

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Katedra Chemii Organicznej



Marek Żylewski

**Badania konformacyjne potencjalnych ligandów receptora 5-HT_{1A}
metodami dwuwymiarowej spektroskopii magnetycznego
rezonansu jądrowego**

Rozprawa doktorska

Promotor
dr hab. Marek Cegła

Kraków 2005

*Panu dr hab. Markowi Cegle
za rady i wskazówki, które przyczyniły
się do powstania tej pracy oraz za
opiekę naukową, życzliwość i wsparcie*
Serdecznie dziękuję

Pragnę gorąco podziękować wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy:

Panu dr Andrzejowi Bojarskiemu i wszystkim koleżankom i kolegom z Zakładu Chemii Leków Instytutu Farmakologii PAN za dostarczenie związków do badań i wiele owocnych dyskusji nad wynikami pomiarów

Panu Prof. dr hab. Jackowi Bojarskiemu i wszystkim koleżankom i kolegom z Katedry Chemii Organicznej Collegium Medicum UJ za ich życzliwość i wspaniałą atmosferę

Żonie i córce za czas, w którym mnie nie było

Praca powstała dzięki częściowemu wsparciu finansowemu Komitetu Badań Naukowych w postaci grantu 3 PO5F 012 23

Spis treści

Spis treści.....	5
1. Część teoretyczna.....	7
1.1. Wstęp.....	7
1.2. Techniki dwuwymiarowej spektroskopii NMR.....	8
1.3. Spektroskopia NMR w analizie i projektowaniu substancji leczniczych.....	15
1.4. NMR w badaniach nad arylopiperazynami – potencjalnymi ligandami receptorów serotoninowych 5-HT _{1A}	18
2. Cel pracy.....	21
3. Część eksperymentalna.....	23
3.1. Odczynniki i aparatura.....	23
3.2. Nomenklatura badanych związków.....	25
3.3. Przygotowanie próbek i akwizycja danych.....	28
3.4. Interpretacja widm i metody obliczeniowe.....	29
4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.....	33
4.1. Związek 1.....	33
4.2. Związek 2.....	45
4.3. Związek 3.....	57
4.4. Związek 4.....	69
4.5. Związek 5.....	81
4.6. Związek 6.....	93
4.7. Związek 7.....	103
4.8. Związek 8.....	117
4.9. Związek 9.....	124
4.10. Związek 10.....	137
4.11. Związek 11.....	150
4.12. Związek 12.....	161
5. Dyskusja wyników i podsumowanie.....	171
5.1. Konformacja łańcucha butanowego.....	172
5.2. Konformacja układu piperazyna – pierścień fenyłowy. Protonowanie układu piperazyny	175
5.3. Wnioski końcowe.....	179
6. Bibliografia.....	180

1. Część teoretyczna

1.1. Wstęp

Magnetyczny rezonans jądrowy (*Nuclear Magnetic Resonance* – NMR) jako jedna z niewielu technik badawczych przeszła bardzo burzliwy rozwój od zastosowania w badaniach czysto fizycznych w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku w szeroko dziś stosowaną we wszystkich gałęziach nauk chemicznych, biologicznych, farmaceutycznych i medycznych technikę analityczną. Wraz z opracowaniem i wprowadzeniem do laboratoriów badawczych pierwszych spektrometrów NMR pracujących w wysokiej rozdzielczości, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego wkroczyła do chemii organicznej i stała się ważnym narzędziem dostarczającym informacji o strukturze chemicznej zarówno związków nowo syntetyzowanych jak i wyodrębnianych z materiału biologicznego. Niska czułość pierwszych spektrometrów pracujących metodą „fali ciągłej” wymagała jednak wysokiego stężenia próbek i bardzo utrudniała pomiary dla jąder izotopów o niskiej zawartości w naturalnie występujących pierwiastkach (^{13}C , ^{15}N). Przełom dokonał się wraz z wprowadzeniem impulsowej techniki rejestracji widm, która pozwoliła na łatwe zaimplementowanie akumulacji wielokrotnie powtarzanych pomiarów, co z kolei doprowadziło do szybkiego rozwoju spektroskopii jąder ^{13}C i w sposób zdecydowany podwyższyło czułość metody. Impulsowa spektroskopia NMR oraz wprowadzenie do obróbki danych pomiarowych szybkiej transformacji Fouriera (spektroskopia FT-NMR) stanowiła również pierwszy krok w kierunku opracowania technik dwu i więcej wymiarowych. Dalszy rozwój i wejście na arenę badań makromolekularnych umożliwiło wprowadzenie w latach 80-tych ubiegłego wieku magnesów nadprzewodzących zapewniających bardzo silne i stabilne pole magnetyczne, czego konsekwencją jest wysoka czułość i bardzo duża rozdzielczość obecnie konstruowanych aparatów. Używane obecnie do badań nad makromolekułami (białka, kwasy nukleinowe) spektrometry pracują w polu o indukcji nawet 21 T równoważnemu częstości podstawowej aparatu dla jąder ^1H 900 MHz. Badań związków o mniejszej masie cząsteczkowej (typowe molekuly organiczne) dokonuje

się wykorzystując spektrometry pracujące przy częstości podstawowej 300 – 500 MHz, co porównując do pierwszych spektrometrów pracujących przy częstości 40 – 60 MHz obrazuje skalę postępu jaki dokonał się w tej technice badawczej.

1.2. Techniki dwuwymiarowej spektroskopii NMR

Wprowadzenie w połowie ubiegłego wieku techniki impulsowej połączonej z szybką transformacją Fouriera do pomiarów widm magnetycznego rezonansu jądrowego pozwoliło na szybki rozwój technik, w których do wzbudzania układu spinowego używano szeregu impulsów promieniowania radiowego, osiągając tym samym specjalne efekty, nieosiągalne dla metod opartych o pomiar widm w technice fali ciągłej. Między innymi techniki impulsowe pozwoliły na zaproponowanie wprowadzenia eksperymentów dwuwymiarowych przez Jeenera w 1971r [1].

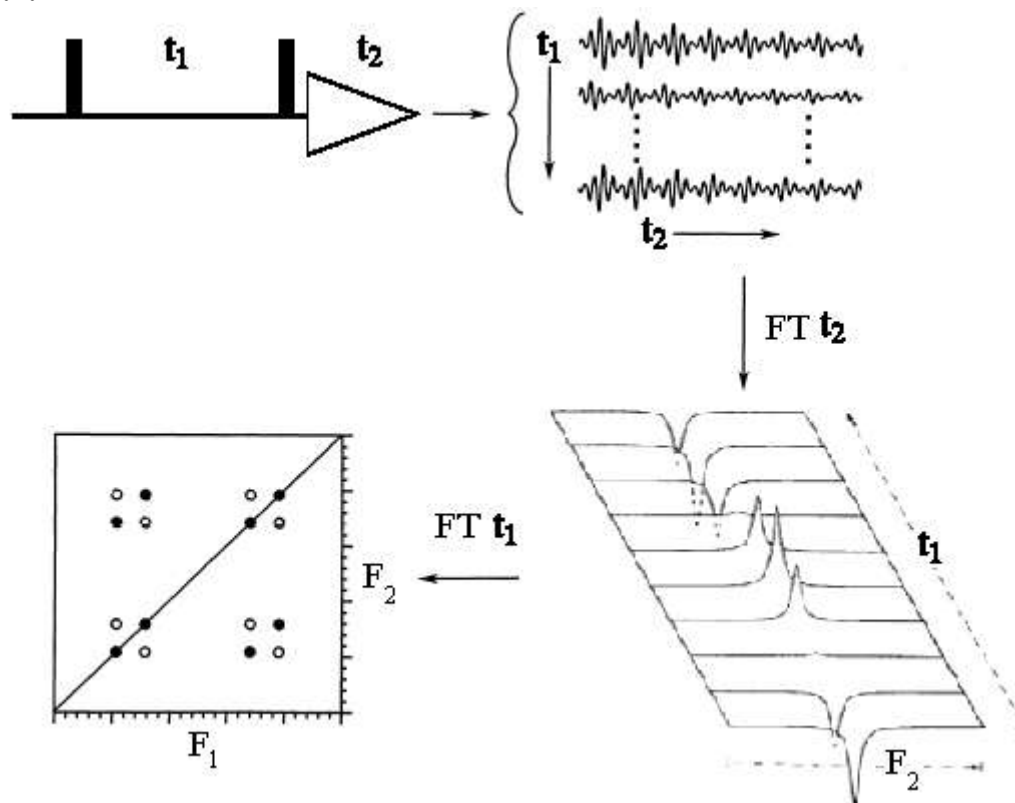
Sekwencję impulsową dowolnej techniki dwuwymiarowej spektroskopii NMR (2D NMR) można podzielić na następujące bloki [2]:

- przygotowanie układu spinowego,
- ewolucja układu (czas t_1),
- mieszanie stanów spinowych,
- detekcja sygnału (czas t_2).

Detekcja sygnału w widmach wielowymiarowych prowadzona jest w taki sam sposób jak w przypadku standardowego widma jednowymiarowego 1D. Stąd czas akwizycji sygnału t_2 odpowiada po transformacji Fouriera osi częstości F_2 widma 2D. Główną innowacją w stosunku do widm 1D jest wprowadzenie drugiej zmiennej czasowej – czasu ewolucji t_1 . Czas ten jest inkrementowany o stałą wielkość i dla każdej wartości czasu t_1 dokonuje się odrębnego pomiaru sygnału zaniku swobodnej precesji wektora magnetyzacji próbki (free induction decay – FID) w czasie t_2 . Otrzymane dane pomiarowe są więc funkcją obu czasów – ewolucji i detekcji. W wyniku transformacji Fouriera względem czasu detekcji otrzymuje się serię widm F_2 , różniących się od siebie intensywnościami i (lub) fazą poszczególnych sygnałów zgodnie ze zmieniającym się czasem t_1 . Kolejna transformacja Fouriera, tym razem „prostopadła” do osi F_2 względem czasu t_1 , daje widmo 2D jako funkcję dwóch częstości – F_2 i F_1 .

Rysunek 1.1 przedstawia założenia dwuwymiarowej spektroskopii NMR na podstawie najprostszej sekwencji impulsowej – sekwencji COSY (correlation spectroscopy).

Rys. 1.1.



FT t_2 – transformacja Fouriera względem czasu detekcji

FT t_1 – transformacja Fouriera względem czasu ewolucji

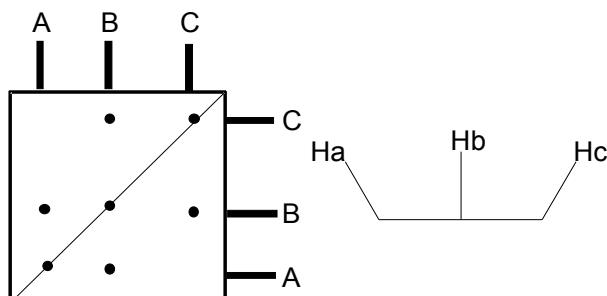
Do lat 90-tych opublikowano ponad 500 różnorodnych sekwencji impulsowych [3], z czego w powszechnym użyciu w badaniach nad strukturą związków używany jest niewielki ułamek. Poniżej przedstawiono opis najczęściej wykonywanych eksperymentów 2D NMR, które jednocześnie zostały wykorzystane w niniejszej pracy.

Widma COSY – COrrrelation SpectroscopY [2]

Eksperyment ten jest najstarszą i jednocześnie ciągle najczęściej wykonywaną techniką 2D NMR. Sygnały diagonalne widma są odwzorowaniem zwykłego widma 1D, natomiast sygnały pozadiagonalne powstają w wyniku sprzężenia spinowo-spinowego, pokazując sieć wzajemnych oddziaływań pomiędzy sąsiednimi protonami,

leżącymi w odległości 3 a czasami więcej wiązań (Rys. 1.2) i umożliwiając w ten sposób łatwe przypisanie sąsiadujących ze sobą grup protonów.

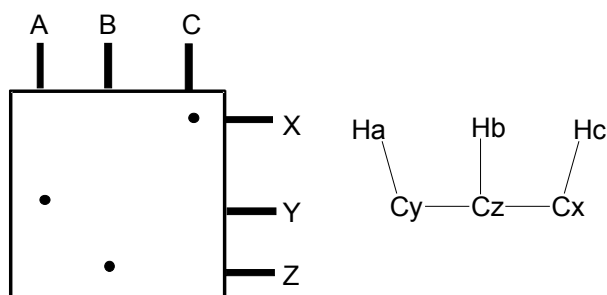
Rys. 1.2.



Widma HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy [4]

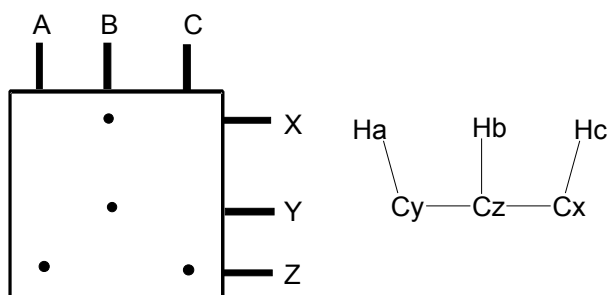
Widma HSQC służą do określenia korelacji atomów wodoru z bezpośrednio z nimi związanymi atomami węgla [^{13}C , ^1H]-HSQC (Rys. 1.3). Sekwencja ta funkcjonalnie odpowiada tradycyjnej sekwencji HETCOR (*HETeronuclear CORrelation spectroscopy*), w wyniku zastosowania której otrzymuje się widmo dostarczające tych samych informacji, jednakże pomiar sygnału jest dokonywany poprzez kanał ^1H a nie ^{13}C jak w przypadku sekwencji HETCOR, co znacznie zwiększa czułość i pozwala na pomiar dla dużo bardziej rozcieńczonych próbek w znacznie krótszym czasie. Sekwencja ta jest również bardzo często wykorzystywana w badaniach nad polipeptydami, białkami i kwasami nukleinowymi korelując atomy wodoru i azotu (^{15}N , ^1H)-HSQC), w sposób zdecydowany ułatwiając przypisanie sygnałów do odpowiednich protonów [5].

Rys. 1.3.



Widma HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation spectroscopy [6]

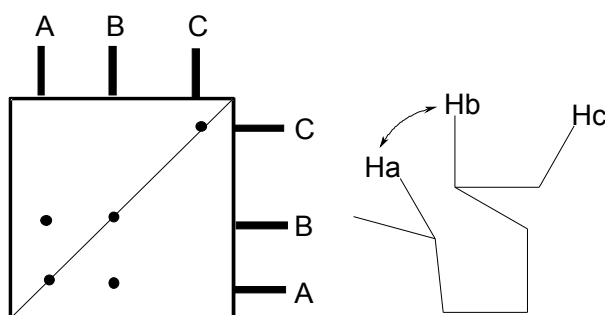
Tak jak powyższa sekwencja impulsowa również eksperyment HMBC posiada detekcję sygnału rezonansowego poprzez kanał protonowy. Sekwencja funkcjonalnie odpowiada eksperymentowi COLOC (*CO*relations spectroscopy via *LO*ng-range *C*ouplings) zatem w obu przypadkach sygnały korelacyjne obrazują oddziaływanie spinowo-spinowe pomiędzy atomami wodoru a atomami węgla oddalonymi o 3 lub więcej wiązań chemicznych (Rys. 1.4). Eksperyment jest optymalizowany względem stałej sprzężenia, stąd w przypadku odpowiedniej jej wartości dla danego układu spinowego, mogą pojawić się oddziaływania poprzez większą ilość wiązań. Ustawiając zatem odpowiednio długi czas mieszania, którego wartość jest właściwa dla obserwacji oddziaływań o danej stałej sprzężenia, można sterować zasięgiem obserwowanych sprzężeń.

Rys. 1.4.Widma NOESY – Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy [7]

Podstawą dla obserwowania widm NOESY jest występowanie w spektroskopii NMR zjawiska sprzężenia dipolowego. Polega ono na oddziaływaniu momentów magnetycznych dwu spinów jądrowych poprzez przestrzeń. Lokalne pole magnetyczne generowane przez jeden ze spinów w pozycji drugiego z nich zależy od ich wzajemnego położenia w przestrzeni – od odległości r pomiędzy nimi i kąta jaki tworzy wektor łączący oba atomy oraz wektor indukcji zewnętrznego pola magnetycznego B_0 . Szybka reorientacja molekuly w roztworze powoduje fluktuacje lokalnych pól magnetycznych, co prowadzi do relaksacji systemu spinowego. Ze względu na sprzężenie dipolowe oddziałujące spiny nie relaksują niezależnie ale

wpływają na siebie, powodując, iż każda zmiana w stanie spinowym jednego z nich jest przenoszona na stan spinowy drugiego, wybijając go ze stanu równowagi. Wpływ ten jest określany mianem jądrowego efektu Overhausera (NOE – *Nuclear Overhauser Enhancement*). Na widmie 2D NOESY objawia się on powstawaniem pozadiagonalnych sygnałów korelacyjnych pomiędzy protonami leżącymi w niewielkiej odległości w przestrzeni (rysunek poniżej), podczas gdy sygnały na diagonalnej widma są odzwierciedleniem zwykłego widma ^1H NMR.

Rys. 1.5.



Intensywność sygnałów korelacyjnych niesie cenną informację o odległości pomiędzy atomami [8, 9]. Zależy ona wprost od szybkości wzajemnej relaksacji oddziałujących spinów σ_{ij} . Dokładna analiza pokazuje, iż szybkość wzajemnej relaksacji układu spinowego można przedstawić za pomocą równania (1.1) wiążącego ją z odległością pomiędzy oddziałującymi spinami r [3].

$$\sigma_{ij} = W_2 - W_0 = \frac{\gamma_i^2 \gamma_j^2 \hbar^2 \tau_c}{10 r^6} \left(\frac{6}{1 + (\omega_i + \omega_j)^2 \tau_c^2} - \frac{1}{1 + (\omega_i - \omega_j)^2 \tau_c^2} \right) \quad (1.1)$$

γ – współczynnik giromagnetyczny, właściwy dla danego jądra

τ_c – czas korelacji, to jest czas potrzebny na obrócenie się cząsteczki o 1 rad

ω – częstość rezonansowa właściwa dla danego spinu

Obliczenie wzajemnej odległości oddziałujących spinów, w najprostszym przypadku, możliwe jest z pomocą znanej odległości pomiędzy protonami w danej molekuły i intensywności sygnału NOE pomiędzy nimi, tak jak przedstawiono to w części eksperymentalnej. Jednakże zakłada się przy tym, że czas korelacji dla różnych wektorów międzyatomowych w danej cząsteczce jest taki sam, czyli molekuła rotuje jako sztywny izotropowy układ, co oczywiście nie zawsze jest prawdziwe. Układ jako

całość może rotować nieizotropowo, co jest częste dla cząsteczek wydłużonych i szczególnie uwidacznia się dla pomiarów kwasów nukleinowych. Również poszczególne fragmenty cząsteczki mogą rotować z innymi czasami korelacji – np. w przypadku białek, gdzie boczne, „luźne” łańcuchy węglowodorowe podlegają znacznie szybszym ruchom niż sztywne, gęsto upakowane wnętrze. Co więcej, zakłada się również, iż rozważany układ spinowy jest izolowany, to znaczy nie oddziałuje z pozostałymi protonami lub oddziaływania te nie interferują ze sobą w żaden sposób, co oczywiście praktycznie nigdy nie jest do końca spełnione. W związku z tym okazać się może, iż obliczona odległość jest za duża, ze względu na spadek intensywności sygnału w wyniku transferu magnetyzacji na sąsiednie atomy (zjawisko dyfuzji spinowej występujące szczególnie w przypadku makromolekuł), lub odwrotnie, za mała, ze względu na przekazywanie magnetyzacji poprzez atomy stojące pomiędzy atomami skorelowanymi sygnałem NOE, a które mogą znajdować się nawet w zbyt dużej odległości aby mógł powstać bezpośredni efekt NOE. Ponieważ dla zaistnienia tych zjawisk potrzeba więcej czasu niż dla wystąpienia bezpośredniego sygnału NOE, unika się ich poprzez pomiar widm NOESY z możliwie jak najkrótszym czasem mieszania, w trakcie którego następuje transfer magnetyzacji [10]. Kolejna trudność występująca podczas interpretacji ilościowej widm NOESY wynika z istnienia równocennych magnetycznie atomów w badanych związkach. Odległość obliczona dla takiego układu będzie średnią odległością do równocennych atomów, które mogą wtedy być reprezentowane jako jeden „pseudoatom”, ułożony pomiędzy nimi [11]. Również zjawiska dynamiki molekularnej mogą komplikować obraz widma NOESY, wprowadzając sygnały wymiany konformacyjnej (jeżeli czas życia obu konformacji jest wystarczająco długi), bądź dając obraz uśrednionej konformacji, dla procesów szybkiej wymiany, która w rzeczywistości może nie istnieć. Ten ostatni problem dotyczy w szczególności makrocząsteczek, co może prowadzić w rezultacie do pewnych niezgodności z wartościami kątów pomiędzy wiązaniami czy z wartościami długości wiązań w obliczonej konformacji molekuly.

Konsekwencją powyższych trudności w wyznaczaniu odległości pomiędzy atomami z intensywności efektu NOE powszechne jest w badaniach biochemicznych pólnościowe traktowanie intensywności sygnałów korelacyjnych odczytanych z widm NOESY [12]. Sygnały korelacyjne dzieli się na klasy ze względu na ich intensywność a następnie każdej z klas przyznaje się wartość maksymalnej odległości pomiędzy oddziałującymi protonami. Według tego kryterium analizy sygnały NOE dzieli się na silne, dla których przypisuje się odległość pomiędzy atomami do 2,7 Å, średnie – 3,3 Å i słabe – 5,0 Å. Dla małych cząsteczek organicznych, których rotacja w roztworze jest znacznie szybsza i w związku z tym czas korelacji ma znacznie niższą wartość, efekt NOE jest słabszy (zmienia się również jego znak), a zatem podane odległości ulegają zmniejszeniu.

Analiza widm NOESY małych cząsteczek organicznych o masach do ok. 800 Da (w zależności od natężenia pola magnesu spektrometru, lepkości użytego rozpuszczalnika) w znacznie mniejszym stopniu jest utrudniona przez wyżej wymienione komplikacje [13]. Cząsteczki te z reguły dają dobrze rozdzielone widma ^1H NMR pozwalając na dokładne przypisanie sygnałów do odpowiednich protonów oraz w zdecydowany sposób ułatwiając całkowanie sygnałów NOE. Nową komplikacją jest podatność małych cząsteczek na inne mechanizmy relaksacji – poprzez oddziaływanie z rozpuszczalnikiem, czy też zanieczyszczeniami paramagnetycznymi, jak choćby rozpuszczony w roztworze tlen, co może powodować znaczne osłabienie efektu NOE [14-16]. Efekt ten można jednak zminimalizować, odpowiednio projektując eksperyment. Najtrudniejsze w analizie konformacyjnej małych cząsteczek jest spełnienie założenia, iż cząsteczka jest konformacyjnie jednorodna (brak szybkich procesów tworzenia się równowag konformacyjnych) – jak dotąd brak jest doniesień rozwiązujących ten problem. Zakłada się przeto, iż molekula występuje w jednej dominującej konformacji lub rodzinie konformacji, pozostających ze sobą w dużej zgodności [13]. Weryfikacją tego założenia jest brak niezgodności pomiędzy danymi eksperymentalnymi uzyskanymi z widm NOESY a obliczoną konformacją związku, jak i brak niezgodności pomiędzy eksperymentem a teoretycznie

obliczonym z wynikowej konformacji widmem NOESY – w przypadku obecności szybkiej wymiany konformacyjnej pomiędzy znacząco różniącymi się konformacjami (co w rezultacie daje uśrednioną, nieistniejącą w rzeczywistości konformację obliczoną z danych NOE) takie niezgodności się pojawiają [17].

1.3. Spektroskopia NMR w analizie i projektowaniu substancji leczniczych

Ponieważ obecnie używane leki są w większości produktem syntezy organicznej, bądź też są wyodrębniane w czystej postaci ze źródeł naturalnych, spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego była i jest głównie używana do potwierdzania lub wyznaczenia struktury chemicznej substancji leczniczej. W ostatnich latach wprowadzono metody spektroskopii NMR do analiz ilościowych w celu oznaczenia profilu zanieczyszczeń leku, charakteryzowania składu ilościowego produktów leczniczych czy też oznaczania metabolitów leków w płynach ustrojowych [18]. W tym ostatnim przypadku bardzo ważną rolę pełni spektroskopia jąder ^{19}F i ^{31}P [19, 20] ze względu na brak problemu wygaszania silnego sygnału rezonansowego wody, który występuje podczas pomiarów widm protonowych.

Ostatnio bardzo ważną rolę pełnić zaczęła spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach nad nowymi, potencjalnymi substancjami leczniczymi, jako metoda wykrywania związków wiodących [21-24], oraz w procesie racjonalnego projektowania leków [25]. Rozwój metod kombinatoryjnych w chemii medycznej doprowadził do powstawania obszernych bibliotek związków, poddawanych w dalszym etapie prac nad substancjami wiodącymi próbom wiązania do białek receptorowych. W badaniach tych spektroskopia NMR okazała się niezwykle cenną metodą w poszukiwaniu związków ulegających wiązaniu do makromolekuł, wykorzystując do tego celu różne techniki pomiarowe – obserwując zmiany przesunięcia chemicznego sygnałów rezonansowych, międzycząsteczkowy transfer magnetyzacji, objawiający się skróceniem czasu relaksacji i silnym poszerzeniem linii rezonansowych, zmiany w znaku efektu NOE, czy też zmiany współczynnika dyfuzji po związaniu małowcząsteczkowego ligandu do docelowego białka. Poszukiwania potencjalnych ligandów receptorów białkowych przy użyciu spektroskopii

magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwiają zidentyfikowanie związków, które posiadają nawet niewielkie powinowactwo do docelowego receptora (stała dysocjacji kompleksu rzędu 0,1 M), nie wymagając wcześniejszej wiedzy z zakresu funkcjonalności danego białka. Oprócz wykrycia wiązania małowcząsteczkowego związku do białka umożliwiają jednocześnie wyznaczenie stałej wiązania (dla układów, w których stała dysocjacji $K_D \geq 10 \mu\text{M}$) [26]. Badania te prowadzone mogą być zarówno w oparciu o pomiar własności spektroskopowych białka jak i samych ligandów. Wśród metod opartych o pomiary widm NMR receptora, dla białek o masach do 30 kDa najczęściej stosowaną metodą jest rejestrowanie widma [^{15}N , ^1H]-HSQC białka maksymalnie wzbogaconego w izotop ^{15}N bez i w obecności mieszaniny potencjalnych ligandów. Podobną metodą jest analogiczny pomiar widm [^{13}C , ^1H]-HSQC białka selektywnie wzbogaconego w izotop ^{13}C (znakuje się w ten sposób tylko atomy węgla grup metylowych waliny, leucyny i izoleucyny) [27]. Jeżeli cząsteczka ligandu zwiąże się z badanym białkiem następuje zmiana w przesunięciach chemicznych atomów w miejscu wiązania, co można stwierdzić porównując odpowiednie widma HSQC. Znając przypisanie poszczególnych sygnałów rezonansowych makromolekuły można ponadto określić, czy badany ligand związał się w centrum aktywnym. Możliwe jest również określenie orientacji cząsteczki ligandu w miejscu wiązania [28-30]. Wadą wyżej wymienionych metod jest potrzeba otrzymania dość dużej ilości izotopowo znaczonego białka, co jest obecnie możliwe przy użyciu metod biotechnologicznych [5]. Metody oparte o pomiar własności spektroskopowych ligandów są zatem stosowane z wyboru w przypadku gdy otrzymanie znakowanego białka jest trudne. Ponadto stosuje się je, gdy badane białko przejawia tendencję do agregowania, jeżeli jego struktura jest nieznana a także jeżeli ma dużą masę cząsteczkową. W pomiarach tych obserwuje się poszerzenie linii sygnałów rezonansowych ligandów po związaniu z makromolekułą, powstawanie efektu NOE pomiędzy ligandem a receptorem oraz zmianę znaku wewnątrzcząsteczkowego efektu NOE po związaniu liganda do receptora [31]. Stosuje się również metody oparte na międzycząsteczkowym transferze magnetyzacji [32-36]

oraz znakowanie miejsca wiążącego receptora znacznikiem spinowym, powodującym bardzo znaczne poszerzenie linii rezonansowych wiążącego się ligandu – metoda SLAPSTIC (*Spin Labels Attached to Protein Side chains as a Tool to identify Interacting Compounds*) [37].

Badania typu struktura a aktywność poprzez metody magnetycznego rezonansu jądrowego (SAR by NMR – *Structure-Activity Relationship by NMR*) znalazły bardzo szerokie zastosowanie w poszukiwaniu substancji wiodących dla nowych leków [38, 39]. Polegają one na wykrywaniu małych cząsteczek organicznych wiążących się jednocześnie do białka w obrębie centrum aktywnego, w niewielkiej odległości od siebie. Związki te są identyfikowane, ich struktura jest optymalizowana, a następnie są łączone w jeden ligand o wysokim powinowactwie do centrum aktywnego. W projektowaniu fragmentu łączącego bardzo ważną rolę odgrywają widma NOESY, dostarczając informacji jak są zorientowane względem siebie związane w centrum aktywnym białka molekule [40], jak również pozwalając na oszacowanie odległości pomiędzy nimi z pomiarów intensywności efektu NOE [41].

Widma NOESY odgrywają nieocenioną rolę w wyznaczaniu struktury przestrzennej białek czy kwasów nukleinowych [5]. Jako jedyne pozwalają one na określenie jej w roztworze, co odgrywa bardzo ważną rolę w zrozumieniu funkcjonowania makromolekule, jej właściwości chemicznych i fizycznych, w naturalnym dla niej środowisku. Poznanie struktury przestrzennej miejsca wiążącego pozwala na racjonalne projektowanie leku dla konkretnego receptora lub dla sterowania konkretnym szlakiem metabolicznym. Do roku 2003 już około 15% ze wszystkich struktur przestrzennych zdeponowanych w Protein Data Bank zostało rozwiązanych poprzez badania NMR [42]. Ponieważ w wyniku pomiarów widm makrocząsteczek otrzymuje się bardzo rozległe zbiory danych, obecnie do ich analizy i dalszego obliczenia struktury przestrzennej wykorzystuje się automatyczne metody obliczeniowe [42-45].

1.4. NMR w badaniach nad arylopiperazynami – potencjalnymi ligandami receptorów serotoniniowych 5-HT_{1A}

Receptory serotoniniowe są często docelowymi miejscem wiązania wielu leków działających na ośrodkowy układ nerwowy. Dotychczasowe badania w tej klasie pochodnych wskazują na bardzo duży wpływ niewielkich zmian strukturalnych na powinowactwo ligandu do receptora jak i na jego aktywność fizjologiczną [46]. Jedną z częściej badanych grup związków są różne pochodne arylopiperazyn a wśród nich długołańcuchowe arylopiperazyny. Większość z nich zawiera łańcuch alifatyczny różnej długości, na którego jednym końcu przyłączony jest fragment arylopiperazynowy, na drugim zaś inna, bardzo często amidowa, grupa farmakoforowa. Modyfikacje długołańcuchowych arylopiperazyn są wprowadzane głównie w tych dwu końcach cząsteczki lub w samym łączniku. Pomimo licznych badań prowadzonych nad tą grupą związków ich konformacja ciągle nie jest jednoznacznie wyznaczona. Szereg badań krystalograficznych [47-49] pokazało, iż w fazie stałej dominuje konformacja maksymalnie rozciągnięta węglowodorowego łańcucha łącznikowego (Rys. 5.1), choć w poszczególnych przypadkach odnotowuje się obecność konformacji zgiętej (Rys. 5.2), w której atomy wodoru znajdujące się przy końcowych grupach metylenowych łańcucha łącznikowego znajdują się w swoim bezpośrednim sąsiedztwie. Badania w roztworze przy użyciu spektroskopii NMR zostały dotychczas przeprowadzone dla niewielkiej ilości związków. [50-53]. Norman i wsp. [50] porównuje w swej pracy konformacje otrzymane w wyniku pomiarów krystalograficznych z wynikami otrzymanymi z widm NOESY. Donosi on, iż w kryształach obserwowana jest konformacja maksymalnie rozciągnięta łańcucha łącznikowego, podczas gdy pomiary przeprowadzone w roztworze dla tych samych pochodnych wskazują na obecność konformacji zgiętej. Pozostali autorzy również donoszą o obecności konformacji zgiętej w badaniach prowadzonych w roztworze, jednakże jak do tej pory nie ukazały się w literaturze żadne doniesienia o systematycznych badaniach nad konformacjami arylopiperazyn w roztworze. Wydaje się, iż badania takie, w zestawieniu z wynikami badań nad aktywnością pochodnych

arylopiperazyn, pomogą w zrozumieniu konformacji bioaktywnej tych związków i pomogą w projektowaniu bardziej specyficznych w wiązaniu do receptorów i aktywnych funkcjonalnie pochodnych.

2. Cel pracy

Badania konformacyjne związków pozwalają na wyznaczenie zależności pomiędzy strukturą chemiczną a przestrzenną molekuł. W połączeniu z badaniami farmakologicznymi mogą przyczynić się do wyznaczenia konformacji potencjalnego ligandu w centrum aktywnym, a co za tym idzie do ułatwienia projektowania dalszych pochodnych o zwiększonym powinowactwie do receptora. Ponieważ grupę długołańcuchowych arylopiperazyn cechuje duża różnorodność strukturalna we fragmentach farmakoforowych, celowym wydaje się przebadanie własności spektroskopowych możliwie szerokiej puli związków w różnych warunkach. Badania te mają ustalić dominującą konformację badanych związków w roztworze, wpływ polarności środowiska na konformację (badania w różnych rozpuszczalnikach) oraz wpływ protonowania układu piperazyny na konformację związków w różnym środowisku. Wyniki badań konformacyjnych przeprowadzonych przy użyciu spektroskopii NMR zostaną następnie zestawione z wynikami badań farmakologicznych oraz wynikami obliczeń kwantowomechanicznych modelujących *in silico* konformacje długołańcuchowych arylopiperazyn.

Celem niniejszej pracy, będącej fragmentem wyżej nakreślonego projektu badawczego realizowanego wspólnie przez Instytut Farmakologii PAN, Politechnikę Krakowską oraz Pracownię Spektroskopii NMR Collegium Medicum UJ, finansowanego przez Komitet Badań Naukowych, jest wyznaczenie własności spektroskopowych szeregu arylopiperazyn, występujących zarówno w postaci soli jak i wolnych zasad, w różnych rozpuszczalnikach (polarnym i niepolarnym) oraz wyznaczenie konformacji związków na podstawie analizy widm NOESY.

3. Część eksperymentalna

3.1. Odczynniki i aparatura

Rozpuszczalniki deuterowane:

Zakupione w firmie Armar AG – Szwajcaria:

- chloroform – D, 99,8% D
- dimetylosulfotlenek – D₆, 99,8% D

Zakupione w firmie Deutero GmbH – Niemcy:

- chloroform – D, 99,8% D
- dimetylosulfotlenek – D₆, 99,8% D

Badane związki:

Substancje przebadane w niniejszej pracy zostały zsyntetyzowane, w ramach wspólnego projektu badawczego, przez Zakład Chemii Leków Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk.

Probówki pomiarowe:

Probówki do spektroskopii NMR, typ 5 HP (High Precision) – średnica zew. $4,97 \pm 0,013$ mm, długość 178 mm firmy Armar AG – Szwajcaria.

Aparatura:

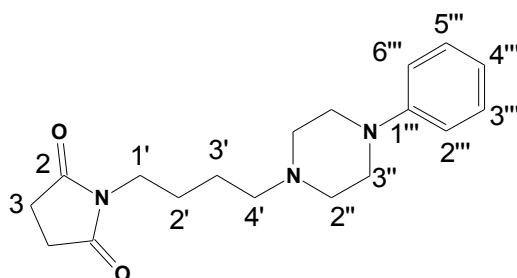
Spektrometr Mercury-VX firmy Varian – USA, pracujący przy częstotliwości podstawowej dla jąder ¹H – 300,08 MHz. Spektrometr jest wyposażony w magnes nadprzewodzący firmy Oxford – Wielka Brytania, pracujący w polu magnetycznym o indukcji 7,2 T, przystawkę temperaturową pozwalającą na kontrolowanie temperatury pomiaru w zakresie 0 – 100°C z dokładnością $\pm 0,1^\circ\text{C}$ oraz jednostkę generatora impulsów gradientowych pola magnetycznego wzdłuż osi magnesu – PFG (*Pulse Field Gradient*) – Performa I. Zakresy pomiarowe obejmują jądra ¹H, ¹³C, ¹⁹F i ³¹P i są automatycznie wybierane podczas definiowania eksperymentu, bez potrzeby przestrajania sondy. System pracuje pod kontrolą stacji roboczej Ultra 5 firmy Sun Microsystems – USA, wyposażonej w procesor RISC 270 MHz, 192 MB pamięci RAM i 80 GB pamięci dyskowej, działającej w środowisku UNIX – Solaris 9 edycja

04/09 firmy Sun Microsystems. Kontrolę pracy spektrometru, akwizycję i obróbkę danych pomiarowych zapewniły programy Vnmr 6.1C oraz VnmrJ 1.1D firmy Varian.

3.2. Nomenklatura badanych związków

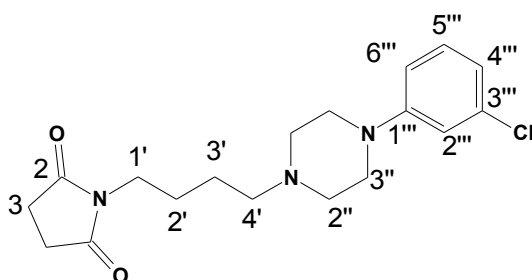
Poniżej przedstawiono wzory i nazwy systematyczne badanych arylopiperazyn wraz z numeracją atomów użytą w opisie interpretacji widm:

związek 1:



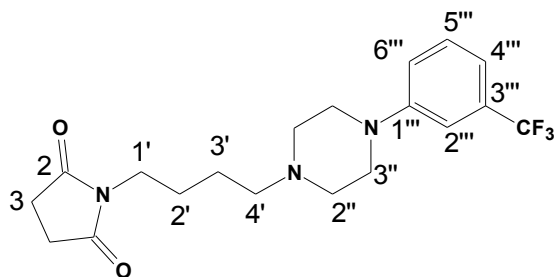
nazwa systematyczna: 1-[4-(4-fenilo-1-piperazynylo)butylo]pirolidyno-2,5-dion;

związek 2:



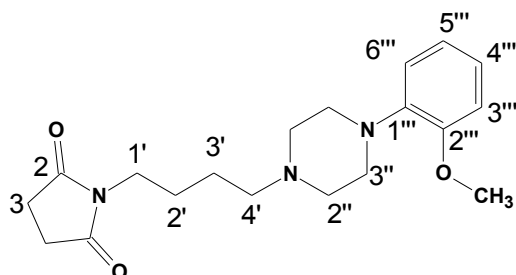
nazwa systematyczna: 1-{4-[4-(3-chlorofenyl)-1-piperazynylo]butylo}pirolidyno-2,5-dion;

związek 3:



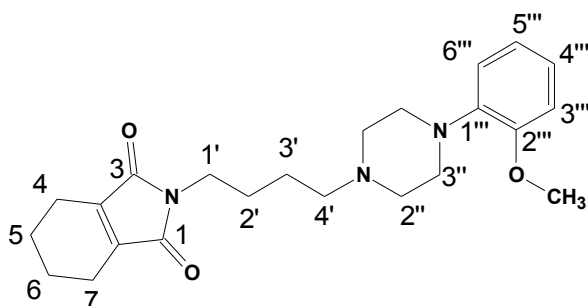
nazwa systematyczna: 1-{4-[4-(3-trifluorometylofenylo)-1-piperazynylo]butylo}pirolidyno-2,5-dion;

związek 4:



nazwa systematyczna: 1-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}pirolidyno-2,5-dion;

związek 5:

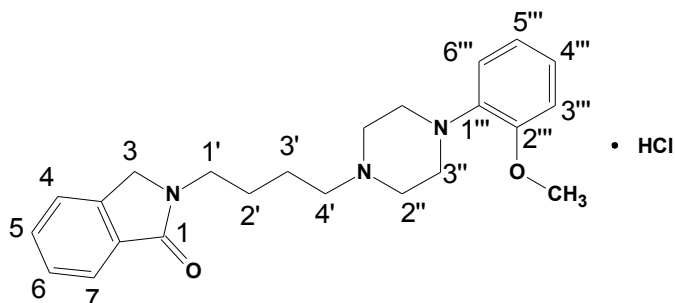


nazwa systematyczna: 2-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-izoindolo-1,3-dion;

związek 6:

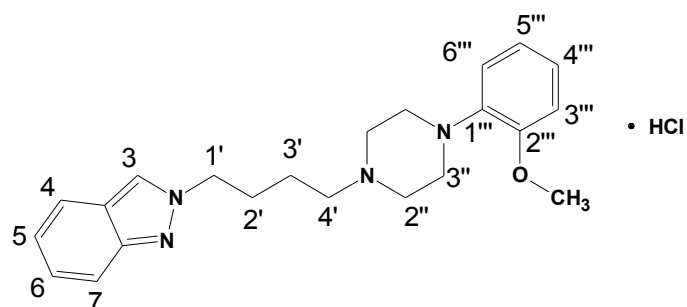
chlorowodorek związku 4;

związek 7:



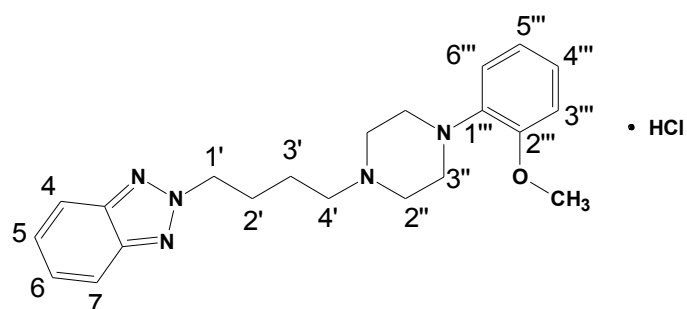
nazwa systematyczna: chlorowodorek 2-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}izoindolin-1-onu;

związek 8:



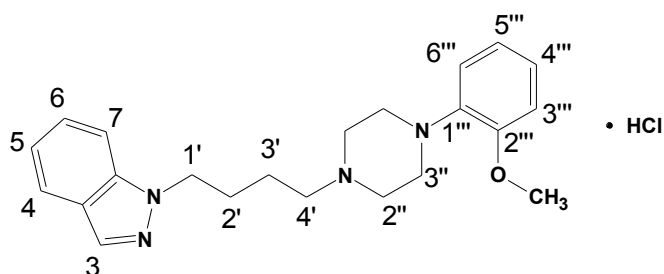
nazwa systematyczna: chlorowodorek 2-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-2*H*-indazolu;

związek 9:



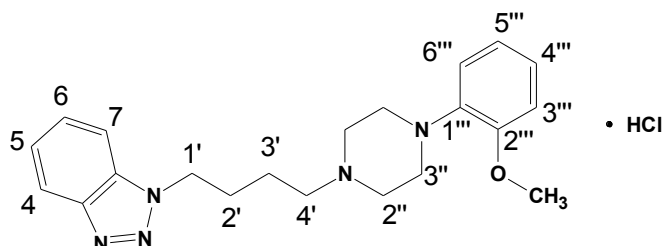
nazwa systematyczna: chlorowodorek 2-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-2*H*-1,2,3-benzotriazolu;

związek 10:



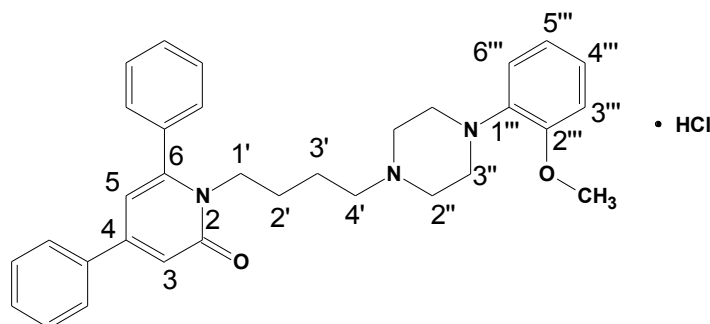
nazwa systematyczna: chlorowodorek 1-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-1*H*-indazolu;

związek **11**:



nazwa systematyczna: chlorowodorek 1-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-1*H*-1,2,3-benzotriazolu;

związek **12**:



nazwa systematyczna: chlorowodorek 4,6-difenylo-1-{4-[4-(2-metoksyfenylo)-1-piperazynylo]butylo}-2[1*H*]-pirydonu;

3.3. Przygotowanie próbek i akwizycja danych.

Przygotowanie próbki:

10 mg badanego związku rozpuszczano w 0,7 ml odpowiedniego rozpuszczalnika. Jeżeli próbka nie uległa całkowitemu rozpuszczeniu dekantowano ciecz z nad osadu i w razie potrzeby sączono.

Akwizycja widm 1D ¹H NMR:

Wszystkie pomiary przeprowadzano w temperaturze 28°C więc aby zminimalizować gradienty temperatury wewnątrz próbki, po umieszczeniu jej w spektrometrze, stabilizowano przez 10 min w temperaturze pomiaru. Następnie przeprowadzano

akwizycję widma 1D wykonując 16 powtórzeń rejestracji FID. Próbkę wzbudzano pulsem 45°, czas relaksacji wynosił 1 s. Całkowity czas pomiaru wynosił 49 s.

Akwizycja widm 2D NMR:

Widma COSY i NOESY rejestrowano stosując standardowe sekwencje spektrometru. Widma heterokorelacyjne zbierano używając gradientowych sekwencji impulsowych pakietu Chempack firmy Varian. Dokonując pomiarów stosowano niżej podane parametry.

- Widma COSY – rejestrację prowadzono przy użyciu sekwencji COSY45 zapewniającej zmniejszenie intensywności sygnałów diagonalnych widma. Szerokość okna pomiarowego wynosiła około 2500 Hz w obu wymiarach. Pomiar przeprowadzano rejestrując 8 powtórzeń dla każdego z 512 inkrementów czasu t_1 , czas relaksacji wynosił 1 s, całkowity czas pomiaru 1 h, 33 min.
- Widma HSQC – pomiar przeprowadzano rejestrując 32 powtórzenia dla każdego z 256 inkrementów czasu t_1 , czas relaksacji wynosił 1 s, całkowity czas pomiaru 5 h, 50 min. Szerokość okna pomiarowego wynosiła około 2500 Hz dla kanału protonowego i około 11000 Hz dla kanału węglowego.
- Widma HMBC – pomiar przeprowadzano rejestrując w zależności od stężenia 16 lub 32 powtórzenia dla każdego z 400 inkrementów czasu t_1 , czas relaksacji wynosił 1 s, całkowity czas pomiaru 2 h, 15 min lub 4 h, 35 min. Szerokość okna pomiarowego wynosiła około 2500 Hz dla kanału protonowego i około 16000 Hz dla kanału węglowego. Eksperyment optymalizowano dla stałej sprzężenia proton-węgiel $J_{CH} = 8$ Hz.
- Widma NOESY – pomiar przeprowadzano rejestrując 16 powtórzeń dla każdego z 512 inkrementów czasu t_1 , czas relaksacji wynosił 1 s, czas mieszania 0,3 s, całkowity czas pomiaru 7 h, 30 min. Szerokość okna pomiarowego wynosiła około 2500 Hz w obu wymiarach.

3.4. Interpretacja widm i metody obliczeniowe

Przypisanie sygnałów z widma ^1H NMR do odpowiednich grup protonów dokonywano na podstawie analizy widma korelacyjnego 2D COSY. W przypadkach wątpliwych,

silnego nakładania się sygnałów rezonansowych, posiłkowano się informacjami płynącymi z widm heterokorelacyjnych. Analiza tych widm pozwoliła na dokładniejszy opis spektroskopowy badanych związków dostarczając informacji o przesunięciu chemicznym atomów węgla. Wyniki interpretacji zebrano w tabelach zamieszczanych poniżej odpowiednich widm. W tabelach tych zamieszczono przesunięcia chemiczne protonów oraz atomów węgla jak i jednoznacznie zidentyfikowane sprzężenia spinowo-spinowe homo- (w przypadku widm COSY) jak i heterojądrowe (widma HMBC).

Analiza widm 2D NOESY.

Znając przesunięcia chemiczne odpowiednich protonów z widm NOESY odczytywano oddziaływania NOE pomiędzy nimi, określając, które z nich znajdują się w sąsiedztwie w przestrzeni. Po jednoznacznym przypisaniu oddziałujących protonów sygnał NOE całkowano otrzymując jego objętość I (miara intensywności efektu NOE). Zgodnie z równaniem (1.1) intensywność sygnału jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy oddziałującymi protonami. Zależność tą można przedstawić za pomocą uproszczonego równania:

$$I = \frac{a}{r^6} \quad (4.1)$$

Określając w strukturze przestrzennej związku znaną odległość i traktując ją jako wzorcową, można obliczyć stałą a charakterystyczną dla danego pomiaru. Dla związków **1** – **4** za wzorcową wzięto odległość pomiędzy protonami *orto* pierścienia fenyłowego a protonami H3 piperazyny znajdującymi się w pozycji ekwatorialnej. Wybór ten podyktowany był występowaniem silnego sygnału korelacyjnego w badanych związkach, pomiędzy wymienionymi protonami, niezależnego od rodzaju użytego rozpuszczalnika, co pozwoliło założyć, iż odległość pomiędzy odpowiednimi protonami pozostaje stała, lub podlega zaniedbywalnym zmianom. Odległość tą wyznaczono *in silico* w wyniku optymalizacji geometrii prostego układu N-fenylopiperazyny metodą półempiryczną PM3. W przypadku dalszych pochodnych odległość ta przestała być użyteczną ze względu na pojawienie się dużej zmienności

intensywności omawianego sygnału, co sugeruje zmiany w geometrii wzajemnego ułożenia pierścieni fenyłowego i piperazynowego. Ponieważ dalsze pochodne posiadają grupę metoksyłową w pozycji *orto* pierścienia fenyłowego za odległość wzorcową dla tych związków uznano odległość pomiędzy protonami grupy metylowej reszty metoksyłowej a protonem w pozycji 3 pierścienia fenyłowego. W każdej z tych pochodnych (związki **4** – **12**) występuje bowiem silny sygnał NOE pomiędzy omawianymi protonami. Odległość tą wyznaczono z widma NOESY związku **4** w CDCl₃ i założono, iż pozostaje ona stała we wszystkich dalszych pochodnych *orto*-metoksyfenylopiperazyny.

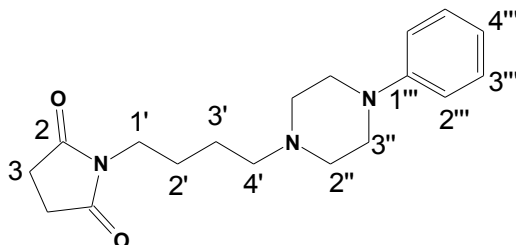
Znając wartość stałej a obliczano następnie, posługując się równaniem (4.1), średnie odległości r pomiędzy pozostałymi oddziałującymi protonami w badanym związku, wykorzystując intensywności I odpowiednich oddziaływań NOE. Do obliczeń brano jedynie wartości całek sygnałów jednoznacznie przypisanych do odpowiednich grup protonów, pomijając te, w których przypisanie nie było możliwe ze względu na nakładanie się sygnałów.

Wyznaczenie konformacji związku.

Wyznaczone z widm NOESY średnie odległości pomiędzy protonami wprowadzano jako ograniczenie swobody konformacyjnej do obliczeń optymalizacji geometrii. Optymalizację prowadzono metodą półempiryczną PM3 przy użyciu programu HyperChem firmy Hypercube. Wyniki optymalizacji przedstawiono jako rysunki odpowiednich struktur.

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

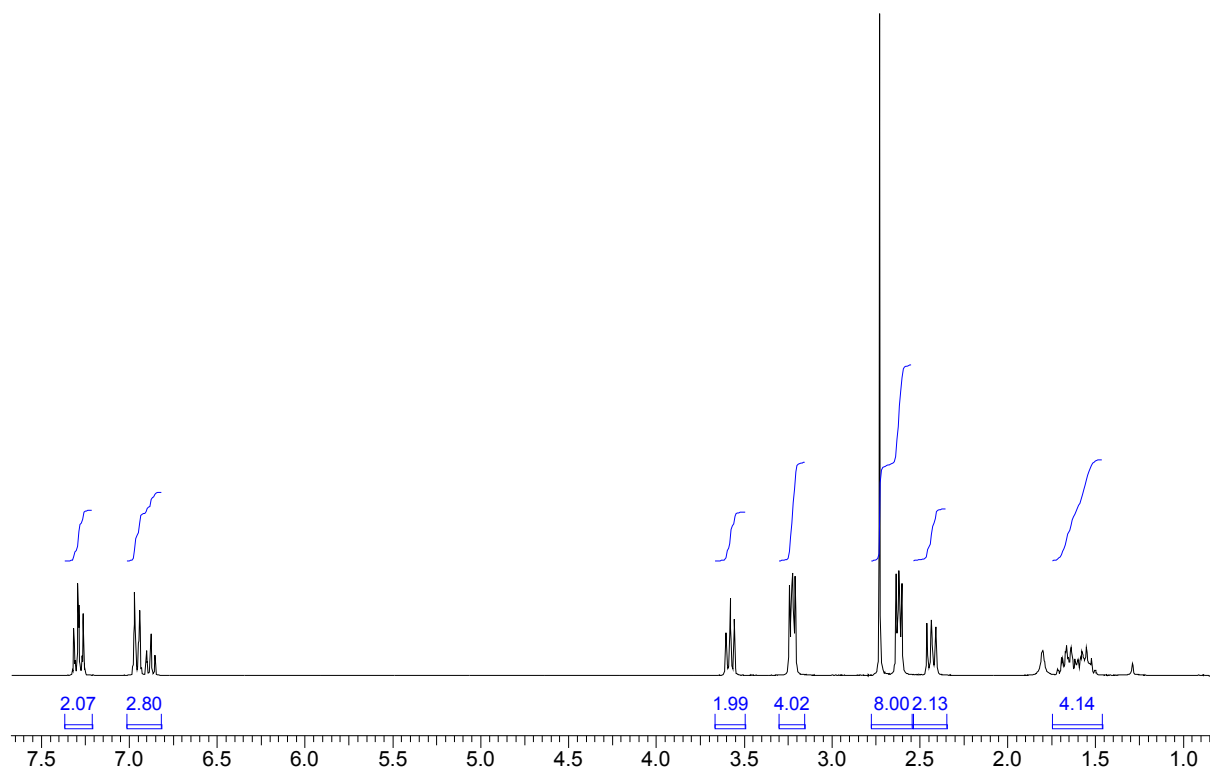
4.1. Związek 1



Pomiary przeprowadzono w CDCl_3 jak i w DMSO.

Interpretacja widm otrzymanych w roztworze CDCl_3 :

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów zamieszczono w tabeli 4.1.1 razem z interpretacją widma COSY.

