Katalysoidut Passerini-reaktiot luonnonainesynteesissä

Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Kemian laitos
Orgaaninen rakenne- ja synteesikemia
27.11.2020
Mikael Rintamaa

Tiivistelmä

Tämä tutkielma on jaettu kahteen osaan, joista ensimmäisessä kirjallisessa osassa tarkastellaan kemiallista reaktiota, joka tunnetaan Passerini-reaktiona. Tutkielmassa käydään läpi reaktion komponenttien, eli isonitriilin, karbonyylin ja Brønsted-Lowry- tai Lewis-happokomponentin vaihtelumahdollisuuksia, sekä erilaisia katalyyttisiä ja enantio- ja diastereoselektiivisiä variantteja. Lisäksi pohditaan Passerini-reaktion ja sen muunnelmien mekanismeja, toteutuksia ja liuottimen vaikutusta. Erityistä huomiota kiinnitetään katalysoituihin versioihin ja niiden kehitysmahdollisuuksiin. Kirjallisuuskatsauksessa tarkastellaan myös luonnonainesynteesejä, joissa katalysoituja Passerini-reaktioita on hyödynnetty.

Tutkielman toinen osio koostuu laboratoriossa tehdyn kokeellisen osuuden raportoinnista. Kokeellisen osuuden ensisijainen tarkoitus oli toteuttaa totaalisynteesit luonnonaineisiin nostosiini A ja nostosiini B, käyttäen apuna uuden kiraalisen hiilen muodostavaa Passerini-reaktiota. Kyseisiä suunnitelmia ja toteutuksia on osittain tehty Saara Riuttamäen opinnäytetyössä, joka toimii oman tutkimukseni lähtökohtana. Synteesipolut suunniteltiin siten, että viimeisten vaiheiden tulosten annettiin ratkaista saadaanko tuotteeksi joko nostosiini A tai nostosiini B. Toissijainen tarkoitus työssä oli kehittää stereoselektiivinen variantti Passerini-reaktioon. Kirjallisuuskatsauksen perusteella kehitettiin uusia boorihaposta johdettuja kiraalisia borinihappoja stereoselektiiviseen Passerini-reaktioon. Näiden Lewis-happojen synteesit jätettiin kuitenkin kehitysasteille, sillä varmuutta niiden synteesien onnistumisista ei saatu. Totaalisynteesipolun viimeisiä vaiheita nostosiini B:hen ei ehditty saattaa loppuun kokonaisuudessaan, mutta reaktiosarjan viimeisessä vaiheessa saatiin kuitenkin epäpuhdasta nostosiini B:tä tuotteena. Nostosiini A:n synteesi jäi suunnitteluasteelle.

Esipuhe

Tutkielmani kokeellinen osa suoritettiin Jyväskylän yliopiston orgaanisen kemian laboratoriossa ajalla kesäkuu 2019 – tammikuu 2020. Kirjallinen osa kirjoitettiin Kirkkonummella ajalla helmikuu 2020 – marraskuu 2020. Kirjallisuuden haussa käytettiin Google scholar -palvelua ja Reaxys-tietokantaa.

Työni ohjaajina toimivat prof. Petri Pihko ja FaT. Teppo Leino. Haluan kiittää heitä tärkeistä neuvoista, kannustamisesta ja siitä, että sain vapauden harjoittaa kemiaa omien suunnitelmien ja toteutuksien avulla. Kiitän Saara Riuttamäkeä, jonka aikaisempi työ nostosiinien A ja B parissa on ollut suuri apu tämän projektin toteuttamisessa. Lisäksi kiitän FT, dos. Juhani Huuskosta tutkielmani arvioinnista ja laboratorioteknikkoa Johanna Hiidenheimoa massaspektrien mittaamisesta.

Lopuksi kiitän perhettäni ja läheisiäni, jotka ovat olleet tukenani opintojeni aikana.

Sisällysluettelo

Tiivistelmä i
Esipuhe ii
Käytetyt lyhenteet v
KIRJALLINEN OSA 1
1. Johdanto 2
2. Passerini-reaktio 4
2.1 Mekanismi 4
2.2 Passerini-reaktion lähtöaineet 7
2.2.1 Isonitriilikomponentti 7
2.2.2 Karbonyylijohdannainen komponenttina 9
2.2.3 Happokomponentti 9
2.3 Liuottimen merkitys 10
2.4 Brønsted-Lowry-happo Passerini-reaktiossa 11
2.5 Lewis-happo Passerini-reaktiossa 16
2.5.1 Katalysoimaton Passerini-reaktio 16
2.5.2 Katalysoitu Passerini-reaktio 18
2.6 Stereoselektiivinen Passerini-reaktio – lähtöaineiden vaikutus 23
2.6.1 Isonitriilikomponentin ohjaama stereoselektiivisyys 24
2.6.2 Karbonyylijohdannaisen ohjaama stereoselektiivisyys 24
2.6.3 Brønsted-Lowry-happo ohjaavana tekijänä 29
2.6.4 Lewis-happo ohjaavana tekijänä 30
3. Yhteenveto katalysoimattomista ja katalysoiduista reaktioista 38
4. Katalysoitu Passerini-reaktio luonnonainesynteesissä 39
5. Yhteenveto 45
KOKEELLINEN OSA 49
1. Työn tarkoitus 50
2. Tulokset 53
2.1 Fragmentti L-ILE 53
2.2 Fragmentti AHA 53
2.3 Fragmentti L-Arg 54
2.4 Fragmenttien AHA-L-ILE -kytkentä 54
2.5 Passerini-reaktio boorihapolla - Optimointi 56
2.6 Stereoselektiivinen Passerini-reaktio 57

2.6.1 Teoria ... 57
2.6.2 Käytäntö ... 60
2.7 Fragmenttien AHA-L-Ile kytkentä ... 61
2.8 AHA-L-Ile -fragmentin hydrolyysi ... 62
2.9 AHA-L-Ile ja L-Arg -fragmenttien kytkentä ... 63
2.10 AHA- L-Ile- L-Argo ... 64
2.11 Nostosiini B ... 64
3. Yhteenveto ... 65
4. Synteesiohjeet ... 68
4.1 L-Isoleusiini-metyyliesteri-hydrokloridi (223) ... 68
4.2 *N*-formamidi-L-Isoleusiini-metyyliesteri (225) ... 69
4.3 L-Isoleusiini-isonitriili-metyyliesteri (220) ... 70
4.4 Metyyli 3-(4-hydroksifenyyli)propanoaatti (227) ... 70
4.5 Metyyli 3-(4-((*t*-butyylidimetyylisilyylieetteri)fenyylipropanoaatti (228) ... 71
4.6 3-(4-((*t*-butyylidimetyylisilyylieetteri)fenyylipropanaali (219) ... 72
4.7 Metyyli $N\omega$-nitro- L-arginaatti hydrokloridi (221) ... 72
4.8 Metyyli *N*-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyli)butanoyyli)glysinaatti (232) ... 73
4.9 Boorihapon esteröintireaktiokoe – reaktioiden esimerkkitoteutus ... 74
4.10 TBDMS-AHA- L-Ile-metyyliesteri (*R*) (266), TBDMS-AHA- L-Ile-metyyliesteri (*S*) (267) ... 74
4.11 AHA- L-Ile-karboksyylihappo (*alempi*-diastereomeeri) (269) ... 76
4.12 AHA- L-Ile- L-Arg-metyyliesteri (270) ... 77
4.13 AHA- L-Ile- L-Argo (280) ... 78
4.14 Nostosiini B (281) ... 79
5. Kirjallisuusluettelo ... 80
6. Liitteet ... 88

Käytetyt lyhenteet

4-tol	4-tolyyli
AcOH	etikkahappo
AHA	alfa-hydroksihappo
Ar	aryyli, substituoitu bentseenirengas
Binol	1,1'-Bi-2-naftoli
Bn	bentsyyli
Boc	*t*-Butyylioksikarbonyyli
Box	(*S,S*)-bis(oksatsoliini)
bs	leveä singletti
Bz	bentsoyyli
Cbz	karboksibentsyyli
CD_3OD	metanoli-*d*4
$CDCl_3$	kloroformi-*d*3
d	dubletti
DFT	tiheysfunktionaaliteoria (laskennallinen kemia)
DCE	dikloorietaani
DCM	dikloorimetaani
DCU	disykloheksyyliurea
dd	dubletin dubletti
DEPBT	3-(dietoksifosforyylioksi)-1,2,3-bentsotriatsin-4(3*H*)-oni
DIPEA	di-isopropyylietyyliamiini
DMF	dimetyyliformamidi
DMSO	dimetyylisulfoksidi
dr	diastereomeerien suhde
EDC·HCl	1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi hydrokloridi
ee	enantiomeerinen ylimäärä
er	enantiomeerien suhde
ESI	elektronisuihkuionisaatio
et. al.	ja muut
Et_2O	dietyylieetteri
EtOAc	etyyliasetaatti
EtOH	etanoli
h	tunti

H_8-binol	5,5',6,6',7,7',8,8'-oktahydro-[1,1'-binaftaleeni]-2,2'-dioli
HOBt	1-hydroksibentsotriatsoli
HRMS	korkean resoluution massaspektrometria (high resolution mass spectrometry)
i-Pr	isopropyyli
i-PrOH	isopropanoli
L-arga	L-arginaali
L-argo	L-arginoli
LDA	litium di-isopropyyliamidi
L-Ile	L-isoleusiini
m	multipletti
MeOH	metanoli
Mep	*N*-metyylipipekoliinihappo
min	minuutti
MOM	metoksimetyyli
MS 4 Å	molekyyliseulat 4 Å
MVP	Meerwein-Ponndorf-Verley-reaktio
n-Buli	*n*-butyylilitium
NEM	*N*-etyylimorfoliini
NMM	*N*-metyylimorfoliini
NMR	ydinmagneettinen resonanssispektroskopia
n-Pr	*n*-propyyli
Nu	nukleofiili
Ph	fenyyli
*p*NP	4-nitrofenoli
R_1, R_2, R_3	Orgaaninen sivuketju
rt	huoneenlämpö
s	singletti
Salen	*N,N′*-etyleenibis(salisyyli-imiini)
Spinol	1,1′-spirobiindaani-7,7′-dioli
t	tripletti
TBDPS	*t*-butyylidifenyylisilyyli
TBS	*t*-butyylidimetyylisilyyli
t-bu	*t*-butyyli
Tf	triflaatti
TEA	trietyyliamiini

TES	trietyylisilyyli
TFA	trifluorietikkahappo
THF	tetrahydrofuraani
TLC	ohutlevykromatografia
TMSCl	trimetyylisilyylikloridi
$TMSN_3$	trimetyylisilyyliatsidi
t-Oct	*t*-oktyyli
Tup	tubufenyylialaniini
Tut	tubutyrosiini
Tuv	tubuvaliini

KIRJALLINEN OSA

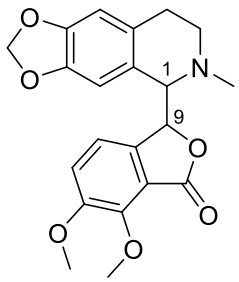
1. Johdanto

Luonnonaineiksi voidaan luokitella mikä tahansa kemiallinen aine tai yhdistelmä aineita, jotka ovat muodostuneet jonkin elävän organismin kautta. Tällainen organismi, kuten puu tai levä, muodostaa kyseisiä tuotteita biosynteesien eli metaboliittien myötä. Luokittelultaan metaboliitit voidaan määrittää primäärisiksi eli suoraan eliön kasvuun, kehitykseen tai lisääntymiseen liittyviksi, tai sekundäärisiksi, jotka eivät suoranaisesti vaikuta näihin edellä listattuihin. Luonnontuotteisiin kohdistuva orgaaninen rakenne- ja synteesikemia tutkii, tekee ja kehittää luonnontuotteita laboratorio-olosuhteissa. Jokin luonnontuote on usein mahdollista syntetisoida täysin käyttäen laboratorio-oloja ja -reagensseja, jolloin saatua luonnontuotetta kutsutaan täyssynteettiseksi. Sen sijaan yhdisteitä, jotka ovat syntetisoitu muokaten jotain valmista luonnosta eristettyä tuotetta, kutsutaan semisynteettiseksi.[1]

Luonnontuotteet ovat tärkeitä ihmiskunnalle. Esimerkiksi paperin raaka-aineena käytetään puussa muodostuvaa selluloosaa ja antibioottina bioaktiivista penisilliiniä. Luonnonaineiden syntetisointi laboratoriossa on olennaista, sillä usein metaboliittien määrä on pieni ja ne ovat työläitä erotella. Laboratoriossa tehty totaalisynteesi luonnontuotteeseen mahdollistaa synteesien toteutuksen suuremmalla skaalalla.

Kemiallisten reaktioiden avulla voidaan yksityiskohtaisesti muokata molekyylin kemiallista rakennetta. Funktionaalisia ryhmiä voidaan esimerkiksi hapettaa, pelkistää, kytkeä, substituoida, eliminoida ja toisiinnuttaa.[2] Lineaarinen synteesi on suora reaktiosarja, jossa jokaista alku- ja lopputuotteen välistä välivaihetta edustaa jokin reaktio. Konvergentti synteesi on samankaltainen, mutta siinä kaksi tai useampia fragmentteja liitetään toisiinsa reaktiosarjan eri vaiheissa, jolloin synteesiketju koostuu useista haaroista.[3,4] Seuraavissa kappaleissa tarkastellaan yhden kemiallisen reaktion käyttöä luonnonainesynteesissä. Reaktio tunnetaan sen löytäjän, Mario Passerinin, mukaan nimettynä Passerini-reaktiona.

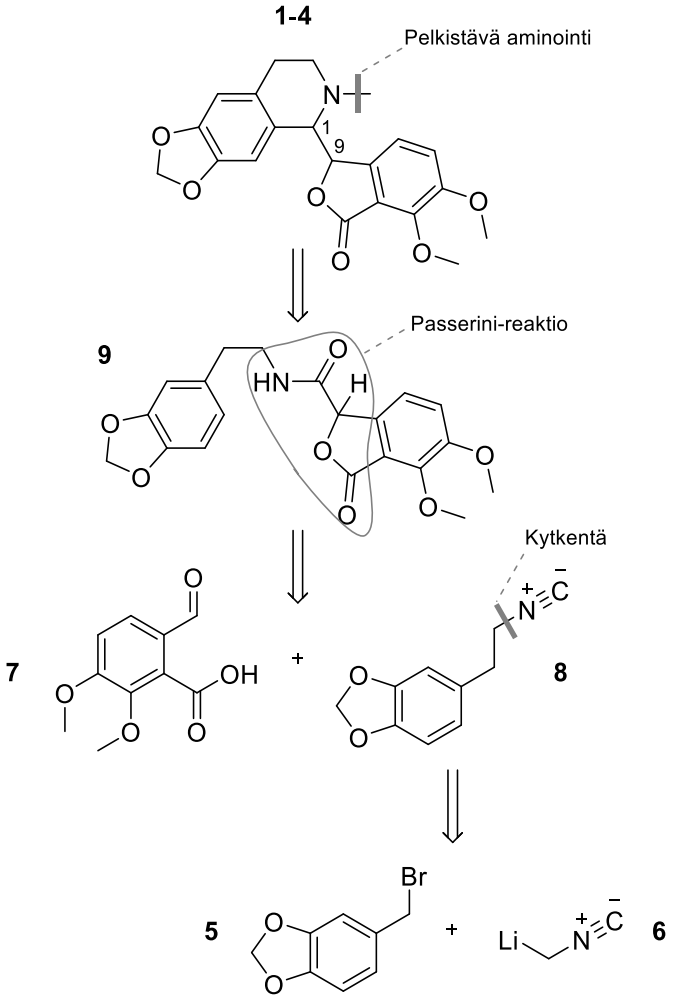
Hydrastiinit (**1-4**) ovat alkaloideja, joita on eristetty kasvilajeista, kuten *Hydrastis canadensis*[5] ja *Corydalis stricta*[6]. Niille ominaista on farmakologinen vaikutus, joten kasvin uutetta on käytetty esimerkiksi ummetuksen hoidossa.[5] Hydrastiineissa on kaksi stereogeenistä keskusta, hiilet 1 ja 9 (kaavio 1). Tutkimuksissa on havaittu, että näiden stereokemialla on vaikutusta farmakologisiin ominaisuuksiin.[6]



1 (+)-α-hydrastiini (1*S*, 9*S*)
2 (-)-β-hydrastiini (1*R*, 9*R*)
3 (+)-α-hydrastiini (1*R*, 9*S*)
4 (-)-β-hydrastiini (1*S*, 9*R*)

Kaavio 1. Hydrastiinit (**1**-**4**) ovat alkaloideja.[7]

Falckin tiimi on toteuttanut hydrastiinien totaalisynteesit. Synteesit olivat lyhyitä ja osittain konvergentteja. Niissä hyödynnettiin intramolekulaarista klassista Passerini-reaktiota (kaavio 2). Kyseinen reaktio tuotti raseemista tuotetta (tuote **9**).[7]



Kaavio 2. Retrosynteettinen analyysi hydrastiinien totaalisynteesistä.[7]

Vaikka Passerini-reaktio on käytännöllinen multikomponenttireaktio, sen kehitys on jäänyt jälkeen modernin synteettisen orgaanisen kemian kehityksestä.[8] Reaktiossa huomattavia

kehitysmahdollisuuksia ovat katalyyttisten komponenttien hyödyntäminen sekä stereoselektiiviset variaatiot. Passerini-reaktion kehittäminen ei ole helppoa, sillä jokaisen yksittäisen komponentin kemiallista ympäristöä on mahdollista muuntaa ja siksi mahdollisten kombinaatioiden määrä on korkea.

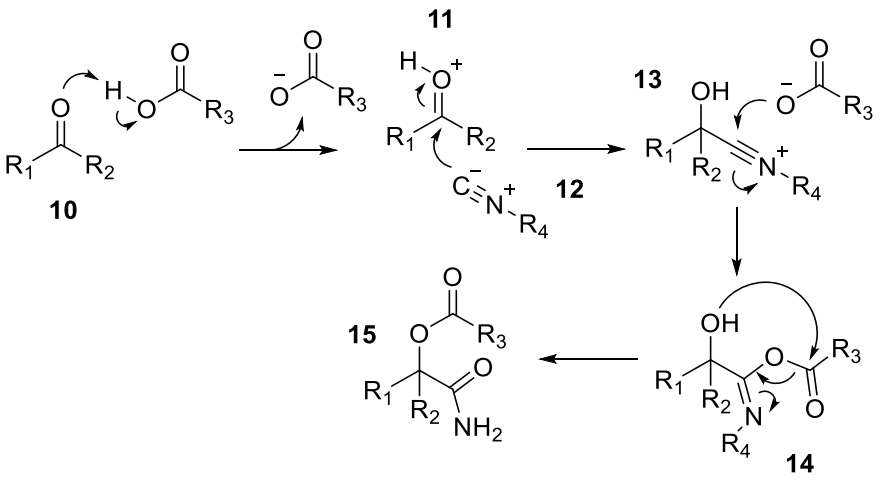
Seuraavassa luvussa tarkastellaan Passerini-reaktiota. Tarkastelussa on ensin kyseisen reaktion komponentit, isonitriili, karbonyyli ja Brønsted-Lowry- tai Lewis-happo. Näiden komponenttien kemiallisia ominaisuuksia sekä synteesimenetelmiä tutkitaan. Lisäksi tarkastellaan liuottimen vaikutusta Passerini-reaktioon sekä komponenttien rakenne-aktiivisuussuhteita, eli komponentin rakenteen muutamisen vaikutusta Passerini-reaktion kulkuun. Huomiota tarkastelussa kiinnitetään katalysoituihin variaatioihin, kuten myös niillä tehtyihin stereoselektiivisiin reaktioihin. Kirjallisen osan viimeisessä luvussa tarkastellaan luonnonaineiden synteesejä, joissa on hyödynnetty katalysoituja Passerini-reaktioita. Tässä tutkielmassa nimitystä Passerini-reaktio käytetään niin klassisesta Passerini-reaktiosta kuin sen komponenttien kemiallisen ympäristön muunteluilla aikaansaaduista Passerini-reaktioista.

2. Passerini-reaktio

2.1 Mekanismi

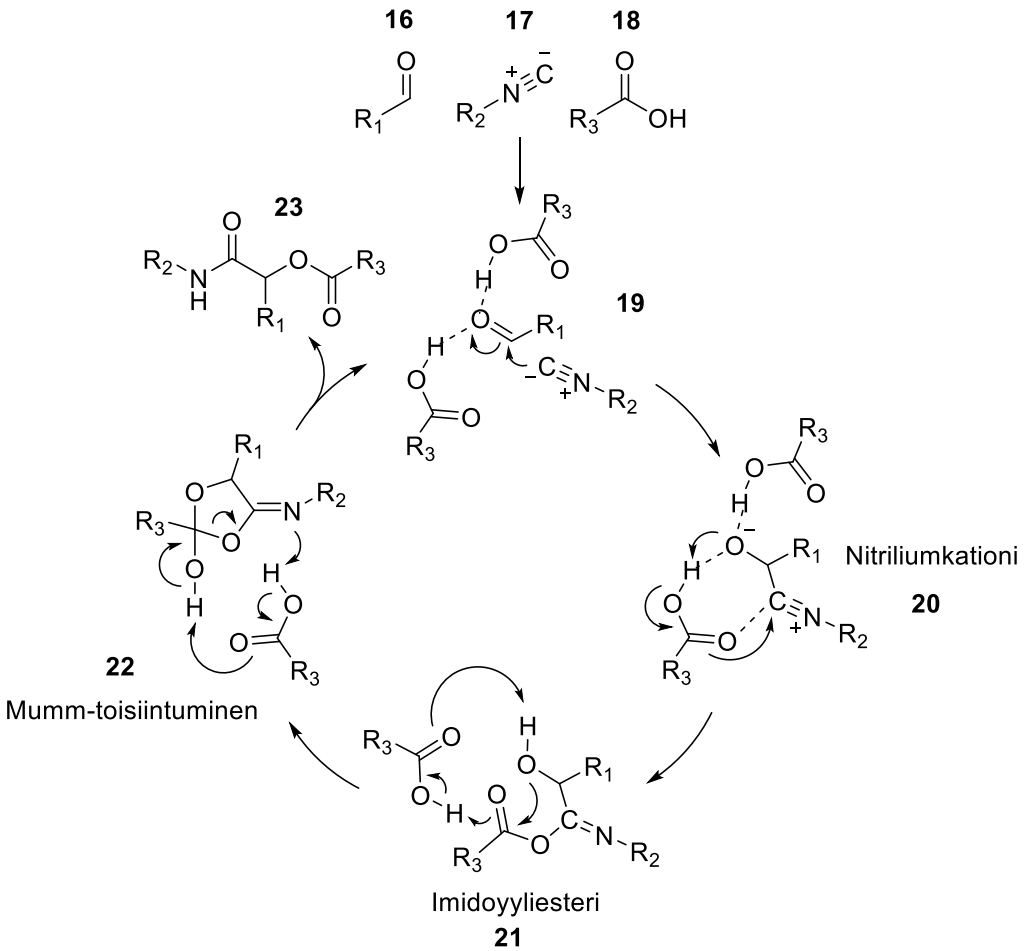
Passerini-reaktio keksittiin 1900-luvun alkupuolella, kun Mario Passerini tutki isonitriilien reaktiivisuutta. Tällöin hän huomasi, että isonitriilit, karbonyylit sekä karboksyylihapot reagoivat keskenään, jolloin muodostui α-asyloksiamidi.[9,10]

Klassisen Passerini-reaktion mekanismin edellytyksenä pidetään karbonyylin (**10**) protonoitumista karboksyylihapolla, jolloin muodostuu reaktiivinen oksokarbeniumioni (**11**). Tällöin isonitriili (**12**) hyökkää ja muodostuu välivaiheiden kautta imidoyyliesteri (**14**). Asyyliryhmän toisiintumisreaktion jälkeen muodostuu α-asyloksiamidi (**15**) (kaavio 3).[9]



Kaavio 3. Yleisesti hyväksytty Passerini-reaktion ioninen mekanismi.[9]

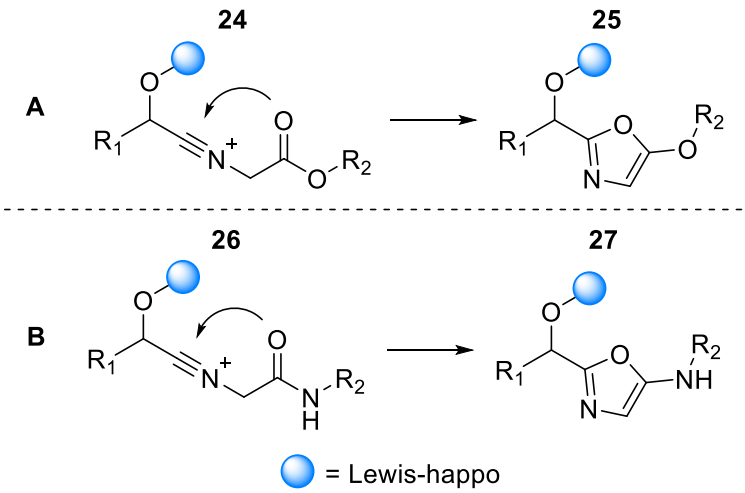
Klassisen Passerini-reaktion mekanismia on tarkasteltu tarkemmin laskennallisilla menetelmillä (DFT, (M06-2X/6-31+G(d,p)) ja (mPW2PLYP-D/6-311++G(d,p)). Tutkimuksen tulokseksi saatiin Passerini-reaktiolle ioninen, tarkennettu mekanismi (kaavio 4). Mekanismille on olennaista kahden karboksyylihapon sitoutuminen aldehydiin **16** heti reaktiosarjan alussa. Lisäksi havaittiin, että asyyliryhmän toisiintumisreaktio (Mumm-toisiintuminen) vaatii myös toisen karboksyylihappomolekyylin osallistumista katalyyttisesti.[11]



Kaavio 4. DFT-laskelmien avulla saatu hypoteesi Passerini-reaktion mekanismille.[11]

Välivaiheessa **21** tapahtuu toisiintumisreaktio, jossa asyyliryhmä toisiintuu asyyli-imidaatista kvarternäärisen hiilivälivaiheen **22** kautta muodostaen α-asyloksiamidin **23**. Mumm-toisiintumisen havaittiin vaativan katalyytin. Käytetty liuotin, metanoli voi myös toimia katalyyttinä, mutta sen reagoiminen verrattuna katalyyttiseen karboksyylihappoon oli hitaampaa.[11]

Passerini-reaktiossa välivaiheeksi muodostuvat nitriliumkationit ovat reaktiivisia. Se on nähtävissä nitriliumkationin kyvystä reagoida intramolekulaarisesti, kun isonitriilikomponentissa on substituenttina nukleofiilinen yksikkö. Kun isonitriilin α-hiilen sivuketju on karboksylaattiesteri tai -amidi, on havaittu, että muodostuu syklisoitunut tuote. Esterisivuketjun tapauksessa on huomattu muodostuvan 5-alkyylioksioksatsoliyhdiste (**25**) (kaavio 5, polku A).[12] Amidisivuketjun on raportoitu syklisoituvan 5-amino-oksatsoliyhdisteeksi (**27**) (kaavio 5, polku B).[13,14]



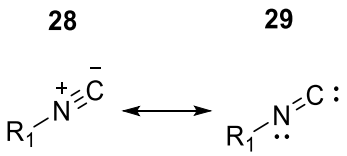
Kaavio 5. Karboksylaattiesteri ja -amidi sisältävät nukleofiilisen karbonyylin.

Yksi selitys kyseiselle syklisoitumisreaktiolle ovat Baldwinin-säännöt, jotka perustuvat suosiollisiin liikeratoihin reaktanttien välillä. Baldwinin-säännöistä nähdään, että kaavion 5 polkujen A ja B kaltainen 5-endo-dig –reaktio on suosiollinen, kun taas vastaavasti 5-endo-trig –reaktio on epäsuosiollinen.[15] Xia *et. al.*[12] ovat raportoineet, että kaavion 5 polun A reaktiopolku (joka toteutettiin käyttäen Lewis-hapoista $Zn(OTf)_2$ ja trimetyylisilyylikloridi (TMSCl) muodostettua kombinaatiota) tapahtui kohtalaisella saannolla, kun reaktioseoksessa oli mukana *N*-etyylimorfoliinia emäksenä. Ilman lisättyä emästä, muodostui syklisoitunutta oksatsoliyhdistettä vain heikolla saannolla.

2.2 Passerini-reaktion lähtöaineet

2.2.1 Isonitriilikomponentti

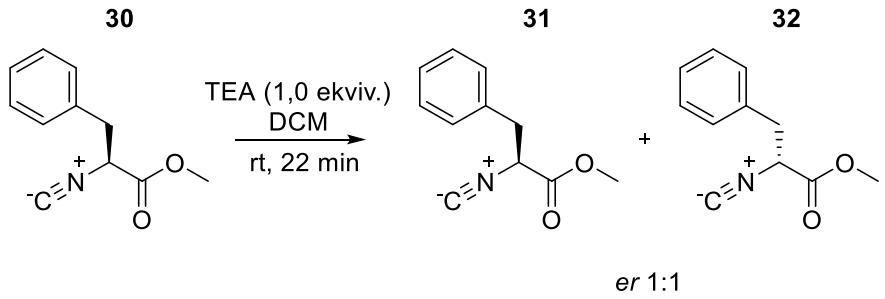
Isonitriilien kemiallinen rakenne voidaan esittää Lewis-kaavalla joko kahtaisionisena rakenteena, jossa on muodollinen kolmoissidos, tai varauksettomana kaksoissidosrakenteena (kaavio 6).[16a]



Kaavio 6. Isonitriilin kaksi resonanssirakennetta.

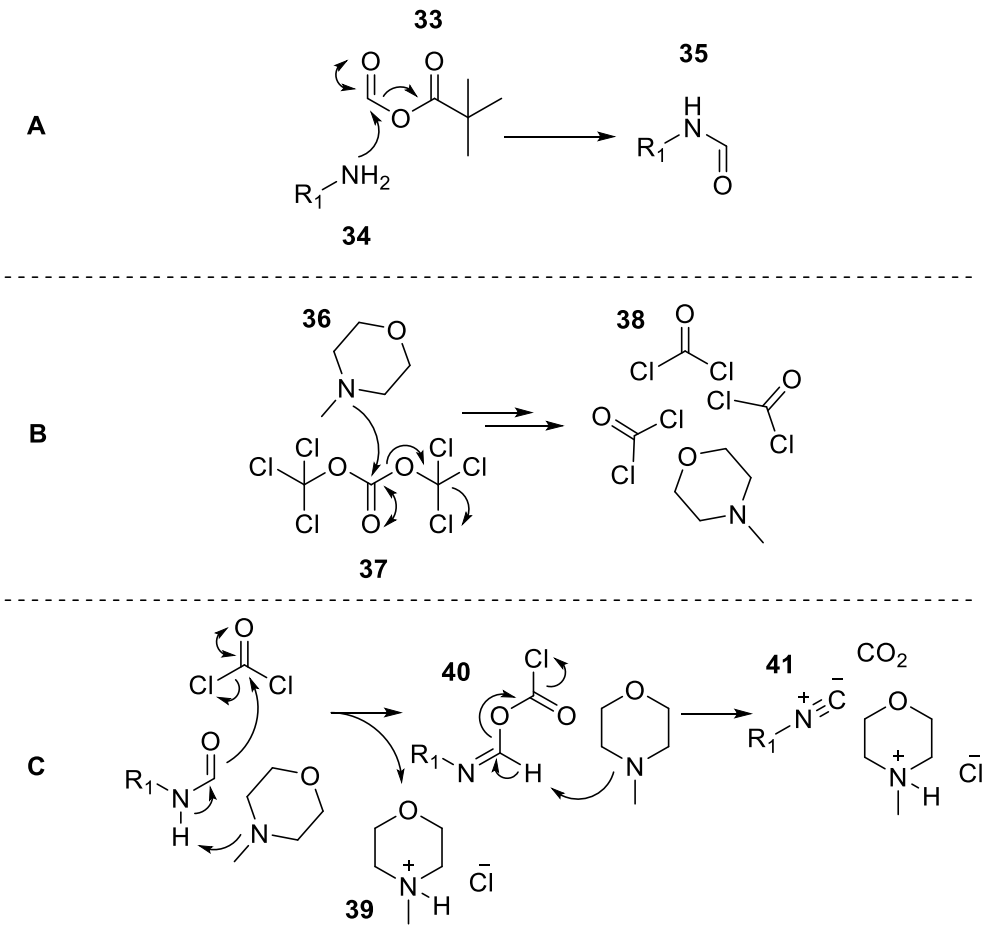
Isonitriilit ovat herkkiä hajoamiselle happamissa olosuhteissa. Emäsolosuhteissa ne ovat suhteellisen stabiileja, mutta ne reagoivat vahvojen emäksien, kuten organometallin *n*-BuLi kanssa. Mikäli isonitriilin α-hiilessä on elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, kuten

karboksylaattiesteri, happamoittaa se α-hiilessä kiinni olevan protonin. Silloin heikkokin emäs, kuten trietyyliamiini (TEA), kykenee rasemisoimaan tällaisen kiraalisen isonitriilin (kaavio 7).[16b]



Kaavio 7. Isonitriilin α-hiilessä on hapan protoni.[16b]

Isonitriilien synteesin lähtöaineena on usein primäärinen amiini, josta tehdään ensin vastaava formamidi, minkä jälkeen formamidiryhmä dehydroidaan isonitriiliksi. Yksi kirjallisuudessa tunnettu menetelmä formamidien synteesiin primäärisistä amiineista hyödyntää seka-anhydridimenetelmää (kaavio 8, mekanismi A). Dehydraatioreaktiossa on hyödynnetty fosgeenin (**38**) esiastetta trifosgeenia (**37**) (kaavio 8, mekanismit B ja C). Reaktioseoksen pH pidetään neutraalina, sillä hapan liuos hajottaa sekä kiraalisten yhdisteiden tapauksessa rasemisoi herkästi isonitriilit.[16-17]



Kaavio 8. Mekanismipolku primäärisestä amiinista isonitriiliin.

2.2.2 Karbonyylijohdannainen komponenttina

Passerini-reaktiossa käytetyt karbonyylit ovat usein aldehydejä tai ketoneja. Aldehydejä käytetään tavallisimmin, sillä niiden reaktiivisuus on suurempi verrattuja ketoneihin. Tämä reaktiivisuusero johtuu usein karbonyylin ympäristön steerisestä esteestä. Mikäli karbonyyli on steerisesti ahdas, niin Passerini-reaktiossa käytetyt kookkaat molekyylit hankaloittavat reaktiota entisestään.[18] Nykyisen tutkimustiedon valossa αβ-tyydyttymättömät ketonit eivät reagoi Passerini-reaktiossa, mutta vastaavat aldehydit reagoivat.[19,20] Karbonyylijohdannaisen aktivoimiseen isonitriilin hyökkäystä varten käytetään usein vahvaa Lewis-happoa, kuten booritrifluoridia (BF_3).[21]

2.2.3 Happokomponentti

Klassinen Passerini-reaktio toteutetaan käyttäen happokomponenttina karboksyylihappoa. Karboksyylihapon hydroksyyliryhmä luovuttaa helposti protonin, joten se tunnetaan myös Brønsted-Lowry-happona. On havaittu, että happokomponentin Brønsted-Lowry-happamuus

vaikuttaa Passerini-reaktion kulkuun. Esimerkiksi karboksyylihappoa käytettäessä reaktion saannot ovat hyviä, mutta kun karboksyylihapon kemiallinen rakenne muutetaan tiokarboksyylihapoksi, reaktion saannot huononevat. Yksi selitys tälle on, että hapen ja rikin välinen elektronegatiivisuusero aiheuttaa Brønsted-Lowry-happamuudelle muutoksen ja täten karbonyylin aktivoituminen on erilaista. Usein Passerini-reaktioon on lisätty vahvoja Lewis- tai Brønsted-Lowry-happoja, mikäli riittävää karbonyylin aktivoitumista ei ole saavutettu. Tällaisilla apuna olevilla aktivoijilla on lisäksi usein heikosti nukleofiilinen vastinemäs, kuten kloridianioni.[16a]

2.3 Liuottimen merkitys

Klassisessa Passerini-reaktiossa käytetty liuotin on usein aproottinen. Tällaiset liuottimet eivät kykene muodostamaan vetysidoksia, joten vetysidokset muodostuvat pelkästään reaktion komponenttien ja tuotteiden välillä. Aproottisen liuottimen, kuten dikloorimetaanin, käytön on havaittu parantavan karboksyylihapon ja aldehydin vuorovaikutusta siten, että aldehydin elektrofiilisyys on parempi verrattuna tilanteeseen, jossa liuottimena käytetään proottista metanolia. Kyseiset tulokset havaittiin laskennallisilla menetelmillä (ks. kappale 2.1). Kun metanolia on käytetty liuottimena, on havaittu, että välivaihe nitriliumkationi (**20**) (kaavio 4) on stabiloitunut metanolin muodostamilla vetysidoksilla. Tällöin Passerini-reaktion eteneminen on hidastunut.[11]

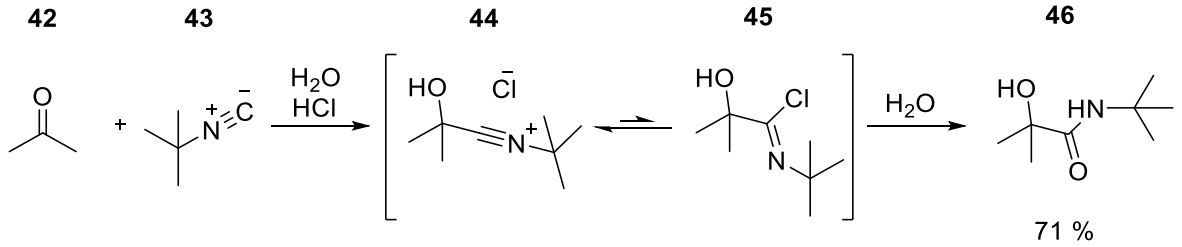
Klassisen Passerini-reaktion komponenttien konsentraatiolla on havaittu olevan vaikutusta reaktion nopeuteen ja saantoon. Koszelewski *et. al.*[22] ovat tutkineet, että liuottimena olleen dikloorimetaanin vähennys puoleen kaksinkertaisti saannon, reaktion lähtöaineiden ainemäärien ollessa vakioita (aldehydi 1,0 ekviv., isonitriili 1,1 ekviv., karboksyylihappo 1,1 ekviv.). Ilmiötä tutkittiin lisää siten, että lähtöaineiden konsentraatiota nostettiin, jolloin havaittiin myös saannon nousevan. Saannon ja konsentraation välillä havaittiin olevan lineaarinen korrelaatio, jossa 3 M lähtöaineiden konsentraatiolla saatiin maksimi saanto (noin 65 %). Tämän johdosta kokeiltiin ilman liuotinta tehtyä reaktiota huoneenlämmössä, jolloin saanto kohosi 86 prosenttiin. Bousquet *et. al.*[23] ovat havainneet, että ilman liuotinta ja lämmityksen avulla tehty reaktio muodosti korkealla saannolla Passerini-tuotetta. Öljyhauteessa 80 °C:ssa suoritettu reaktio (aldehydi 1,1 ekviv., isonitriili 1,0 ekviv., karboksyylihappo 1,1 ekviv.) muodosti 10 minuutissa 70 % saannolla tavoitetuotetta (^{1}H NMR-analyysi reaktioseoksesta osoitti 88 % konversion). Lämmön kohottaminen lukemaan 180 °C ja reaktioajan vähennys kahteen minuuttiin muodosti 88 % saannolla tavoitetuotteen (^{1}H NMR-analyysi reaktioseoksesta osoitti 100 % konversion ja isonitriilin ainemäärä oli 0,50

mmol). Tätä korkeammat lämpötilat tuottivat kuitenkin heikomman saannon, mikä johtui luultavasti tuotteiden hajoamisesta. Lämmityksen muotona on käytetty lisäksi mikroaaltoja, joilla Barreto *et. al.*[24] ovat tutkineet lämpötilan vaikutusta Passerini-reaktioon. He havaitsivat, että lämpötilassa 120 °C ja noin minuutin reaktioajassa suoritettu reaktio antoi erinomaisia saantoja. Lähtöaineiden määrät olivat pienet (0,20 mmol) ja reaktiossa käytettiin ekvivalentteja ainemääriä.

