffith, O.H., Spin-labeled mitochondrial lipids in Neurospora crassa, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61, 819 /1968/
92. Waggoner, A.S., Kingzett, T.S., Rottschaefter, S., and Griffith, O.H., A spin-labeled lipid for probing biological membranes, Chem. Phys. Lipids 3, 245 /1969/
93. Hubbell, W.L., and McConnell, H.M., Molecular motion in spin-labeled phospholipids and membranes, J. Amer. Chem. Soc., 93, 314 /1971/
94. Jost, P., Libertini, L.J., Hebert, V.C., and Griffith, O.H., Lipid spin labels in lecithin multilayers, A study of motion along fatty acid chains, J. Mol. Biol., 59, 77 /1971/
95. Bartók, M., Láng, K.L., Oxiranes, in "The chemistry of functional groups", Suppl. E: The chemistry of ethers, crown ethers, hydroxyl groups and their sulphur analogues, Part 2, Chapter 14, p. 609, /Patai, S., ed./, John Wiley and Sons, Chichester /1980/ és az ott közölt irodalmak

96. Malinovskii, M.S., Epoxides and their derivatives, Translated from Russian, Israel Program for Scientific Translation Jerusalem /1965/
97. Berti, G., Macchia, B., and Macchia, F., Dimethyl sulphoxide as a solvent for the hydrolytic cleavage of epoxides. Synthesis of the four diastereoisomeric 4-*tert*-butylcyclohexane-1,2-diols, Tetrahedron Lett., 3421 /1965/
98. Attenburrow, J., Cameron, A.F.B., Chapman, J.H., Evans, R.M., Hems, B.A., Jansen, A.B.A., and Walker, T., A synthesis of vitamin A from cyclohexanone, J. Chem. Soc. 1094 /1952/
99. Shapiro, A.B., Skripnichenko, L.N., Pavlikov, V.V., Rozantsev, E.G., Synthesis of nitroxyl radicals based on 4-ethynyl-4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 1, 151 /1979/
100. Le Bigot, Y., Delmas, M., and Gaset, A., A simplified Wittig synthesis using solid/liquid transfer processes II. - The use of K_2CO_3 for the synthesis of alkenes from aromatic and aliphatic aldehydes, Synth. Comm. 12 /2/, 107 /1982/
101. Stone, T.J., Buckmann, T., Nordio, R.L., and McConnell, H.M., Spin labeled biomolecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 1010 /1965/

102. Miller, W.G., Spin-labeled synthetic polymers, in "Spin Labelling: Theory and applications /Berliner, L.J., ed./ Vol. 2, 173, Academic Press, New York /1971/
103. Kovács, K., Halmos, M., A szerves kémia alapjai, 65. old. Tankönyvkiadó, Budapest, /1972/
104. Lee, T.D., Synthesis of spin labeled derivatives of lipids, diacylglycerophosphatidylcholine, and pyrrochlorophyll-A via Grignard and alkyllithium additions to nitrones. Ph.D. Thesis, University of Oregon, Eugene /1977/
105. Volodarsky, L.B., Kutikova, G.A., Kobrin, V.S., Saqdeev, R.Z., and Molin, Yu.N., Synthesis and spectra studies of stable iminoxyl radicals. Derivatives of 2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline-1-oxyl-4-carboxylic acid and its amide, salt, and copper /II/ complex. Izv. Sib. Otd. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim. Nauk, 3, 101 /1971/ /Russ/.
106. Simon, P., Sümegi, L., Rockenbauer, A., Tüdős, F., Csekő, J., Hideg, K., Effect of main chain double bond on dynamics of polystyrene: an ESR study of macromolecules spin labeled by copolymerization, Macromolecules /in press/