Widmo COSY:

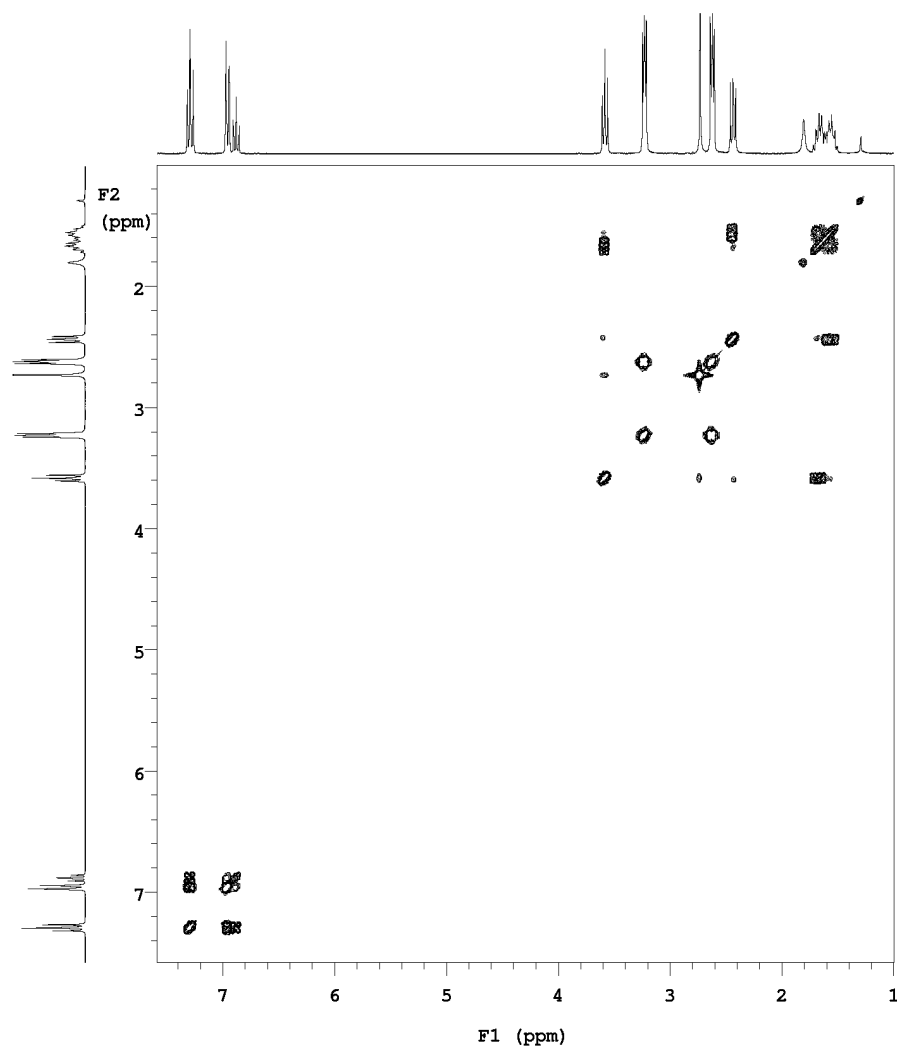


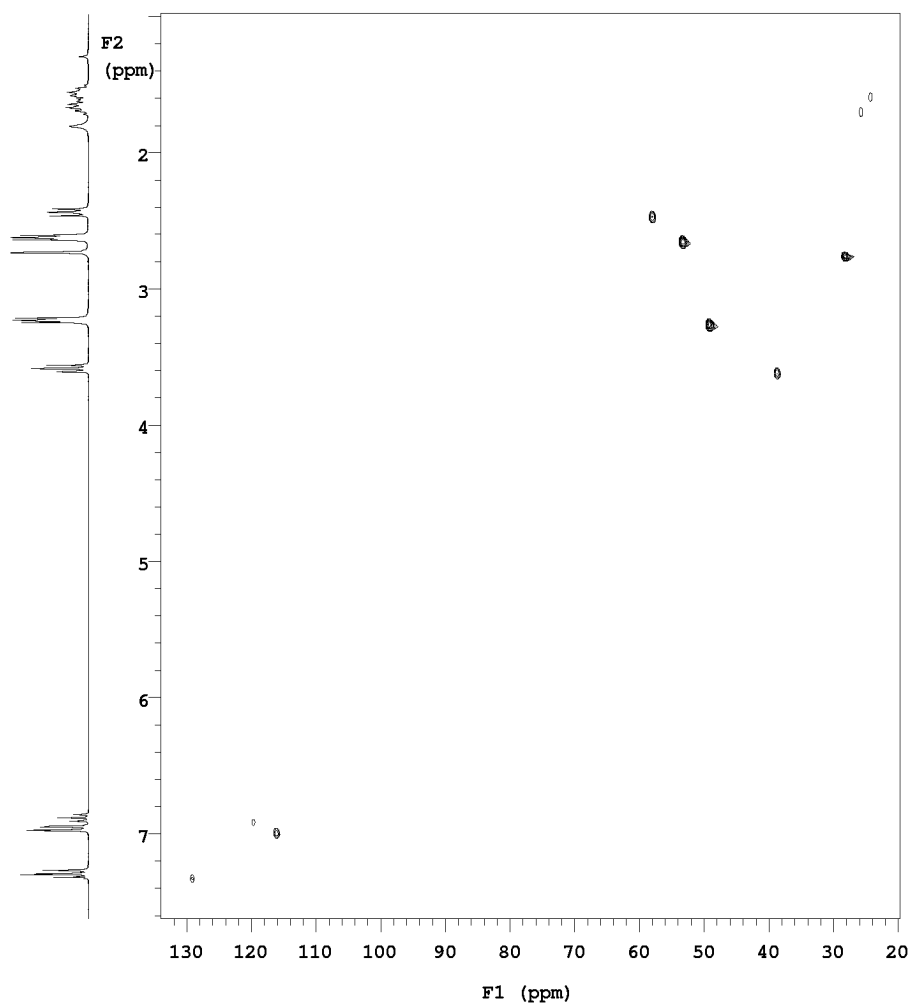
Tabela 4.1.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,73	singlet	4	-	H1'
H1'	3,58	tryplet	2	7,1	H3, H2', H3', H4'
H2'	1,60-1,75	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,50-1,60	multiplet	2	-	H1', H2', H4'
H4'	2,43	tryplet	2	7,1	H1', H2', H3'
H2''	2,62	tryplet	4	4,9	H3''
H3''	3,23	tryplet	4	4,9	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2'''	6,97	multiplet	2	-	H3''', H4'''
H3'''	7,29	multiplet	2	-	H2''', H4'''
H4'''	6,88	multiplet	1	-	H3''', H4'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

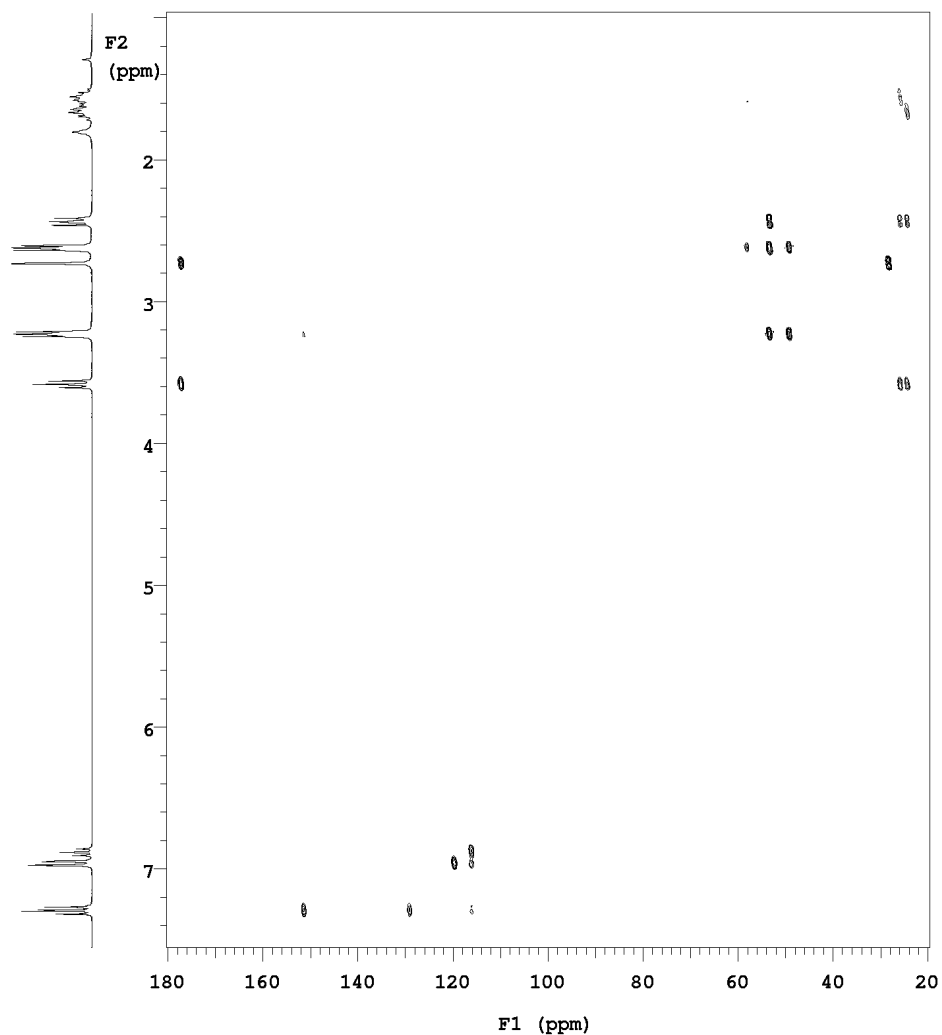


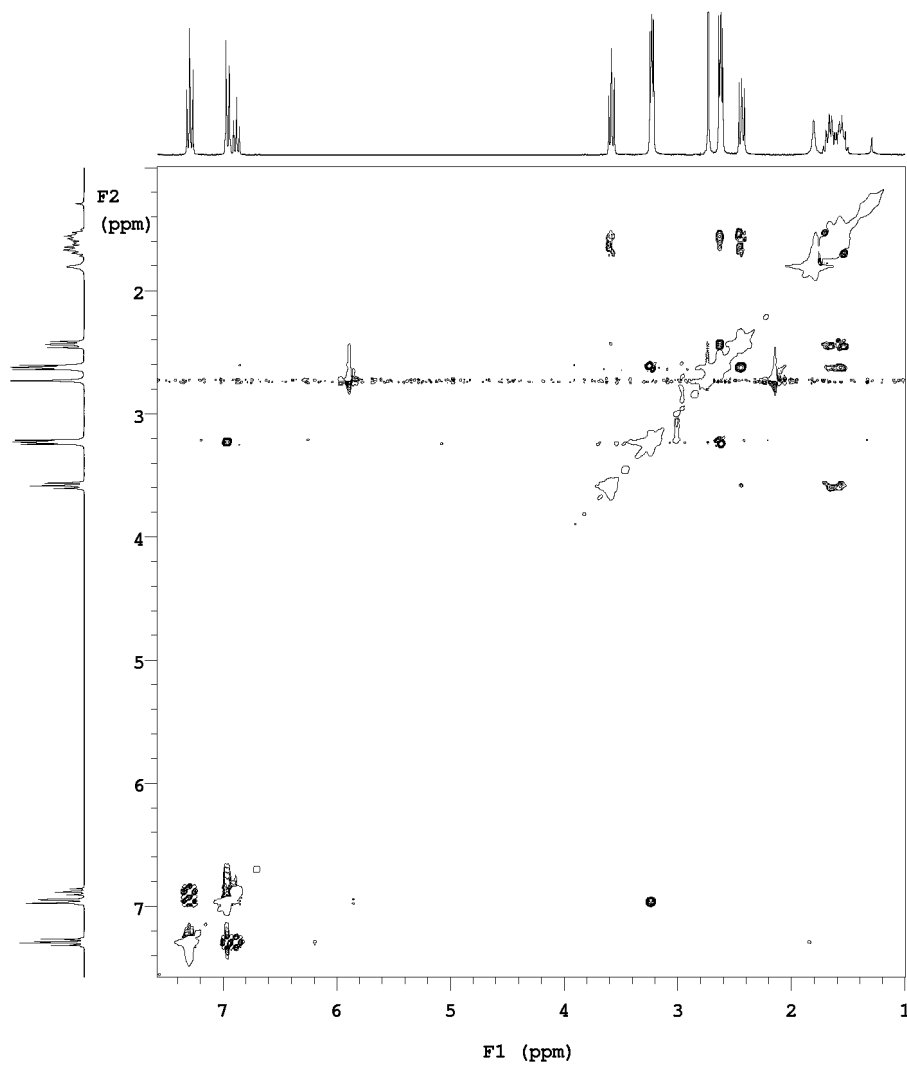
Tabela 4.1.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	177	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	39	
C2'	26	H1', H3', H4'
C3'	24	H1', H2', H4'
C4'	58	H3', H2''
C2''	53	H4', H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	49	H2'', H3''
C1'''	151	H3'''
C2'''	116	H3''', H4'''
C3'''	129	
C4'''	120	H2'''

Widmo NOESY:



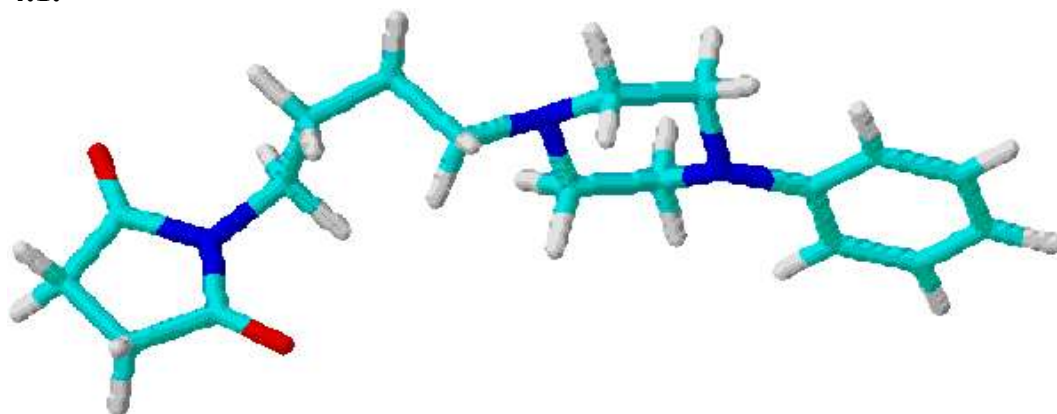
W poniższej tabeli zestawiono interpretację widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.1.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,00	3,37
H1'-H2'	17,60	2,09
H2'-H4'	11,51	2,24
H3'-H4'	15,44	2,13
H4'-H2''	45,24	1,78
H3''-H2'''	45,96	1,78*

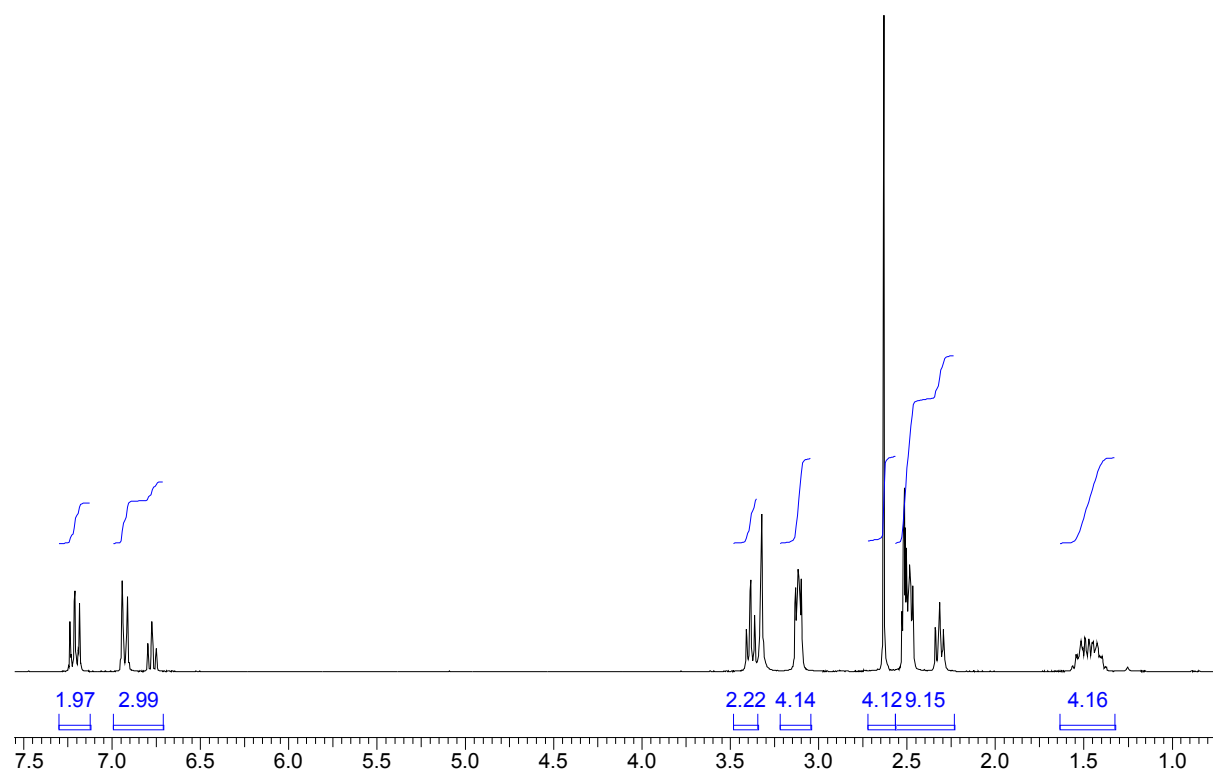
Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **1**. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

Rys. 4.1.



Interpretacja widm uzyskanych w roztworze DMSO:

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów wraz z interpretacją widma 2D COSY zamieszczono w tabeli 4.1.4.

Widmo COSY:

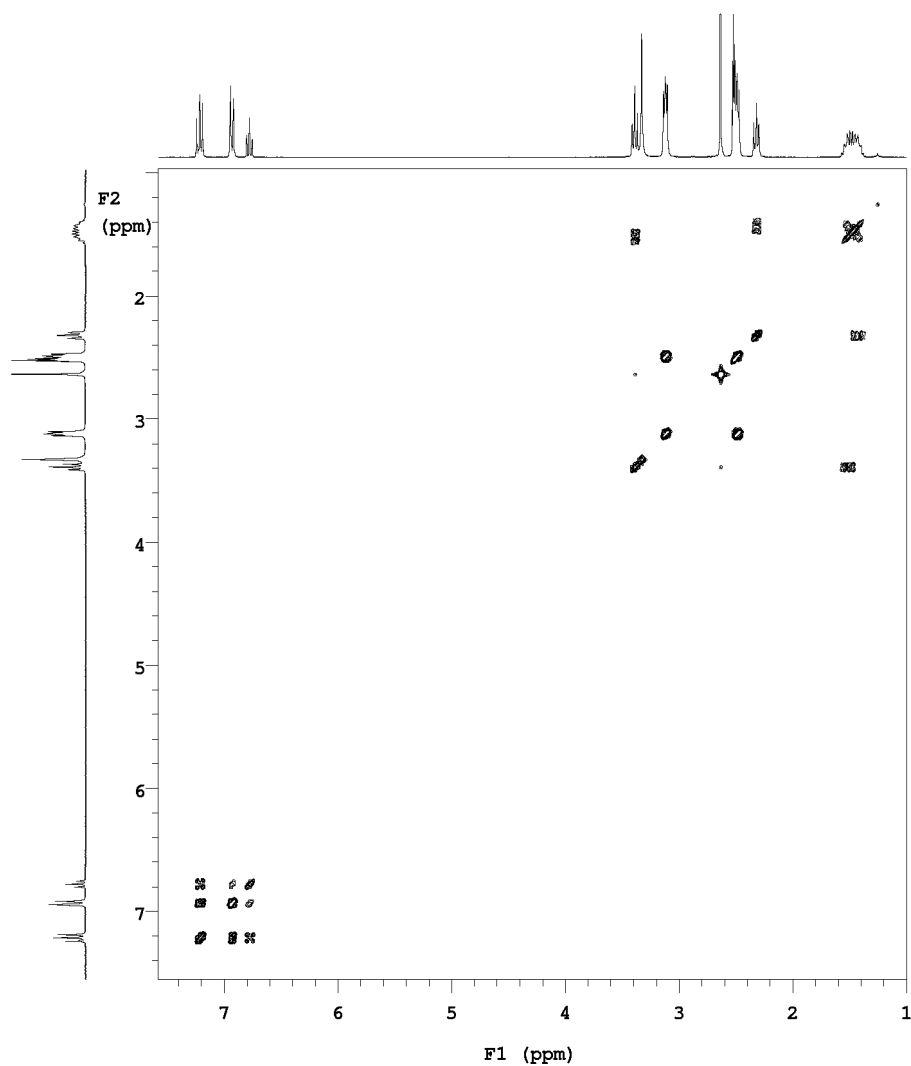


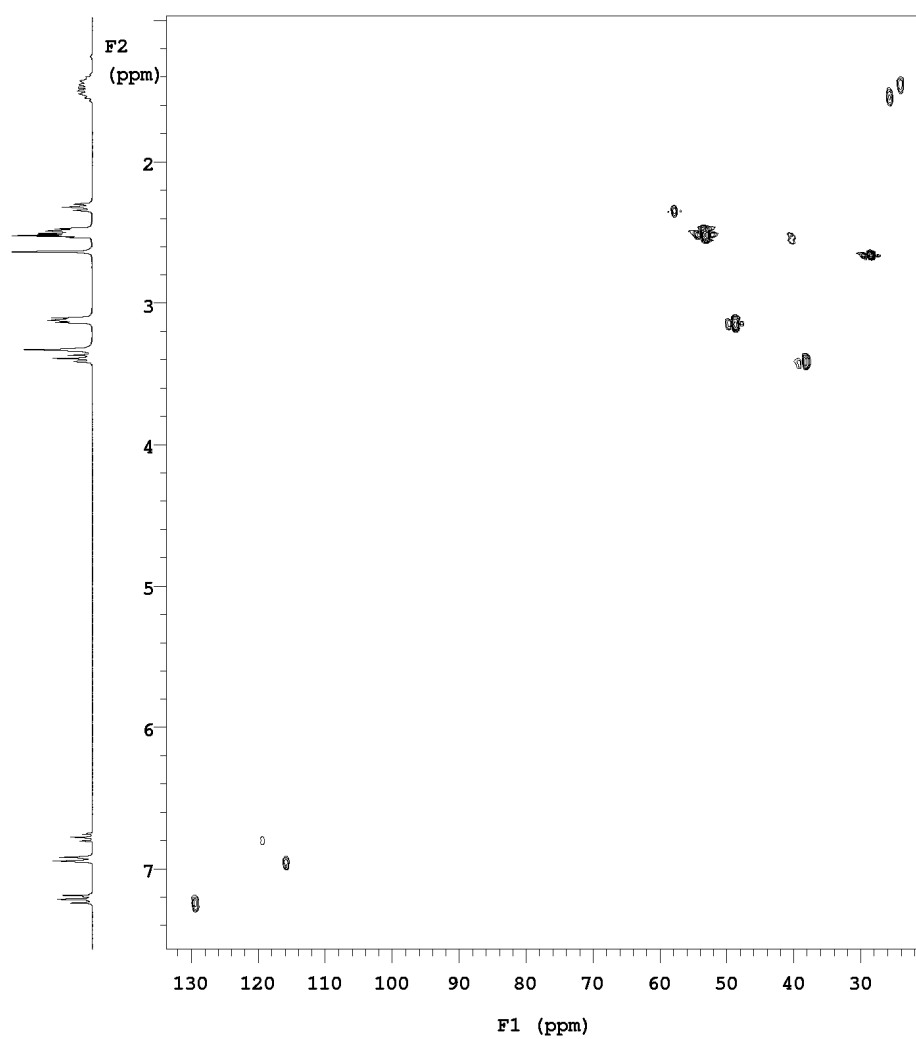
Tabela 4.1.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,63	singlet	4	-	
H1'	3,39	tryplet	2	6,9	H2', H4'
H2'	1,36-1,58	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,36-1,58	multiplet	2	-	H2', H3'
H4'	2,32	tryplet	2	7,1	H1', H3'
H2''	2,49	multiplet	4	-	H3''
H3''	3,12	multiplet	4	-	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2'''	6,92	dublet dubletów	2	$J_3 = 8,8$ $J_4 = 1,1$	H3''', H4'''
H3'''	7,21	dublet dubletów	2	$J' = 7,4$ $J'' = 8,8$	H1''', H4'''
H4'''	6,78	tryplet dubletów	1	$J_3 = 7,4$ $J_4 = 1,1$	H2''', H3'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

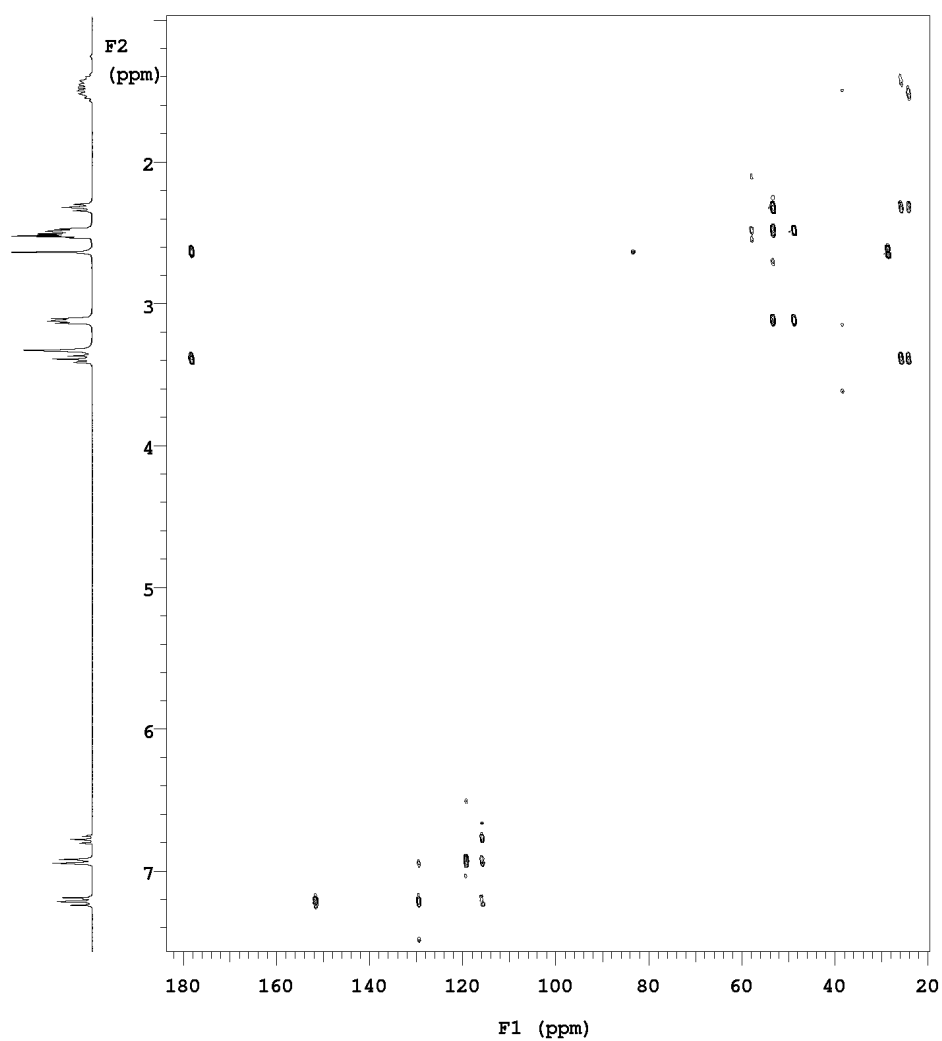


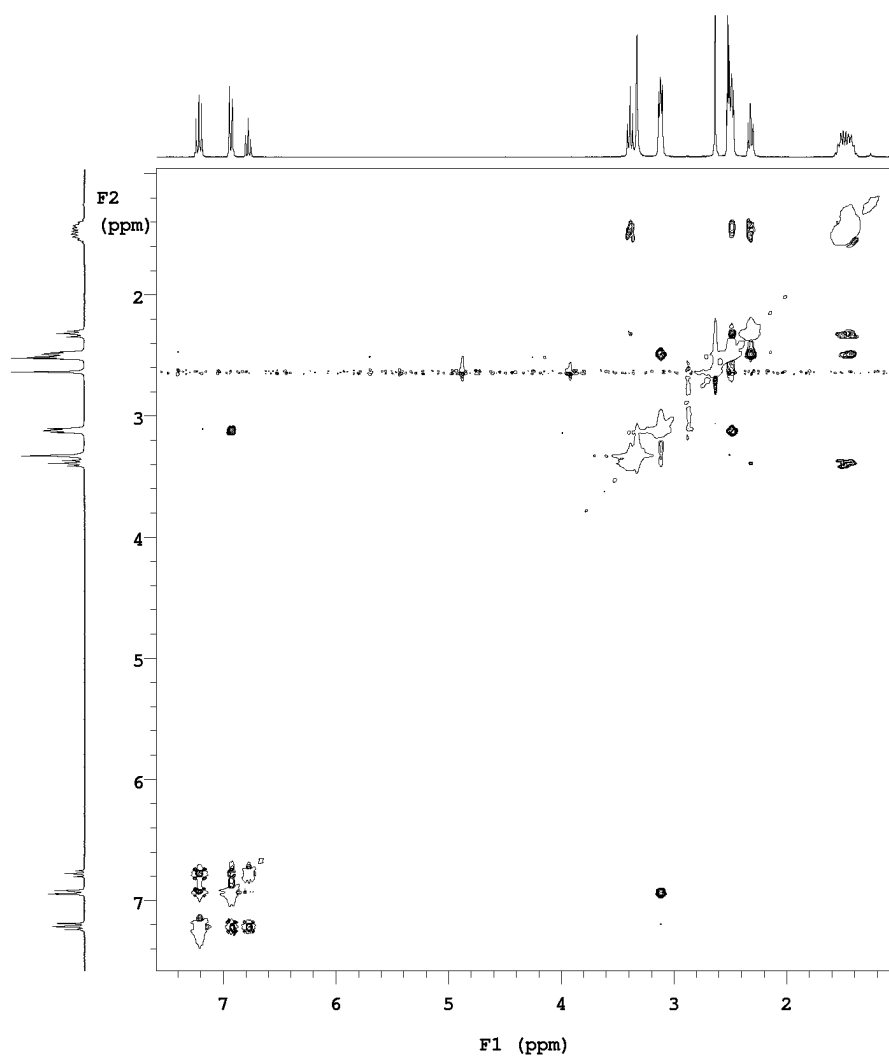
Tabela 4.1.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	178	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	38	H2'
C2'	26	H1', H3', H4'
C3'	24	H1', H2', H4'
C4'	58	H2''
C2''	54	H4', H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	48	H2'', H3''
C1'''	152	H3'''
C2'''	116	H3''', H4'''
C3'''	129	H3'''
C4'''	119	H2'''

Widmo NOESY:



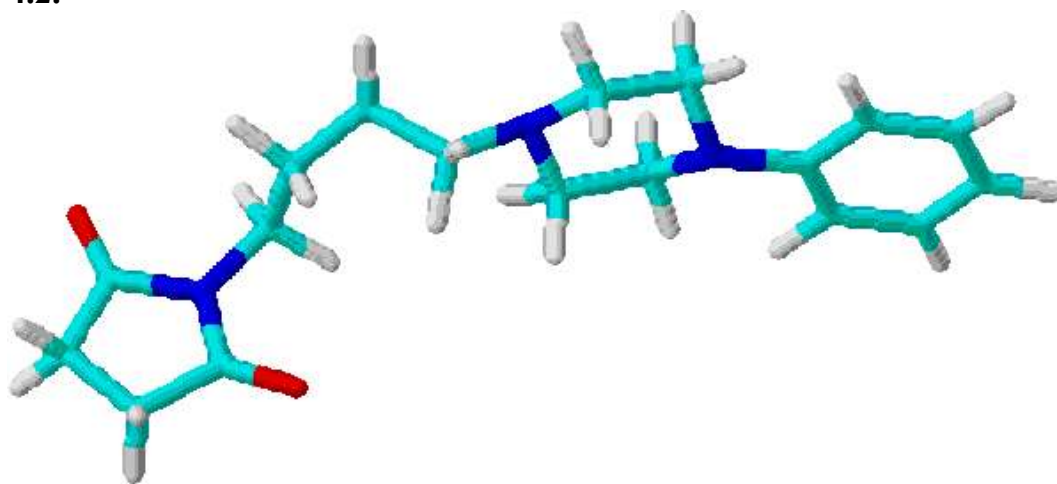
W tabeli zestawiono interpretację widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.1.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

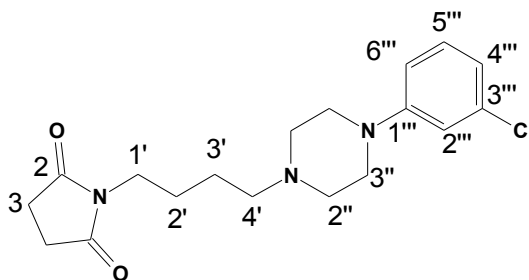
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,00	3,65
H1'-H2'	23,69	2,15
H2'-H4'	16,39	2,29
H3'-H4'	14,74	2,33
H4'-H2''	61,88	1,83
H3''-H2'''	74,09	1,78*

Na rysunku przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **1**, przy wykorzystaniu danych uzyskanych w roztworze DMSO.

Rys. 4.2.



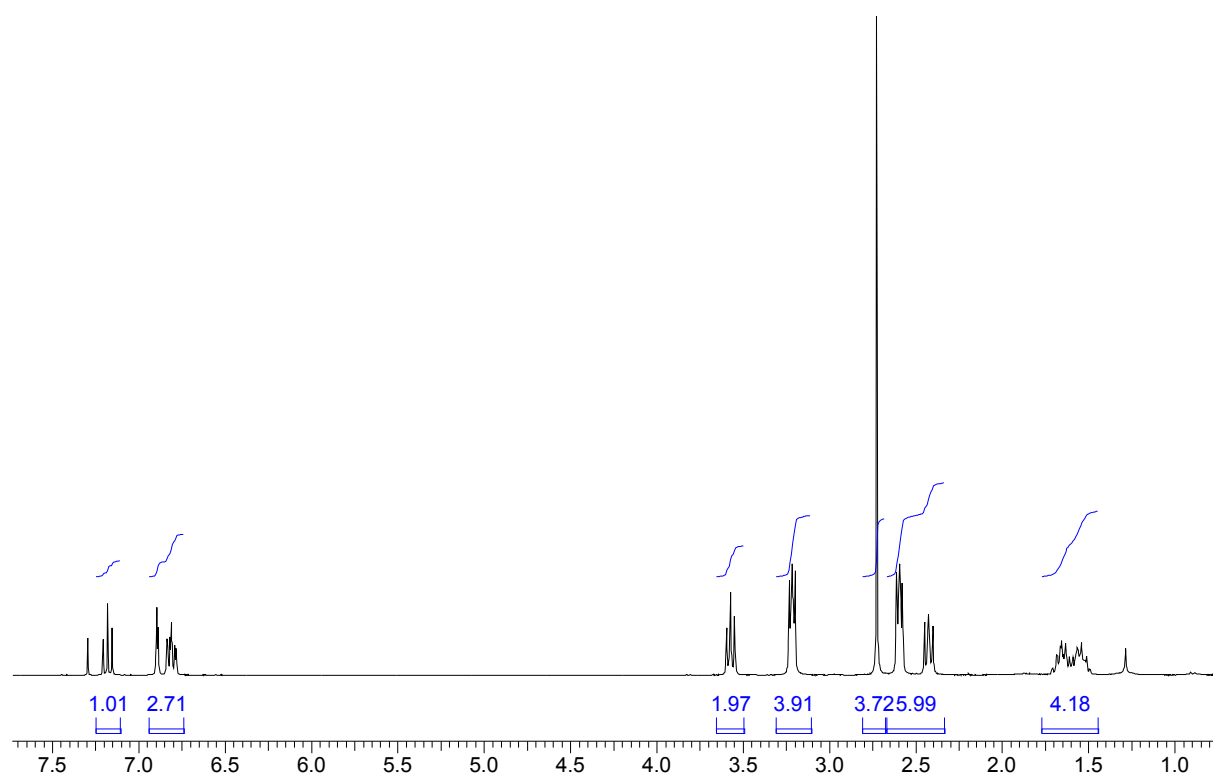
4.2. Związek 2



Analizę spektroskopową związku przeprowadzono zarówno w roztworze CDCl_3 jak i w roztworze DMSO.

Interpretacja widm uzyskanych w roztworze CDCl_3 :

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów widma ^1H NMR do odpowiednich grup protonów podano w tabeli 4.2.1 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

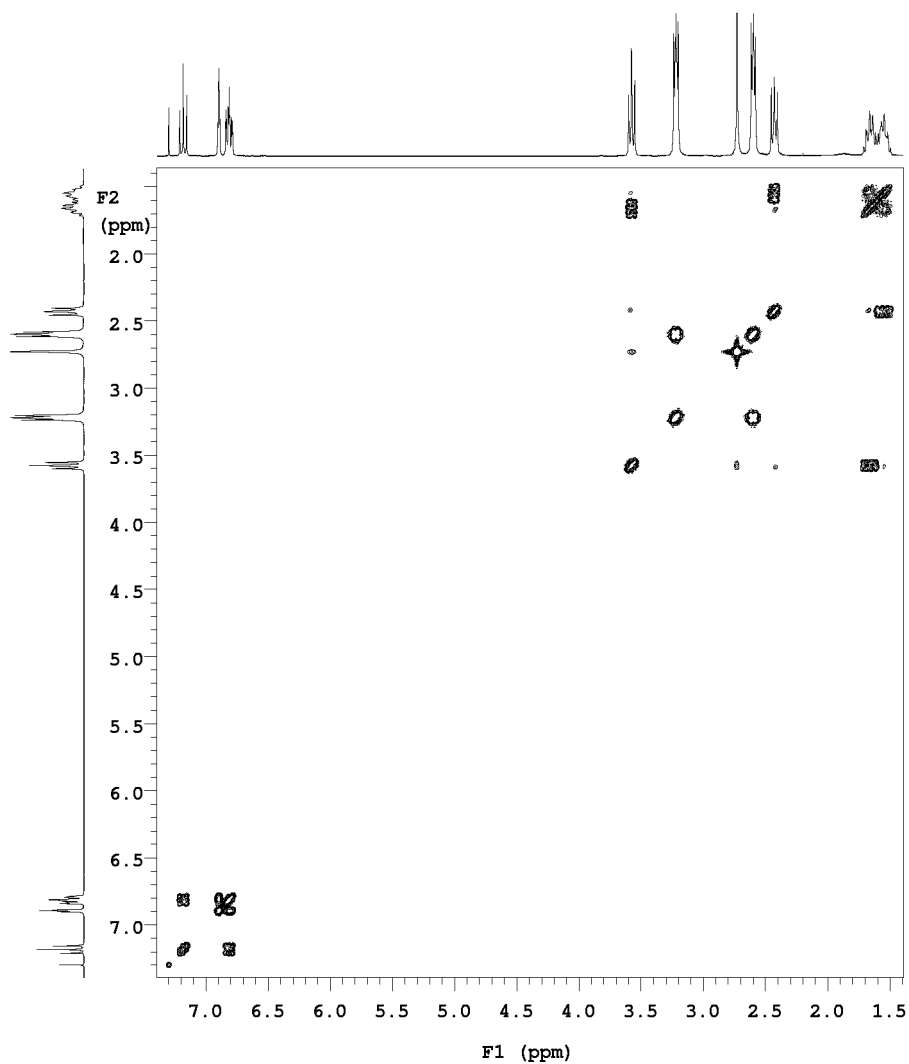


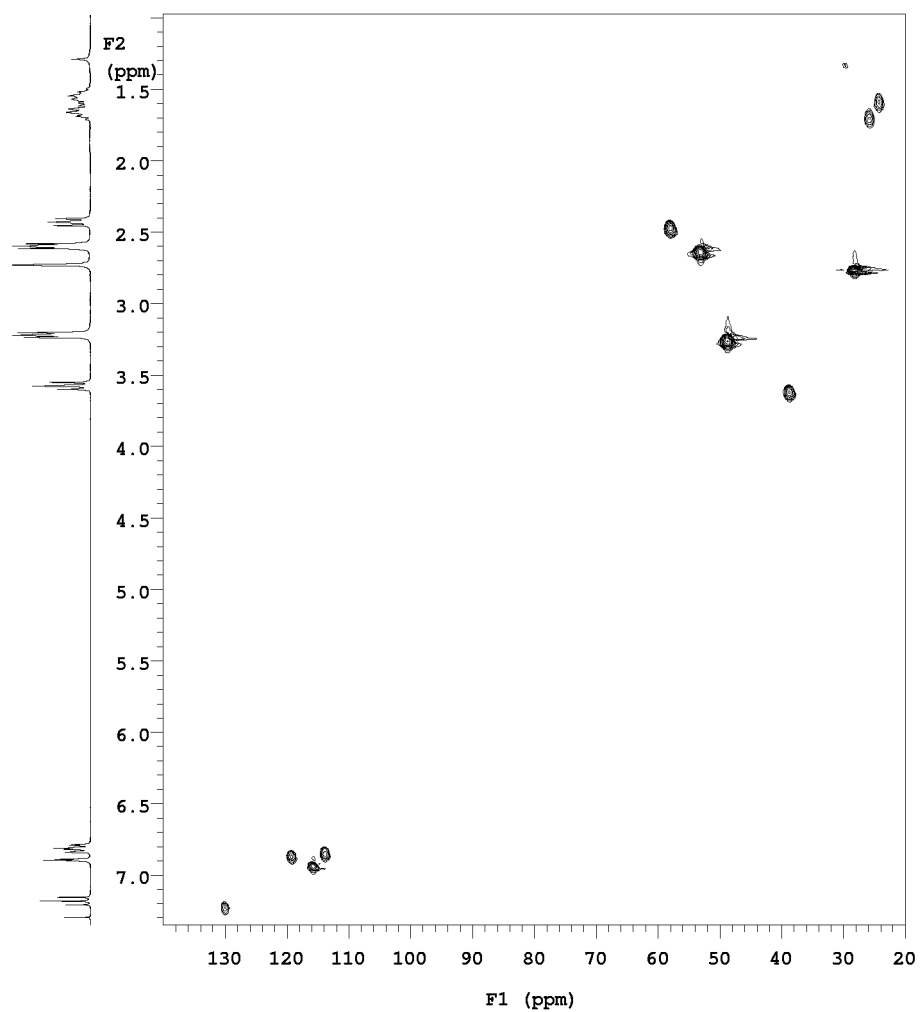
Tabela 4.2.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,72	singlet	4	-	
H1'	3,57	tryplet	2	7,4	H2', H3', H4'
H2'	1,60-1,75	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,45-1,60	multiplet	2	-	H1', H2', H4'
H4'	2,43	tryplet	2	7,1	H1', H2', H3'
H2''	2,59	tryplet	4	4,9	H3''
H3''	3,22	tryplet	4	5,2	H2''
H2'''	6,89	tryplet	1	2,2	H6'''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H4'''	6,78-6,85	multiplet	1	-	H5''', H6'''
H5'''	7,18	tryplet	1	8,0	H4''', H6'''
H6'''	6,78-6,85	multiplet	1	-	H2''', H5'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

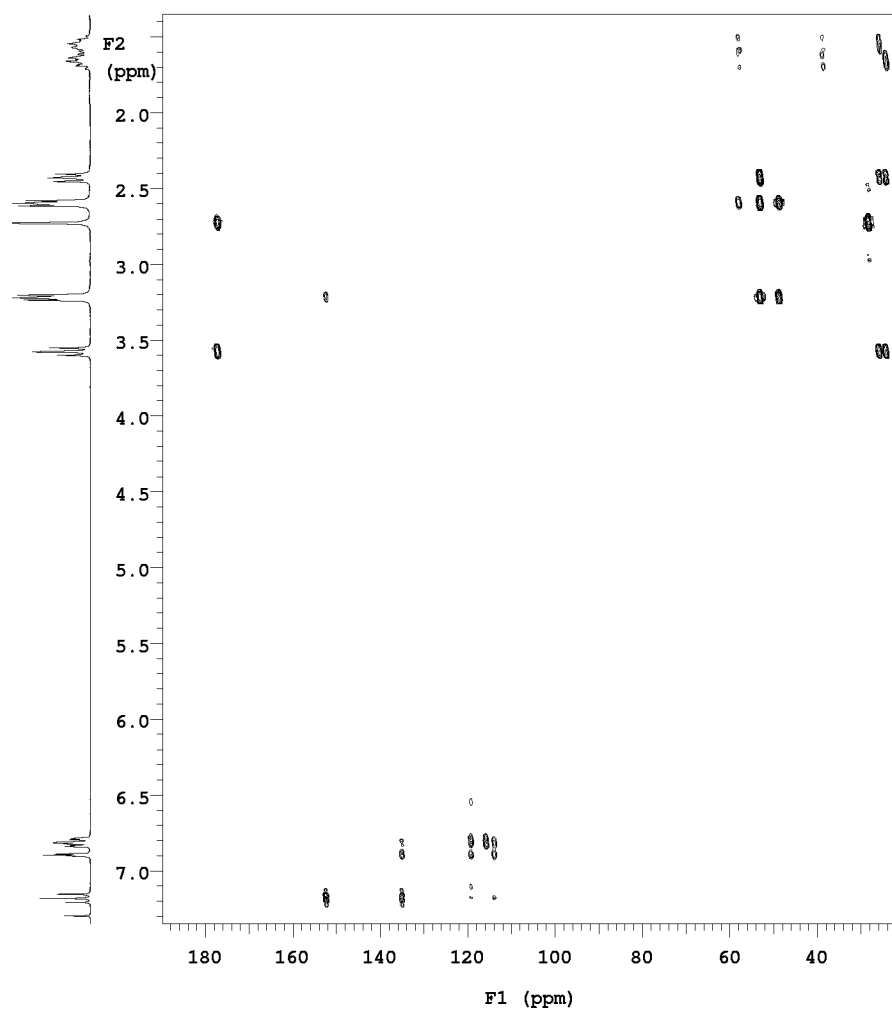


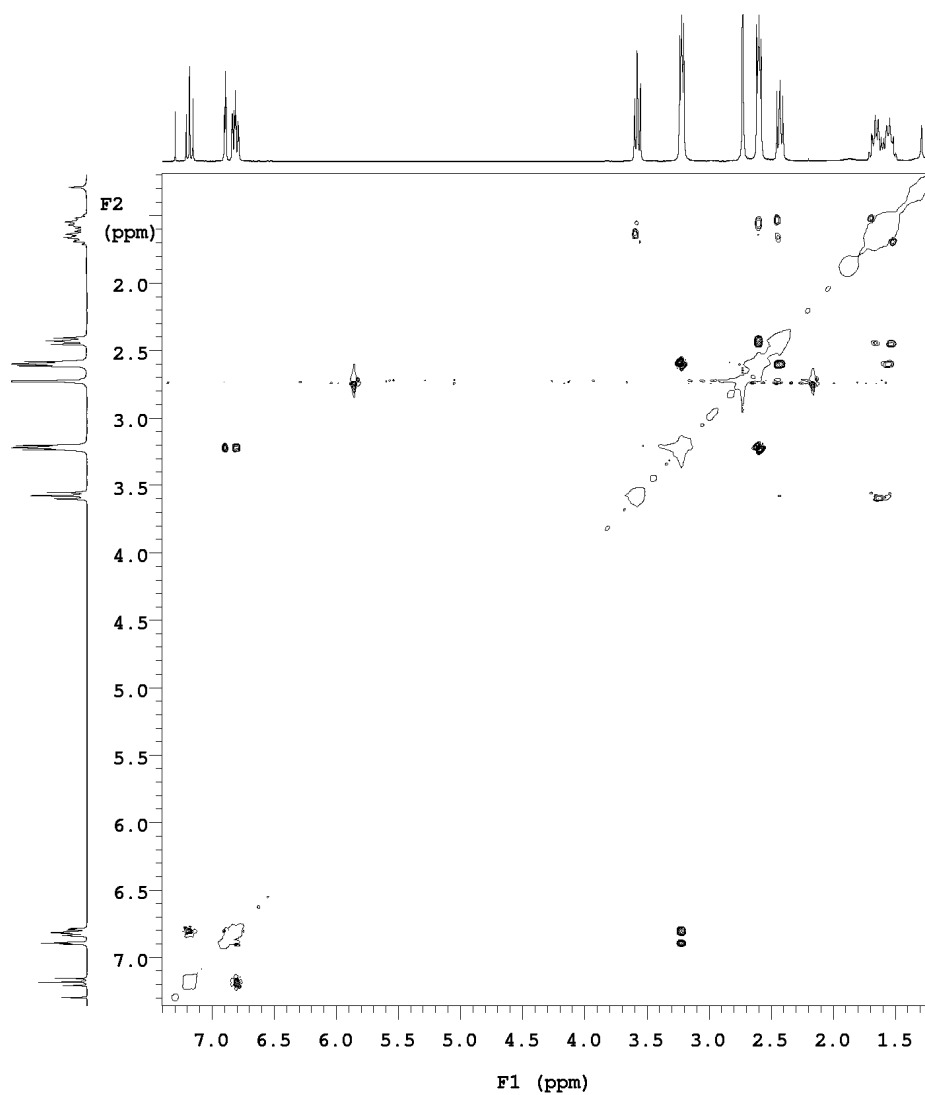
Tabela 4.2.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	177	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	39	H2', H3'
C2'	26	H1', H4'
C3'	24	H1', H4'
C4'	58	H2', H3', H2''
C2''	53	H2'', H3''
C3''	49	H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C1'''	152	H3'', H2'''
C2'''	116	H2'', H4''', H5'''
C3'''	135	H2'', H4''', H5'''
C4'''	119	H2'', H5''', H6'''
C5'''	130	
C6'''	114	H2'', H4''', H5'''

Widmo NOESY:



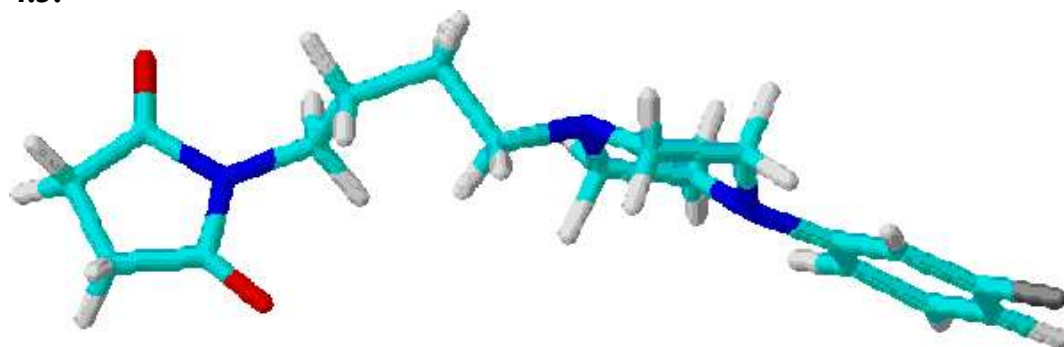
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.2.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,75	3,08
H1'-H2'	8,35	2,06
H2'-H4'	3,78	2,35
H3'-H4'	8,95	2,04
H3'-H2''	10,11	1,99
H4'-H2''	22,63	1,74
H3''-H2'''	20,00	1,78*
H3''-H6'''	16,12	1,85

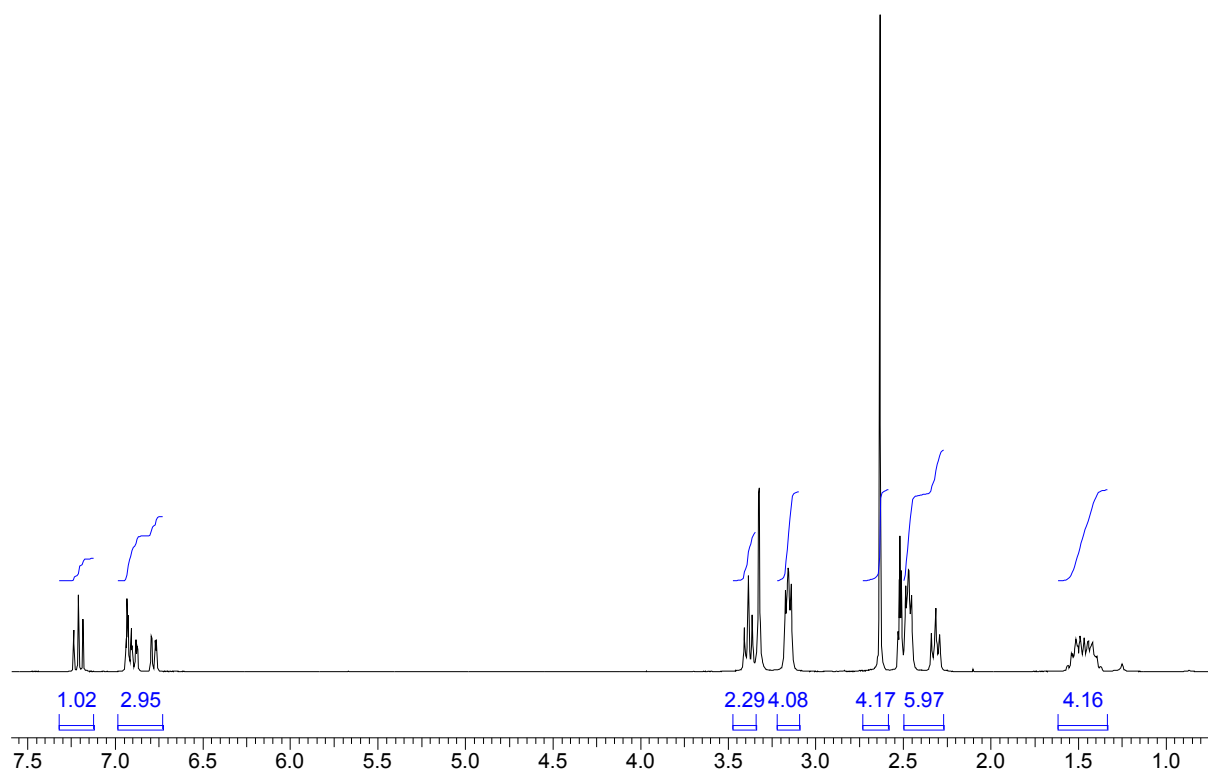
Na rysunku przedstawiono obliczoną na podstawie danych spektroskopowych konformację związku 2.

Rys. 4.3.



Interpretacja widm wykonanych w roztworze DMSO

Widmo ^1H NMR:



Interpretację widma z przypisaniem sygnałów do odpowiednich grup protonów zamieszczono w dalszej części w tabeli 4.2.4 wraz z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

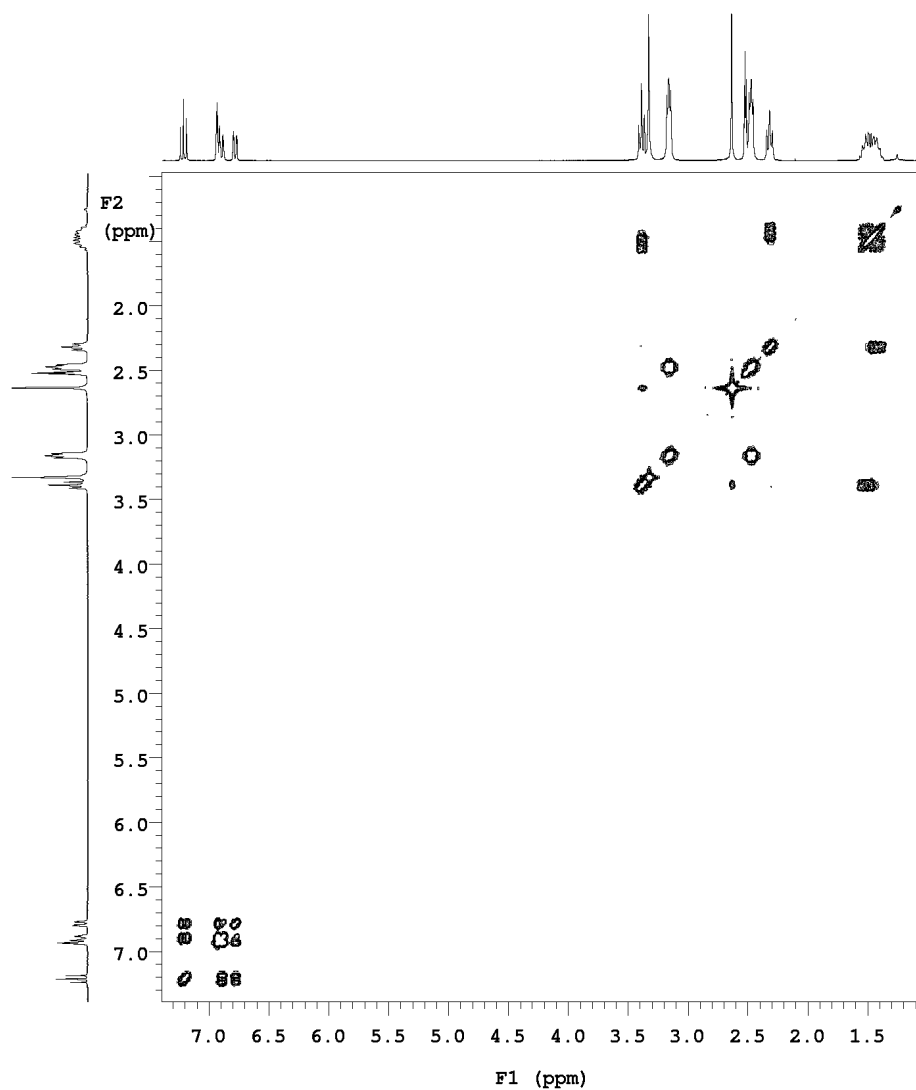


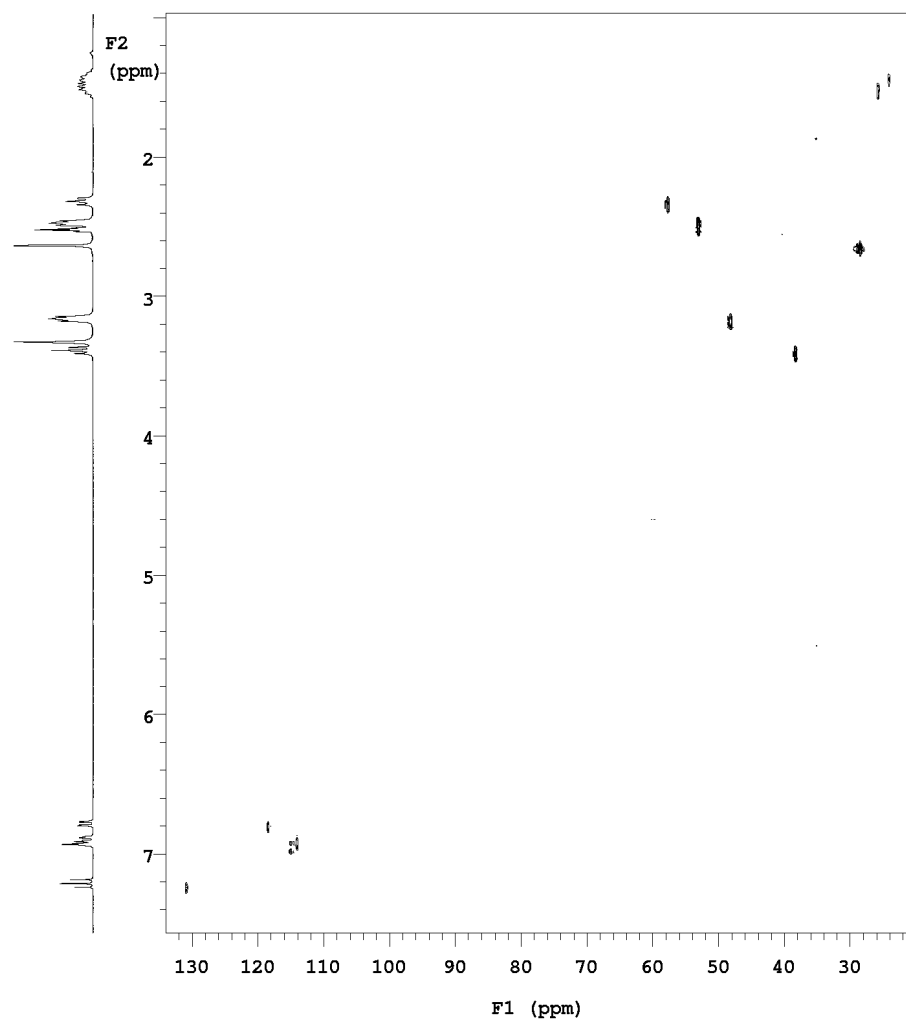
Tabela 4.2.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,63	singlet	4	-	
H1'	3,38	tryplet	2	6,9	H2', H3', H4'
H2'	1,39-1,60	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,39-1,60	multiplet	2	-	H1', H2', H4'
H4'	2,31	tryplet	2	6,9	H1', H2', H3'
H2''	2,47	tryplet	4	5,0	H3''
H3''	3,16	tryplet	4	5,2	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2'''	6,94	triplet	1	2,2	H3''', H4''', H6'''
H4'''	6,78	multiplet	1	-	H2''', H5''', H6'''
H5'''	7,20	triplet	1	8,0	H2''', H4''', H6'''
H6'''	6,90	multiplet	1	-	H2''', H4''', H5'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

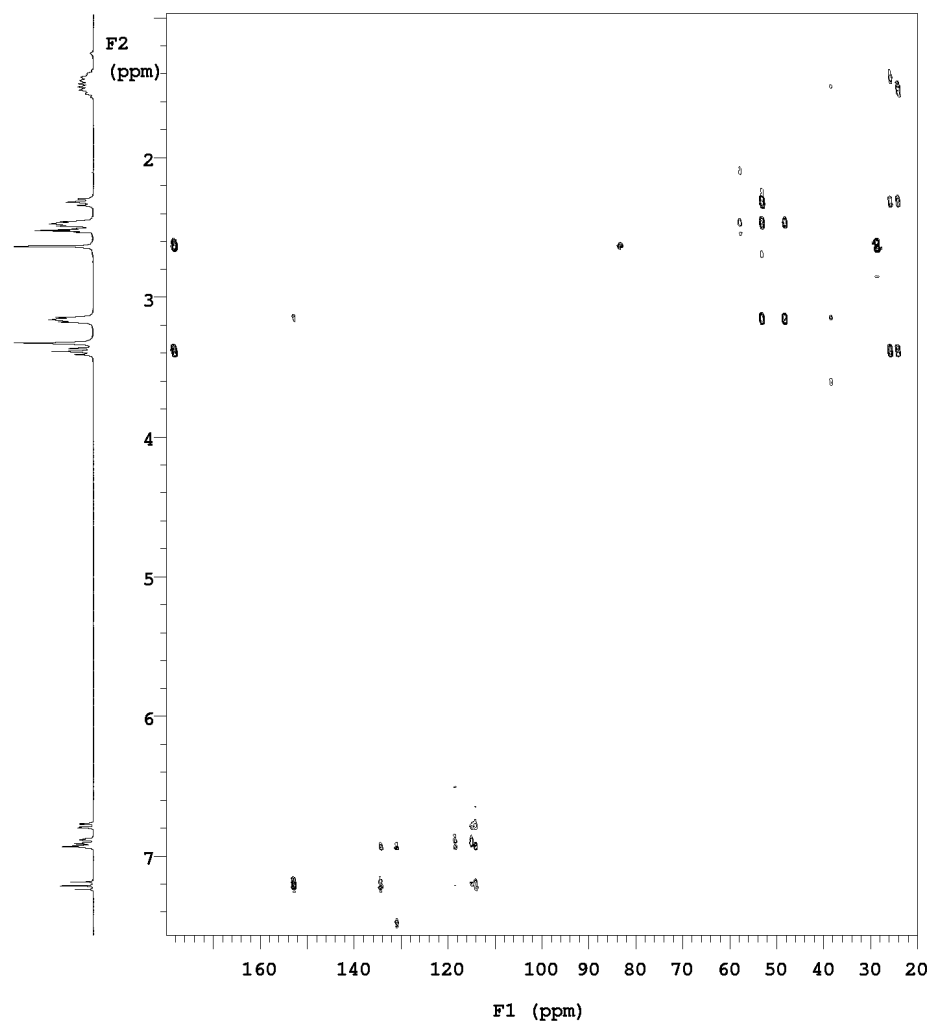


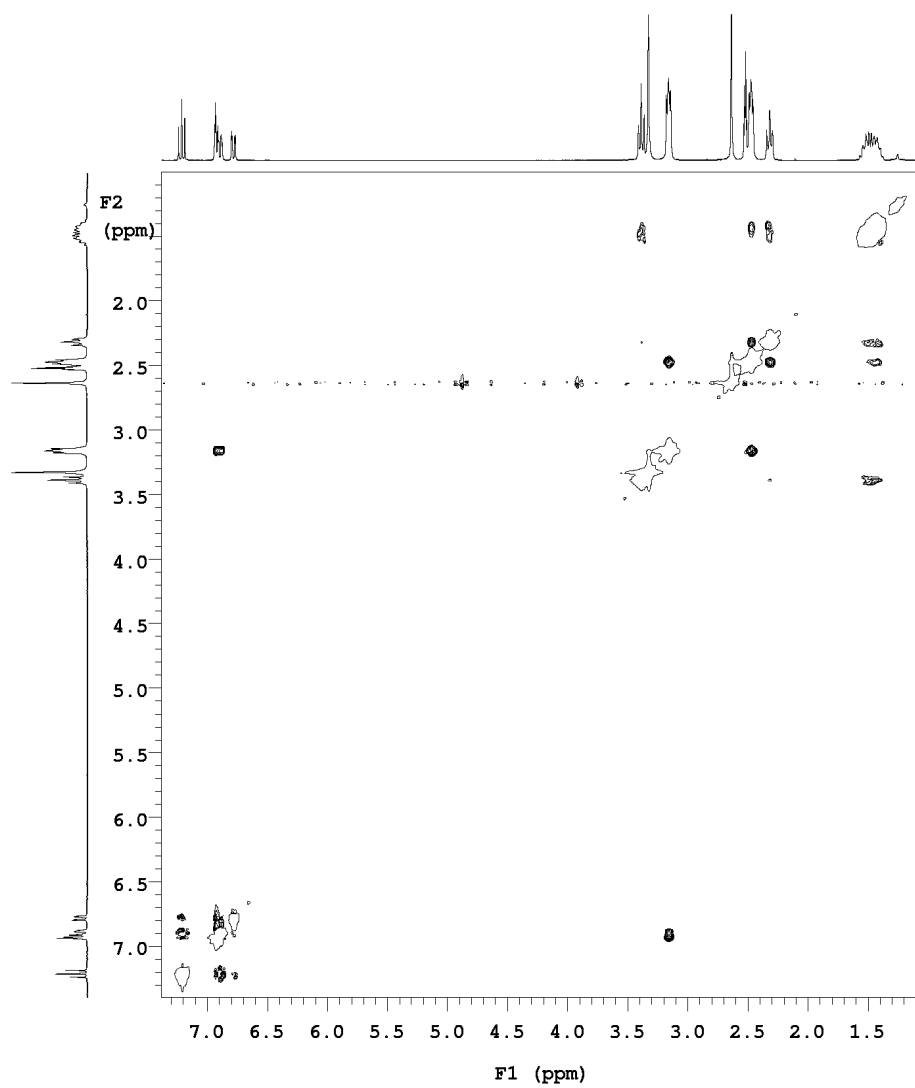
Tabela 4.2.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	178	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	38	'
C2'	26	H1', H3', H4'
C3'	24	H1', H2', H4'
C4'	58	H2''
C2''	54	H4', H2'', H3''
C3''	48	H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C1'''	153	H3'', H5'''
C2'''	115	H2'', H4''', H5''', H6'''
C3'''	134	H2'', H5'''
C4'''	119	H2''
C5'''	131	H6'''
C6'''	114	H2'', H4''', H5'''

Widmo NOESY:



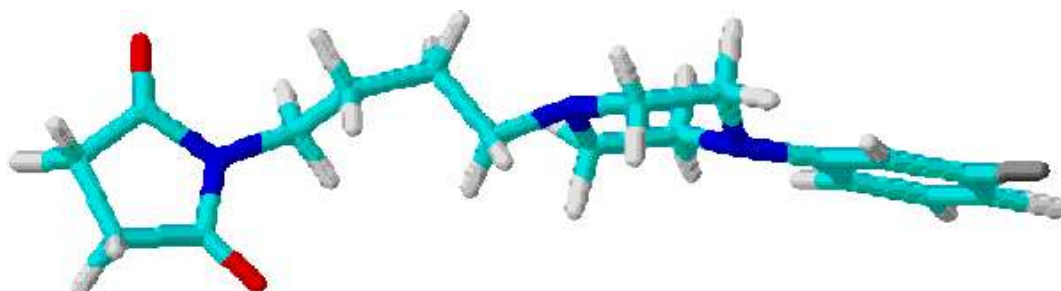
W tabeli zebrano interpretację widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.2.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

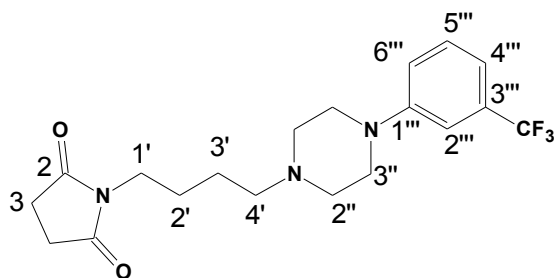
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,29	3,59
H3'-H2''	5,74	2,18
H4'-H2''	20,07	1,77
H3''-H2'''	19,59	1,78*
H3''-H6'''	6,12	2,16

Na rysunku przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **2**, obliczoną na podstawie danych otrzymanych w roztworze DMSO.