Myös vettä on tutkittu Passerini-reaktion liuottimena. Pirrung *et. al.*[25] ovat tutkineet, että dikloorimetaanin ollessa liuotin, oli reaktion saanto 18 tunnin reaktioajalla huoneenlämmössä 45 %. Kun dikloorimetaani korvattiin vedellä, oli reaktio huomattavasti nopeampi. Tällöin 3,5 tunnin reaktioajalla huoneenlämmössä saatiin 95 % saanto. Kun veden ionivahvuutta lisättiin liuottamalla siihen litiumkloridia 2,5 M konsentraatioon, oli reaktio valmis jo 0,3 tunnin kuluessa, saannon pysyessä 95 %:ssa. Kun reaktio tehtiin glukoosin 1 M vesiliuoksella, oli reaktio valmis 0,8 tunnissa ja saanto oli sama 95 %, mikä tukee johtopäätöstä, että reaktioympäristön poolisuus nopeuttaa reaktiota. Klassisen Passerini-reaktion komponentit ovat usein hydrofobisia. Paprocki *et. al.*[26] ovat havainneet, että reagenssien sekoitusta faasien välillä auttavien pinta-aktiivisten, eli emulsiota lisäävien aineiden käyttö, nostaa vedessä suoritetun Passerini-reaktion saantoa. Lähtöaineiden ollessa ekvivalenteilla ainemäärillä ja liuottimen ollessa vesi-fosfaattipuskurilla, muodostui 33 %:lla saannolla Passerini-tuotetta. Reaktio toistettiin uudelleen, mutta tällä kertaa mukana oli myös pinta-aktiivinen reagenssi, jolloin saanto kohosi 58 %:n.

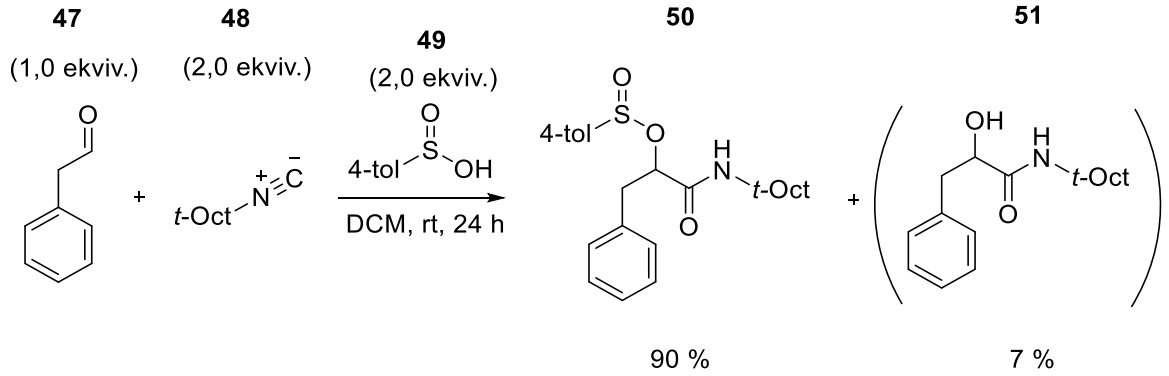
2.4 Brønsted-Lowry-happo Passerini-reaktiossa

Passerini-reaktion karboksyylihappokomponentti on mahdollista korvata mineraalihapolla, kuten suolahapolla. Mineraalihappojen happamuus vaikeuttaa kuitenkin Passerini-reaktion toteuttamista, sillä isonitriilit ovat herkkiä hajoamaan sellaisessa ympäristössä. Hagedorn *et. al.*[27] ovat tutkineet Passerini-reaktiota, jossa liuottimena käytettiin vettä ja happokomponenttina suolahappoa. Vesimolekyyli toimi nukleofiilinä nitriliumkationille, jolloin tuotteeksi muodostui α-hydroksiamidi (**46**) (kaavio 9).[16a]



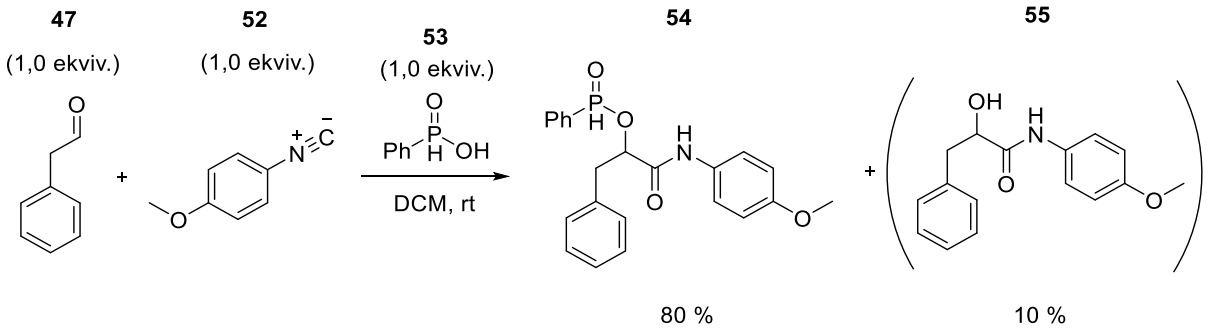
Kaavio 9. Suolahapolla toteutettu Passerini-reaktio.[27]

Mineraalihapon, kuten rikkihapon, asemasta voidaan käyttää analogisia sulfiinihappoja. Ne sisältävät myös happaman hydroksyyliryhmän, mutta ovat huomattavasti vähemmän happamampia verrattuna vastaavaan substituoituun sulfonihappoon. Soeta *et. al.*[28] ovat tutkineet substituoituja sulfiinihappoja Passerini-reaktion happokomponentteina (kaavio 10). Mekanismeiksi on hypotetisoitu kaavion 3 analogista klassisen Passerini-reaktion mekanismia. Proottisen liuottimen tärkeys havaittiin, kun reaktion liuottimen vaihto metanoliksi johti heikkoon saantoon vain hydrolyysituotetta α-hydroksiamidia (**51**).



Kaavio 10. Sulfiinihapolla toteutettu Passerini-reaktio.[28]

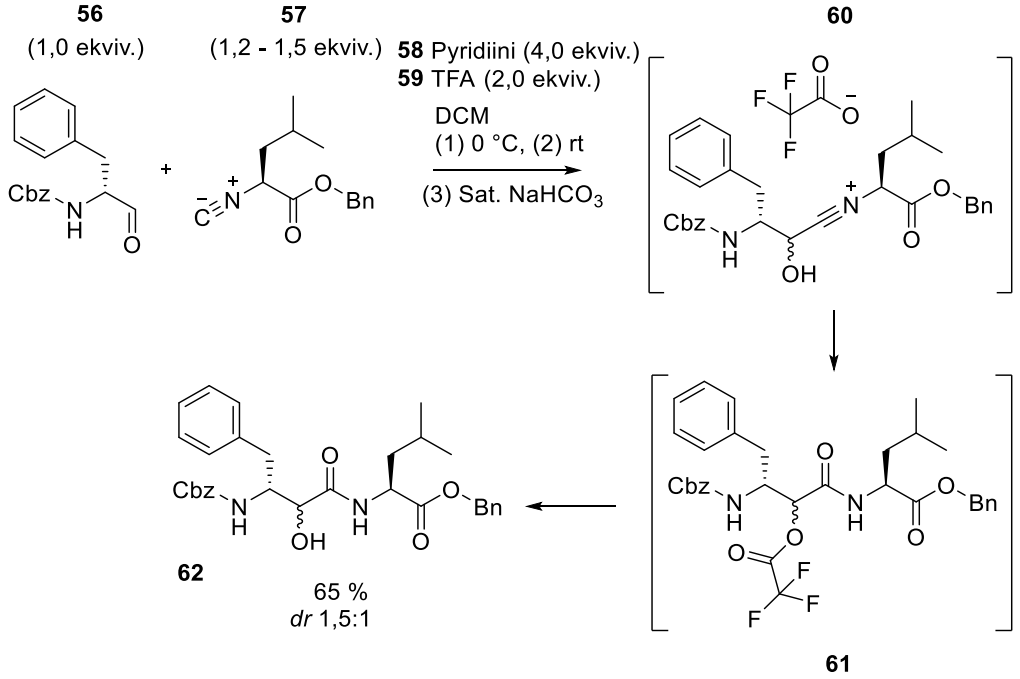
Samaiset tutkijat, jotka tutkivat sulfiinihappojen toimintaa, ovat tutkineet myös niiden fosfiinihappoanalogeja. Reaktion toteutus oli lähes identtinen, mutta lähtöaineiden ainemäärät olivat erilaiset. Passerini-tuotteeksi muodostui fosfinaattiesteri (**54**). Kun liuottimena käytettiin metanolia, muuttui reaktion lopputulos huomattavasti. Tällöin tuotteeksi saatiin ainoastaan α-hydroksiamidia (**55**) kohtalaisella saannolla.[29]



Kaavio 11. Fosfiinihapolla suoritettu Passerini-reaktio.[29]

Karboksyylihapot ovat usein heikkoja happoja, mutta jos niissä on elektroneja puoleensavetäviä ryhmiä substituentteina, ne voivat olla myös vahvoja happoja. Yksi tällainen vahva happo on trifluorietikkahappo (**59**), jonka toimintaa yhdessä emäsparin, pyridiinin (**58**) kanssa, on tutkittu Passerini-reaktiossa. Tutkimuksessa lähtöaineet eivät rajautuneet vain rakenteeltaan yksinkertaisiin molekyyleihin, vaan mukana oli myös kiraalisia α-

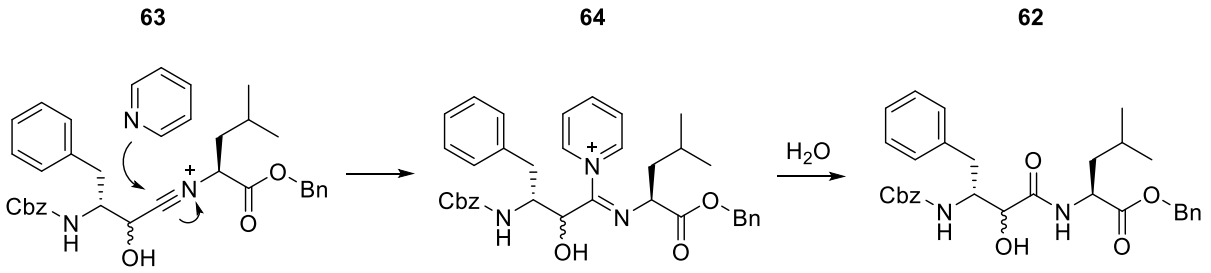
isosyanoasetaattiestereitä ja kiraalisia aldehydejä. Kiraalinen ominaisuus oli aldehydeillä ja isonitriileillä α-hiilessä. Kaavion 5 ja polun A kaltaista esterisivuketjun syklisoitumista 5-alkyylioksioksatsoliyhdisteeksi ei havaittu. Kiraalisten isonitriilien tapauksessa (kaavio 12, yhdiste **57**) α-hiili ei rasemisoitunut. Tutkimuksessa havaittiin, että vähemmän reaktiivisten aldehydien tai isonitriilien tapauksessa reaktioseoksen konsentraation nostaminen paransi saantoa.[30]



Kaavio 12. TFA ja pyridiini Passerini-komponentteina.[30]

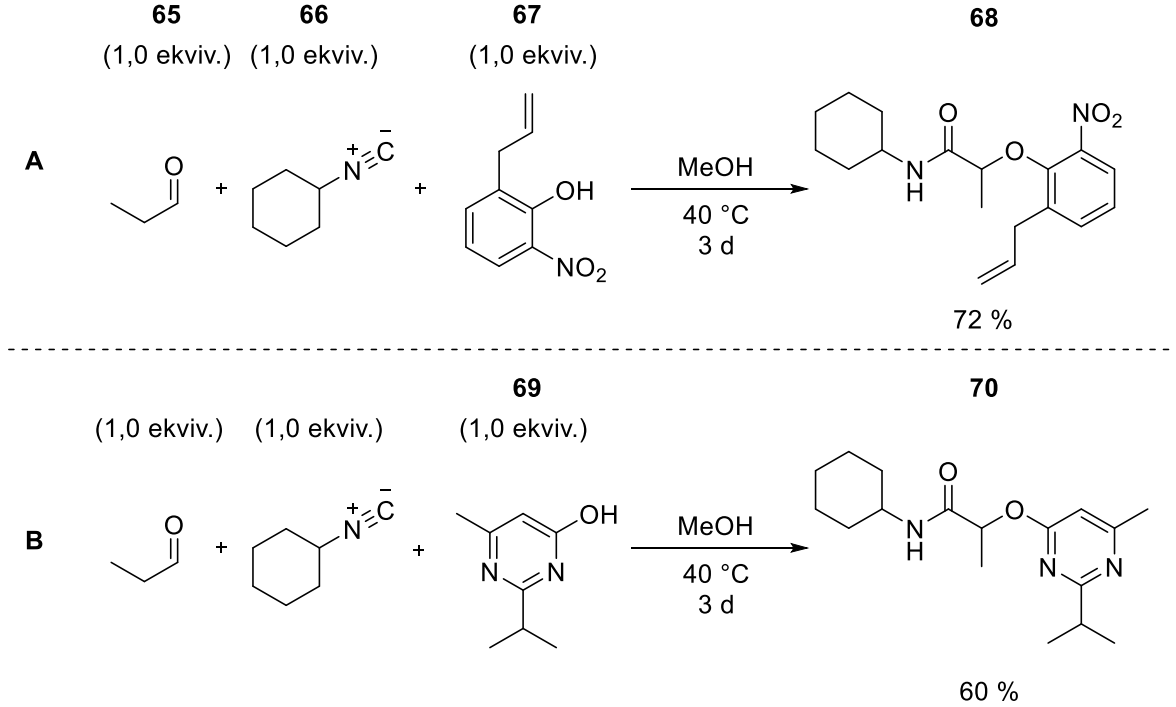
Kaavion 12 mukaisesti trifluorietikkahappo (**59**) aktivoi karbonyylin ja aiheuttaa välivaiheen nitriliumkationin (**60**) muodostumisen. Tämän muodostuttua on mahdollista, että heikosti nukleofiilisesta trifluorietikkahaposta muodostunut anioni (trifluoriasetaatti) toimii nukleofiilinä, jolloin muodostuisi imidoyyliesteri ja siten toisiintumisreaktion kautta α-asyloksiamidi (**61**) (kaavio 12). Uuttovaiheessa käytetty emäsliuos, $NaHCO_3$-vesiliuos, lopulta hydrolysoisi trifluoriasetaattiesterin (**61**) ja muodostuisi lopputuote α-hydroksiamidi (**62**).[30]

On mahdollista, että heikosti nukleofiilinen trifluorietikkahappo ei muodosta imidoyyliesterisidosta ja täten lainkaan α-asyloksiamidia. Pyridiiniä sisältävä puskuroitu liuos voi toimia stabiloivana tekijänä nitriliumkationille, jolloin mahdollisesti pyridiini toimii nukleofiilinä (välivaiheet **63** ja **64**) (kaavio 13). Vesihydrolyysin jälkeen muodostuu α-hydroksiamidi (**62**).[16a]



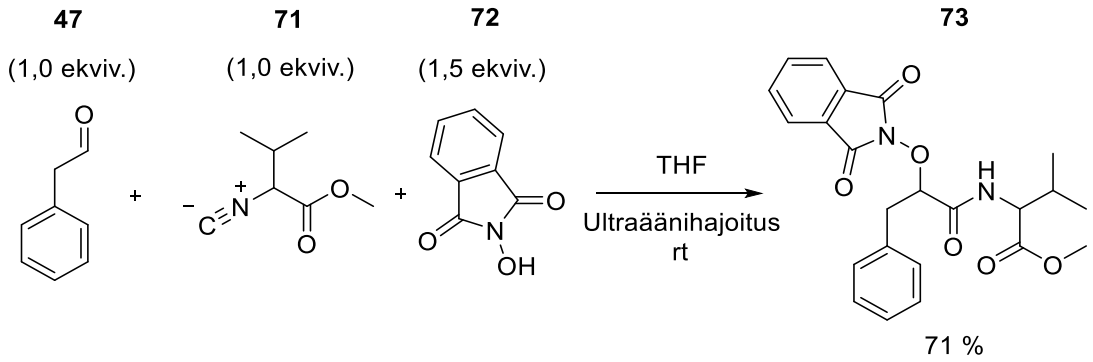
Kaavio 13. Hypoteesi mekanismille, pyridiinin toimiessa nukleofiilinä.[16a]

Fenolit ovat heikkoja Brønsted-Lowry-happoja, joiden happamuutta voidaan muunnella aryyliryhmän substituenteilla. Aryyliryhmän substituentin ollessa elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, kuten nitroryhmä, happamoituu fenoli. Vastaavasti elektroneja luovuttavat ryhmät, kuten alkyylisubstituentit aryylirenkaassa, vähentävät fenolin happamuutta. Elektronegatiivisen ympäristön sisältävät fenolit osallistuvat Passerini-reaktioon happokomponentteina. El Kaim *et. al.*[31] ovat tehneet tutkimuksen, jonka kohteena olivat substituoidut *o*-nitrofenolit, jotka reagoidessaan muodostivat *o*-nitrofenoliyhdisteen (**68**) (kaavio 14, osio A). Kyseisen tutkimuksen yhdisteisiin sisältyi lisäksi heteroaromaattisia fenoleita, joiden havaittiin toimivan vastaavalla toteutuksella (kaavio 14, osio B). Tutkijat päättelivät, että kyseiset fenoliyhdisteet ovat riittävän happamia (esimerkiksi *o*-nitrofenolin pK_a = 7.2), jotta karbonyylin aktivoituminen isonitriilin hyökkäykselle saavutetaan. Dai *et. al.*[32] ovat lisäksi havainneet *o*-nitrofenolien toiminnan happokomponentteina.



Kaavio 14. Substituoiduilla fenoleilla suoritettu Passerini-reaktio.[31]

N-hydroksi-imidit ovat kemialliselta rakenteeltaan hydroksyyliamiineja, joiden typpiatomiin on sidoksissa kaksi asyyliryhmää. Asyyliryhmä on elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, joten *N*-hydroksi-imidissä substituenttina oleva hydroksyyliryhmä on Brønsted-Lowry-teorian mukaan hapan. Tällaisten useiden *N*-hydroksiasyloitujen yhdisteiden osallistuvuutta Passerini-reaktioon on tutkittu Changdude *et. al.*[33] raportissa. Tutkimuksen lähtöaineena käytettiin esimerkiksi raseemista isonitriiliä **71**, jonka α-hiili sisälsi karboksylaattiesterin. Syklisoituneen oksatsoliyhdisteen muodostumista ei havaittu. Reaktiossa muodostuu α-aminoksiamidi (**73**) tavoitetuotteena (kaavio 15).



Kaavio 15. Esimerkkireaktio *N*-hydroksi-imidillä tehdystä Passerini-reaktiosta.[33]

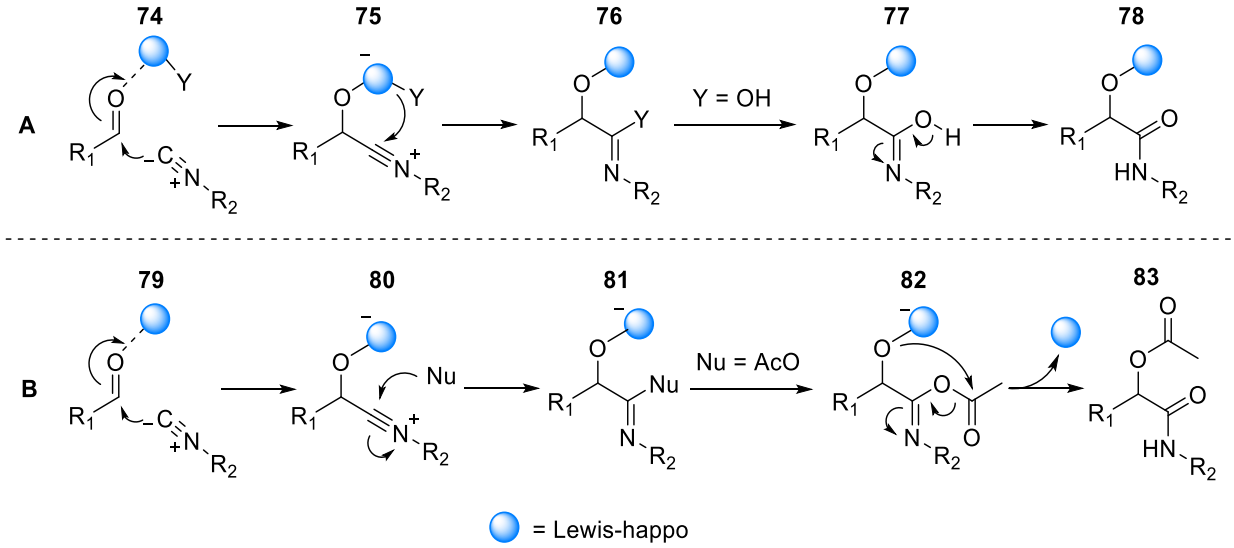
Edellä mainitussa tutkimuksessa havaittiin, että *N*-hydroksi-imidien ollessa happokomponentteina, Passerini-reaktio onnistui kahden asyyliryhmän sisältävien *N*-hydroksisukkinimidin sekä *N*-hydroksiftalimidin (**72**) kanssa. Sen sijaan yhden asyyliryhmän sisältävät hydroksamidihapot, asetoksihydroksamidihappo, *t*-butyyli-*N*-hydroksikarbamaatti ja *N*-hydroksibentseenisulfonamidi eivät reagoineet tavoitellusti. Myös *N*-hydroksibentsotriatsolilla (HOBt) tehty reaktio muodosti Passerini-tuotteen, mutta sen havaittiin hajoavan puhdistuksen aikana, muodostaen α-hydroksiamidin. Kun vesi tai veden ja metanolin seos (H_2O:MeOH 1:1) olivat liuottimina, muodostui tuotteena enimmäkseen hydrolyysituotetta α-hydroksiamidia.[33]

Reaktion mekanismiksi on artikkelissa hypotetisoitu *N*-hydroksi-imidien toimintaa Lewis-happoina. Tutkijat kuitenkin mainitsevat, että kyseisten yhdisteiden Brønsted-Lowry-happamuuden (pK_a = ~7,5) johdosta riittävä karbonyylin aktivoituminen voidaan saavuttaa isonitriilin hyökkäykselle. Huomionarvoista on, että *N*-hydroksi-imidillä suoritettua Passerini-reaktiota yritettiin katalysoida käyttäen Lewis-happoja ($ZnCl_2$ ja $BF_3{\cdot}OEt_2$) ja Brønsted-Lowry-happoa (*p*-tolueenisulfonihappo) sekä dikloorimetaania liuottimena (isonitriiliä 1,0 ekviv., aldehydiä 1,0 ekviv. ja *N*-hydroksi-imidiä 2,0 ekviv.). Passerini-tuotteiden saannot jäivät tällöin alhaiseksi.[33]

2.5 Lewis-happo Passerini-reaktiossa

Klassisessa Passerini-reaktiossa käytetään karboksyylihappoa happokomponenttina. Lewis-happoa voidaan myös käyttää happokomponenttina. Lewis-hapot ovat yhdisteitä, jotka kykenevät vastaanottamaan elektroniparin.[2] Tutkimuksissa on havaittu, että kyseisen yhdisteen happamuus voidaan määritellä lähes samoilla kriteereillä, jotka määrittävät Brønsted-Lowry-happamuuden. Lewis-happojen substituenttien elektronegatiivisuus on korreloitunut voimakkaampiin happo-ominaisuuksiin. Lewis-happamuutta ja emäksisyyttä on kuitenkin haastavaa määrittää, sillä induktiivisten vaikutusten kilpailijana ovat esimerkiksi substituenttien koko ja niiden tuoma steerinen este.[34-36]

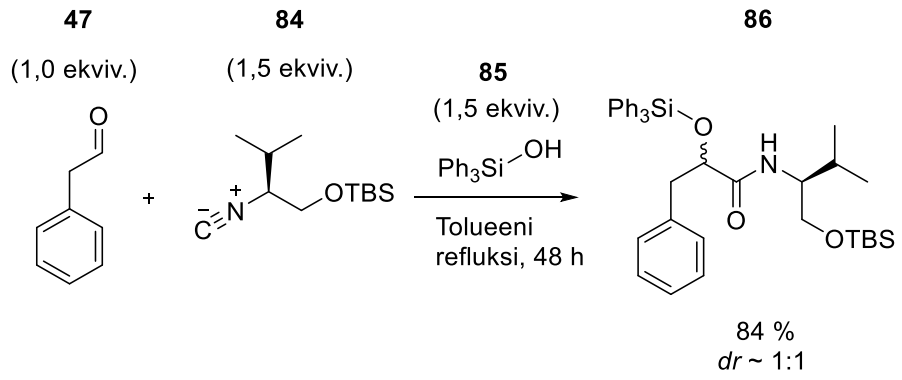
Lewis-happojen rooli Passerini-reaktiossa on sitoutua Lewis-emäkseen, eli tässä tapauksessa karbonyyliin ja aktivoida se isonitriilin hyökkäykselle. Välivaiheessa voi siten tapahtua toisiintumisreaktio Lewis-hapossa olleen substituentin ja nitriliumkationin välillä (kaavio 16, polku A). Aktivoinnin tapahduttua ja nitriliumkationin muodostuttua, voi nukleofiilinä toimia myös erillinen komponentti, kuten karboksyylihappo (kaavio 16, polku B).[16a]



Kaavio 16. Passerini-reaktion toteutus Lewis-hapolla.

2.5.1 Katalysoimaton Passerini-reaktio

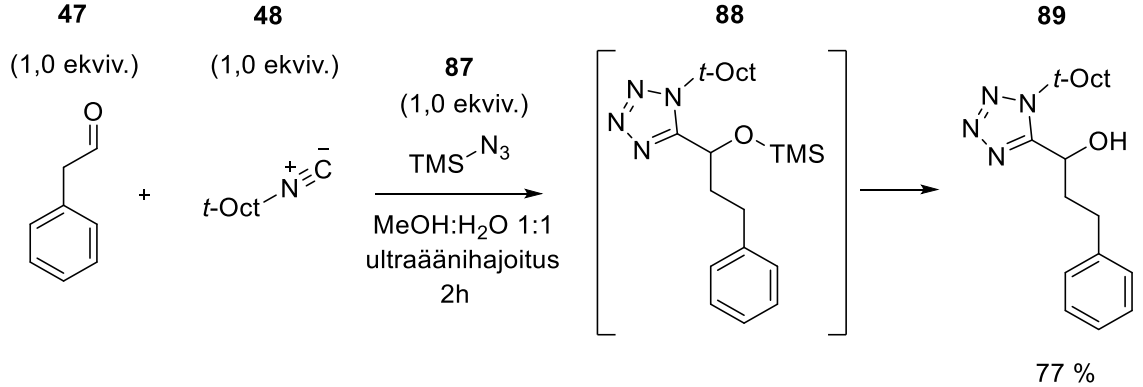
Silyyliyhdisteiden substituentteja muuntelemalla, voidaan vaikuttaa silaanin Lewis-happamuuteen tai vastaavan silanolin Brønsted-Lowry-happamuuteen. Samoilla tavoilla voidaan vaikuttaa myös silanolien reaktiivisuuteen Passerini-reaktiossa. Soeta *et. al.*[37] ovat havainneet, että silanoliyhdisteet, erityisesti trifenyylisilanoli, (**85**) toimivat Lewis-happokomponenttina, jolloin lopputuotteeksi saatiin *O*-silyloksiamidi (**86**) (kaavio 17).



Kaavio 17. Silanolipohjainen Lewis-happo Passerini-reaktiossa.[37]

Silanoliyhdisteistä testeissä olivat mukana myös silaanista alkyylisubstituoidut trietyylisilanoli ja tri-isopropyylisilanoli, mutta saannot niillä suoritetuilla Passerini-reaktioilla olivat alhaiset. *t*-Butyylidifenyylisilanoliyhdisteen tapauksessa saanto koheni kohtalaiseksi, verrattuna juuri mainittujen yhdisteiden alhaiseen saantoon. Fenyylisubstituenttien havaittiin olevan tärkeitä, jotta reaktiivisuus Passerini-reaktiossa säilyy. Kun lähtöaineena käytettiin isonitriiliä **84**, joka sisälsi α-hiilessä kiraalisen hiilen, ei ollut havaittavissa rasemisoitumista.[37]

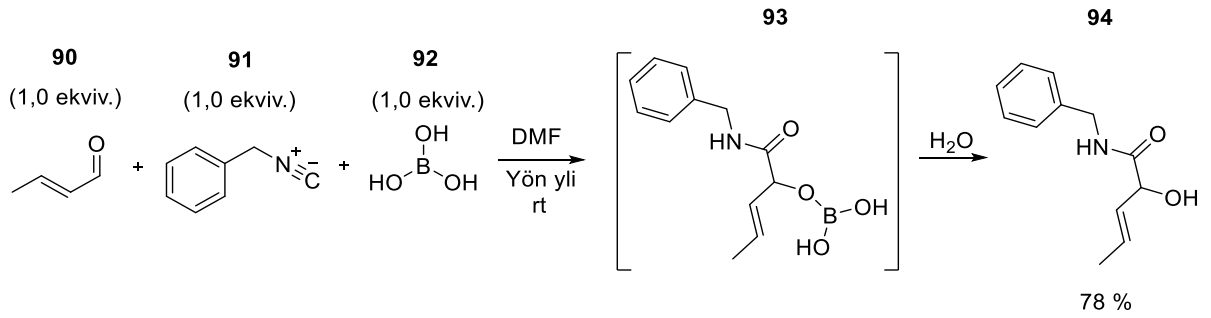
Trimetyylisilyyliatsidi ($TMSN_3$) on Lewis-hapan. Changdude *et. al.*[38] ovat havainneet sen reagoivan Passerini-reaktiossa happokomponenttina. Substituenttina oleva atsidiryhmä reagoi intramolekulaarisesti muodostaen syklisoituneen tetratsoliyhdisteen (**88**) (kaavio 18). Kun liuotinkombinaatio oli 1:1 suhteessa metanolin ja veden seos, hydrolysoitui silyylieetterisidos reaktion aikana ja muodostui yhdiste **89**. Vastaavasti, kun liuottimena käytettiin dikloorimetaania, muodostui huomattava määrä hydrolysoimatonta tuotetta **88**.[38]



Kaavio 18. Atsidiryhmän sisältävällä silyyliyhdisteellä toteutettu Passerini-reaktio.[38]

Boorihappo on Lewis-hapan ja se sisältää myös kolme Brønsted-Lowry-hapanta hydroksyyliryhmää. Kumar *et. al.*[39] ovat tutkineet boorihapon toimintaa Passerini-reaktiossa. Raportissa boorihapon määrää vaihdeltiin kymmenestä mooliprosentista sataan mooliprosenttiin. Reaktioita toteutettiin lisäksi eri liuottimilla, mutta niiden vaikutusta reaktion kulkuun ei erikseen artikkelissa raportoitu. Artikkelissa mainittiin, että korkeimman

saannon antoivat yhden ekvivalentin boorihapon käyttö sekä liuottimena käytetty dimetyyliformamidi. Alifaattisten isonitriilien ja aldehydien havaittiin toimivan parhaiten kyseisessä reaktiossa ja reaktiot etenivät loppuun noin päivän reaktioajan jälkeen huoneenlämmössä (kaavio 19).

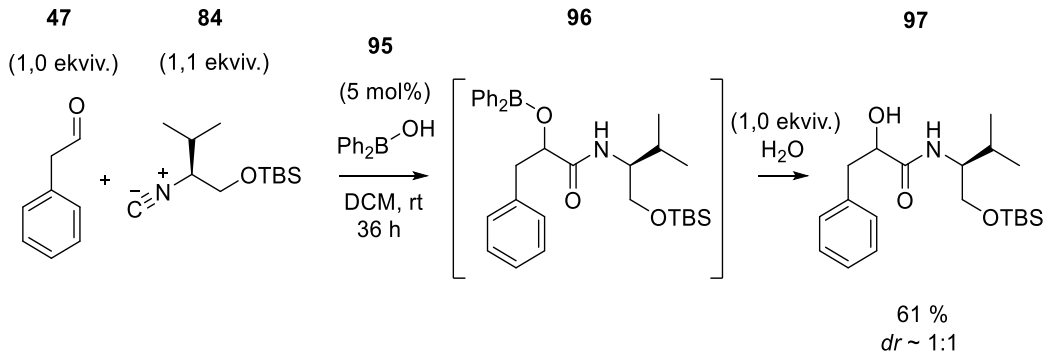


Kaavio 19. Boorihappo komponenttina Passerini-reaktiossa.[39]

Boorihapon ollessa happokomponentti Passerini-reaktiossa, reaktion mekanismiksi voidaan päätellä, että boorihappo sitoutuu Lewis-happopohjaisesti karbonyyliin, muodostuu nitriliumkationi ja hydroksyyliryhmä toisiintuu. Välivaiheeksi reaktiossa muodostuu boraattiesteri (**93**), jonka uuttovaiheessa lisätty vesi hydrolysoi lopputuotteeksi α-hydroksiamidiksi (**94**).

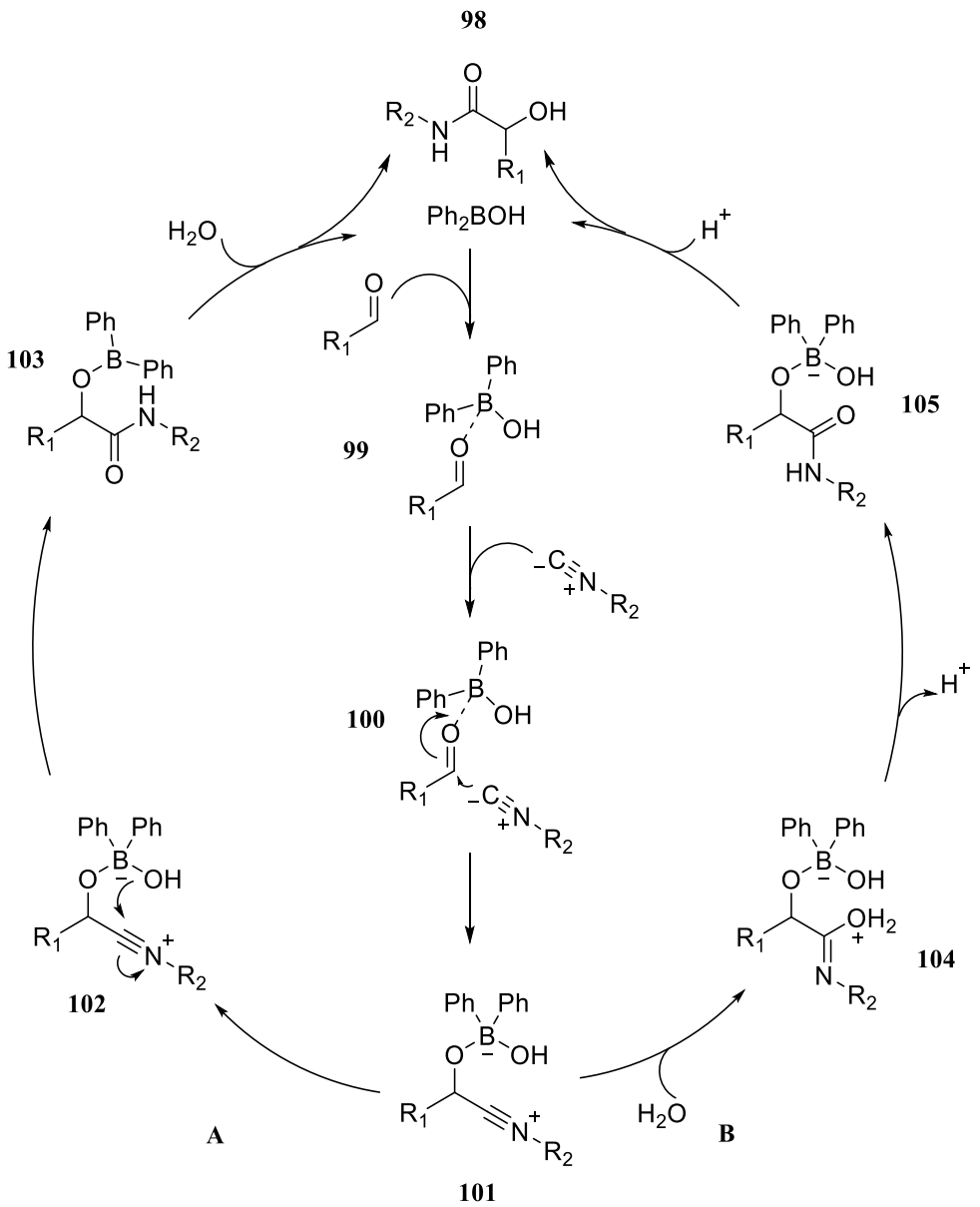
2.5.2 Katalysoitu Passerini-reaktio

Substituoituja borini- ja boronihappoja on tarkasteltu happokomponentteina Passerini-reaktiossa Soeta *et. al.*[40] tutkimuksessa. He havaitsivat, että kyseiset yhdisteet reagoivat tavoitellusti ja muodostivat Passerini-tuotteen. Reaktio toteutettiin siten, että happokomponenttia (booriyhdistettä) oli reaktiossa mukana vain katalyyttinen määrä. Lisänä reaktiossa oli myös yksi ekvivalentti vettä, jonka tehtävä oli hydrolysoida välivaihe **96** ja vapauttaa happokomponenti takaisin katalyyttiseen kiertoon (kaavio 20). Aproottisten liuottimien, kuten dikloorimetaanin, dikloorietaanin ja kloroformin havaittiin muodostavan korkeimmalla saannolla Passerini-tuotetta. Liuottimen ollessa proottinen metanoli, muodostui Passerini-tuotetta vain kohtalaisella saannolla. Tutkijat hypotetisoivat, että syynä alhaiseen saantoon oli metanolimolekyylin koordinoituminen booriyhdisteeseen, joka estää Passerini-reaktion etenemisen. Tutkitun reaktion havaittiin myös muodostavan tavoitetuotteen, kun happokomponenttina käytettiin kaksi hydroksyyliryhmää sisältävää fenyyliboronihappoa. Reaktioajat olivat pisimmillään noin kaksi päivää.



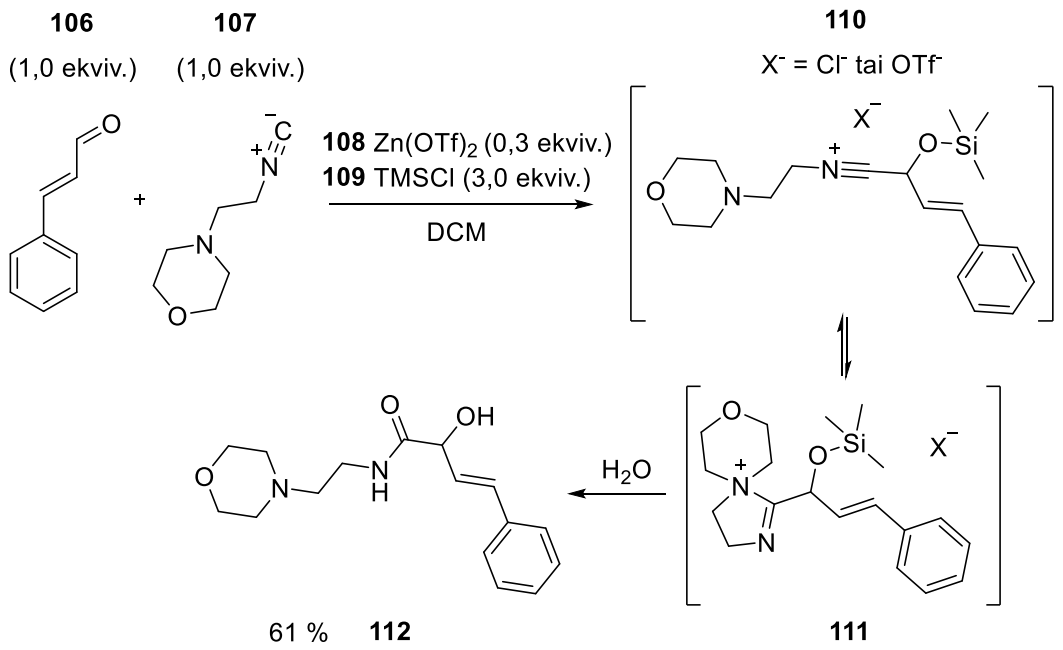
Kaavio 20. Borinihapolla toteutettu Passerini-reaktio.[40]

Edellä mainitun reaktion mekanismiksi on esitetty karbonyylin aktivoitumista difenyyliborinihapolla (**95**) Lewis-happopohjaisen mekanismin mukaan. Reaktio voi edetä kahta eri polkua, jotka näkyvät kaaviossa 21. Polussa A booriatomissa substituenttina oleva hydroksyyliryhmä toimii nukleofiilinä (välivaihe **102**) ja intramolekulaarisen toisiintumisen jälkeen muodostuu borinihapon esteri (välivaihe **103**). Vesihydrolyysin jälkeen muodostuu α-hydroksiamidi (**98**). Polussa B nuklefiilinä nitriliumkationille toimii reaktioseoksessa mukana oleva vesimolekyyli (välivaihe **104**). Toisiintumisreaktion jälkeen (välivaihe **105**) ja booriesterin hydrolyysin jälkeen muodostuu α-hydroksiamidi (**98**). On arvioitu, että polku B on epätodennäköisempi, sillä intramolekulaarinen toisiintumisreaktio tapahtuu helpommin ja nopeammin polun A kautta verrattuna polun B intermolekulaarisen veden nukleofiiliseen hyökkäykseen.[40]



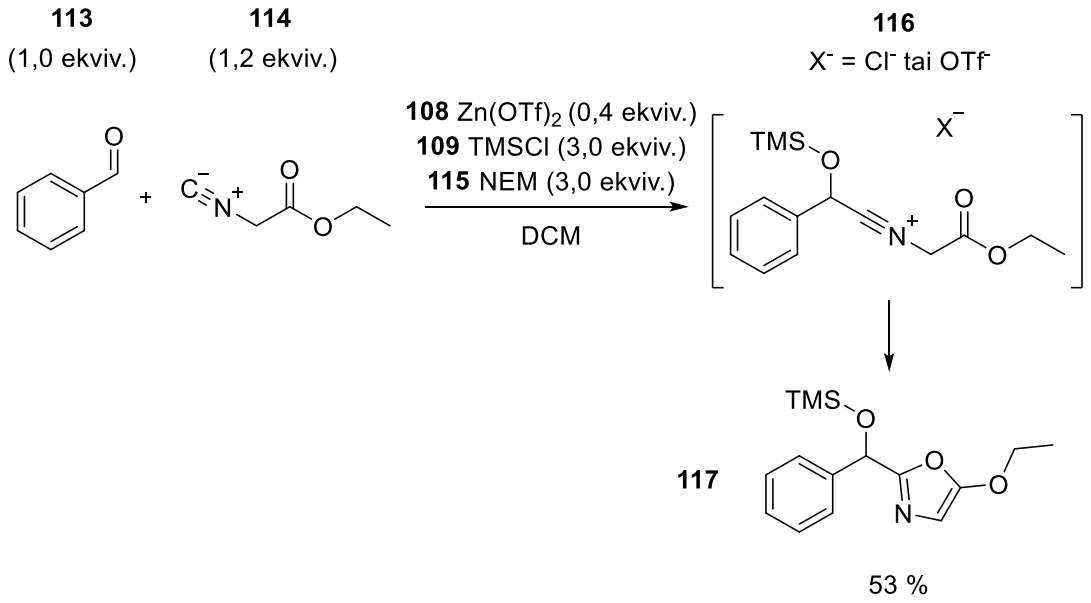
Kaavio 21. Katalyyttinen sykli borinihapolla Passerini-reaktiossa.[40]

Sinkkiyhdisteiden, erityisesti Zn^{2+}-suolojen on havaittu toimivan katalyytteinä silylointireaktioissa. Sinkki-ionien katalyysiä on tarkasteltu esimerkiksi pyridiinin, pikoliinin ja kinoliinin renkaan silylointireaktioissa.[41] Kyseinen synergistinen katalyyttinen vaikutus on todettu myös, kun Xia *et. al.*[12] ovat tutkineet Passerini-reaktiota. Lewis-hapot $Zn(OTf)_2$ (**108**) ja TMSCl (**109**) reagoivat katalyyttisessä syklissä aktivoiden karbonyylijohdannaisen, johon isonitriili hyökkää muodostaen välivaiheeksi yhdisteen, jossa on silyylieetteri ja nitriliumkationi (**110**). Morfoliinirenkaan typpiatomin todettiin olevan nukleofiilinen siten, että tapahtuu tasapainoreaktiossa intramolekulaarinen syklisoituminen, muodostaen yhdisteen **111** (kaavio 22). Uuttovaiheen vesi hydrolysoi silyylieetterin muodostaen α-hydroksiamidin (**112**). Happokomponenttien synergisoiva vaikutus vahvistettiin, kun reaktiota yritettiin stoikiometrisella määrällä TMSCl tai $Zn(OTf)_2$. Tällöin reaktio ei käynnistynyt lainkaan.



Kaavio 22. Zn(II)-suolalla ja silyyliyhdisteellä toteutettu Passerini-reaktio.[12]

Tutkijat havaitsivat, että isonitriilin sisältäessä karboksylaattiesteriryhmän α-hiilessä muodostuu syklisoitunut lopputuote. Esteriryhmän karbonyyli toimii tällöin nukleofiilinä nitriliumkationille ja muodostuu 5-alkyylioksioksatsoliyhdiste **117** (kaavio 23). Emäksenä reaktiossa käytettiin *N*-etyylimorfoliinia (**115,** NEM).[12]

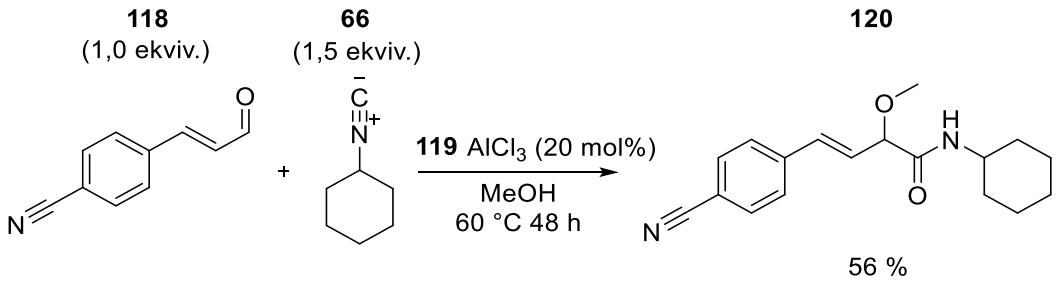


Kaavio 23. Esterisivuketjun havaittiin syklisoituvan oksatsolirenkaaksi.[12]

O-alkyloitujen oksokarbeniumionien tuottaminen Passerini-reaktion lähtöaineeksi on onnistunut usealla Lewis-happokatalyytillä. Tämän oksokarbeniumvariantin ideana on, että karbonyyliä reaktiivisempi oksokarbeniumioni reagoi isonitriilin kanssa muodostaen

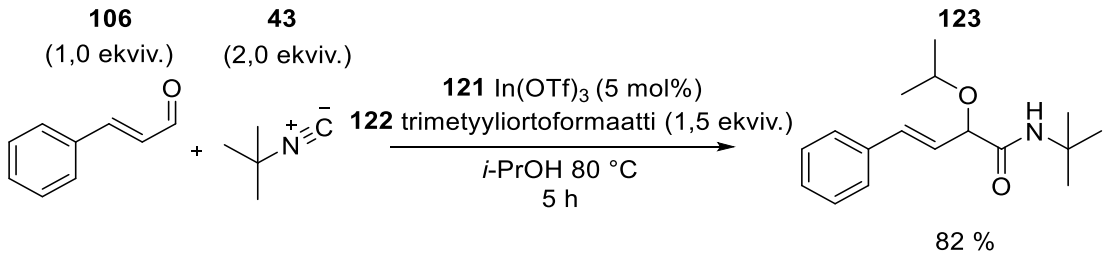
Passerini-tuotteen α-alkyylioksiamidin. Tuotteessa on täten alkyylieetterisidos samassa funktionaalisessa kohdassa kuin klassisessa Passerini-reaktiossa olisi esterisidos.

Tässä tutkielmassa käsitellään kahta tutkimusta, joissa *O*-alkyloitu oksokarbeniumioni on muodostettu Lewis-hapon katalysoimana. Ensimmäisessä näistä tutkimuksen kohteena olivat substituoidut kanelialdehydit. Lewis-happojen $Zn(OTf)_2$, AgOTf, $In(OTf)_3$, $ZnCl_2$, $FeCl_3$, $CuCl_2$ ja $AlCl_3$ katalyyttistä toimintaa tutkittiin ja havaittiin katalyyttien $In(OTf)_3$ ja $FeCl_3$ muodostavan tavoitetuotetta α-alkyylioksiamidia kohtalaisella saannolla. Korkein ja erinomainen saanto tuli yhdisteellä $AlCl_3$ (**119**) (kaavio 24). Kokeet tehtiin käyttäen vain lyhytketjuisia alifaattisia alkoholeja, joista alhaisin reaktiivisuus oli steerisesti ahtaalla *t*-butanolilla. Vastaavasti korkein reaktiivisuus oli metanolilla. Reaktio toistettiin ilman Lewis-happoa käyttäen katalyyttistä määrää etikkahappoa, jolloin saatiin vain pieni määrä tavoitetuotetta. Vaikka reaktiossa ylimääränä olikin mahdollisesti nukleofiilinä toimiva alkoholimolekyyli, ei sen havaittu reagoivan elektrofiilisen nitriliumkationin kanssa.[42]



Kaavio 24. Lewis-hapolla $AlCl_3$ metanolissa toteutettu Passerini-reaktio.[42]

Toinen *O*-alkyloituja oksokarbeniumioneja käsittelevä tutkimus pohjautuu samaan ideaan. Siinä kohteena Lewis-hapoista olivat $InCl_3$, $Bi(OTf)_3$, $FeCl_3$, $Sc(OTf)_3$, $Y(OTf)_3$, $Gd(OTf)_3$, $Yb(OTf)_3$, ja $In(OTf)_3$. Havaittiin, että tavoitetuotetta α-alkyylioksiamidia saatiin vaihtelevilla saannoilla alhaisesta korkeaan, mutta hydrolyysituotetta α-hydroksiamidia muodostui pieniä määriä. Reaktio suunniteltiin uudelleen siten, että reaktioseokseen lisättiin trimetyyliortoformaattia. Lisäyksellä oli positiivisia vaikutuksia, sillä α-hydroksiamidin muodostumista ei enää havaittu. Reaktion saannot olivat korkeimmillaan, kun isonitriiliä oli reaktioseoksessa ylimääränä (2 ekviv.) ja kun isonitriili ja Lewis-happo lisättiin osissa reaktioseokseen. Korkein saanto kokeissa saatiin käyttäen Lewis-happoa $In(OTf)_3$ ja lisättyä trimetyyliortoformaattia (kaavio 25). Trifluorietikkahapon ollessa happokatalyyttinä, muodostui pieniä määriä tavoitteena ollutta Passerini-tuotetta α-alkyylioksiamidia ja hydrolyysin sivutuotetta α-hydroksiamidia. Myös tässä tutkimuksessa huomionarvoista on, että alkoholi ei toiminut nukleofiilinä nitriliumkationille.[43]



Kaavio 25. Lewis-hapolla ja trimetyyliortoformaatilla tehty Passerini-reaktio.[43]

Edellä kuvatun tutkimuksen tuloksissa raportoitiin, että aldehydit muodostavat ensin dimetyyliasetaalin reagoidessaan trimetyyliortoformaatin kanssa. Tällöin katalyyttinä ollut Lewis-happo reagoi dimetyyliasetaalin ja reagenssina olleen alkoholimolekyylin kanssa siten, että muodostuu *O*-alkyloitu oksokarbeniumioni (*O*-alkyylisubstituenttina on alkoholimolekyylin hiilisubstituentti). Lisäksi tutkijat havaitsivat, että seos, jonka komponentit olivat bentsaldehydi, isopropanoli ja $In(OTf)_3$, reagoi Meerwein-Ponndorf-Verley-reaktiossa (MVP) pelkistäen bentsaldehydin bentsyylialkoholiksi. Tällöin muodostui indiumkompleksi. Kun seokseen lisättiin isonitriilikomponentti, MVP-reaktio hidastui huomattavasti, minkä pääteltiin johtuvan isonitriilin koordinoitumisesta indiumkompleksiin.[43]

2.6 Stereoselektiivinen Passerini-reaktio – lähtöaineiden vaikutus

Stereoselektiivinen synteesi on kemiallinen reaktio tai reaktiosarja, jossa muodostuu yksi tai useampi kiraalinen keskus. Muodostuneiden stereoisomeerien suhteet ovat erilaiset. Esimerkiksi toista stereoisomeeriä voi muodostua ainoastaan tai huomattavasti enemmän. Pohjana stereoselektiiviselle synteesille on kiraalisuus, joka voi olla substraatissa, reagenssissa, katalyytissä tai ympäristössä.[44] Tällöin toiseen stereoisomeeriin johtava reaktiopolku on aktivaatioenergialtaan alhaisempi, kuin toisen.

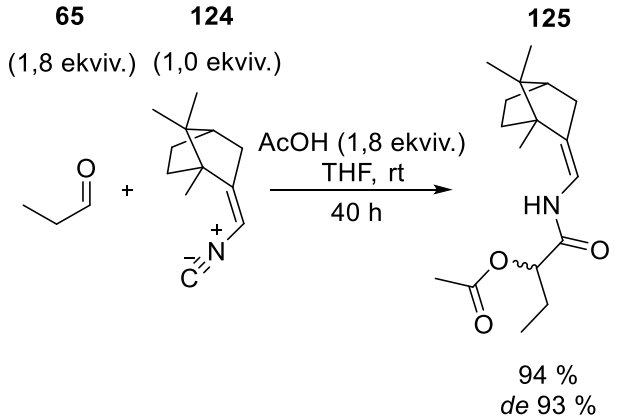
Ohjaavaa ryhmää käytetään stereoselektiivisyyden aiheuttajana. Energeettisesti edullisempi polku toiseen stereoisomeeriin voi johtua esimerkiksi steerisestä esteestä tai kemiallisista vuorovaikutuksista reaktanttien välillä. Usein stereoselektiivisiä reagensseja ja reaktioita suunniteltaessa käytetäänkin suuria kiraalisia molekyylejä, kuten binol-yhdisteitä, jotka aiheuttavat steeristä estettä. Vastaavasti kemiallisiin vuorovaikutuksiin perustuvat ohjaavat apuyksiköt sitovat tai hylkivät heikosti stereokemiallisen reaktion komponentteja.[2]

Vaikka Passerini-reaktio ja sen muunnelmat ovat tunnettu jo noin vuosisadan, ovat ne edelleen kehityksessä. Stereoselektiivisiä variaatioita niistä ei ole juurikaan löydetty.

Lupaavia tutkimuksia on ollut kuitenkin viime vuosina. Seuraavissa luvuissa käydään läpi Passerini-reaktion komponenttien muunnelmia ja niiden vaikutusta stereoselektiivisyyteen.

2.6.1 Isonitriilikomponentin ohjaama stereoselektiivisyys

Ohjaavan ryhmän käyttämisen klassisen Passerini-reaktion isonitriilikomponentissa voisi olettaa olevan haasteellista, sillä kiraalinen komponentti on mahdollista olla substituenttina vain α-hiilessä. Tällöin isonitriilin nukleofiilisen hiilen ja α-hiilen väliin jää stereoselektiivisyyttä haittaavaa etäisyyttä. Bock *et. al.*[45] ovat kuitenkin raportoineet stereoselektiivisen klassisen Passerini-reaktion, joka on toteutettu kiraalisella isonitriilillä. Ohjaava apuyksikkö isonitriilissä oli steerisesti isokokoinen kamferiryhmä (kaavio 26). *Cis*-isomeeri isonitriilistä (**124**) reagoitettiin artikkelin suppeassa tutkimuksessa neljän eri alifaattisen aldehydin kanssa käyttäen etikkahappoa happokomponenttina.[45]

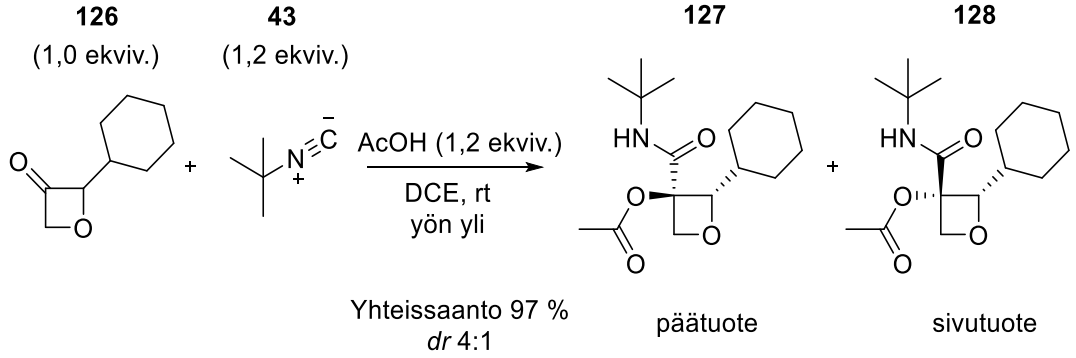


Kaavio 26. Kiraalinen isonitriili vaikuttaa Passerini-reaktion stereoselektiivisyyteen.[45]

2.6.2 Karbonyylijohdannaisen ohjaama stereoselektiivisyys

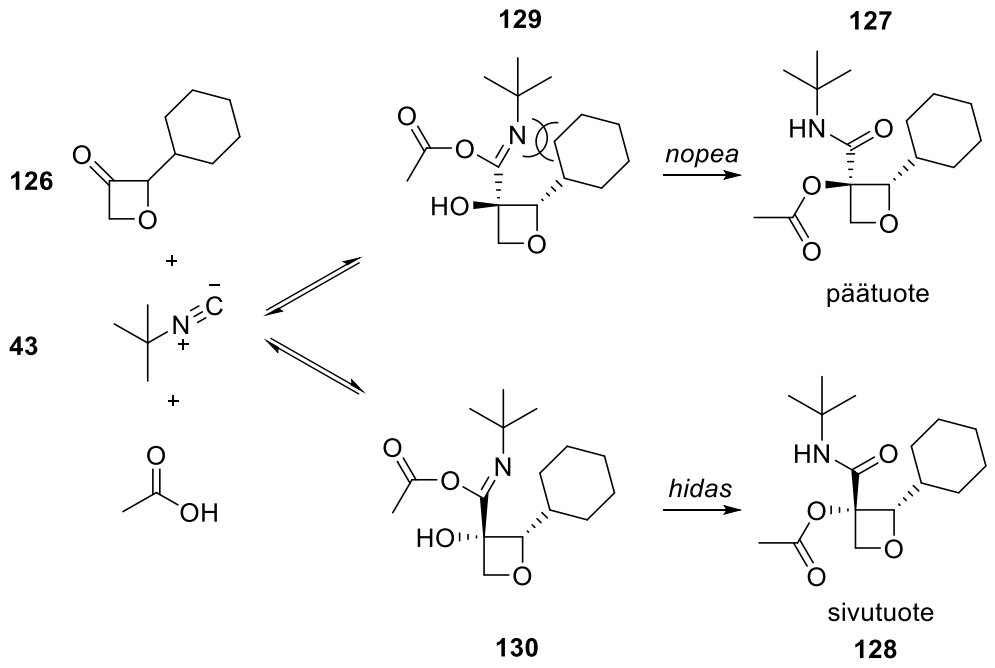
Stereokemiallisesti tärkeimmäksi kohdaksi karbonyylijohdannaisessa voisi olettaa karbonyylin α-hiilen, sillä se on lähimpänä Passerini-reaktion ensimmäistä vaihetta, isonitriilin hyökkäystä. Karbonyylijohdannaiset nimeltä oksetan-3-onit ovat mielenkiintoisia yhdisteitä, sillä niille ominaista on steerisesti jäykkä eetterisidoksen sisältävä nelirenkainen karbonyyli. Tämä herättää pohdintaa niiden reaktiivisuudesta klassisessa Passerini-reaktiossa. Beasley *et. al.*[46] ovat tutkineet substituoituja oksetan-3-oneja ja he havaitsivat muodostuneiden Passerini-tuotteiden olevan eri suhteilla. Karbonyylin yhden substituentin ollessa suurikokoinen, kuten sykloheksyyli, Passerini-tuotteita muodostui eri diastereomeerien suhteilla (4:1) (kaavio 27). Lisäksi he toteuttivat reaktion yhdisteellä, jossa

kyseinen sykloheksyyliryhmä oli korvattu 2-fenyylietyylisubstituentilla. Tällöin diastereomeerien suhteiksi saatiin alhaisempi lukema 1,7:1.



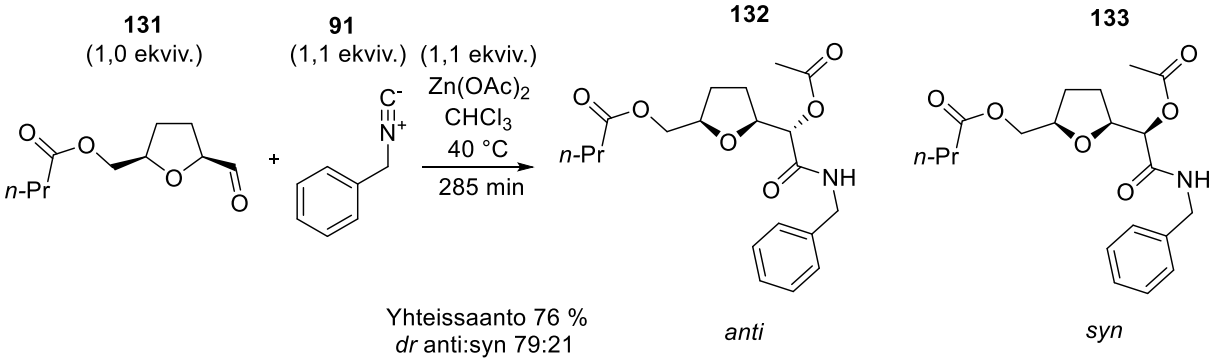
Kaavio 27. Substituoitu oksetan-3-oni diastereoselektiivisessä Passerini-reaktiossa.[46]

Tutkimuksessa hypoteesina oli, että isonitriilin hyökkäys karbonyyliin tapahtuu karbonyylissä kiinni olevan sykloheksyyliryhmän päinvastaiselta puolelta, johtuen vähemmästä steerisestä ahtaudesta. Täten pääosin muodostuva tuote olisi **128**. Näin ei kuitenkaan havaittu. Tutkijat päättelivät, että klassista Passerini-reaktiota pidetään reversiibelinä, ennen kuin viimeinen vaihe, asyyliryhmän toisiintuminen tapahtuu. Tutkijat arvioivat mekanismin uudelleen siten, että isonitriili hyökkää yhtenevin määrin karbonyyliin sykloheksyyliryhmän molemmilta puolilta (tuotteet **129** ja **130**), mutta diastereomeerien eroavaisuuden määrittää viimeisen vaiheen nopeus. Imidoyyli- ja sykloheksyyliryhmän välisen steerisen ahtauden (yhdiste **129**) arveltiin nopeuttavan asyyliryhmän toisiintumista huomattavasti nopeammaksi verrattuna toisen diastereomeerin vastaavaan (yhdiste **130**) (kaavio 28). Kyseinen reaktiopolku on artikkelissa vain teoreettinen ehdotus, eikä sitä varmentavia laskutoimituksia tai mittauksia ole suoritettu.[46]



Kaavio 28. Passerini-reaktion diastereoselektiivisyys voi olla kiinni aivan viimeisestä vaiheesta, imidoyylivälivaiheen protonoitumisesta.[46]

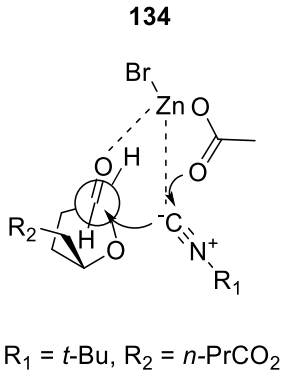
Karbonyylijohdannaisen α-hiili voi olla stereogeeninen ja siinä voi olla substituenttina esimerkiksi eetteri. Moni *et. al.*[47] ovat tutkineet kiraalisia tetrahydrofuraaniyhdisteitä. He havaitsivat, että aldehydillä **131** tehty klassinen Passerini-reaktio muodosti diastereomeerien 62:38 (*anti:syn*) suhteilla Passerini-tuotetta. He pohtivat, että eetteriryhmä ja lisätty sinkkikatalyytti voisivat vaikuttaa stereoselektiivisyyteen reaktanttien välillä tapahtuvan kelatoitumisen myötä, jolloin stereoselektiivisyys olisi korkeampi. Teoreettinen pohja hypoteesille oli, että steeriseen esteen johdosta pääosin muodostuva tuote olisi *syn*-diastereomeeri. Katalyyttisissä kokeissa kuitenkin havaittiin, että muodostuva tuote oli edelleen pääosin *anti*-diastereomeeri (kaavio 29).



Kaavio 29. Ylimäärällä sinkkireagenssia suoritettu reaktio.[47]

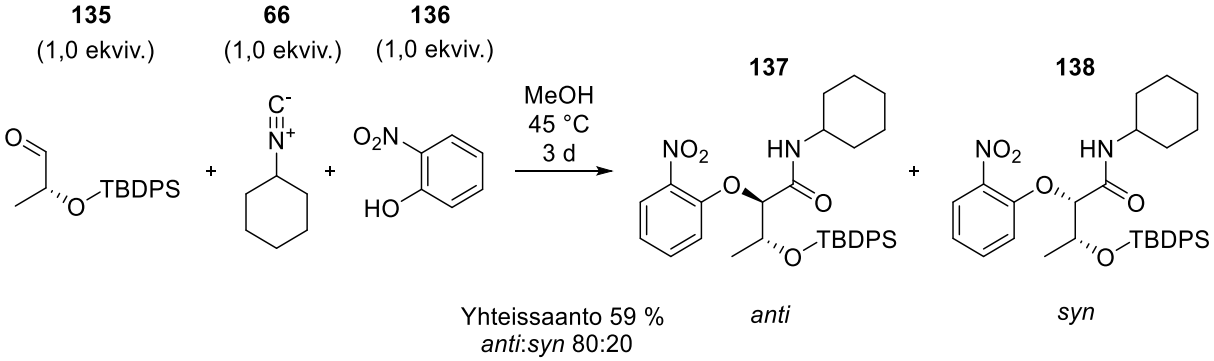
Edellä mainitussa artikkelissa tarkasteltiin Felkin-Ahn-mallin mukaista mekanismia. Artikkelin tuloksena havaittiin laskelmista, että steerisen esteen johdosta ja nukleofiilin

hyökkäykseen karbonyyliin vaadittava Bürgi–Dunitz-kulma olisi välivaiheessa **134** sopiva *anti*-diastereomeerin muodostumiseen (kaavio 30).[47]



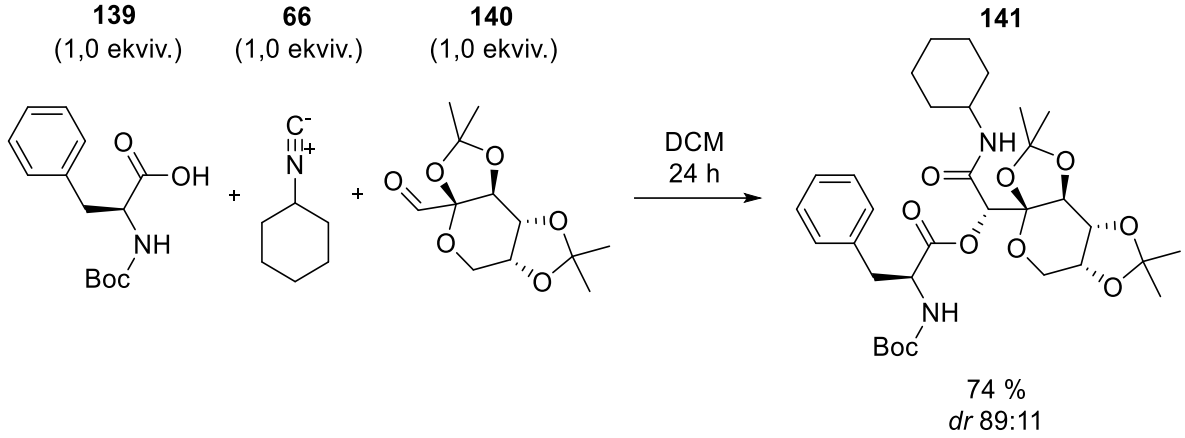
Kaavio 30.Stereoselektiiviseen hyökkäykseen johtava välivaihe.[47]

Radha Krishna *et. al.*[48] ovat todenneet tutkimuksessa karbonyylin α-hiilen substituentin vaikutuksen stereoselektiivisyyteen. Lähtöaineina karbonyylijohdannaisista käytettiin yksinkertaisissa tapauksissa α-hiilen silyylieetteriä tai *p*-metoksibentsyylieetteriä sisältäviä yhdisteitä (esimerkiksi yhdiste **135**). Kompleksisemmat karbonyylijohdannaiset sisälsivät sekä α- ja β-hiilen substituentteja, kuten kyseisiin hiiliin sidoksissa olevan sykloheksyyliketaalin. Tällöin havaittiin myös diastereomeerien muodostuminen eri suhteilla. Kaaviossa 31 on nähtävissä yksi reaktio kyseisestä artikkelista.



Kaavio 31. Aldehydin α-substituentin vaikutus stereokemiaan Passerini-reaktiossa.[48]

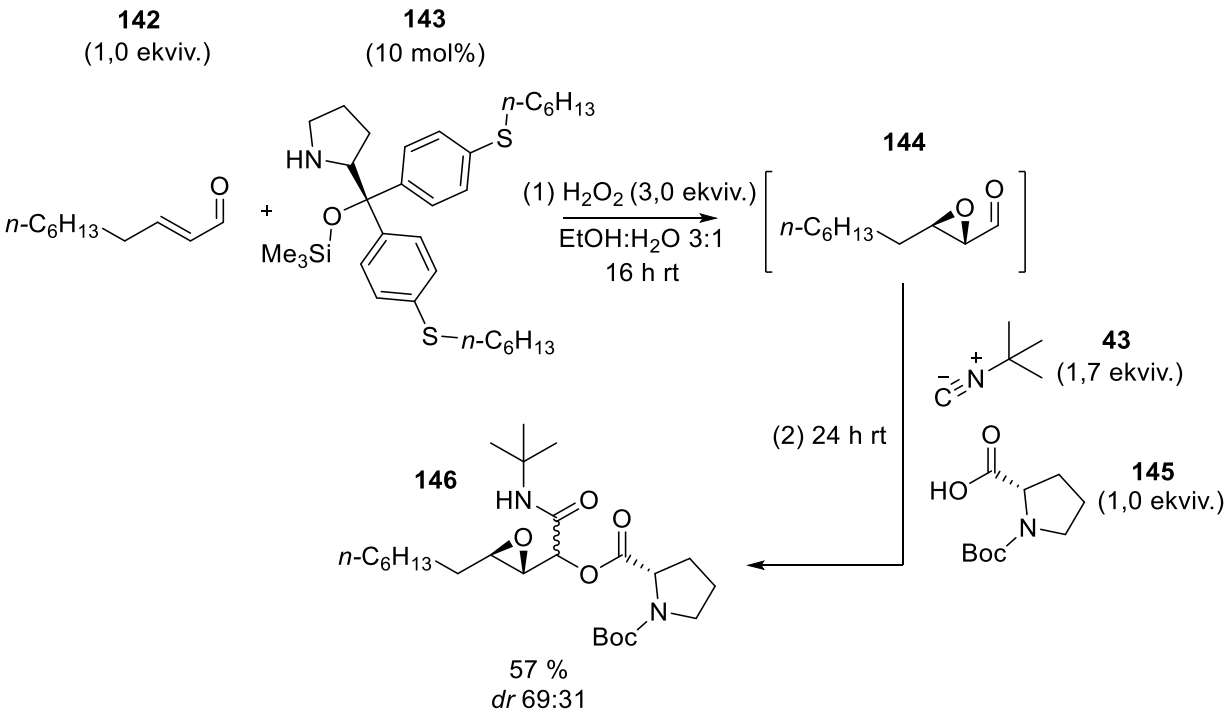
Karbonyylijohdannaisen substituentti voi myös olla ohjaava ryhmä α- ja β-hiilessä. Tällöin steerisesti suurikokoinenkin rakenne voidaan sisällyttää rakenteeseen. Yksi esimerkki kyseisistä yhdisteistä on pohjautunut sokerialdehydiin, D-fruktoosi-johdannaiseen **140**, jossa stereokemiallisesti tärkeä ketaaliryhmä on sidoksissa α- ja β-hiileen (kaavio 32).[49]



Kaavio 32. D-fruktoosi-johdannaisella tehty Passerini-reaktio.[49]

Edellä mainitun tutkimuksen stereselektiivisyyden syytä tutkittiin tarkemmin käyttäen apuna laskennallista kemiaa (DFT, SMD/M062X/6-311++G(2d,p)//M062X/6-31G(d)). Tällä tavoin havaittiin, että toisen diastereomeerin muodostuminen on energeettisesti edullisempaa. Esimerkiksi reaktion ensimmäisen vaiheen kompleksaatio sokerialdehydin **140**, sykloheksyyli-isosyanidin **66** ja kahden etikkahappomolekyylin välillä johtaa energiatasoiltaan kahteen eri kompleksiin, joista (*S*)-tuotteeseen johtava polku on stabiilimpi. Laskelmia kokeiltiin myös käyttäen vain yhtä etikkahappomolekyyliä, mutta tulokset olivat epäonnistuneita.[49] Reaktion mekanismin polku on vastaava kuin kaaviossa 4 ilmoitettu.

Karbonyylijohdannaisen α- ja β-hiileen substituentiksi voidaan valita pienikokoinen epoksidiryhmä. Deobald *et. al.*[50] ovat havainneet tutkimuksissaan, että αβ-tyydyttymätön aldehydi on mahdollista epoksoida stereoselektiivisesti organokatalyyttisessä ympäristössä, jonka jälkeen voidaan toteuttaa samassa reaktioastiassa klassinen Passerini-reaktio. Tehdyn kiraalisen epoksidin todettiin vaikuttavan muodostuneiden Passerini-tuotteiden diastereomeerien suhteeseen. Arvo oli noin 60:40. Lähtöaineena käytettiin myös kiraalista karboksyylihappoa *N*-Boc-L-proliinia (**145**), jonka kiraalisen ominaisuuden ei havaittu vaikuttavan merkittävästi isonitriilin hyökkäyksen stereoselektiivisyyteen (kaavio 33). Reaktiot toteutettiin käyttäen etanolin ja veden liuotinkombinaatiota ja tällöin ei raportoitu hydrolyysituotteen, α-hydroksiamidin muodostumista.