Rys. 4.4.



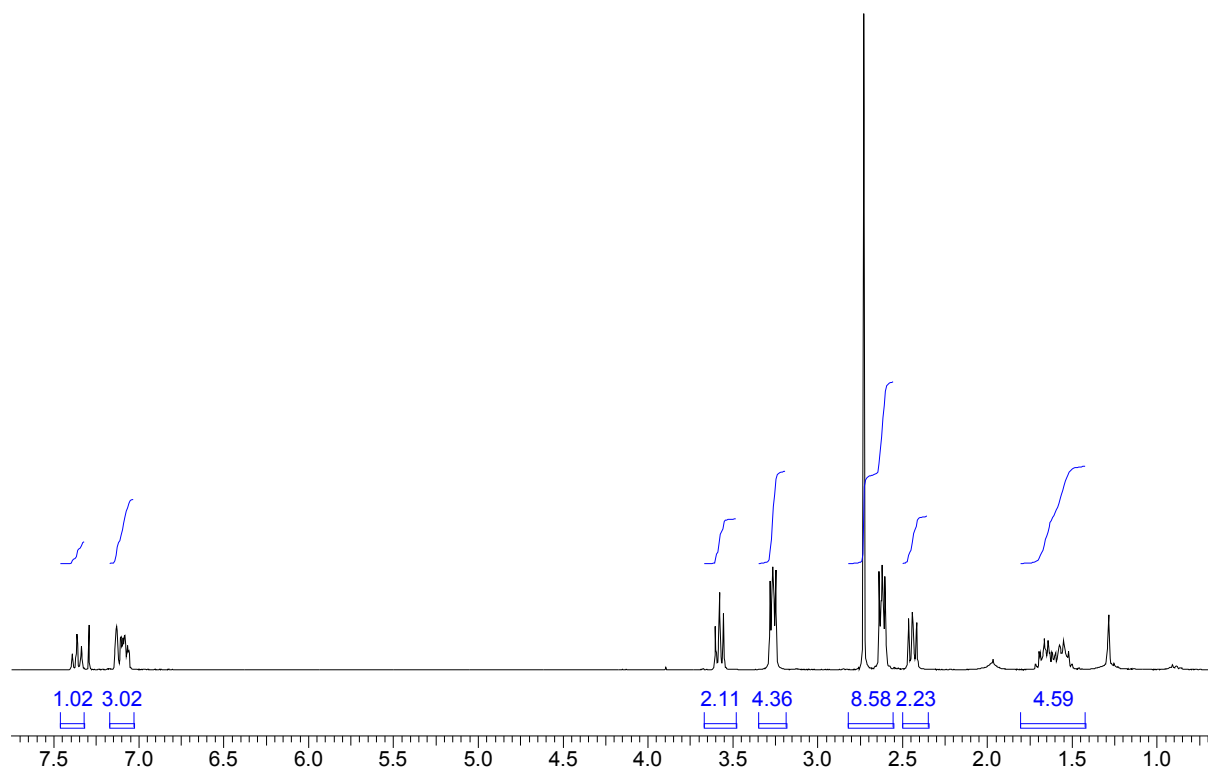
4.3. Związek 3



Dla związku **3** widma zarejestrowano w obu zastosowanych rozpuszczalnikach.

Widma wykonane w roztworze CDCl_3 .

Widmo ^1H NMR:



Szczegółową interpretację widma zebrano w tabeli 4.3.1 razem z danymi odczytanymi z widma 2D COSY.

Widmo COSY:

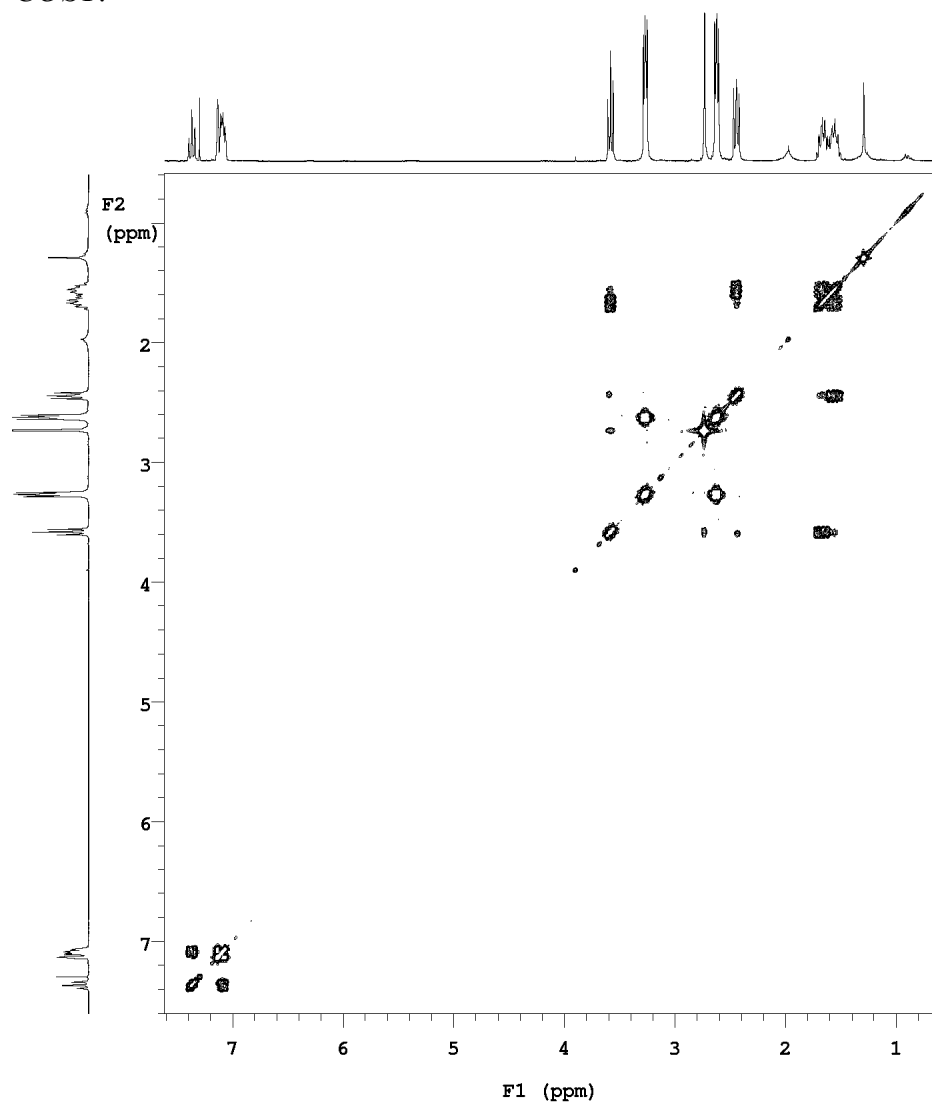


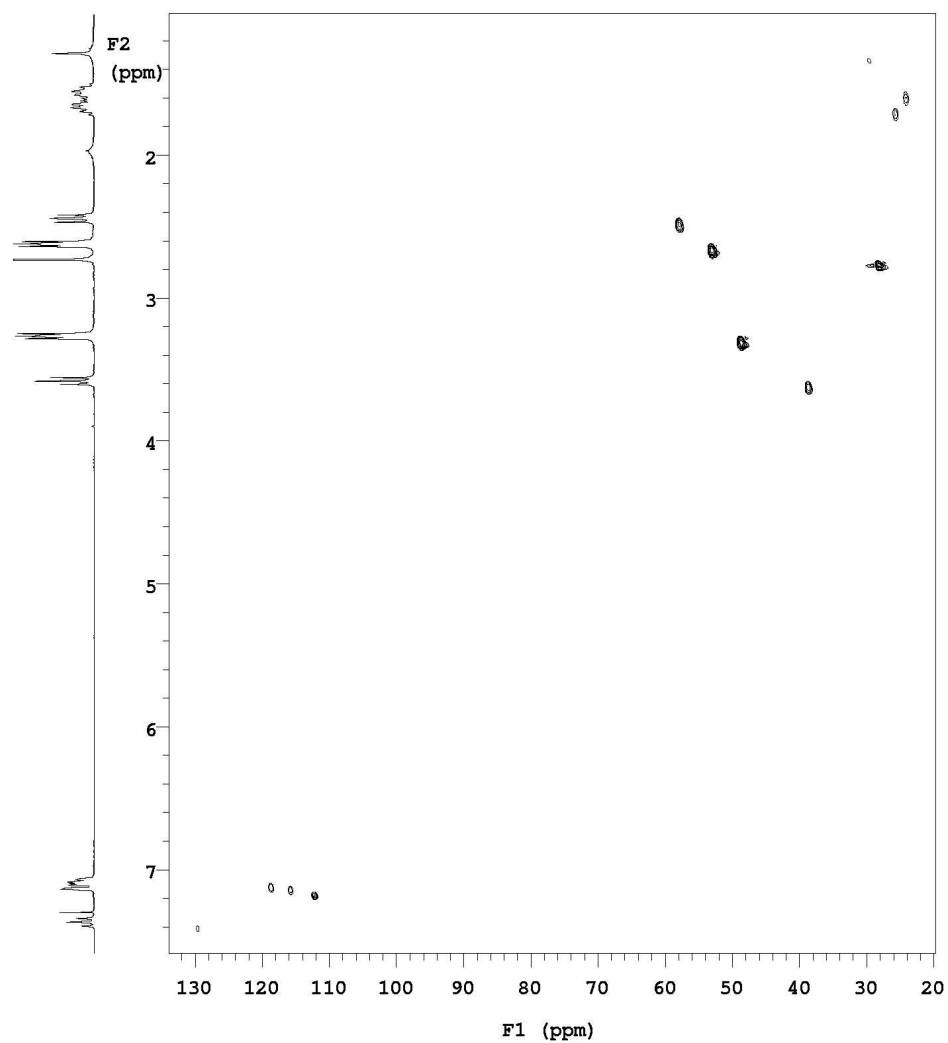
Tabela 4.3.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,73	singlet	4	-	
H1'	3,58	tryplet	2	7,4	H2', H3', H4'
H2'	1,60-1,70	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,50-1,60	multiplet	2	-	H1', H2', H4'
H4'	2,44	tryplet	2	7,1	H1', H2', H3', H2''
H2''	2,62	tryplet	4	5,0	H4', H3''
H3''	3,26	tryplet	4	5,2	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H5'''	7,98	tryplet	1	8,0	H2''', H4''', H6'''
H2''', H4''', H6'''	7,05-7,15	multiplet	3	-	H5'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

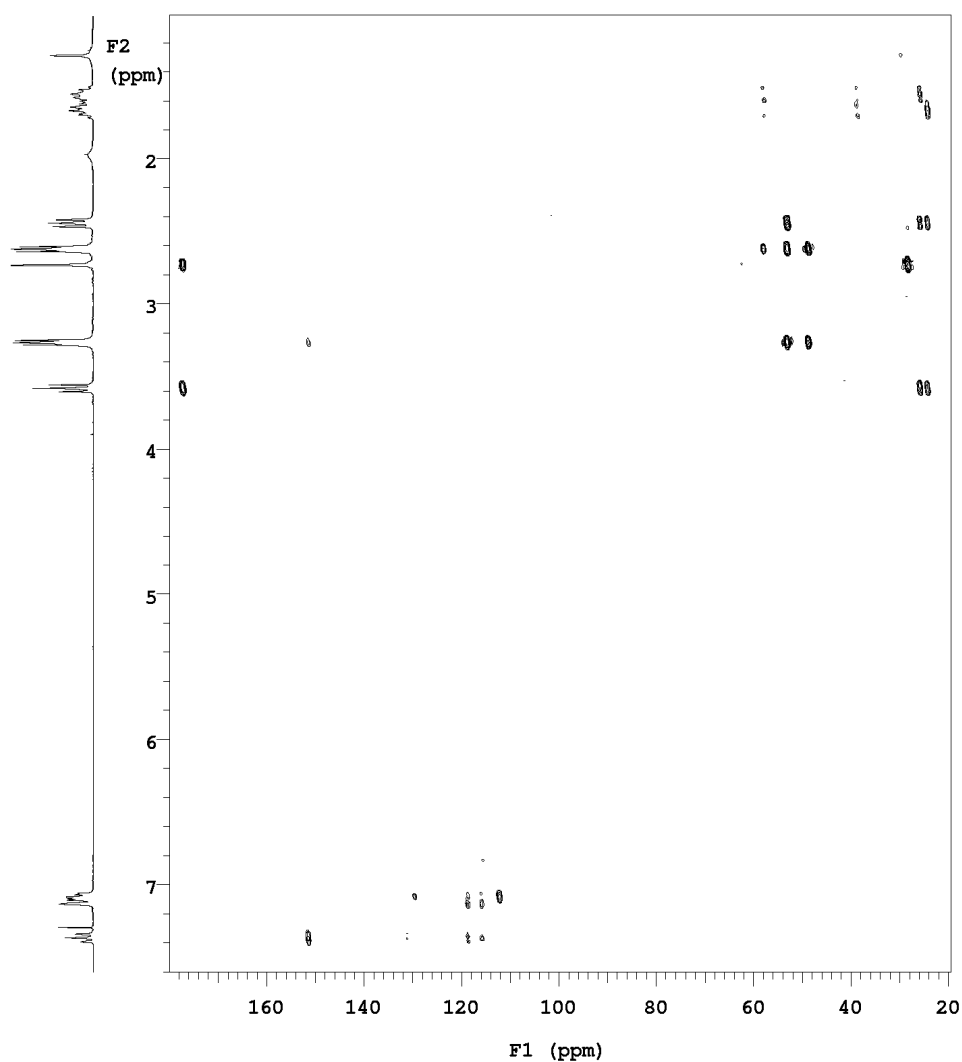


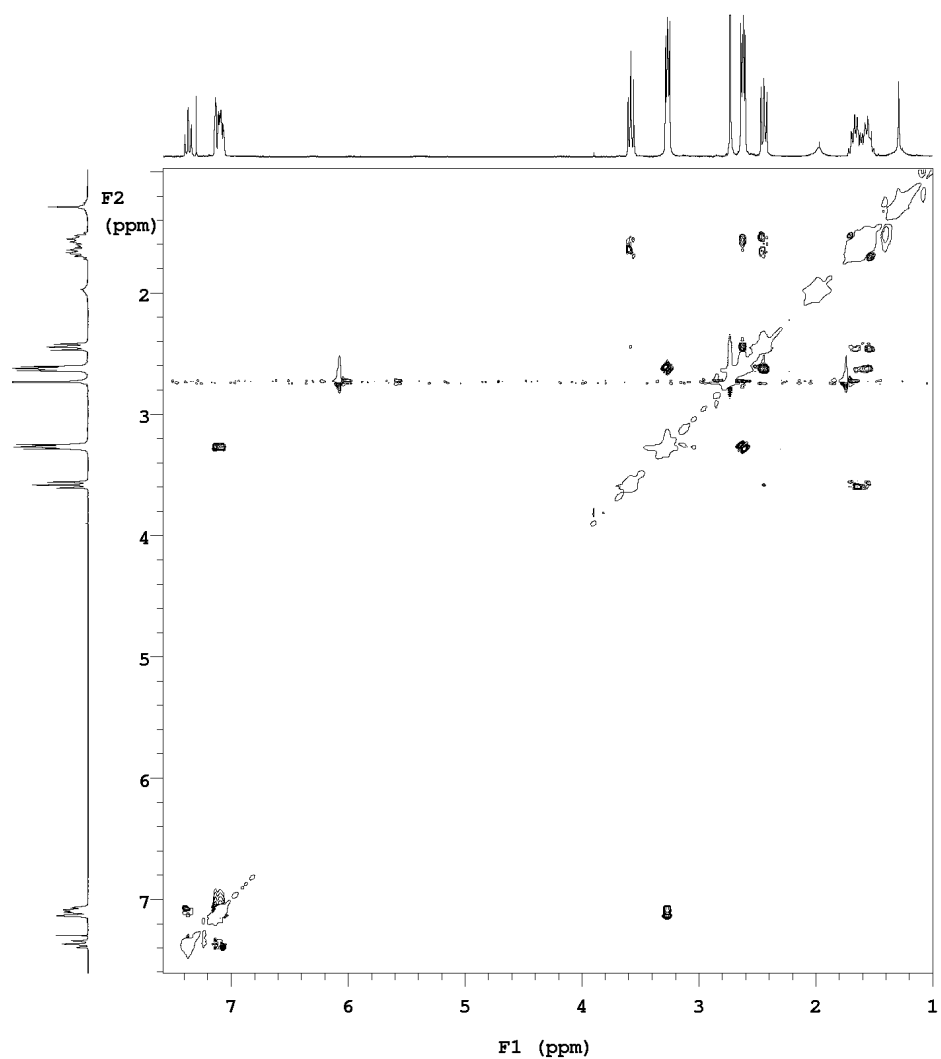
Tabela 4.3.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	177	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	38	H3'
C2'	27	H1', H3', H4'
C3'	25	H1', H2', H4'
C4'	58	H3', H2''
C2''	54	H4', H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3"	49	H2", H3"
C1'''	152	H3", H5'''
C2'''	112	H4''' , H6'''
C4'''	118	H2''' , H5''' , H6'''
C5'''	129	H2''' , H4''' , H6'''
C6'''	114	H2''' , H4''' , H5'''

Widmo NOESY:



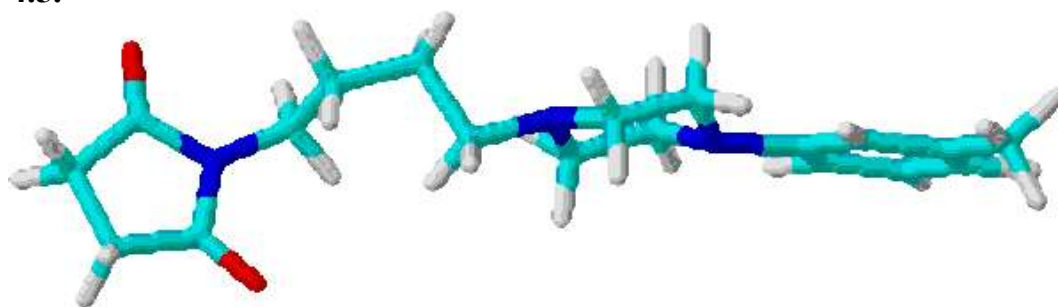
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.3.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,00	3,21
H1'-H2'	16,95	2,00
H2'-H4'	10,39	2,17
H3'-H4'	15,10	2,04
H3'-H2''	21,16	1,93
H3''-H2'''	34,28	1,78*
H3''-H6'''	28,02	1,84

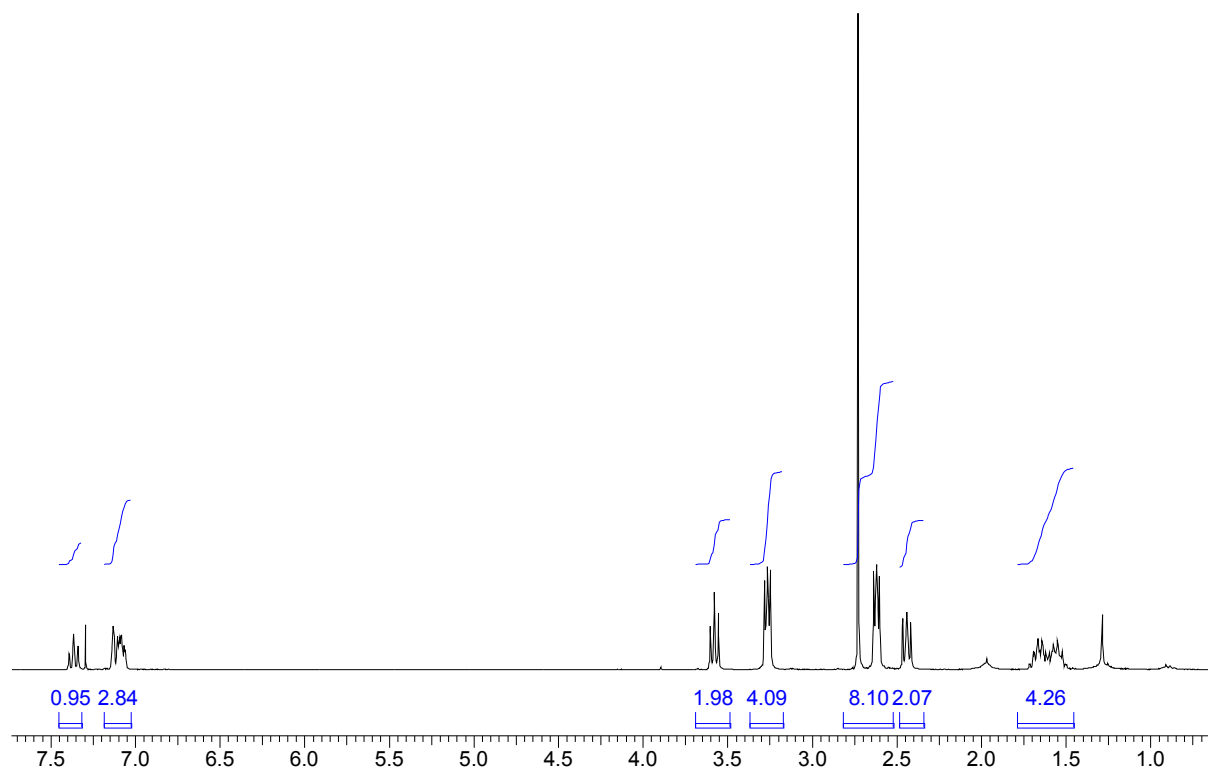
Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **3**. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

Rys. 4.5.



Badania spektralne przeprowadzone w roztworze DMSO:

Widmo ^1H NMR:



Interpretację podano razem z opisem widma 2D COSY w tabeli 4.3.4.

Widmo COSY:

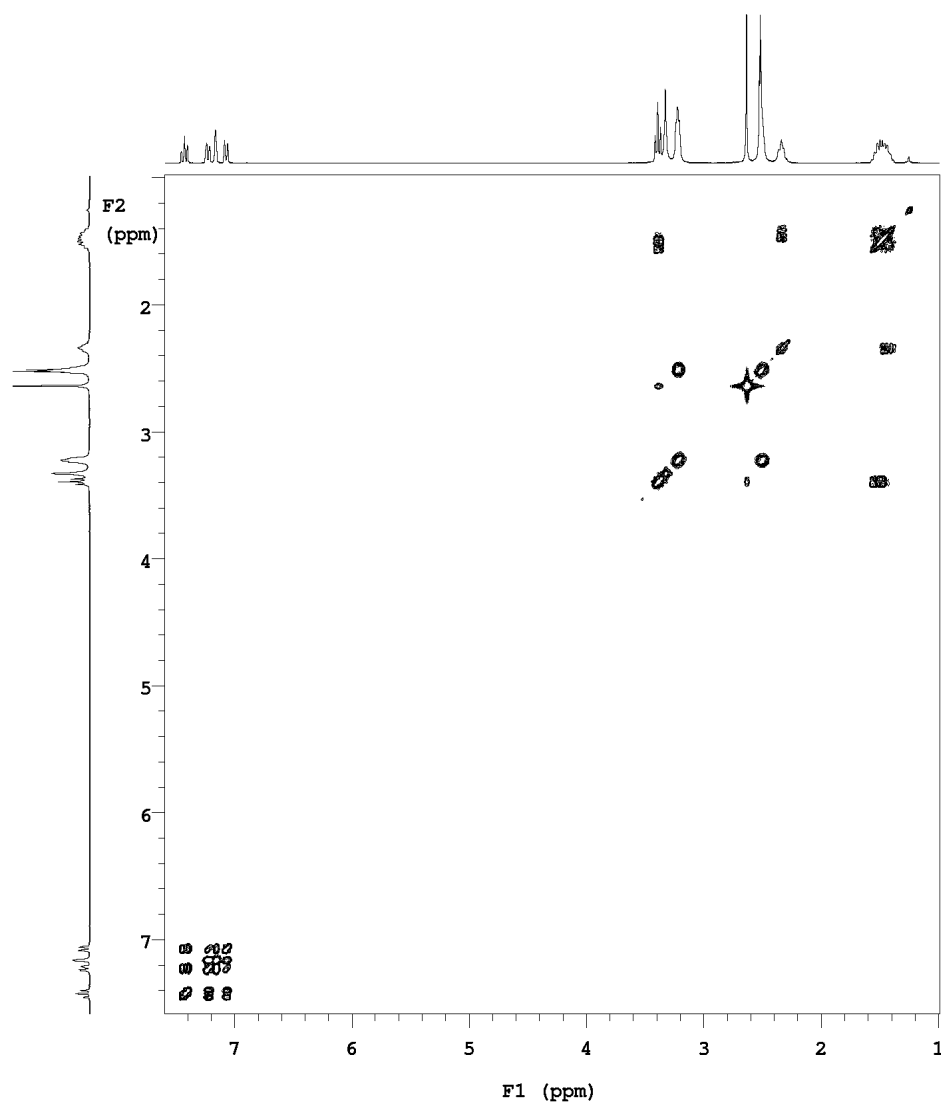


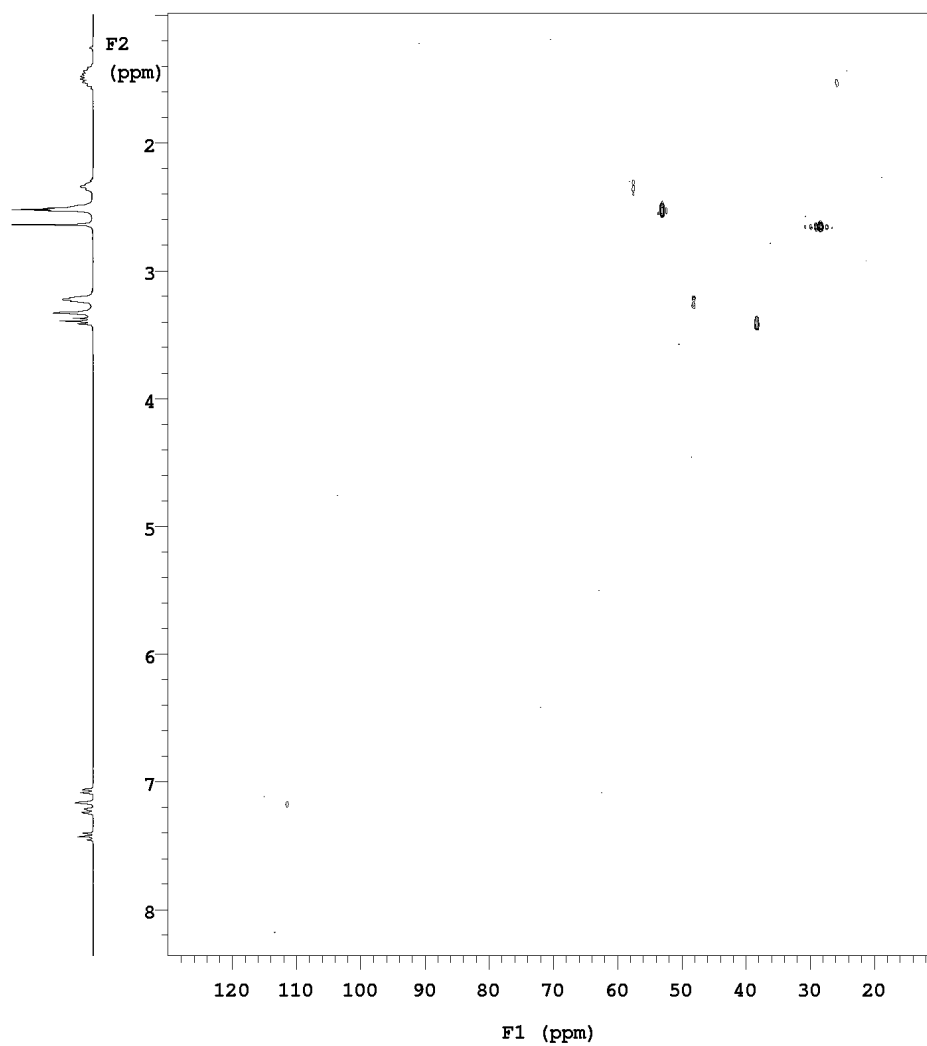
Tabela 4.3.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,63	singlet	4	-	H2'
H1'	3,39	tryplet	2	6,9	H2, H2'
H2'	1,50-1,60	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,40-1,50	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	2,34	multiplet	2	-	H3'
H2''	2,50	multiplet	4	-	H4', H3''
H3''	3,22	multiplet	4	-	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2'''	7,16	singlet	1	-	H4''', H6'''
H4'''	7,06	dublet	1	7,7	H2''', H5''', H6'''
H5'''	7,42	tryplet	1	7,9	H4''', H6'''
H6'''	7,20	multiplet	1	-	H2''', H4''', H5'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

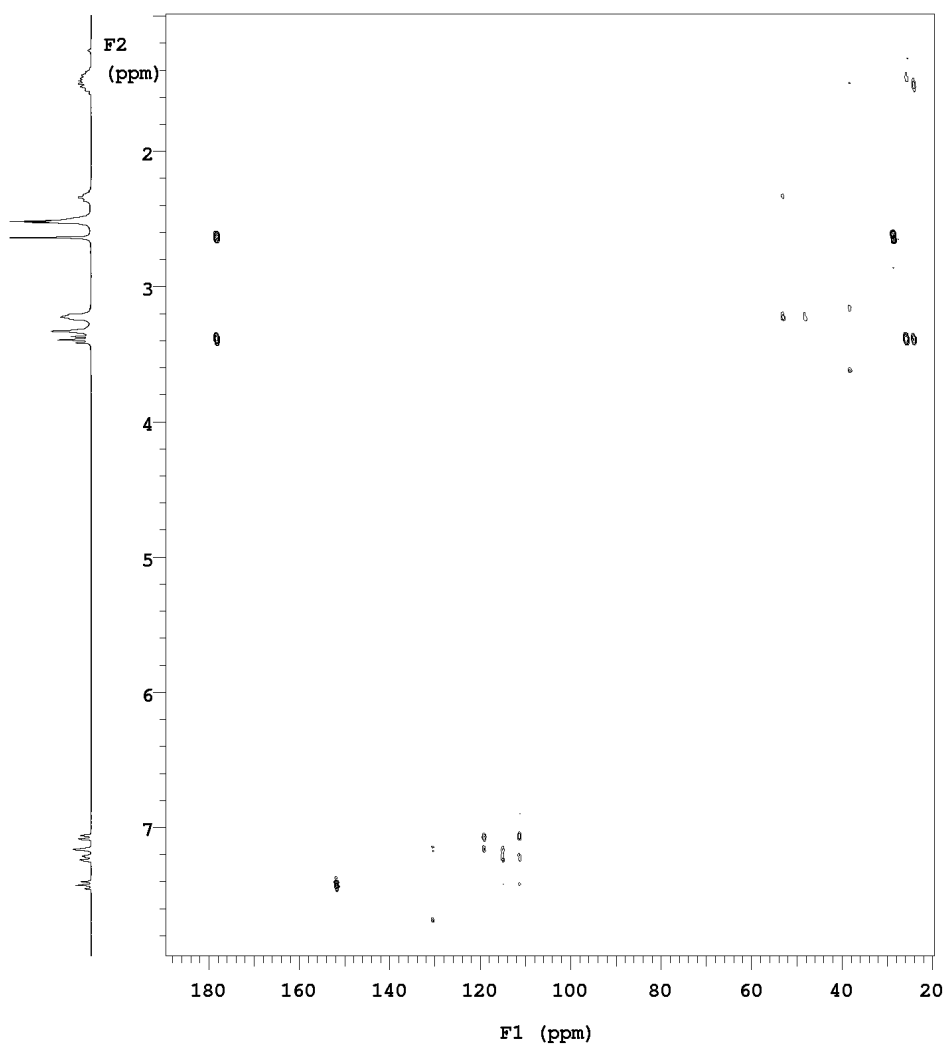


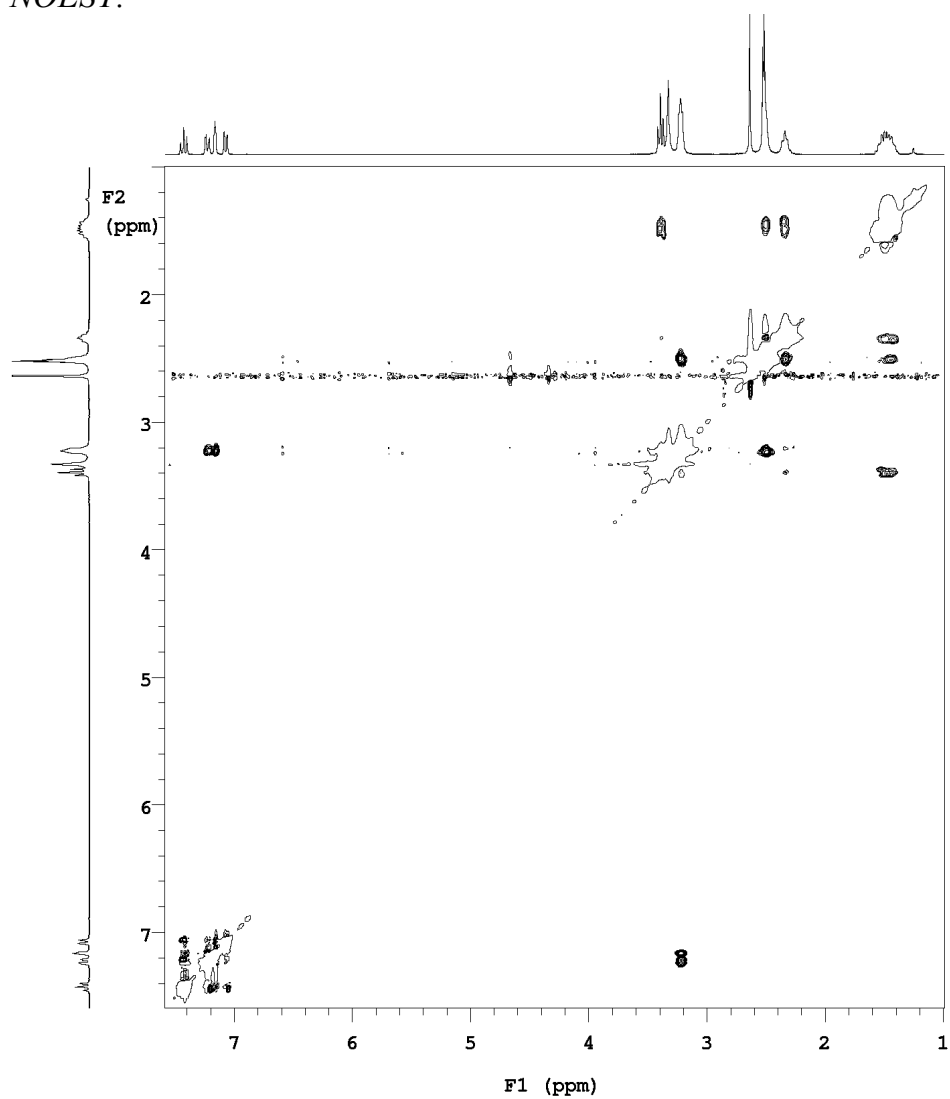
Tabela 4.3.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	178	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	38	H2'
C2'	25	H1', H3'
C3'	24	H1', H2',
C4'	57	
C2''	53	H4', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	48	
C1'''	152	H5'''
C2'''	115	H4'''
C4'''	119	H2'''
C5'''	130	H4'''
C6'''	111	H4''', H5'''

Widmo NOESY:



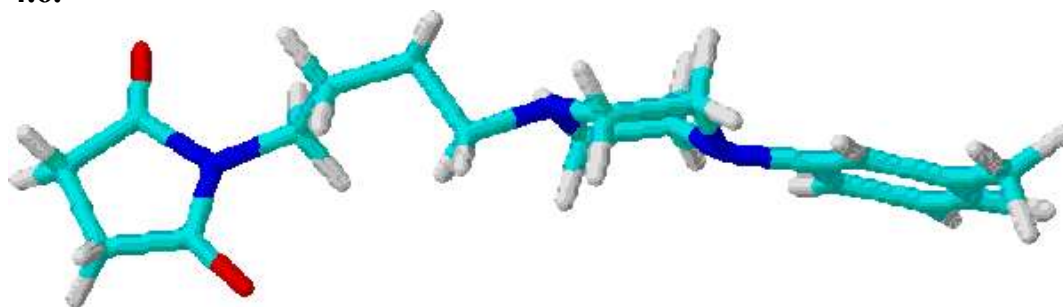
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.3.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

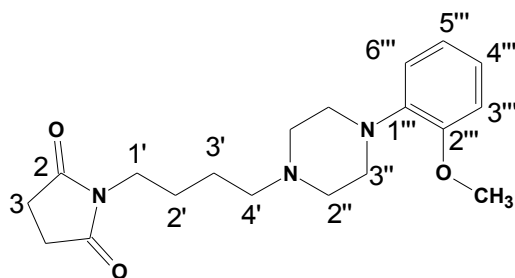
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,86	3,04
H2'-H4'	6,91	2,15
H3'-H4'	6,35	2,18
H3'-H2''	10,69	2,00
H4'-H2''	17,39	1,84
H3''-H2'''	21,20	1,78*
H3''-H6'''	20	1,80

Na poniższym rysunku przedstawiono strukturę związku **3** w DMSO obliczoną na podstawie danych NOE.

Rys. 4.6.



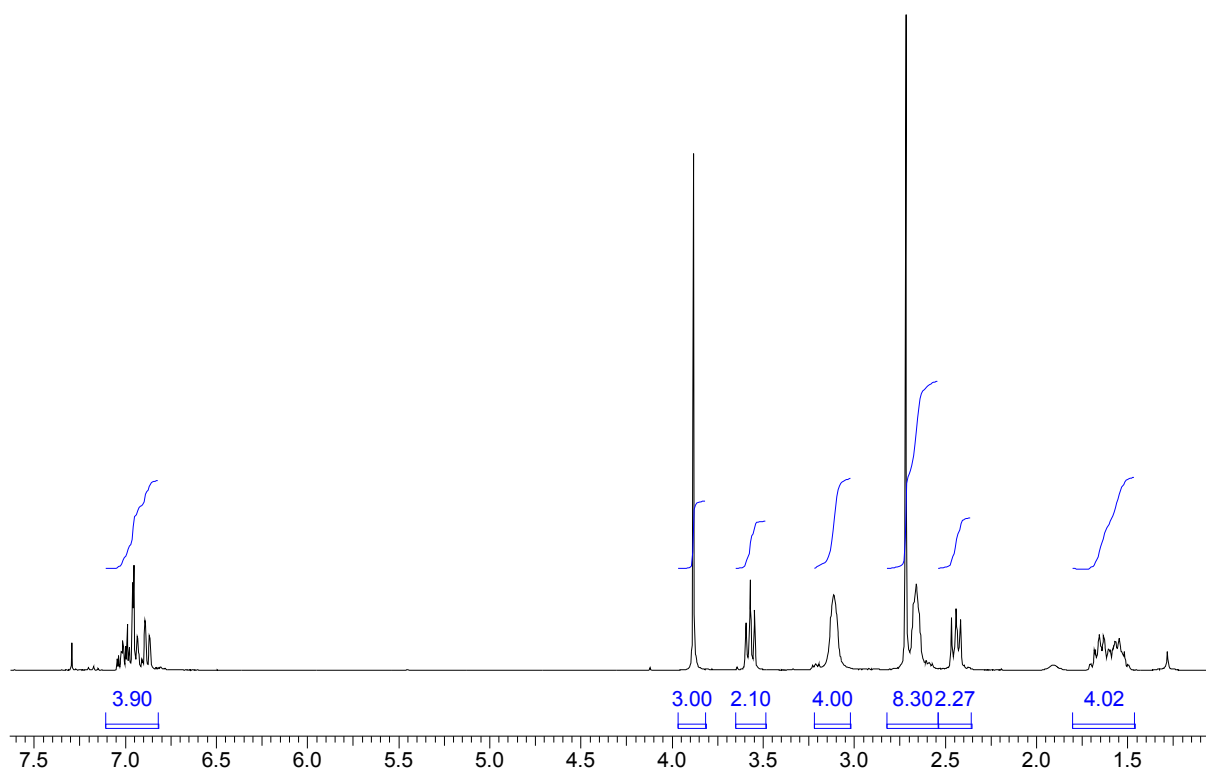
4.4. Związek 4



Analizę spektroskopową związku **4** prowadzono zarówno w roztworze CDCl_3 jak i DMSO.

Interpretacja widm uzyskanych w CDCl_3 :

Widmo ^1NMR :

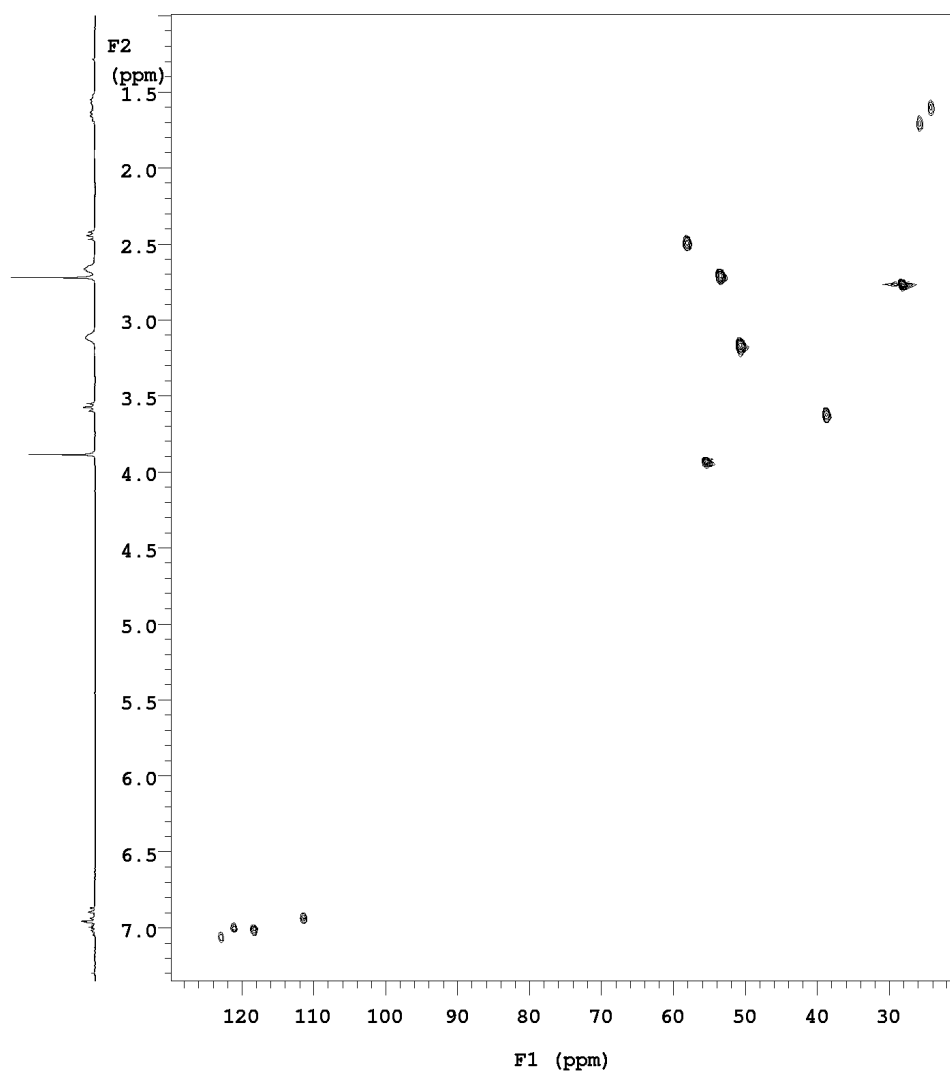


Przypisanie sygnałów do odpowiednich protonów wraz z interpretacją widma 2D COSY zamieszczono w tabeli 4.4.1.

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H3''	3,11	multiplet	4	-	H2''
H3'''- H6'''	6,80-7,06	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,88	singlet	3	-	H3''' - H6'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

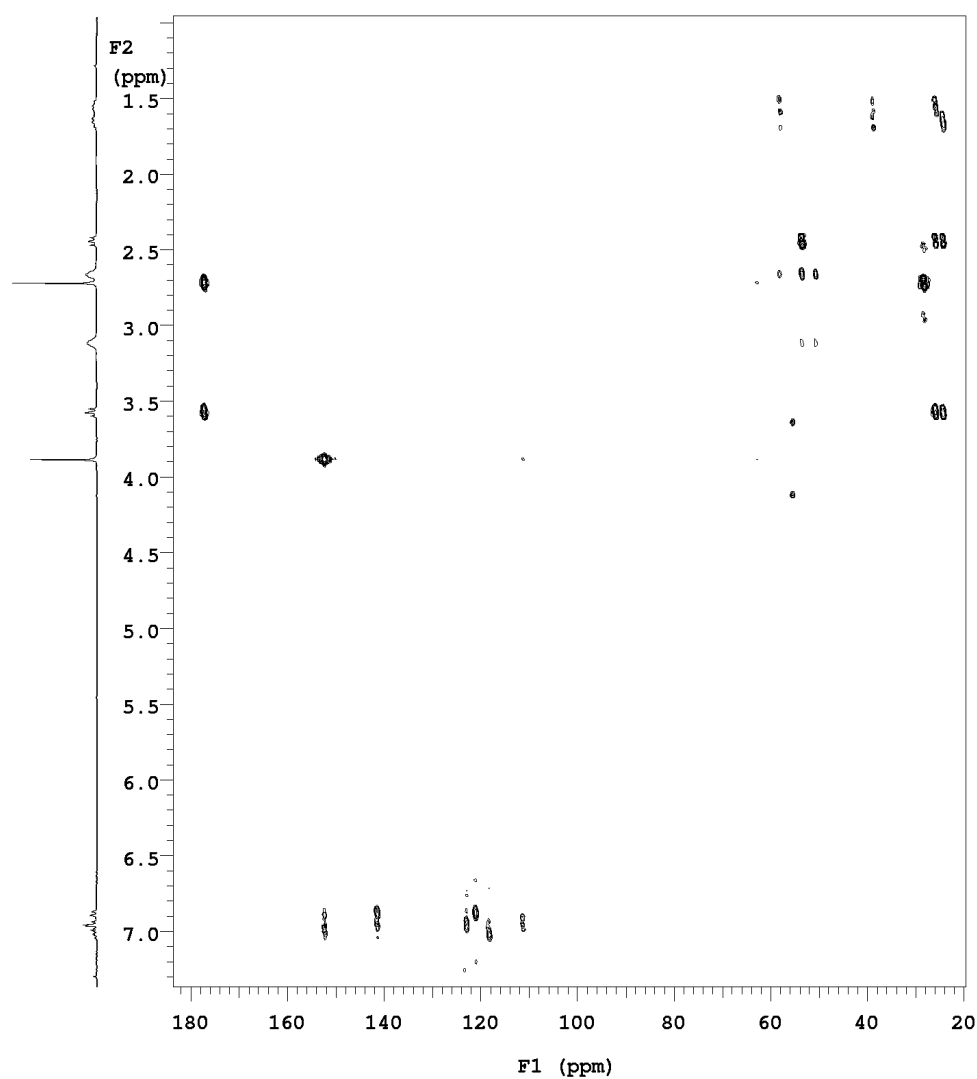


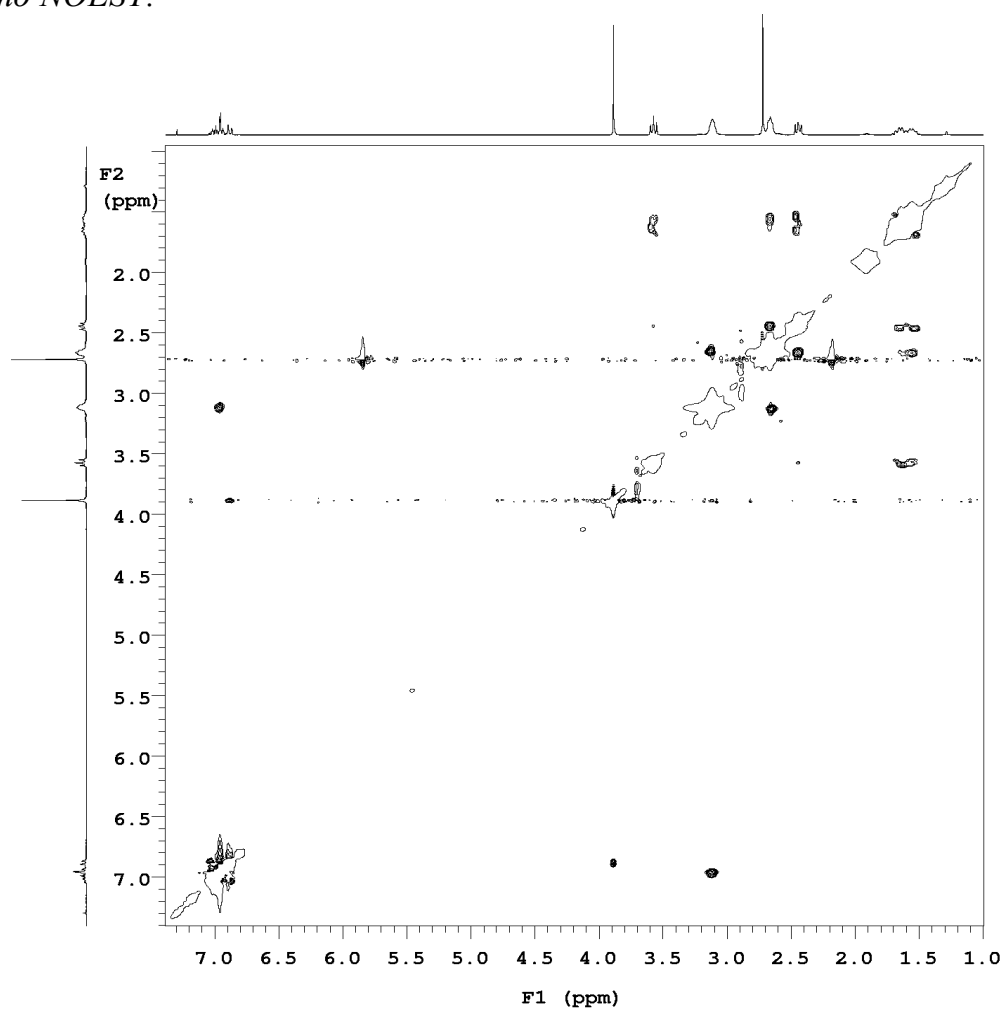
Tabela 4.4.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	177	H3, H1'
C3	28	H3
C1'	38	H2', H3'
C2'	25	H1', H3', H4'
C3'	24	H1', H2', H4'
C4'	58	H2', H3', H2''
C2''	53	H4', H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	50	H2'', H3''
C1'''	141	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', $\underline{\text{CH}}_3$
C3'''	119	H3'''-H6'''
C4'''	121	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	123	H3'''-H6'''
$\underline{\text{CH}}_3$	55	

Widmo NOESY:



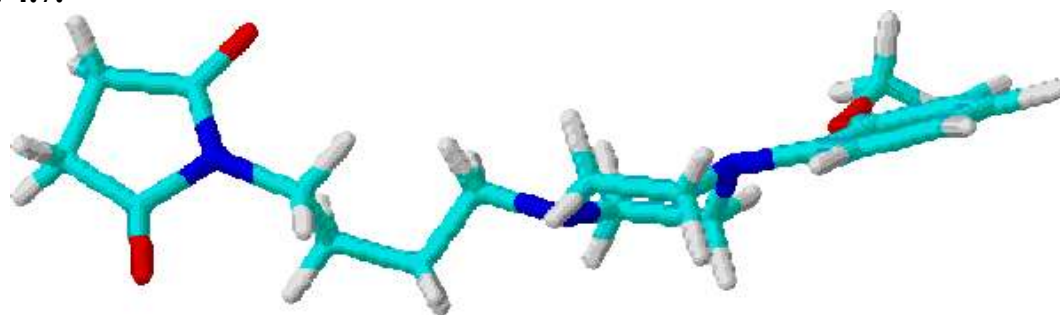
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.4.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,24	3,02
H1'-H2'	10,68	2,11
H2'-H4'	6,73	2,28
H3'-H4'	10,22	2,12
H3'-H2''	11,75	2,07
H4'-H2''	27,55	1,80
H3''-H6'''	25,76	1,82*
H5'''-CH ₃	10,00	2,13

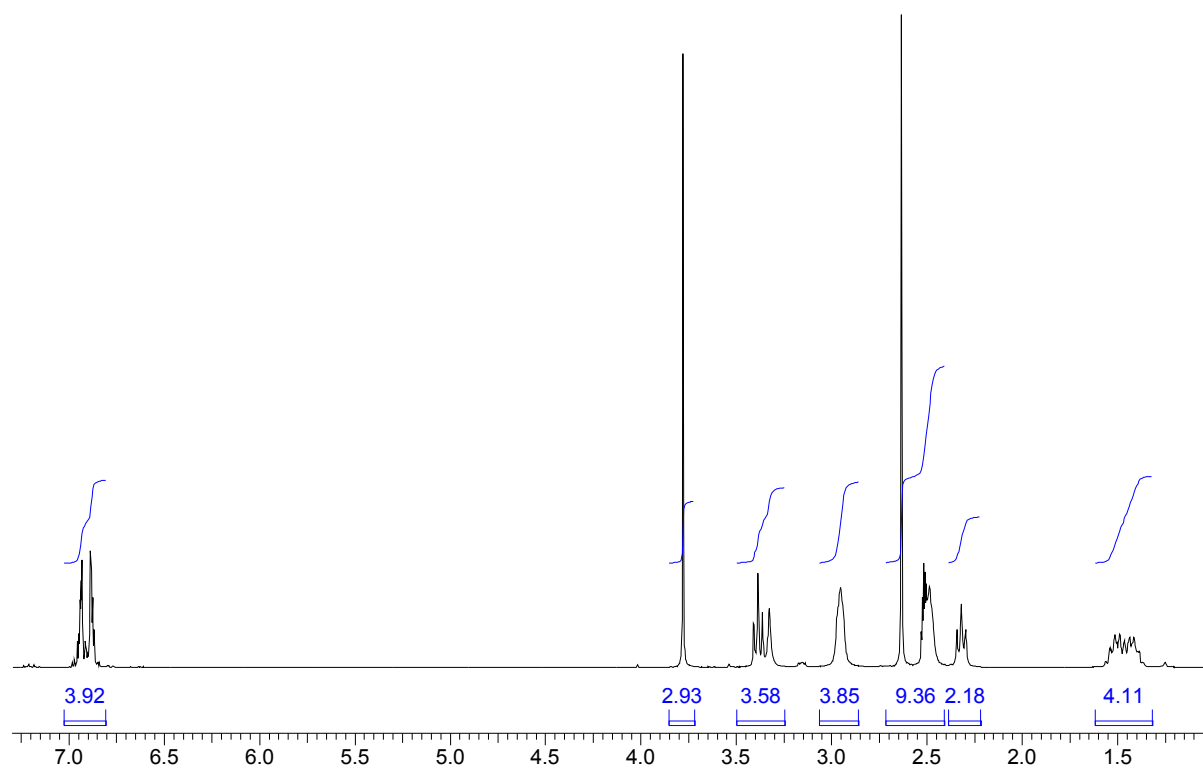
Na rysunku przedstawiono obliczoną na podstawie danych spektroskopowych konformację związku 4.

Rys. 4.7.



Interpretacja widm uzyskanych w roztworze DMSO:

Widmo ^1NMR :



Szczegółowy opis widma został zamieszczony w tabeli 4.4.4 razem z danymi odczytanymi z widma 2D COSY.