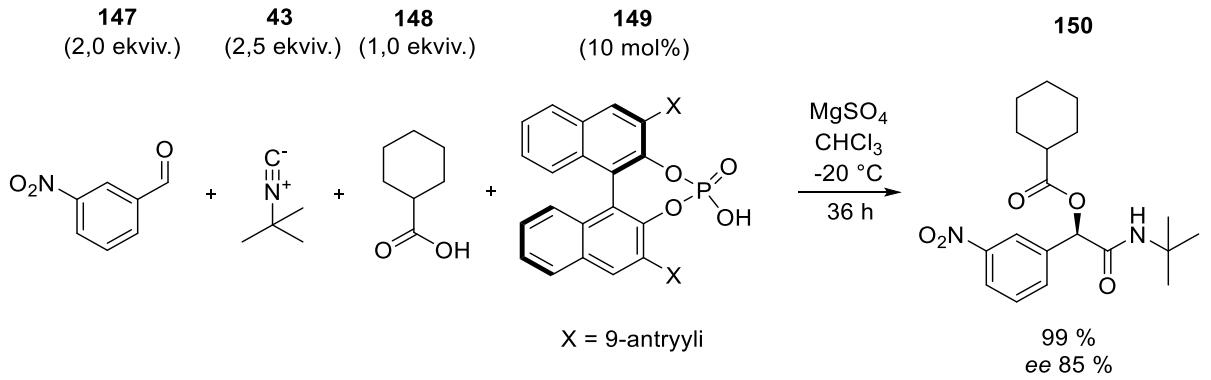


Kaavio 33. Aldehydin α,β-epoksidiryhmän vaikutus stereoselektiivisyyteen.[50]

2.6.3 Brønsted-Lowry-happo ohjaavana tekijänä

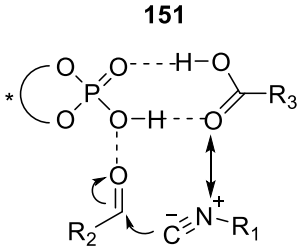
Ohjaavan ryhmän sisältävien Brønsted-Lowry-happojen on huomattu toimivan stereoselektiivisen klassisen Passerini-reaktion katalyyttinä. Zhang *et. al.*[51a] ovat havainneet kyseisen ilmiön. Katalyytit, jotka pohjautuivat kiraalisiin 1,1'-bi-2-naftoli- (binol) ja 1,1'-spirobiindaani-7,7'-dioli (spinol) -yhdisteisiin olivat rakenneyksiköitä. Zeng *et. al.*[51b] ovat tutkineet lisäksi katalyyttisiä fosforihappoja, jotka pohjautuivat kiraalisiin H_8-binol- ja binol-yhdisteisiin. Samankaltaisten katalyyttien on havaittu tutkimuksissa toimivan Ugi-reaktiossa stereoselektiivisyyden aiheuttajana.[52,53]

Stereoselektiivisen binol-pohjaisen (**149**) fosforihappokatalyytin toimintaa klassisessa Passerini-reaktiossa tutkittiin analysoimalla katalyytin ja reaktion muiden lähtöaineiden vuorovaikutusta ^{31}P NMR-spektreistä. Tällöin havaittiin, että kukin komponentti vuorovaikutti katalyytin kanssa siirtäen sen ^{31}P NMR-siirtymää alakentälle päin. Katalyytin, karboksyylihapon ja isonitriilin vuorovaikutus oli erityisen vahva. Useista testatuista binol- ja spinol-katalyyteistä korkein stereoselektiivisyys Passerini-tuotteille saatiin käyttäen katalyyttiä **149** (kaavio 34).[51a]



Kaavio 34. Kiraalinen fosforihappo stereoselektiivisenä katalyyttinä.[51a]

Kiraalisen fosforihapon ja karboksyylihapon on tutkittu muodostavan heterodimeerin, joka vahvistaa fosforihapon happamuutta ja karboksyylihapon nukleofiilisyyttä.[54] Hypoteesi on, että reaktion mekanismi pohjautuu tällaisen heterodimeerin muodostumiseen, johon karbonyyli ja isonitriili sitoutuvat. Välivaiheessa **151** vuorovaikutuksen komponenttien välillä on arveltu aiheuttavan stereoselektiivisyyden (kaavio 35).[51a]



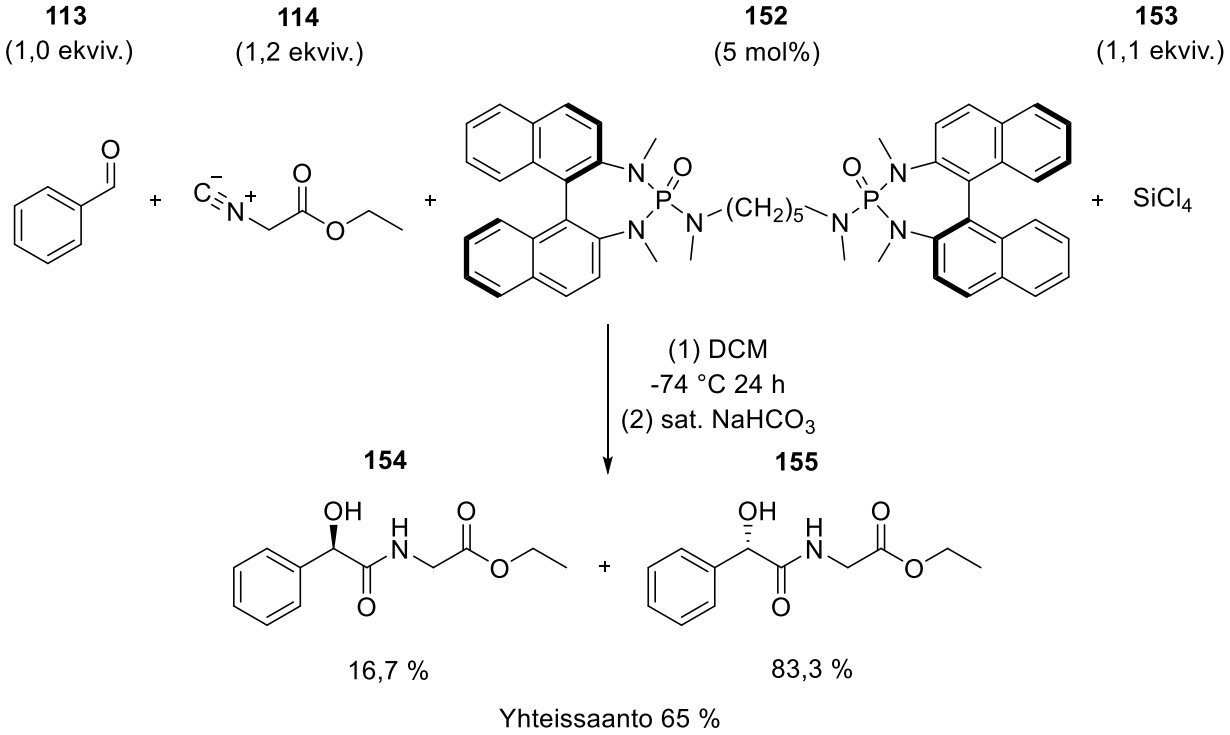
Kaavio 35. Hypoteesi stereoselektiivisen reaktion välivaiheesta.[51a]

2.6.4 Lewis-happo ohjaavana tekijänä

Konseptia Lewis-happojen aktivoimisesta kiraalisilla Lewis-emäksillä on hyödynnetty aldehydien stereoselektiivisissä aldol-reaktioissa, joissa nukleofiilinä on käytetty esimerkiksi silyyliketeeni-asetaaleja. Esimerkiksi heikosti hapan silyylitetrakloridi ($SiCl_4$) voidaan aktivoida vahvalla Lewis-emäksellä, kiraalisella fosforiamidilla, jolloin muodostuu Lewis-hapan kiraalinen reagenssi. Reagenssin muodostumisen toimintamekanismi on kiraalisien Lewis-emäksisten yksiköiden sitoutuminen Lewis-happoon, silyyliyhdisteeseen.[55] Seuraavissa kappaleissa esitetyt Lewis-hapoilla suoritetut Passerini-reaktiot ovat luonteeltaan katalyyttisiä.

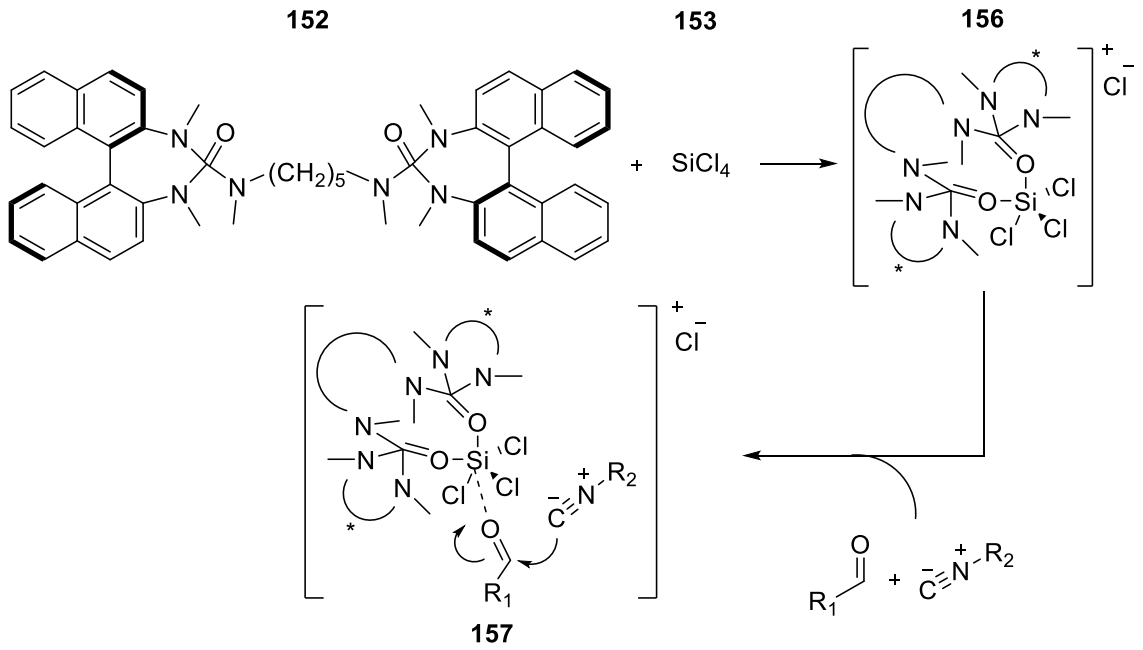
Kiraalinen bisbinaftyylifosforiamidi (**152**) sisältää kaksi Lewis-emäksistä yksikköä. Reagoidessaan Lewis-hapon $SiCl_4$ (**153**) kanssa, muodostaa se kiraalisen reagenssin. Kyseisen yhdisteen katalyyttistä toimintaa on tutkittu Passerini-reaktiossa ja sen havaittiin muodostavan Passerini-tuotteen eri enantiomeerien suhteilla. Yksi tutkituista lähtöaineista oli

karboksylaattiesterin α-hiilessä sisältävä isonitriili (**114**) (kaavio 36). Sen ei raportoitu syklisoituvan 5-alkyylioksioksatsoliyhdisteeksi.[56]



Kaavio 36. Esimerkkireaktio esterisivuketjun sisältävän isonitriilin stereoselektiivisestä reaktiosta.[56]

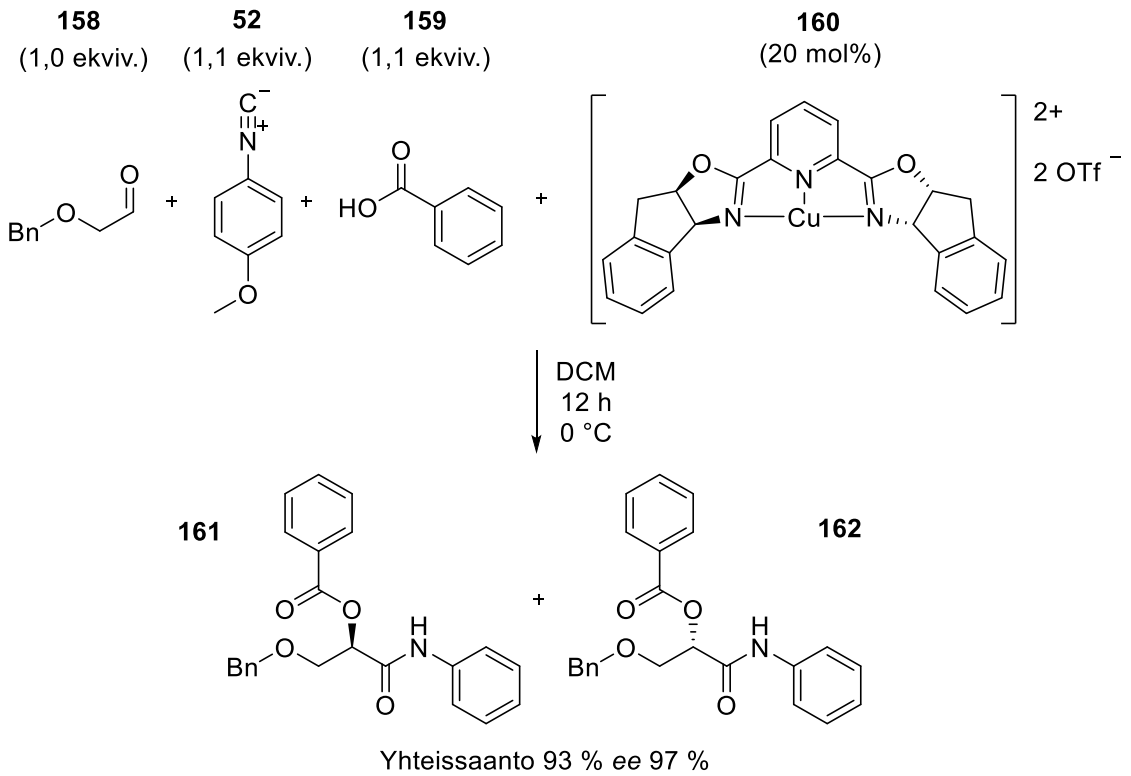
$SiCl_4$ (**153**) sitoutuu kiraalisen reagenssin muodostamaan taskuun siten, että kloridianioni lohkeaa ja muodostuu kiraalisen reagenssin kationi (välivaihe **156**) (kaavio 37).[57] Tähän reagenssiin karbonyyli sitoutuu, jonka jälkeen tapahtuu isonitriilin stereoselektiivinen hyökkäys. Kloridianioni lohkeaa kiraalisesta katalyytistä ja muodostuu nitriliumkationi. Reaktion sammutusvaiheessa lisätty $NaHCO_3$-vesiliuos hydrolysoi nitriliumkationin/imidoyylikloridin ja silyylieetterin siten, että muodostuu α-hydroksiamidi.



Kaavio 37. Hypoteesi mekanismille.[57]

Reaktio toteutettiin artikkelissa toisin, lisäten välivaiheen nitriliumkationiin/imidoyylikloridiin metanolia. Tällöin lopputuotteeksi $NaHCO_3$-vesiliuoksella tehdyn hydrolyysin jälkeen saatiin α-hydroksimetyyliesteri. Tutkimuksessa havaittiin myös, että $SiCl_4$ ilman erillistä Lewis-emästä/katalyyttiä toimi reaktiossa happokomponenttina.[56]

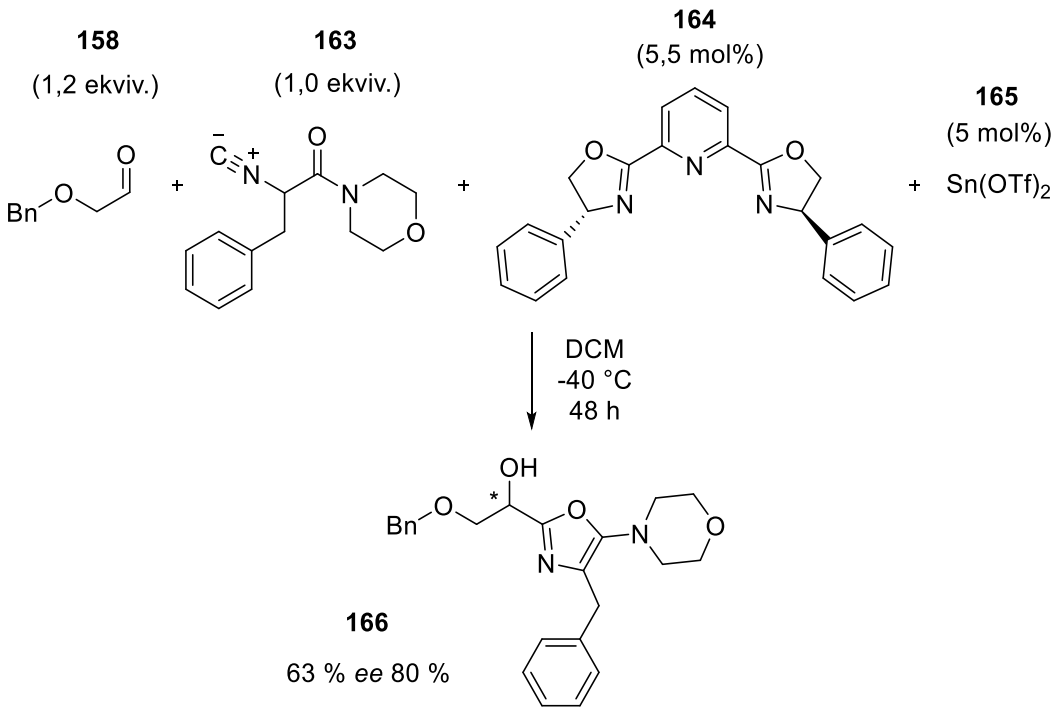
Myös box ((*S,S*)-bis(oksatsoliini))- ja pybox (bis(oksatsoliini)pyridiini)-ligandeja on hyödynnetty Passerini-reaktiossa. Andreana *et. al.*[58] ovat tutkineet kyseisten ligandien ja Cu^{2+}-suolojen toimintaa stereoselektiivisessä Passerini-reaktiossa. Kohteena ligandeista olivat substituoidut kaksihampaiset box- ja kolmihampaiset pybox-ligandit ja aminoindanolipohjainen pybox-analogi **160**. Kokeissa havaittiin, että jokainen kiraalinen ligandi tuotti yli 50 % enantiomeeristä ylimäärää ja korkein lukema saatiin käyttäen ligandia **160**. Korkeimman enantioselektiisyyden antoi metodi, jossa ligandin ja aldehydin seokseen lisättiin hitaasti karboksyylihappo ja isonitriili (kaavio 38).



Kaavio 38. Pybox-ligandi kaksihampaisen aldehydin kanssa stereoselektiivisessä reaktiossa.[58]

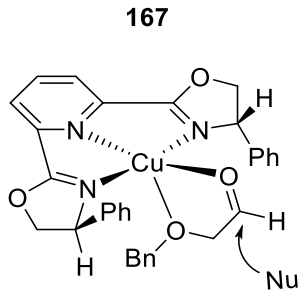
Edellisessä tutkimuksessa karbonyylijohdannaisia muunneltaessa havaittiin, että yksihampaisesti koordinoituvien (kuten bentsaldehydi) käyttö ei aiheuttanut juurikaan enantioselektiivisyyttä. Sen sijaan enantioselektiivisyys havaittiin esimerkiksi silloin, kun kohteena olivat kaksihampaiset furfuraali ja 2-tiofeenikarboksaldehydi. Heikon Lewis-hapon, $Cu(OTf)_2$:n käyttö reagenssina kiraalisen ligandin sijaan aiheutti pienen saannon Passerini-tuotetta.[58]

Edellisen tutkimuksen tapaan, myös ligandi **164** sisältää Lewis-emäksiset hampaat. Sen toimintaa kiraalisena katalyyttinä sitoutettuna Lewis-happoon $Sn(OTf)_2$ on tarkasteltu Wang *et. al.*[13] tutkimuksessa. Isonitriilikomponentin α-hiilessä käytettiin karboksylaattiamidia ja karbonyylijohdannaisena kaksihampaista (bentsyylioksi)asetaldehydia (**158**). Tutkimuksen teoreettinen pohja oli, että isonitriilin karboksylaattiamidiryhmä sitoutuisi Lewis-emäksenä kiraaliseen katalyyttiin ja haittaisi stereoselektiivistä reaktiota. Näin ei huomattu tapahtuvan, vaan Passerini-tuotteita muodostui eroavalla stereoselektiivisellä suhteella. Reaktiossa nitriliumkationin muodostuttua, nukleofiilinen karbonyyli (karboksylaattiamidiryhmä) reagoi intramolekylaarisesti muodostaen syklisoituneen 5-amino-oksatsolin **166** (kaavio 39).



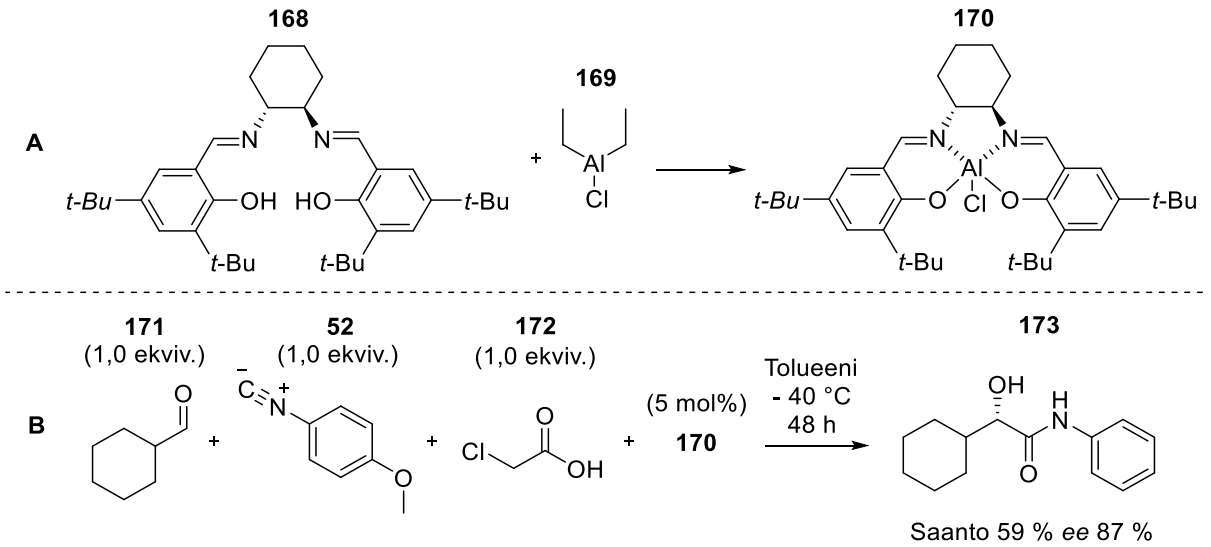
Kaavio 39. Isonitriilin sivuketjun karboksylaattiamidiryhmä syklisoitui 5-amino-oksatsoliyhdisteeksi.[13]

Kaksihampainen aldehydi **158** sitoutuu kiraaliseen Lewis-happoreagenssiin siten, että muodostuu tuote **167**. Tällöin karbonyyliin voi tapahtua stereoselektiivinen hyökkäys (kaavio 40). Evans *et. al.*[59] ovat havainneet, että nukleofiilinä voidaan käyttää enol-silaaneja. Kyseessä on silloin aldol-reaktio.



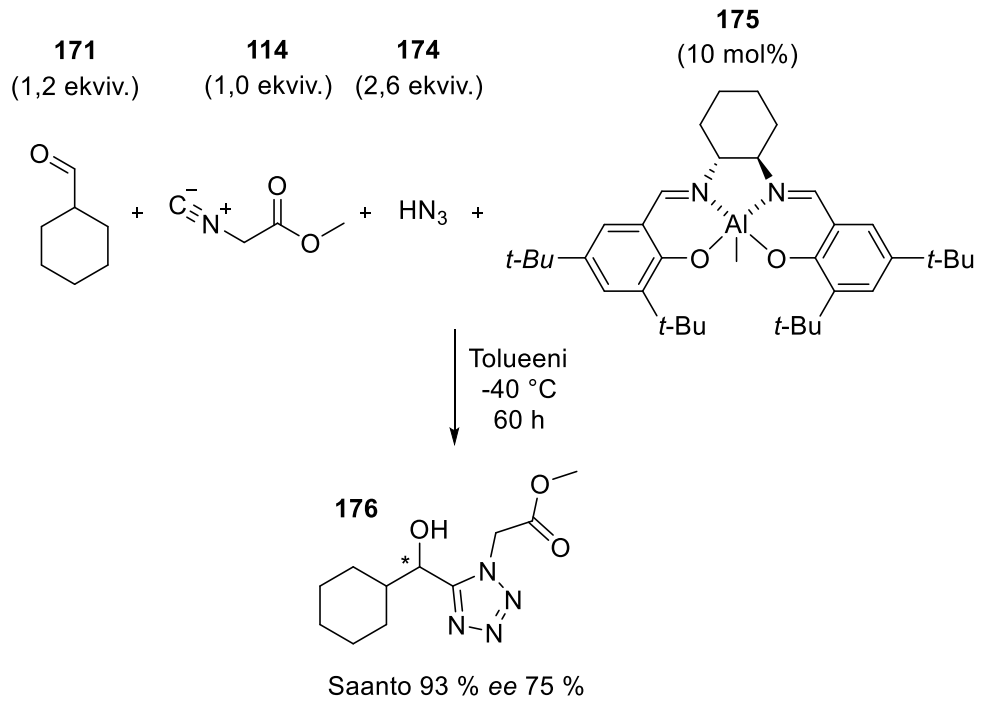
Kaavio 40. Stereoselektiiviselle hyökkäykselle olennainen välivaihe.[59]

Lewis-emäksiset yksiköt salen-pohjaisessa (*N,N'*-etyleenibis(salisyyli-imiini)) ligandissa **168** kykenevät reagoimaan Lewis-hapon kanssa. Wang *et. al.*[60] ovat havainneet, että Lewis-hapon Et_2AlCl (**169**) ja ligandin **168** muodostama kiraalinen reagenssi **170** reagoi stereoselektiivisenä katalyyttinä Passerini-reaktiossa (kaavio 41, osiot A ja B). Passerini-reaktion havaittiin toimivan klassisen menetelmän tapaan myös ilman lisättyä Lewis-happokatalyyttiä, joten optimoidussa enantioselektiivisessä reaktiossa karboksyylihappo lisättiin hitaasti muiden komponenttien sekaan.



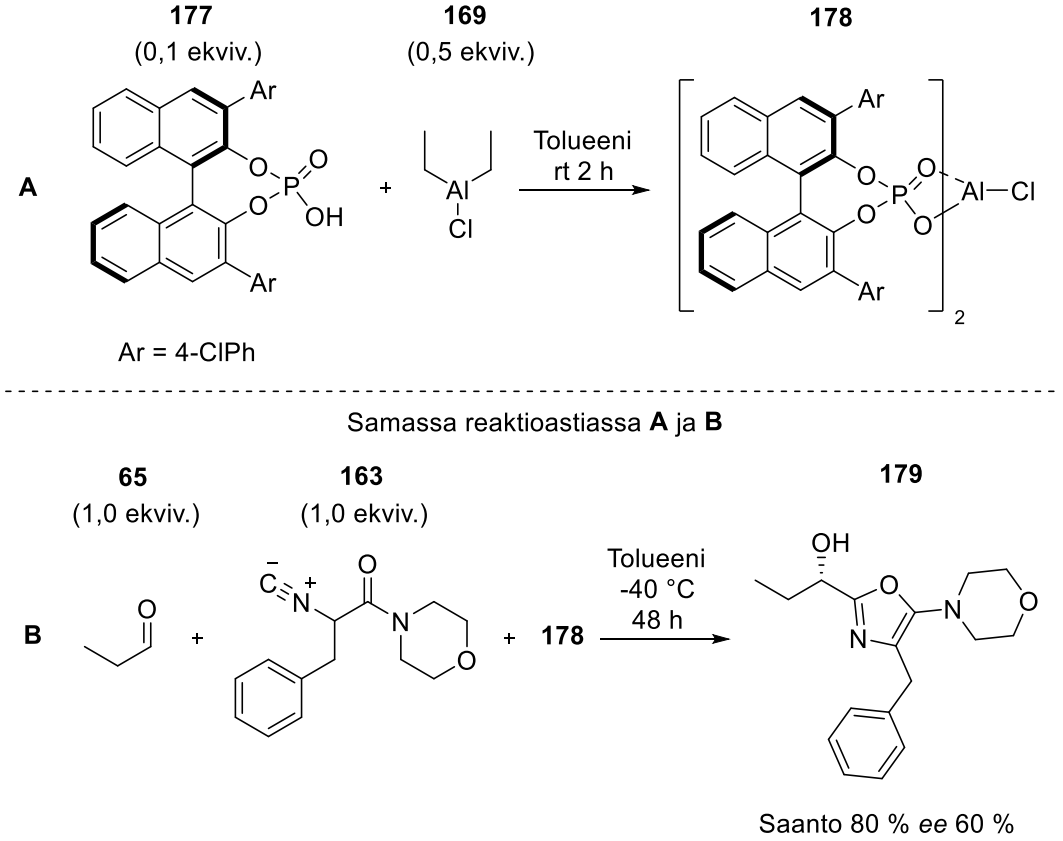
Kaavio 41. Alumiinipohjainen Lewis-happo stereoselektiivisessä reaktiossa.[60]

Yue *et. al.*[61] ovat tutkineet myös salen-ligandia **170** Passerini-reaktion komponenttina. Yhdisteen **170** haittapuolena on alumiiniyksikössä substituenttina oleva kloridiryhmä, joka voi mahdollisesti toimia nukleofiilinä. Passerini-reaktion edetessä, kloridiryhmä voi reagoida nitriliumkationin kanssa ja muodostaa vedellä tehdyssä uuttovaiheessa hydrolyysituotteen, α-hydroksiamidin. Katalyyttiin tehtiin rakenteellinen muutos, jossa kloridiryhmä korvattiin metyyliryhmällä. Tutkimuksen pohjana oli nukleofiilinen atsidiryhmä, jonka havaittiin syklisoituvan Passerini-reaktion edetessä tetratsoliyhdisteeksi **176** (kaavio 42). Atsidiryhmän lähteenä käytettiin vetyatsidia (HN_3), mutta trimetyylisilyyliatsidin ($TMSN_3$) havaittiin myös toimivan seulontareaktioissa.



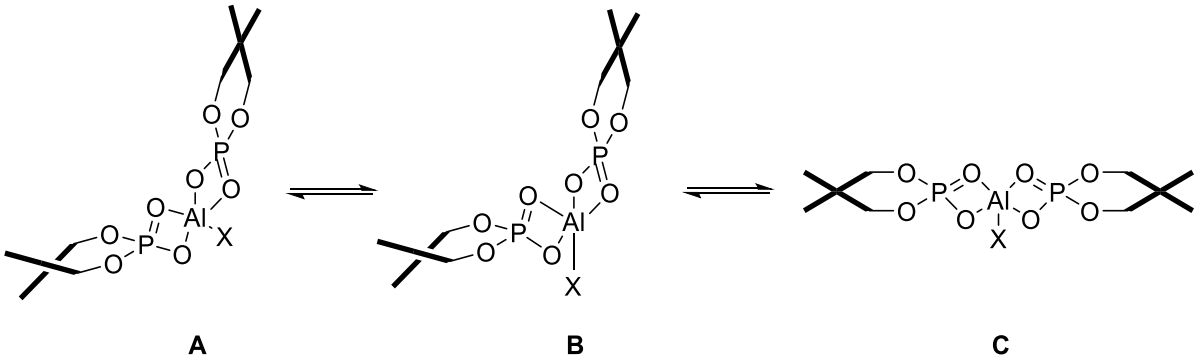
Kaavio 42. Tetratsoliyhdisteen stereoselektiivinen synteesi.[61]

Ohjaavan binol-fragmenttiyksikön sisältävien fosforihappojen on todettu toimivan stereoselektiivisessä Passerini-reaktiossa katalyyttisinä Brønsted-Lowry-happoina.[51] Yue *et. al.*[14] ovat havainneet, että kyseisen katalyytin rakenne- ja toimintaperiaate on mahdollista muuttaa siten, että Brønsted-Lowry-happoon (**177**) sidotaan Lewis-happo Et_2AlCl (**169**). Muodostunut reagenssi (**178**) toimii täten Lewis-happona (kaavio 43, osio A). Artikkelissa tutkittiin isonitriilejä, joiden α-hiili sisälsi nukleofiilisen karboksylaattiamidin. Tuotteeksi saatiin 5-amino-oksatsoliyhdiste (**179**) (kaavio 43, osio B). Kun tutkimuksessa seulottiin katalyyttistä toimintaa, havaittiin, että fosforihapolla (yhdiste **177**, mutta Ar = Ph) tehty reaktio ilman lisättyä Et_2AlCl (**169**) muodosti heikolla stereoselektiivisyydellä tavoitetuotetta.[14]



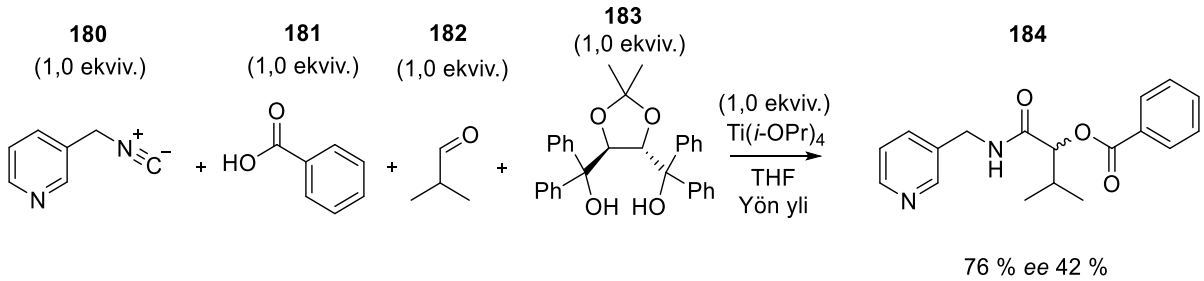
Kaavio 43. Kiraalisen fosforihapon ja Lewis-hapon muodostama katalyytti Passerini-reaktiossa.[14]

Katalyytin **178** toiminnalle hypoteesi oli, että se voi olla kolmessa eri avaruudellisessa konformaatiossa A, B ja C (kaavio 44). Niiden erillistä katalyyttistä toimintaa ei tutkittu, mutta yhdisteen C arveltiin toimivan parhaimman enantioselektiivisyyden katalyyttinä.[14]



Kaavio 44. Nähtävissä cis-alfa- (A), cis-beta- (B) ja trans-kompkeksi (C). Trans-kompleksissa on vain yksi koordinaatiokeskus.[14]

Satojen eri Lewis-happojen, kuten CuOTf, $BF_3{\cdot}OEt_2$ ja $AlCl_3$, ja kiraalisten ligandien, kuten (*R*)-binol ja di-isopropyyli (*R*)-tartraatti, muodostamien yhdisteiden vaikutuksia stereoselektiivisyyteen Passerini-reaktiossa ovat tutkimuksessaan tarkastelleet Kusebauch *et. al.*[62]. Tutkimuksen tuloksena todettiin, että monilla kiraalisilla reagensseilla tehty reaktio muodosti paljon sivutuotteita tai ei ollenkaan tavoitetuotetta α-asyloksiamidia. Monissa reaktioissa havaittiin, että muodostuikin tuote α-hydroksiamidi, uuttovaiheen veden toimiessa nukleofiilinä. Lupaavimman stereoselektiivisyyden tuotteelle α-asyloksiamidi antoi Lewis-happo Ti(*i*-OPr)$_4$ kiraalisten ligandien ollessa **183** (kaavio 45).



Kaavio 45. Kiraalisella diolilla **183** muodostettu stereoselektiivinen reaktio.[62]

Artikkelissa titaniumkompleksien, jotka ovat muodostuneet yhdisteistä Ti(*i*-OPr)$_4$ ja kiraalinen ligandi **183**, on arvioitu muodostavan komplekseja monomeerisiä tai oligomeerisiä yhdisteitä. Stereoselektiivisyydelle tärkeänä reagenssina pidettiin kuitenkin Ti(*i*-OPr)$_4$:n sitoutumista kiraalisen diolin **183** kahden hydroksyyliryhmän väliseen taskuun. Tällöin muodostuvat kovalenttiset sidokset diolin ja Ti(*i*-OPr)$_4$:n kanssa siten, että kaksi isopropanolimolekyyliä lohkeaa pois. Muodostunut kiraalinen reagenssi toimii täten karbonyylin aktivoijana Lewis-hapon tapaan, suosien isonitriilin stereoselektiivistä hyökkäystä. Nukleofiilinä toimii karboksyylihappo, jolloin reaktiopolusta lopputuotteeksi saadaan α-asyloksiamidi. Kun tutkijat määrittelivät lähtöaineiden määriä, he havaitsivat, että Ti(*i*-OPr)$_4$:n ja ligandin määrien ollessa alle stoikiometriset, väheni reaktion

enantioselektiviisyys huomattavasti. Artikkelissa pohdittiin myös isonitriilin mahdollista koordininoitumista titaniumkompleksiin.[62]

Artikkelissa mainittiin lyhyesti, että oli useita Lewis-happojen ja ligandien kombinaatioita, joilla saatiin lupaavia stereoselektiivisyyksiä. Lewis-hapoista mukana olivat esimerkiksi $Zn(OTf)_2$ ja $BF_3{\cdot}OEt_2$. Niiden reaktioissa havaittiin kuitenkin suuri määrä sivutuotteita. Artikkelissa ei käyty tarkemmin läpi näiden sivutuotteiden karakterisointia, eikä muodostuneen α-asyloksiamidin tai α-hydroksiamidin enantiomeerisuhdetta.[62]

3. Yhteenveto katalysoimattomista ja katalysoiduista reaktioista

Yhteenvetona edellisissä luvuissa tarkastelluista reaktioista voidaan johtaa, että katalysoimattomien ja katalysoitujen Passerini-reaktioiden komponenttien kemiallisten rakenteiden välillä on yhteys. Voidaan todeta, että katalyyttisen ominaisuuden aiheuttaa usein happokomponentti, Brønsted-Lowry- tai Lewis-happo. Reaktion muiden komponenttien (karbonyylin tai aldehydin) käyttö katalyytteinä ei onnistu, sillä ne ovat rajoittavana tekijänä Passerini-tuotteiden muodostumiselle.

Passerini-reaktiossa liuotin voi myös toimia katalyyttinä. Laskennallisen kemian avulla tarkasteltu klassisen Passerini-reaktion mekanismi käyttäen liuotinmallia, joka kuvasi dikloorimetaania ja metanolia, antoi tulokseksi tarkennetun ionisen mekanismin. Kriittisen vaiheen, Mumm-toisiintumisen, havaittiin vaativan organokatalyyttisen ympäristön. Ominaisuus tähän havaittiin olevan niin lähtöaineella (karboksyylihapolla) kuin liuottimena olleen happaman protonin sisältävällä metanolilla. Karboksyylihapolla havaittiin olevan energeettisesti edullisemmat katalyyttiset ominaisuudet.[11]

Brønsted-Lowry-happojen käyttöä katalyytteinä Passerini-reaktiossa on tutkittu vähän. Aiemmissa luvuissa tarkasteltiin kiraalisen yksikön, binol-, spinol- tai H_8-binol-fragmenttien sisältävien fosforihappojen stereoselektiivisiä tutkimuksia.[51] Lisäksi tarkasteltiin katalysoimattomia reaktioita, joista nähtiin, että mineraalihappoja on mahdollista käyttää Passerini-komponentteina. Rakenne-aktiivisuussuhde happokomponenteilla havaittiin siitä, että fosforihapon analogilla, fosfiinihapolla, on suoritettu onnistuneesti Passerini-reaktio.[29]

Lewis-hapot ovat osoittautuneet kiinnostaviksi hyödyntää Passerini-reaktiossa. Lewis-happoja on mahdollista käyttää siten, että nitriliumkationille nukleofiilinä toimii joko Lewis-hapon substituentti tai erillinen reaktantti, kuten karboksyylihappo. Lewis-hapon ainoaksi tehtäväksi

voi jäädä siten katalyyttinen karbonyylin aktivoiminen isonitriilin hyökkäykselle. Vahvoja Lewis-happoja voidaan käyttää katalyytteinä, mikäli karboksyylihappo ei aiheuta riittävää karbonyylijohdannaisen aktivoitumista. Lewis-happojen rakenne-aktiivisuussuhde on nähtävissä booriyhdisteillä tehdyissä Passerini-reaktioissa. Boori- ja substituoidut boroni- ja borinihappo reagoivat jokainen Lewis-happokomponenttina muodostaen Passerini-tuotteen.[39,40] Kyseisten yhdisteiden helposti hydrolysoituva esterisidos mahdollistaa myös niiden katalyyttisen käytön.[40] Silyyliyhdisteillä on havaittavissa vastaavaa yhteyttä. Silyyliyhdisteessä nukleofiilinä nitriliumkationille havaittiin toimivan hydroksyyli-[37], atsidi-[38] ja kloridiryhmä[12]. Lisäksi silyyliyhdisteellä TMSCl ja sinkkiyhdisteellä $Zn(OTf)_2$ havaittiin toisiaan voimistava vaikutus katalyyttisenä komponenttina.[12] Lewis-happojen, jotka sisältävät nukleofiilisen yksikön, kuten kloridiryhmän, havaittiin reagoivan nitriliumkationivälivaiheen kanssa. Lisäksi huomattiin tarpeelliseksi, että nukleofiilinen yksikkö muunnettiin vähemmän nukleofiilisempaan, jotta sivutuotteita ei muodostuisi.[61]

Lewis-hapoista ja kiraalisista Lewis-emäksistä voidaan muodostaa uusia kiraalisia Lewis-happoja, joita on hyödynnetty Passerini-reaktion tutkimuksissa. Nämä kiraaliset Lewis-hapot voivat toimia stereoselektiivisissä Passerini-reaktoissa happokomponenttina. Silti stereoselektiivisen Passerini-reaktion toteuttaminen näiden reagenssien avulla on osoittautunut hankalaksi. Tutkimuksissa on havaittu, että stereoselektiivisyys saattaa vaatia esimerkiksi kaksihampaisesti koordinoituvia karbonyylijohdannaisia. Muuten reaktiot eivät olleet stereoselektiivisiä.

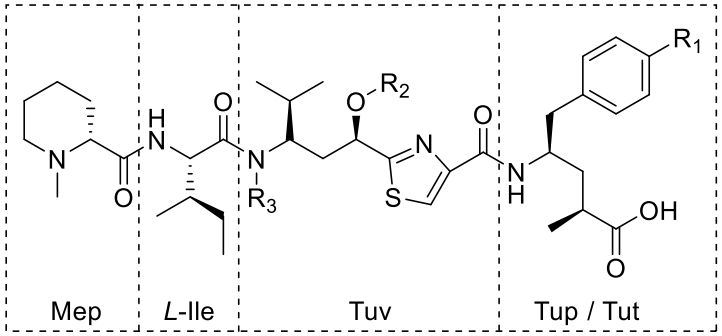
4. Katalysoitu Passerini-reaktio luonnonainesynteesissä

Passerini-reaktiota on hyödynnetty luonnonaineiden synteeseissä. Esimerkiksi luonnonaineet eurystatiini A[63] ja syklotheonamidi C[64] on syntetisoitu käyttäen klassista versiota. Lapidilektiini B, grandilodiini C, lapidilektiini A, lapidilektaami, grandilodiini A, isolapidilektiini A ja grandilodiini B on syntetisoitu Miloserdov *et. al.*[65] tutkimuksessa käyttäen apuna aiemmin esitettyä menetelmää[56], joka pohjautui Lewis-hapon $SiCl_4$ ja katalyyttisen määrän ligandia pyridiini-*N*-oksidia (PyNO) muodostamaan Passerini-reaktioon. Katalysoitua Passerini-reaktiota Lewis-hapolla BF_3 on käytetty tubulysiini U:n ja V:n synteeseissä.[66]

Koska edellä on tarkasteltu laajasti Passerini-reaktion teoriaa ja toteutusta, valittiin luonnonainesynteesin osiota varten vain katalysoidulla Passerini-reaktiolla syntetisoidut luonnonaineet tubulysiini U ja V. Näiden totaalisynteesien reaktiot käydään läpi.

Tubulysiinit (**185-191**, kaavio 52) ovat erittäin vahvoja tubuliinin polymerisaation inhibiittoreita. Tästä syystä niiden on arveltu toimivan vaikeasti hoidettavissa olevien syöpien sytostaattihoidoissa. Tubulysiini U:ta ja V:tä on eristetty vain pieniä määriä mykobakteereista *Archangium gephyra* ja *Angiococcus disciformi*.[67]

Rakenteeltaan tubulysiinit ovat tetrapeptidejä, joiden rakennefragmentit ovat *N*-metyylipipekoliinihappo (Mep), L-isoleusiini (L-Ile), tiatsoliryhmän sisältävä tubuvaliini (Tuv) ja kahdesta eri γ-aminohaposta koostuva fragmentti tubutyrosiini (Tut) tai tubufenyylialaniini (Tup). Monella näistä on rakenteessa asetyloitu alkoholi ja *N,O*-asetaali tubuvaliinifragmentissa (kaavio 46).[67]

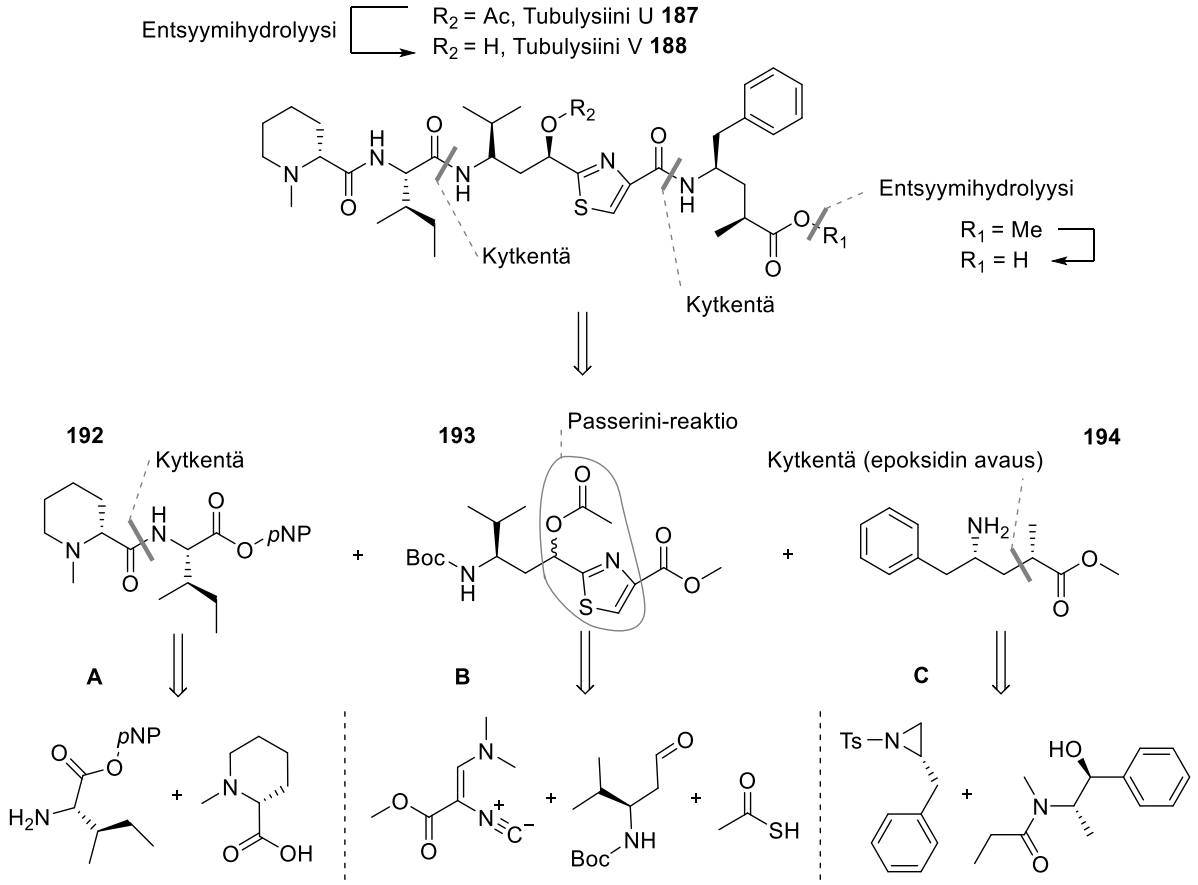


185 Tubulysiini A, R_1 = OH, R_2 = Ac, R_3 = $CH_2OC(O)CH_2CHMe_2$
186 Tubulysiini D, R_1 = H, R_2 = Ac, R_3 = $CH_2OC(O)CH_2CHMe_2$
187 Tubulysiini U, R_1 = H, R_2 = Ac, R_3 = H
188 Tubulysiini V, R_1 = H, R_2 = H, R_3 = H
189 Tubulysiini W, R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = $CH_2OC(O)CH_2CH_2Me$
190 Tubulysiini X, R_1 = OH, R_2 = Ac, R_3 = H
191 Tubulysiini Z, R_1 = OH, R_2 = H, R_3 = H

Kaavio 46. Tubulysiinien kemialliset rakenteet.[67]

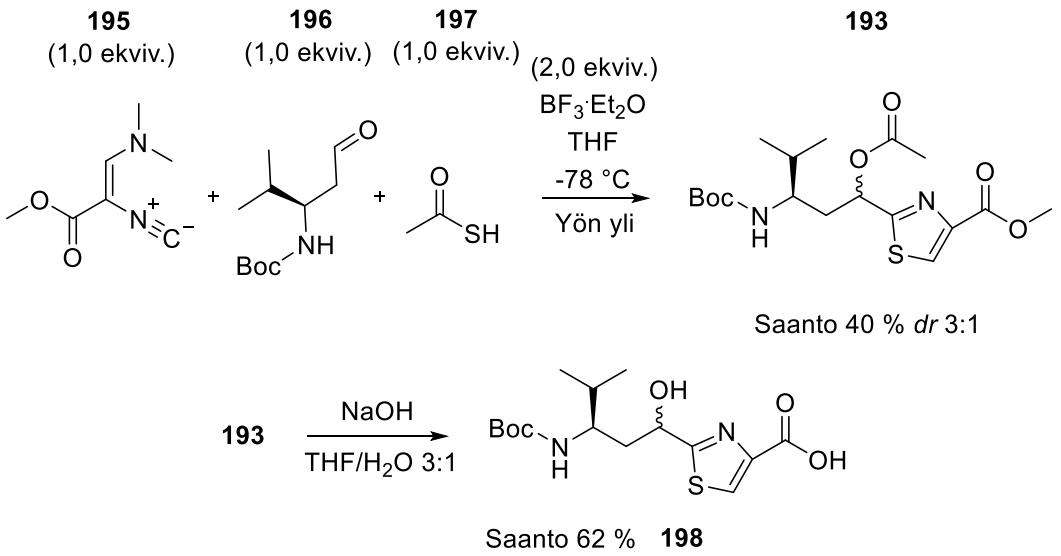
Tubulysiinien synteesi on osoittautunut hankalaksi. Tämä johtuu siitä, että vain yksi tetrapeptidin fragmentti (L-Ile) koostuu luonnossa erillisenä esiintyvänä aminohappona. Rakenteen keskiössä oleva fragmentti (Tuv) sisältää kaksi stereogeenistä keskusta ja myös tiatsolirenkaan. Kaksi stereogeenistä keskusta sisältää myös oikeanpuolimmainen fragmentti (Tup / Tut). Synteesejä hankaloittaa niiden monet funktionaaliset ryhmät ja myös se, että osassa tubulysiineistä on helposti hajoava *N,O*-asetaali.

Dömling *et. al.*[66] kehittivät ensimmäisen tubulysiini U:n ja V:n synteesin, jossa Tuv-fragmentin synteesi toteutettiin käyttäen katalysoitua Passerini-reaktiota. Retrosynteettinen analyysi on nähtävissä kaaviossa 47.



Kaavio 47. Retrosynteettinen analyysi raportoidusta tubulysiini U:n ja V:n synteeseistä.[66]

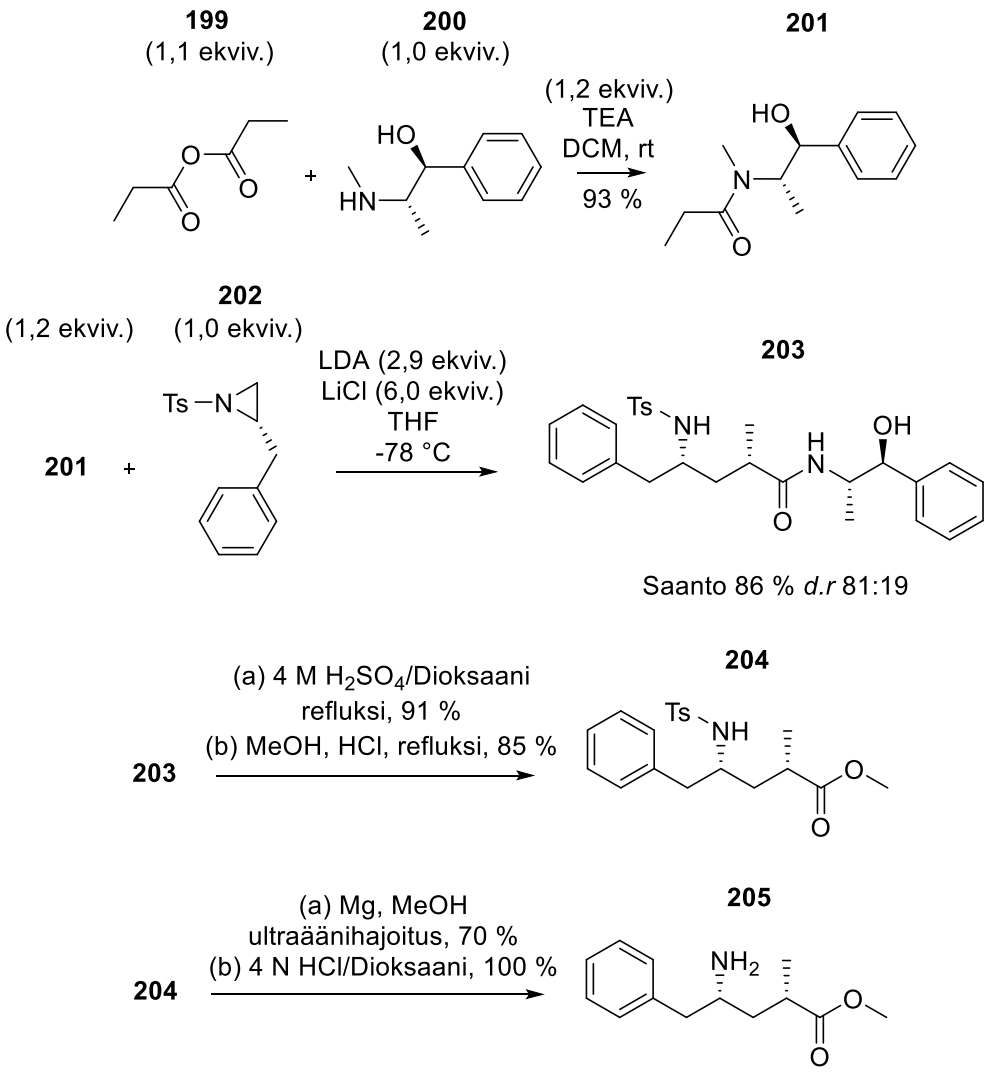
Tuv-fragmentin synteesi toteutettiin yhdessä astiassa käyttäen lähtöaineina Schöllkopfin isonitriiliä **195**, *N*-Boc-suojattua L-homovaliinialdehydiä **196**, tioetikkahappoa **197** ja katalyyttinä Lewis-happoa $BF_3{\cdot}Et_2O$. Katalyytin ja karbonyylin seokseen lisättiin hitaasti tioetikkahapon ja isonitriilin seos. Tällöin tiatsolirenkaan sisältävä Passerini-tuote **193** saatiin 40 % saannolla ja diastereomeerien suhteen ollessa 3:1. Muodostuneet esterit hydrolysoitiin emäsolosuhteissa, jotta saatiin muodostettua jatkoreaktioihin soveltuva hydroksihappo (**198**) (kaavio 48).[66]



Kaavio 48. Tuv-fragmentin synteesipolku.[66]

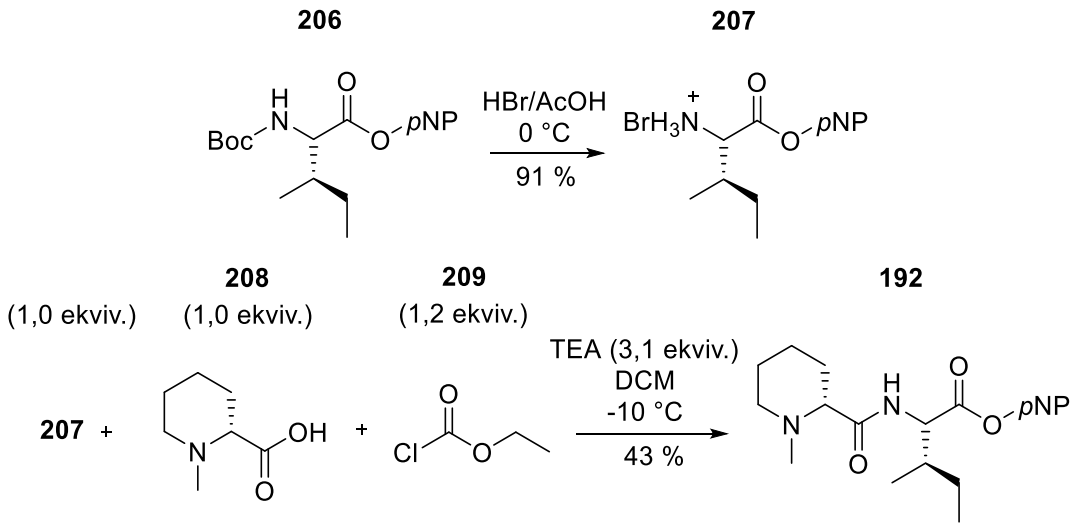
Käytetyn Passerini-reaktion mekanismin pohjana pidetään aldehydin aktivoimista katalyytillä $BF_3{\cdot}Et_2O$, jolloin isonitriili voi toimia nukleofiilinä. Vaikka Lewis-happo $BF_3{\cdot}Et_2O$ oli reaktiossa katalyyttinä, oli sitä kuitenkin ylimääränä suhteessa muihin lähtöaineisiin. Henkel *et. al.*[68] ovat tutkineet, että katalyytin määrä oli samantyyppisessä tiatsoli-Passerini-reaktiossa mahdollista pitää jopa 10 mol % ilman, että saantoon oli juurikaan vaikutusta. Samassa artikkelissa havaittiin myös, että reaktion edellytyksenä oli alhainen lämpötila –78 °C, jotta sivutuotteita, kuten 2-hydroksitiatsolituotetta, ei muodostunut liikaa.

Tup-fragmentin synteesi aloitettiin rakentamalla ohjaava ryhmä stereokeskusten muodostumiseen. Pseudoefedriini amidoitiin ensin propionamidiksi, jonka jälkeen vahvan emäksen litium di-isopropyyliamidin (LDA) avulla amidin α-hiili deprotonoitiin. Tämä toimi nukleofiilinä lähtöaineen **202** epoksidirenkaan avauksessa. Diastereomeerien suhteiksi saatiin 81:19 ja saannoksi 86 %. Seuraavassa vaiheessa ohjaava ryhmä, pseudoefedriini hydrolysoitiin pois rikkihapon avulla ja muodostunut karboksyylihappo esteröitiin metyyliesteriksi **204**. Seuraaviin reaktioihin soveltuva tuote **205** saatiin, kun amiiniryhmän tosylaattisuojaus poistettiin ja esteröinti suoritettiin uudelleen hydrolysoituneeseen karboksyylihappoon samassa reaktiossa (kaavio 49).[66]



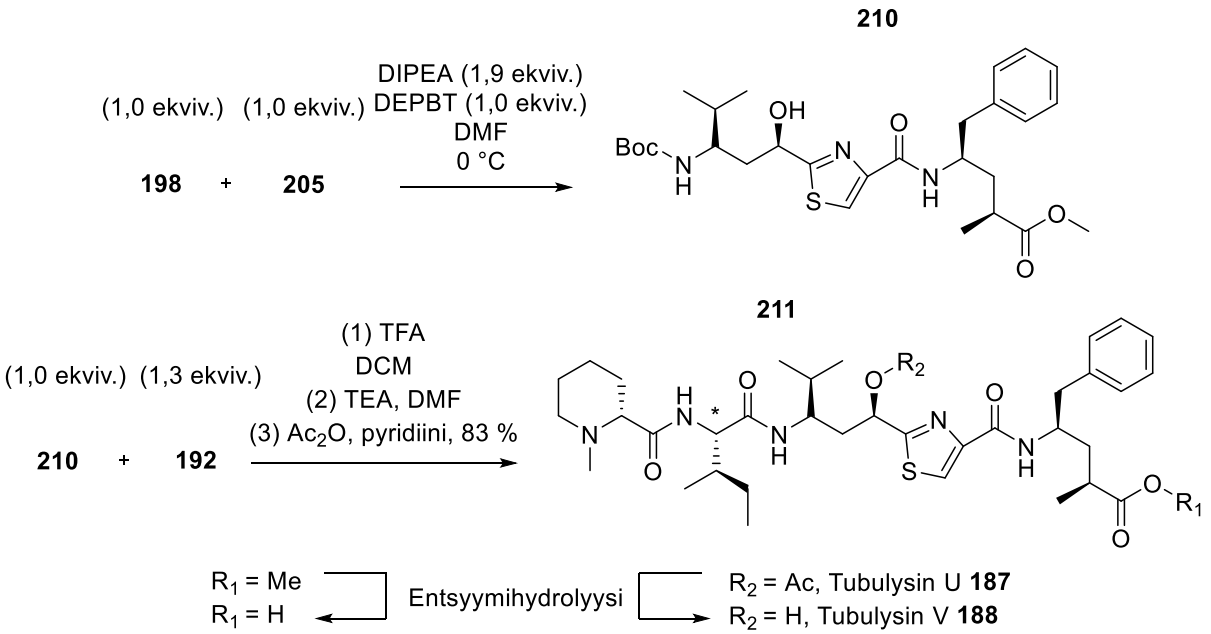
Kaavio 49. Tup-fragmentin synteesipolku.[66]

Mep-L-Ile-fragmentin synteesin lähtöaineena oli amiiniryhmästä ja karboksyylihaposta suojattu aminohappojohdannainen **206**. Amiiniryhmän Boc-suojaus poistettiin happohydrolyysillä, jolloin D-pipekolihappo (**208**) liitettiin siihen. Tämä tapahtui käyttäen seka-anhydridimenetelmää, jossa D-pipekolihapon karboksyylihapporyhmästä muodostettiin seka-anhydridi etyylikloroformiaatin (**209**) avulla. Amidointireaktion tuotteeksi saatiin 39 % saannolla tuote **192**, jossa karboksyylihappo on suojattu 4-nitrofenyyliryhmällä (*p*NP) (kaavio 50).[66]



Kaavio 50. Mep-L-Ile-fragmentin synteesipolku.[66]

Tuv-fragmentti (**198**) kytkettiin Tup-fragmenttiin (**205**) käyttäen kytkentäreagenssia 3-(dietoksifosforyylioksi)-1,2,3-bentsotriatsi-4-(3*H*)-oni (DEPBT) ja emästä di-isopropyylietyyliamiini (DIPEA) (tuote **210**). Totaalisynteesien viimeisiä vaiheita yritettiin ensin käyttäen polkua, jossa Tup-Tuv-fragmentista poistettiin amiinin suojaus, jonka jälkeen siihen kytkettiin *N*-Cbz-suojattu L-Ile-fragmentti. Viimeisen vaiheen reaktio, D-Mep-fragmentin kytkentä, ei kuitenkaan onnistunut hyvin. Sivutuotteita muodostui paljon ja tavoitetuotetta **210** saatiin korkeintaan 10 % saannolla, joten tästä polusta päätettiin luopua. Seuraava polku toteutettiin tekemällä kytkentäreaktio suojausryhmästä (*p*NP) poistetulle Mep-L-Ile-fragmentille ja yhdisteelle **210**. Tässä L-Ile-fragmentin α-hiili kuitenkin epimerisoitui kvantitatiivisesti, mutta saannoksi saatiin 83 %. Diastereomeerit erotettiin ja entsyymihydrolyysin jälkeen saatiin tuotteet tubulysiini U ja V (kaavio 51).[66]



Kaavio 51. Tubulysiini U:n ja V:n synteesien viimeiset reaktiot.[66]

5. Yhteenveto

Tutkielman kirjallisessa osiossa tehtiin katsaus Passerini-reaktioihin ja sen muunnelmiin. Tutkimuksista kävi ilmi, että reaktion komponentit, isonitriili, karbonyylijohdannainen ja Brønsted-Lowry- tai Lewis-happo ovat laajasti vaihdettavissa. Karbonyylijohdannaisiin havaittiin soveltuvan ketonit ja aldehydit, joista vähäisen steerisen esteen sisältävillä aldehydeillä on korkeampi reaktiivisuus. Vähemmän reaktiivisten αβ-tyydyttymättömien aldehydien[28,29] tapauksessa saannot jäivät usein pieneksi ja reaktioajat pitkiksi. Isonitriilien kemiallisen rakenteen havaittiin vaikuttavan reaktiivisuuteen Passerini-reaktiossa. Yksinkertaisen kemiallisen rakenteen sisältävät isonitriilit, kuten alifaattisen hiiliketjun substituenttina sisältävät, ovat usein reaktiivisia, mutta kun isonitriilien substituentti on aromaattinen ryhmä, kuten fenyyliryhmä, saattoi reaktiivisuus vaihdella heikompaan suuntaan.[28,29]

Tutkimuksissa tavoitetuotteina olivat usein Brønsted-Lowry-hapoilla tehdyissä reaktioissa α-asyloksiamidit. Monista tutkimuksista kävi ilmi, että Passerini-reaktion välivaiheen nitriliumkationi on stabiloitunut reaktion ollessa käynnissä, joten on mahdollista, että uuttovaiheessa lisätty vesi toimii nukleofiilinä muodostaen sivutuotteen α-

hydroksiamidin.[28,29,33] Passerini-reaktion happokomponentin ollessa Lewis-happo, voi Lewis-hapon nukleofiilinen substituentti reagoida nitriliumkationin kanssa.[61]

Kirjallisuuskatsauksen perusteella voidaan esittää hypoteesi, että happokomponenttien Brønsted-Lowry- tai Lewis-happamuus korreloituu niiden kykyyn osallistua Passerini-reaktioon. Kriittinen vaihe reaktiossa on, kuinka hyvin karbonyyli aktivoituu happokomponentilla, joka määrittyy juuri mainittujen happamuuksien eroilla. Tarkasteltujen artikkelien perusteella on kuitenkin hankala määrittää tarkkaa mallia happamuuden vaikutukselle. Voidaan havaita, että vähemmän karbonyyliä aktivoivien happokomponenttien sijaan apuna käytettiin vahvempia Brønsted-Lowry - tai Lewis-happoja, jotta reaktion saantoa voitiin parantaa.[15,28,42,43,66]

Lewis-hapoilla ja mahdollisesti mukana olleilla Lewis-emäskatalyyteillä suoritettu Passerini-reaktio sietää monia eri funktionaalisia ryhmiä. Silanoli-[37] ja borinihappoyhdisteillä[40] toteutettiin reaktio siten, että isonitriili sisälsi silyylieetteriryhmän ja kiraalisen alkyylisubstituentin α-hiilessä (kaaviot 17 ja 20). Boorihapon ollessa komponenttina havaittiin, että αβ-tyydyttymättömillä aldehydeillä on korkea reaktiivisuus (kaavio 19).[39] Karboksylaattiesteriryhmän α-hiilessä sisältävä isonitriili muodosti stereoselektiivisen Passerini-tuotteen, α-hydroksiamidin, ilman 5-alkyylioksioksatsoliyhdisteen muodostumista syklisoitumisen kautta. Happokomponenttina reaktiossa käytettiin kiraalista Lewis-emäskatalyyttiä ja Lewis-happoa $SiCl_4$ (kaavio 36).[56] Vastaavan karboksylaattiesteriryhmän sisälsi myös salen-pohjaisella Lewis-hapolla tehty tutkimus, jossa muodostettiin tetratsoliyhdiste atsidinukleofiilillä (kaavio 42).[61] Lewis-emäs, karboksylaattiesteriryhmä, ei sitoutunut Lewis-happokatalyyttiin, eikä näin ollen haitannut reaktion etenemistä. Lewis-hapon $Sn(OTf)_2$ ja pybox-ligandin avulla tehty Passerini-reaktio mahdollisti myös α-hiilessä karboksylaattiamidin sisältävien isonitriilien käytön. Tällöinkään ei havaittu, että Lewis-emäksiset karboksylaattiamidiyksiköt inhibitoivat Passerini-reaktiota (kaavio 39).[13]

Passerini-reaktioissa liuottimena käytetään usein aproottista liuotinta, kuten dikloorimetaania tai tolueenia. Reaktion mekanismia tutkittaessa on päätelty, että välivaiheen nitriliumkationi ei ole näillä liuottimilla stabiloitunut (vetysidoksilla), ja silloin reaktion eteneminen on nopeaa.[11] Reaktion konsentraation nostamisen on havaittu nopeuttavan reaktion etenemistä ja myös saanto on korkeampi.[30] Ilman liuotinta on myös saavutettu korkeita saantoja.[22-24] Proottisen liuottimen, kuten metanolin, on päätelty Lewis-hapolla (borinihapolla) tehdyssä reaktiossa olevan inhibiittorina reaktion kululle.[40] Hypoteesina tässä tutkimuksessa oli, että

metanoli koordinoituu happokomponenttiin. Myös vettä on käytetty liuotinkomponenttina Passerini-reaktiossa. Tällöin on havaittu, että klassinen Passerini-reaktio muodosti korkeamman saannon lyhyemmässä ajassa, verrattuna dikloorimetaanin käyttöön liuottimena.[25] Yhdisteiden, kuten litiumkloridin ja glukoosin liuottaminen veteen, on havaittu aiheuttavan nopean reaktion ja korkean saannon Passerini-reaktiossa.[25] Lisäksi pinta-aktiivisten aineiden ja veden yhdistelmän on havaittu toimivan liuottimena Passerini-reaktiossa.[25,26] Tämä voi viitata siihen, että vesi toimisi vain kannattelevana alustana reaktiolle. Veden käytön reaktioseoksessa havaittiin muodostavan monissa tutkimuksissa sivutuotetta α-hydroksiamidia.[28,29,33] Kuitenkin tarkastelussa oli myös tutkimuksia, joissa metanolin[50], isopropanolin[43] ja etanolin käyttö liuottimena oli onnistunut, myös yhdessä veden kanssa.[38,50]

Tutkimuksissa on tarkasteltu Passeri-reaktioita, joissa isonitriilin α-hiilessä on karboksylaattiesteri tai karboksylaattiamidi. Yhdessä tutkimuksessa karboksylaattiesterin on raportoitu syklisoituvan 5-alkyylioksioksatsoliyhdisteeksi,[12] toisessa taas ei.[56] Karboksylaattiamidin on raportoitu syklisoituvan 5-amino-oksatsoliyhdisteeksi.[13,14] Mikäli karboksylaattiesterin syklisoituminen tapahtuu, on kiraalisten isonitriilien tapauksessa α-hiilen stereokemia muuttunut. Mahdollinen syy syklisoitumiselle voi olla perusteltavissa Baldwinin-säännöillä, joiden mukaan 5-endo-dig –reaktio on suosiollinen, kun taas vastaavasti 5-endo-trig –reaktio on epäsuosiollinen. Reaktioseoksessa lisänä olleen emäsreagenssin havaittiin lisäksi edesauttavan karboksylaattiesterin syklisoitumista.

Isonitriilin α-hiilen substituentin ollessa elektroneja puoleensa vetävä ryhmä, kuten karboksylaattiesteri, on mahdollisesti α-hiilen protoni hapan. Heikkojen orgaanisten emästen, kuten trietyyliamiinin (TEA), on raportoitu rasemisoivan tällaisen kiraalisen keskuksen.[16] Synteesejä suunniteltaessa on huomioitava mahdollinen rasemisoituminen. Tarkastelluissa tutkimuksissa havaittiin myös isonitriilien lämpötilaherkkyys.[16] Koska isonitriilit ovat epästabiileja, niitä on hyvä pitää ylimääränä synteeseissä.

Tutkitusta kirjallisuudesta on nähtävissä, että Passerini-reaktion jokainen komponentti, karbonyyli, isonitriili ja happo, vaikuttavat stereoselektiivisyyteen. Synteesejä suunniteltaessa on kuitenkin usein turvauduttava kiraaliseen ja katalyyttiseen happokomponenttiin, sillä silloin nukleofiiliksi nitriliumkationille voidaan vaihtaa myös jokin erillinen komponentti, kuten karboksyylihappo. Karbonyylien ja isonitriilien tapauksessa saattaa olla hankalaa muuntaa lopputuote siten, että ohjaava apuyksikkö on poistettu tuotteesta. Kiraalisten

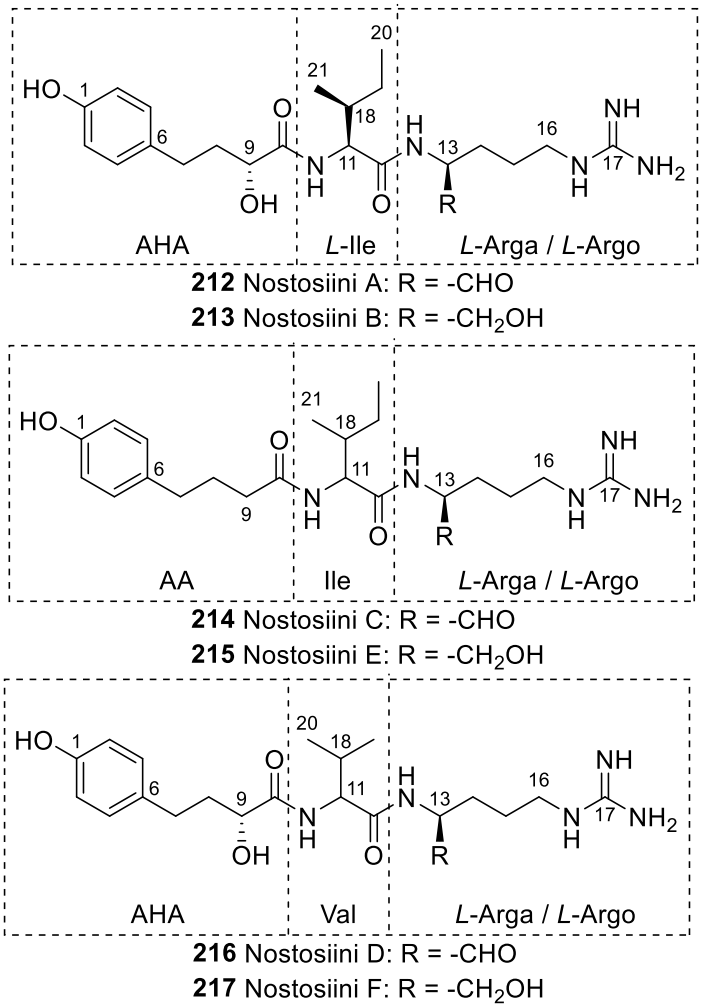
karbonyylijohdannaisten vaikutusta Passerini-reaktioon on tutkittu, ja tällöin on havaittu, että erityisesti karbonyylin α- ja β-hiilien stereokemiallinen suuntaus vaikuttaa stereoselektiivisyyteen. Substituentteina näissä olivat joko hiiliketju, Lewis-emäksiset happi- tai silyylieetterit, epoksidi tai kompleksi hemiaminaalieetteri.[46-52] Tarkastelluissa artikkeleissa näiden substituenttien Lewis-emäksisyyden vuorovaikutusta lähtöaineiden kanssa ei tutkittu, eikä myöskään sen vaikutusta stereoselektiivisyyteen. Kun kiraalinen yksikkö on sijoitettu happokomponenttiin, on karbonyylin ja happokomponentin vuorovaikutus perusta stereoselektiivisyydelle. Yleisen Passerini-reaktion mekanismia tutkittaessa isonitriilikomponentti on vapaasti liikkuva ennen kuin hyökkäys karbonyyliin tapahtuu. Tämän vuoksi on hankalaa toteuttaa kemiallinen ympäristö isonitriilin hyökkäykselle siten, että se olisi stereoselektiivinen.

KOKEELLINEN OSA

1. Työn tarkoitus

Syano- ja sinibakteereina tunnetuilla eliöillä on suuri määrä erilaisiin bioaktiivisuuksiin yhdistettäviä sekundäärisiä metaboliitteja. Yksi merkittävä havainto näistä on tehty Iranin riisipelloilta löydetystä syanobakteerista nimeltä *Nostoc sp*. Sen hydrofiilisesta uutosta tunnistettiin nostosiineiksi nimitettyjä yhdisteitä. Monien nostosiinien, erityisesti nostosiini A:n, on raportoitu toimivan trypsiini-inhibiittoreina.[69-71]

Määrältään nostosiineista A ja B (**212** ja **213**, kaavio 52) ovat *Nostoc* sp. bakteerissa runsaimmat ja niiden kemialliset rakenteet voidaan luokitella koostuvan kolmesta eri fragmentista: Aromaattisen renkaan sisältämää α-hydroksihappotähteen (AHA) fragmenttia yhdistää keskiössä oleva L-isoleusiinitähde (L-Ile), sekä näitä L-arginaalista (L-Arga) tai L-arginolista (L-Argo) koostuvat tähteet. Pienemmissä määrissä olevat nostosiinit D ja F (**216** ja **217**) koostuvat L-Ile-fragmentin sijaan valiinifragmentista, sekä C ja E (**214** ja **215**) L-Ile-fragmentin sijaan leusiinifragmentista. Nostosiinit C ja E eivät sisältäneet hiili C9:n kiraalista hydroksyyliryhmää.[70]



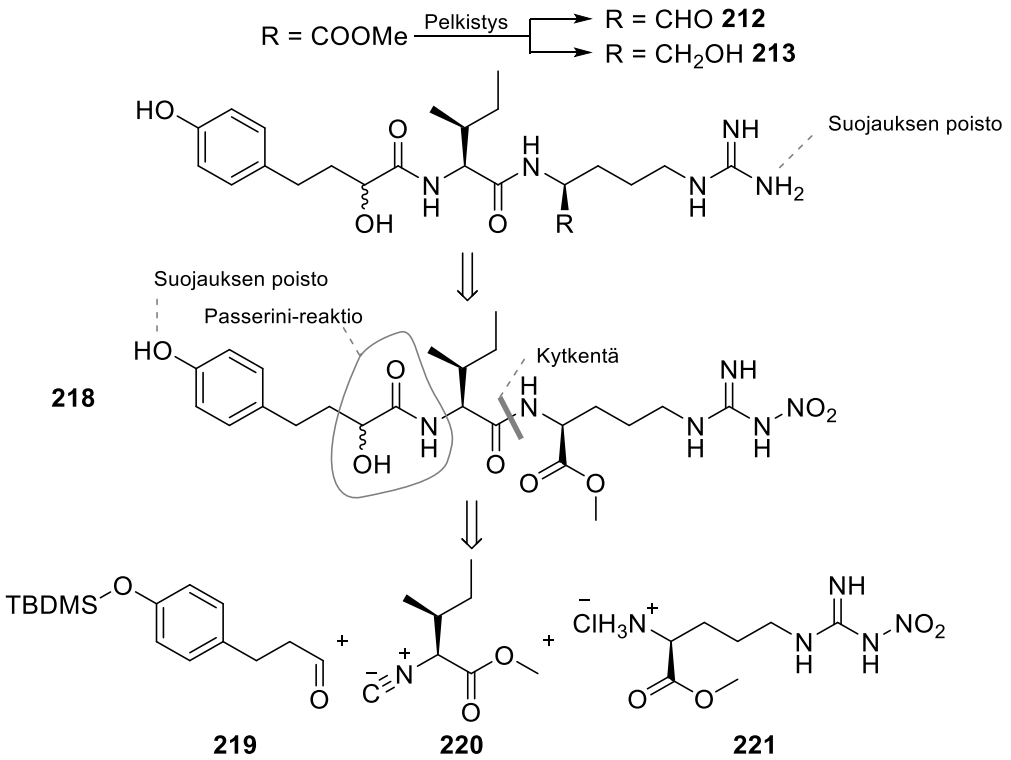
Kaavio 52. Nostosiini A-F kemialliset rakenteet ja niiden keskeiset fragmentit.[70]

Saara Hartikainen (nykyisin Riuttamäki) on toteuttanut Pro gradu-tutkielmassaan nostosiini A:n ja B:n totaalisynteesien suunnitelmat.[72] Kyseiset suunnitelmat jäivät toteutukseltaan kesken, sillä niiden suorituksessa havaittiin ongelmia, jotka estivät totaalisynteesien loppuun saattamisen. Viimeisten vaiheiden esteeksi havaittiin fenolisen ryhmän suojauksena olleen metyylieetterin poistaminen, jolloin tuotteeksi olisi saatu vapaa fenoli. Useat kokeet tutkielmassa osoittivat, että lähtöaineena olleen peptidin (guanidiiniryhmästä nitroryhmällä ja fenolista metyylieetteriryhmällä suojattu AHA-L-Ile-L-Arga -tyyppinen yhdiste) metoksisidos oli erityisen hankala katkaista. Viimeiseksi totaalisynteesissä suoritetuksi reaktioksi, ennen metoksiryhmän poistoreaktioita, jäi L-arginiini-fragmentin metyyliesterin kemoselektiivinen pelkistys litiumboorihydridillä ($LiBH_4$), jolloin tuotteeksi saatiin L-arginoli-fragmentti. Reaktion toteutus jäi viimeistelemättä, sillä reagenssina olleen $LiBH_4$:n todettiin hajonneen hydrolyysituotteeksi LiOH:ksi sen säilytyksen aikana. Oletetuksi pelkistystuotteeksi saatiinkin vastaavan esteriryhmän hydrolyysituotteen, karboksyylihapon ja primäärisen alkoholin seos. Tavoitetuotetta alkoholia ei karakterisoitu, vaan sen läsnäolo todettiin vain raakatuotteen ESI-massaspektristä viittaavan massan avulla. Aikaisemman tutkimuksen

pohjana oli Passerini-reaktiolla tehty kytkentäreaktio (käyttäen lähtöaineina 3-(4-metoksifenyyyli)propanaalia, aminohaposta L-isoleusiinista johdetun isonitriilin metyyliesteriä ja kloorietikkahappoa). Tällöin tuotteeksi saatiin α-asyylioksiamidi, jossa asyyliryhmänä oli kloorietikkahaposta muodostettu fragmentti. Totaalisynteesipolun edellytyksenä oli, että juuri mainittu esterisidos hydrolysoitiin. Muodostunutta kloorietikkahappoa oli haastavaa erottaa raakatuotteesta.