Widmo COSY:

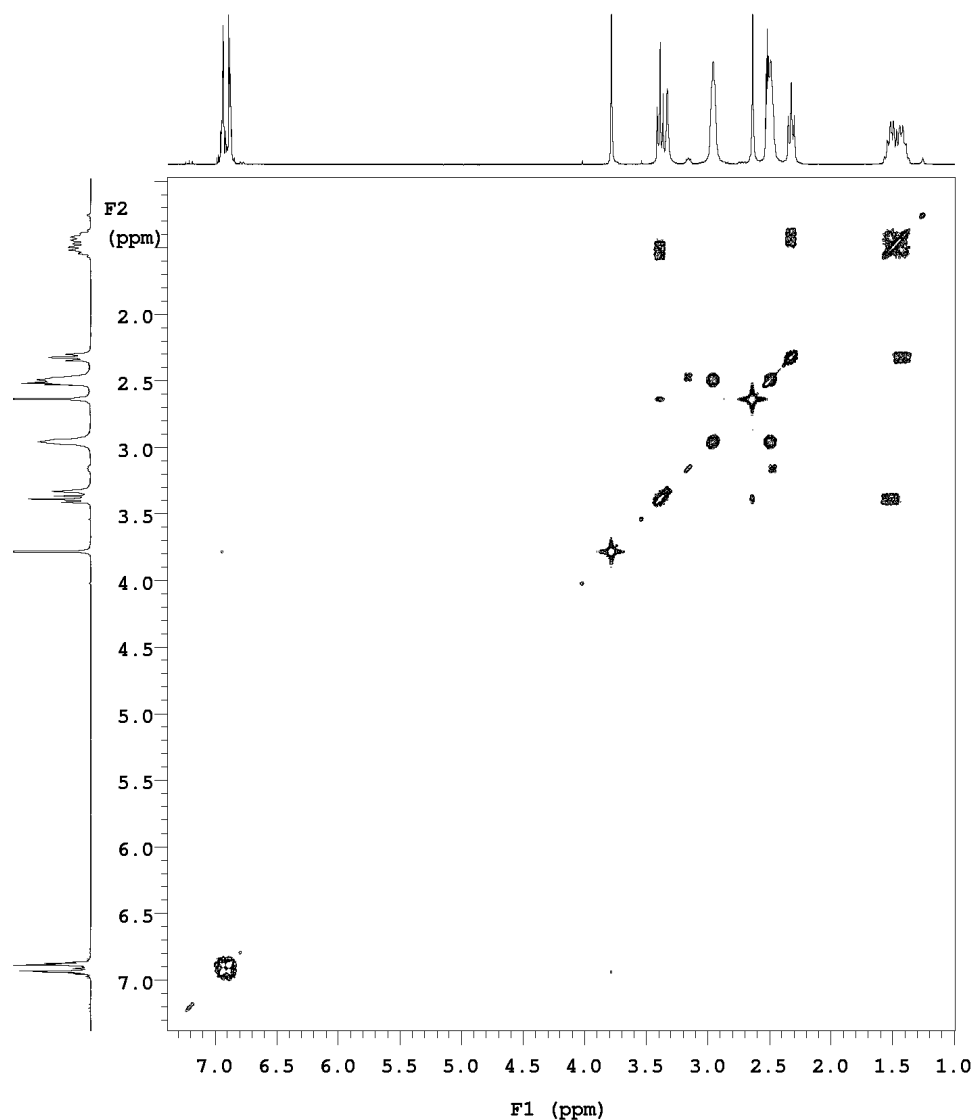


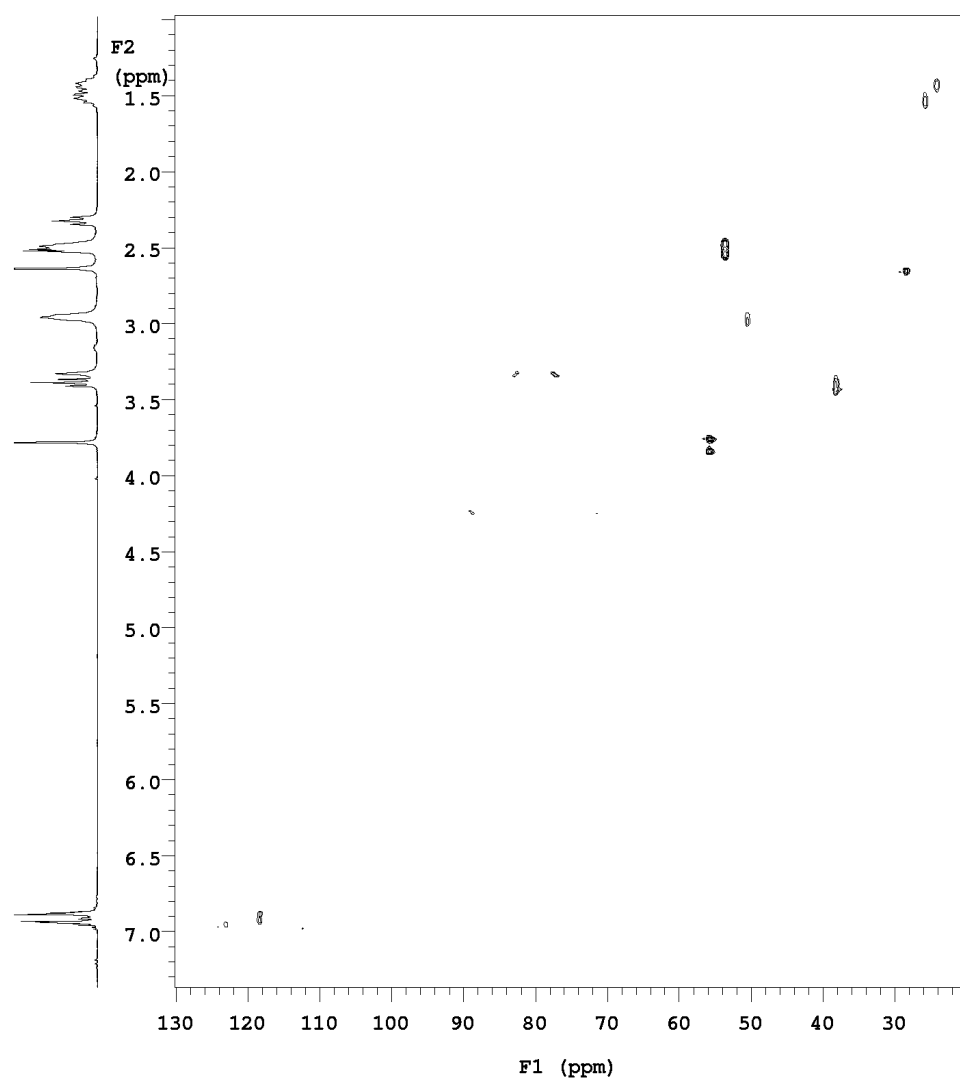
Tabela 4.4.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipleto-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,63	singlet	4	-	H2'
H1'	3,40	tryplet	2	6,9	H2, H2'
H2'	1,50-1,60	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,40-1,50	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	2,32	tryplet	2	7,1	H3'
H2''	2,50	poszerz. singlet	4	-	H3''
H3''	2,95	poszerz. singlet	4	-	H2''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H3'''- H6'''	6,80-7,00	multiplet	4	-	
CH ₃	3,78	singlet	3	-	

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

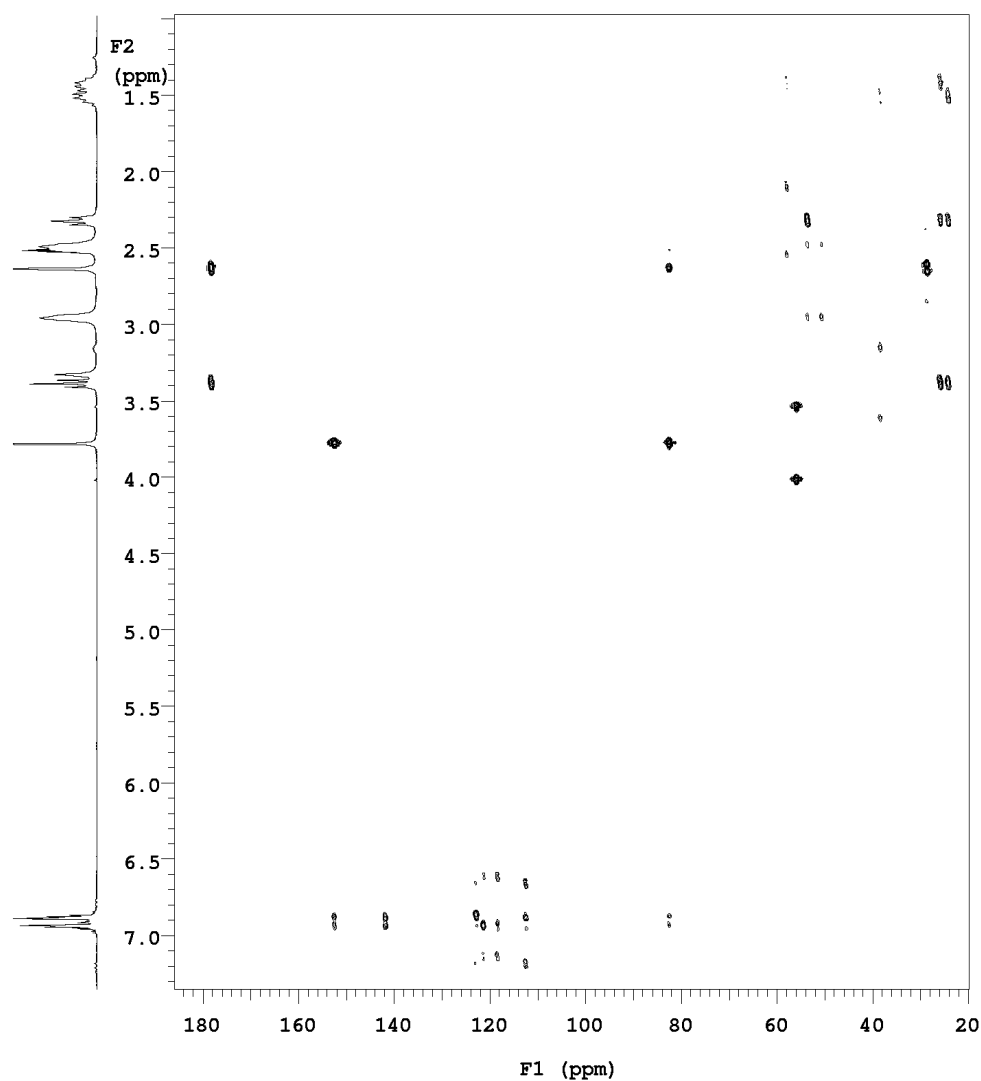


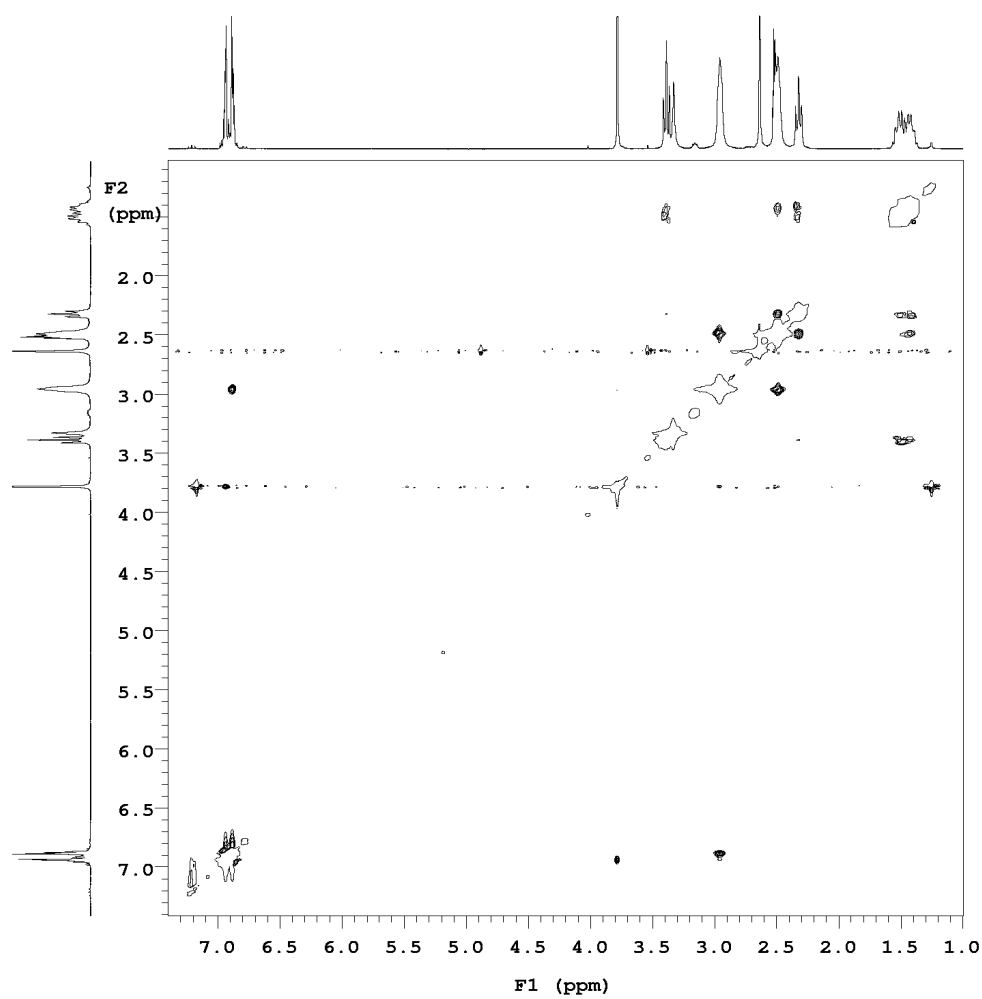
Tabela 4.4.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	178	H3, H1'
C3	28	H3
C1'	38	H2', H3'
C2'	26	H1', H3', H4'
C3'	24	H1', H2', H4'
C4'	57	H2', H3'
C2''	54	H4', H2'', H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	50	H2'', H3''
C1'''	141	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', $\underline{\text{CH}}_3$
C3'''	119	H3'''-H6'''
C4'''	121	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	123	H3'''-H6'''
$\underline{\text{CH}}_3$	55	

Widmo NOESY:



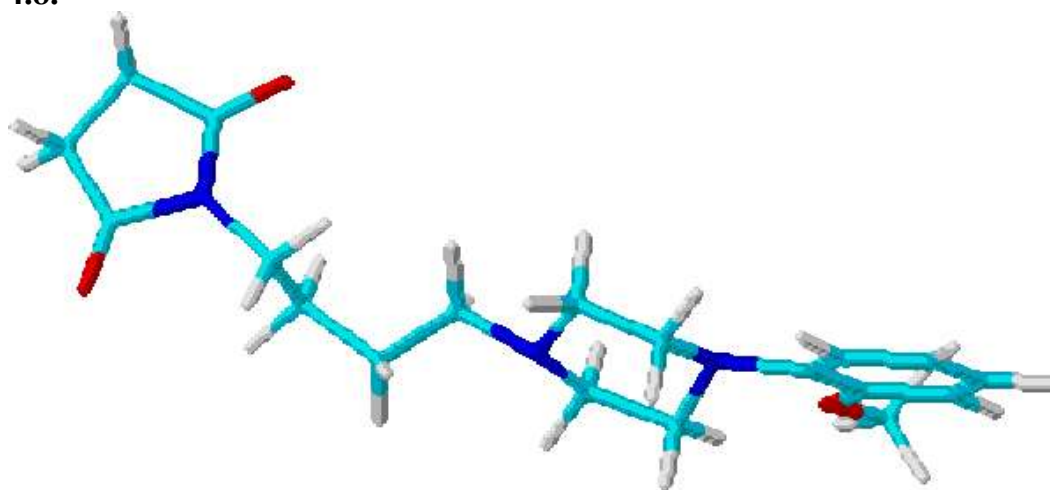
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.4.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

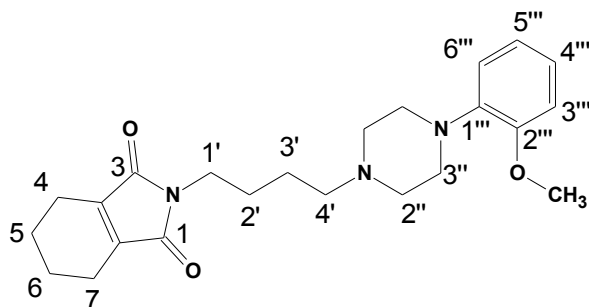
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,00	3,78
H1'-H2'	20,04	3,29
H2'-H4'	17,29	2,35
H3'-H4'	22,19	2,25
H3'-H2''	25,76	2,20
H4'-H2''	60,14	1,91
H3''-H6'''	66,92	1,87
H5'''-CH ₃	31,95	2,12*

Na poniższym rysunku przedstawiono strukturę związku **4** w DMSO obliczoną na podstawie danych NOE.

Rys. 4.8.



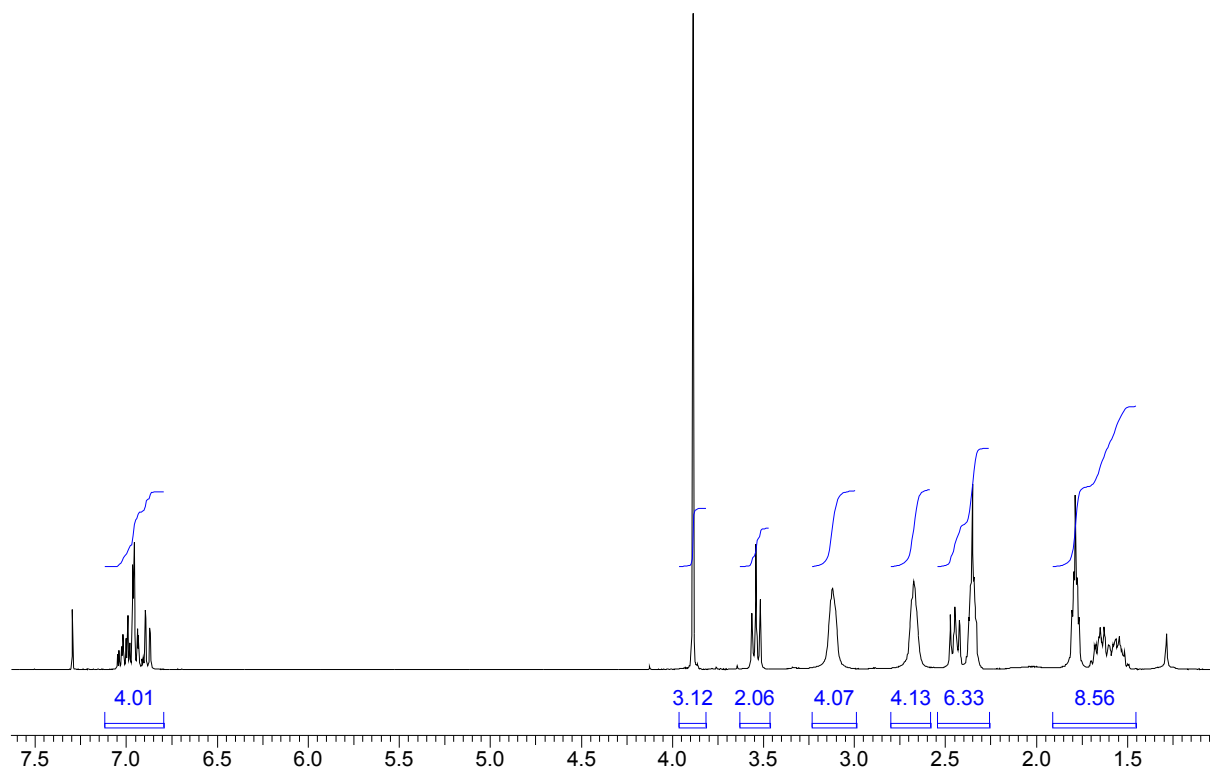
4.5. Związek 5



Komplet widm NMR sporządzono dla związku **5** w roztworach CDCl_3 oraz DMSO.

Interpretacja widm otrzymanych w roztworze CDCl_3 :

Widmo ^1H NMR:



Interpretację widma zamieszczono w tabeli 4.5.1 razem z danymi spektroskopowymi pochodzącymi z widma 2D COSY.

Widmo COSY:

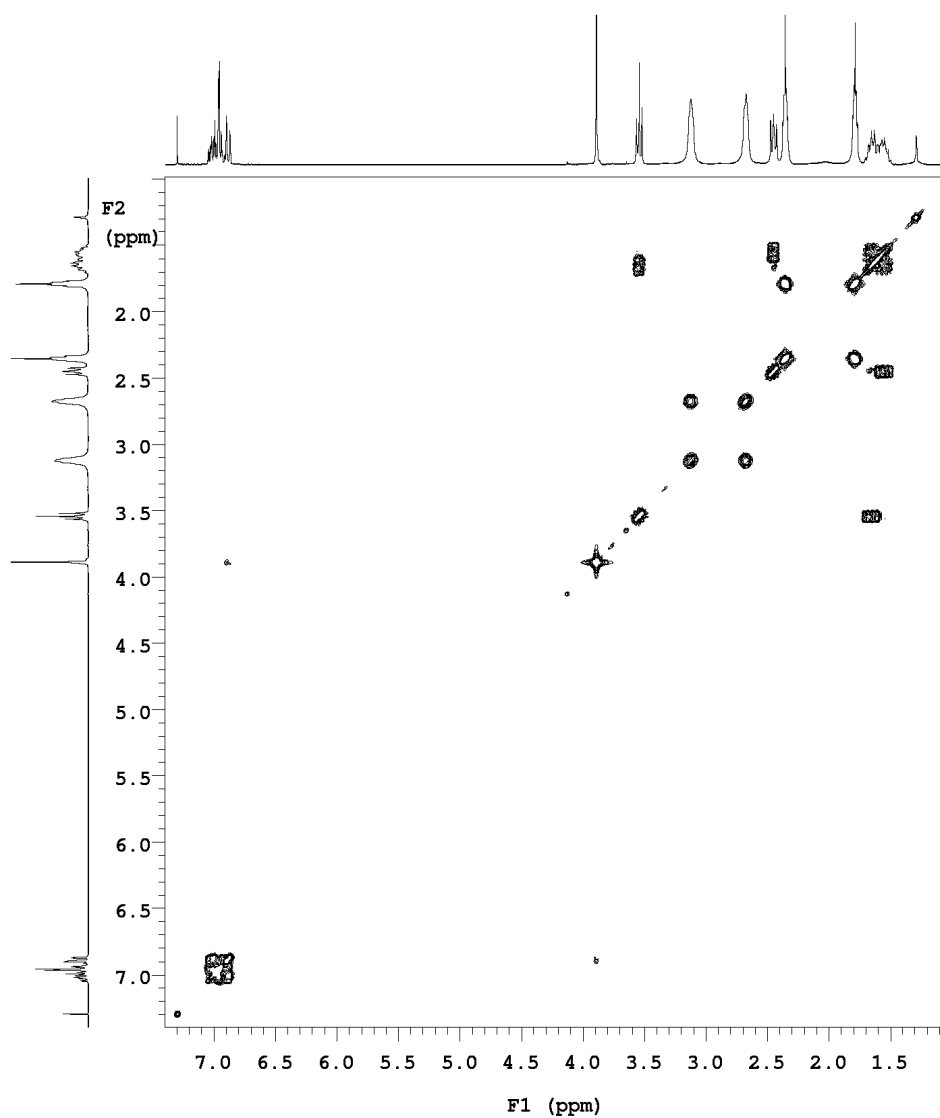


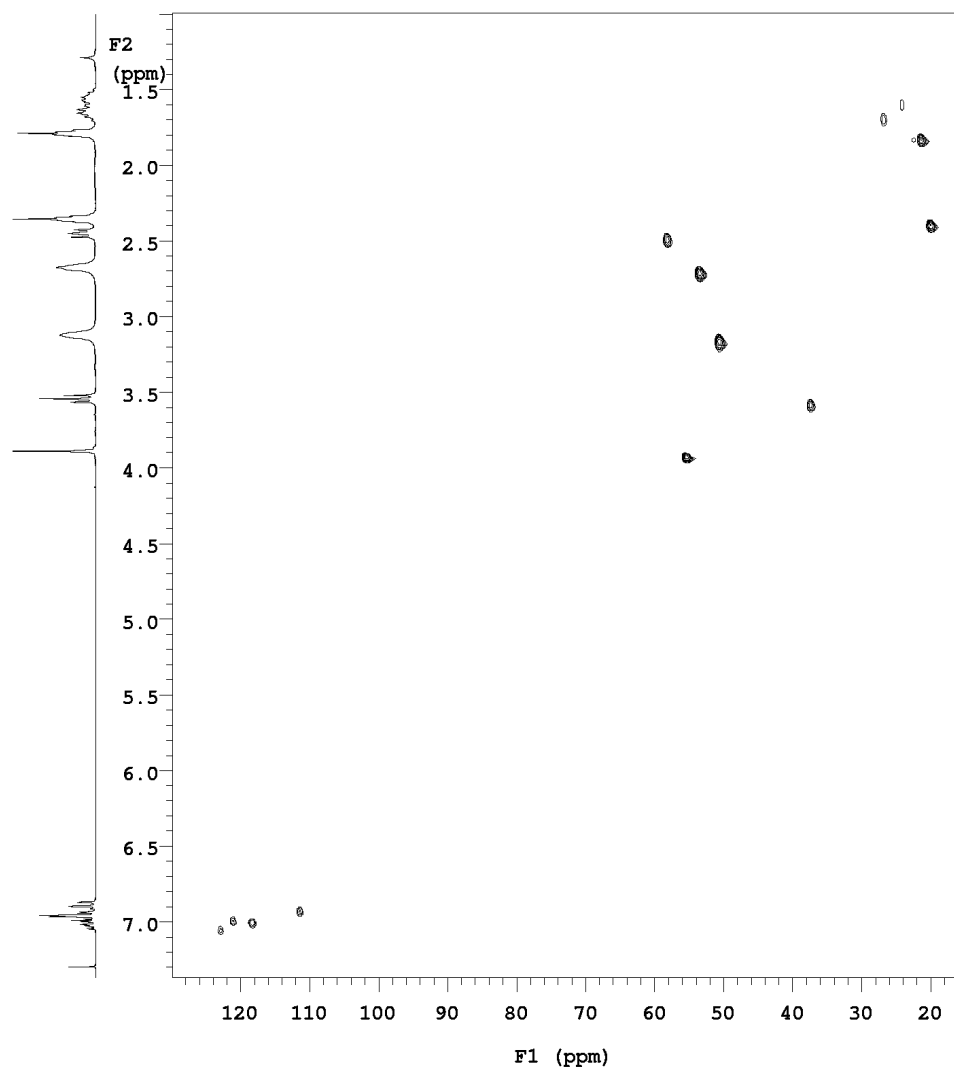
Tabela 4.5.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4(7)	2,36	multiplet	4	-	H5
H5(6)	1,80	multiplet	4		H4
H1'	3,54	tryplet	2	6,9	H2'
H2'	1,60-1,75	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,45-1,60	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	2,45	tryplet	2	7,4	H2', H3'
H2''	2,67	poszerz. singlet	4	-	H3''

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H3''	3,12	poszerz. singlet	4	-	H2''
H3'''- H6'''	6,85-7,05	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,89	singlet	3	-	H3'''-H6'''

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

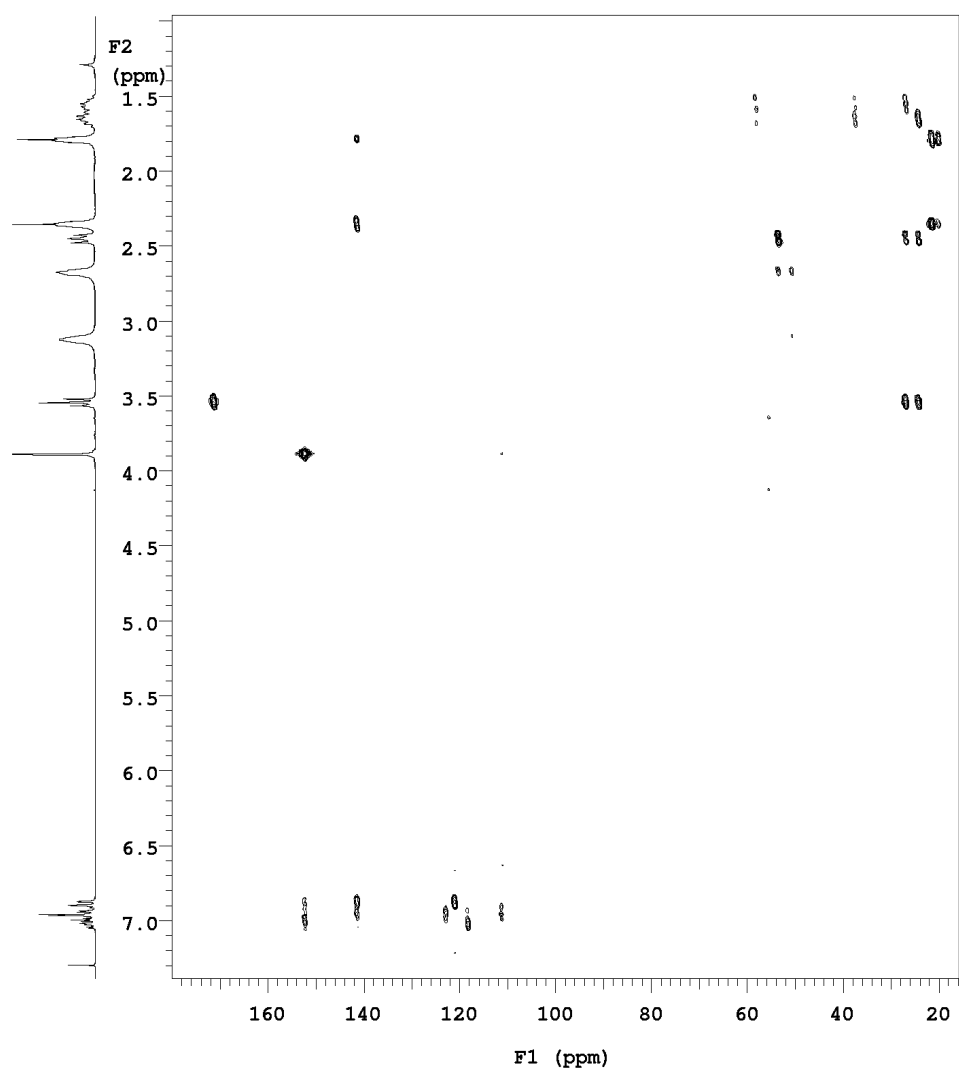


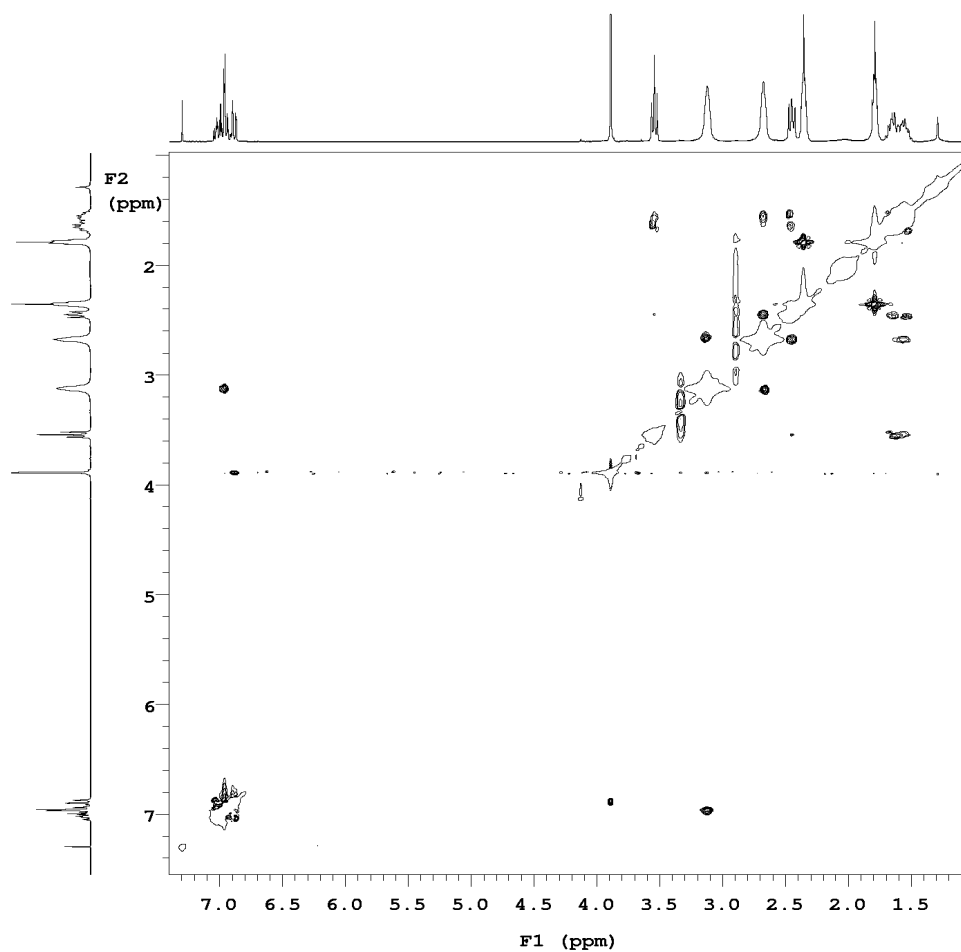
Tabela 4.5.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C1(3)	171	H1'
C3a	140	H4, H5
C4(7)	20	H4, H5
C5(6)	21	H4, H5
C1'	37	H2', H3'
C2'	27	H1', H3', H4'
C3'	23	H1', H2', H4'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C4'	58	H2', H3'
C2''	54	H4', H2''
C3''	50	H2'', H3''
C1'''	141	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', CH ₃
C3'''	121	H3'''-H6'''
C4'''	119	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	123	H3'''-H6'''
CH ₃	55	

Widmo NOESY:



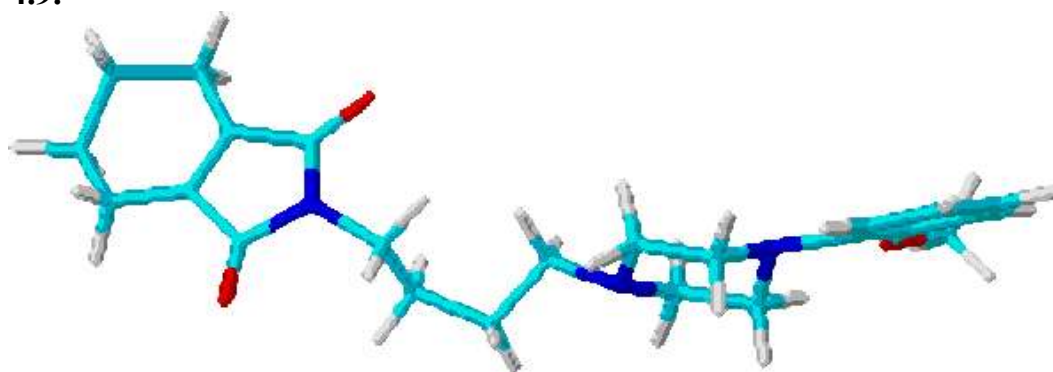
Poniżej przedstawiono interpretację widma NOESY, wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami obliczonymi według metody opisanej w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.5.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,92	3,16
H1'-H2'	14,23	2,00
H2'-H4'	9,30	2,15
H3'-H4'	9,56	2,14
H3'-H2''	13,04	2,03
H4'-H2''	24,66	1,82
H3''-H6'''	23,93	1,83
H5'''-CH ₃	10	2,12*

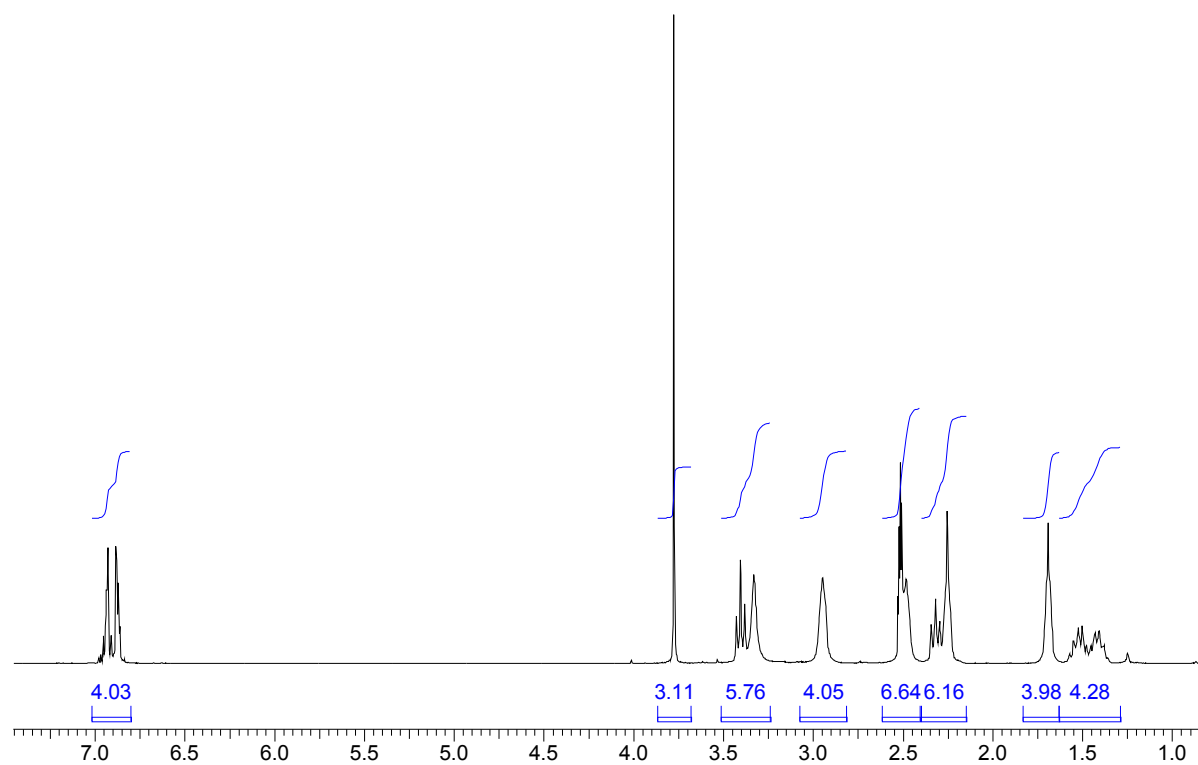
Rysunek przedstawia konformację związku **5** w roztworze CDCl₃ obliczoną przy użyciu danych spektroskopowych.

Rys. 4.9.



Widma wykonane w roztworze DMSO:

Widmo ^1H NMR:



Opis widma zamieszczono w dalszej części tekstu, w tabeli 4.5.4 wraz z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

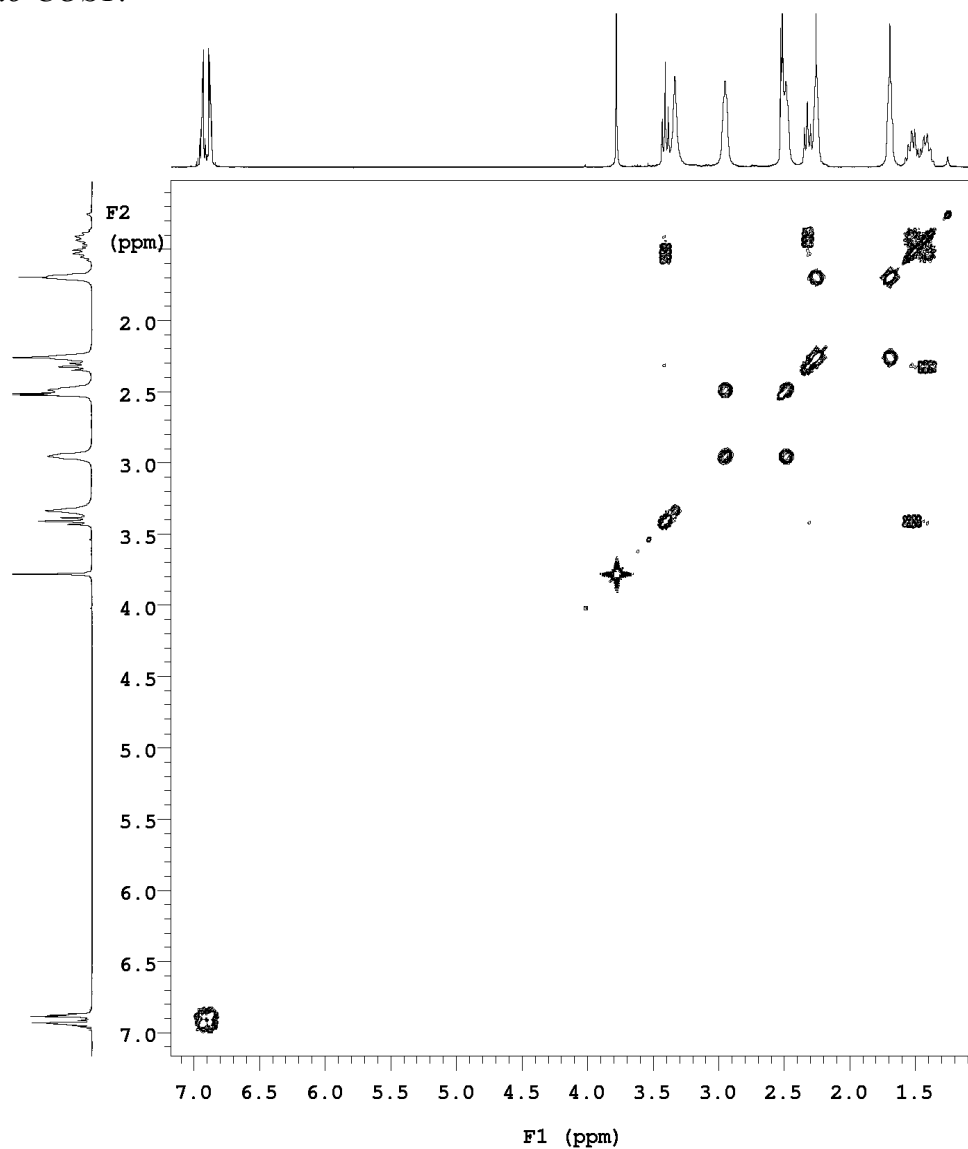


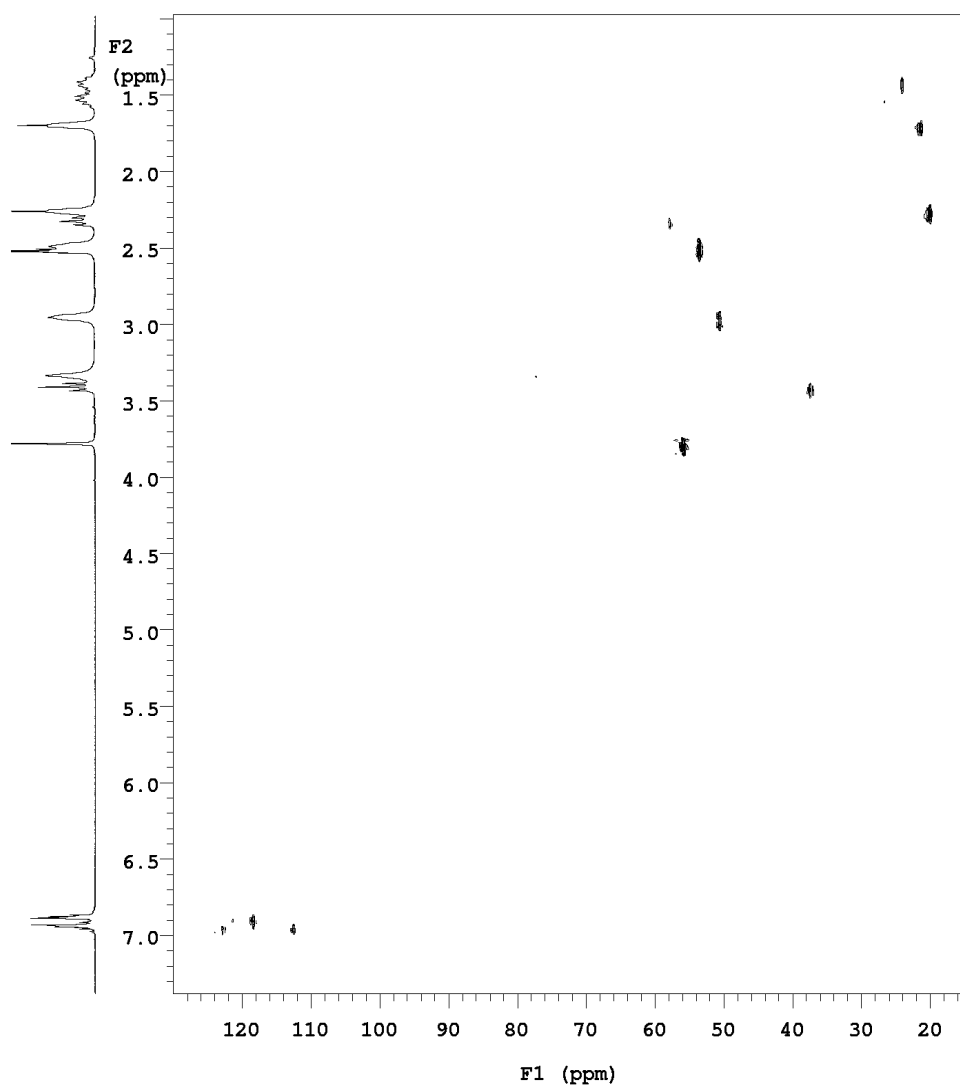
Tabela 4.5.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4(7)	2,25	poszerz. singlet	4	-	H5
H5(6)	1,69	poszerz. singlet	4		H4
H1'	3,40	tryplet	2	6,6	H2', H3', H4'
H2'	1,45-1,60	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,31-1,45	multiplet	2	-	H1', H2', H4'
H4'	2,32	tryplet	2	7,1	H1', H2', H3'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2"	2,50	poszerz. singlet	4	-	H3"
H3"	2,95	poszerz. singlet	4	-	H2"
H3'''- H6'''	6,80-7,00	multiplet	4	-	
CH ₃	3,78	singlet	3	-	

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

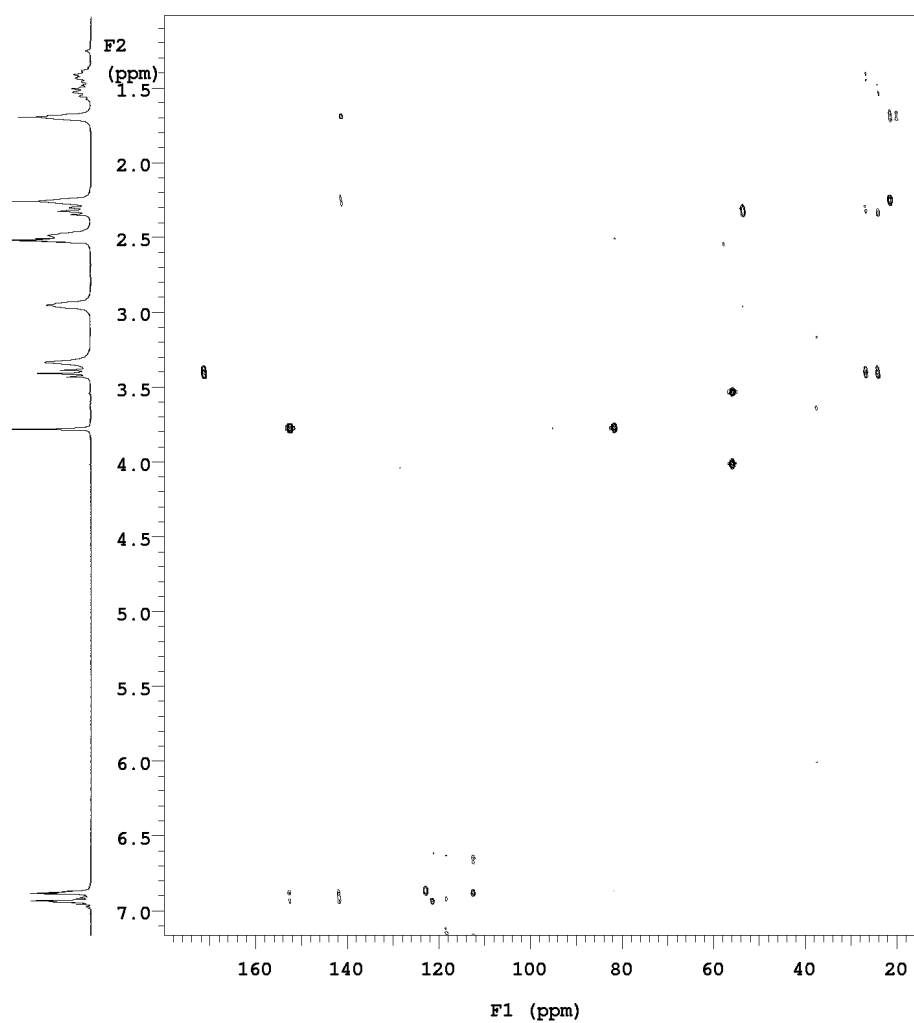


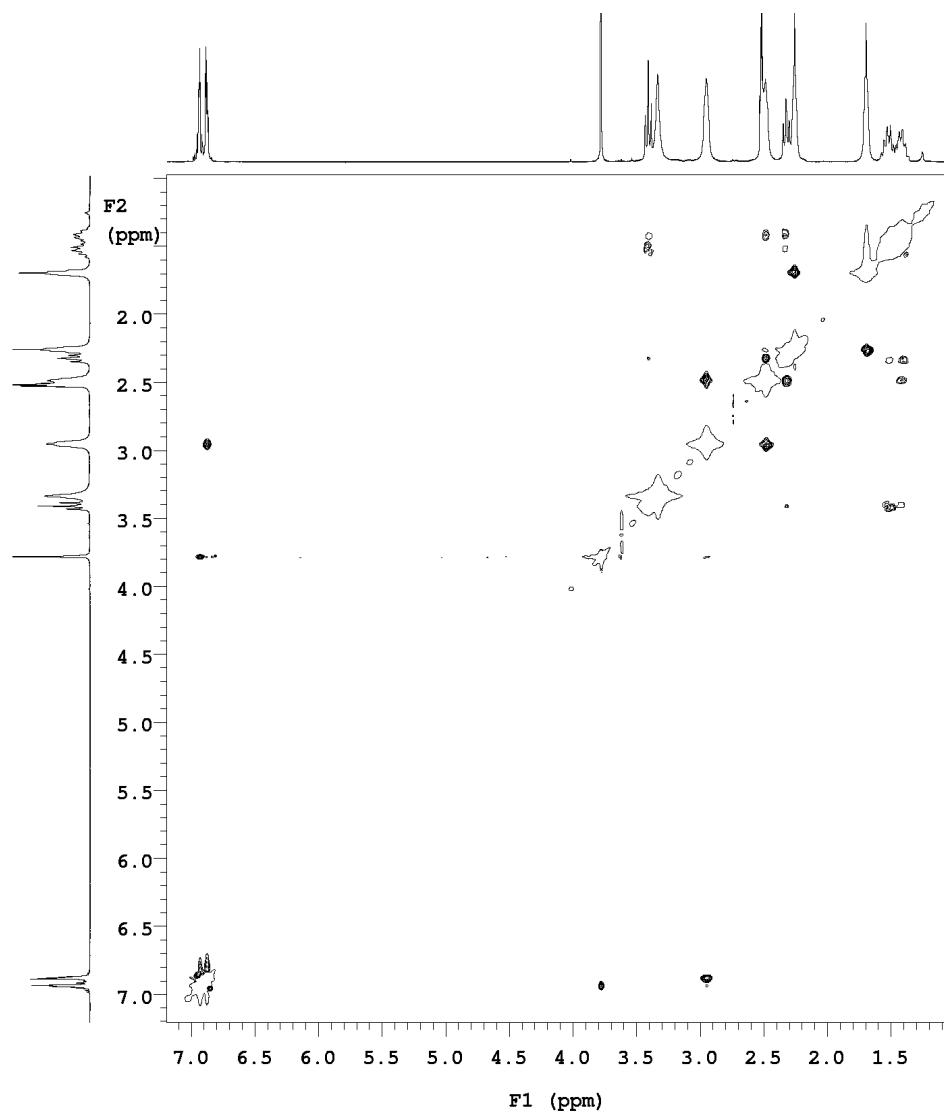
Tabela 4.5.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C1(3)	170	H1'
C3a	140	H4
C4(7)	18	H4, H5
C5(6)	20	H4, H5
C1'	38	
C2'	26	H1', H4'
C3'	24	H1' H4'
C4'	58	

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C2''	54	H4'
C3''	51	
C1'''	142	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', CH ₃
C3'''	119	H3'''-H6'''
C4'''	121	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	122	H3'''-H6'''
CH ₃	56	

Widmo NOESY:



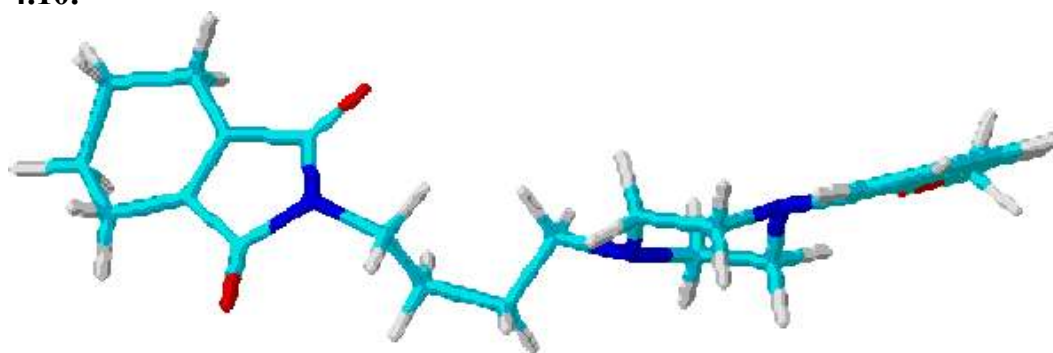
W tabeli 4.5.6 zestawiono wyniki obliczeń średniej odległości pomiędzy oddziałującymi protonami wraz z interpretacją widma NOESY. Obliczeń dokonano metodą przedstawioną w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.5.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

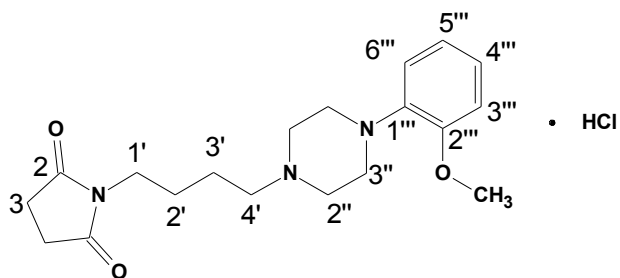
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,91	3,16
H1'-H2'	7,57	2,22
H2'-H4'	2,87	2,61
H3'-H4'	6,92	2,25
H3'-H2''	7,05	2,25
H4'-H2''	17,80	1,93
H3''-H6'''	20,72	1,88
H5'''-CH ₃	10,00	2,12*

Na rysunku poniżej przedstawiono konformację związku **5** w roztworze DMSO obliczoną w oparciu o dane odczytane z widma NOESY.

Rys. 4.10.



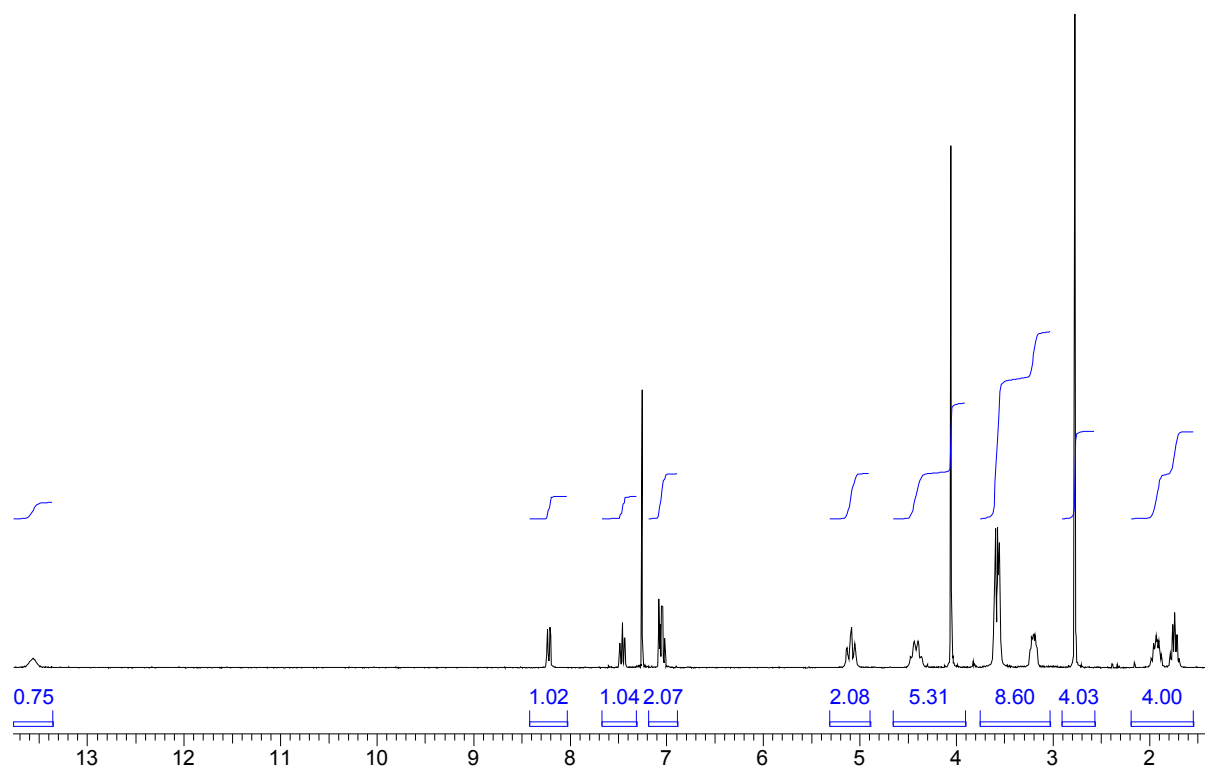
4.6. Związek 6



Dla związku **6** widma wykonano w CDCl_3 oraz w DMSO.

Widma otrzymane w roztworze CDCl_3 :

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów zamieszczono w tabeli 4.6.1 razem z opisem widma COSY.

Widmo COSY:

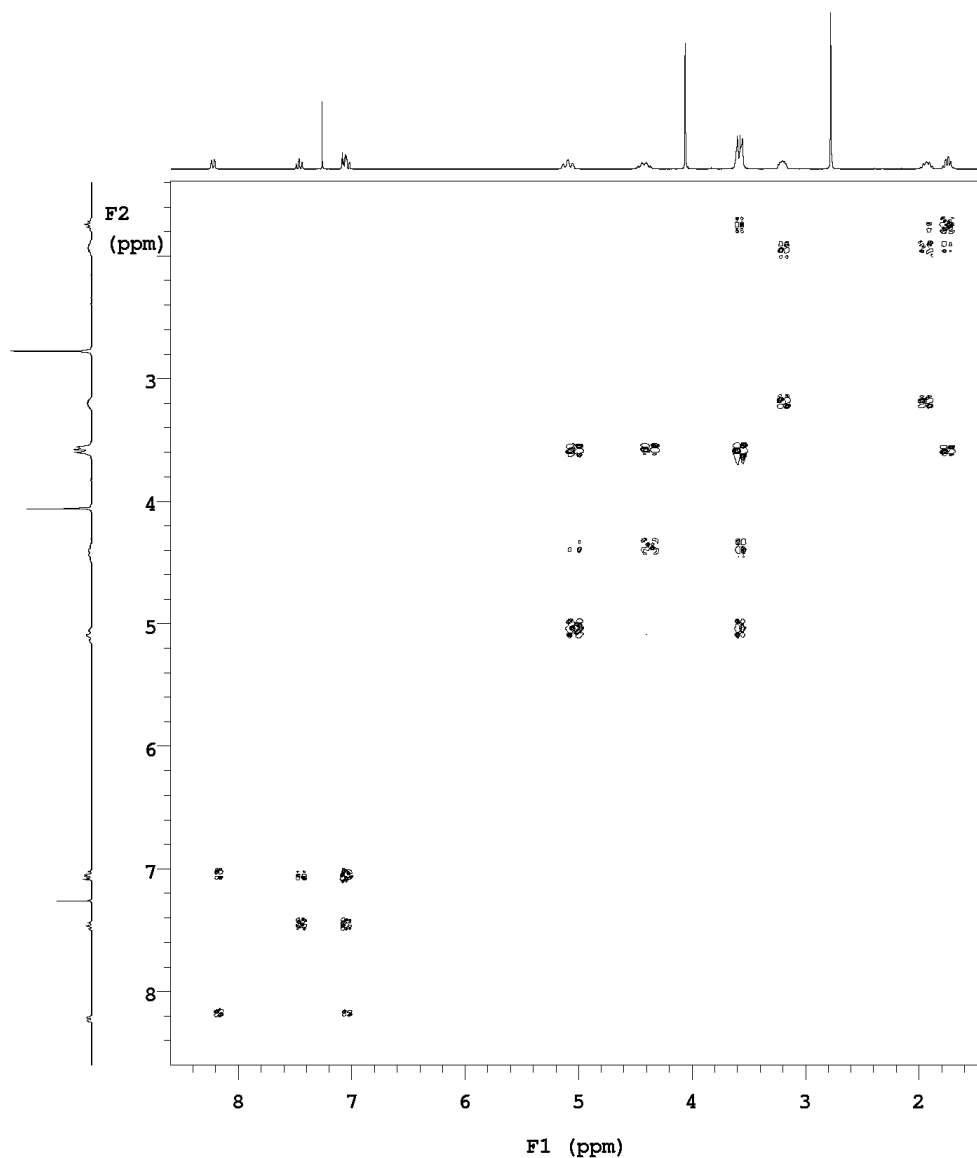


Tabela 4.6.1. Interpretacja widm ¹H NMR i 2D COSY.