Ensisijainen tehtäväni tässä tutkielmassa oli saattaa loppuun nostosiini A:n ja B:n totaalisynteesit. Jo tehdyn tutkimuksen tuloksista havaittiin, että fenolisen ryhmän suojauksena täytyy olla jokin helpommin irroitettava suojaus. Tämän lisäksi viimeisten vaiheiden, kuten $LiBH_4$:llä tehdyn pelkistyksen, toteuttaminen vaatii huolellista panostusta. Kehittämisen kohde nähtiin myös aikaisemman tutkimuksen Passerini-reaktiossa kloorietikkahapolla, joka muodosti työlään toteutuksen. Vaikka kehityskohteita nähtiin, antoi silti aikaisempi tutkimus erinomaiset puitteet totaalisynteesien kehittämiseen.

Keskeinen osa tutkimuksessani oli hyödyntää muunneltavaa Passerini-reaktiota totaalisynteesin loppuun saattamisessa. Kyseinen reaktio on tunnettu jo lähes vuosisadan, mutta stereoselektiiviset variantit siitä ovat niukat. Toissijaisena tarkoituksena tutkielmassani oli täten tutkia ja kehittää stereoselektiivinen variantti Passerini-reaktiosta. Retrosynteettinen analyysi tutkielman synteesipolusta on havaittavissa kaaviossa 53.



Kaavio 53. Retrosynteettinen analyysi kokeellisen osuuden totaalisynteeseistä.

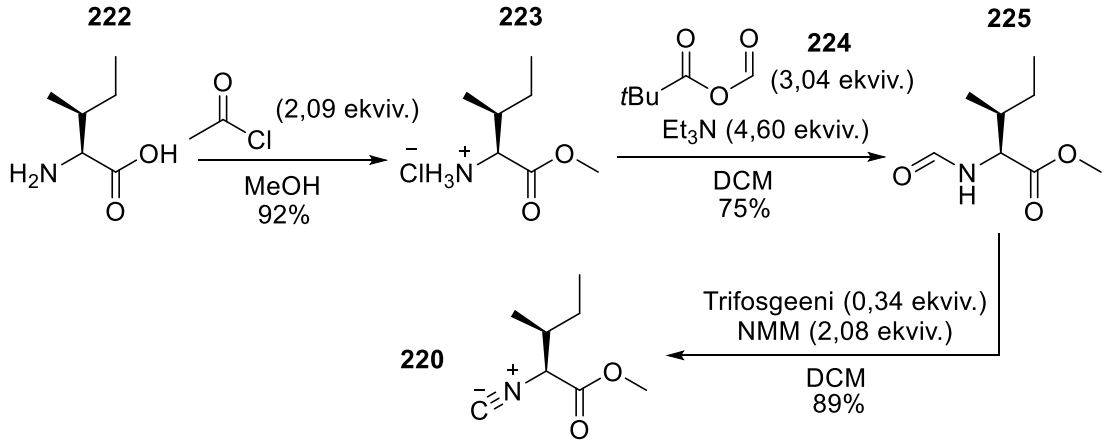
2. Tulokset

2.1 Fragmentti L-ILE

L-Ile-fragmentin lähtöaineena käytettiin L-isoleusiinia (**222**), joka ensin esteröitiin happokatalyytillä metanolissa metyyliesteriksi (**223**). Dehydranttina oli suolahappo, joka muodostettiin asetyylikloridin ja metanolin välisessä reaktiossa. Pieni määrä lähtöaineena ollutta aminohappoa jäi reagoimatta.

Pivaloyylikloridista, muurahaishaposta ja trietyyliamiinista muodostettiin seka-anhydridi formyylipivaloylaatti (**224**) käyttäen liuottimena dikloorimetaania. Tällä reagenssilla suoritettiin samassa astiassa aminoesterin (**223**) amiinin formylointi. Reaktion optimoinnissa huomattiin, että sivutuotteena muodostui veteen heikkoliukoista pivaloyylihappoa, jonka erottaminen tavoitetuotteesta osoittautui hankalaksi. Uuttovaiheen pesu suoritettiin useaan otteeseen sekä happamalla, että emäksisellä vesiliuoksella, jonka jälkeen tehtiin flash-pylväskromatografinen puhdistus.

Formamidi (**225**) reagoitettiin dehydraatioreaktiossa trifosgeenin ja *N*-metyylimorfoliinin (NMM) kanssa dikloorimetaanissa, jolloin muodostui isonitriili (**220**) (kaavio 54). Lähteinä reaktiolle käytettiin vastaavien isonitriilien synteesien raportteja.[16b] Isonitriilien havaittiin olevan herkkiä hajoamaan happamissa olosuhteissa.

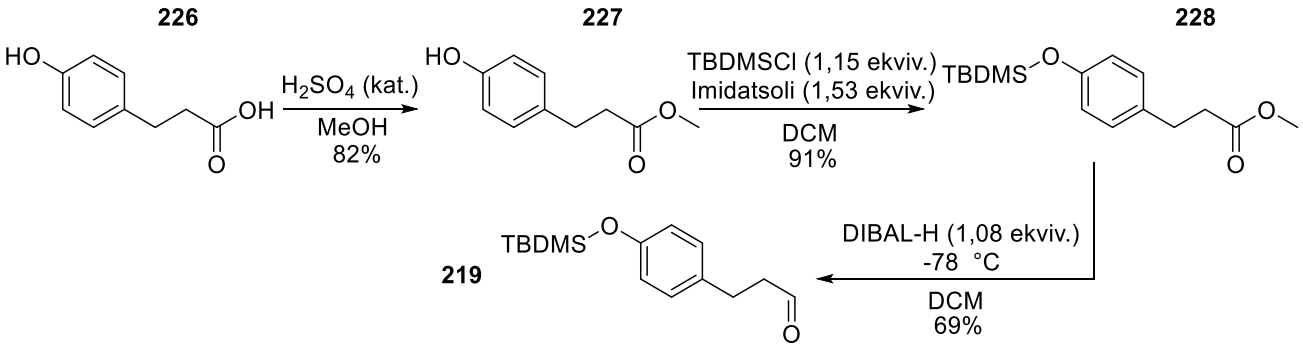


Kaavio 54. Synteesipolku L-isoleusiinista (**7**) isonitriiliin (**5**).

2.2 Fragmentti AHA

Fragmentti AHA:n synteesin (kaavio 55) lähtöaineena käytettiin kaupallista karboksyylihappoa (**226**), joka esteröitiin rikkihapon katalysoimana metanolissa metyyliesteriksi (**227**). Sen sisältämä fenolinen ryhmä suojattiin *t*-

butyylidimetyylisilyyliryhmällä (TBDMS-suojaus) (**228**), käyttäen kirjallisuudessa raportoitua menetelmää, jossa reagensseina ovat *t*-butyylidimetyylisilyylikloridi (TBDMSCl) ja imidatsoli dikloorimetaanissa.[73] Yhdisteen (**228**) karboksylaattiesteriryhmä pelkistettiin aldehydiksi (**219**) käyttäen pelkistintä di-isobutyylialumiinihydridi (DIBAL-H) dikloorimetaanissa –78 °C lämpötilassa. Lähteenä pelkistykselle käytettiin kirjallisuudessa raportoitua analogista menetelmää.[74]

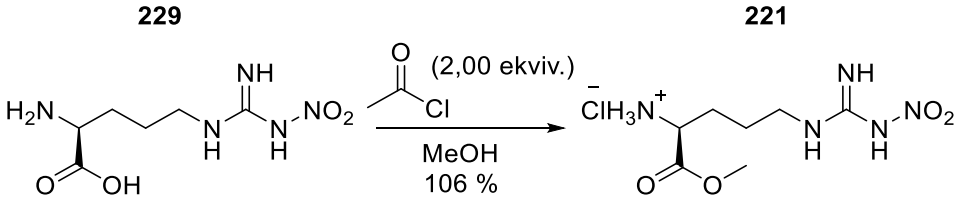


Kaavio 55. AHA-fragmentin synteesipolku.

Tutkielman kirjallisessa osassa on mainittu tutkimuksia, joissa fenolinen ryhmä on toiminut Passerini-reaktiossa happokomponenttina.[31,32] Tästä syystä fenolinen ryhmä päätettiin suojata TBDMS-suojauksella, sillä vapaan fenolisen ryhmän reaktiivisuutta Passerini-reaktiossa ei tiedetty varmuudella.

2.3 Fragmentti L-Arg

L-Arg-fragmentin lähtöaineena käytettiin N_ω-nitro-L-arginiinia (**229**), joka esteröitiin käyttäen L-Ile-fragmentin synteesissä käytettyä menetelmää (kaavio 56). Suojaamaton guanidiiniryhmä on reaktiivinen ja sen emäksisyydestä johtuen flash-pylväskromatografinen puhdistus on vaivalloista. Tästä syystä guanidiiniryhmä suojattiin nitroryhmällä.



Kaavio 56. L-arg-fragmentin synteesipolku.

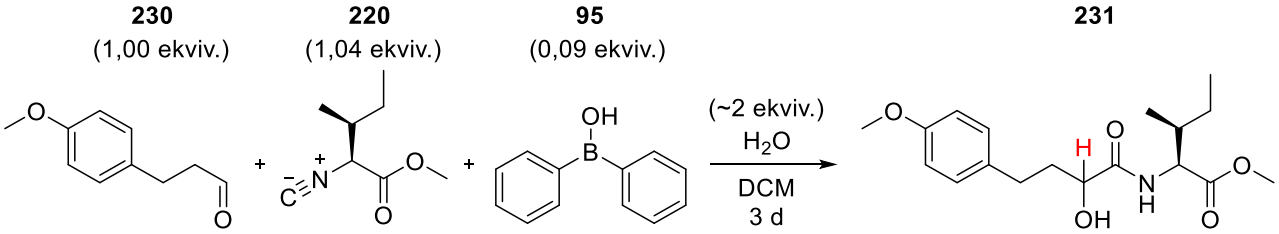
2.4 Fragmenttien AHA-L-ILE -kytkentä

Fragmenttien AHA ja L-Ile kytkennässä tavoitteena oli hyödyntää Passerini-reaktiota. Klassinen tapa suorittaa se on käyttää karboksyylihappoa happokomponenttina, jolloin

tuotteeksi muodostuu α-asyloksiamidi. Muodostunut esterisidos on kuitenkin hydrolysoitava, jolloin karboksyylihappo muodostuu sivutuotteena. Vapaa karboksyylihappo on usein liukoisuuksista johtuen haasteellista erottaa tavoitetuotteesta.[72] Vaihtoehtoisia menetelmiä päätettiin täten tutkia.

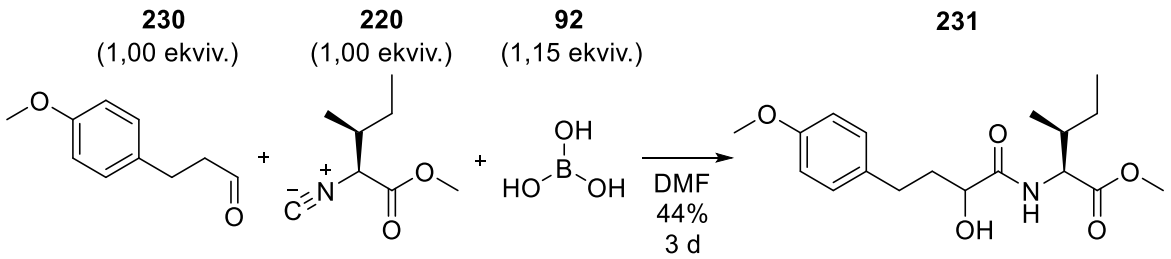
Tutkielman kirjallisessa osassa on mainittu tutkimuksia, joissa boorihappo[39] ja substituoidut borinihapot[40] toimivat Lewis-happokomponentteina. Nämä valittiin tutkimuksen kohteiksi, sillä Passerini-reaktiossa muodostuva boraatti- tai borinaattiesteri hydrolysoituu helposti ja muodostuu vapaa borini- tai boorihappo ja jatkoreaktioihin soveltuva α-hydroksiamidi. Lähdeartikkelien tutkimuksissa havaittiin, että borini- ja boorihapon substituenttien vaihdettavuus on laaja. Tästä syystä stereoselektiivisten variaatioiden kehittäminen voisi olla mahdollista.

Passerini-reaktion katalyyttinä kokeiltiin difenyyliborinihappoa (**95**) käyttäen isonitriiliä (**220**) ja aldehydiä (**230**). Liuottimena reaktiossa käytettiin dikloorimetaania ja katalysoidun tästä reaktiosta teki reaktioseokseen lisätty vesi. Lähdeartikkelissa[40] on mainittu yksi ekvivalentti vettä reaktioseoksessa. Johtuen pienessä skaalassa tehdyssä reaktiosta, vettä lisättiin testireaktioon tässä tutkimuksessa yksi tippa, mikä vastaa noin kahta ekvivalenttia. Saanto reaktiossa jäi kuitenkin alhaiseksi, sillä raakatuotteen ^{1}H NMR-spektriä karakterisoidessa havaittiin vain pieni määrä tuotteen **231** diastereomeerejä (NMR:lla havaittu protoni on merkitty punaisella, kaavio 63). Mahdollinen syy alhaiseen saantoon voi olla liian suuri määrä vettä reaktioseoksessa.



Kaavio 57. Difenyyliborinihapon katalysoima Passerini-reaktio. Tuotetta muodostui vain pieni määrä.

Boorihapon (**92**), isonitriilin (**220**) ja aldehydin (**230**) välistä Passerini-reaktiota tutkittiin ilman katalyyttinä olevaa vettä. Liuottimena reaktiossa käytettiin ei-kuivattua dimetyyliformamidia, joka otettiin suoraan reagenssipullosta. Reaktio ei ole katalyyttinen, sillä boorihappoa oli ylimäärä suhteessa muihin lähtöaineisiin. Tavoitetuotteen diastereomeerien (**231**) havaittiin muodostuneen, jolloin ne puhdistettiin reaktioseoksesta ja karakterisoitiin tarkemmin ^{1}H ja ^{13}C NMR-spektreistä.

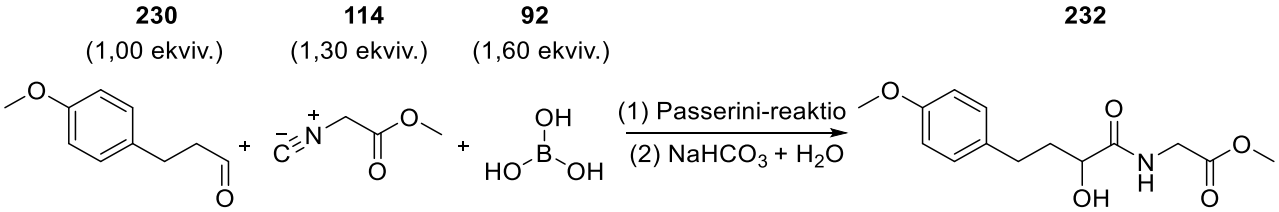


Kaavio 58. Boorihappo Lewis-happona Passerini-reaktiossa.

2.5 Passerini-reaktio boorihapolla - Optimointi

Alhaisen saannon takia boorihapolla tehtyä Passerini-reaktiota päätettiin optimoida. Mahdollinen syy alhaiseen saantoon saattoi olla liuottimen sisältämät epäpuhtaudet. Dimetyyliformamidi on altis hajoamistuotteiden muodostumiselle, sekä lisäksi herkkä sitomaan kosteutta ilmasta.[75] Liuottimen käytöstä päätettiin luopua, sillä ilman liuotinta tehdyn reaktion on raportoitu toimivan, karboksyylihapon ollessa happokomponentti.[72,22-24] Toinen syy alhaiseen saantoon saattoi olla Passerini-tuotteen ja boorihapon muodostaman kompleksin vesiliukoisuus, jolloin orgaanisella liuottimella suoritetun uuton hyötysuhde väheni.[77] Muodostunut kompleksi voidaan rikkoa käyttämällä uuttovaiheessa vesifaaseissa heikkoa emästä, kuten $NaHCO_3$:n vesiliuosta. Koereaktio suoritettiin ilman liuotinta lämmittäen 20 minuuttia 100 °C:ssa lähtöaineita 3-(4-metoksifenyyli)propanaalia (**230**), metyyli-isosyanoasetaattia (**114**) ja boorihappoa (**92**), jolloin Passerini-tuotetta muodostui 60 % saannolla. Isonitriilin arveltiin olevan epästabiili korkeassa lämpötilassa, joten sitä oli ylimäärin. Reaktioaikaa pidennettiin vielä kahteen tuntiin, jolloin saanto kohosi lukemaan 71 %.

Taulukko 1. Ilman liuotinta tehdyn Passerini-reaktion optimointia. Reagenssien suhteita ei optimoitu

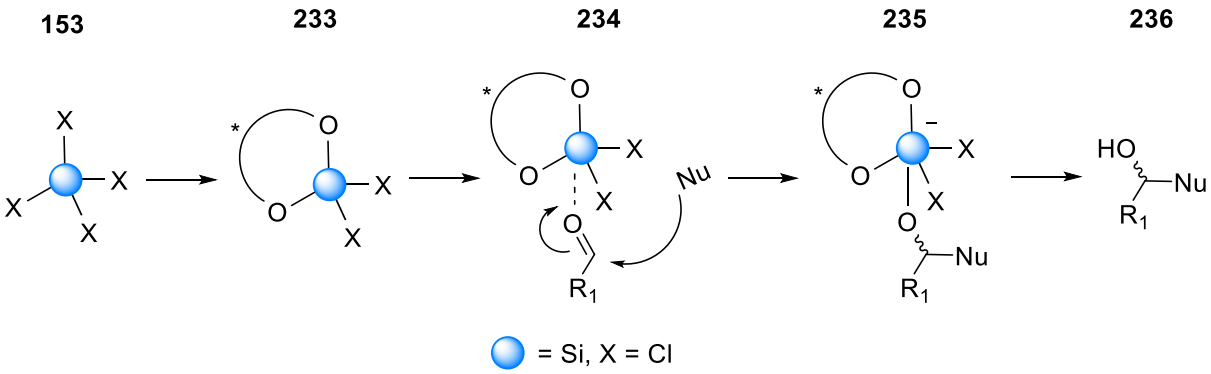


Koe	Liuotin	Lämpötila	Reaktioaika	Saanto
1	–	100 °C	20 minuuttia	60 %
2	–	100 °C	2 tuntia	71 %

2.6 Stereoselektiivinen Passerini-reaktio

2.6.1 Teoria

Tutkielman kirjallisen osan osiossa *2.6 Stereoselektiivinen Passerini-reaktio – lähtöaineiden vaikutus* käytiin läpi stereoselektiivisyyden perusteita ja Passerini-reaktioihin kohdistuneita tutkimuksia. Silyyliyhdisteillä[55-57] suoritetuille stereoselektiivisille reaktioille, joissa tapahtuu nukleofiilien lisäys aldehydeihin, voidaan johtaa kaavion 59 yleistävä mekanismi.

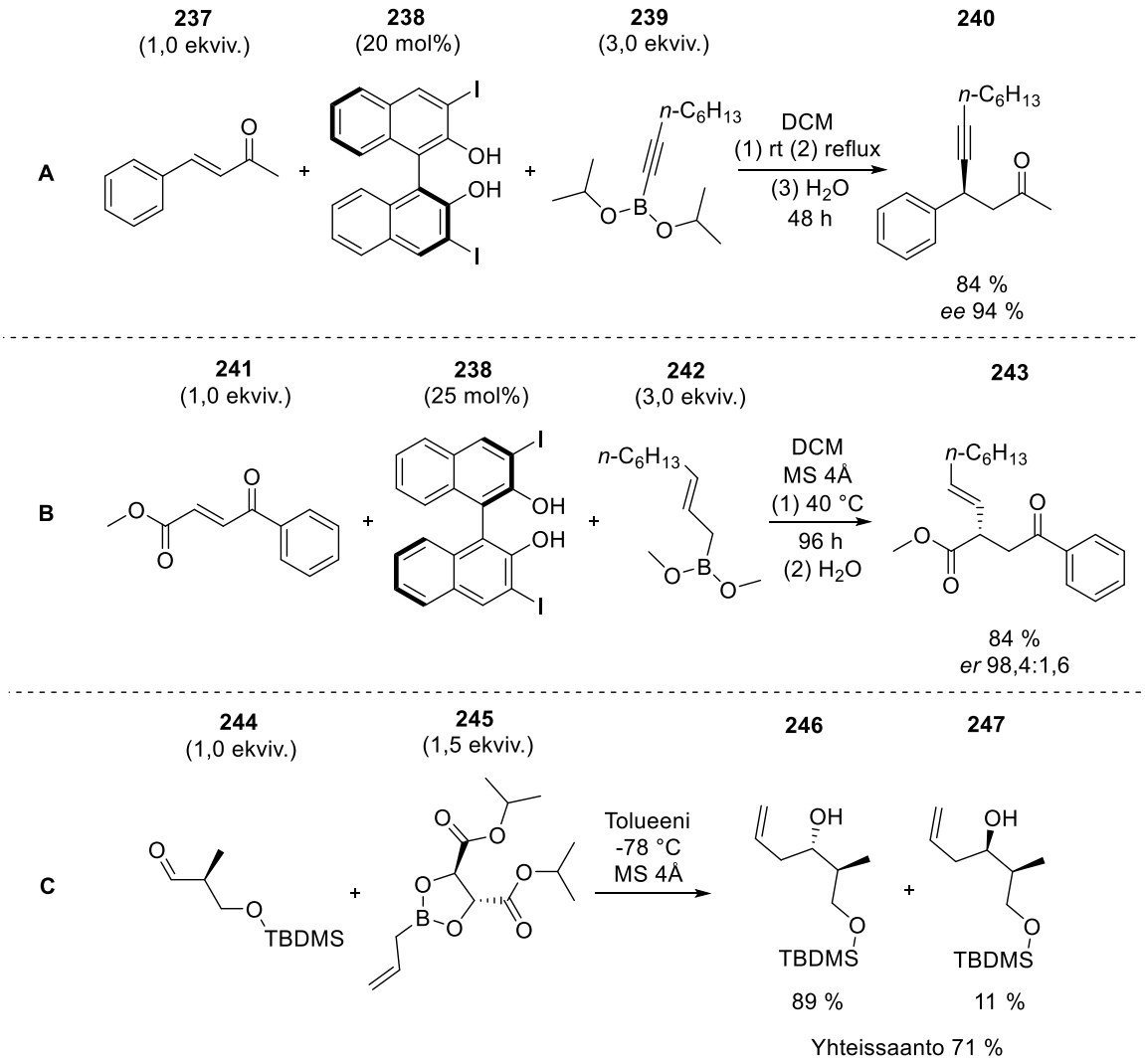


Kaavio 59. Yleistävä mekanismi Lewis-hapon $SiCl_4$ reagointiin aldehydin ja nukleofiilin kanssa.

Boorihappo sisältää kolme hydroksyyliryhmää. Sillä tehdyn Passerini-reaktion mekanismia tutkittaessa nähdään, että hydroksyyliryhmä toisiintuu nitriliumkationiin (kaavion 21, välivaiheen **102** kaltainen mekanismi). Olisi suotavaa, että vapaana näistä hydroksyyliryhmistä olisi vähintään yksi, jotta toisiintumisreaktio voisi tapahtua. Boorihapon rakenteeseen suunniteltiin täten kiraalinen ohjaava yksikkö, joka on sidoksissa esterisidoksin muodostaen borinihapon. Kirjallisuushaussa havaittiin, että kiraalisen yksikön sisältämät borinihapot ovat vielä suhteellisen vähän tutkittu yhdistejoukko, eikä menetelmiä niiden syntetisoimiseksi ole juurikaan raportoitu. Lisäksi hydroksyyliryhmän substituoimista eri fragmentilla, kuten halogeenilla, ei ole tutkittu löytämieni lähteiden perusteella. Kirjallisuudesta löytyi kuitenkin viite, jossa Zhao *et. al.*[76] ovat havainneet borinihappoja rakenteeltaan etäisesti muistuttavien kiraalisten boroksinaattianionien toiminnan stereoselektiivisessä Ugi-reaktiossa.

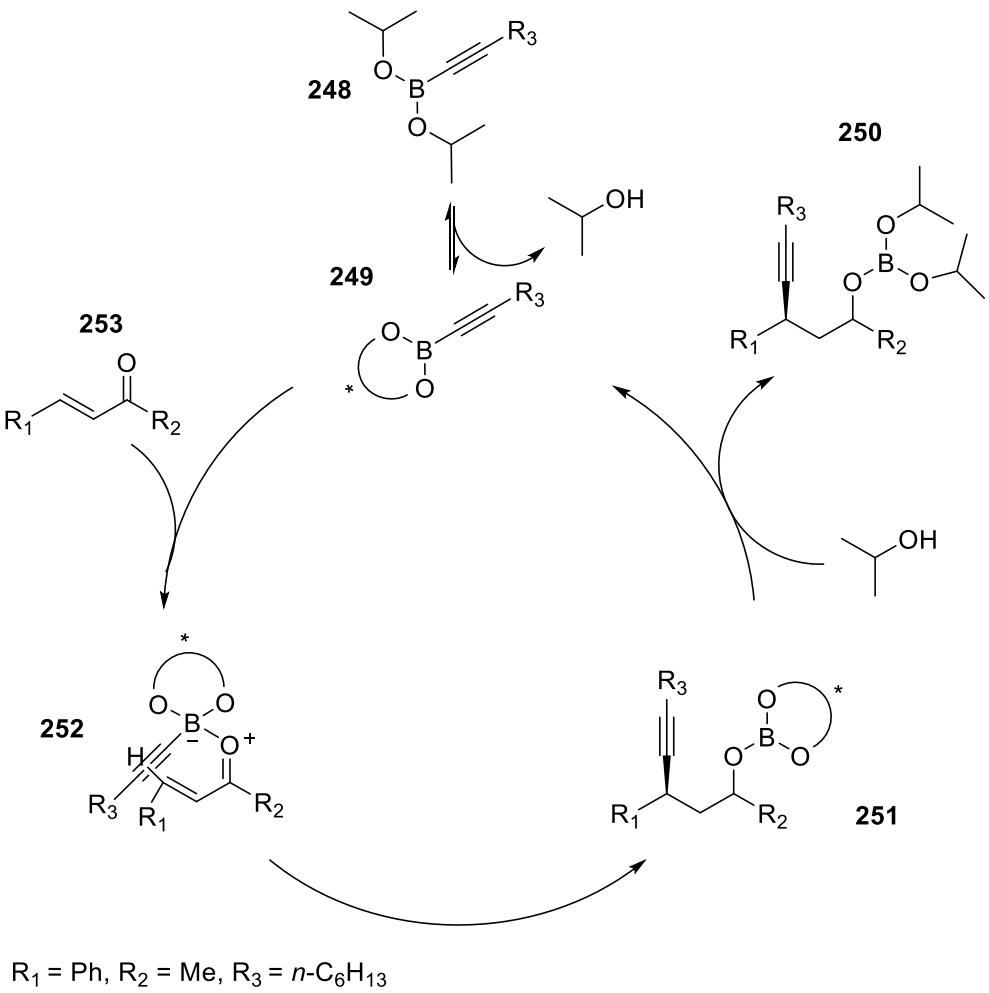
Ohjaavan ryhmän sisältävien borinihappojen suunnittelujen apuna olivat kirjallisuudessa raportoidut kiraaliset booriyhdisteet ja niiden avulla tehdyt stereoselektiiviset alkylointireaktiot. Lewis-happoihin perustuvia alkylointireagensseja ovat esimerkiksi nukleofiilisen hiiliketjun sisältävät boronaattiesterit.[78-80] Wu *et. al.*[81] ovat raportoineet, että ohjaavana apuyksikkönä oleva **238** toimii katalyyttisenä määränä αβ-tyydyttymättömien ketonien alkynylointi- ja konjugaattiadditioreaktioissa (kaavio 60, osio A). Sama

tutkimusryhmä on raportoinut myös katalyyttisen alkenylointireaktion (kaavio 60, osio B).[82] Ohjaavana ryhmänä on raportoitu Roush *et. al.*[83] työssä toimivan kiraaliset tartraattiesterit (kaavio 60, osio C). Tällä on tehty stereoselektiivisiä allylointireaktioita. Krotyylinukleofiilin sisältäviä kiraalisia booriyhdisteitä on myös tutkittu paljon aiemmin.[84,85]



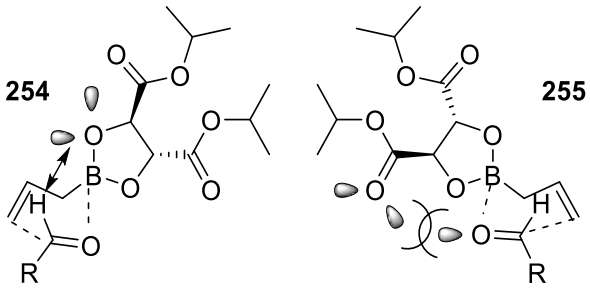
Kaavio 60. Boronaattiestereillä tehtyjä stereoselektiivisiä esimerkkireaktioita (A[81], B[82], C[83]).

Kaavion 60 osioiden A ja B mekanismit pohjautuvat kiraalisen boronaattiesterin **249** muodostumiseen tasapainoreaktiossa, jolloin isopropanolimolekyyli lohkeaa pois. Karbonyyli **253** sitoutuu kiraalisen reagenssin booriatomiin (kaavio 61 välivaihe **252**) ja tapahtuu stereoselektiivinen konjugaattiadditio (**251**). Kiraalisen yksikön sisältävä boronaattiesteri reagoi tämän jälkeen juuri lohjenneiden isopropanolimolekyylien kanssa ja vapauttaa sen katalyyttiseen kiertoon.[78]



Kaavio 61. Katalyyttisen syklin mekanismi.[78]

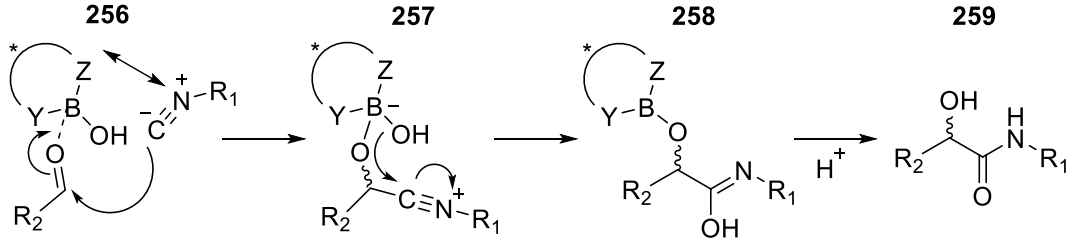
Tartraattiestereihin pohjautuvien kiraalisten reagenssien mekanismin hypoteesiksi on esitetty hylkivä vuorovaikutus reagoitavan karbonyylin ja apuyksikön esterin karbonyylin kanssa (kaavio 62).[83-85]



Kaavio 62. Hylkivään vuorovaikutukseen karbonyylien välillä perustuva mekanismi.[83-85]

Kiraalisella borinihapolla suoritetun Passerini-reaktion mekanismin hypoteesi on nähtävissä kaaviossa 63. Tällöin välivaihessa **256** karbonyyli on sidoksissa kiraaliseen borinihappoon, kuten myös isonitriili heikoin vuorovaikutuksin tai steerisen esteen johdosta. Vastaavaa isonitriilin sitoutumista on havaittu kiraalisella fosforihapolla suoritetussa stereoselektiivisessä Passerini-reaktiossa (kaavio 35). Booriatomin pienen koon takia

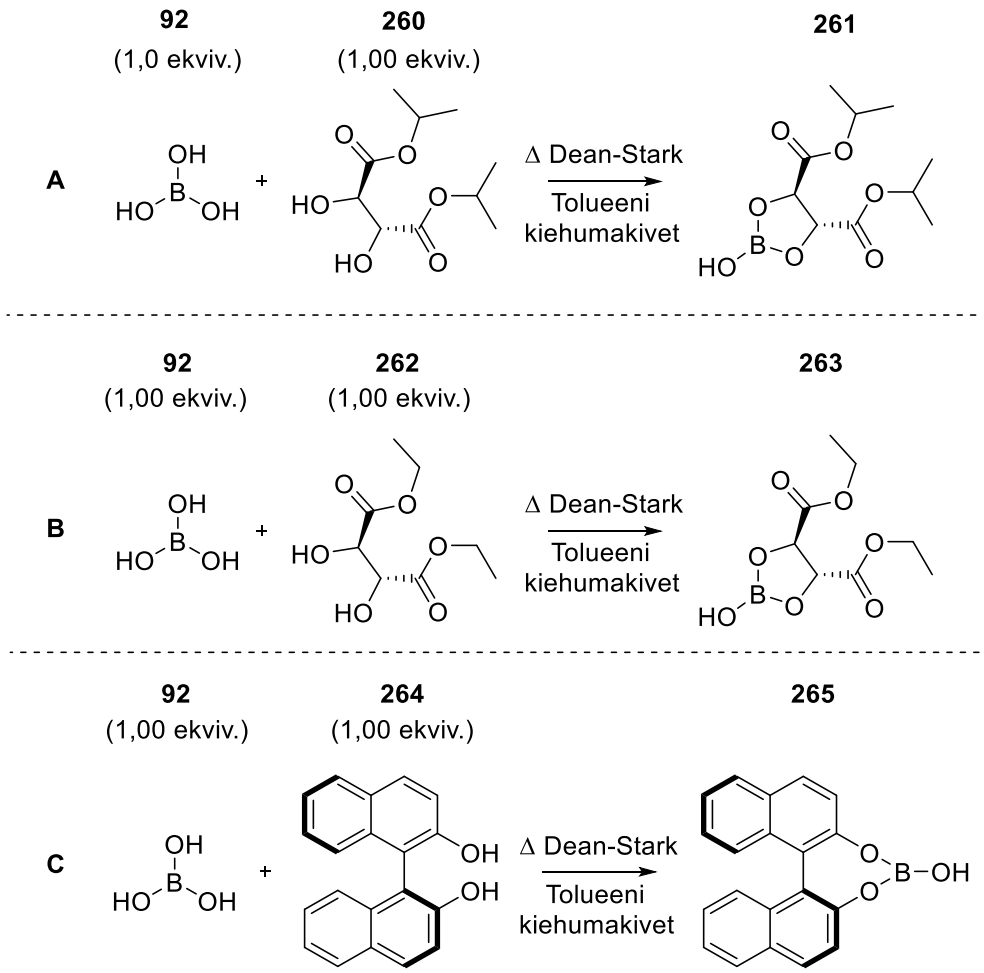
stereoselektiivisyydelle olennainen kiraalinen keskus on lähellä reaktiokeskusta, eli isonitriilin hyökkäystä.



Kaavio 63. Hypoteesi kiraalisilla borinihapoilla tehdyn Passerini-reaktion stereoselektiivisyydelle.

2.6.2 Käytäntö

Synteesien toteutuksien ja yksinkertaisista lähtöaineista koostuvien yhdisteiden puolesta kiraalisten reagenssien kehitykseen valittiin boorihaposta ja kolmesta eri kiraalisesta yksiköstä muodostetut borinihapot. Näiden synteesimetodi pohjautui kirjallisuudessa käytettyyn esteröintireaktioon Dean-Stark-laitteistossa.[86] Ensimmäisenä (kaavio 64, osio A) tutkimuksen kohteena oli di-isopropyyli-L-tartraatti (**260**). Reaktion edetessä havaittiin ongelmaksi, että muodostui ylikuumenemista ja ylikiehumista aiheuttavaa sakkaa. Reaktioseoksen värin havaittiin myös muuttuvan värittömästä ruskeaksi. Tolueeniliukoisten reaktiotuotteiden karakterisointia varten sakka suodatettiin, liuotin haihdutettiin ja ^{1}H NMR-analyysi suoritettiin, mutta saadusta raakatuotteen spektristä oli hankala havaita tavoitetuotteen (**261**) muodostuminen. Kyseinen reaktio toteutettiin uudelleen käyttäen isompaa mittakaavaa ja samat ongelmat havaittiin jälleen. Reaktio tehtiin uudelleen käyttäen dietyyli-L-tartraattia (**262**) (kaavio 64, osio B). Sakkaa ei tällöin muodostunut ja reaktioseoksen väri pysyi lähes värittömänä. Veden muodostumisen loputtua liuotin haihdutettiin ja raakatuotteen karakterisointia varten valmistettiin näyte ^{1}H, ^{13}C ja ^{11}B NMR-tutkimuksia varten. Näissä havaittiin lähtöaineesta, dietyyli-L-tartraatista, eroava spektri, sekä ^{11}B NMR-spektrissä oleva siirtymä arvolla 89,50 ppm. NMR-spektrien avulla tehty karakterisointi tavoitetuotteen (**263**) varmistamiseksi ei kuitenkaan tuottanut toivottua varmuutta, joten yhdisteen tarkka massa yritettiin mitata HRMS (ESI^{+}) -massaspektrometrillä. Lukuisista yrityksistä huolimatta tarkkaa massaa ei saatu. Lähtöaineella (*S*)-binol (**264**) esteröintireaktio (kaavio 64, osio C) toistettiin, mutta tavoitetuotteen (**265**) muodostumisesta ei saatu varmuutta.



Kaavio 64. Kiraalisten reagenssien synteesien onnistumisesta ei saatu varmuutta.

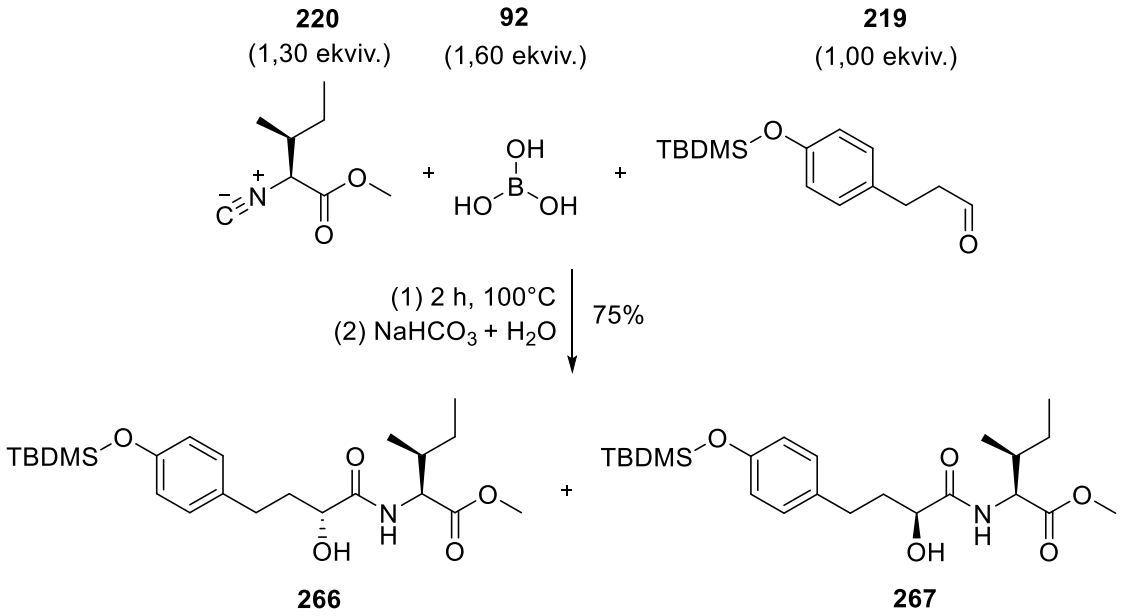
Erittäin kosteusherkät boorihapon esterit vaikeuttivat työn suoritusta, kuten myös karakterisointia. Tutkitussa esteröintireaktiossa voi mahdollisesti muodostua sivutuotteita, jotka eivät reagoi haluttuun tapaan Passerini-reaktiossa. Borinihapot ja niiden synteesien välivaihetuotteet voivat reagoida keskenään tehden erilaisia anhydridejä.[87] Reaktiossa voi mahdollisesti muodostua myös borinaattianioneja.[87] Tavoitteen eli viisirenkaisen booriatomiin pohjautuvan heterosyklisen yhdisteen muodostaminen voi myös olla steerisesti vaikeaa.

Kiraalisia borinihappoja ei ehditty tämän työn puitteissa tutkimaan tarkemmin. Niiden tutkimus olisi kuitenkin hyödyllistä, sillä ne ovat vähemmän tunnettu yhdistejoukko ja täten mahdollisesti apuna monissa reaktioissa.

2.7 Fragmenttien AHA-L-Ile kytkentä

Optimoitu Passerini-reaktio boorihapolla (**92**) suoritettiin lähtöaineilla **220** ja **219** (kaavio 65). Raakatuotteen puhdistus suoritettiin Combiflash® -laitteistolla. Liuotinkombinaatioiden sovituksen jälkeen saatiin täysi erottelu diastereomeereille **266** ja **267**. Diastereomeerien

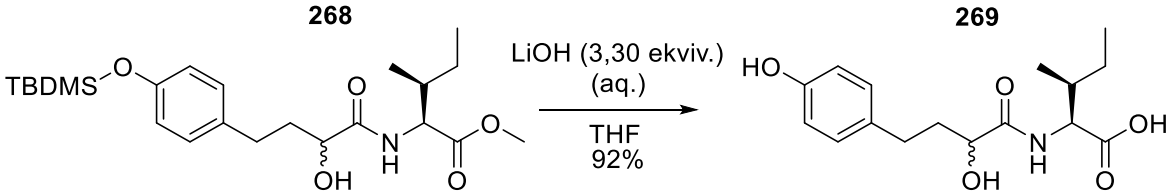
suhteiksi arvioitiin noin 1:1, mutta kromatografinen puhdistus puhtaille fraktioille ei mahdollistanut hieman epäpuhtaiden fraktioiden talteenottoa. Diastereomeerien stereokemiallista analysointia (*R,S,S* ja *S,S,S*) ei tässä projektissa tehty, vaan niiden nimityksinä käytettiin poolisuuksiin perustuvaa nimeämistä: ylempänä ohutlevykromatografiassa liikkuva yhdiste on *ylempi*-diastereomeeri ja vastaava alempana liikkuva yhdiste on *alempi*-diastereomeeri.



Kaavio 65. Optimoitu Passerini-reaktio totaalisynteesin välivaiheeseen.

2.8 AHA-L-Ile -fragmentin hydrolyysi

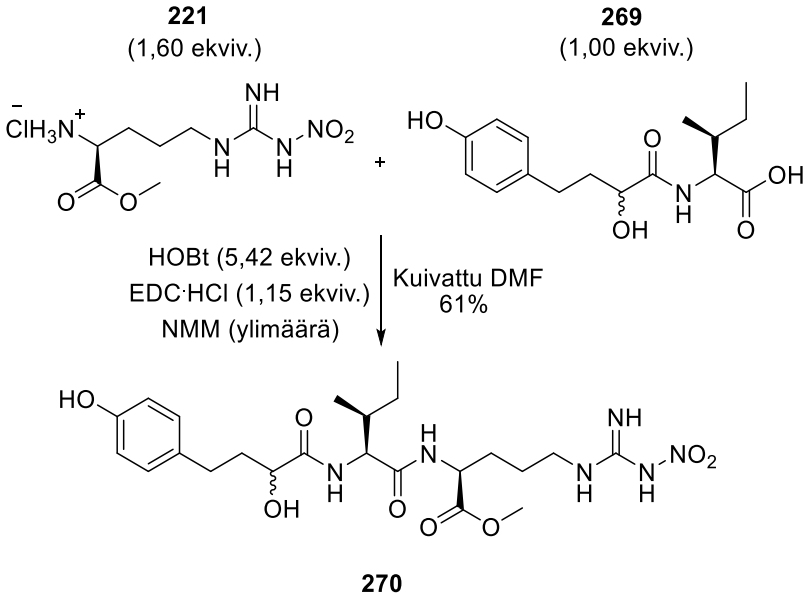
Jatkoreaktioihin valittiin *alempi*-diastereomeeri. Kyseinen metyyliesteri **268** hydrolysoitiin LiOH:lla, liuottimen ollessa veden ja tetrahydrofuraanin kombinaatio (kaavio 68). Hydrolyysissä lohkesi myös fenolin TBDMS-suojausryhmä. Raakatuotteeksi saatiin karboksyylihappo **269**, jonka puhdistus pylväskromatografialla silikageelillä olisi ollut vaivalloista. Tästä syystä raakatuotteella edettiin jatkoreaktioihin. Yhdisteen ^{13}C-spektri jäi puutteelliseksi, sillä signaalit alakentällä olevista vähemmän suojatuista hiiliatomeista jäivät näkymättä. Näiden arveltiin olevan fenolinen hiili ja karbonyylien hiilet. Syynä tähän voi olla näytteen alhainen konsentraatio.



Kaavio 66. Metyyliesteri sekä fenolin suojausryhmä hydrolysoituivat.

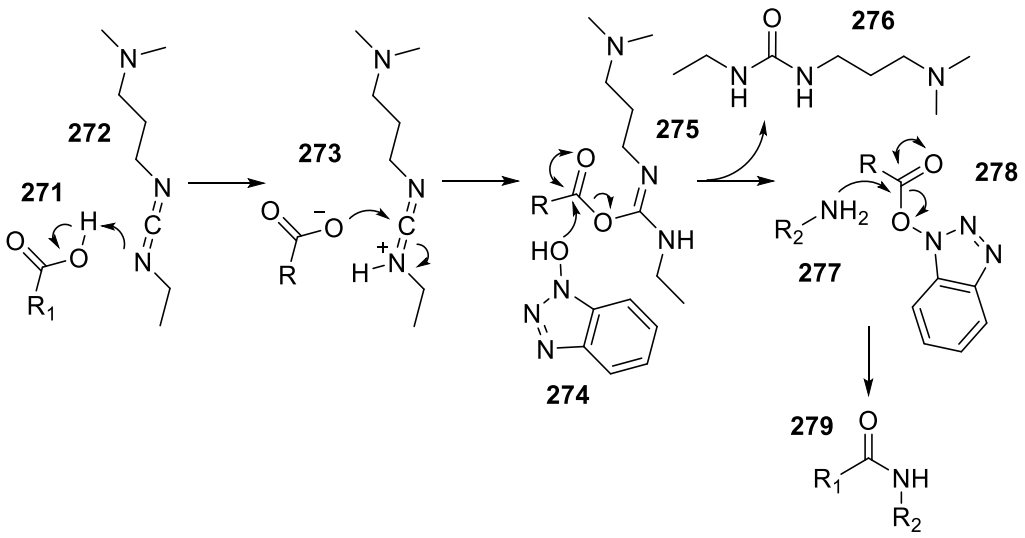
2.9 AHA-L-Ile ja L-Arg -fragmenttien kytkentä

Hydrolyysituotteen **269** kytkentää L-Argo-fragmentin keskeiseen lähtöaineeseen N_{ω}-nitroarginiinin metyyliesteriin (**221**) tutkittiin aluksi käyttäen kytkentäreagenssia *N*,*N'*-disykloheksyylikarbodi-imidi (DCC). Tämän reagenssin haittapuolena on kuitenkin sivutuotteena muodostuva disykloheksyyliurea (DCU), jota on usein vaikea saada erotettua muodostuneesta kytkentäreaktion tuotteesta. Uuttamiseen, flash-pylväskromatografiaan tai liukoisuuksiin perustuvien metodien käyttö tehdyn reaktion raakatuotteen puhdistuksessa osoittautui erittäin hankalaksi. Tästä syystä kytkentäreagenssiksi valittiin 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi hydrokloridi (EDC·HCl), jonka sivutuote, substituoitu urea amiiniryhmällä, on helposti reaktioseoksesta vedellä pois pestävissä.[88] Kytkentäreagensseilla EDC·HCl, HOBt ja NMM kytkettiin lähtöaineet **221** ja **269**, liuottimen ollessa kuivattu dimetyyliformamidi (kaavio 67).



Kaavio 67. AHA- L-Ile ja L-Arg –fragmenttien kytkentäreaktio.

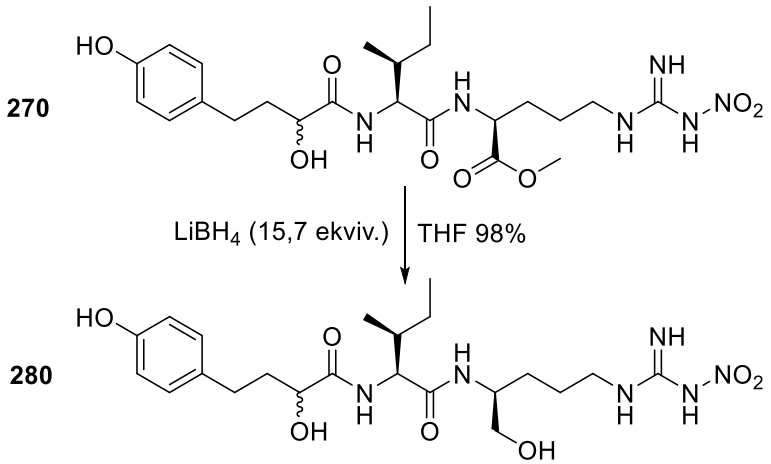
Substitoiduilla karbodi-imideillä tehdyn kytkentäreaktion mekanismi perustuu seka-anhydriyhdisteen **275** muodostumiseen. Tämä muodostuu karboksylaatin **271** ollessa nukleofiilinä. Nukleofiilisen hydroksyyliryhmän sisältävä HOBt (**274**) toimii tämän jälkeen nukleofiilinä ja muodostuu esterisidoksellinen yhdiste **278**. Ureayhdiste **276** lohkeaa pois sivutuotteena. Amiini **277** toimii lopulta nukleofiilinä ja muodostuu amidisidos (**279**) (kaavio 68).



Kaavio 68. Kytkentäreaktion mekanismi.[88,89]

2.10 AHA- L-Ile- L-Argo

Lähtöaine **270** sisältää lukuisia eri funktionaalisia ryhmiä. Näiden ryhmien pääteltiin mahdollisesti hankaloittavan L-Arg-fragmentin kemoselektiviistä pelkistystä metyyliesteristä alkoholiksi. Aikaisemmassa tutkimuksessa havaittiin kuitenkin, että $LiBH_4$-reagenssilla suoritettu pelkistys voisi toimia.[72] Tässä tutkimuksessa tehty reaktio toteutettiin käyttäen ylimäärää pelkistintä (kaavio 69).

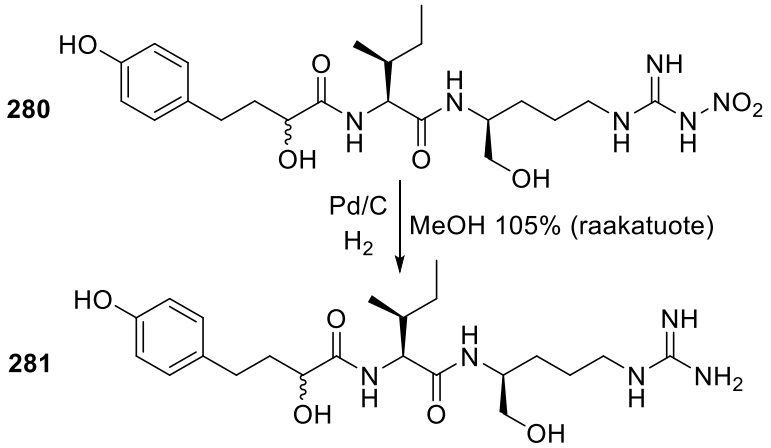


Kaavio 69. Metyyliesterin pelkistys alkoholiksi.

2.11 Nostosiini B

Lähtöaine **280** sisältää guanidiiniryhmässä suojauksen. Tällaisen nitroryhmän poisto vastaavasta funktionaalisesta ryhmästä on suoritustavaltaan kirjallisuudessa laajasti tutkittu ja sen yleinen metodi on metalli- ja vetykeskeinen katalyyttinen pelkistys.[90,91] Metallikatalyytillä

Pd/C suoritettu vedytysreaktio lähtöaineelle **280** suoritettiin metanolissa ja havaittiin yön yli reagoinnin jälkeen, että kyseinen lähtöaine oli kulunut reaktiossa loppuun (TLC-analyysi). Metallikatalyytti suodatettiin ja liuotin haihdutettiin, jolloin saatiin raakatuote **281** (kaavio 70). Raakatuotteesta analysoitiin useita NMR-spektrejä, mutta niiden konsentraatio oli pieni ja NMR-liuottimen havaittiin sisältävän epäpuhtauksia, kuten vettä. Analysointi oli täten hankalaa. Raakatuotteen puhdistusta ja tarkempien NMR-spektrien mittaamista ei ehditty suorittaa. Tästä huolimatta raakatuotteesta mitattiin massaspektri, jolla saatiin nostosiini B:tä vastaava tarkka massa (HRMS (ESI$^+$): m/z laskettu $[C_{22}H_{37}N_5O_5+H]^+$ 452,28620, m/z mitattu 452,28470, Δ(m/z) = 1,5 mDa).



Kaavio 70. Nostosiini B:n synteesi: nitroryhmän pelkistys guanidiiniryhmästä.

3. Yhteenveto

Kokeellisen osuuden ensisijainen tarkoitus oli toteuttaa totaalisynteesit nostosiini A:han ja B:hen. Avainasemassa synteesipolussa oli hyödyntää Passerini-reaktiota, jossa muodostuu uusi kiraalinen hiili. Aikaisemmin tehty tutkielma[72] nostosiinien A ja B totaalisynteeseihin oli pohjana tälle tutkimukselle. Kyseisessä tutkielmassa tehtiin synteesisuunnitelmat, mutta niiden toteuttaminen loppuun saakka osoittautui hankalaksi. Lisäksi kirjallisuudessa on raportoitu vähän stereoselektiivisiä Passerini-reaktioita. Tämän johdosta tutkielmani toissijainen tarkoitus oli kehittää stereoselektiivinen variaatio Passerini-reaktioon.

Kokeellisen osuuden tutkimukset aloitettiin syntetisoimalla Passerini-reaktion komponentit isonitriili (**220**) (L-Ile-fragmentti) ja aldehydi (**219**) (AHA-fragmentti), sekä myöhemmässä vaiheessa kytkettävä L-arginiini-johdannainen (L-Arg-fragmentti) (**221**). Isonitriilikomponentin havaittiin olevan erityisen herkkä hajoamaan happamissa olosuhteissa

ja kirjallisuuskatsauksen perusteella myös erityisen herkkä rasemisoitumaan. Tästä syystä varovaisuuteen kiinnitettiin erityistä huomiota. AHA-fragmentin lähtöaineen viimeisen vaiheen synteesi toteutettiin pelkistäen karboksylaattiesteriryhmä DIBAL-H -reagenssilla aldehydiksi.

Lähtöaineiden synteesien jälkeen edettiin tutkimuksiin Passerini-reaktiolla. Kirjallisuuskatsauksen perusteella lupaaviksi kehittämiseen soveltuviksi vaihtoehdoiksi nähtiin Lewis-happoina toimivat booriyhdisteisiin pohjautuvat kiraaliset reagenssit. Boorihapon havaittiin toimivan Lewis-happokomponenttina Passerini-reaktiossa, kun reaktio tehtiin ilman liuotinta. Kiraalisen ohjaavan ryhmän sisältäviä boronaattiestereitä ja niiden avulla tehtyjä stereoselektiivisiä alkylointireaktioita tutkittiin kirjallisuudesta. Erityistä huomiota kiinnitettiin kyseisten alkylointireaktioiden mekanismeihin. Teoreettisen taustatyön perusteella kehitettiin kemialliselta rakenteeltaan yksinkertaisia kiraalisen ympäristön sisältäviä borinihapporeagensseja, joiden pääteltiin reagoivan stereoselektiivisesti Passerini-reaktiossa. Kiraaliset L-di-isopropyyli- (**260**) ja L-dietyylitartraatti (**262**), sekä (*S*)-binol (**264**) olivat tutkimuksen kohteina ohjaavista ryhmistä ja tavoitteena oli muodostaa näillä viisirenkainen borinihappoesteri. Tutkimuksessa oli mukana vain yksi metodi näiden synteesiin, joka pohjautui esteröintiin Dean-Stark-laitteistolla. Tavoitetuotteiden synteesien onnistumisista ei kuitenkaan saatu varmuutta, joten niiden tutkimuksesta päätettiin luopua. Niiden kehitys ja tutkinta olisi kuitenkin suotavaa, sillä ne ovat vähän tutkittu yhdistejoukko.

Totaalisynteesiä jatkettiin käyttäen substituoimatonta boorihappoa Passerini-reaktiossa, ja siitä muodostuneista diastereomeereista valittiin toinen jatkoreaktioihin. Diastereomeerien stereokemiallista suuntausta ei tässä työssä määritelty. Passerini-reaktion diastereomeeri (**268**) hydrolysoitiin karboksyylihapoksi (**269**), jonka jälkeen siihen kytkettiin L-Arg-fragmentti (**221**). Muodostuneen tuotteen (AHA-L-Ile-L-Arg -kytkentätuote) (**270**) sisältämä karboksylaattiesteriryhmä pelkistettiin kemoselektiivisesti $LiBH_4$:lla primääriseksi alkoholiksi (**280**). Viimeisellä toteutetulla reaktiolla pelkistettiin guanidiiniryhmän sisältämä nitrosuojaus, jolloin tuotteeksi muodostui nostosiini B (**281**) (jossa hiili C9:n stereokemia tuntematon). Sen läsnäolo todettiin vain raakatuotteen HRMS (ESI^+) tarkalla massalla. Raakatuotteesta mitatut NMR-spektrit olivat tarkkuudeltaan hankala tulkita, johtuen NMR-liuottimen ja näytteen epäpuhtaudesta. Raakatuotteen puhdistusta ja tarkempien NMR-spektrien mittaamista ei ehditty suorittaa.

L-Ile-, AHA- ja L-Arg-fragmenttien lähtöaineille (**219**, **220** ja **221**) tehdyt synteesit optimoitiin. Sen sijaan optimointeja ei ehditty suorittaa täysin viimeisten vaiheiden reaktioille. Tässä tapauksessa olisi voitu vielä optimoida esimerkiksi reagenssien moolisuhteita, reaktioaikoja, ja lisäksi raakatuotteen eristys- ja puhdistusmenetelmiä. Synteesituotteiden karakterisoinnissa huomioitavaa oli, että hygroskooppisten NMR-liuottimien, kuten CD_3OD ja DMSO-*d*6 sisältämä kosteus haittasi NMR-spektrien vaihtuvien protonien näkyvyyttä. Lisäksi pienellä skaalalla suoritetut viimeisten vaiheiden reaktiot olivat NMR-spektrien osalta hieman epätarkkoja. Näin ollen esimerkiksi protonien multiplisiteettiä oli hankala määrittää tarkasti.

L-Arg-fragmentin lähtöaineen karakterisoinnissa havaittiin raakatuotteessa epäpuhtautena liuottimena käytettyä metanolia. Metanolin määrä oli pieni, joten se ei haitannut jatkoreaktioita. Kuitenkin myös kyseisen lähtöaineen hygroskooppisuus hankaloitti työskentelyä. Jatkoreaktioihin valitun Passerini-tuotteen, eli *alemman*-diastereomeerin (**268**) hydrolyysi LiOH:lla suoritettiin, ja johtuen tavoitetuotteen (**269**, sisältää fenolin ja karboksyylihapon) reaktiivisuudesta, olisi sen puhdistus pylväskromatografialla (silikageelillä) ollut työlästä. Tästä syystä jatkoreaktioihin edettiin raakatuotteella. Siitä mitatut ^{13}C NMR-spektrit jäivät puutteellisiksi, sillä spektrin jokaista pääteltyä alakentän signaalia ei näkynyt. AHA-L-Ile-L-Arg -välivaiheen karboksylaattiesteriryhmä pelkistettiin suurella ylimäärällä reagenssia $LiBH_4$, jolloin raakatuotteen (**280**) ^1H NMR-spektristä ei havaittu karboksylaattimetyyliesterin karakterisoivaa singlenttisignaalia. Viimeisenä reaktiona toteutettiin guanidiiniryhmän suojauksena olleen nitroryhmän pelkistys, jolloin tuotteeksi tavoiteltiin nostosiini B:tä (**281**, hiili C9:n stereokemia tuntematon). Reaktiota suoritettaessa havaittiin, että lähtöainetta (**280**) ei ollut nähtävissä enää reaktioseoksessa (TLC-analyysi), joka antoi viitettä, että tavoiteltu reaktio oli toteutunut. Saatua tuotetta ei puhdistettu käänteisfaasin pylväskromatografialla, vaan yritettiin karakterisoida raakatuote.

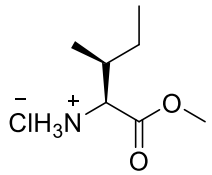
Lähteenä olleessa tutkielmassa[72] mainittiin, että Passerini-reaktiota ei ollut mahdollista suorittaa Lewis-hapolla (trifenyylisilanoli), kun isonitriili sisälsi Lewis-emäksisen karboksylaattiesteriryhmän (yhdiste **220**). Tämän pääteltiin johtuvan siitä, että isonitriilin sivuketju, karboksylaattiesteri, sitoutui karbonyyliä voimakkaampana Lewis-emäksenä trifenyylisilanoliin. Sen sijaan tämän tutkielman johtopäätöksenä voidaan todeta, että Lewis-hapolla (boorihappo) on mahdollista tehdä Passerini-reaktio, kun lähtöaineissa on substituentteina Lewis-emäksiä. Isonitriilifragmentissa (**220**) oleva Lewis-emäs, karboksylaattiesteri, ei haitannut sillä toteutettua Passerini-reaktiota. Sen inhibitoivaa

sitoutumista Lewis-happoon ei todettu. Tämän tutkimuksen perusteella nostosiini A:n ja B:n totaalisynteesit voidaan todennäköisesti saattaa loppuun tutkituilla synteesipoluilla. Tehdyt synteesit ovat toteutuksiltaan helposti toistettavissa. Nostosiini A:n totaalisynteesi jäi tässä tutkielmassa vielä suunnitteluasteille. Polku siihen on kuitenkin mahdollista toteuttaa esimerkiksi hapettaen $LiBH_4$-pelkistyksen tuote (**280**) primäärisestä alkoholista aldehydiksi ja tämän jälkeen mahdollisesti pelkistäen guanidiinin suojausryhmä. Hiili C9:n stereokemian karakterisointi olisi myös hyödyksi.

4. Synteesiohjeet

Mikäli reaktioastian ilmakehän spesifisyyttä ei ole erikseen mainittu, reaktiot suoritettiin reagoimattoman ilmakehän alla argonissa. Reaktiot toteutettiin käyttäen uunikuivattuja reaktioastioita, sekä käytetyt liuottimet kuivattiin käyttäen MBraunin SPS-800 -laitteistoa tai uunikuivattuja 3 Å molekyyliseuloja, mikäli näin on erikseen mainittu. Liuottimien poisto suoritettiin käyttäen pyöröhaihdutinta yhteistoimin korkean alipainelinjaston kanssa. Analyysejä varten ohutlevykromatografia tehtiin käyttäen silikalevyjä (Merck silica gel F254, 230-400 mesh). Flash-kromatografiset puhdistukset tehtiin käyttäen pääsääntöisesti Merck silica gel 60 (230–400 mesh) silikalla, ellei toisin mainita. NMR-analyysit tehtiin käyttäen Brüker Avance 300 MHz tai 500 MHz spektrometria, ja saadut signaalit on ilmoitettu ppm:na suhteessa käytetyn deuteroidun liuottimen signaaleihin. IR-spektrit mitattiin Brüker Tensor 27 FTIR-spektrometrilla, massaspektrometriset analyysit määritettiin MicroMass LCT Premier-massaspektrometrillä, ja kiraalisten yhdisteiden kiertokulmat mitattiin Perkin-Elmer 343-polarimetrillä. Tehdyt analyysit suoritettiin huoneenlämpötilassa (22 °C), ellei toisin mainita.

4.1 L-Isoleusiini-metyyliesteri-hydrokloridi (223)



Asetyylikloridi (2,09 ekviv., 11,4 ml, 12,5 g, 0,160 mol) lisättiin hitaasti jäähauteessa olevaan metanoliin (48,0 ml) ja sekoitettiin 15 minuuttia. L-isoleusiini (1,00 ekviv., 10,0 g, 76,4 mmol) lisättiin ja seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön. Seosta lämmitettiin 60 °C:ssa 24 tuntia. Liuottimet haihdutettiin, jolloin tuote kiinteytyi. Tuotteeksi saatiin amorfinen

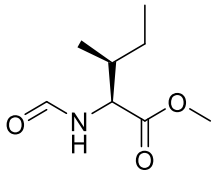
valkoinen jauhe. Tuotetta ei puhdistettu vaan käytettiin sellaisenaan seuraavassa synteesivaiheessa.

Raakasaanto: 12,8 g, 70,6 mmol, 92 %

^{1}H NMR (300 MHz $CDCl_3$) δ_H: 8,76 (3H, bs), 4,05 (1H, s), 3,81 (3H, s), 2,20 (1H, m), 1,50 (2H, m), 1,10 (3H, d, J = 6,9 Hz), 0,97 (3H, t, J =7,4 Hz). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 168,9, 57,5, 52,8, 36,5, 25,7, 15,0, 11,6. Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[92]

Liite 1: ^{1}H, liite 2: ^{13}C

4.2 *N*-formamidi-L-Isoleusiini-metyyliesteri (225)



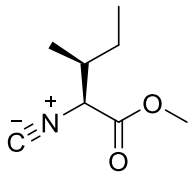
Pivaloyylikloridi (3,07 ekviv., 4,10 ml, 4,02 g, 33,3 mmol) ja muurahaishappo (3,42 ekviv., 1,40 ml, 1,71 g, 37,1 mmol) lisättiin dikloorimetaaniin (25 ml) jäähauteessa. Tähän seokseen lisättiin hitaasti trietyyliamiini (3,37 ekviv., 5,10 ml, 3,70 g, 36,6 mmol) ja sekoitusta jatkettiin 2 tuntia jäähauteessa. Tämän jälkeen seokseen lisättiin L-isoleusiinin metyyliesterin hydrokloridi (**223**) (1,00 ekviv., 1,97 g, 10,9 mmol), jonka jälkeen trietyyliamiini (1,22 ekviv., 1,85 ml, 1,34 g, 13,3 mmol). Jäähaude poistettiin ja seosta sekoitettiin yön yli huoneenlämmössä. Orgaaninen faasi pestiin H_2O:lla (6 ml), 15 % sitruunahapon vesiliuoksella (6 ml), 2 M NaOH-vesiluoksella (2 × 6 ml) ja lopuksi kylläisellä suolaliuoksella (20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4:lla, suodatettiin ja enimmät liuottimet haihdutettiin. Puhdistus suoritettiin flash-pylväskromatografialla (eluenttina EtOAc/n-Hex 1:1) ja liuottimien poiston jälkeen saatiin tuotteeksi väritön öljy.

Saanto: 1,40 g, 8,10 mmol, 75 %

R_f(EtOAc/n-Hex 4:5): 0,66, $KMnO_4$-värjäys, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 8,20 (1H, s), 6,41 (1H, bs), 4,65 (1H, dd, J = 8,9 Hz, 4,9 Hz), 3,71 (3H, s), 1,89 (1H, m), 1,41 (1H, m), 1,16 (1H, m), 0,90 (3H, t, J = 7,3 Hz), 0,89 (3H, d, J = 6,9 Hz), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 172,2, 161,0, 55,1, 52,3, 38,0, 25,2, 15,5, 11,6. Tuotteen spektri vastaa kirjallisuusarvoja.[93]

Liite 3: ^{1}H, liite 4: ^{13}C

4.3 L-Isoleusiini-isonitriili-metyyliesteri (220)



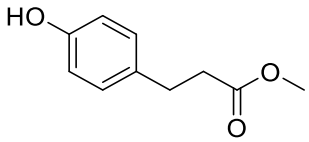
Formamidi **225** (1,00 ekviv., 208 mg, 1,20 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (1,5 ml) ja saatu liuos jäähdytettiin −78 ℃ lämpötilaan. Erilliseen astiaan punnittiin trifosgeeni (0,34 ekviv., 122 mg, 0,410 mmol), liuotettiin dikloorimetaaniin (1,5 ml) ja lisättiin jäähdytettyyn formamidin liuokseen hitaasti. Tämän jälkeen lisättiin hitaasti NMM (2,08 ekv, 0,275 ml, 2,50 mmol). Muodostunutta reaktioseosta sekoitettiin −78 ℃:ssa kaksi tuntia, jolloin huomattiin lähtöaineen **255** kuluneen reaktiossa (TLC-analyysi). Reaktioastiaan lisättiin tuuletusneula ja 20 ml vettä. Seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön ja vesifaasi uutettiin dikloorimetaanilla (2 × 35 ml). Orgaaniset faasit yhdistettiin, pestiin kylläisellä suolaliuoksella (20 ml), kuivattiin Na_2SO_4:lla ja liuotinta haihdutettiin 20 ℃:ssa, kunnes jäljellä oli noin 5 ml. Saatu neste suodatettiin silikan läpi ja suodoksesta haihdutettiin liuotin 20 ℃:ssa pyöröhaihduttimella. Tuotteeksi saatiin väritön neste, johon muodostui pieniä valkoisia hiukkasia (epäiltyä hajoamistuotetta).

Saanto: 0,14 g, 0,90 mmol 75 %

R_f(EtOAc/n-Hex 1:5): 0,55 värjäytyy vanilliinilla keltaiseksi, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 4,18 (1H, d, J = 4,5 Hz), 3,80 (3H, s), 2,08 (1H, m), 1,39 (2H, m), 1,06 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,92 (3H, t, J = 7,4 Hz), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 166,9, 160,5, 62,1, 53,1, 37,7, 24,2, 15,9, 11,2, Tuotteesta mitatut spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[93]

Liite 5: ^{1}H, liite 6: ^{13}C

4.4 Metyyli 3-(4-hydroksifenyyli)propanoaatti (227)



3-(4-hydroksifenyyli)propaanihappo (1,00 ekviv., 5,013 g, 30,2 mmol) lisättiin metanoliin (30 ml), jonka jälkeen sekaan lisättiin hitaasti rikkihappo (96 %, 0,34 ekviv., 0,5 ml, 9,38 mmol). Muodostunutta reaktioseosta refluksoitiin 4 tuntia, jolloin huomattiin TLC-analyysillä, että

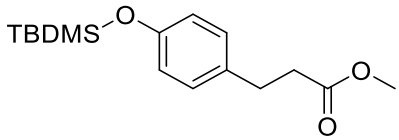
karboksyylihappoa oli vain vähän jäljellä. Reaktioseos konsentroitiin ja jäännös liuotettiin EtOAc:iin (100 ml), pestiin kylläisellä $NaHCO_3$-vesiliuoksella (50 ml), kylläisellä suolaliuoksella (40 ml), kuivattiin Na_2SO_4:lla, suodatettiin ja liuotin haihdutettiin. Tuotteeksi saatiin väritön öljy.

Saanto: 4,43g, 24,6 mmol, 82 %

R_f(EtOAc/n-Hex 9:1): 0,74 $KMnO_4$ –värjäys, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7,05 (2H, d, J = 8,6 Hz), 6,75 (2H, d, J = 8,6 Hz), 5,16 (1H, bs), 3,67 (3H, s), 2,88 (2H, t, J = 7,7 Hz), 2,60 (2H, t, J = 7,7 Hz), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 173,9, 154,3, 132,6, 129,5, 115,5, 51,8, 36,2, 30,2, Tuotteesta mitatut spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[73]

Liite 7: ^{1}H, liite 8: ^{13}C

4.5 Metyyli 3-(4-((*t*-butyylidimetyylisilyylieetteri)fenyylipropanoaatti (228)



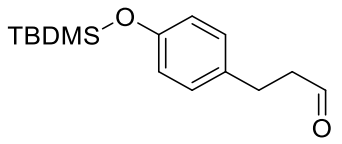
Yhdiste **227** (1,00 ekviv., 1,01 g, 5,61 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (19 ml) ja seokseen lisättiin TBDMSCl (1,14 ekviv., 970 mg, 6,41 mmol) sekä imidatsoli (1,52 ekviv., 580 mg, 8,54 mmol). Seokseen muodostui vaaleata kiinteää sakkaa. Sekoitusta jatkettiin yön yli ja reaktio sammutettiin lisäämällä seokseen vettä. Uutto suoritettiin dietyylieetterillä (2 × 40 ml) ja orgaaniset faasit yhdistettiin, pestiin kylläisellä suolaliuoksella (25 ml) ja kuivattiin Na_2SO_4:lla. Liuotin haihdutettiin alipaineessa ja tuotteen puhdistus suoritettiin flash-pylväskromatografialla (eluenttina EtOAc/n-Hex 1:9). Liuottimien haihdutuksen jälkeen tuotteeksi saatiin väritön öljy.

Saanto: 1,50 g, 5,08 mmol, 91 %

R_f(EtOAc/n-Hex 1:9): 0,5 $KMnO_4$ –värjäys, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7,04 (2H, d, J = 8,6 Hz), 6,75 (2H, d, J = 8,5 Hz), 3,66 (3H, s), 2,89 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,60 (2H, t, J = 7,8 Hz), 0,98 (9H, s), 0,19 (6H, s), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 173,5, 154,1, 133,3, 129,2, 120,1, 51,6, 36,1, 30,3, 25,8, 18,3, −4,3, Tuotteesta mitatut spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[73]

Liite 9: ^{1}H, liite 10: ^{13}C

4.6 3-(4-((*t*-butyylidimetyylisilyylieetteri)fenyylipropanaali (219)



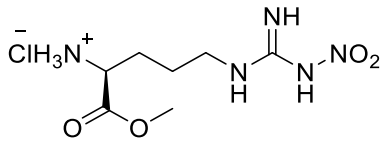
Esteri **228** (1,00 ekviv., 0,900 g, 3,06 mmol) liuotettiin dikloorimetaaniin (15 ml) ja seos jäähdytettiin −78 °C:ksi kuivajäällä. DIBAL-H (1,08 ekviv., 3,30 ml, 1 M liuos heksaanissa, 3,30 mmol) lisättiin hitaasti ja sekoittelua jatkettiin puoli tuntia. TLC-analyysissä tällöin huomattiin, että lähtöaine **228** oli kulunut reaktiossa loppuun. Metanolia (2 ml) lisättiin reaktioseokseen ja tämän jälkeen kylläistä NH_4Cl-vesiliuosta (5 ml). Uutto suoritettiin EtOAc:lla (2 × 30 ml), orgaaniset faasit yhdistettiin ja pestiin kylläisellä suolaliuoksella (20 ml). Orgaaninen faasi kuivattiin Na_2SO_4:lla ja haihdutettiin liuottimesta. Tuotteen flash-pylväskromatografinen puhdistus (eluenttina EtOAc/n-Hex 1:5) tehtiin ja liuottimet haihdutettiin. Tuotteeksi saatiin väritön öljy.

Saanto: 561 mg, 2,12 mmol, 69 %

R_f(20% EtOAc-Hex): 0,56 $KMnO_4$ -värjäys, ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 9,80 (1H, t, J = 7,8 Hz), 7,04 (2H, d, J = 8,5 Hz), 6,75 (2H, d, J = 8,5 Hz), 2,89 (2H, t, J = 7,4 Hz), 2,73 (2H, t, J = 7,4 Hz), 0,98 (9H, s), 0,19 (6H, s) ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 201,9, 154,2, 133,0, 129,3, 120,2, 45,6, 27,5, 25,8, 18,3, −4,3, Tuotteesta mitatut spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[73]

Liite 11: ^{1}H, liite 12: ^{13}C

4.7 Metyyli N_ω-nitro- L-arginaatti hydrokloridi (221)



Asetyylikloridi (2,00 ekviv., 718 mg, 0,650 ml, 9,14 mmol) lisättiin hitaasti jäähauteessa olevaan metanoliin (16,2 ekviv., 3,00 ml) ja muodostunutta reaktioseosta sekoitettiin 15 minuuttia. N_ω-nitro-L-arginiini (1,00 ekviv., 1,00 g, 4,57 mmol) lisättiin ja seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön. Seosta lämmitettiin 60 °C:ssa 24 tuntia. Reaktion etenemistä seurattiin ^{1}H NMR:llä ja huomattiin, että esteröintireaktio oli edennyt lähes loppuun saakka.