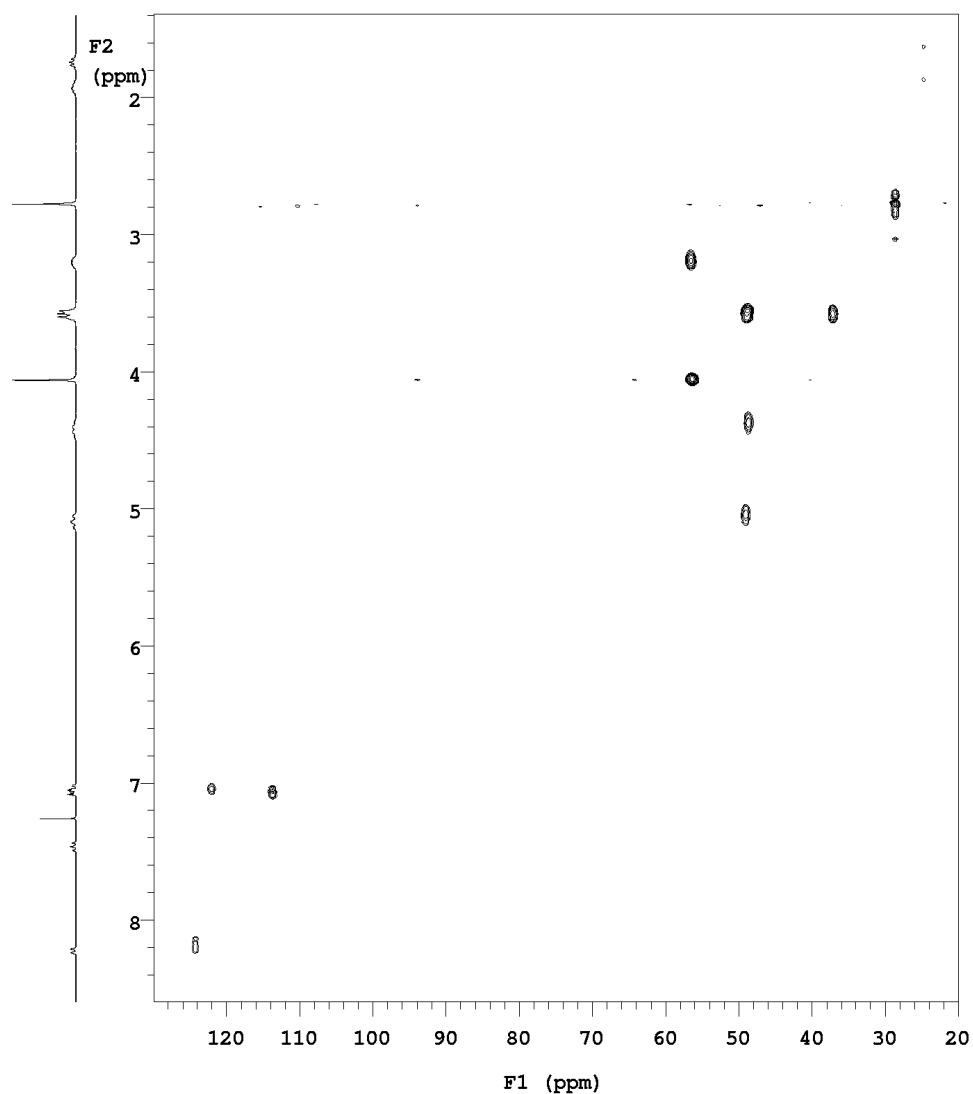
Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,77	singlet	4	-	
H1'	3,60	multiplet	2	-	H2'
H2'	1,74	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,93	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,20	multiplet	2	-	H3'
H2" _a	4,42	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H3" _a

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2" _e , H3" _e	3,56	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3" _a	5,09	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H2" _a
H3''', H5'''	7,01-7,10	multiplet	2	-	H4''', H6'''
H4'''	7,46	tryplet	1	7,9	H3''', H5'''
H6'''	8,22	dublet	1	7,9	H3''', H5'''
CH ₃	4,06	singlet	3	-	

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

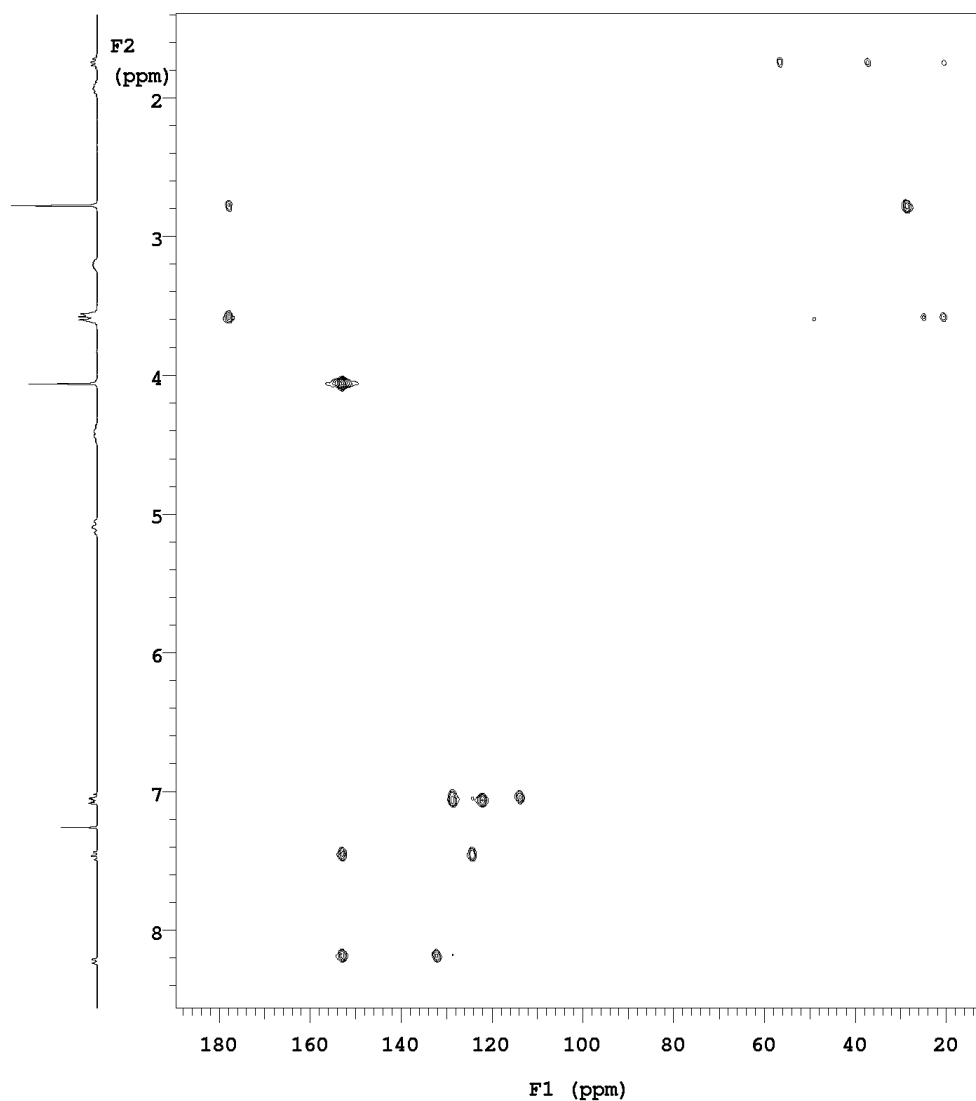


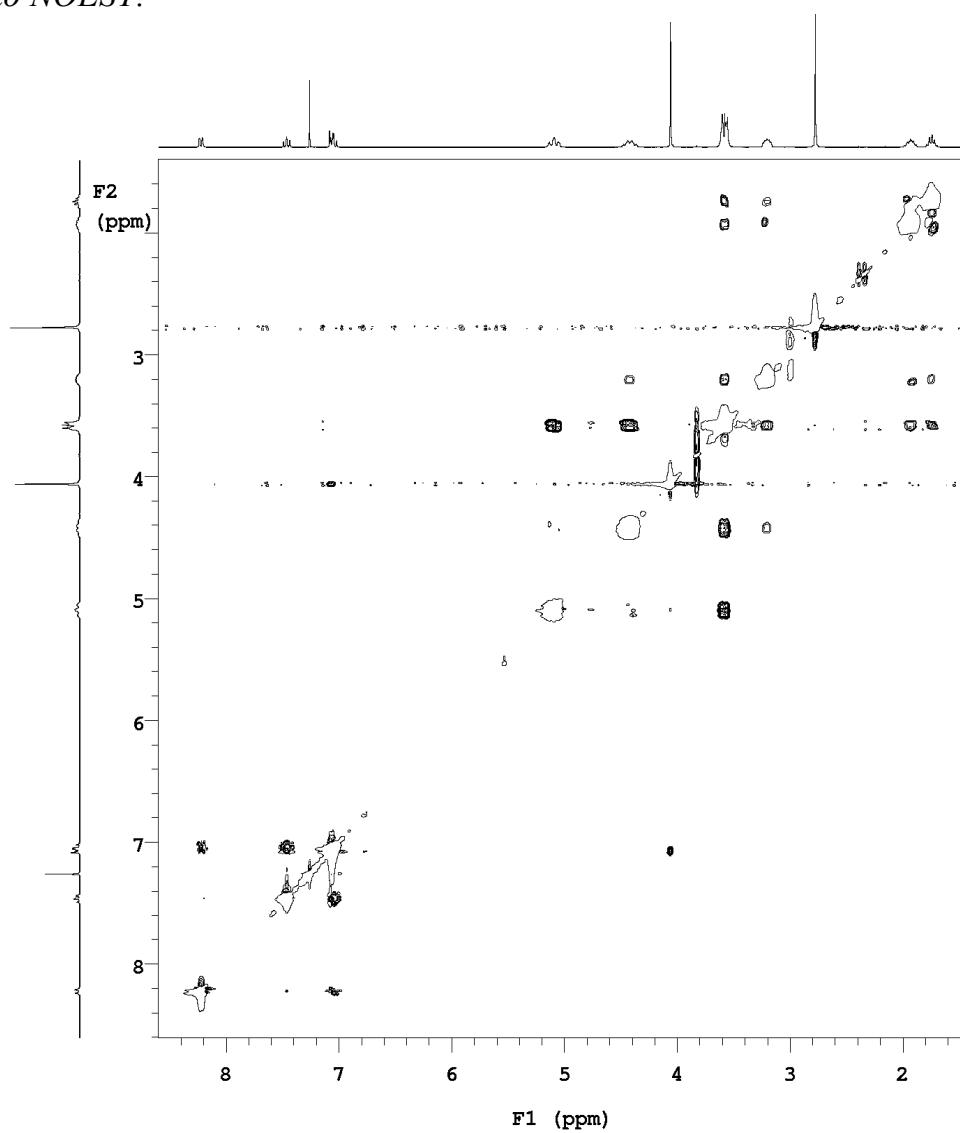
Tabela 4.6.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	174	H3, H1'
C3	29	H3
C1'	38	H2'
C2'	25	H4'
C3'	21	H2', H4'
C4'	57	H2'
C2''	48	H2'' _e , H3'' _e

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3''	49	
C1'''	132	H6'''
C2'''	153	H4''' , H6''' , $\underline{\text{CH}}_3$
C3'''	113	H3''' , H5'''
C4'''	128	H3''' , H5'''
C5'''	121	H3''' , H5'''
C6'''	124	H4'''
$\underline{\text{CH}}_3$	56	

Widmo NOESY:



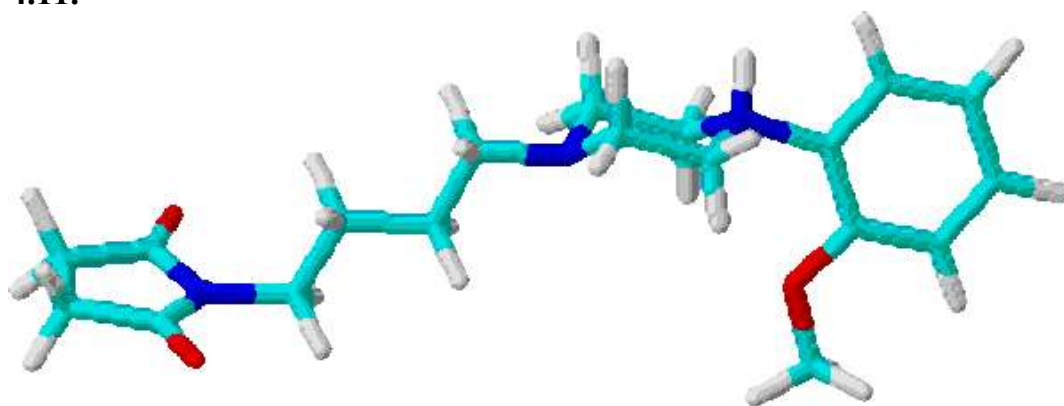
Poniżej przedstawiono interpretację widma NOESY wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami obliczonymi według metody opisanej w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.6.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H2'	9,98	2,12
H2'-H4'	10,35	2,11
H3'-H4'	4,95	2,38
H4'-H2" _e	5,11	2,37
H3" _a -H6'''	0,59	3,40
H3" _e -H6'''	0,24	3,95
H3" _a -CH ₃	0,45	3,55
H5'''-CH ₃	10,00	2,12*

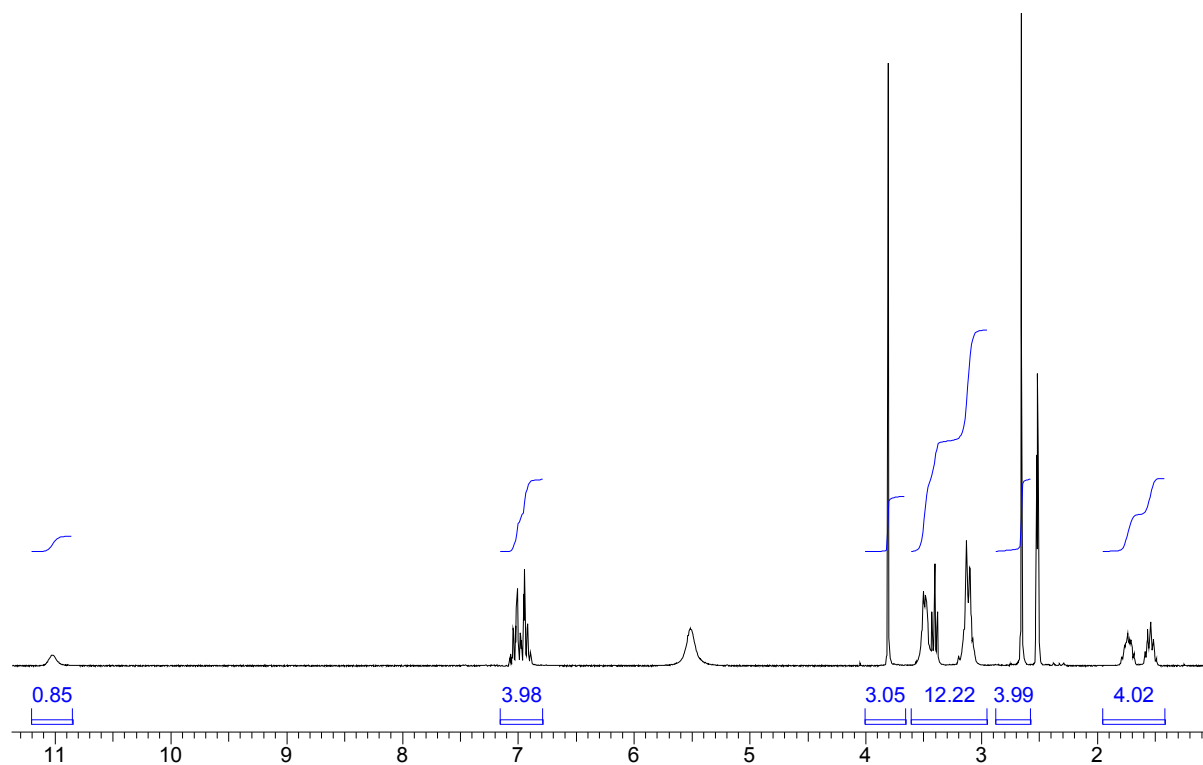
Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **6**. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

Rys. 4.11.



Widma zarejestrowane w roztworze DMSO

Widmo ^1H NMR:



Zestawienie przypisania sygnałów do odpowiednich grup protonów zebrano w tabeli 4.6.4 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

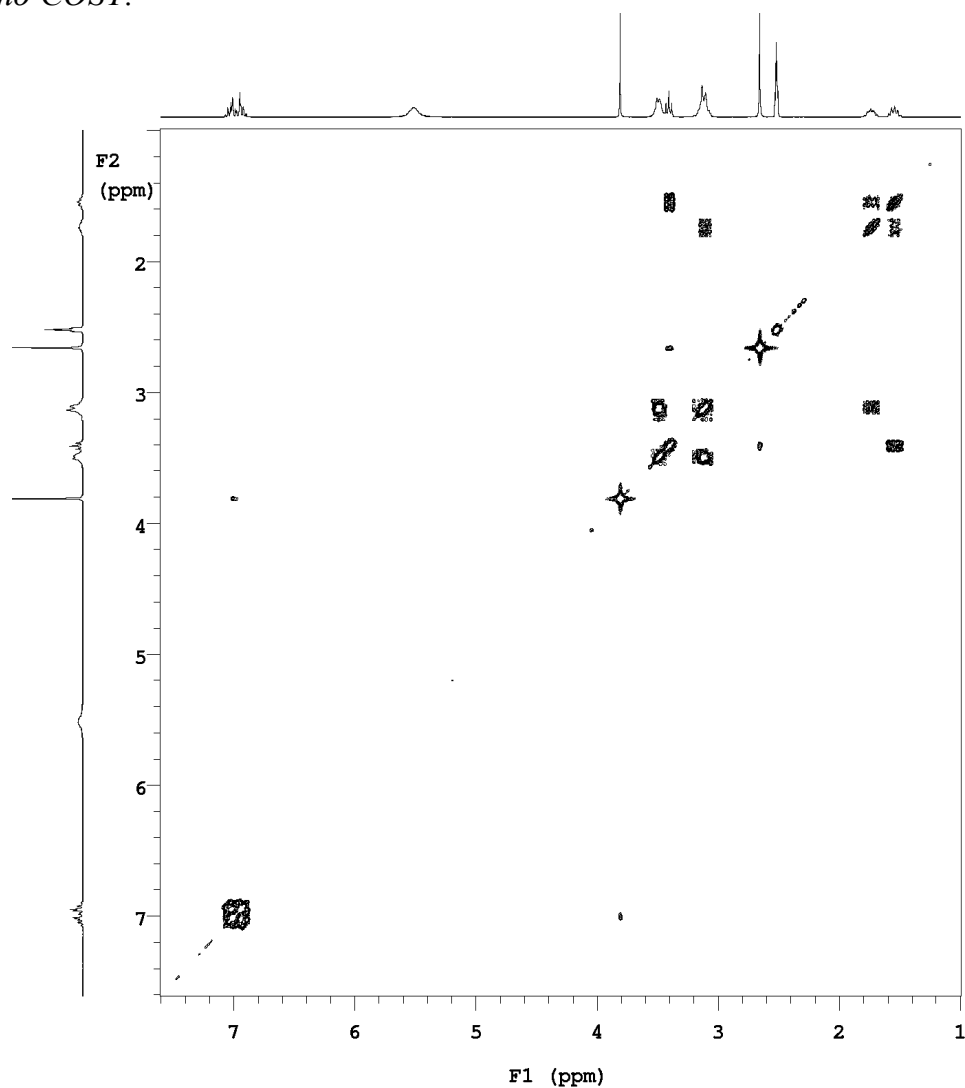


Tabela 4.6.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	2,66	singlet	4	-	H1'
H1'	3,41	multiplet	2	-	H3, H2'
H2'	1,54	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,73	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,13	multiplet	2	-	H3'
H2" _e , H3" _e	3,49	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a

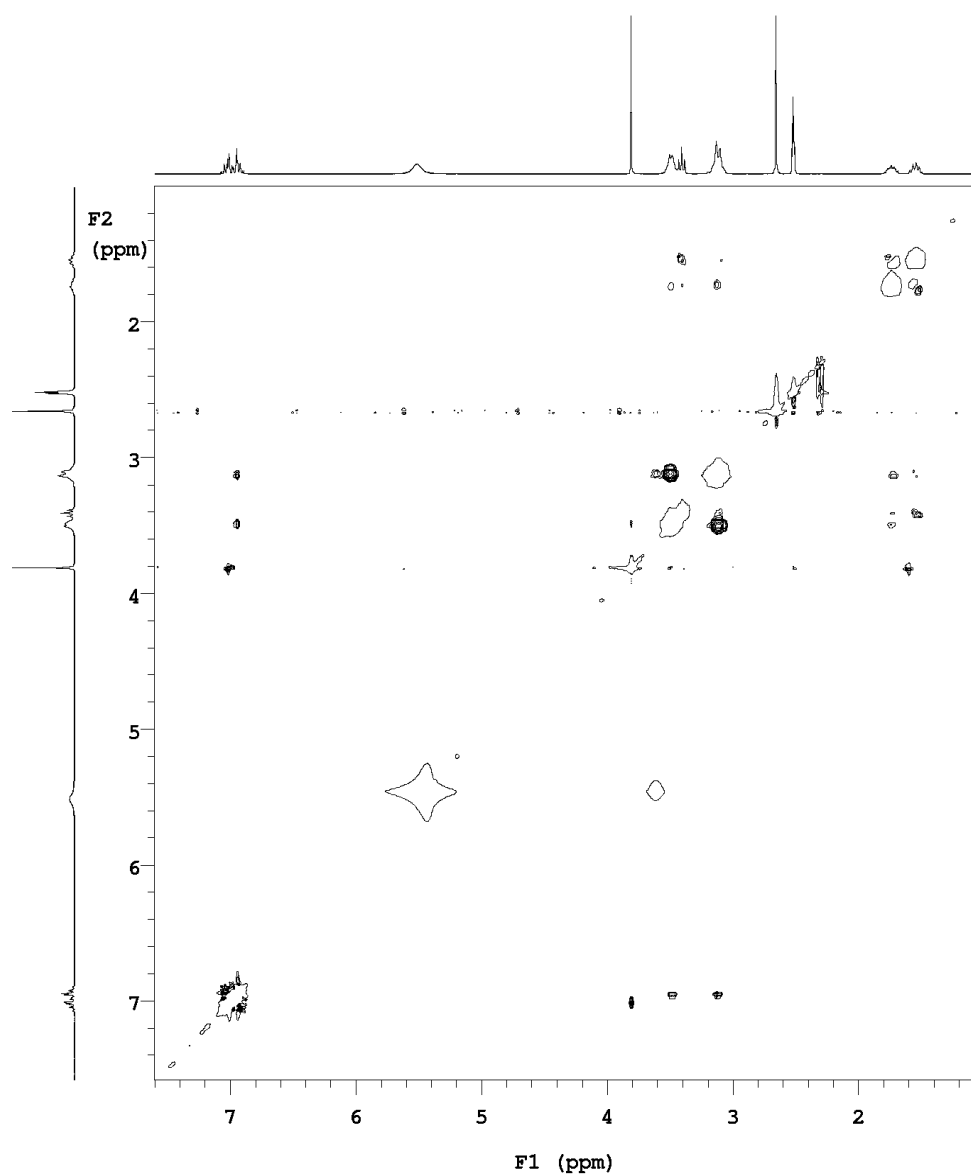
4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2" _a , H3" _a	3,13	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H3'''- H6'''	6,89-7,07	multiplet	4	-	<u>CH</u> ₃
<u>CH</u> ₃		singlet	3	-	H3'''- H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widm heterokorelacyjnych nie udało się zarejestrować.

Widmo NOESY:



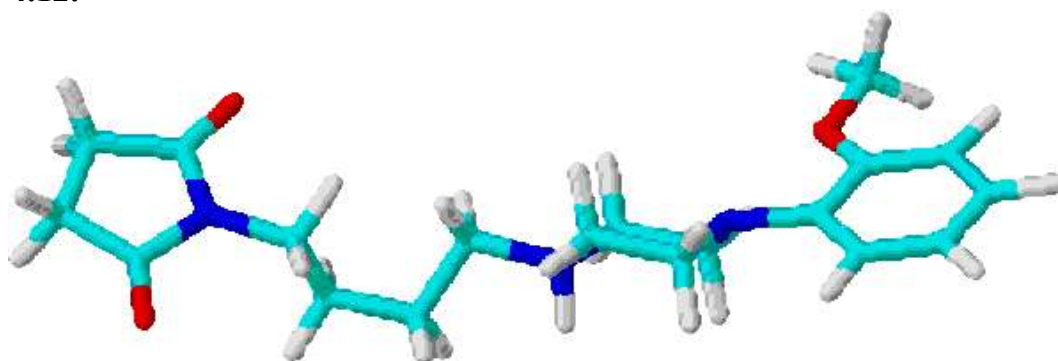
W tabeli zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.6.5. Interpretacja widma 2D NOESY.

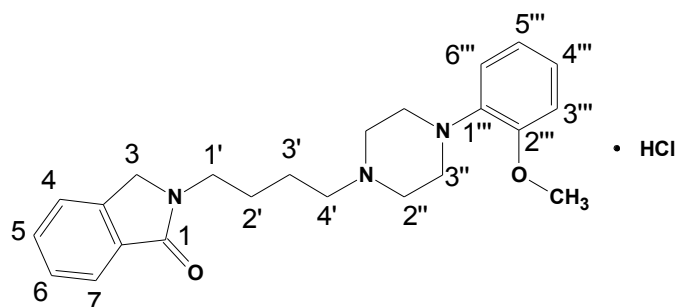
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	4,45	2,43
H1'-H2'	5,08	2,37
H3'-H2" _e	2,73	2,63
H3" _a -H6'''	4,51	2,42
H3" _e -H6'''	4,71	2,40
H5'''-CH ₃	10	2,12*

Na rysunku przedstawiono obliczoną na podstawie danych spektroskopowych konformację związku **6** w roztworze DMSO.

Rys. 4.12.



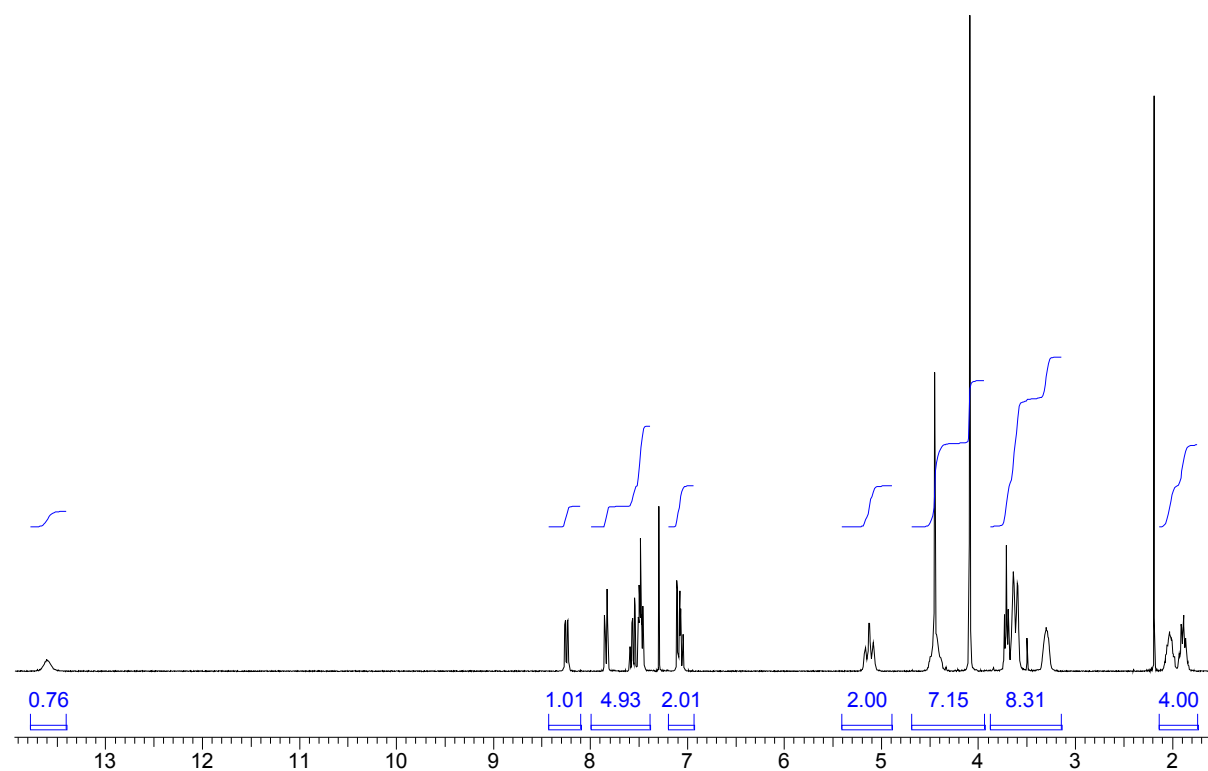
4.7. Związek 7



Analizę spektroskopową związku **7** wykonano zarówno w roztworze CDCl_3 jak i DMSO.

Widma wykonane w roztworze CDCl_3 .

Widmo $^1\text{H NMR}$:



Interpretacja widma została przedstawiona w tabeli 4.7.1 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

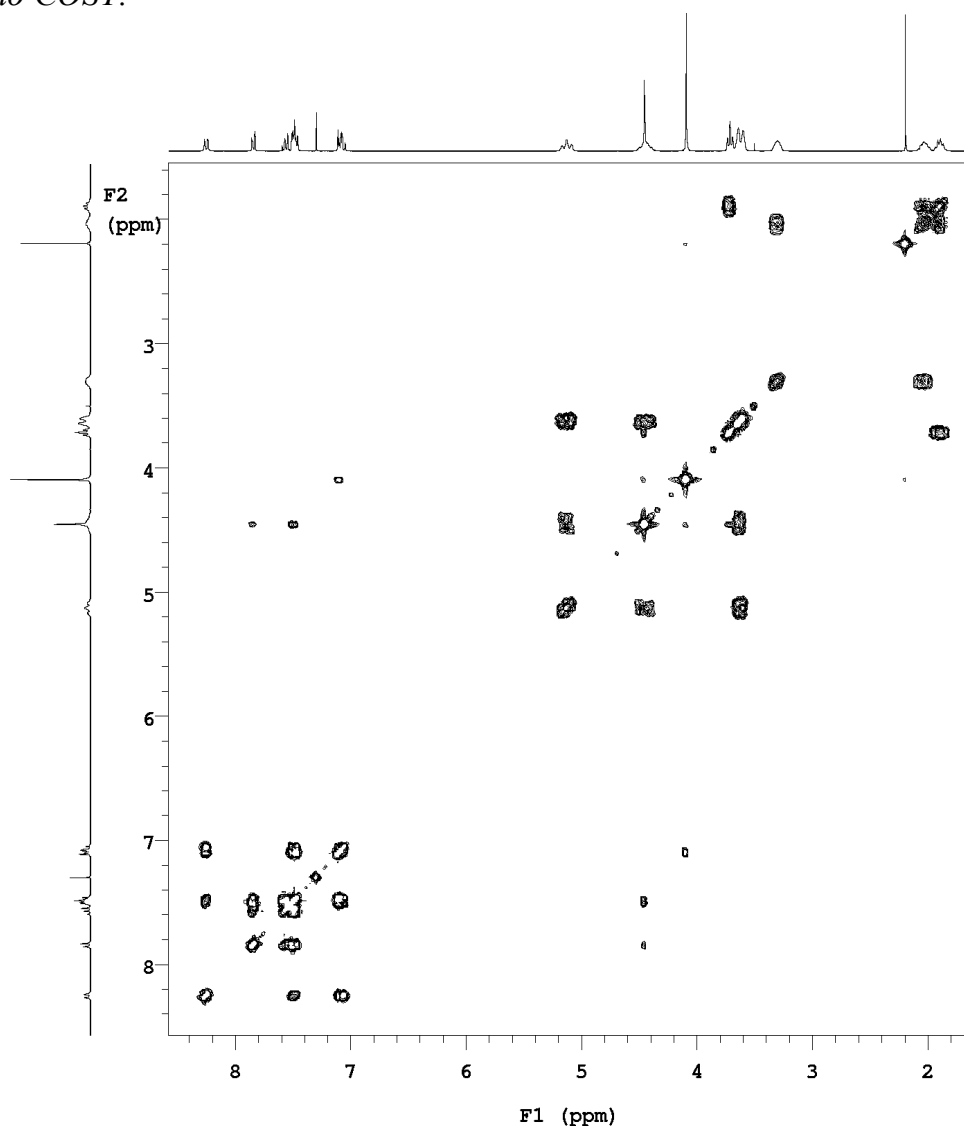


Tabela 4.7.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

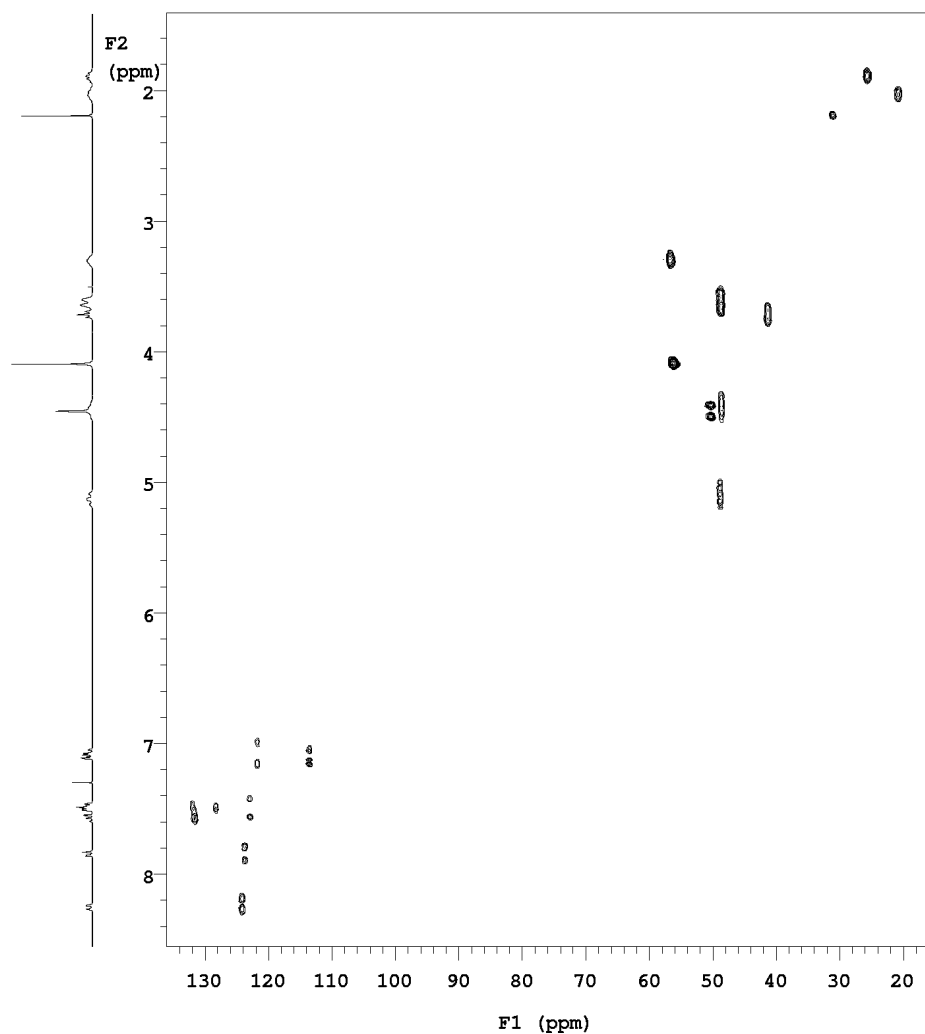
Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	4,45	singlet	2	-	H4, H6, H7
H4, H6	7,44-7,52	multiplet	2	-	H3, H5, H7
H5	7,57	multiplet	1	-	H4, H6, H7
H7	7,84	multiplet	1	-	H3, H4, H5, H6
H1'	3,71	tryplet	2	6,6	H2'
H2'	1,89	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	2,03	multiplet	2	-	H2', H4'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H4'	3,30	multiplet	2	-	H3'
H2" _a	4,44	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H3" _a
H2" _e , H3" _e	3,62	dublet	4	12,1	H2" _a , H3" _a
H3" _a	5,13	tryplet	2	12,2	H2" _e , H3" _e , H2" _a
H3''', H5'''	7,03-7,13	multiplet	2	-	H4''', H6''', CH ₃
H4'''	7,50	multiplet	1	-	H3''', H5''', H6'''
H6'''	8,25	dublet	1	8,0	H3''', H4''', H5'''
CH ₃	4,09	singlet	3	-	H3''', H5'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

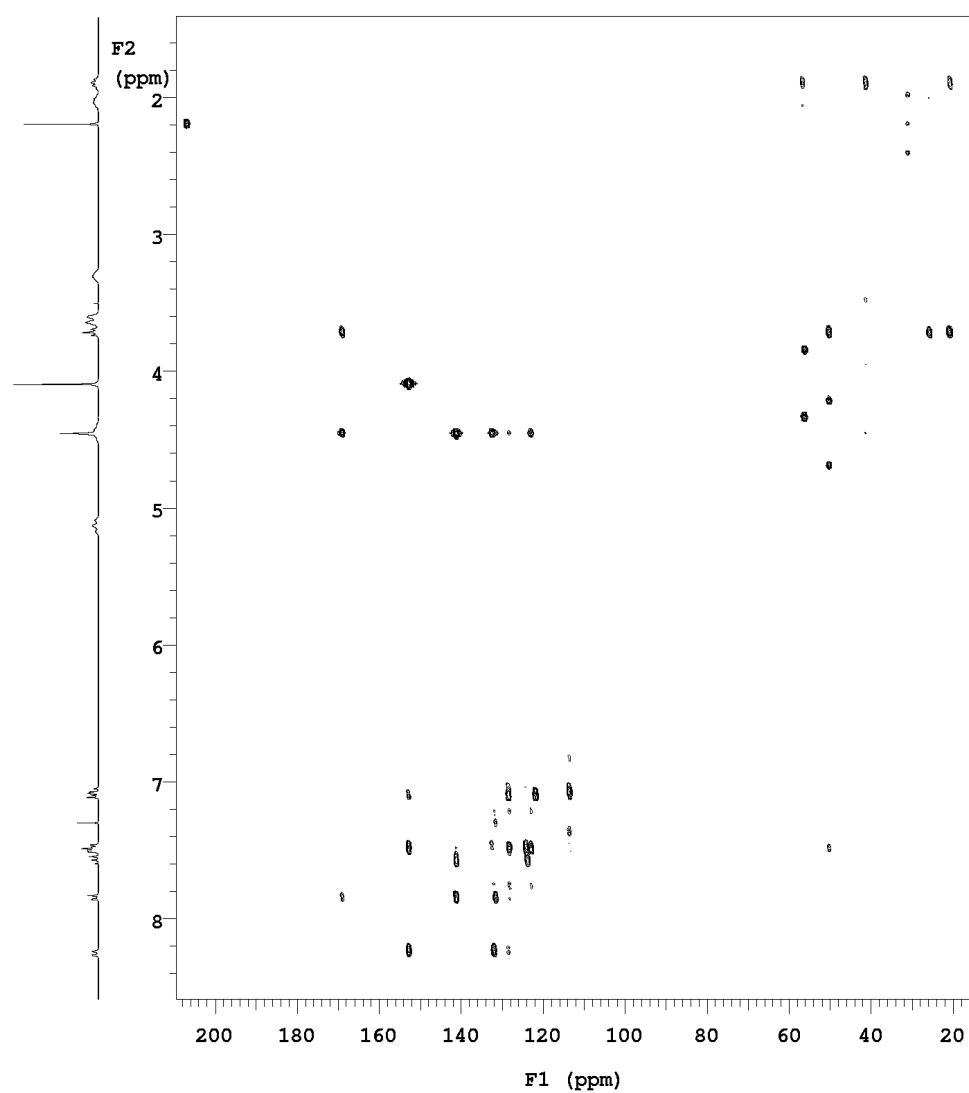


Tabela 4.7.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C1	169	H3, H7
C3	51	H4, H6, H1'
C3a	132	H3
C4	122	H3, H6
C5	131	H7
C6	128	H4
C7	124	H5
C7a	141	H3, H5, H6, H7
C1'	41	H2'
C2'	26	H1'
C3'	20	H1', H2'
C4'	56	H2', H3', H2" _e , H2" _a
C2"	49	H2" _e , H3" _e
C3"	49	H2" _e , H3" _e
C1'''	128	H3''', H5'''
C2'''	152	H4''', H3''', H5''', H6''', <u>CH</u> ₃
C3'''	122	H3''', H5'''
C4'''	132	H6'''
C5'''	113	H3''', H5'''
C6'''	124	H4'''
<u>CH</u> ₃	56	

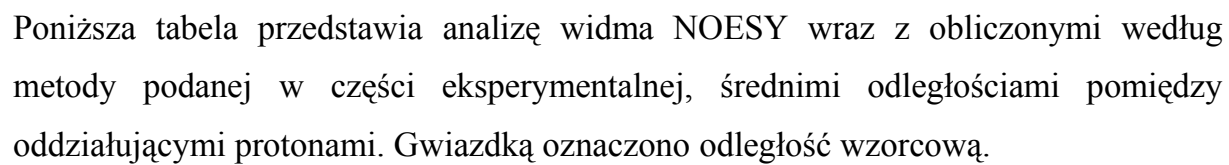
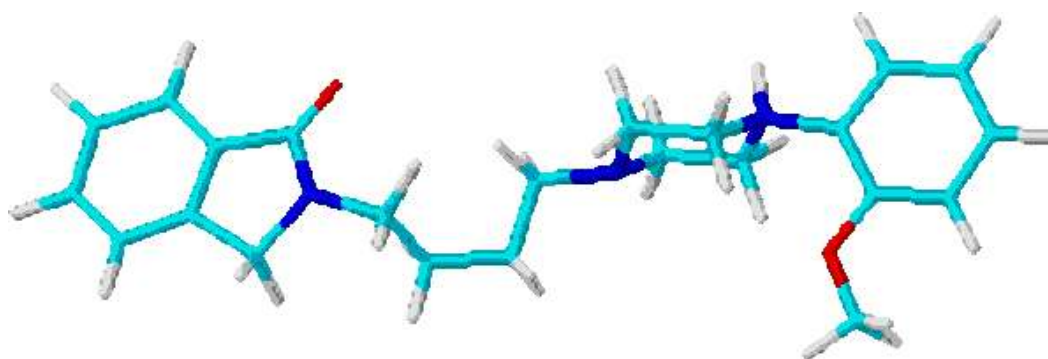


Tabela 4.7.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

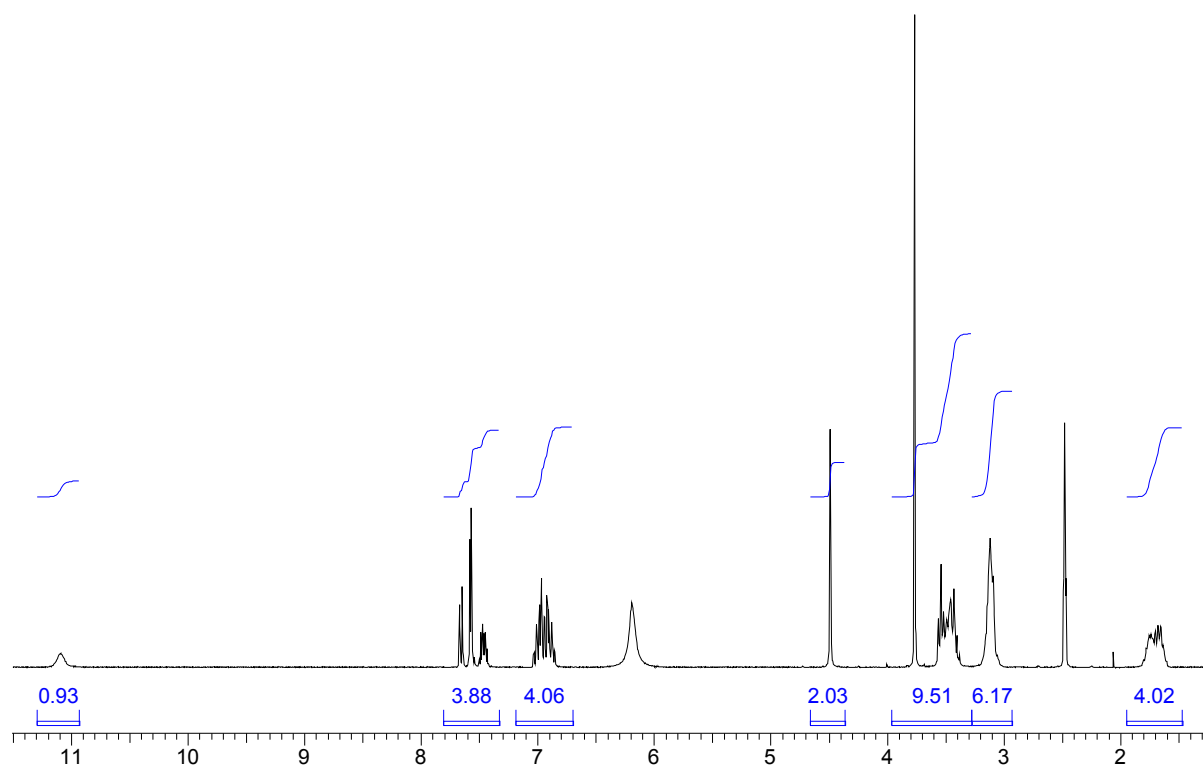
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H3-H4	4,98	2,75
H3-H1'	8,28	2,53
H3-H2'	3,62	2,90
H1'-H4'	3,21	2,96
H1'-H2'	16,85	2,25
H1'-H3'	6,98	2,60
H2'-H4'	5,25	2,73
H3'-H4'	7,87	2,55
H3'-H2" _e	7,71	2,56
H4'-H2" _e	6,59	2,63
H4'-H2" _a	7,88	2,55
H3" _a -H6'''	0,79	3,74
H3" _e -H6'''	0,94	3,64
H3" _a -CH ₃	1,71	3,29
H5'''-CH ₃	23,91	2,12*

Na poniższym rysunku przedstawiono strukturę związku **7** w CDCl₃ obliczoną na podstawie danych NOE.

Rys. 4.13.

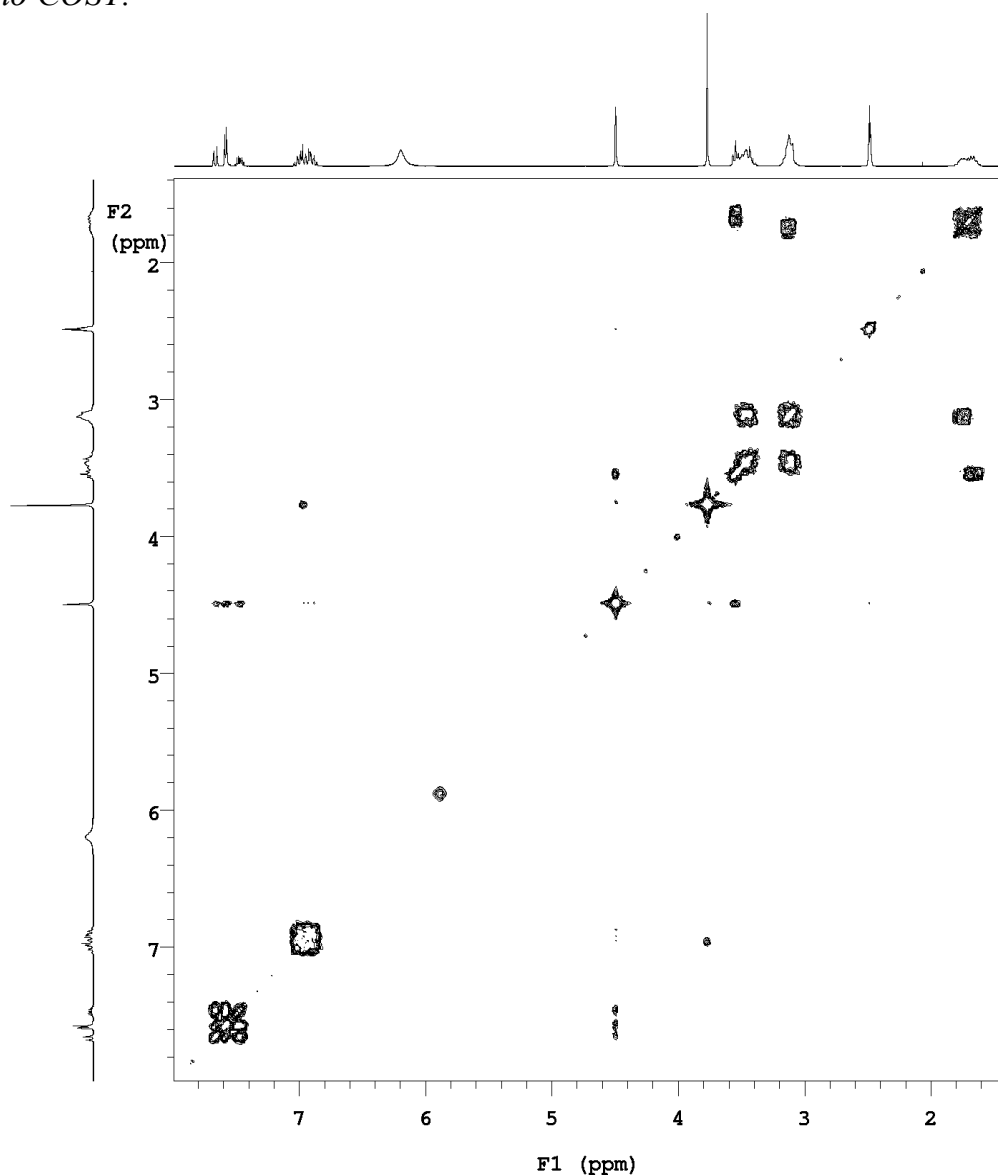
Pomiary zarejestrowane w roztworze DMSO

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów zebrano w tabeli 4.7.4 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

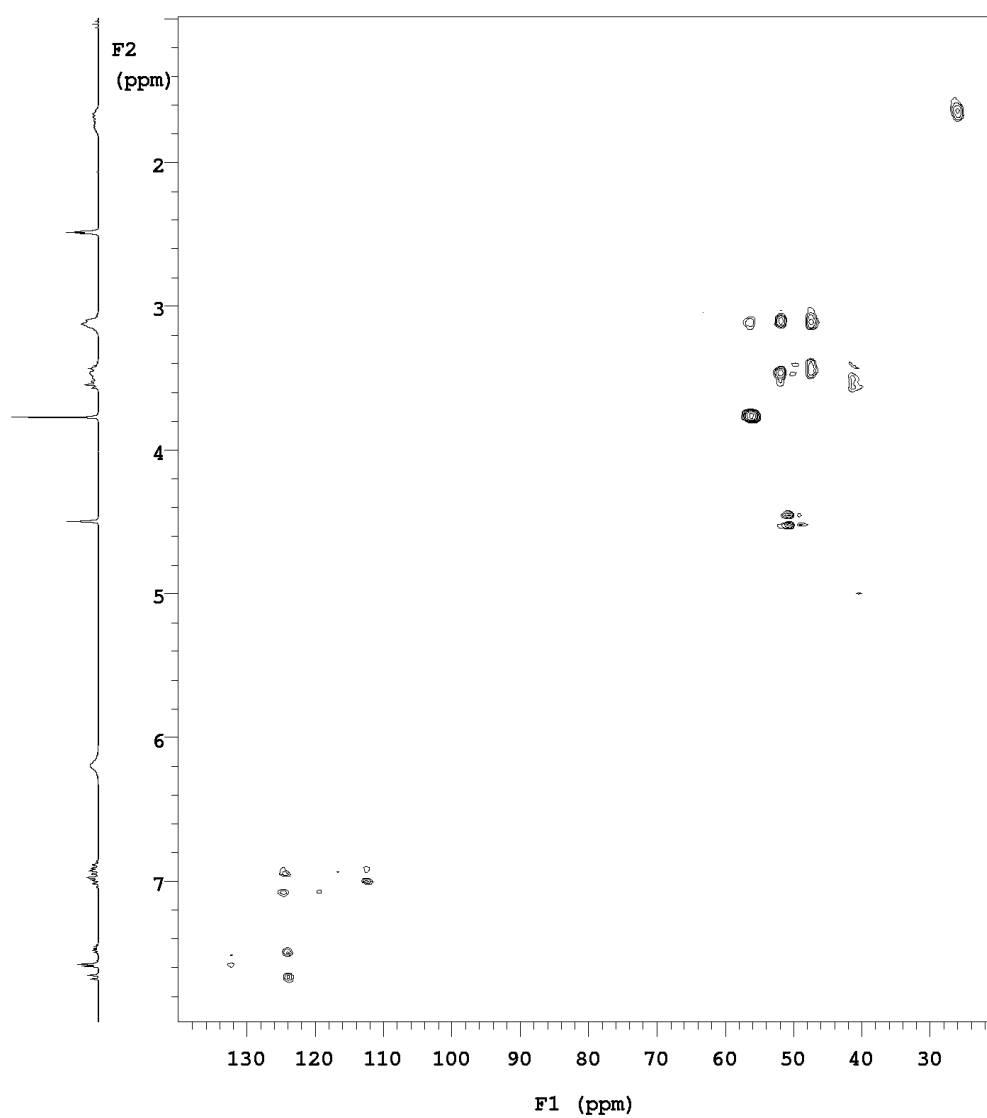
**Tabela 4.7.4.** Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	4,49	singlet	2	-	H4, H6, H7
H4, H6	7,58	multiplet	2	-	H3, H5, H7
H5	7,43-7,51	multiplet	1	-	H4, H6, H7
H7	7,66	multiplet	1	-	H3, H4, H5, H6
H1'	3,54	tryplet	2	6,7	H2'
H2'	1,58-1,72	multiplet	2	-	H1', H3'

H3'	1,72-1,84	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,07-3,20	multiplet	2	-	H3'
H2" _a , H3" _a	3,07-3,20	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,40-3,51	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,85-7,05	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,77	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

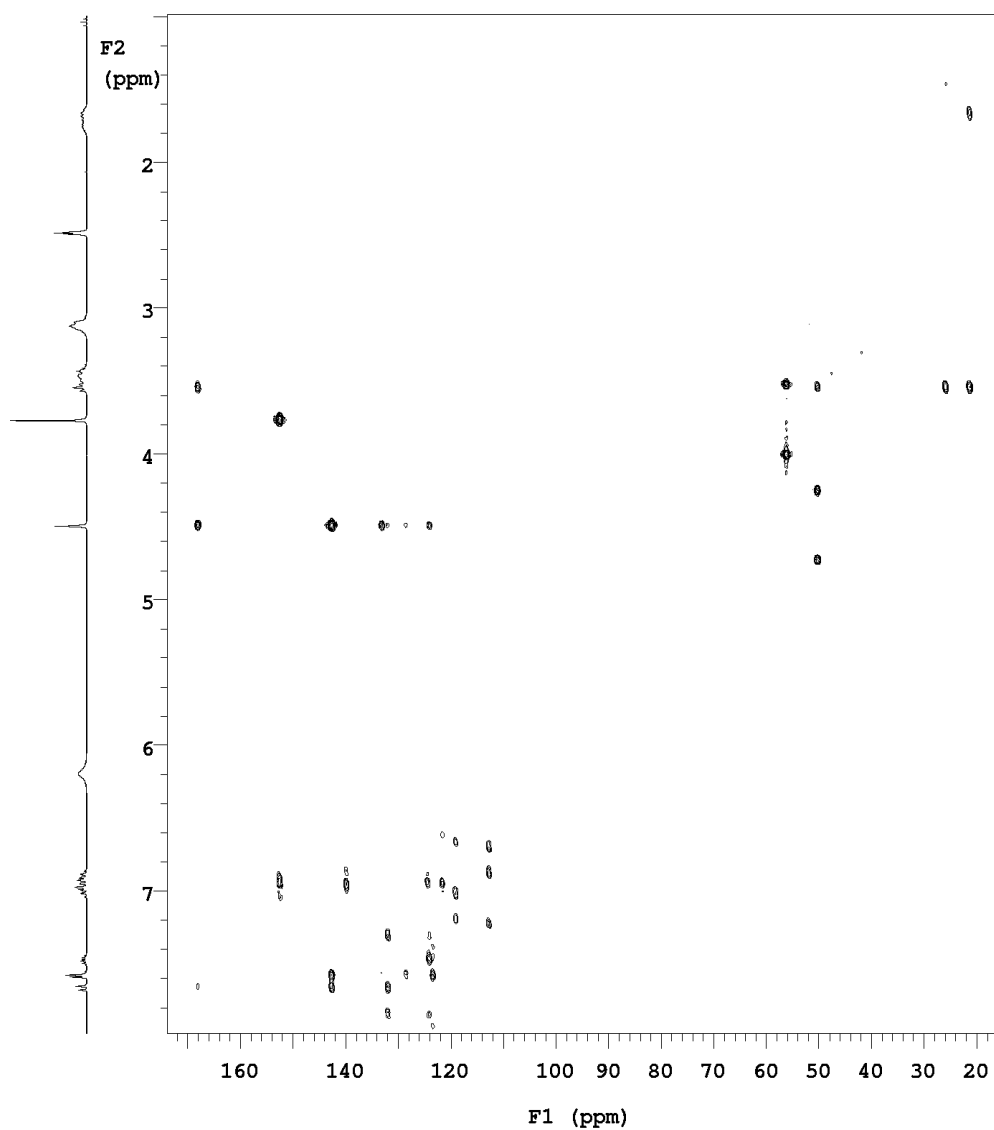
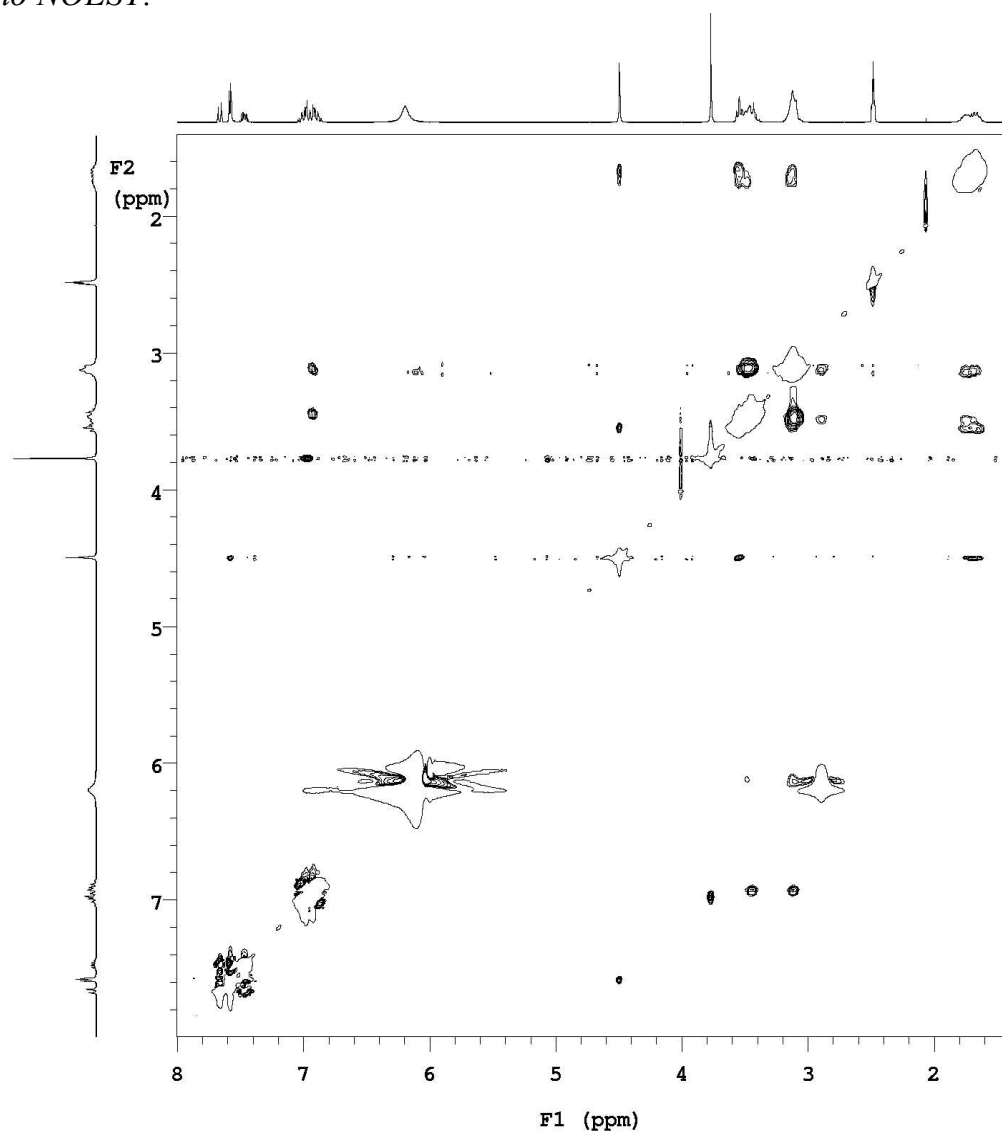


Tabela 4.7.5. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C1	168	H3, H7, H1'
C3	50	H4, H6, H1'
C3a	133	H3
C4	128	H3, H5
C5	124	H3
C6	132	H3, H7
C7	124	H3, H5
C7a	142	H3, H4, H7
C1'	41	H4'
C2'	26	H1', H3'
C3'	22	H1', H2'
C4'	56	
C2''	51	H4'
C3''	47	
C1'''	139	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6'''
C3'''	121	H3''' , H5'''
C4'''	119	H3'''-H6'''
C5'''	113	H3'''-H6'''
C6'''	124	H3'''-H6'''
<u>C</u> H ₃	56	

Widmo NOESY:



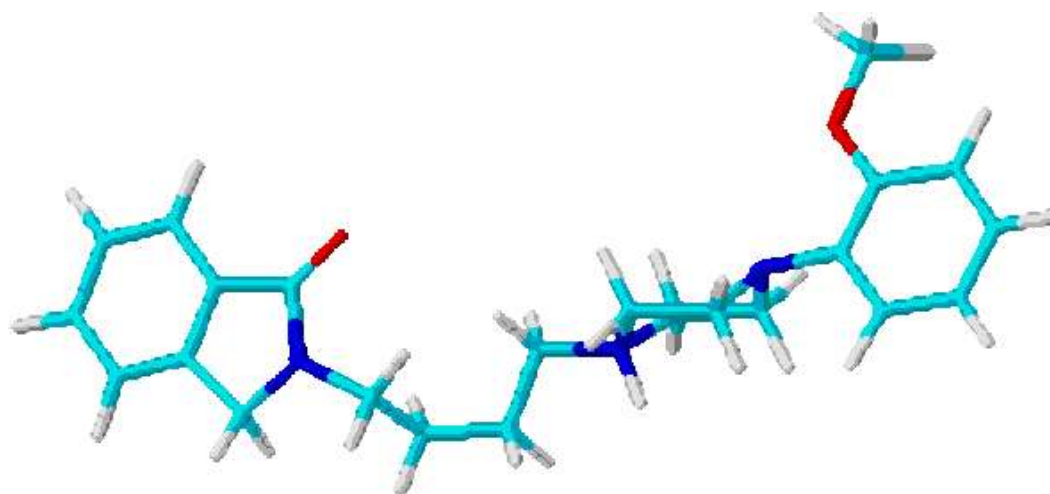
W tabeli 4.7.6 przedstawiono interpretację widma oraz wyniki obliczeń średniej odległości pomiędzy oddziałującymi protonami. Obliczenia wykonano według metody opisanej w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.7.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

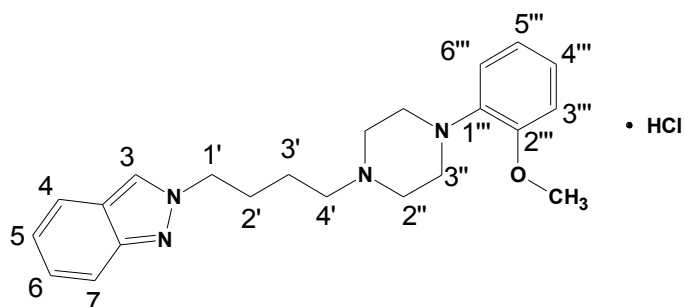
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H3-H4	4,82	2,61
H3-H1'	6,57	2,48
H3-H2'	4,00	2,69
H3'-H2'' _e	5,95	2,52
H3'' _a -H6'''	9,50	2,33
H3'' _e -H6'''	10,63	2,29
H5'''-CH ₃	16,82	2,12*

Rysunek poniżej prezentuje konformację związku **7** obliczoną w oparciu o odległości wyznaczone z widma NOESY.

Rys. 4.14.

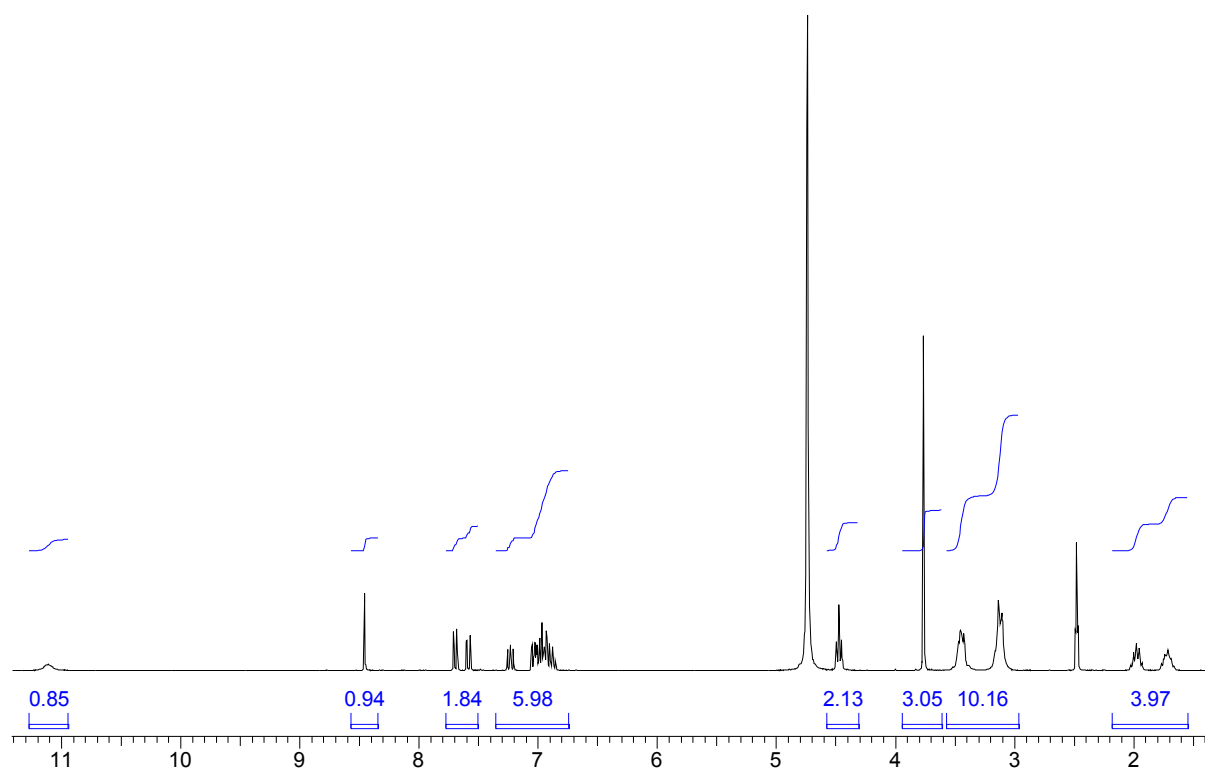


4.8. Związek 8



Dla związku **8** widma udało się zarejestrować jedynie w roztworze DMSO.

Widmo ^1H NMR:



Interpretację widma ^1H NMR przedstawiono w tabeli 4.8.1 razem z opisem widma 2D COSY.

Widmo COSY:

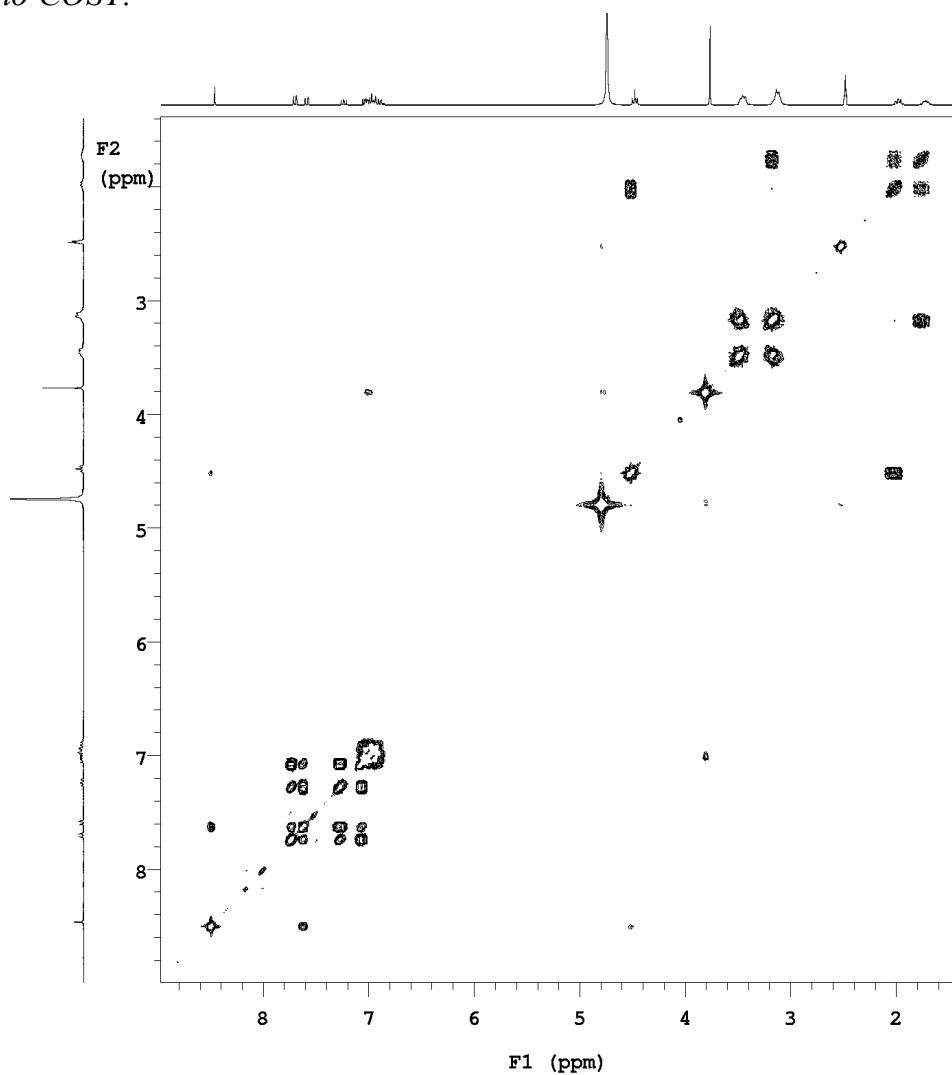


Tabela 4.8.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

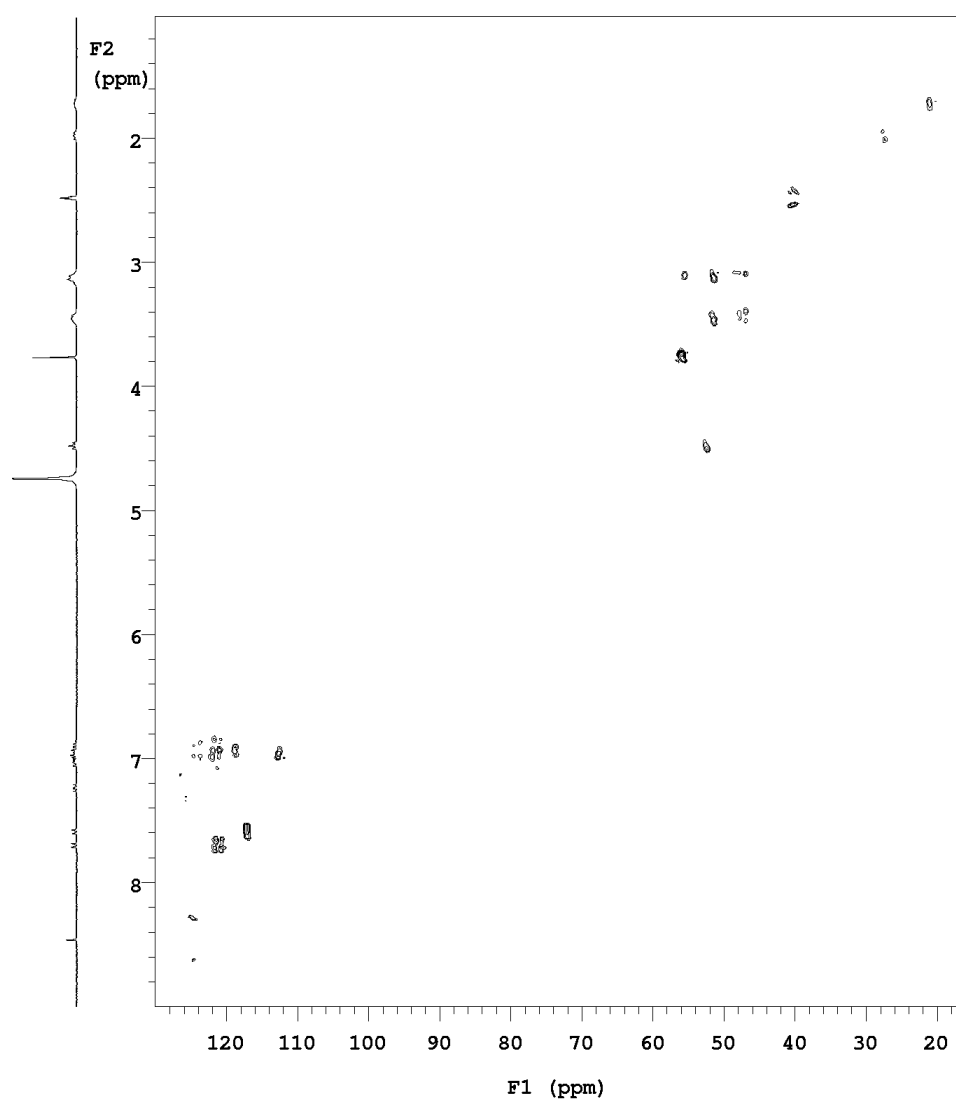
Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	8,46	dublet	1	0,7	H4, H1'
H4	7,58	multiplet	1	-	H3, H5, H6, H7
H5	7,23	multiplet	1	-	H4, H6, H7
H6	7,05	multiplet	1	-	H4, H5, H7
H7	7,70	multiplet	1	-	H4, H5, H6
H1'	4,48	tryplet	2	6,8	H3, H2'
H2'	1,98	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	1,72	multiplet	2	-	H2', H4'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H4'	3,12	multiplet	2	-	H3'
H2" _a , H3" _a	3,12	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,45	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,84-7,05	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,76	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

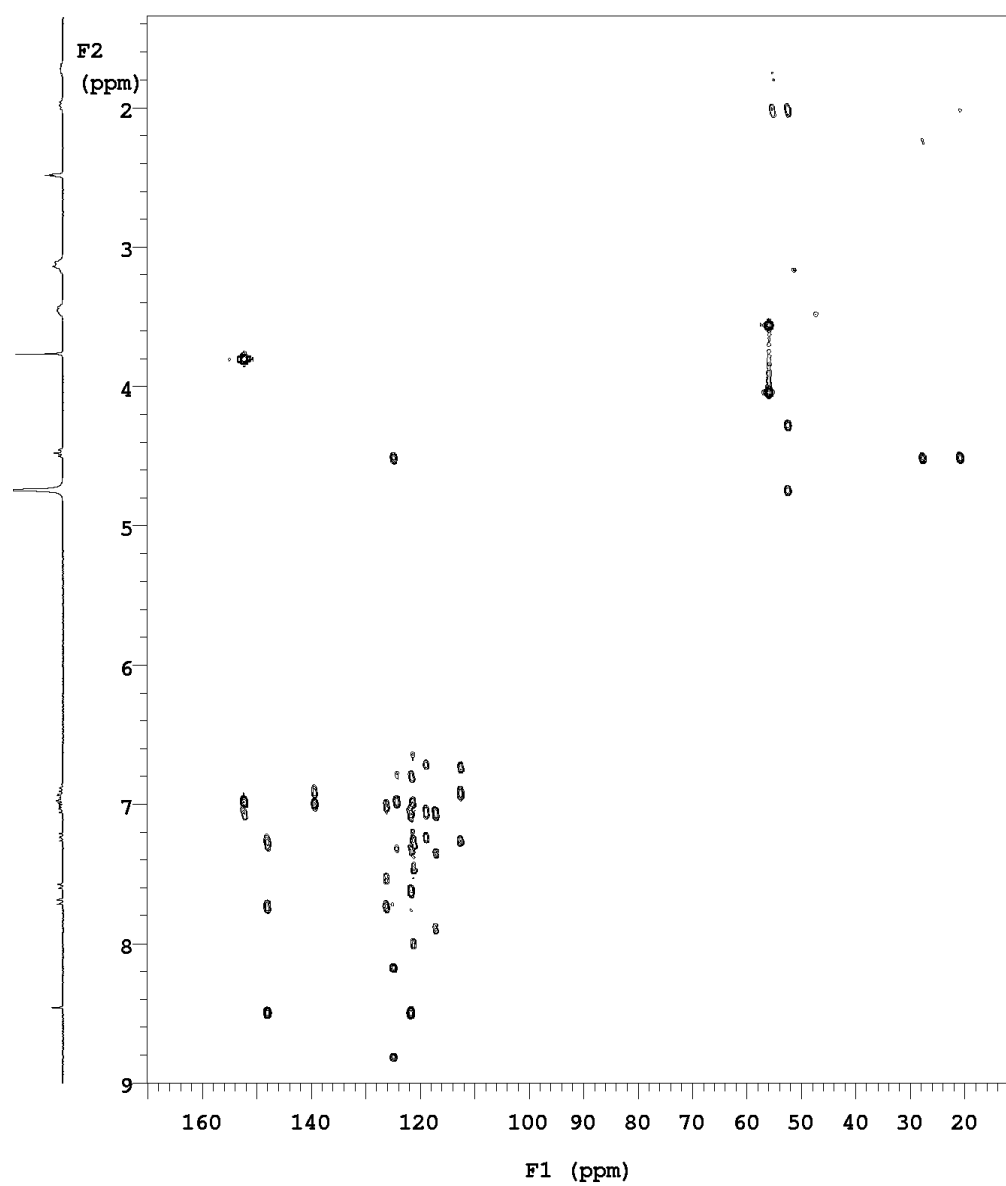
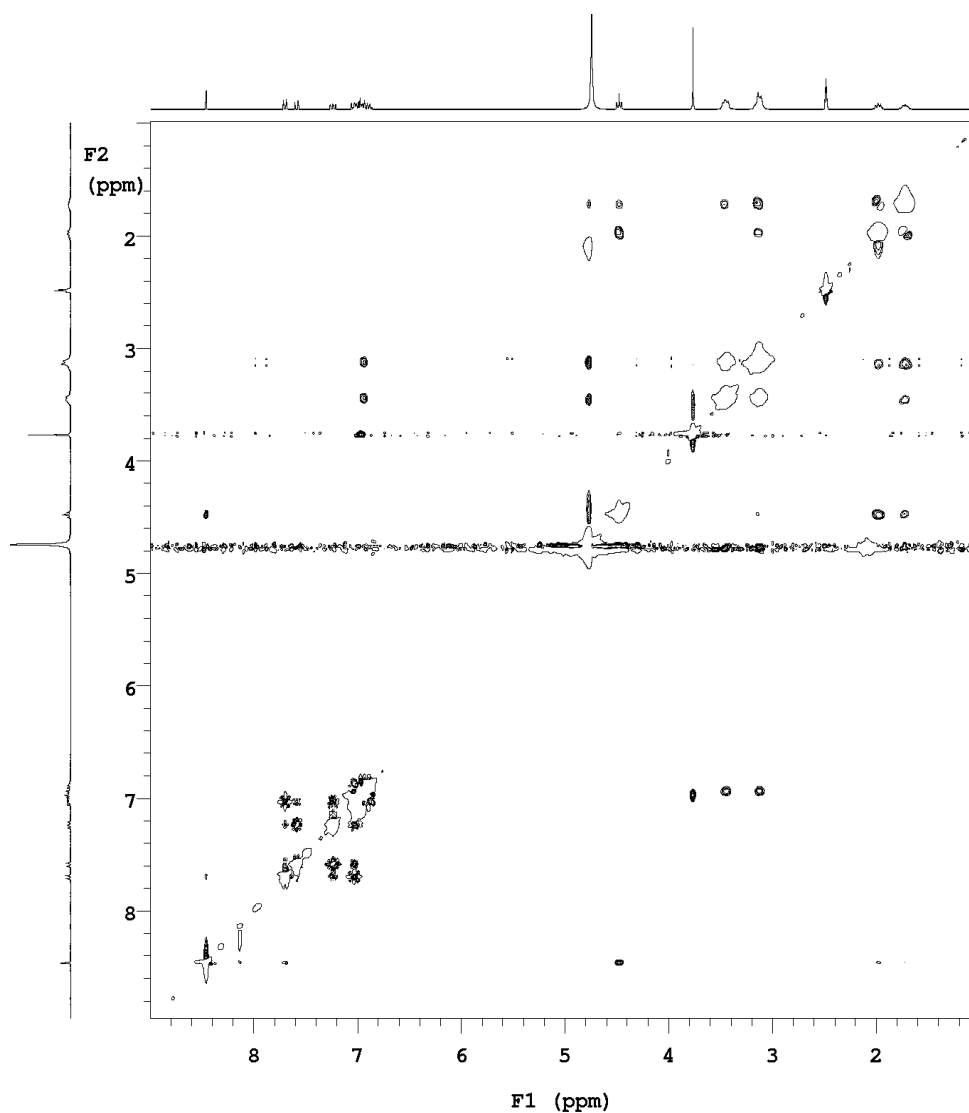


Tabela 4.8.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C3	125	H1'
C3a	122	H3
C4	117	H6
C5	126	H4, H6, H7
C7	121	H3, H5
C7a	148	H3, H5, H7
C1'	52	H2'
C2'	27	H1'
C3'	21	H1', H2'
C4'	56	H2', H3'
C2''	52	H2'' _a , H3'' _a
C3''	47	H2'' _e , H3'' _e
C1'''	139	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', CH ₃
C3'''	119	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	124	H3'''-H6'''
CH ₃	56	

Nie udało się jednoznacznie ustalić przesunięcia chemicznego atomów C6 i C4'''.

Widmo NOESY:

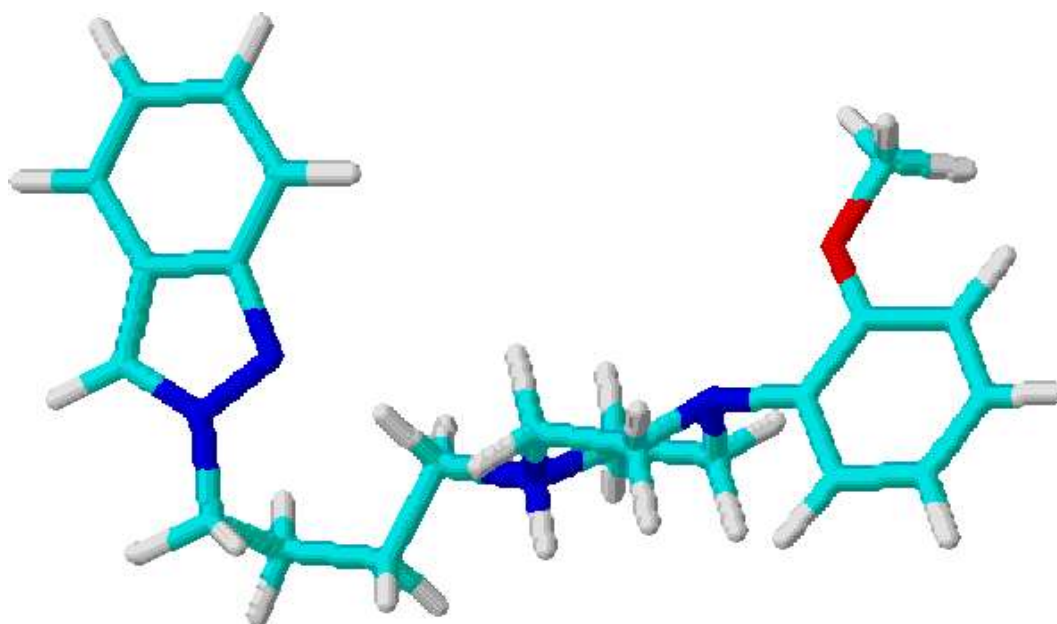


W tabeli poniżej zestawiono informacje uzyskane z analizy widma wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami. Obliczenia wykonano zgodnie z metodą podaną w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

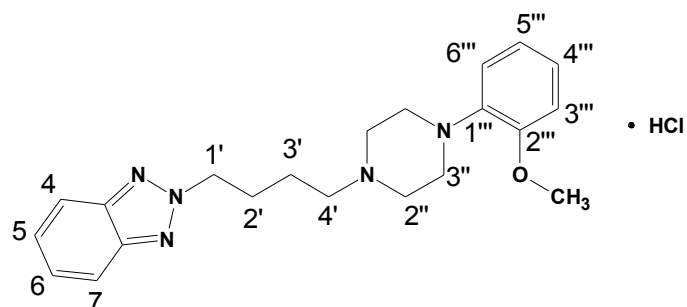
Tabela 4.8.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H3-H1'	6,00	2,50
H3-H2'	0,50	3,78
H1'-H4'	0,41	3,90
H1'-H2'	14,24	2,16
H1'-H3'	4,23	2,65
H3'-H2'' _e	5,46	2,54
H3'' _a -H6'''	9,39	2,32
H3'' _e -H6'''	9,76	2,30
H5'''-CH ₃	16,00	2,12*

Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **8**. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

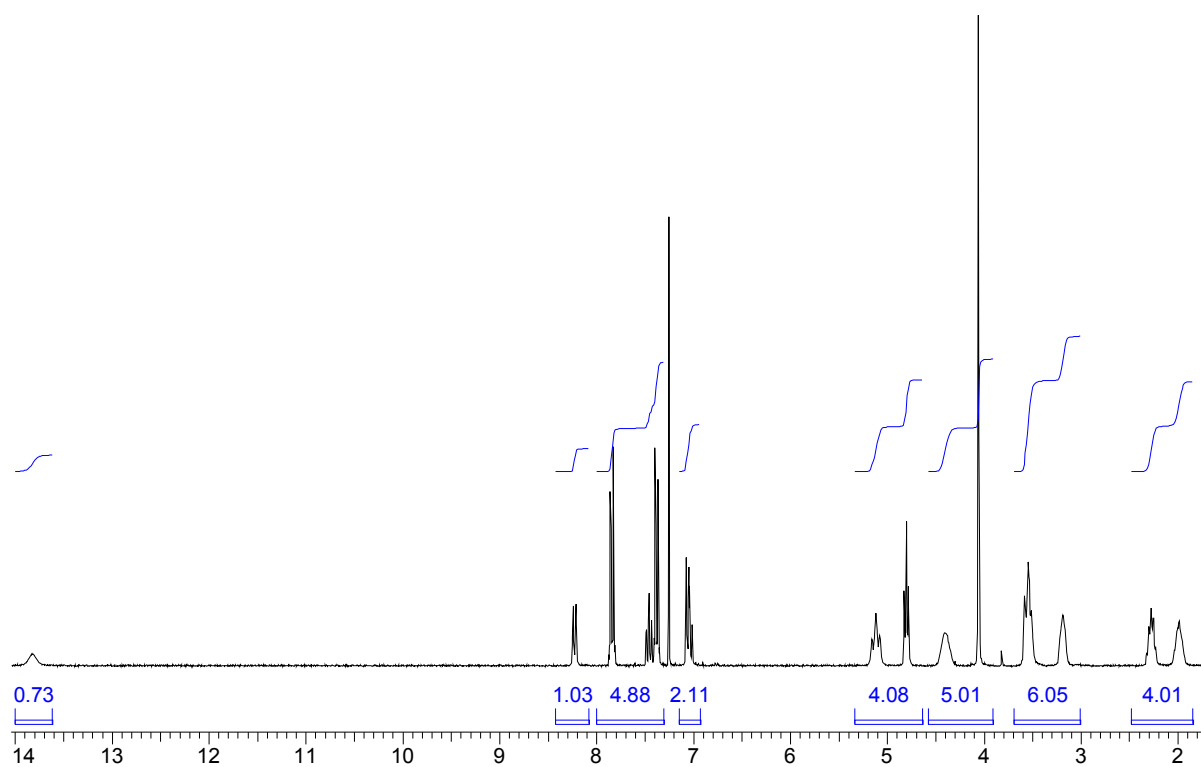
Rys. 4.15.

4.9. Związek 9



Widma związku **9** wykonano zarówno w roztworze CDCl_3 jak i DMSO.

Widma w CDCl_3 .



Opis widma wraz z interpretacją widma 2D COSY zamieszczono w tabeli 4.9.1.

Widmo COSY:

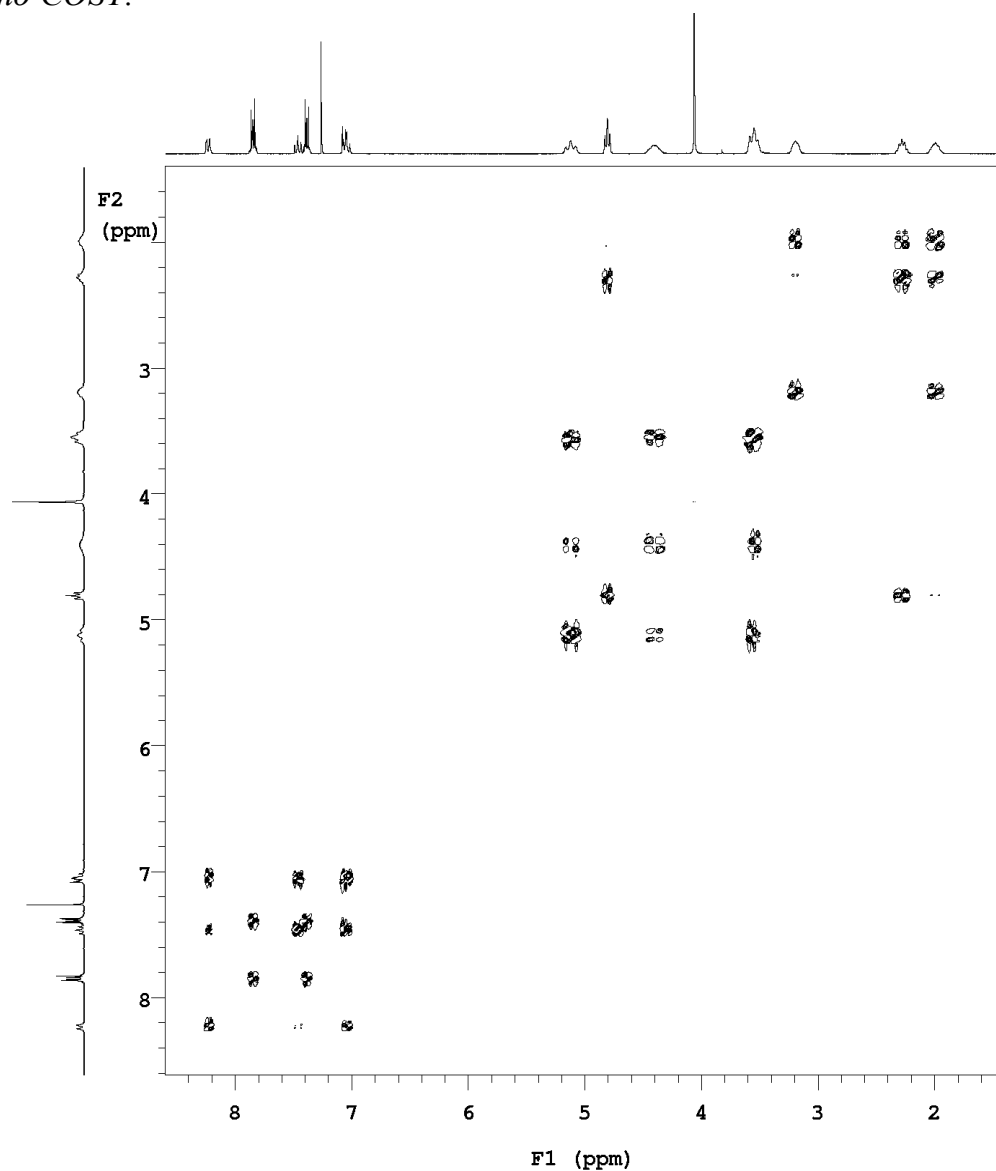


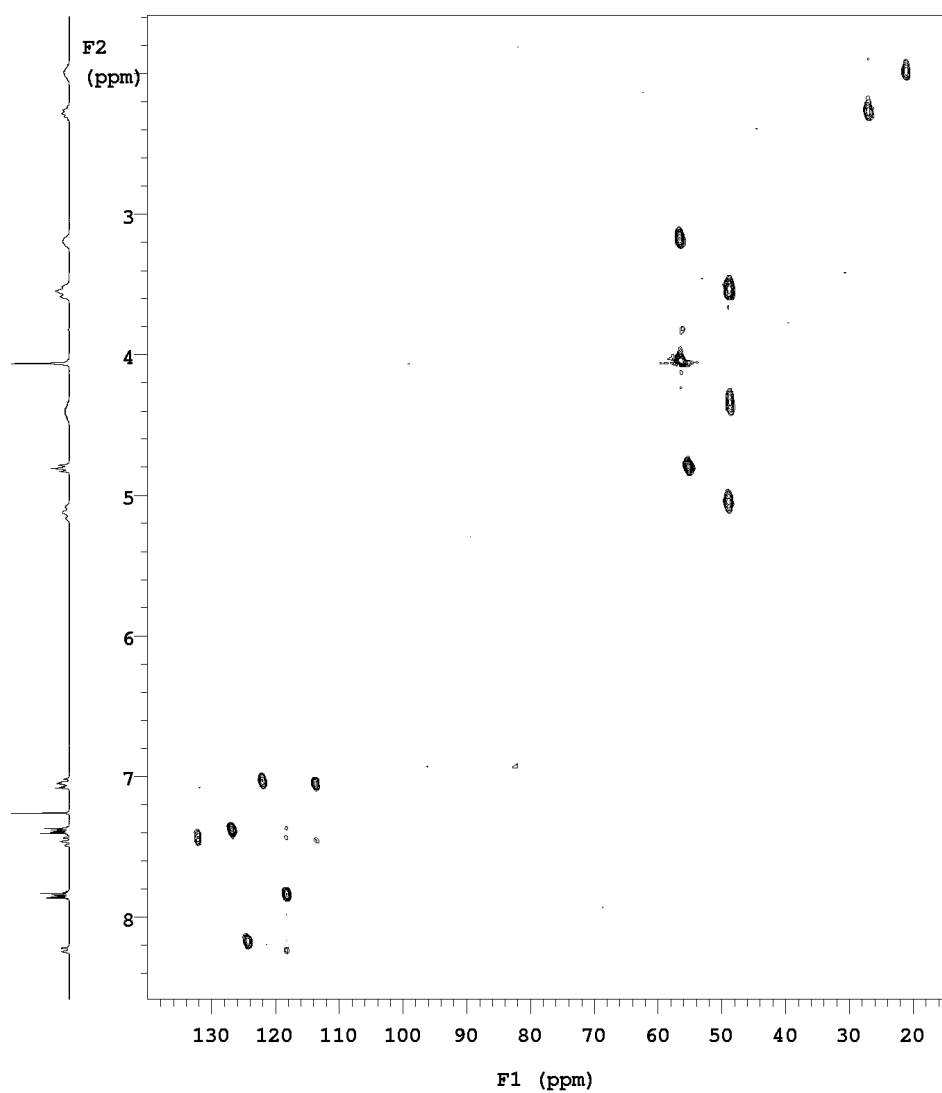
Tabela 4.9.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multiplero-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4	7,38	multiplet	2	-	H5
H5	7,85	multiplet	2	-	H4
H1'	4,81	tryplet	2	6,4	H2'
H2'	2,28	kwartet	2	6,9	H1', H3'
H3'	1,99	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,19	multiplet	2	-	H3'

H2" _a	4,40	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H3" _a
H2" _e , H3" _e	3,55	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3" _a	5,12	tryplet	2	11,7	H2" _e , H3" _e , H2" _a
H3''', H5'''	7,05	multiplet	2	-	H4''', H6'''
H4'''	7,46	tryplet	1	7,5	H3''', H5''', H6'''
H6'''	8,23	dublet	1	8,0	H3''', H4''', H5'''
CH ₃	4,06	singlet	3	-	

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

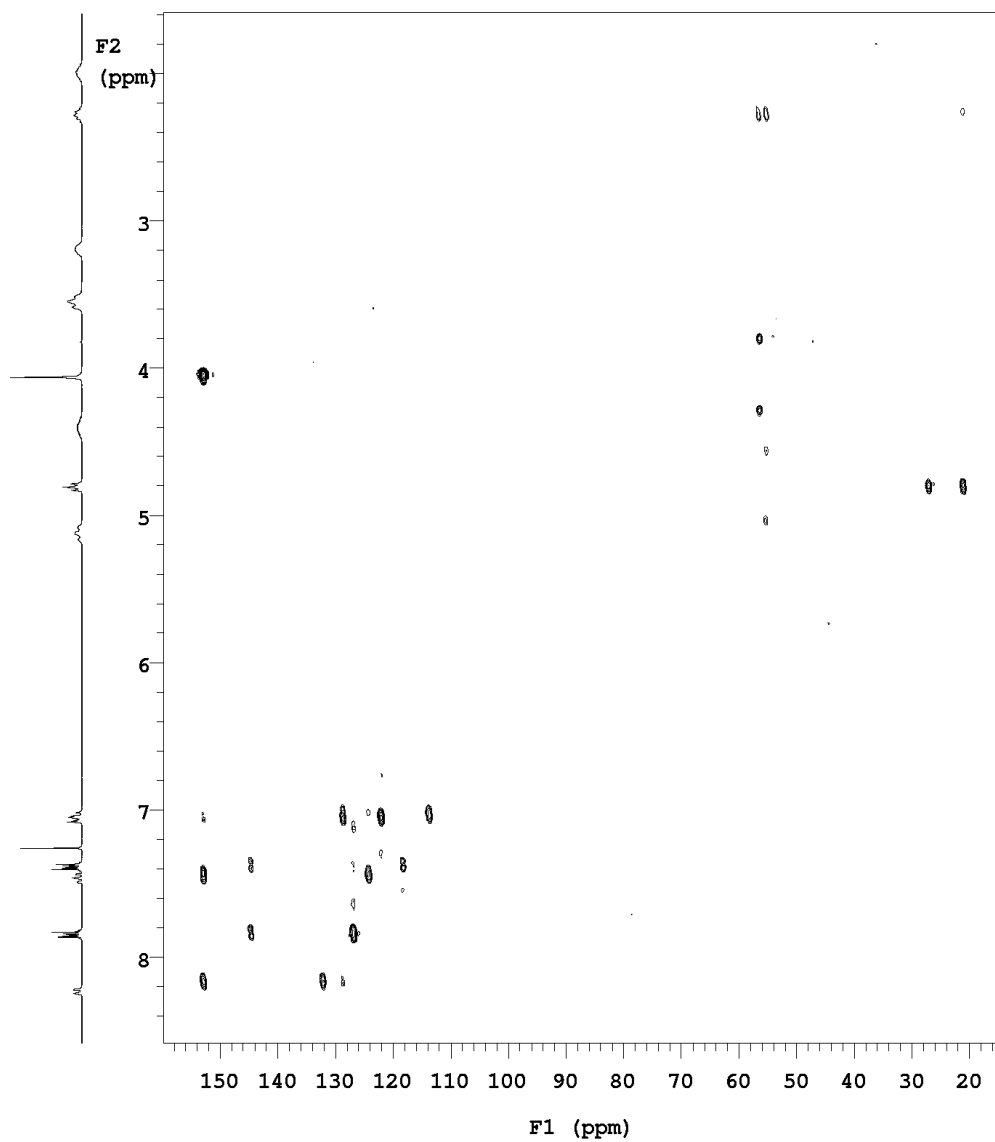
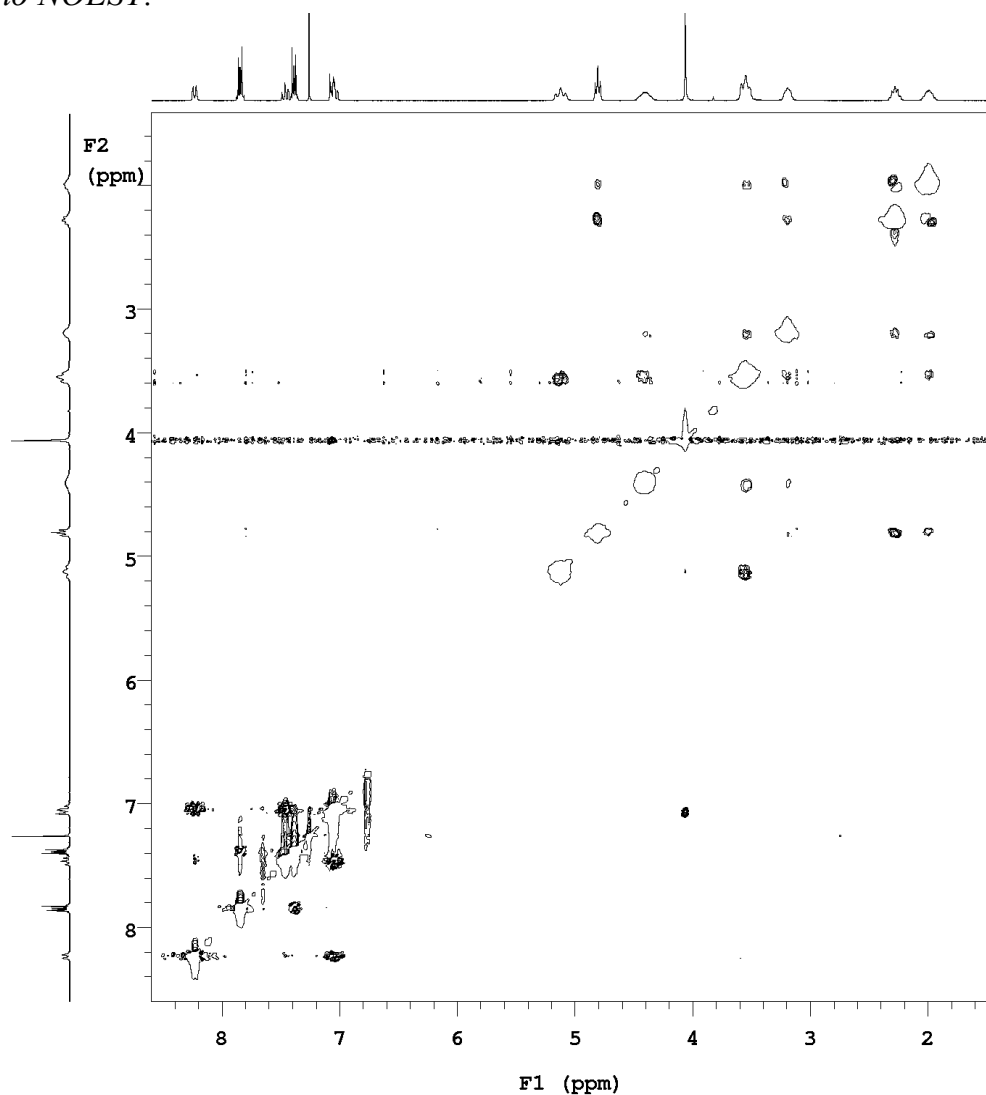


Tabela 4.9.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C3a	144	H4, H5
C4	127	H5
C5	118	H4
C1'	55	
C2'	27	H1'
C3'	18	H1', H2'
C4'	57	
C2''	48	
C3''	49	
C1'''	128	H3'''-H6'''
C2'''	153	H3'''-H6''', $\underline{\text{CH}}_3$
C3'''	122	H3'''-H6'''
C4'''	132	H3'''-H6'''
C5'''	114	H3'''-H6'''
C6'''	124	H3'''-H6'''
$\underline{\text{CH}}_3$	56	

Widmo NOESY:



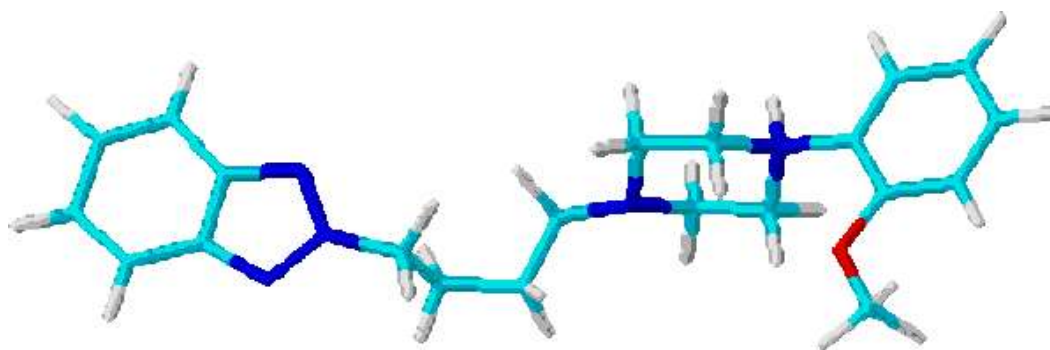
W tabeli poniżej zebrano interpretację widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.9.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	0,85	3,81
H1'-H2'	21,89	2,21
H1'-H3'	6,65	2,70
H2'-H4'	6,12	2,74
H3'-H2'' _e	6,15	2,74
H4'-H2'' _e	4,97	2,83
H4'-H2'' _a	3,17	3,06
H3'' _e -H6'''	0,24	4,70
H5'''-CH ₃	28,42	2,12*

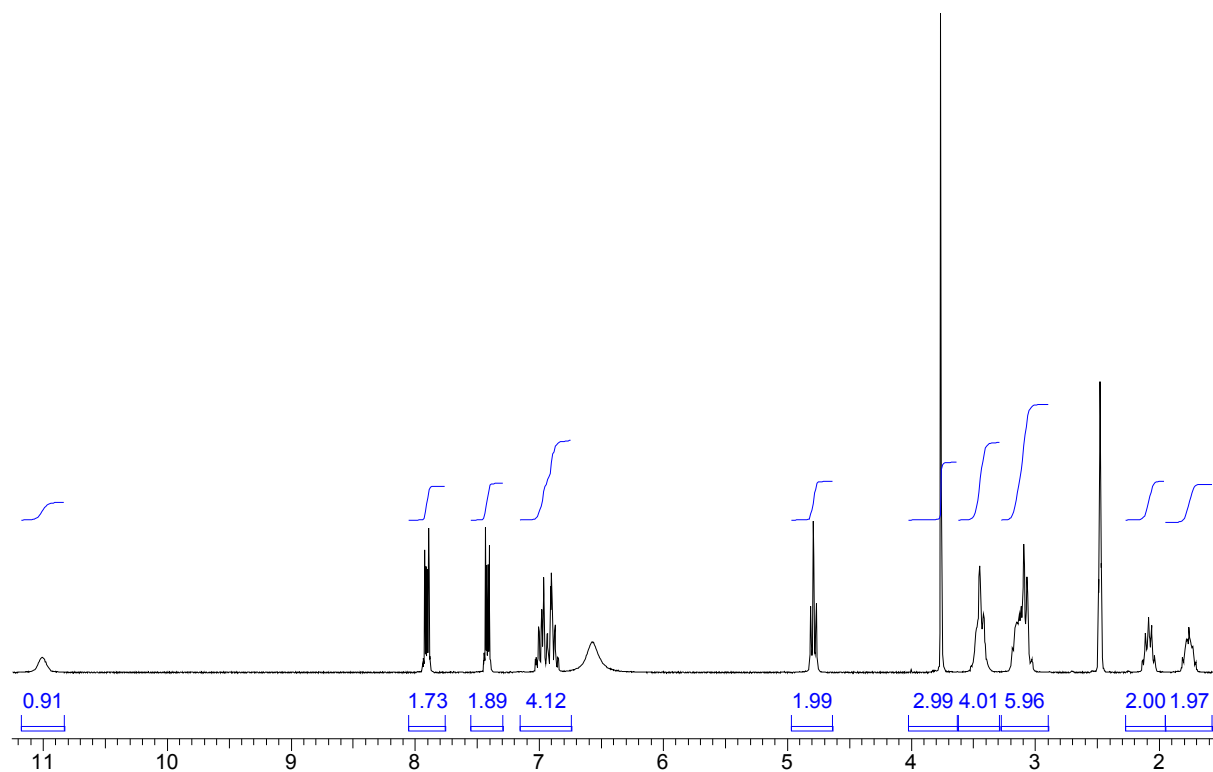
Rysunek przedstawia obliczoną na podstawie danych spektroskopowych strukturę związku **9** w roztworze chloroformowym.

Rys. 4.16.



Widma zarejestrowane w roztworze DMSO

Widmo ^1H NMR:



Interpretację widma ^1H NMR zamieszczono razem z opisem sygnałów widma 2D COSY w tabeli 4.9.4.

Widmo COSY:

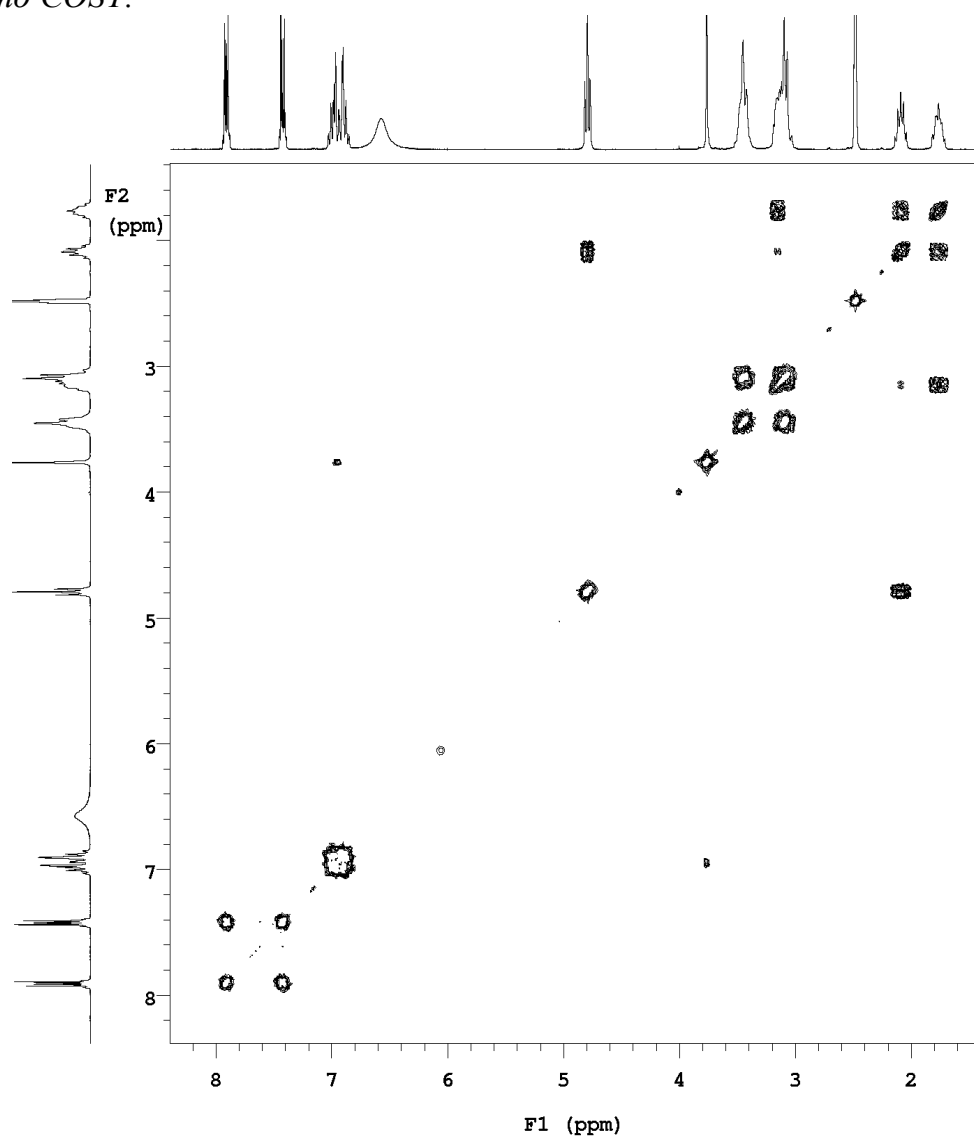


Tabela 4.9.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipleto-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4	7,42	multiplet	1	-	H5
H5	7,91	multiplet	1	-	H4
H1'	4,79	tryplet	2	4,79	H2'
H2'	2,09	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,76	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,15	multiplet	2	-	H2', H3'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2" _a , H3" _a	3,09	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,45	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,84-7,04	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,76	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HMBC:

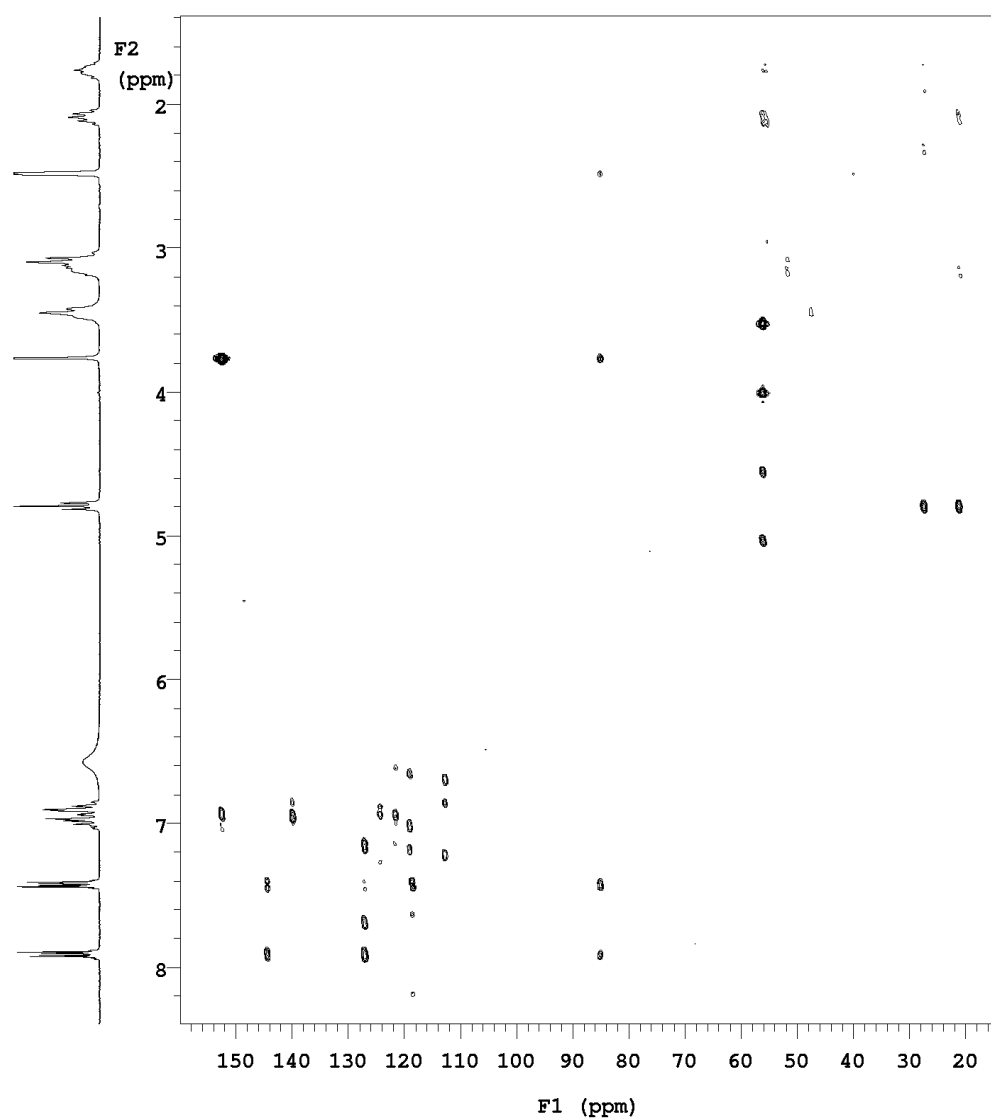
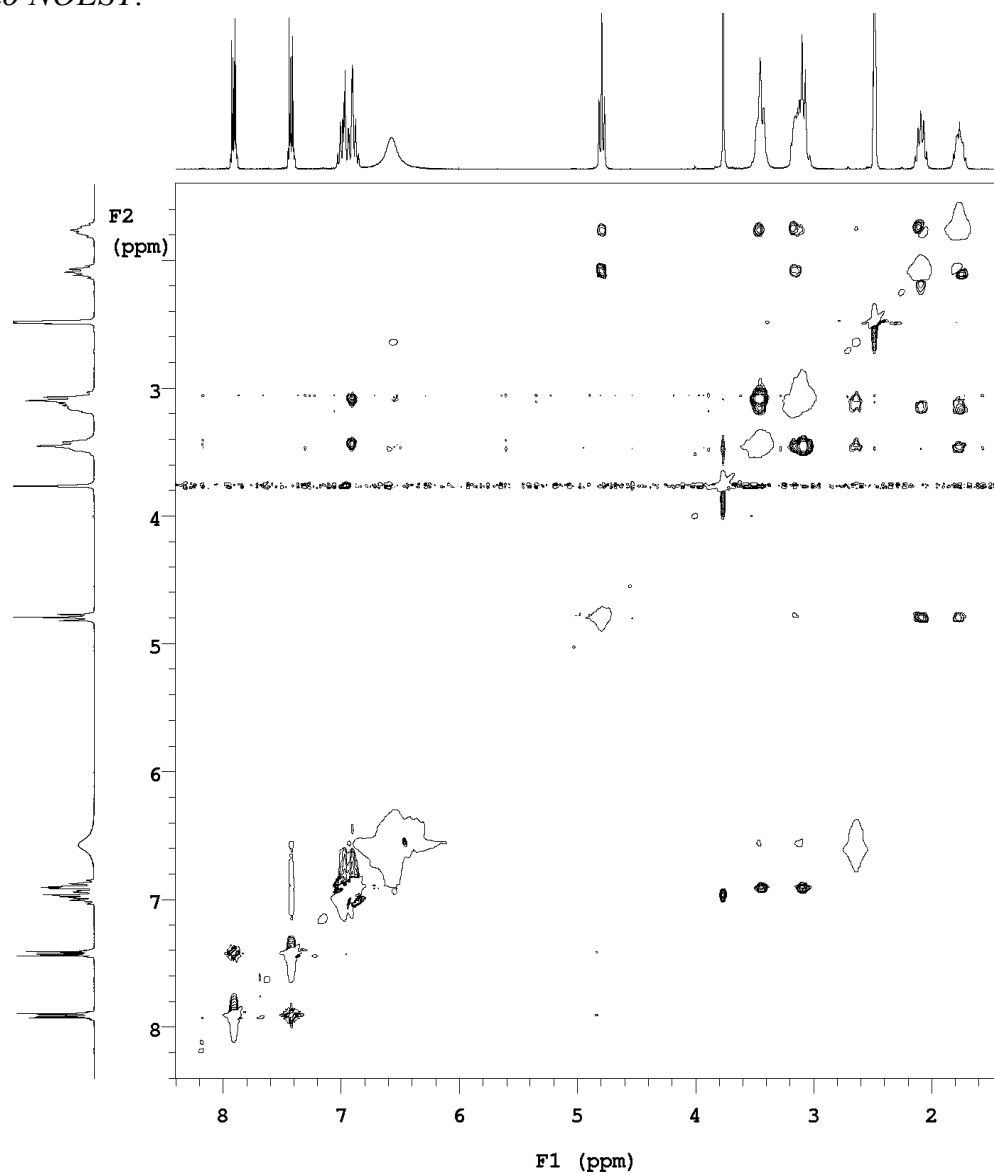


Tabela 4.9.5. Interpretacja widma heterokorelacyjnego HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C3a	144	H4, H5
C4	127	H5
C5	118	H4
C1'	56	H2', H3'
C2'	28	H1'
C3'	21	H1', H2', H4'
C2''	48	C3''
C3''	51	C2''
C1'''	140	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', $\underline{\text{CH}}_3$
C3'''	119	H3'''-H6'''
C4'''	124	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	122	H3'''-H6'''
$\underline{\text{CH}}_3$	57	$\underline{\text{CH}}_3$



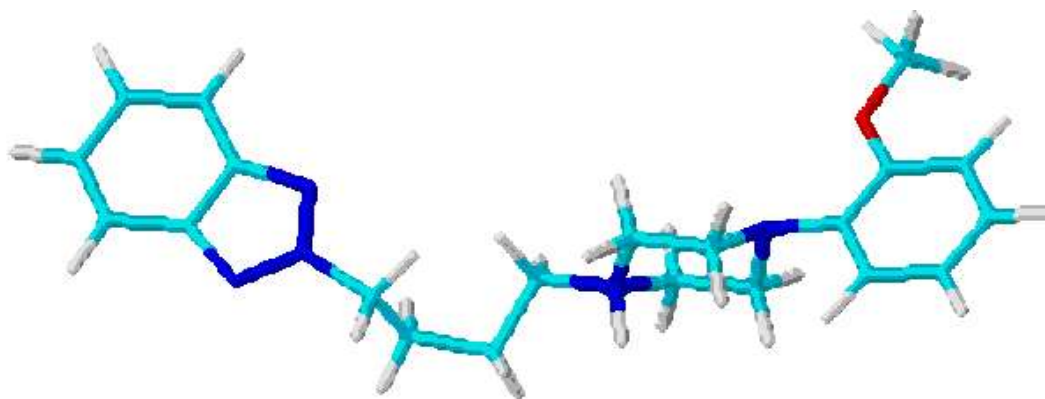
135

Tabela 4.9.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

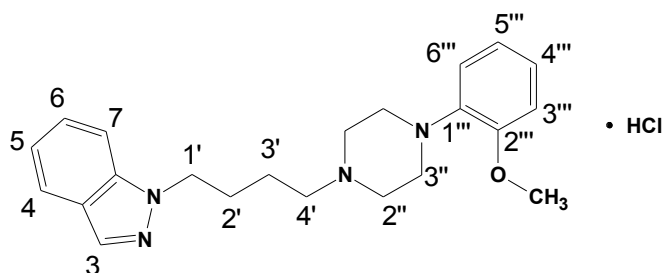
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H1'-H4'	1,11	3,52
H1'-H2'	23,94	2,11
H1'-H3'	7,89	2,54
H2'-H4'	10,61	2,42
H3'-H2'' _e	11,39	2,39
H3'' _a -H6'''	17,39	2,23
H3'' _e -H6'''	15,86	2,26
H5'''-CH ₃	23,42	2,12*

Na poniższym rysunku przedstawiono strukturę związku **9** w DMSO obliczoną na podstawie danych NOE.

Rys. 4.17.



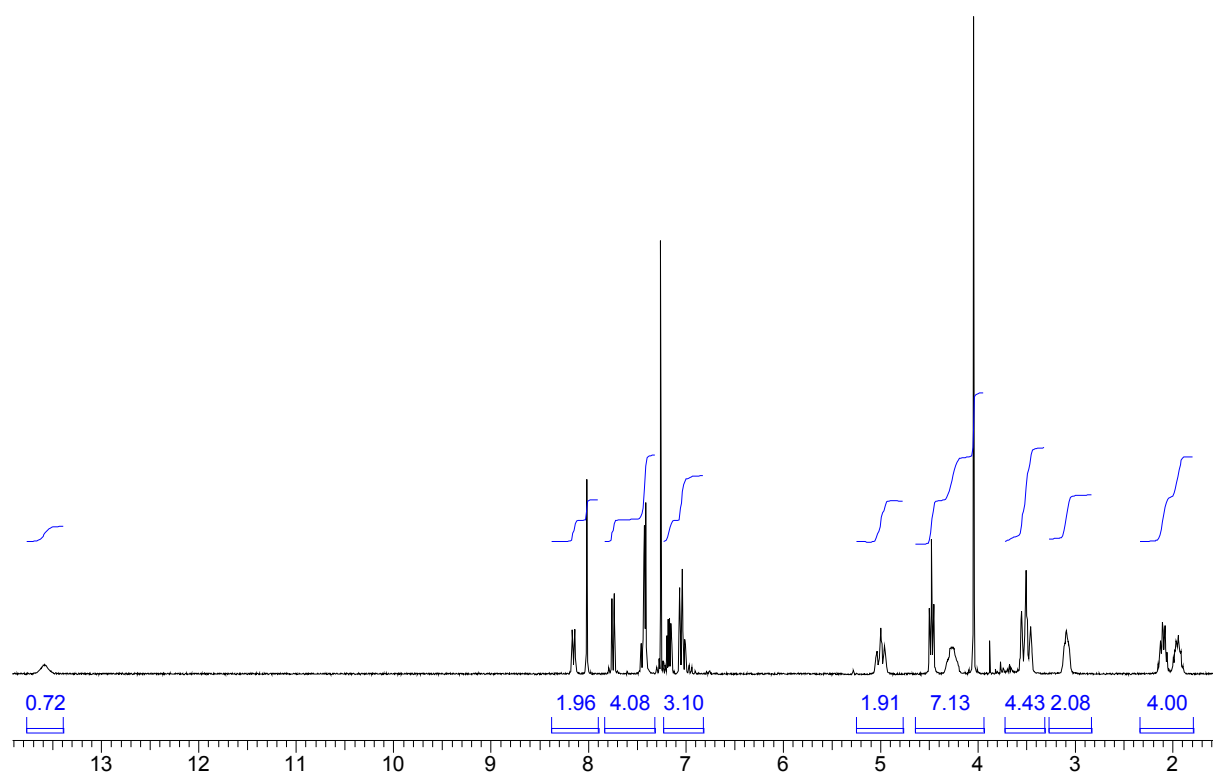
4.10. Związek 10



Analizę spektroskopową związku **10** przeprowadzano zarówno w roztworze CDCl_3 jak i DMSO.

Widma zarejestrowane w roztworze CDCl_3 .

Widmo ^1H NMR:



Opis widma ^1H NMR zamieszczono w tabeli 4.10.1 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

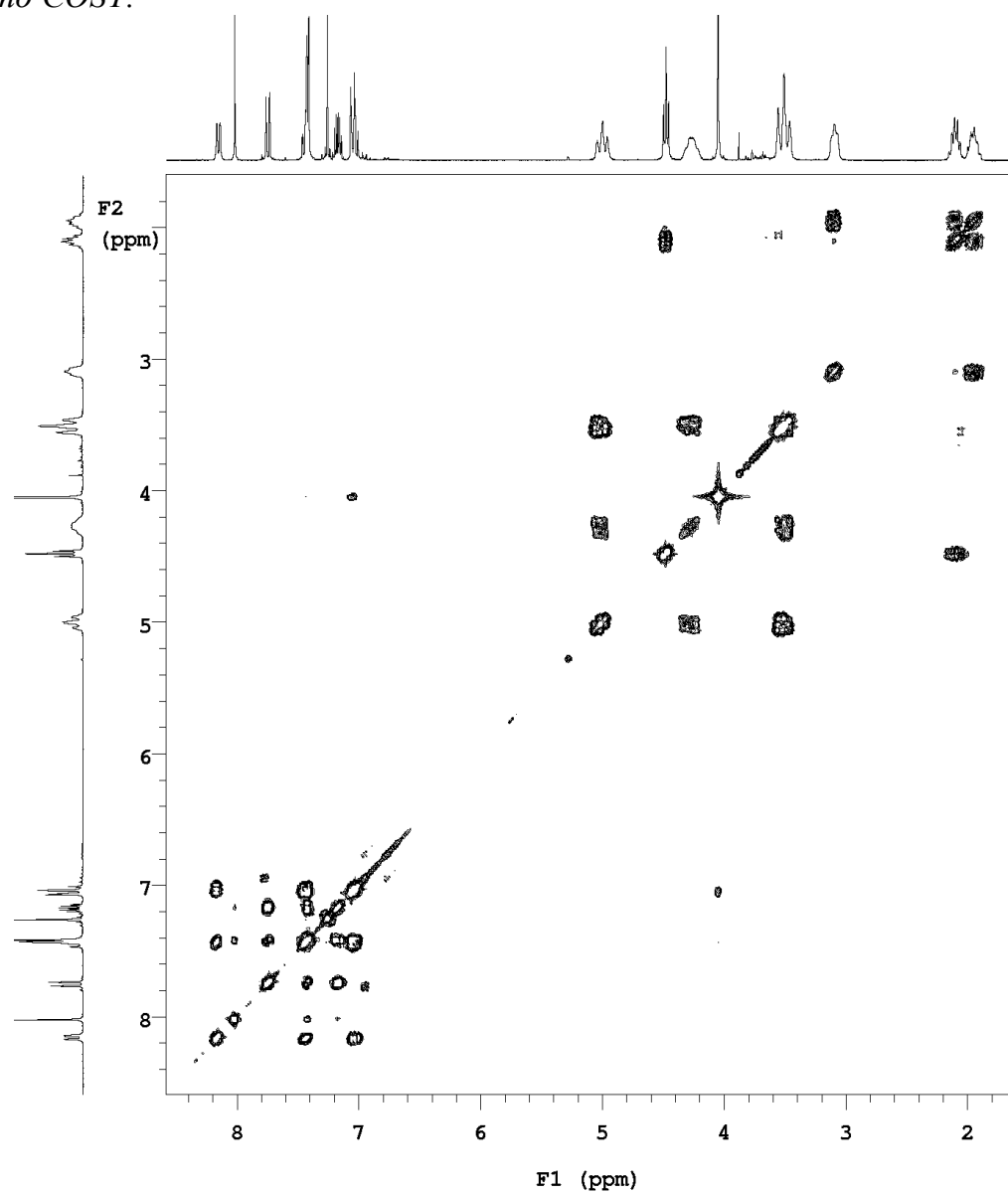
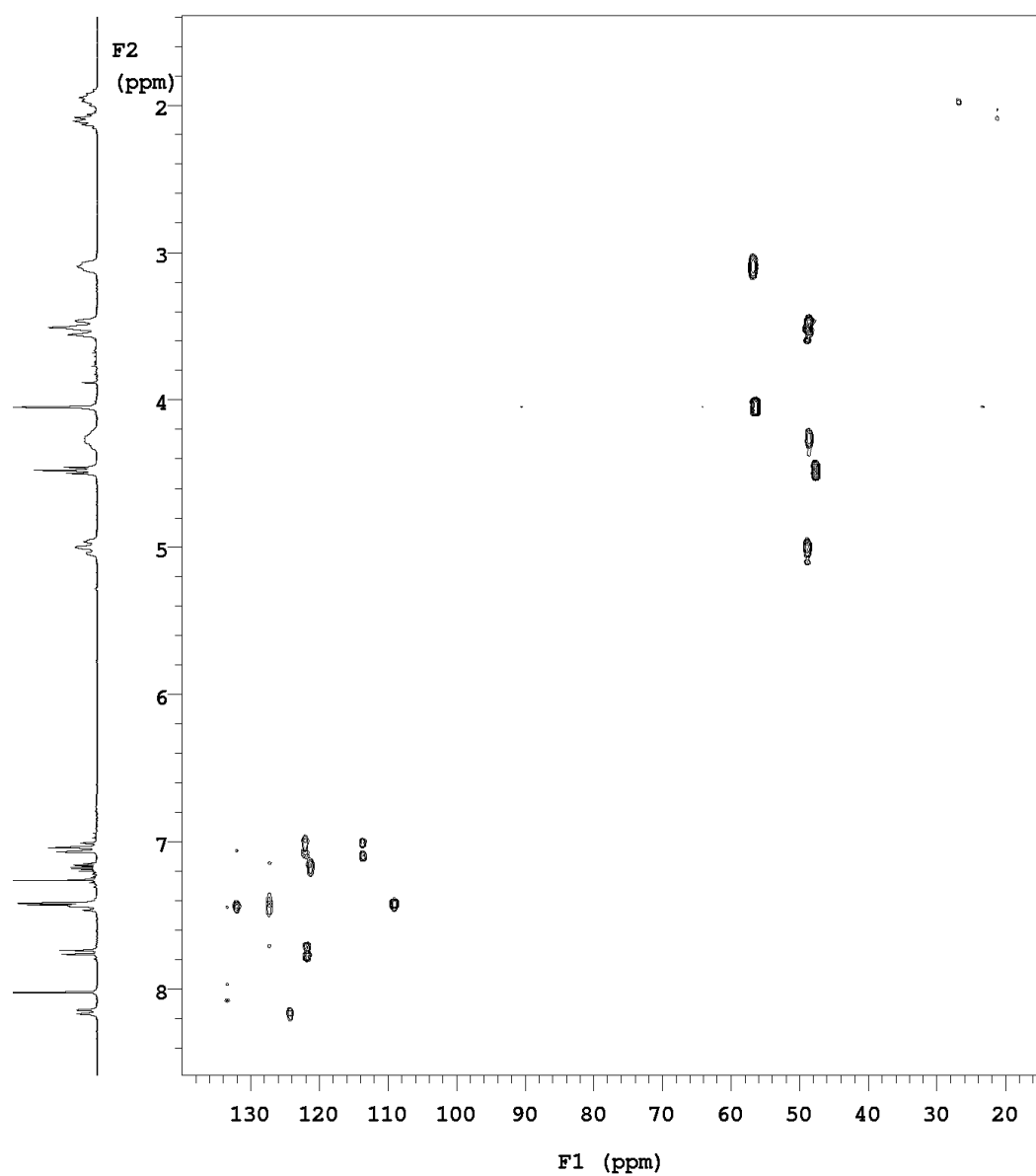


Tabela 4.10.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multiplero-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	8,02	singlet	1	-	H5, H6, H7
H4	7,75	dublet	1	8,0	H5, H6, H7
H5	7,17	multiplet	1	-	H3, H4, H6, H7
H6, H7	7,43	multiplet	2	-	H3, H4, H5
H1'	4,48	tryplet	2	6,4	H2'
H2'	2,10	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,95	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,09	multiplet	2	-	H2', H3'
H2" _a	4,27	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H3" _a
H2" _e , H3" _e	3,51	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3" _a	5,00	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _e , H2" _a
H3''', H5'''	7,00-7,08	multiplet	2	-	H4''', H6''', CH ₃
H4'''	7,42	multiplet	1	-	H3''', H5''', H6'''
H6'''	8,15	dublet	1	8,0	H3''', H4''', H5'''
CH ₃	4,05	singlet	3	-	H3''', H5'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

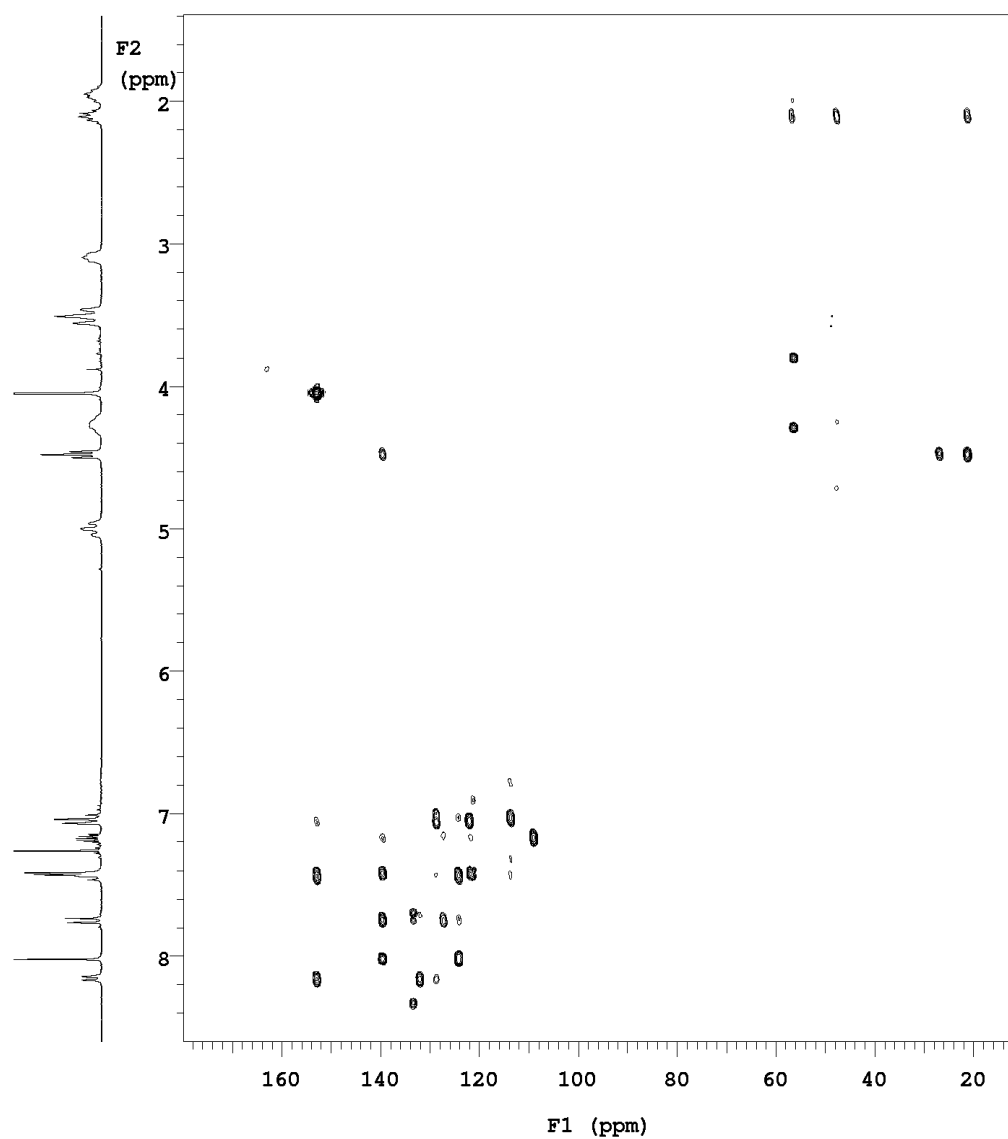
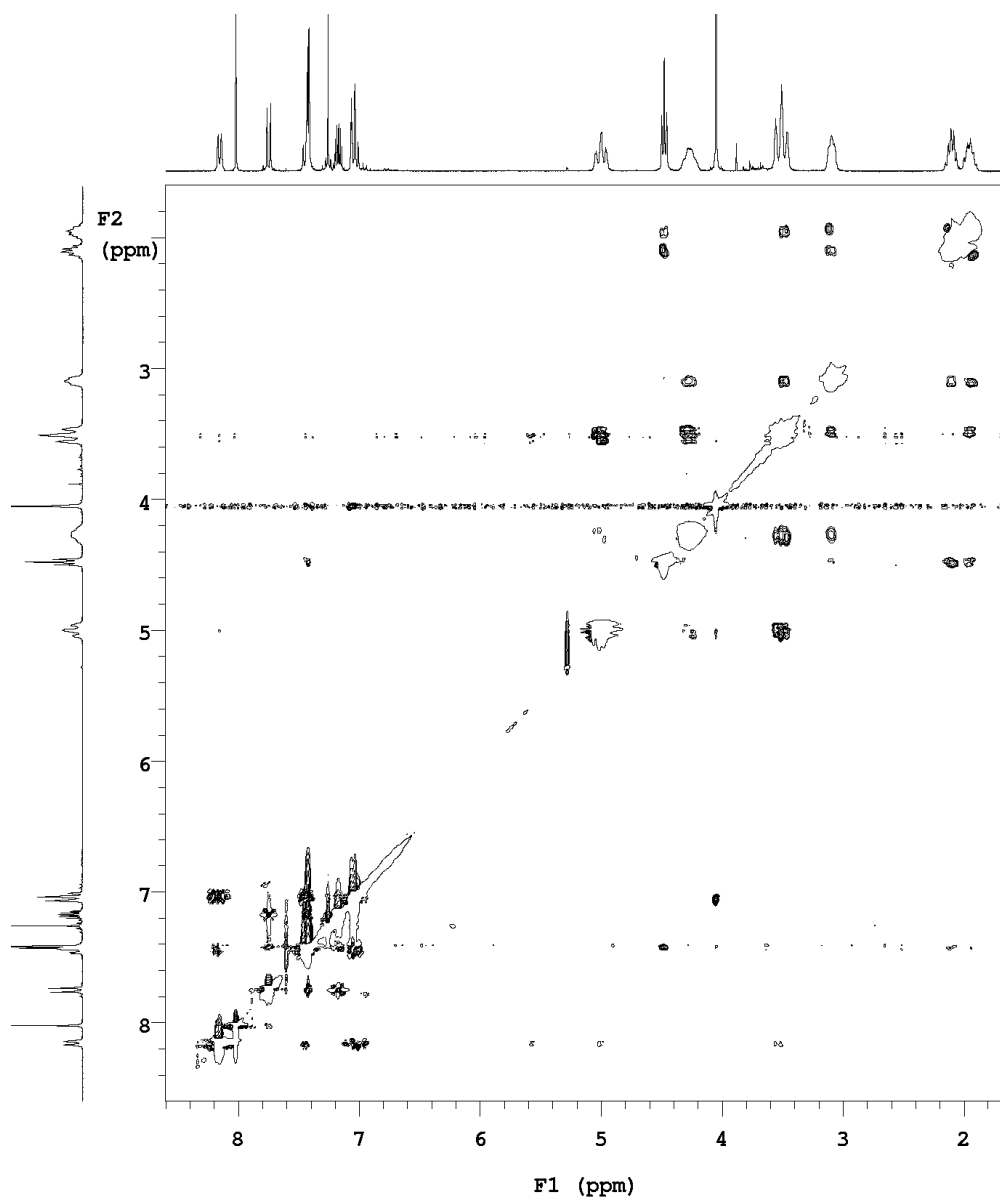


Tabela 4.10.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C3	133	H4
C3a	124	H3, H6, H7
C4	122	H5
C5	121	H6, H7
C6	127	H4
C7	109	H5
C7a	140	H3, H4, H5, H6, H7, H1'
C1'	47	H2'
C2'	20	H1', H3'
C3'	26	H1'
C4'	56	H2', H3'
C2"	48	H2" _e , H3" _e
C3"	49	
C1'''	128	H3'''-H6'''
C2'''	153	H3'''-H6''', <u>CH</u> ₃
C3'''	122	H3'''-H6'''
C4'''	132	H3'''-H6'''
C5'''	114	H3'''-H6'''
C6'''	124	H3'''-H6'''
<u>CH</u> ₃	56	

Widmo NOESY:

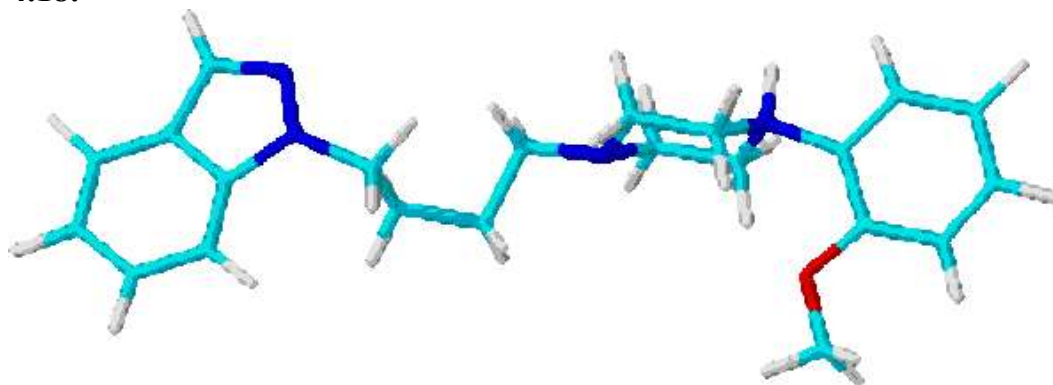


W tabeli poniżej zebrano informacje odczytane z widma NOESY, wraz z obliczeniem średniej wartości odległości pomiędzy oddziałującymi protonami według metody podanej w rozdziale dotyczącym części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.10.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

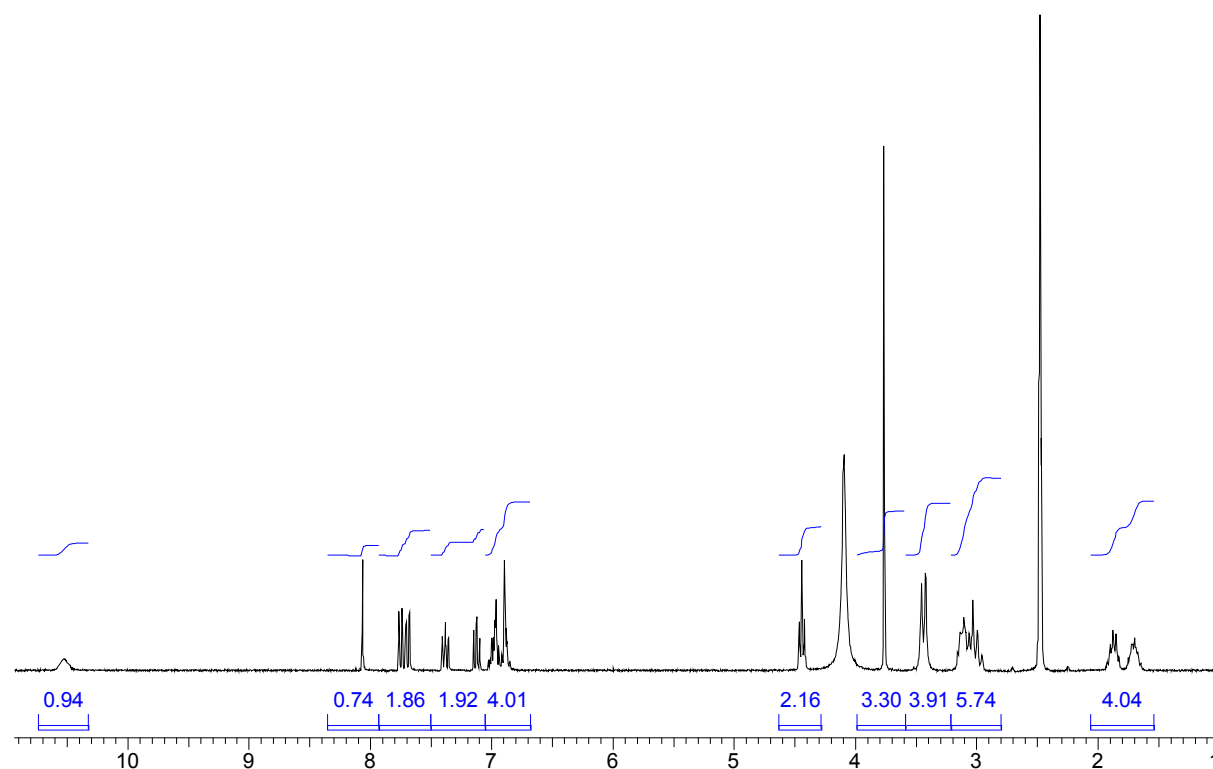
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H7-H1'	5,79	2,53
H1'-H4'	1,36	3,23
H1'-H2'	14,52	2,17
H1'-H3'	6,11	2,51
H2'-H4'	6,33	2,50
H3'-H4'	9,49	2,33
H3'-H2" _e	9,26	2,34
H4'-H2" _e	9,16	2,35
H4'-H2" _a	10,60	2,29
H3" _a -H6'''	1,00	3,40
H3" _e -H6'''	1,33	3,24
H3" _a -CH ₃	1,22	3,28
H5'''-CH ₃	16,88	2,12*

Rysunek poniżej przedstawia konformację związku **10**, obliczoną z danych otrzymanych w wyniku interpretacji widma NOESY, zgodnie z metodą opisaną w części eksperymentalnej.

Rys. 4.18.

Interpretacja widm wykonanych w roztworze DMSO

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów zostało zebrane razem z opisem widma COSY w tabeli 4.10.4.

Widmo COSY:

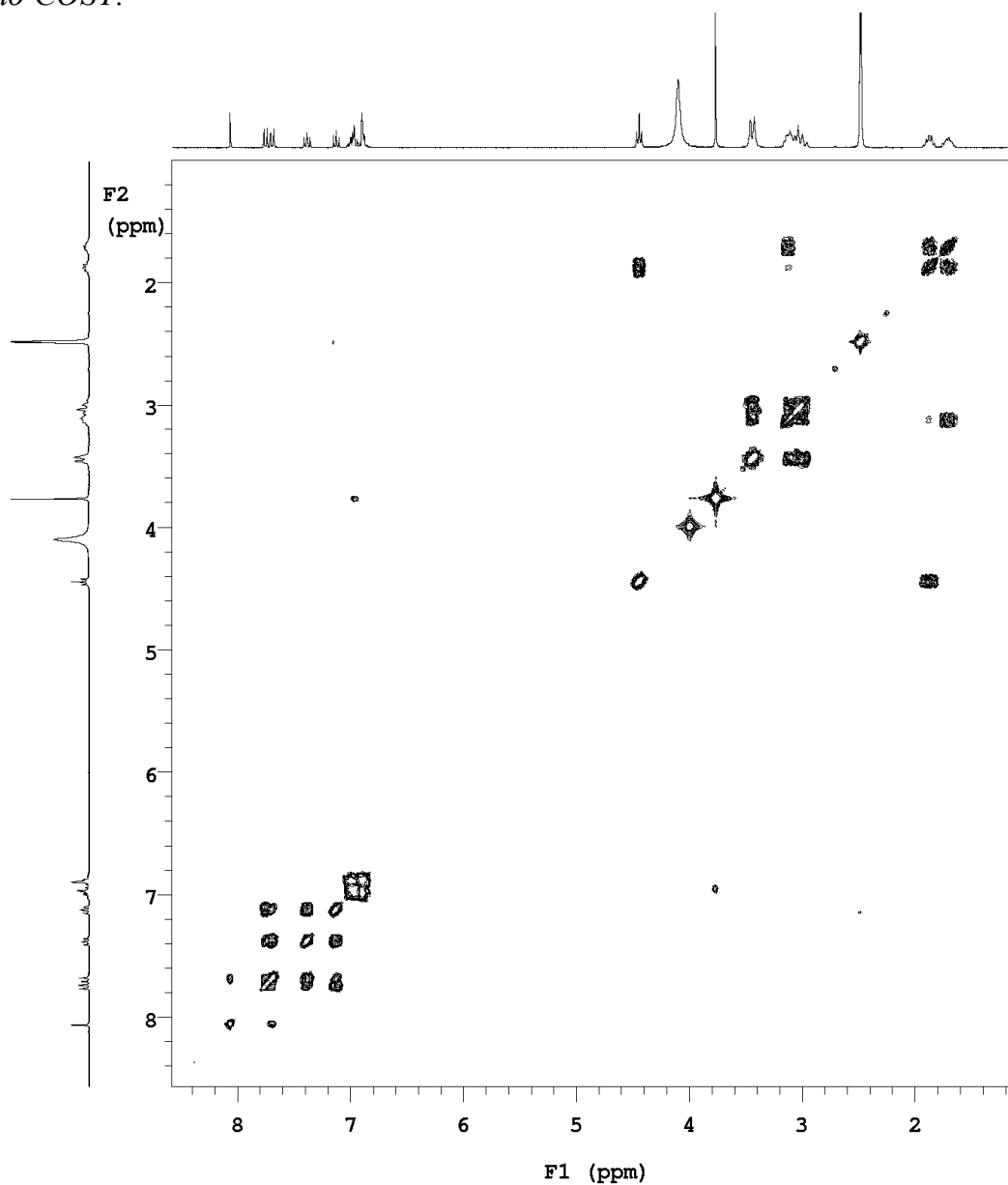


Tabela 4.10.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multiplero-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	8,07	dublet	1	0,9	H4
H4	7,69	multiplet	1	-	H3, H5, H6, H7
H5	7,38	multiplet	1	-	H4, H6, H7
H6	7,12	multiplet	1	-	H4, H5, H7
H7	7,75	multiplet	1	-	H4, H5, H6

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H1'	4,44	tryplet	2	6,7	H2'
H2'	1,88	multiplet	2	-	H1', H3', H4'
H3'	1,70	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,12	multiplet	2	-	H2', H3'
H2" _a , H3" _a	3,02	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,44	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,84-7,04	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,76	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:

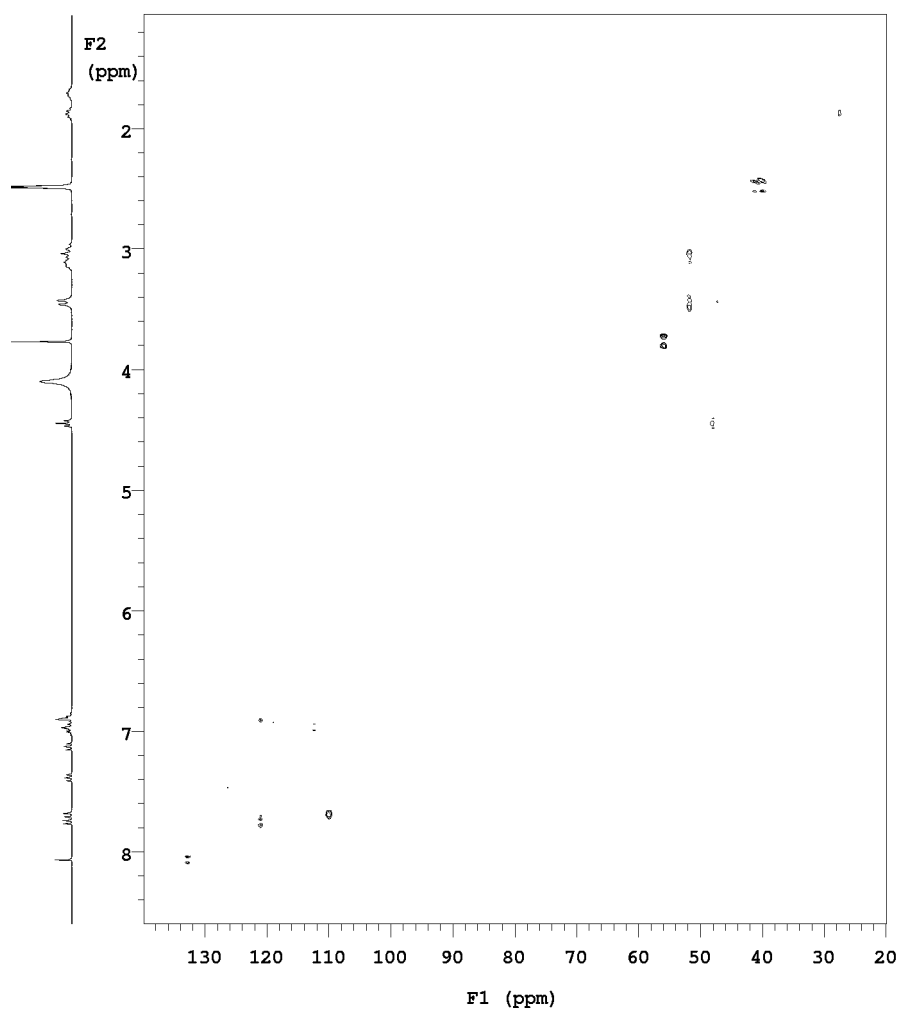
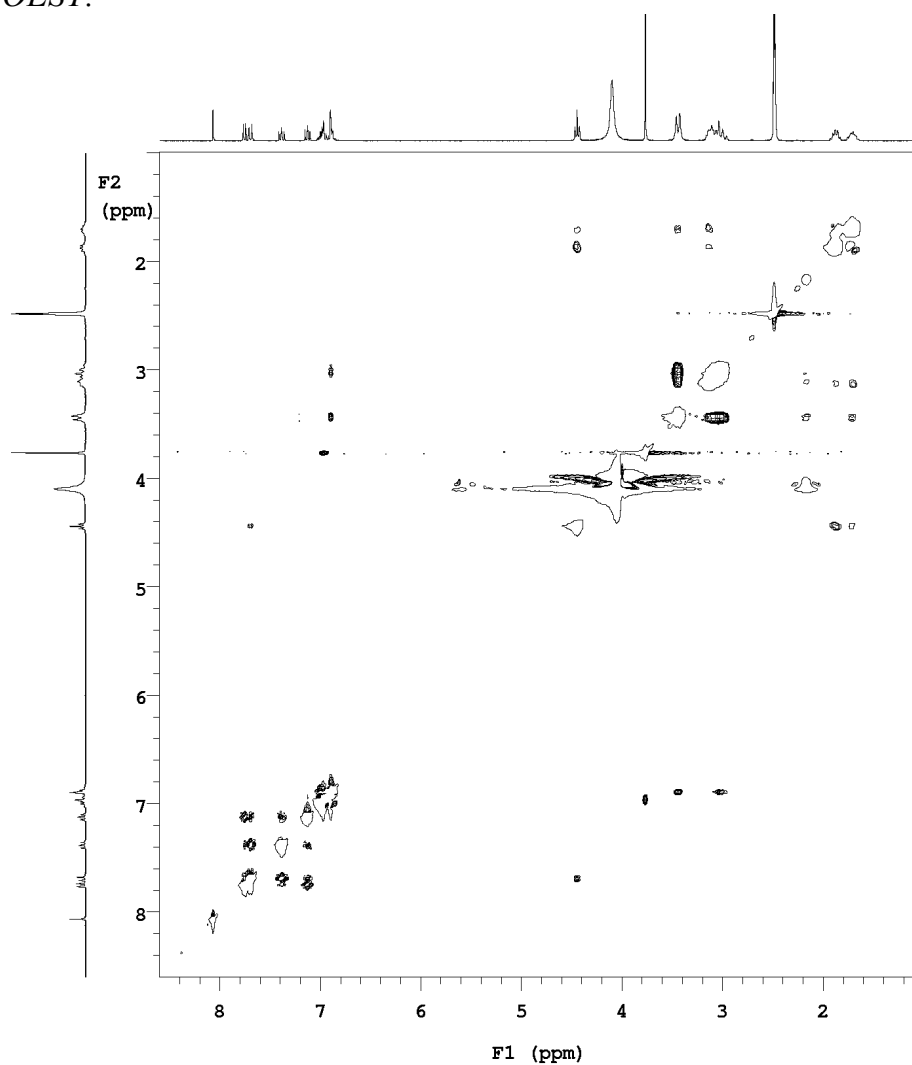


Tabela 4.10.5. Interpretacja widma heterokorelacyjnego HSQC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]
C3	133
C4	110
C7	121
C1'	48
C2'	29
CH ₃	56

Ze względu na niskie stężenie próbki nie udało się uzyskać widma HMBC.

Widmo NOESY:



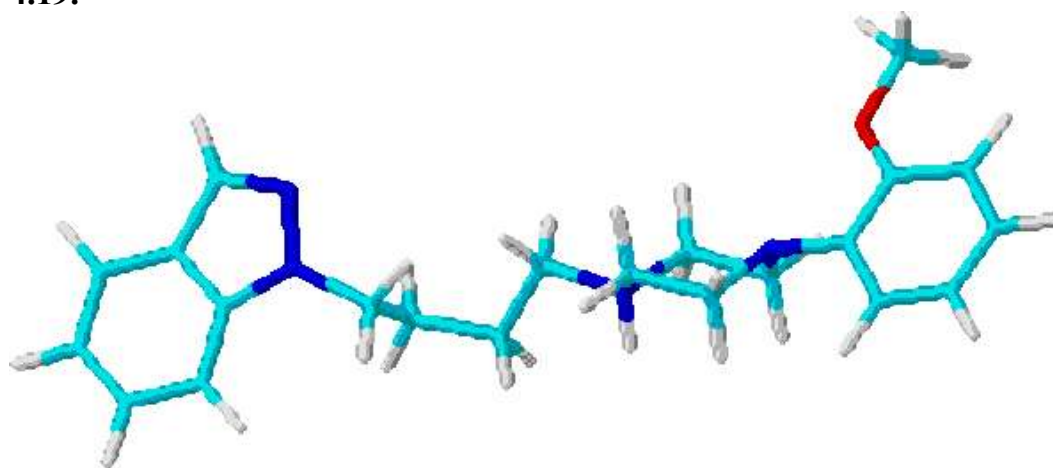
W poniższej tabeli zamieszczono zestawienie sygnałów odczytanych z widma NOESY, wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami obliczonymi według metody opisanej w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.10.6. Interpretacja widma 2D NOESY.

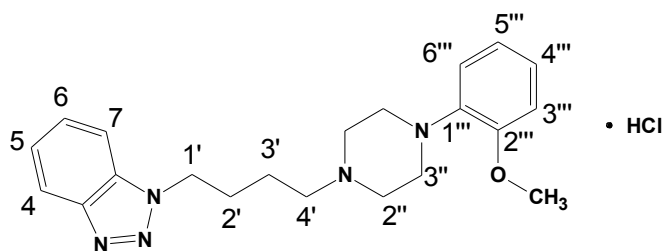
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H7-H1'	10,00	2,50
H1'-H2'	22,14	2,19
H1'-H3'	5,64	2,75
H2'-H4'	4,68	2,84
H3'-H2" _e	8,22	2,58
H3" _a -H6'''	16,93	2,29
H3" _e -H6'''	15,48	2,33
H5'''-CH ₃	26,97	2,12*

Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **10** w roztworze DMSO. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

Rys. 4.19.



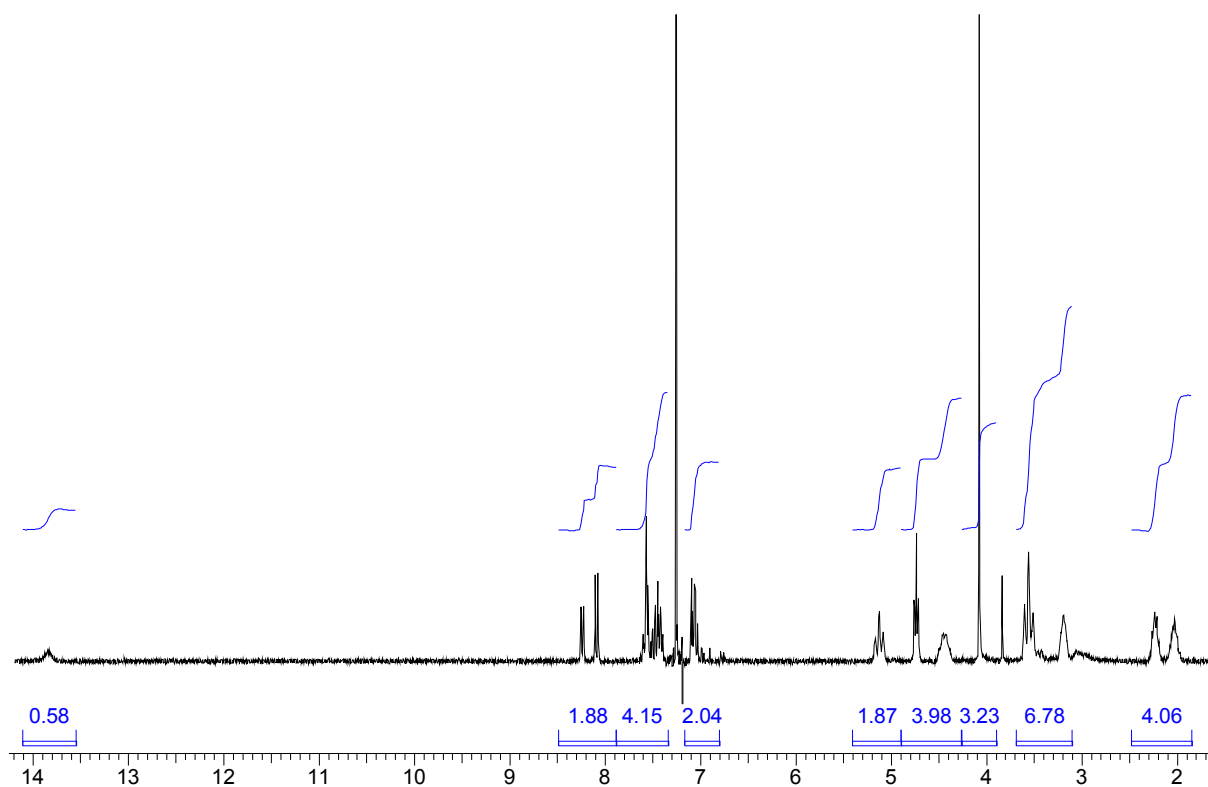
4.11. Związek 11



Dla związku **10** widma zarejestrowano w roztworach CDCl_3 i DMSO

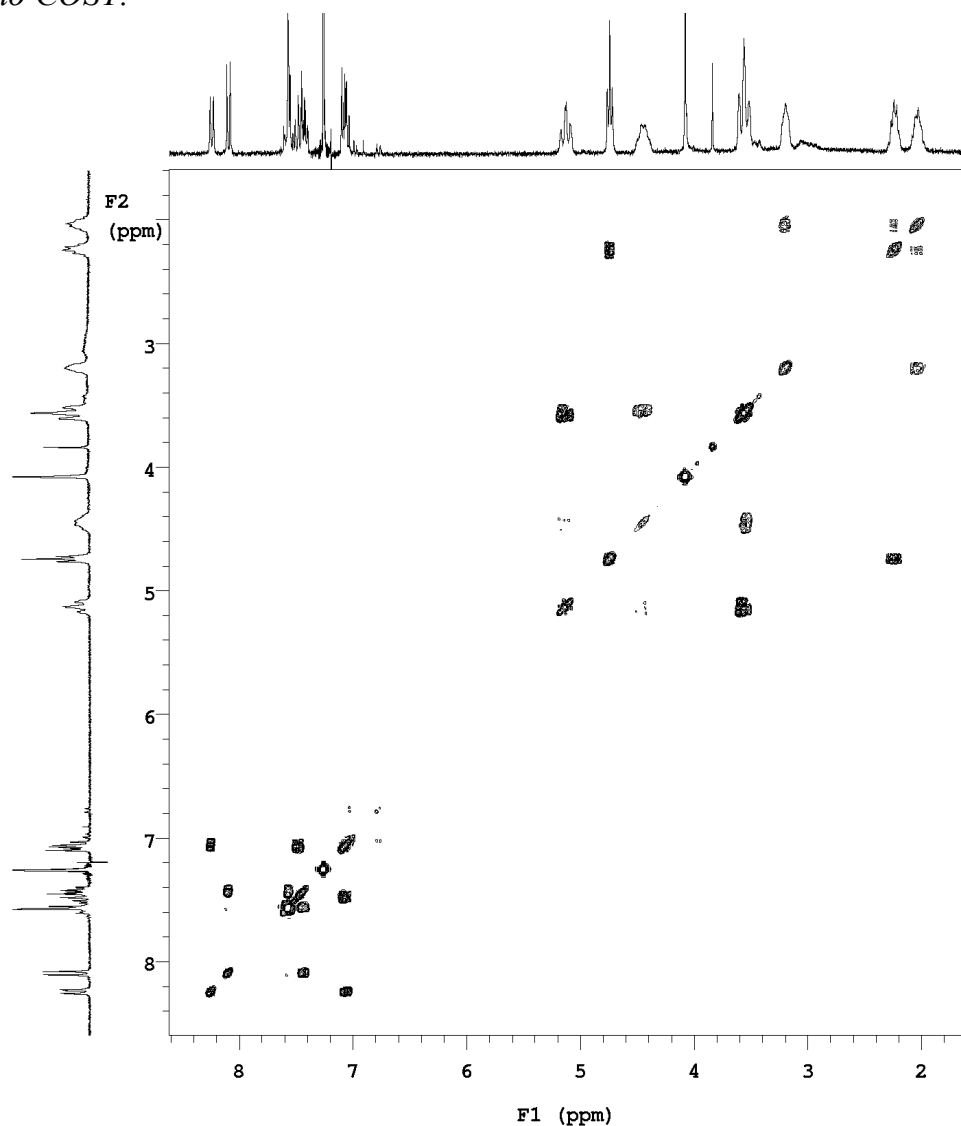
Widma wykonane w roztworze CDCl_3 .

Widmo ^1H NMR:



Interpretację widma ^1H NMR przedstawiono w tabeli 4.11.1 razem z opisem widma 2D COSY.

Widmo COSY:

**Tabela 4.11.1.** Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

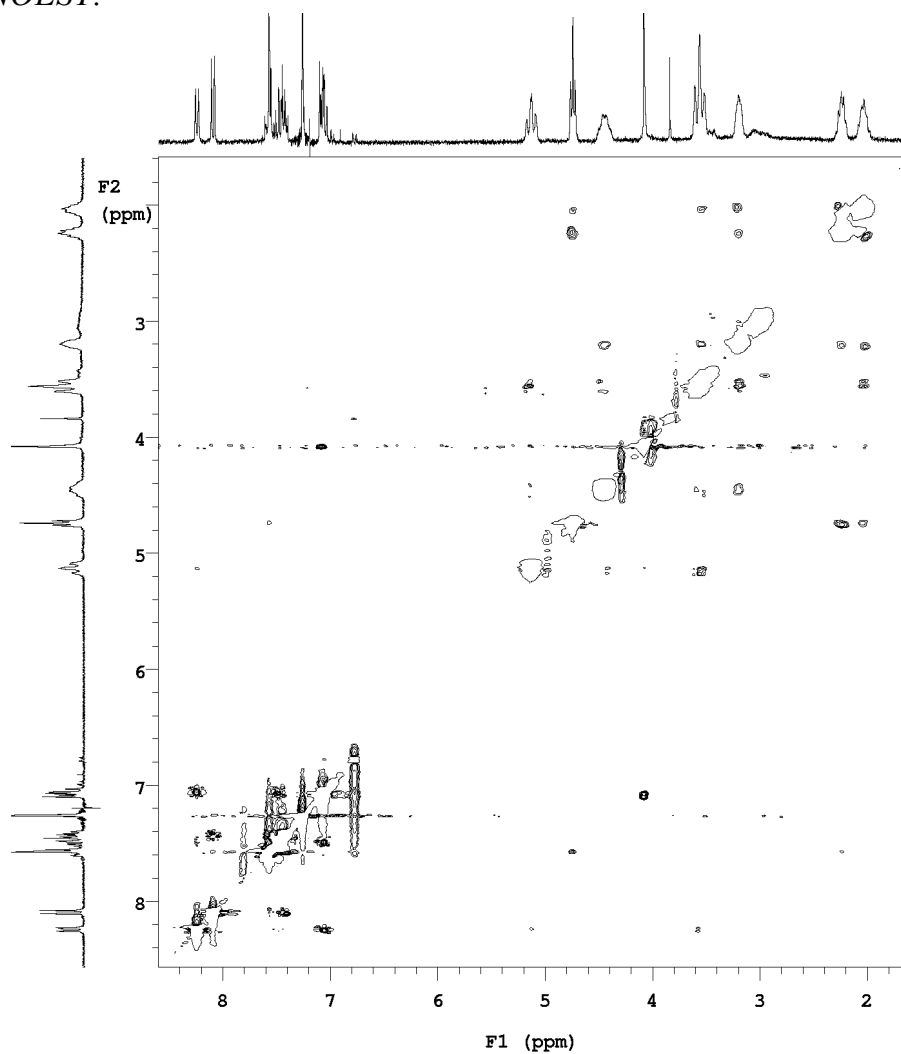
Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipleto-wość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4	8,09	dublet	1	8,5	H5-H7
H5-H7	7,39-7,61	multiplet	3	-	H4
H1'	4,74	tryplet	2	6,5	H2'
H2'	2,23	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	2,03	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,19	poszerz. singlet	2	-	H3'
H2'' _a	4,44	poszerz. singlet	2	-	H2'' _e , H3'' _e , H3'' _a

H2" _e , H3" _e	3,56	tryplet	4	13,1	H2" _a , H3" _a
H3" _a	5,12	tryplet	2	13,1	H2" _e , H3" _e , H2" _a
H3'''- H5'''	7,01-7,11	multiplet	2	-	H4''', H6'''
H6'''	8,24	dublet	1	8,0	H3''', H4''', H5'''
CH ₃	4,08	singlet	3	-	

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widm heterokorelacyjnych nie udało się zarejestrować z powodu bardzo niskiego stężenia próbki.

Widmo NOESY:



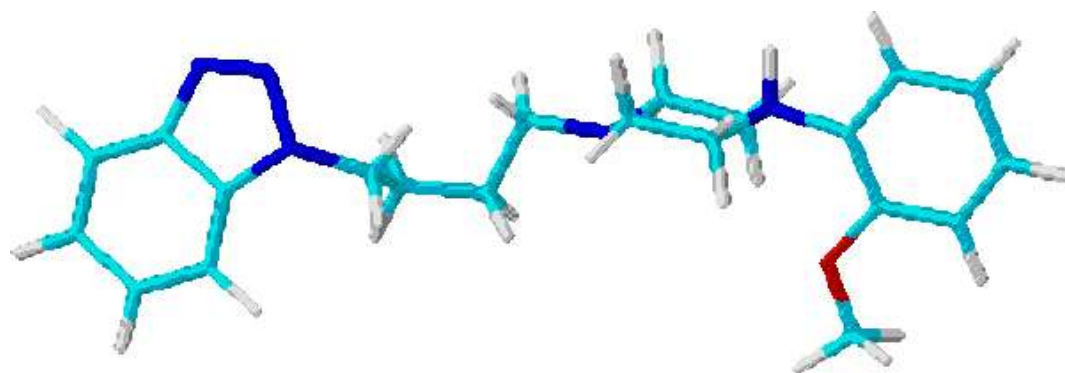
Interpretację widma NOESY, wraz z obliczonymi według metody opisanej w części eksperymentalnej odległościami pomiędzy protonami związanymi oddziaływaniem NOE, zamieszczono w poniższej tabeli. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.11.2. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H7-H1'	5,16	2,90
H1'-H2'	24,00	2,24
H1'-H3'	9,15	2,64
H2'-H4'	7,98	2,70
H3'-H4'	10,63	2,57
H3'-H2" _e	14,00	2,45
H4'-H2" _e	19,74	2,32
H4'-H2" _a	15,67	2,41
H3" _a -H6"	1,00	3,81
H3" _e -H6"	3,24	3,13
H5"-CH ₃	33,75	2,12*

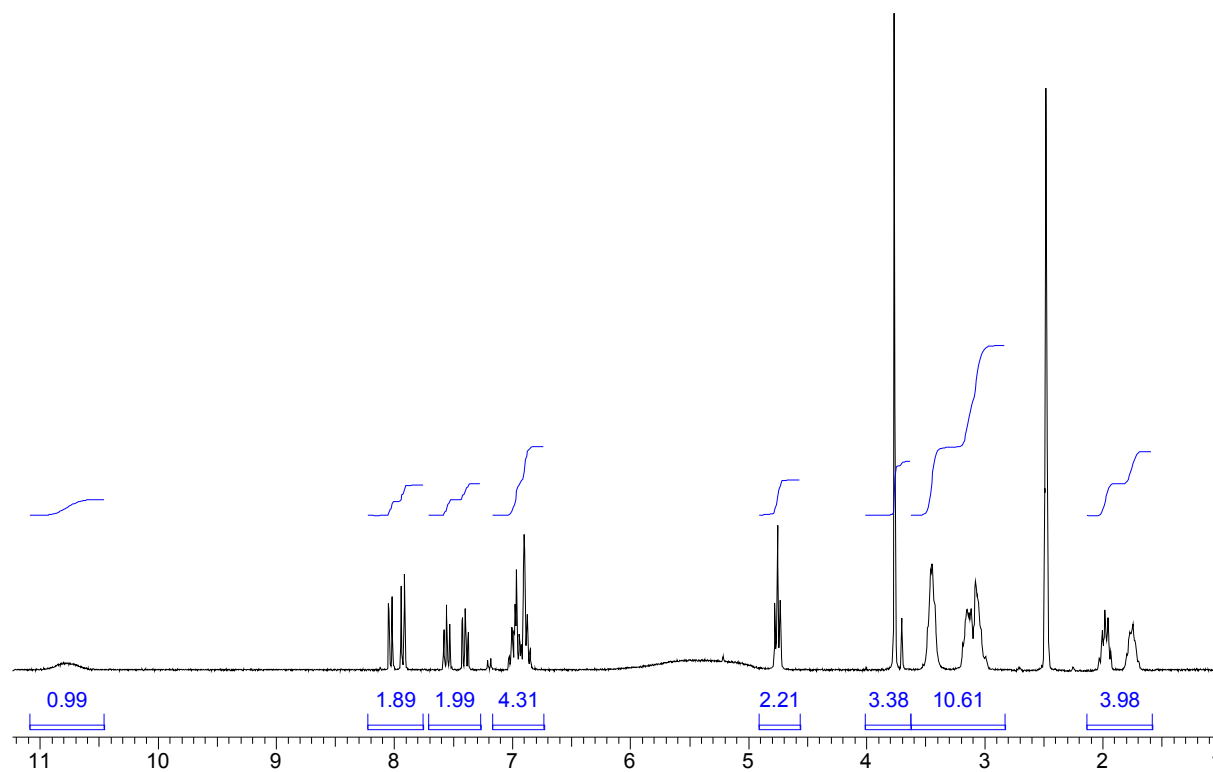
Na rysunku przedstawiono obliczoną na podstawie danych spektroskopowych konformację związku **11**.

Rys. 4.20.



Widma otrzymane w roztworze DMSO.

Widmo ^1H NMR:



Interpretacja widma wraz z opisem widma 2D COSY została przedstawiona w tabeli 4.11.3.

Widmo COSY:

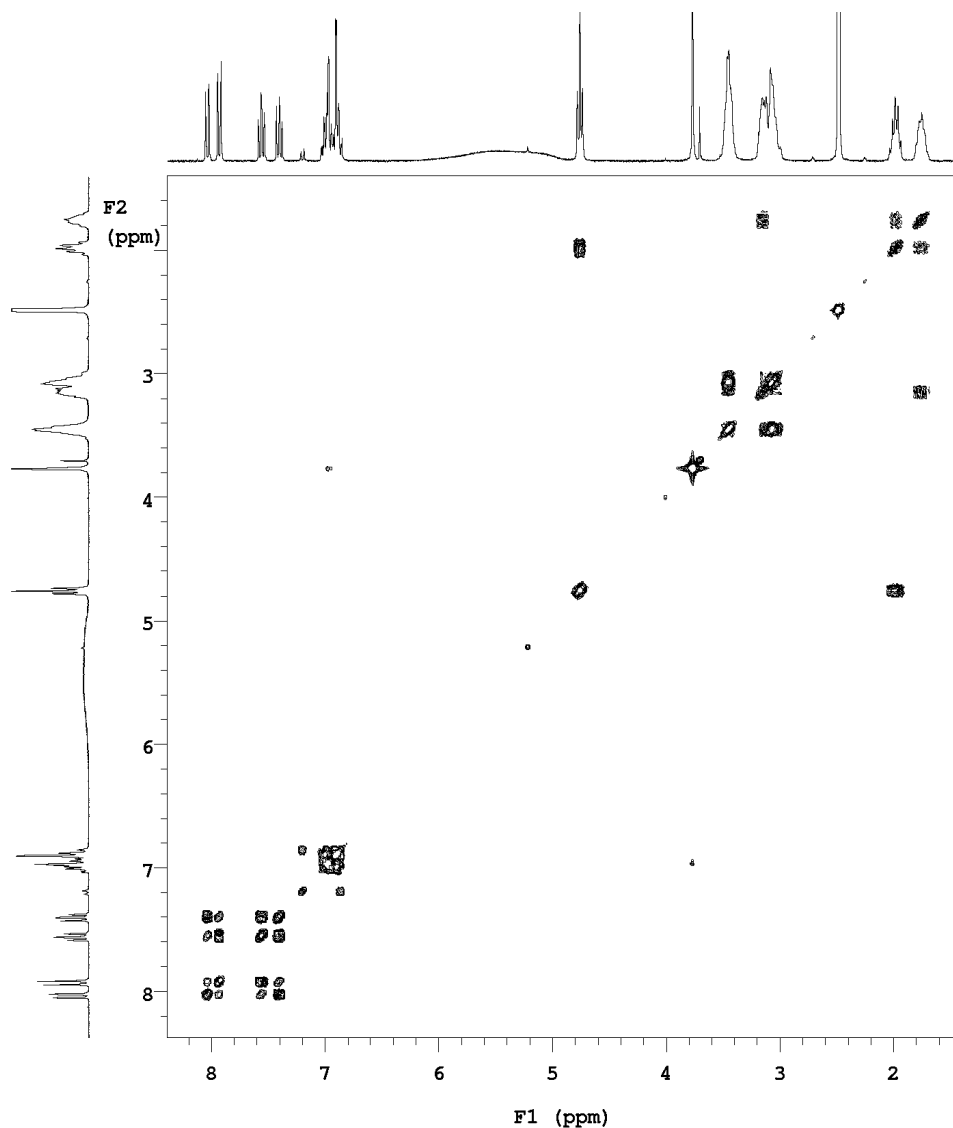


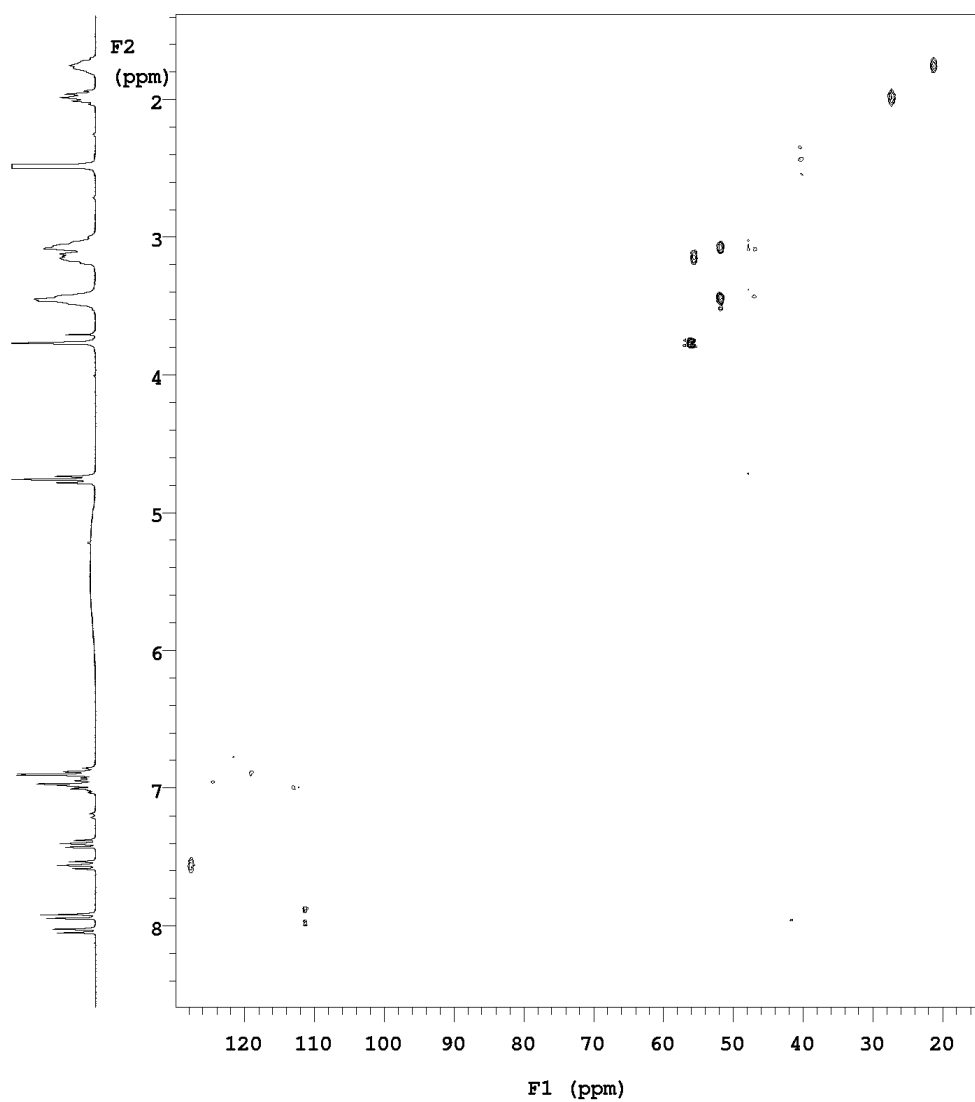
Tabela 4.11.3. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H4	8,03	dublet	1	8,4	H5, H6, H7
H5	7,70	tryplet	1	7,9	H4, H6, H7
H6	7,56	tryplet	1	8,4	H4, H5, H7
H7	7,93	dublet	1	8,4	H4, H5, H6
H1'	4,68	tryplet	2	6,8	H2'
H2'	1,98	multiplet	2	-	H1', H3'

H3'	1,75	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,15	multiplet	2	-	H3'
H2" _a , H3" _a	2,95-3,20	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,45	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,84-7,04	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,77	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

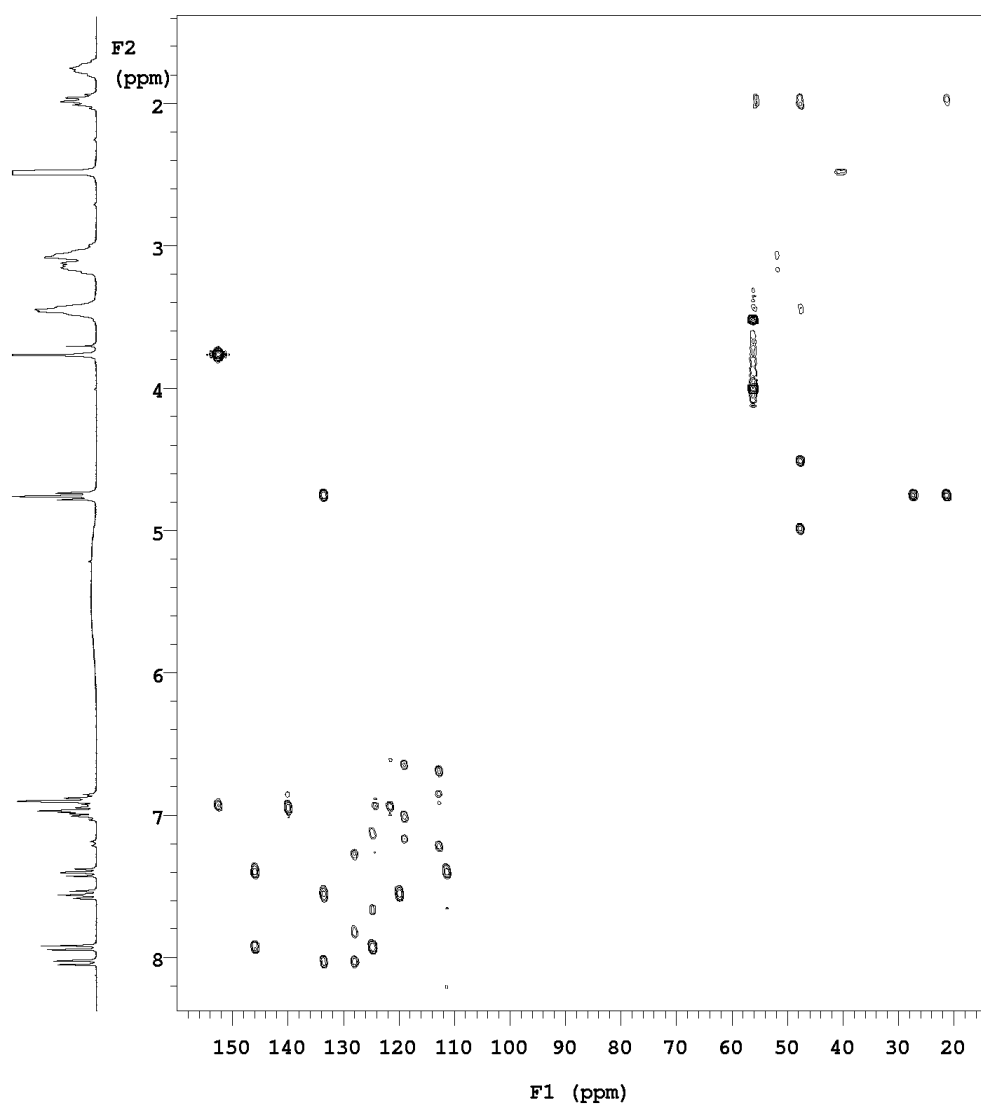
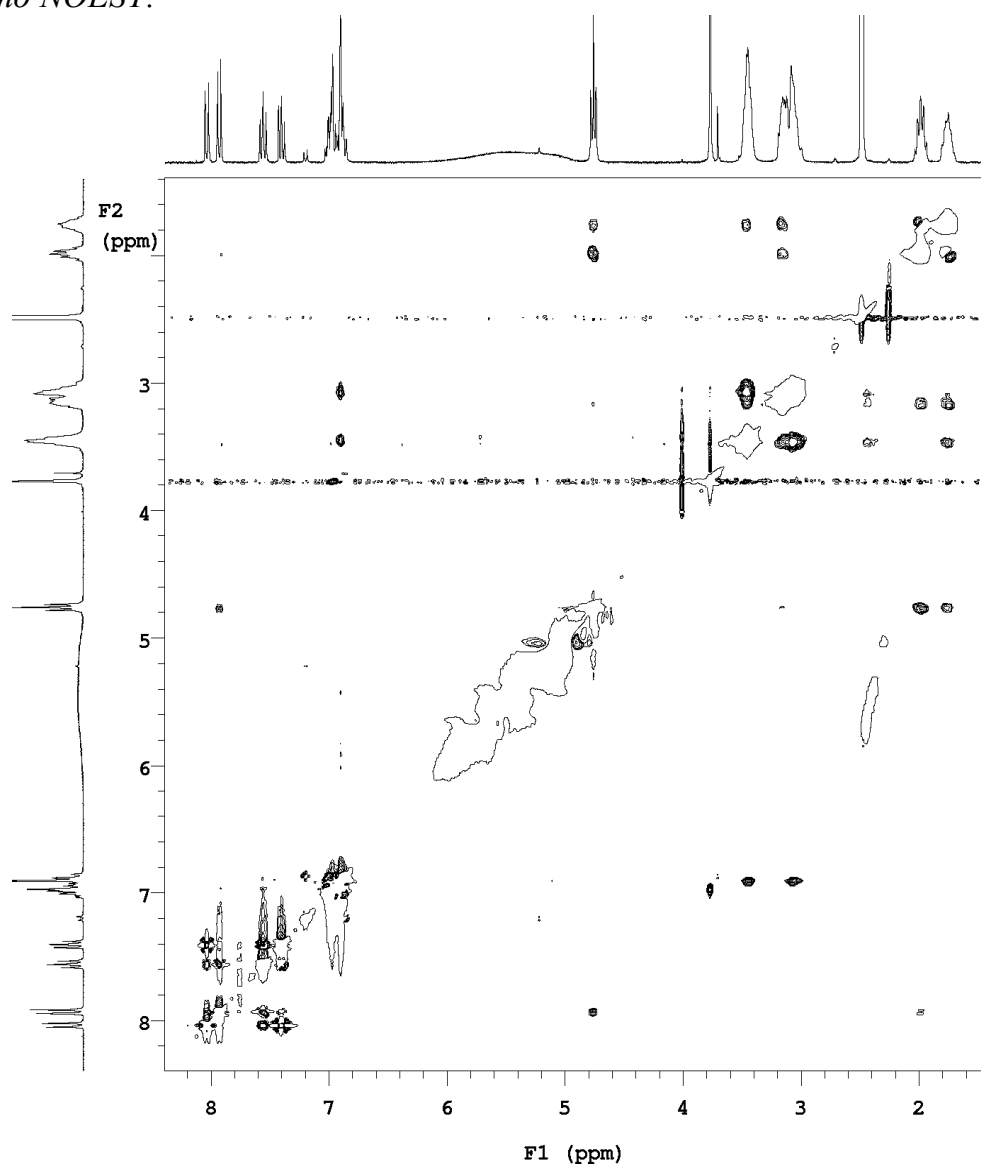


Tabela 4.11.4. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C3a	148	H5, H7
C4	111	H6
C5	128	H4
C6	125	H7
C7	120	H5
C7a	133	H4, H6, H1'
C1'	48	H2'
C2'	28	H1'
C3'	22	H1', H2'
C4'	55	H2'
C2"	47	H2" _e , H3" _e
C3"	51	H2" _a , H3" _a
C1'''	140	H3'''-H6'''
C2'''	152	H3'''-H6''', CH ₃
C3'''	122	H3'''-H6'''
C4'''	119	H3'''-H6'''
C5'''	112	H3'''-H6'''
C6'''	124	H3'''-H6'''
CH ₃	56	

Widmo NOESY:



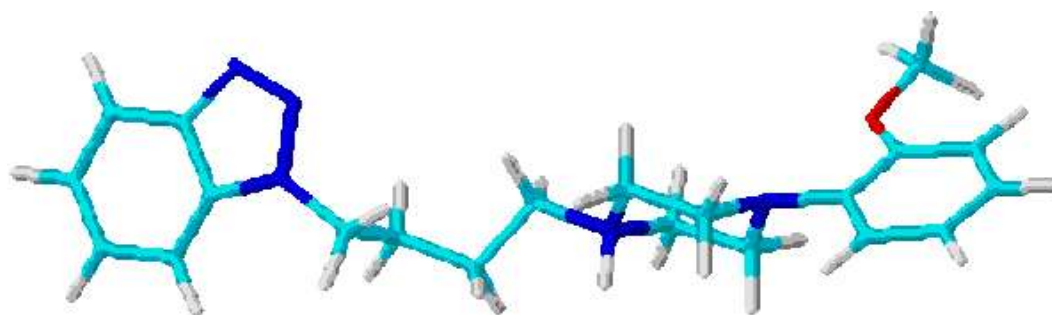
W tabeli 4.11.5 przedstawiono interpretację widma NOESY oraz zebrano obliczone odległości pomiędzy oddziałującymi protonami metodą opisaną w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.11.5. Interpretacja widma 2D NOESY.

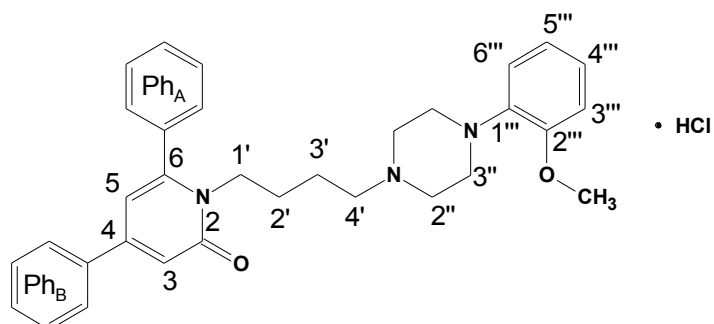
Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
H7-H1'	20,00	2,67
H7-H2'	6,88	3,19
H1'-H4'	1,68	4,04
H1'-H2'	72,10	2,16
H1'-H3'	27,93	2,53
H3'-H2'' _e	39,01	2,39
H3'' _a -H6'''	52,29	2,28
H3'' _e -H6'''	57,19	2,24
H5'''-CH ₃	80,05	2,12*

Rysunek poniżej prezentuje konformację związku **11** w roztworze DMSO, obliczoną w oparciu o odległości wyznaczone z widma NOESY.

Rys. 4.21.



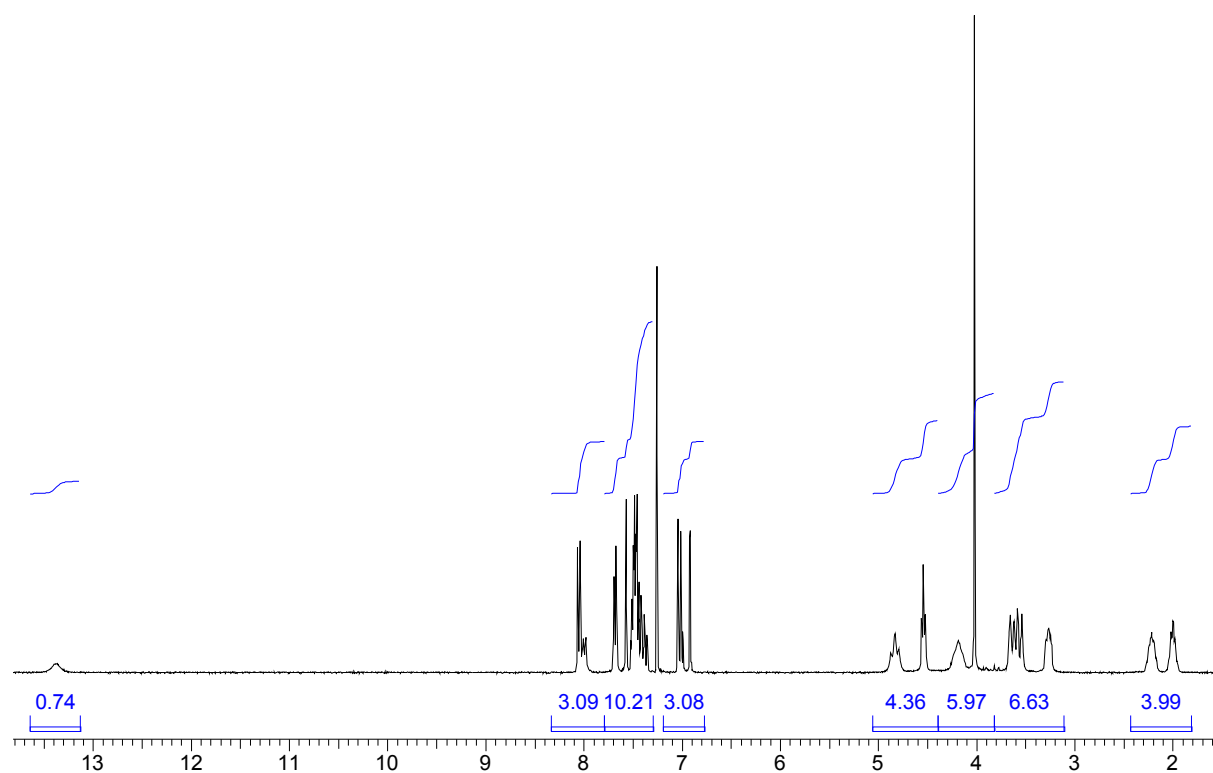
4.12. Związek 12



Dla związku **12** widma wykonano zarówno w roztworze CDCl_3 jak i DMSO.

Widma zarejestrowane w roztworze CDCl_3 .

Widmo ^1H NMR:



Szczegółową interpretację widma zamieszczono w tabeli 4.12.1 razem z danymi odczytanymi z widma 2D COSY.

Widmo COSY:

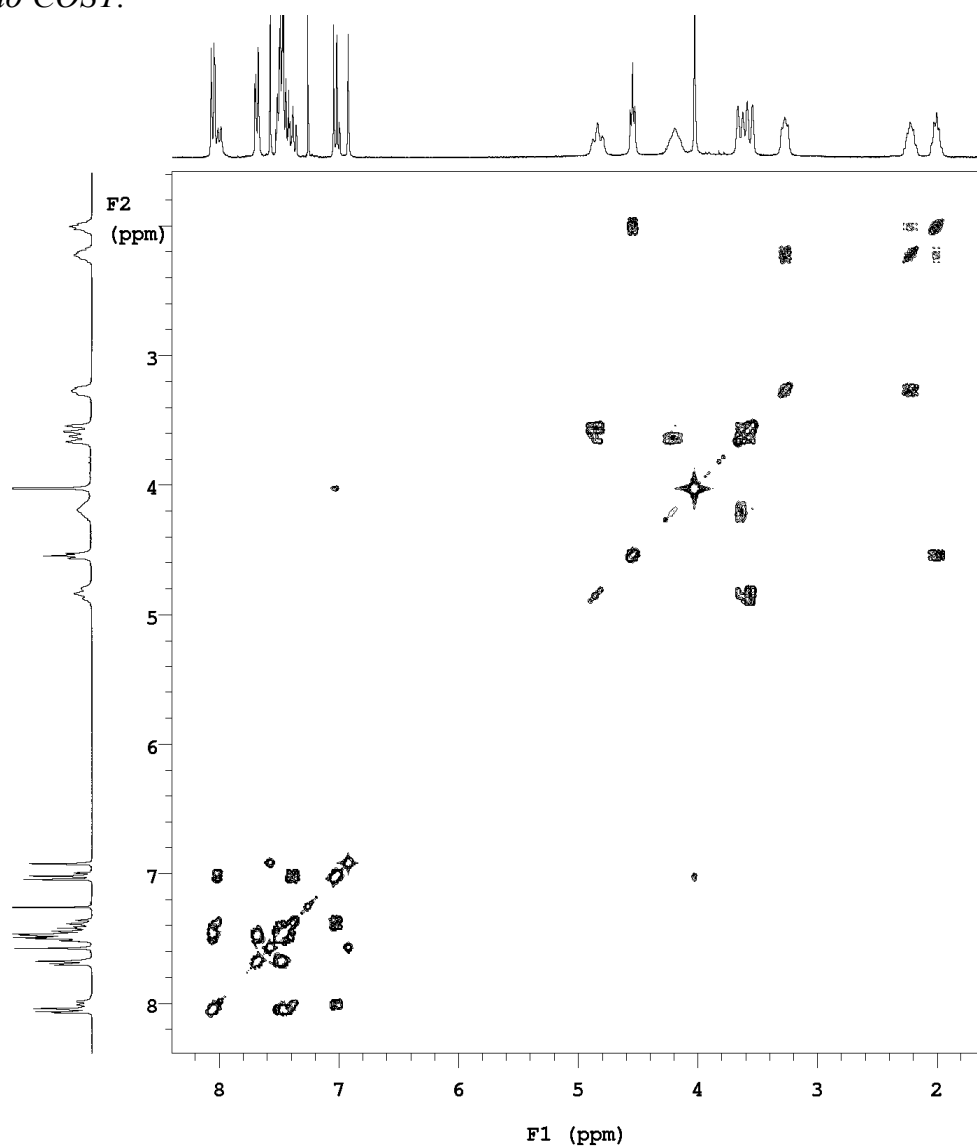


Tabela 4.12.1. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

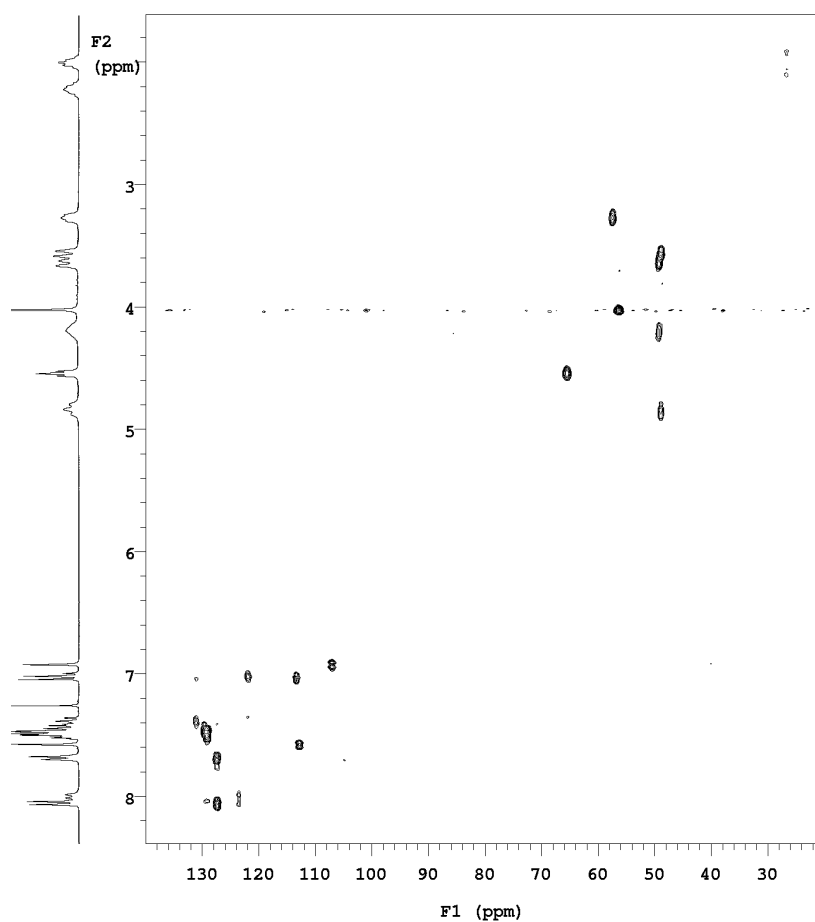
Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	6,92	dublet	1	1,1	H5
H5	7,57	dublet	1	1,1	H3
$\text{Ph}_\text{A}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$	8,05	multiplet	2	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$
$\text{Ph}_\text{B}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$	7,68	multiplet	2	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$
$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$	7,40-7,53	multiplet	6	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$, $\text{Ph}_\text{B}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$
H1'	4,54	tryplet	2	5,7	H2'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H2'	2,00	multiplet	2	-	H1', H3'
H3'	2,22	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,27	multiplet	2	-	H3'
H2" _a	4,19	poszerz. singlet	2	-	H2" _e
H2" _e	3,64	multiplet	2	-	H2" _a , H3" _e , H3" _a
H3" _e	3,56	multiplet	2	-	H2" _e , H3" _a
H3" _a	4,84	tryplet	2	11,9	H2" _e , H3" _e
H3''', H5'''	7,00	multiplet	2	-	H4''', H6''', CH ₃
H4'''	7,39	multiplet	1	-	H3''', H5''', H6'''
H6'''	8,00	dublet	1	8,2	H3''', H4''', H5'''
CH ₃	4,02	singlet	3	-	H3''', H5'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego, o – protony w pozycji *orto* fenylu

Widmo HSQC:



Widmo HMBC:

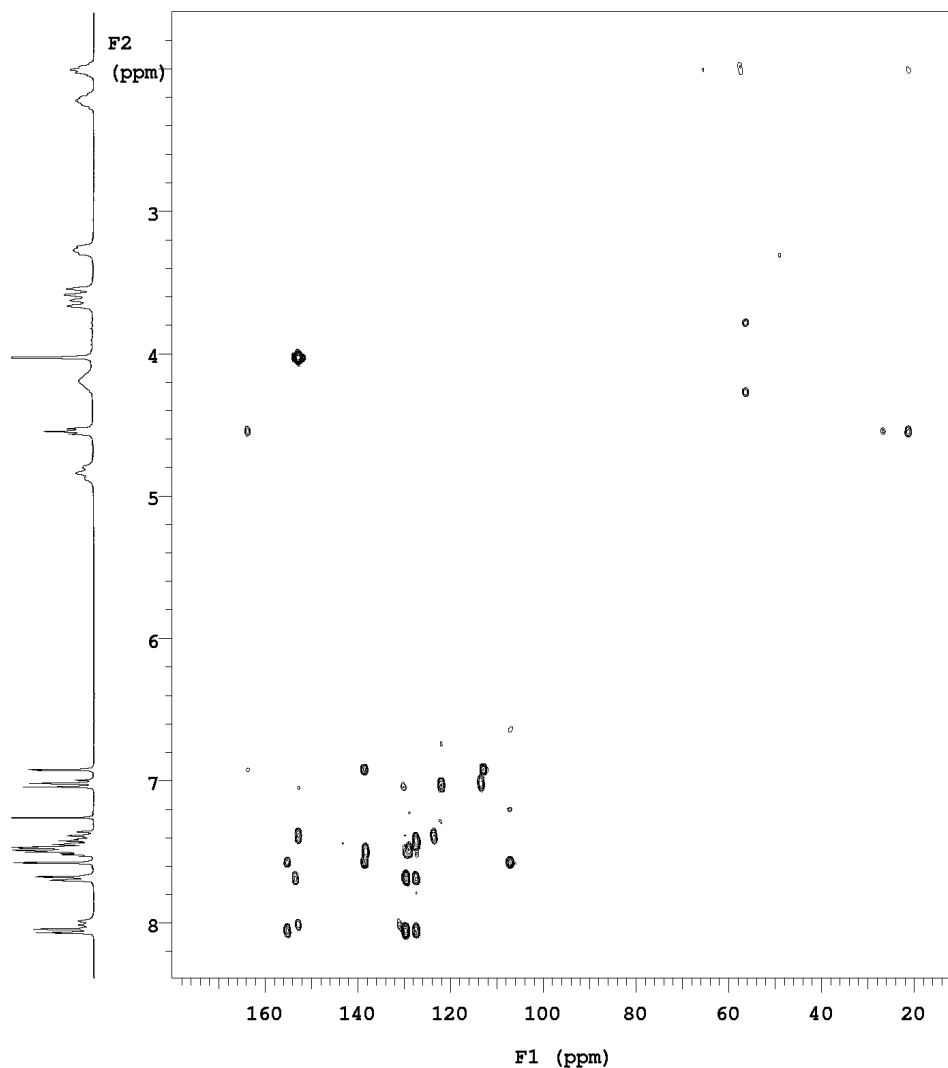


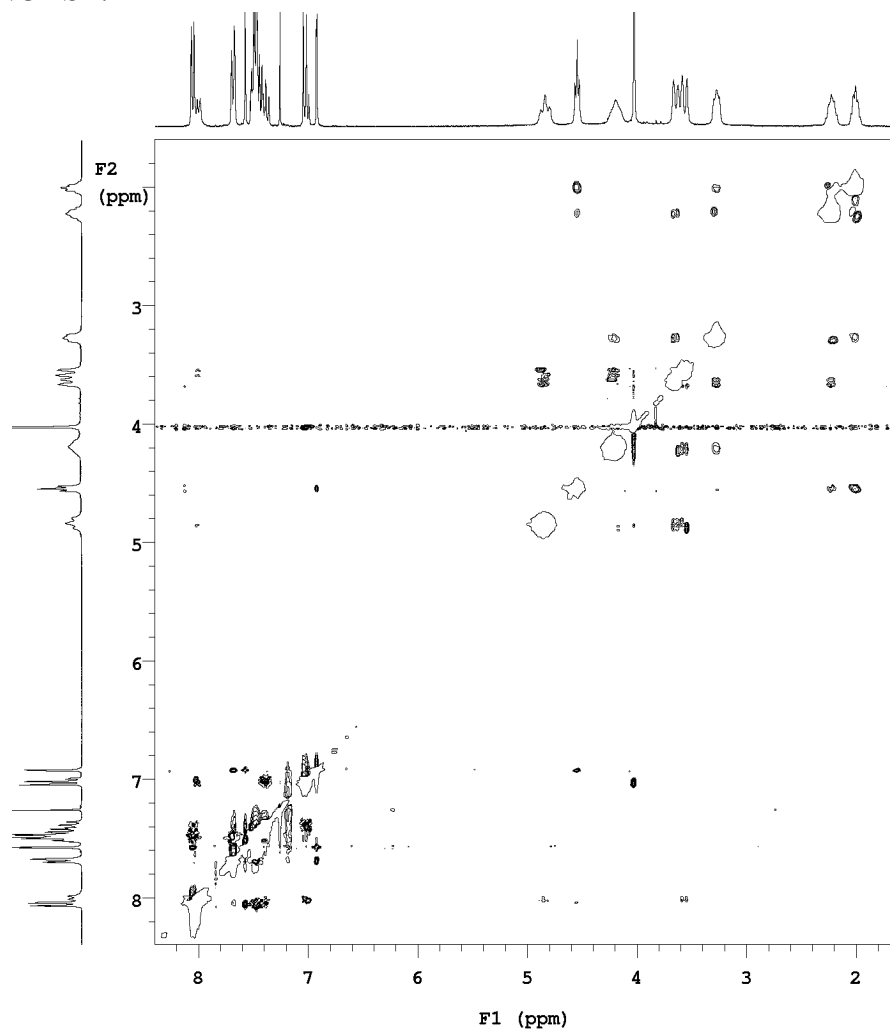
Tabela 4.12.2. Interpretacja widm heterokorelacyjnych HSQC i HMBC.

Atom węgla	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Sprzężenia HMBC
C2	163	H3, H1'
C3	107	H5
C4	138	H3, H5, Ph _B -H _o
C5	112	H3
C6	155	H5, Ph _A -H _o
C1'	65	H2'
C2'	26	H1'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

C3'	22	H1', H2'
C4'	57	
C2''	49	H4'
C3''	48	
C1'''	132	H6'''
C2'''	152	H4''', CH ₃
C3'''	122	H3''', H5'''
C4'''	131	H3''', H5'''
C5'''	113	H3''', H5'''
C6'''	123	H4'''
CH ₃	54	

Widmo NOESY:



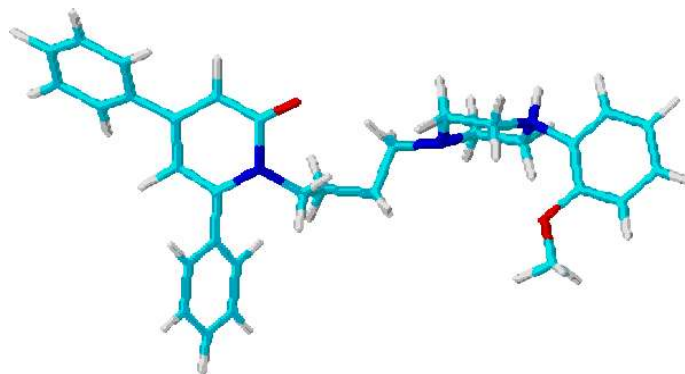
W niżej zamieszczonej tabeli zebrano zaobserwowane oddziaływania NOE, wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami obliczonymi według metody opisanej w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.12.3. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
Ph _B -H _o -H3	4,10	2,50
Ph _A -H _o -H1'	0,19	4,17
H1'-H4'	0,23	4,04
H1'-H2'	8,34	2,22
H1'-H3'	2,73	2,68
H2'-H4'	3,65	2,55
H3'-H4'	4,21	2,49
H3'-H2" _e	4,13	2,50
H4'-H2" _e	4,28	2,48
H4'-H2" _a	4,21	2,49
H3" _a -H6'''	0,69	3,37
H3" _e -H6'''	1,14	3,10
H5'''-CH ₃	11,06	2,12*

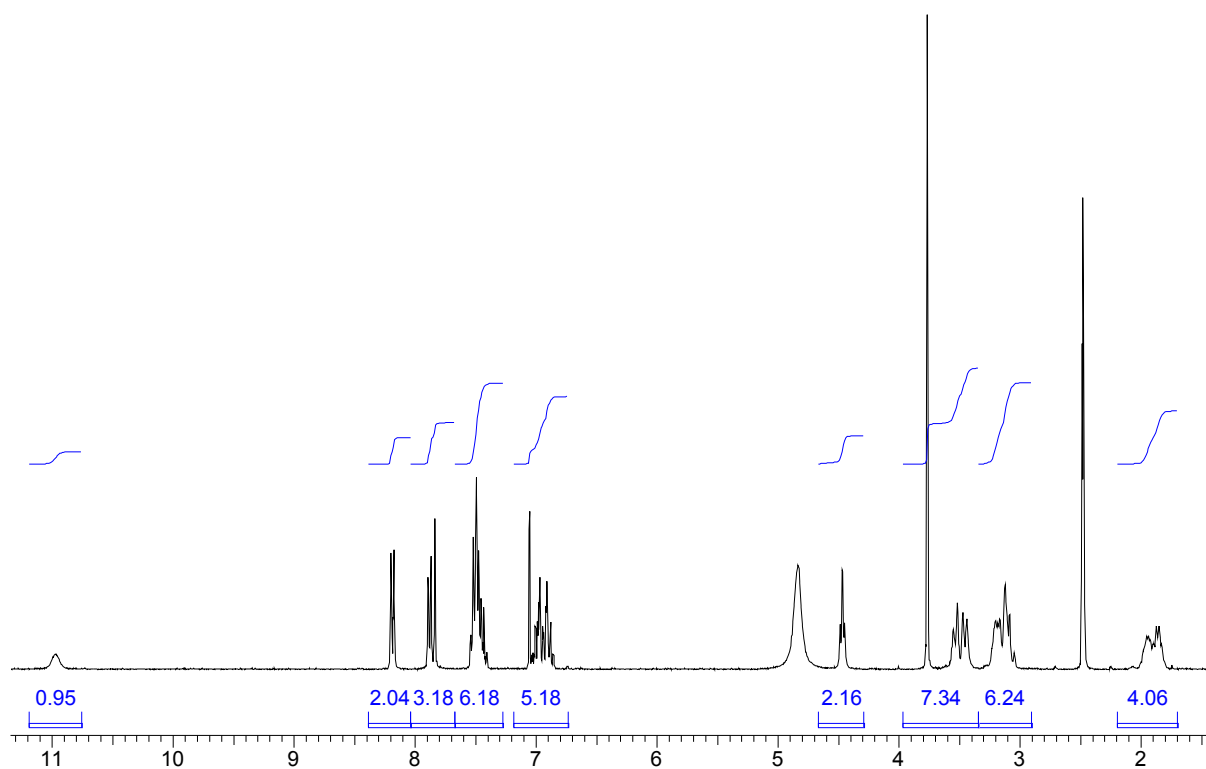
Rysunek poniżej przedstawia konformację związku **12** w roztworze CDCl₃ obliczoną na podstawie danych z widma NOESY.

Rys. 4.22.



Widma otrzymane w roztworze DMSO:

Widmo ^1H NMR:



Przypisanie sygnałów do odpowiednich grup protonów zebrano w tabeli 4.12.4 razem z interpretacją widma 2D COSY.

Widmo COSY:

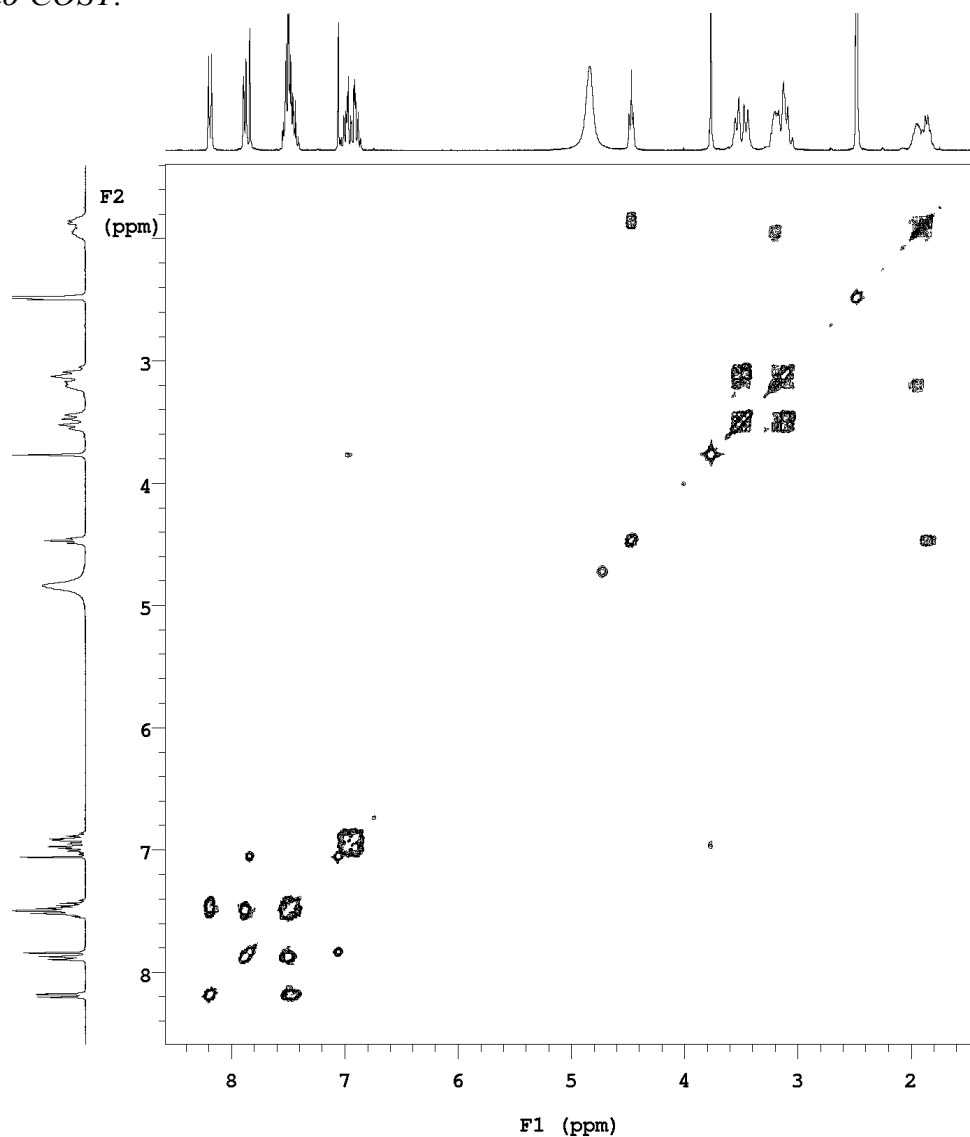


Tabela 4.12.4. Interpretacja widm ^1H NMR i 2D COSY.

Protony	Przesunięcie chemiczne [ppm]	Multipletowość	Ilość protonów	Stała sprzężenia [Hz]	Sprzężenia COSY
H3	7,06	dublet	1	1,3	H5
H5	7,84	dublet	1	1,3	H3
$\text{Ph}_\text{A}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$	8,19	multiplet	2	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$
$\text{Ph}_\text{B}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$	7,88	multiplet	2	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$
$\text{Ph}_\text{A}\text{Ph}_\text{B}$	7,39-7,55	multiplet	6	-	$\text{Ph}_\text{A}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$, $\text{Ph}_\text{B}\text{-}\underline{\text{H}}_\text{o}$
H1'	4,47	tryplet	2	6,1	H2'
H2'	1,78-1,91	multiplet	2	-	H1', H3'

4. Wyniki pomiarów i interpretacja widm.

H3'	1,91-2,02	multiplet	2	-	H2', H4'
H4'	3,15-3,25	multiplet	2	-	H3'
H2" _a , H3" _a	3,02-3,25	multiplet	4	-	H2" _e , H3" _e
H2" _e , H3" _e	3,40-3,58	multiplet	4	-	H2" _a , H3" _a
H3'''- H6'''	6,84-7,04	multiplet	4	-	CH ₃
CH ₃	3,77	singlet	3	-	H3'''-H6'''

a – pozycja aksjalna, e – pozycja ekwatorialna pierścienia piperazynowego, o – protony w pozycji *orto* fenylu

Z powodu niskiego stężenia próbki widm heterokorelacyjnych nie udało się zarejestrować z wystarczającą do jednoznacznej analizy jakością w rozsądnym czasie.

Widmo NOESY:

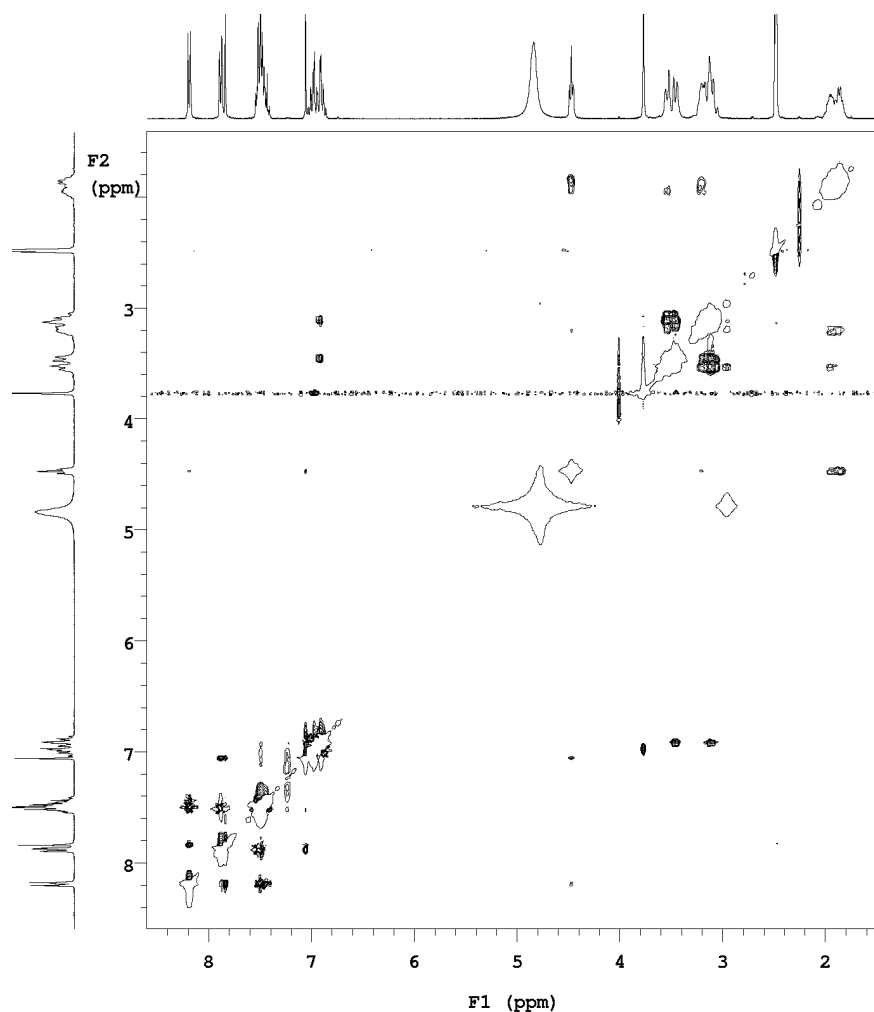


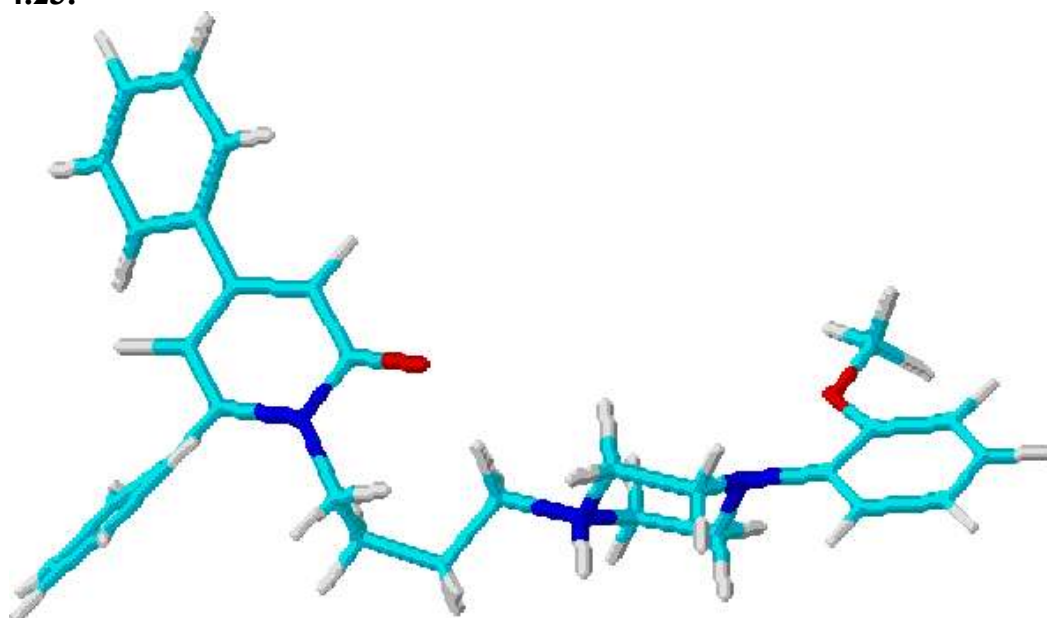
Tabela 4.12.5. przedstawia analizę widma NOESY, wraz ze średnimi odległościami pomiędzy oddziałującymi protonami obliczonymi metodą opisaną w części eksperymentalnej. Gwiazdką oznaczono odległość wzorcową.

Tabela 4.12.5. Interpretacja widma 2D NOESY.

Protony oddziałujące	Intensywność sygnału (objętość)	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]
Ph _B -H _o -H3	13,87	2,36
Ph _A -H _o -H5	27,35	2,10
Ph _A -H _o -H1'	1,59	3,38
H1'-H4'	1,03	3,63
H3'-H2" _e	7,22	2,63
H3" _a -H6'''	16,79	2,28
H3" _e -H6'''	13,98	2,35
H5'''-CH ₃	26,11	2,12*

Poniżej przedstawiono zoptymalizowaną strukturę związku **12**. Sposób obliczenia konformacji podano w części eksperymentalnej.

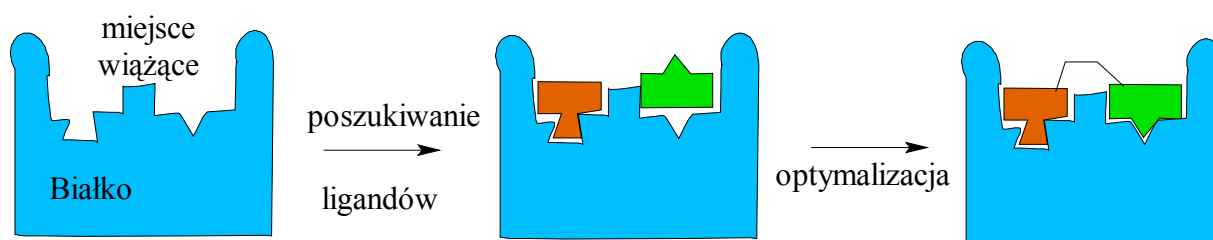
Rys. 4.23.



5. Dyskusja wyników i podsumowanie

Badania konformacyjne związków będących potencjalnymi ligandami receptorów mają bardzo duże znaczenie jako wstęp do optymalizacji ich struktury, aby uzyskać jak najlepsze parametry wiązania ligandu. Istotna jest zarówno konformacja samych grup farmakoforowych, zapewniająca ich właściwe dopasowanie do wnęki wiążącej receptora jak i konformacja fragmentów łącznikowych, odpowiedzialna za odpowiednią odległość pomiędzy resztami farmakoforowymi, jak i za ich ułożenie względem siebie w przestrzeni, a zatem zapewniająca możliwość jednoczesnego wiązania grup do wnęki wiążącej białka. Optymalizację związków prowadzi się poprzez nieznaczne modyfikacje ich struktury, które jednakże mogą mieć znaczący wpływ na konformacje układów. W rezultacie otrzymuje się serię związków, wśród których, wykonując badania konformacyjne i zestawiając je z wynikami badań farmakologicznych, znaleźć można elementy strukturalne zapewniające właściwe dopasowanie ligandu do miejsca wiążącego receptora, co w dalszym etapie badań można wykorzystać do celowej syntezy związków mających wysokie powinowactwo do receptora (Rys. 5.1) [54].

Rys. 5.1.

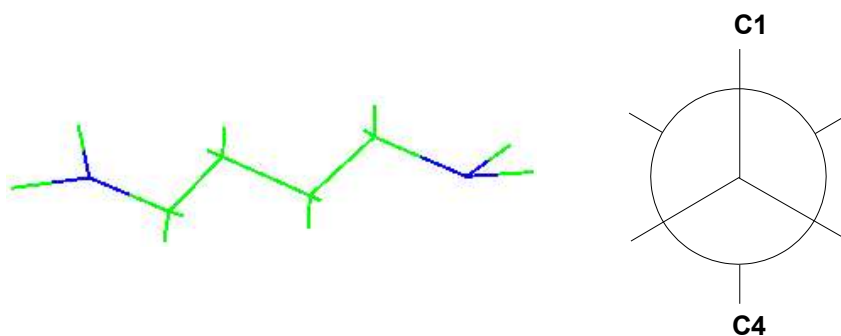


Dokonując analizy zebranego materiału eksperymentalnego stwierdzono, iż w opisie struktury przestrzennej badanych związków można wyróżnić trzy główne zagadnienia. Są to: konformacja łańcucha butanowego łączącego fragment amidowy związku z arylopiperazyną, wzajemne ułożenie pierścieni piperazynowego i fenyłowego w fragmencie arylopiperazynowym oraz w przypadku chlorowodorków problem protonowania atomu azotu piperazyny.

5.1. Konformacja łańcucha butanowego

Podstawowym wyróżnikiem sposobu ułożenia łańcucha butanowego w przestrzeni jest obecność i intensywność oddziaływania NOE pomiędzy protonami H1' a H4' lub jego brak. Obecność sygnału NOE pomiędzy wyżej wymienionymi, skrajnymi protonami łańcucha świadczy o obecności konformacji „zgiętej”, w której średnia odległość pomiędzy wymienionymi grupami protonów jest nie większa niż około 4 Å, odpowiadającej stanowi pośredniemu pomiędzy charakterystycznymi dla łańcucha butanowego konformacjami synklinalną i antyklinalną. Maksymalnie rozciągnięta konformacja łańcucha, zbliżona do konformacji antyperiplanarnej cząsteczki butanu (Rys. 5.2), nie pozwala na wystąpienie tego typu oddziaływań, ze względu na zbyt dużą odległość pomiędzy odpowiednimi atomami wodoru (4,4 Å). Dodatkowo obserwowane oddziaływania pomiędzy pozostałymi protonami tego łańcucha mają znaczenie pomocnicze w ustaleniu konformacji z większą dokładnością lecz same, będące oddziaływaniami krótszego zasięgu, nie pozwalają na ustalenie konformacji łańcucha.

Rys. 5.2.



Intensywność obserwowanych sygnałów pozwoliła na obliczenie średniej odległości pomiędzy oddziałującymi protonami a w dalszej kolejności na wyznaczenie konformacji badanego fragmentu. W tabeli 5.1 zestawiono obliczone, średnie odległości pomiędzy protonami H1' i H4', jak również wartości kąta torsyjnego zawartego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' i C3'-C4'. Podano również odległość pomiędzy skrajnymi atomami węgla łańcucha butanowego.

Tabela 5.1. Odległości pomiędzy protonami H1' i H4', atomami węgla C1' i C4' oraz wartości kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' w badanych związkach.

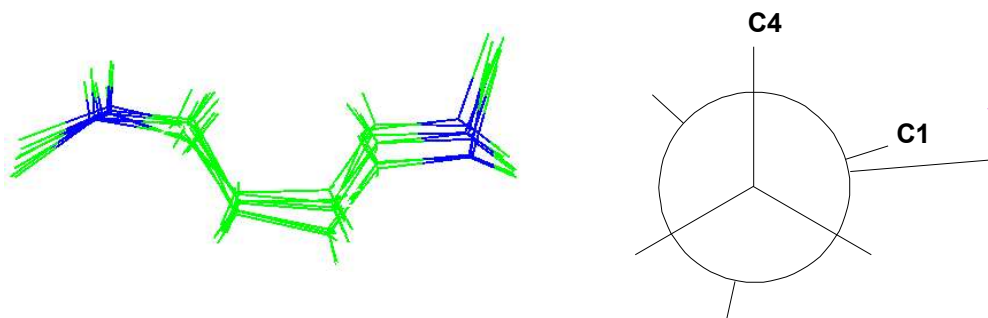
Związek	CDCl ₃			DMSO		
	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]	kąt torsyjny pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' [°]	Obliczona średnia odległość pomiędzy atomami C1' a C4' [Å]	Obliczona średnia odległość pomiędzy protonami [Å]	kąt torsyjny pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' [°]	Obliczona średnia odległość pomiędzy atomami C1' a C4' [Å]
1	3,37	76,8	3,08	3,65	88,5	3,21
2	3,08	70,5	3,03	3,59	82,9	3,25
3	3,21	73,6	3,06	3,04	70,2	3,02
4	3,02	68,9	3,01	3,78	98,6	3,34
5	3,16	73,6	3,04	3,16	68,5	3,04
6	-	-	-	2,43	52,8	2,89
7	2,96	58,5	2,99	-	-	-
8	-	-	-	3,90	76,1	3,18
9	3,81	92,3	3,30	3,52	76,5	3,11
10	3,23	70,4	3,05	-	-	-
11	-	-	-	4,04	100,5	3,39
12	4,04	100,4	3,38	3,63	77,1	3,16

We wszystkich badanych związkach występujących w formie wolnych zasad (związki **1 – 5**) wartość kąta torsyjnego zawartego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' mieści się w granicach 69-77°, co daje wartość średnią 72,3° (wyniki otrzymane na podstawie pomiarów w roztworze CDCl₃). W polarnym roztworze DMSO średnia wartość kąta torsyjnego wzrasta do 81,7°. Porównując tę wartość z wartościami kąta torsyjnego charakterystycznymi dla konformacji synklinalnej – 60° i antyklinalnej – 120° można przyjąć, iż łańcuch węglowy łączący fragmenty farmakoforowe badanych arylopipezyn występuje w formie „zgiętej”, zbliżonej do konformacji synklinalnej, praktycznie niezależnie od rodzaju rozpuszczalnika, w którym prowadzono pomiar. W

konsekwencji zmniejszeniu ulega odległość pomiędzy skrajnymi atomami węgla łańcucha butanowego (C1' i C4') z 3,85 Å – wielkości charakterystycznej dla maksymalnie rozciągniętej konformacji antyperiplanarnej do obserwowanych w roztworze CDCl₃ 3,04 Å i 3,17 Å w roztworze DMSO. Wzajemnemu zbliżeniu ulegają zatem grupy farmakoforowe, co może mieć znaczący wpływ na ich wiązanie i wzajemne ułożenie we wnęce wiążącej receptora. W celu zobrazowania przynależności omawianego fragmentu strukturalnego w związkach **1** – **5** do jednej rodziny konformacji na rysunku 5.3 pokazano nałożone na siebie fragmenty struktury przestrzennej cząsteczek związków **1** – **5** obliczone na bazie danych odczytanych z widm NOESY, zarejestrowanych w obu rozpuszczalnikach. Rysunek dla przejrzystości ograniczono jedynie do omawianego fragmentu struktury to jest do łańcucha butanowego i atomów azotu bezpośrednio z nim związanych. Obok przedstawiono projekcję Newmana względem wiązania C2'-C3'. Kolorem oznaczono zakres zmienności kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' w obliczonych z danych doświadczalnych konformacjach badanych związków.

Wśród dalszych związków będących chlorowodorkami odpowiednich pochodnych *orto*-metoksyfenylopiiperazyn występuje znacznie większa tendencja do przyjmowania formy bardziej rozciągniętej łańcucha. Wartość kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' wzrasta w pojedynczych przypadkach do ponad 100° co zbliża się już do wartości charakterystycznej dla konformacji antyklinalnej a odległość pomiędzy skrajnymi atomami węgla wzrasta do 3,4 Å. W grupie tej obserwuje się jednakże dość dużą zmienność konformacyjną z wartościami kąta torsyjnego zawartymi w granicach 53°-101°.

Rys. 5.3.



5.2. Konformacja układu piperazyna – pierścień fenyłowy. Protonowanie układu piperazyny

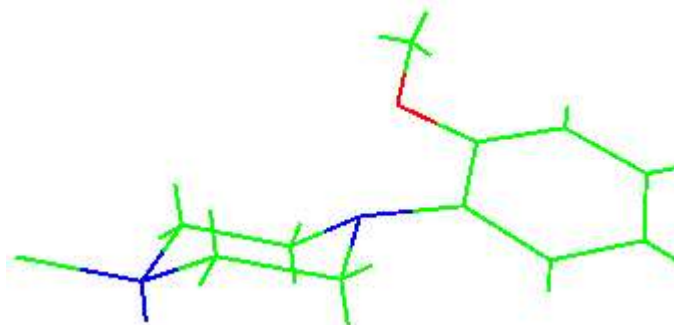
Badane wolne zasady (związki **1** – **5**) posiadają na widmie NOESY bardzo silny sygnał korelacyjny wiążący protony układu piperazynowego (H3'') oraz protony w pozycji *orto* związanego z nim układu aromatycznego, wskazując na ich bliskie sąsiedztwo w przestrzeni. Jednocześnie obliczenia optymalizacji geometrii dla najprostszego, modelowego układu N-fenylopiperazyny pokazują, iż oba pierścienie leżą praktycznie w jednej płaszczyźnie (kąt zawarty pomiędzy płaszczyzną pierścienia fenyłowego a płaszczyzną pierścienia piperazyny wynosi zaledwie $0,1^\circ$) a odległość pomiędzy wymienionymi protonami jest niewielka i wynosi $1,78 \text{ \AA}$. Wprowadzenie podstawników w pozycję *meta* pierścienia fenyłowego (związki **2**, **3**) nie zaburza w sposób zauważalny geometrii układu, natomiast pojawienie się podstawnika w pozycji *orto* (grupa metoksyłowa, związki **4**, **5**) powoduje jedynie nieznaczne nachylenie płaszczyzny pierścienia fenyłowego względem płaszczyzny układu piperazyny (wartość kąta nachylenia wzrasta do 10°). Wartości kąta zawartego pomiędzy płaszczyznami pierścienia fenyłowego i pierścienia piperazynowego wyznaczonego z obliczonych na podstawie danych NOE konformacji badanych związków zebrano w tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Wartości kąta zawartego pomiędzy płaszczyznami pierścienia fenyłowego i piperazynowego obliczone dla pomiarów przeprowadzonych w CDCl_3 i DMSO.

Związek	Kąt pomiędzy płaszczyznami [°]	
	CDCl_3	DMSO
1	4,0	5,0
2	3,3	2,3
3	8,2	5,0
4	8,9	10,0
5	8,4	9,2
6	8,9	20,1
7	59,1	38,1
8	-	37,9
9	56,5	38,5
10	58,6	31,8
11	61,5	31,0
12	54,4	31,7

Brak rozróżnienia w widmie ^1H NMR sygnałów pochodzących osobno od piperazynowych protonów w pozycjach aksjalnych i ekwatorialnych świadczy o łatwym zachodzeniu procesu inwersji konformacji krzesłowej, postulowanej dla tego układu heterocyklicznego. Konformację układu piperazyna – pierścień aromatyczny pokazano na poniższym rysunku

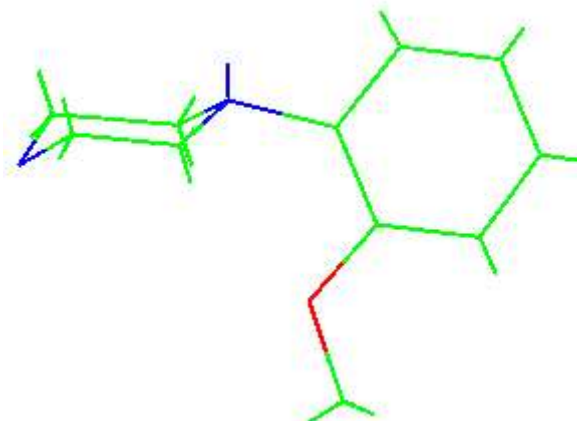
Rys. 5.4.



Dość podobną sytuację zaobserwowano podczas analizy widm soli arylopiperazyn (**6** – **12**) w roztworze DMSO. W dalszym ciągu obserwowany jest sygnał korelacyjny pomiędzy protonami *orto* pierścienia fenyłowego oraz protonami w pozycji H3" układu piperazyny, dowodzący ich wzajemnego bliskiego sąsiedztwa w przestrzeni, jednak jest słabszy niż w przypadku wolnych zasad, a co za tym idzie związki te w roztworze DMSO przyjmują, w omawianym fragmencie struktury, konformację podobną do tej przyjmowanej przez wolne zasady. Osłabienie sygnału NOE świadczy o zwiększeniu odległości pomiędzy protonami układu piperazyny i protonami pierścienia aromatycznego. Osiągane jest to poprzez skrócenie płaszczyzny pierścienia fenyłowego względem płaszczyzny układu piperazyny. Kąt pomiędzy tymi płaszczyznami wzrasta do wartości 32°. Protonowanie atomu azotu piperazyny powoduje zahamowanie procesu inwersji konformacji krzesłowej układu heterocyklicznego, objawiający się zróżnicowaniem na widmie ¹H NMR sygnałów pochodzących od protonów w pozycjach aksjalnych i ekwatorialnych. Założyć przy tym można iż proton ulega przyłączeniu do atomu azotu związanego z łańcuchem alifatycznym, ponieważ przesunięcie chemiczne sygnałów protonów aromatycznych nie ulega praktycznie żadnej zmianie w porównaniu do widm cząsteczek wolnych zasad.

Analiza widm związków **6** – **12** zarejestrowanych w CDCl₃ wykazała zanik, bądź bardzo znacznie osłabienie efektu NOE wiążącego protony *orto* pierścienia aromatycznego z odpowiednimi protonami piperazyny. Taki obraz widma świadczy o znacznym wzroście odległości pomiędzy wymienionymi protonami a zatem o znacznej zmianie we wzajemnym ułożeniu pierścieni. Możliwy do osiągnięcia jest on jedynie przy założeniu, iż pierścień fenyłowy i pierścień układu piperazyny leżą w płaszczyznach przecinających się pod znacznie większym kątem. Dane zebrane w tabeli 5.2 pokazują, iż wartość tego kąta wzrosła do blisko 60°, co jest bardzo znaczącą zmianą w stosunku do konformacji wolnych zasad. Takie wzajemne ułożenie pierścieni fenyłowego i układu piperazyny pokazano na rysunku 5.5.

Rys. 5.5.



Ułożenie grupy metoksyłowej w kierunku protonów aksjalnych piperazyny zostało podyktowane pojawianiem się na widmach NOESY sygnału korelującego te protony z protonami metylowymi ugrupowania metoksyłowego, co jest możliwe wyłącznie w takim wzajemnym ustawieniu obu pierścieni.

Widma ¹H NMR chlorowodorków *orto*-metoksyfenylopiperazyn w CDCl₃ wykazują znacząco odbiegający od pozostałych badanych układów obraz sygnałów protonów aromatycznych pochodzących od pierścienia *orto*-metoksyfenylowego. Sygnał protonów w pozycji 6 tego pierścienia pojawia się przy anormalnie niskim polu w zakresie δ 8,00 – 8,25, podczas gdy we wszystkich pozostałych przypadkach (widma wolnych zasad oraz chlorowodorków w roztworze DMSO) znajduje się w zakresie δ 6,80 – 7,10. Tak znaczny efekt odsłaniania protonów w pozycji *orto* spowodowany jest z reguły przez pojawienie się silnie elektronoakceptorowego podstawnika, co w przypadku badanych związków może świadczyć o protonowaniu atomu azotu połączonego bezpośrednio z pierścieniem aromatycznym. Dalsze badania tego zjawiska wykazały, iż aby efekt ten pojawił się wymagana jest obecność dużego podstawnika przy drugim atomie azotu, bowiem niepodstawiona N-*o*-metoksyfenylopiperazyna go nie wykazuje (dane eksperymentalne nie zamieszczone w niniejszej pracy).

5.3. Wnioski końcowe

Podsumowując przedstawione analizy badanych długołańcuchowych arylopiperazyn stwierdzono:

- Badane związki występujące w formie wolnych zasad występują w konformacji zgiętej łańcucha butanowego będącej stanem pośrednim pomiędzy konformacją synklinalną i antyklinalną, ze średnią wartością kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' równą 72° , natomiast pierścienie piperazynowy i aromatyczny leżą praktycznie w jednej płaszczyźnie bądź są skrócone względem siebie pod niewielkim kątem (do 10°).
- Chlorowodorki N-*o*-metoksyfenylopiperazyn w roztworze DMSO wykazują tendencję do tworzenia mniej „zwartej” struktury, przejawiającej się wzrostem wartości kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4', natomiast wzajemne ułożenie pierścienia piperazynowego i fenyłowego jest dość podobne do obserwowanego w przypadku wolnych zasad, jednakże zwiększa się kąt pomiędzy płaszczyznami pierścieni fenyłowego i układu piperazyny do wartości 32° . Protonowanie zachodzi przy atomie azotu podstawionym układem alifatycznym.
- Łańcuch butanowy chlorowodorków N-*o*-metoksyfenylopiperazyn w roztworze CDCl₃ przyjmuje częściej niż w roztworze DMSO konformację zbliżoną do konformacji antyklinalnej (średnia wartość kąta torsyjnego pomiędzy wiązaniami C1'-C2' a C3'-C4' wynosi 80°), natomiast płaszczyzna pierścienia fenyłowego jest silnie skrócona względem płaszczyzny układu piperazynowego (kąt zawarty pomiędzy płaszczyznami wzrasta do 60°). Protonowanie układu piperazyny zachodzi prawdopodobnie przy atomie azotu podstawionym układem aromatycznym.

6. Bibliografia

1. J. Jeener, *Ampere International Summer School*, Basko Polje, Jugosławia (1971).
2. W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem Phys.*, **64** (1976) 2229.
3. H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **27** (1988) 490.
4. G. Bodenhausen, D. Ruben, *J. Chem. Phys. Lett.*, **69** (1980) 185.
5. Pod red. O. Zerbe, *BioNMR in Drug Research*, Wiley-VCH, Weinheim (2003).
6. A. Bax, M. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108** (1986) 2093.
7. J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, **71** (1979) 4546.
8. J. W. Keepers, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **104** (1982) 929.
9. G. B. Young, T. L. James, *J. Am. Chem. Soc.*, **106** (1984) 7986.
10. S. Forsén, J. Kördel, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14** (1996) 233.
11. K. Wütrich, M. Billeter, W. Braun, *J. Mol. Biol.*, **169** (1983) 949.
12. M. P. Williamson, T. F. Havel, K. Wütrich, *J. Mol. Biol.*, **182** (1985) 295.
13. D. F. Mierke, M. Reggelin, *J. Org. Chem.*, **57** (1992) 6365.
14. M. Reggelin, H. Hoffmann, K. Köck, D. F. Mierke, *J. Am. Chem. Soc.*, **114** (1992) 3272.
15. H. Won, K. D. Olson, R. S. Wolfe, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 2178.
16. K. D. Olson, H. Won, R. S. Wolfe, D. R. Hare, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 5884.
17. H. Kessler, C. Griesinger, A. Müller, J. Lautz, W. F. van Gunsteren, J. H. C. Berendsen, *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (1988) 3393.
18. U. Holzgrabe, I. Wawer, B. Diehl, *NMR Spectroscopy in Drug Development and Analysis*, Wiley-VCH, Weinheim (1999).
19. F. G. Lehnhardt, G. Röhn, R. I. Ernestus, M. Grüne, M. Hoehn, *NMR Biomed.*, **14** (2001) 307.
20. M. Kliszkiewicz-Janus, S. Baczyński, *NMR Biomed.*, **8** (1995) 127.
21. T. Diercks, M. Coles, H. Kessler, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **5** (2001) 285.

22. D. F. Wyss, M. A. McCoy, M. M. Senior, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, **5** (2002) 630.
23. M. van Dongen, J. Wiegelt, J. Uppenberg, J. Schultz, M. Wikström, *Drug Disc. Today*, **7** (2002) 471.
24. G. C. K. Roberts, *Drug Disc. Today*, **5** (2000) 230.
25. R. P. Hicks, *Curr. Med. Chem.*, **8** (2001) 627.
26. L. Fielding, *Tetrahedron*, **56** (2000) 6151.
27. P. J. Hajduk, D. J. Augeri, J. Mack, R. Mendoza, J. Yang, S. F. Betz, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 7898.
28. M. A. McCoy, D. F. Wyss, *J. Biomol. NMR*, **18** (2000) 189.
29. A. Medek, P. J. Hajduk, J. Mack, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 1241.
30. M. Pellecchia, D. Meininger, Q. Dong, E. Chang, R. Jack, D. S. Sem, *J. Biomol. NMR*, **22** (2002) 165.
31. P. J. Hajduk, E. T. Olejniczak, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 12257.
32. A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **120** (1998) 10258.
33. A. Chen, M. J. Shapiro, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 414.
34. M. Mayer, B. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **123** (2001) 6108.
35. C. Dalvit, P. Pevarello, M. Tatò, M. Veronesi, A. Vulpetti, M. Sundström, *J. Biomol. NMR*, **18** (2000) 65.
36. C. Dalvit, G. Fogliatto, A. Stewart, M. Veronesi, B. Stockman, *J. Biomol. NMR*, **21** (2001) 349.
37. W. Jahnke, S. Rüdisser, M. Zurini, *J. Am. Chem. Soc.*, **123** (2001) 3149.
38. P. J. Hajduk, G. Sheppard, D. G. Nettesheim, E. T. Olejniczak, S. B. Shuker, R. P. Meadows, D. H. Steinman, G. M. Carrera Jr, P. A. Marcotte, J. Severin, K. Walter, H. Smith, E. Gubbins, R. Simmer, T. F. Holzman, D. W. Morgan, S. K. Davidsen, J. B. Summers, S. W. Fesik, *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 5818.
39. A. Ross, H. Senn, *Drug Disc. Today*, **6** (2001) 583.
40. D. Li, E. F. DeRose, R. E. London, *J. Biomol. NMR*, **15** (1999) 71.

41. R. E. London, *J. Magn. Reson.*, **141** (1999) 301.
42. P. Güntert, *Prog. NMR Spectrosc.*, **43** (2003) 105.
43. M. Nilges, *J. Mol. Biol.*, **245** (1995) 645.
44. M. Nilges, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6** (1996) 617.
45. M. Nilges, S. O'Donoghue, *Prog. NMR Spectrosc.*, **32** (1998) 107.
46. R. A. Glennon, M. Dukat, R. B. Westkaemper, w *Psychopharmacology The Fourth Generation of Progress*, pod red. F. E. Bloom, D. J. Kupfer, Raven Press: New York (1999) CD-ROM edition.
47. J. Karolak-Wojciechowska, A. Fruziński, A. J. Bojarski, M. H. Paluchowska, M. J. Mokrosz, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **331** (1998) 299.
48. M. J. Mokrosz, P. Kowalski, T. Kowalska, Z. Majka, B. Duszynska, A. J. Bojarski, A. Fruziński, J. Karolak-Wojciechowska, A. Wesolowska, A. Kłodzińska, E. Tatarczyńska, E. Chojnacka-Wójcik, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **332** (1999) 373.
49. J. Karolak-Wojciechowska, A. Fruziński, M.J. Mokrosz, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, **542** (2001) 47.
50. M. Norman, D. J. Minick, G. C. Rigdon, *J. Med. Chem.*, **39** (1996) 149.
51. J. Igarashi, T. Nishimura, M. Sunagawa, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **7** (1997) 1659.
52. M. L. Lopez-Rodriguez, M. J. Morcillo, Tandu K. Rovat, E. Fernandez, B. Vicente, A. M. Sanz, M. Hernandez, L. Orensanz, *J. Med.Chem.*, **42** (1999) 36.
53. S. Guccione, A. M. Doweyko, H. Chen, G. Uccello Barretta, F. Balzano, *J. Comput.-Aided Mol. Design.*, **14** (2000) 647.
54. G. L. Patrick, *Chemia medyczna*, Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa (2003)