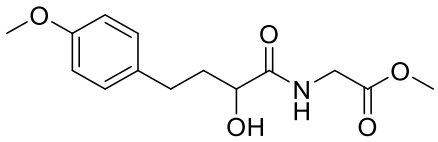
Liuottimet haihdutettiin ja tuotteeksi saatiin vaaleanpunainen hygroskooppinen amorfinen massa.

Raakasaanto: 1,31g, 4,85 mmol, 106 %, (H_2O ja MeOH epäpuhtautena)

^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ_H: 4,27 (1H, t, J = 6,4 Hz), 3,91 (3H, s), 3,40 (2H, t, J = 6,7 Hz), 2,08 (2H, m), 1,82 (2H, m), ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O) δ_C: 170,5, 159,0, 53,7, 52,5, 40,3, 26,9, 23,3, Tuotteen spektrit vastaavat kirjallisuusarvoja.[94]

Liite 13: ^{1}H, liite 14: ^{13}C

4.8 Metyyli *N*-(2-hydroksi-4-(4-metoksifenyyli)butanoyyli)glysinaatti (232)



3-(4-metoksifenyyli)propanaali (1,00 ekviv., 131 mg, 0,800 mmol), metyyli-isosyanoasetaatti (1,30 ekviv., 103 mg, 1,04 mmol) ja boorihappo (1,60 ekviv., 79,0 mg, 1,28 mmol) lisättiin kolviin, joka oli magnettisekoituksella varustetetussa refluksointilaitteistossa ja öljyhauteessa. Muodostunutta reaktioseosta lämmitettiin 2 tuntia 100 °C:ssa, jolloin seoksen väri muuttui ruskeaksi ja koostumus jämäkäksi. Tämän jälkeen seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja uutto tehtiin EtOAc:lla (2 × 20 ml). Orgaaninen faasi pestiin kahdesti liuoksella, joka oli tehty lisäämällä kylläisen $NaHCO_3$-vesiliuoksen tilavuuteen sama määrä vettä (6 ml). Pesu suoritettiin vielä kylläisellä suolaliuoksella (15 ml), jonka jälkeen kuivaus suoritettiin Na_2SO_4:lla. Liuotin haihdutettiin ja raakatuotteen puhdistus suoritettiin flash-pylväskromatografian avulla (eluenttina EtOAc). Liuottimien haihdutusten jälkeen tuotteeksi saatiin amorfinen valkoinen jauhe.

Saanto: 172 mg, 0,611 mmol, 71 %

R_f(100% EtOAc): 0,55 $KMnO_4$ -värjäys, IR (filmi, cm^{-1}): 3263, 2952, 2912, 1630, 1511, 1239, 1080, 998, 822, 660, 505, HRMS (ESI$^+$): m/z laskettu $[C_{14}H_{19}NO_5+Na]^+$ 304,11554, m/z mitattu 304,11650, Δ(m/z) = 0,96 mDa.

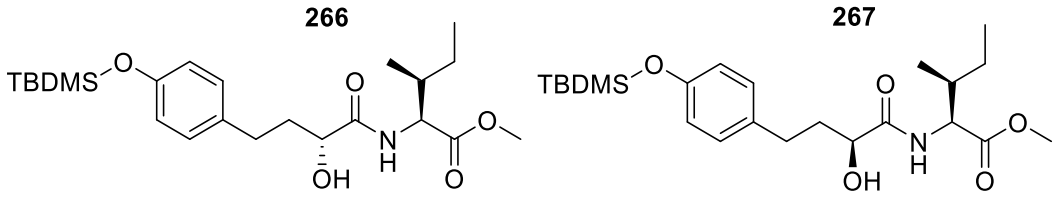
^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7,13 (2H, d, J = 8,6 Hz), 7,00 (1H, app. t, J = 5,2 Hz) 6,82 (2H, d, J = 8,6 Hz), 4,17 (1H, dd, J = 8,1 Hz, 3,7 Hz), 4,05 (2H, t, J = 5,7 Hz), 3,78 (3H, s), 3,76 (3H, s), 2,73 (2H, t, J = 7,8 Hz), 2,14 (1H, m), 1,96 (1H, m), ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 174,3, 170,4, 158,1, 133,2, 129,6, 114,1, 71,7, 55,4, 52,6, 40,9, 36,6, 30,4

Liite 15: ^{1}H, liite 16: ^{13}C

4.9 Boorihapon esteröintireaktiokoe – reaktioiden esimerkkitoteutus

Dietyyli-L-tartraatti (1,00 ekviv., 3,00 g, 14,6 mmol) ja boorihappo (1,00 ekviv., 900 mg, 14,6 mmol) liuotettiin tolueeniin (10 ml) ja muodostunutta reaktioseosta lämmitettiin Dean-Stark-laitteistossa kiehumakivien kanssa, kunnes veden muodostuminen loppui. Liuotin haihdutettiin karakterisointia varten.

4.10 TBDMS-AHA- L-Ile-metyyliesteri (*R*) (266), TBDMS-AHA- L-Ile-metyyliesteri (*S*) (267)



Aldehydi **219** (1,00 ekviv., 430 mg, 1,63 mmol), isonitriili **220** (1,30 ekv, 328 mg, 2,11 mmol) ja boorihappo (1,60 ekviv., 161 mg, 2,60 mmol) lisättiin kolviin, joka oli magnettisekoituksella varustetetussa refluksointilaitteistossa ja öljyhauteessa. Muodostunutta reaktioseosta lämmitettiin 2 tuntia 100 °C:ssa, jolloin seoksen väri muuttui tumman punaiseksi ja koostumus jähmeäksi öljyksi. Tämän jälkeen seoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja uutto suoritettiin EtOAc:lla (2 × 40 ml). Orgaaninen faasi pestiin kahdesti liuoksella, joka oli tehty lisäämällä kylläisen $NaHCO_3$-vesiliuoksen tilavuuteen sama määrä vettä (6 ml). Pesu suoritettiin vielä kylläisellä suolaliuoksella (20 ml), jonka jälkeen kuivaus suoritettiin Na_2SO_4:lla. Liuotin haihdutettiin ja tuotteen puhdistus, sekä diastereomeerien erottelu suoritettiin Combiflash® R_f –automaattisella pylväskromatografilla. Ensimmäinen ajo suoritettiin 20 – 60 % EtOAc/Hex –liuottimilla, mutta diastereomeerit jäivät ajossa hieman päällekäin. Toista ajoa varten päällekäiset fraktiot yhdistettiin ja ajo suoritettiin uudelleen 20 – 40 % EtOAc/Hex –liuottimilla, jolloin fraktiot saatiin täysin eroteltua toisistaan. Tuotteen diastereomeerit saatiin keltaisina jähmeinä öljyinä liuottimien haihdutuksen jälkeen.

Yhteissaanto: 531 mg, 1,21 mmol, 75 %. Diastereomeerien nimityksinä käytettiin poolisuuksiin perustuvaa nimeämistä: Ylempänä ohutlevykromatografiassa liikkuva yhdiste on ylempi –diastereomeeri ja vastaava alempana liikkuva yhdiste on *alempi* –diastereomeeri.

Ylempi-diastereomeeri 258 mg

R_f(EtOAc/n-Hex 1:1): 0,61 $KMnO_4$-värjäys, $[\alpha]_D^{20}$ (DCM)= + 17,1°, IR (filmi, cm^{-1}): 3273, 2933, 2884, 1732, 1639, 1495, 1431, 1133, 1071, 890, 745, HRMS (ESI^+): m/z laskettu $[C_{23}H_{39}NO_5Si+Na]^+$ 460,24897, m/z mitattu 460,24860, Δ(m/z) = 0,4 mDa.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7,06 (2H, d, *J* = 8,3 Hz), 6,81 (1H, d, *J* = 8,6 Hz), 6,76 (2H, d, *J* = 8,3 Hz), 4,60 (1H, dd *J* = 8,6 Hz, 5,0 Hz), 4,16 (1H, dd, *J* = 8,1 Hz, 3,5 Hz), 3,74 (3H, s), 2,71 (2H, t, *J* = 7,7 Hz), 2,14 (1H, m), 1,93 (1H, m, päällekäin 1,93 m:n kanssa), 1,93 (1H, m, päällekäin 1,93 m:n kanssa), 1,45 (1H, m), 1,18 (1H, m), 0,98 (9H, s), 0,92 (3H, d, *J* = 7,4 Hz, päällekäin 0,92 t:n kanssa), 0,92 (3H, t, *J* = 7,6 Hz, päällekäin 0,92 d:n kanssa), 0,18 (6H, s)

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 173,3, 172,2, 154,0, 133,6, 129,4, 120,1, 71,6, 56,2, 52,1, 37,9, 36,6, 30,4, 25,7, 25,2, 18,2, 15,5, 11,5, −4,4

Liite 17: HRMS (ESI^+), liite 18-19: ^{1}H, liite 20: ^{13}C, liite 21: DEPT45, liite 22: DEPT90, liite 23: DEPT135, liite 24-26: ^{1}H^{1}H COSY, liite 27: ROESY, liite 28: HSQC, liite 29: HMBC.

Alempi-diastereomeeri 274 mg

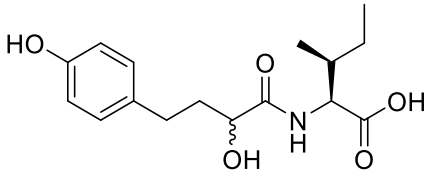
R_f(EtOAc/n-Hex 1:1): 0,47 $KMnO_4$ –värjäys, $[\alpha]_D^{20}$ (THF)= + 1,33°, IR (filmi, cm^{-1}): 3394, 2958, 2930, 2858, 1742, 1652, 1508, 1252, 913, 837, 779, HRMS (Liite 30, ESI^+): m/z laskettu $[C_{23}H_{39}NO_5Si+Na]^+$ 460,24897, m/z mitattu 460,24810, Δ(m/z) = 0,9 mDa.

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H: 7,06 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 6,90 (1H, d, *J* = 8,8 Hz), 6,76 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 4,60 (1H, dd *J* = 8,9 Hz, 5,0 Hz), 4,15 (1H, dd, *J* = 8,2 Hz, 3,7 Hz), 3,74 (3H, s), 2,71 (2H, t, *J* = 7,8 Hz), 2,13 (1H, m), 1,92 (1H, m, päällekäin 1,92 m:n kanssa), 1,92 (1H, m, päällekäin 1,92 m:n kanssa), 1,43 (1H, m), 1,18 (1H, m), 0,98 (9H, s), 0,92 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, päällekäin 0,92 t:n kanssa), 0,92 (3H, t, *J* = 6,7 Hz, päällekäin 0,92 d:n kanssa), 0,18 (6H, s)

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C: 173,4, 172,4, 154,0, 133,6, 129,4, 120,1, 71,6, 56,1, 52,1, 37,9, 36,7, 30,5, 25,7, 25,1, 18,2, 15,5, 11,5, −4,4.

Liite 30: HRMS (ESI^+), liite 31-32: ^{1}H, liite 33: ^{13}C, liite 34: DEPT45, liite 35: DEPT90, liite 36: DEPT135, liite 37-39: ^{1}H^{1}H COSY, liite 40: NOESY, liite 41: HSQC, liite 42: HMBC.

4.11 AHA- L-Ile-karboksyylihappo (*alempi*-diastereomeeri) (269)



Edellä tehdyn pelkistystuotteen *alempi*-diastereomeeri (1,00 ekviv., 150 mg, 0,340 mmol) liuotettiin lisäaineettomaan tetrahydrofuraaniin (12 ml) ja liuos jäähdytettiin jäähauteessa. Sekaan lisättiin LiOH:n vesiliuos (3,34 ekviv., 48,0 mg, 1,14 mmol, 12 ml:ssa vettä) hitaasti ja seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön ja sekoitettiin 2 tuntia. Vettä (10 ml) lisättiin ja enin tetrahydrofuraani haihdutettiin pyöröhaihduttimella pitäen lämpötila 30 °C:ssa. Saatu liuos pestiin EtOAc:lla (20 ml) ja vesifaasi tehtiin happamaksi suolahapolla. Uutto suoritettiin EtOAc:lla (2 × 20 ml) ja orgaaniset faasit yhdistettiin, pestiin kylläisellä suolaliuoksella (10 ml) ja kuivattiin Na_2SO_4:lla. Liuotin haihdutettiin ja tuotteeksi saatiin vaalean ruskea amorfinen jauhe. Tuotetta ei puhdistettu vaan käytettiin sellaisenaan seuraavaan synteesiin.

Raakasaanto: 97,8 mg, 316 μmol, 92 %

$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH)= + 0,4°, IR (filmi, cm^{-1}): 3381, 2964, 2930, 1715, 1643, 1513, 1452, 1216, 1079, 828, 659, HRMS (ESI^+): m/z laskettu $[C_{16}H_{23}NO_5+Na]^+$ 332,14684, m/z mitattu 332,14550, Δ(m/z) = 1,34 mDa.

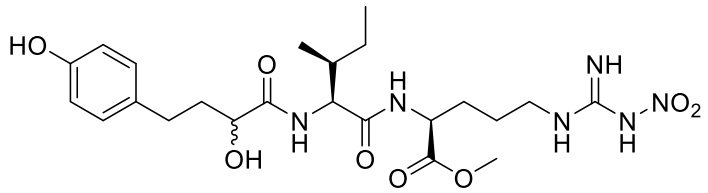
^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H: 7,01 (2H, d, *J* = 8,4 Hz), 6,69 (2H, d, *J* = 8,4 Hz), 4,42 (1H, d, *J* = 5,1 Hz), 4,04 (1H, dd, *J* = 8,0 Hz, 3,8 Hz), 2,63 (2H, t, *J* = 8,0 Hz), 2,00 (1H, m), 1,94 (1H, m), 1,82 (1H, m), 1,52 (1H, m), 1,25 (1H, m), 0,96 (3H, d, *J* = 6,7 Hz), 0,95 (3H, t, *J* = 6,9 Hz)

Fenolinen hiili ja karbonyylien hiilet eivät näy ^{13}C-spektrissä.

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C: 133,7, 130,4, 116,2, 72,1, 57,4, 38,8, 38,1, 31,4, 26,2, 16,0, 11,8.

Liite 43: HRMS (ESI^+), liite 44-45: ^{1}H, liite 46: ^{13}C, liite 47: DEPT90, liite 48: DEPT135, liite 49-50: ^{1}H^{1}H COSY, liite 51: ROESY, liite 52-53: HSQC.

4.12 AHA- L-Ile- L-Arg-metyyliesteri (270)



Yhdiste **269** (1,00 ekviv., 73,1 mg, 236 μmol), **221** (1,60 ekviv., 102 mg, 378 μmol) ja HOBt·H_2O (5,42 ekviv., 173 mg, 1280 μmol) liuotettiin vedettömään dimetyyliformamidiin (5 ml) ja sekaan lisättiin NMM (11,6 ekviv., 300 μl, 2730 μmol). Tämän jälkeen lisättiin 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyyli)karbodi-imidi hydrokloridi (EDC·HCl) (1,15 ekviv., 52,1 mg, 272 μmol) liuotettuna vedettömään dimetyyliformamidiin (2 ml). Muodostunutta reaktioseosta sekoitettiin 48 tuntia huoneenlämmössä ja tämän jälkeen lisättiin vettä (20 ml) sekä 30 % sitruunahapon vesiliuosta (1 ml). Vesifaasi uutettiin EtOAc:lla (3 × 20 ml) ja pestiin kylläisellä $NaHCO_3$:lla (10 ml), jonka jälkeen kahteen kertaan vedellä (10 ml). Etyyliasetaattiliuos kuivattiin Na_2SO_4:lla ja liuotin haihdutettiin. Raakatuotteen flash-pylväskromatografinen puhdistus tehtiin (eluentteina MeOH/DCM 1:9) ja tuotteeksi saatiin liuottimien haihdutuksen jälkeen vaaleankeltainen amorfinen jauhe.

Saanto: 75,7 mg, 144 μmol, 61 %, (reaktiota ei optimoitu)

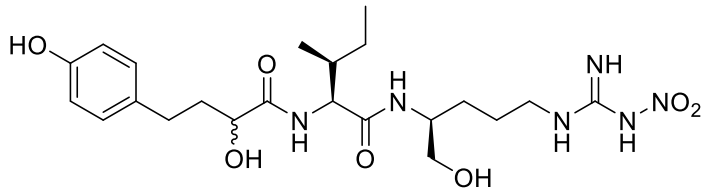
R_f(MeOH/DCM 1:9): 0,42 $KMnO_4$ –värjäys, $[\alpha]_D^{20}$ (MeOH)= − 19,0°, IR (filmi, cm^{-1}): 3293, 2961, 1740, 1632, 1514, 1437, 1213, 1077, 830, 533, HRMS (Liite 54, ESI^+): m/z laskettu $[C_{23}H_{36}N_6O_8+K]^+$ 563,22262, m/z mitattu 563,22140, Δ(m/z) = 1,22 mDa.

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H: 7,01 (2H, d, J = 8,5 Hz), 6,69 (2H, d, J = 8,5 Hz), 4,47 (1H, dd, J = 8,2 Hz, 4,5 Hz), 4,42 (1H, d, J = 7,6 Hz), 4,03 (1H, dd, J = 8,0 Hz, 3,6 Hz), 3,71 (3H, s), 3,24 (2H, m), 2,63 (2H, t, J = 8,0 Hz), 2,04−1,61 (7H, m), 1,57 (1H, m), 1,19 (1H, m), 0,98 (3H, d, J = 6,8 Hz), 0,92 (3H, t, J = 7,4 Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C: 177,0, 173,8, 173,4, 161,0, 156,5, 133,7, 130,4, 116,2, 72,1, 58,4, 53,2, 52,7, 41,6, 38,5, 38,1, 31,4, 29,6, 25,9, 20,7, 15,8, 11,2.

Liite 54: HRMS (ESI^+), liite 55-58: ^{1}H, liite 59: ^{13}C, liite 60: DEPT45, liite 61: DEPT90, liite 62: DEPT135, liite 63-64: ^{1}H^{1}H COSY, liite 65: NOESY, liite 66-68: HSQC, liite 69-71: HMQC, liite 72: HMBC.

4.13 AHA- L-Ile- L-Argo (280)



Yhdiste **270** (1,00 ekviv., 45,0 mg, 85,8 μmol) liuotettiin lisäaineettomaan THF (5 ml). Tämä liuos jäähdytettiin 0 °C:seen ja $LiBH_4$ (15,7 ekviv., 675 mml, 2M liuos tetrahydrofuraanissa, 1,35 mmol) lisättiin hitaasti. Sekoitusta jatkettiin jäähauteessa ja 45 minuutin kuluessa seokseen oli ilmestynyt valkoista sakkaa. Tunnin jälkeen jäähaude poistettiin ja seoksen annettiin lämmetä huoneenlämpöön sekoitusta jatkaen yön yli. Ylimääräinen boorihydridi tuhottiin lisäämällä seokseen 30 % sitruunahapon vesiliuosta ja tämän jälkeen vettä (10 ml). Enin tetrahydrofuraani haihdutettiin ja saadusta liuoksesta uutettiin orgaaniset komponentit EtOAc:lla (2 × 20 ml). Vesifaasi tehtiin vielä emäksiseksi kylläisellä $NaHCO_3$-vesiliuoksella ja uutto toistettiin EtOAc:lla (2 × 20 ml). Saadut EtOAc-liuokset yhdistettiin, pestiin kylläisellä suolaliuoksella (10 ml) ja kuivattiin Na_2SO_4:lla. Liuottimien poiston jälkeen saatiin raakatuote **A**.

Reaktio toistettiin samoilla reagenssien suhteilla ja lähtöaineen **270** määrän ollessa 10,0 mg, jolloin saatiin raakatuote **B**. Raakatuotteet **A** ja **B** yhdistettiin ja flash-pylväskromatografisen puhdistukseen (MeOH/DCM 1:9) ja liuottimien poiston jälkeen tuotteeksi saatiin vaaleanruskea amorfinen jauhe.

Yhdistetty saanto: 50,9 mg, 103 μmol, 98 %, (reaktiota ei optimoitu)

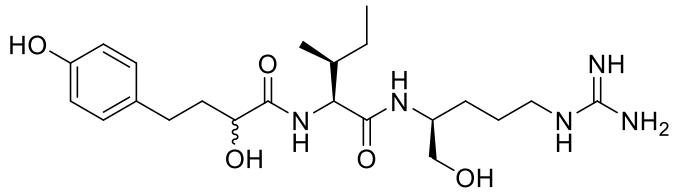
R_f(MeOH/DCM 1:9): 0,21 $KMnO_4$ –värjäys, $[\alpha]_D^{20}$ (MeOH)= − 19,8°, IR (filmi, cm^{-1}): 3290, 2921, 1633, 1514, 1451, 1260, 1080, 1252, 609, HRMS (ESI^+): m/z laskettu $[C_{22}H_{36}N_6O_7+Na]^+$ 519,25377, m/z mitattu 519,25330, Δ(m/z) = 0,47 mDa.

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H: 7,01 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 6,69 (2H, d, *J* = 8,5 Hz), 4,20 (1H, d, *J* = 7,9 Hz), 4,03 (1H, dd, *J* = 8,1 Hz, 3,7 Hz), 3,91 (1H, m), 3,50 (2H, m), 3,23 (2H, m), 2,63 (2H, t, *J* = 8,0 Hz), 2,00 (1H, m**),** 1,83 (1H, m, päällekäin 1,83 m:n kanssa), 1,83 (1H, m, päällekäin 1,83 m:n kanssa), 1,73−1,40 (6H, m), 0,96 (3H, d, *J* = 6,8 Hz), 0,92 (3H, t, *J* = 7,4 Hz)

^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C: 177,0, 173,8, 161,0, 156,5, 133,7, 130,4, 116,2, 72,2, 65,0, 58,8, 52,2, 42,0, 38,3, 38,1, 31,4, 29,2, 26,0, 15,9, 14,4, 11,2.

Liite 73: HRMS (ESI$^+$), liite 74-76: ^{1}H, liite 77: ^{13}C, liite 78: DEPT45, liite 79: DEPT90, liite 80: DEPT135, liite 81-83: ^{1}H^{1}H COSY, liite 84-86: HSQC, liite 87-88: HMQC.

4.14 Nostosiini B (281)



Yhdiste **280** (1,00 ekviv., 34,8 mg, 70,1 μmol) liuotettiin metanoliin (5 ml). Erilliseen astiaan punnittiin 5 % Pd/C (70 mg) ja reaktioastia huuhdeltiin kolmesti vakuumi-argon-sykleillä (argon-pallo). Yhdisteen **280** liuos metanolissa lisättiin Pd/C:n sisältävään kolviin ja ilmakehä vaihdettiin vedyksi huuhtelemalla kolvi kolmesti vakuumi-vety-sykleillä (vety-pallo). Muodostunutta reaktioseosta sekoitettiin yön yli, jolloin huomattiin lähtöaineen **280** kuluneen reaktiossa (TLC-analyysi). Palladiumkatalyytti erotettiin seliittisuodatuksella ja liuotin haihdutettiin. Tuotteeksi saatiin kellertävä tahna.

Raakasaanto: 33,3 mg, 73,7 μmol, 105 %

Tuotteen ^{1}H NMR-spektri sisälsi hyvin paljon vettä (leveä piikki siirtymällä 3,33 ppm), ja piikit olivat erittäin leveitä. Kuitenkin spektristä voitiin havaita seuraavia karakteristisia piikkejä, jotka vastaavat nostosiini B:lle raportoituja siirtymiä[71]. Näytteen konsentraatio oli lisäksi pieni, mikä haittasi ^{13}C NMR-spektrin tarkkuutta.

^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ_H: 6,95 (2H), 6,65 (2H), 4,20 (1H), 3,85 (1H), 3,70 (app. 1H), 1.08–0.95 (2H).

^{13}C DEPT 45 NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ_C: 128,8, 114,8, 70,1, 62,9, 55,7, 50,0, 37,1, 36,7, 29,7, 27,5, 24,8, 24,0, 15,1, 10,8.

^{13}C DEPT45 ja ^{1}H NMR-spektrejä käytettiin 1D-spektreinä HSQC-spektrissä. ^{1}H^{1}H COSY ja HSQC -spektrien karakterisointien apuna olivat vastaavat spektrit, jotka Liu *et. al.*[70] saivat työssään.

HRMS (ESI$^+$): m/z laskettu $[C_{22}H_{37}N_5O_5+H]^+$ 452,28620, m/z mitattu 452,28470, Δ(m/z) = 1,5 mDa.

Liite 89-90: HRMS (ESI^+), liite 91: ^1H, liite 92: DEPT45, liite 93: $^1H^1H$ COSY, liite 94: HSQC.

5. Kirjallisuusluettelo

[1] Khan, R. A., Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals, *Saudi Pharm. J.* **2018**, *26* (5), 739-753.

[2] Smith, J. G., *Organic chemistry*, 3 painos, McGraw-Hill, New-York, USA, 2011.

[3] Warren, S. ja Wyatt, P., *Organic Synthesis - The Disconnection Approach*, 2 painos, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2008.

[4] Nicolau, K. C. ja Sorensen, E. J., *Classics in organic synthesis*, Wiley-VCH, New York, USA, 1996, 1–18.

[5] Mahady, G. B. ja Chadwick, L. R., Goldenseal (Hydrastis canadensis): is there enough scientific evidence to support safety and efficacy?, *Nutr. Clin. Care*, **2001**, *4* (5), 243-249.

[6] Huang, J. H. ja Johnston, G. A., (+)-Hydrastine, a potent competitive antagonist at mammalian GABAA receptors, *Br. J. Pharmacol.*, **1990**, *99* (4), 727.

[7] Falck, J. R. ja Manna, S., An intramolecular Passerini reaction: Synthesis of hydrastine, *Tetrahedron Lett.,* **1981**, *22* (7), 619–620.

[8] Wang, Q.; Wang, D. X.; Wang, M. X. ja Zhu, J., Still unconquered: enantioselective Passerini and Ugi multicomponent reactions, *Acc. Chem. Res*., **2018**, *51* (5), 1290-1300.

[9] Banfi, L. ja Renata R., The Passerini Reaction, *Organic Reactions,* **2004**, *65.*

[10] Passerini, M. ja Simone, L., Isonitriles. I. Compound of *p*-isonitrileazobenzene with acetone and acetic acid, *Gazzeta Chim. Ital*. **1921**, *51* (2), 126–129.

[11] Ramozzi, R. ja Morokuma, K., Revisiting the Passerini reaction mechanism: existence of the nitrilium, organocatalysis of its formation, and solvent effect, *The Journal of organic chemistry*, **2015**, *80* (11) 5652-5657.

[12] Xia, Q. ja Ganem, B., Metal-promoted variants of the Passerini reaction leading to functionalized heterocycles, *Org. lett*., **2002**, *4* (9), 1631-1634.

[13] Wang, S.; Wang, M. X.; Wang, D. X. ja Zhu, J., Asymmetric Lewis Acid Catalyzed Addition of Isocyanides to Aldehydes–Synthesis of 5-Amino-2-(1-hydroxyalkyl)oxazoles, *Eur. J. Org. Chem*., **2007**, (24), 4076-4080.

[14] Yue, T.; Wang, M. X.; Wang, D. X.; Masson, G. ja Zhu, J., Catalytic asymmetric Passerini-type reaction: Chiral aluminum-organophosphate-catalyzed enantioselective α-addition of isocyanides to aldehydes, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74* (21), 8396-8399.

[15] Dörwald, F. Z., *Side reactions in Organic Synthesis: a guide to successful synthesis design*, John Wiley & Sons, Weinheim, Saksa, 2006.

[16] (a) Nenajdenko, V., *Isocyanide Chemistry: Applications in Synthesis and Material Science*, John Wiley & Sons, New York, USA, 2012. (b) Zhu, J.; Wu, X. ja Danishefsky, S. J., On the preparation of enantiomerically pure isonitriles from amino acid esters and peptides, *Tetrahedron Lett*., **2009**, *50* (5), 577-579.

[17] Walborsky, H. M. ja Niznik, G. E., Synthesis of isonitriles, *J. Org. Chem*., **1972**, *37* (2), 187-190.

[18] Caballero, M. J. A.; Ayaz, M.; Banfi, L.; Basso, A. ja Bernardi, L., *Science of Synthesis: Multicomponent Reactions Vol. 1: General Discussion and Reactions Involving a Carbonyl Compound as Electrophilic Component*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Saksa, 2014.

[19] Zahoor, A. F.; Thies, S. ja Kazmaier, U., A straightforward approach towards combined α-amino and α-hydroxy acids based on Passerini reactions, *Beilstein J. Org. Chem*., **2011**, *7* (1), 1299-1303.

[20] Youcef, S. D.; Kerim, M. D.; Ilitki, H. ja El Kaïm, L., A Passerini/Tsuji-Trost access to dienamide derivatives. *Tetrahedron Lett.*, **2019**, *60* (2), 102-105.

[21] Saegusa, T.; Taka-Ishi, N. ja Fujii, H., Reaction of carbonyl compound with isocyanide, *Tetrahedron Lett*., **1968**, *24* (10), 3795-3798.

[22] Koszelewski, D.; Szymanski, W.; Krysiak, J. ja Ostaszewski, R., Solvent-free Passerini reactions, *Synth. Commun*., **2008**, *38* (7), 1120-1127.

[23] Bousquet, T.; Jida, M.; Soueidan, M.; Deprez-Poulain, R.; Agbossou-Niedercorn, F. ja Pelinski, L., Fast and efficient solvent-free Passerini reaction, *Tetrahedron Lett*., **2012,** *53* (3), 306-308.

[24] Barreto, A. D. F. S.; Vercillo, O. E. ja Andrade, C. K. Z., Microwave-assisted Passerini reactions under solvent-free conditions, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2011**, *22* (3), 462-467.

[25] Pirrung, M. C. ja Sarma, K. D., Multicomponent reactions are accelerated in water, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126* (2), 444-445.

[26] Paprocki, D.; Koszelewski, D.; Walde, P. ja Ostaszewski, R., Efficient Passerini reactions in an aqueous vesicle system, *RSC Adv.*, **2015**, *5* (124), 102828-102835.

[27] Hagedorn, I. ja Eholzer, U., Einstufige synthese von α-Hydroxysäure-amiden durch Abwandlung der Passerini-reaktion, *Chem. Ber.,* **1965**, *98* (3), 936-940.

[28] Soeta, T.; Matsuzaki, S. ja Ukaji, Y., A one-pot *o*-sulfinative passerini/oxidation reaction: Synthesis of α-(sulfonyloxy) amide derivatives, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80* (7), 3688-3694.

[29] Soeta, T.; Matsuzaki, S. ja Ukaji, Y., A One-Pot *O*-Phosphinative Passerini/Pudovik Reaction: Efficient Synthesis of Highly Functionalized α-(Phosphinyloxy) amide Derivatives, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20* (17), 5007-5012.

[30] Semple, J. E.; Owens, T. D.; Nguyen, K. ja Levy, O. E., New Synthetic Technology for Efficient Construction of α-Hydroxy-β-amino Amides via the Passerini Reaction, *Org. Lett.*, **2000**, *2* (18), 2769-2772.

[31] El Kaim, L.; Gizolme, M. ja Grimaud, L., *O*-arylative Passerini reactions, *Org. Lett.*, **2006**, *8* (22), 5021-5023.

[32] Dai, W. M. ja Li, H., Lewis acid-catalyzed formation of Ugi four-component reaction product from Passerini three-component reaction system without an added amine, *Tetrahedron*, **2007**, *63* (52), 12866-12876.

[33] Chandgude, A. L. ja Dömling, A., Unconventional Passerini Reaction toward α-Aminoxy-amides, *Org. Lett.*, **2016**, *18* (24), 6396-6399.

[34] Laurence, C. ja Gal, J. F., *Lewis basicity and affinity scales: data and measurement*, John Wiley & Sons, New York, USA, 2009.

[35] Plumley, J. A. ja Evanseck, J. D., Periodic Trends and Index of Boron Lewis Acidity*, J. Phys. Chem. A,* **2009**, *113* (20), 5985-5992.

[36] Jupp, A. R.; Johnstone, T. C. ja Stephan, D. W., Improving the Global Electrophilicity Index (GEI) as a Measure of Lewis Acidity, *Inorg. Chem.,* **2018**, *57* (23), 14764-14771.

[37] Soeta, T.; Kojima, Y.; Ukaji, Y. ja Inomata, K., *O*-Silylative Passerini reaction: A new one-pot synthesis of α-siloxyamides, *Org. Lett.*, **2010**, *12* (19), 4341-4343.

[38] Chandgude, A. L. ja Dömling, A., An efficient Passerini tetrazole reaction (PT-3CR), *Green Chem.*, **2016**, *18* (13), 3718-3721.

[39] Kumar, J. S.; Jonnalagadda, S. C. ja Mereddy, V. R., An efficient boric acid-mediated preparation of α-hydroxyamides, *Tetrahedron Lett*., **2010**, *51* (5), 779-782.

[40] Soeta, T.; Kojima, Y.; Ukaji, Y. ja Inomata, K., Borinic acid catalyzed α-addition to isocyanide with aldehyde and water, *Tetrahedron Lett*., **2011**, *52* (20), 2557-2559.´

[41] Prybil, J. W.; Wallace, R.; Warren, A.; Klingman, J.; Vaillant, R.; Hall, M. B.; Yang, X.; Brennessel, W. W. ja Chin, R. M., Silylation of Pyridine, Picolines, and Quinoline with a Zinc Catalyst, *ACS omega*, **2020**, *5* (3), 1528-1539.

[42] Lyu, L.; Xie, H.; Mu, H.; He, Q.; Bian, Z. ja Wang, J., $AlCl_3$-catalyzed *O*-alkylative Passerini reaction of isocyanides, cinnamaldehydes and various aliphatic alcohols for accessing α-alkoxy-β, γ-enamides, *Org. Chem. Front.,* **2015**, *2* (7), 815-818.

[43] Yanai, H.; Oguchi, T. ja Taguchi, T., Direct alkylative Passerini reaction of aldehydes, isocyanides, and free aliphatic alcohols catalyzed by indium (III) triflate*, J. Org. Chem*., **2009**, *74* (10), 3927-3929.

[44] http://goldbook.iupac.org/terms/view/A00483 (11.8.2020)

[45] Bock, H. ja Ugi, I., Multicomponent reactions. II. Stereoselective synthesis of 1 (*S*)-camphor-2-cis-methylidene-isocyanide and its application in Passerini-and Ugi-reaction, *Journal für Praktische Chemie/Chemiker-Zeitung*, **1997**, *339* (1), 385-389.

[46] Beasley, B. O.; Clarkson, G. J. ja Shipman, M., Passerini reactions for the efficient synthesis of 3,3-disubstituted oxetanes, *Tetrahedron Lett*., **2012**, *53* (24), 2951-2953.

[47] Moni, L.; Banfi, L.; Cartagenova, D.; Cavalli, A.; Lambruschini, C.; Martino, E.; Orru, R. V.; Ruijter, E.; Saya, J. M.; Sgrignani, J. ja Riva, R., Zinc (II)-mediated diastereoselective Passerini reactions of biocatalytically desymmetrised renewable inputs, *Org. Chem. Front.,* **2020**, *7* (2), 380-398.

[48] Radha Krishna, P.; Dayaker, G.; Venkata Ramana, D. ja Kunde, R., First Diastereoselective Passerini-Smiles and Ugi-Smiles Reactions Using Chiral Aldehydes, *Helv. Chim. Acta*, **2014**, *97* (8), 1076-1087.

[49] Vlahoviček-Kahlina, K.; Vazdar, M.; Jakas, A.; Smrečki, V. ja Jerić, I., Synthesis of Glycomimetics by Diastereoselective Passerini Reaction, *J. Org. Chem.*, **2018**, *83* (21), 13146-13156.

[50] Deobald, A. M.; Corrêa, A. G.; Rivera, D. G. ja Paixão, M. W., Organocatalytic asymmetric epoxidation and tandem epoxidation/Passerini reaction under eco-friendly reaction conditions, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10* (38), 7681-7684.

[51] (a) Zhang, J.; Lin, S. X.; Cheng, D. J.; Liu, X. Y. ja Tan, B., Phosphoric acid-catalyzed asymmetric classic passerini reaction, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137* (44), 14039-14042. (b) Zeng, X.; Ye, K.; Lu, M.; Chua, P. J.; Tan, B. ja Zhong, G., Chiral Brønsted Acid Catalyzed Enantioselective Addition of α-Isocyanoacetamides to Aldehydes, *Org. Lett.*, **2010**, *12* (10), 2414−2417.

[52] Yue, T.; Wang, M. X.; Wang, D. X.; Masson, G. ja Zhu, J., Brønsted Acid Catalyzed Enantioselective Three-Component Reaction Involving the α Addition of Isocyanides to Imines, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2009**, *48* (36), 6717-6721.

[53] Su, Y.; Bouma, M. J.; Alcaraz, L.; Stocks, M.; Furber, M.; Masson, G. ja Zhu, J., Organocatalytic Enantioselective One-Pot Four-Component Ugi-Type Multicomponent Reaction for the Synthesis of Epoxy-tetrahydropyrrolo[3,4-*b*]pyridin-5-ones, *Chem. - Eur. J.*, **2012**, *18* (40), 12624-12627.

[54] Monaco, M .R.; Poladura, B.; Diaz de Los Bernardos, M.; Leutzsch, M.; Goddard, R. ja List, B., Activation of carboxylic acids in asymmetric organocatalysis, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2014**, *53* (27), 7063-7067.

[55] Denmark, S. E.; Beutner, G. L.; Wynn, T. ja Eastgate, M. D., Lewis base activation of Lewis acids: catalytic, enantioselective addition of silyl ketene acetals to aldehydes, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127* (11), 3774-3789.

[56] Denmark, S. E. ja Fan, Y., The first catalytic, asymmetric α-additions of isocyanides. Lewis-base-catalyzed, enantioselective passerini-type reactions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125* (26), 7825-7827.

[57] Sutar, R. L. ja Joshi, N. N., Base-catalyzed Mukaiyama-type aldol additions, a continued quest for stereoselectivity, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24* (21-22), 1345-1363.

[58] Andreana, P. R.; Liu, C. C. ja Schreiber, S. L., Stereochemical control of the Passerini reaction, *Org. Lett.*, **2004**, *6* (23), 4231-4233.

[59] Evans, D. A.; Kozlowski, M. C.; Murry, J. A.; Burgey, C. S.; Campos, K. R.; Connell, B. T. ja Staples, R. J., C_2-symmetric copper (II) complexes as chiral Lewis acids. Scope and mechanism of catalytic enantioselective aldol additions of enolsilanes to (benzyloxy) acetaldehyde, *J. Am. Chem. Soc*, **1999**, *121* (4), 669-685.

[60] Wang, S. X.; Wang, M. X.; Wang, D. X. ja Zhu, J., Catalytic enantioselective Passerini three-component reaction, *Angew. Chem.*, **2008**, *120* (2), 394-397.

[61] Yue, T.; Wang, M. X.; Wang, D. X. ja Zhu, J., Asymmetric synthesis of 5-(1-hydroxyalkyl) tetrazoles by catalytic enantioselective Passerini-type reactions, *Angew. Chem.*, **2008**, *120* (49), 9596-9599.

[62] Kusebauch, U.; Beck, B.; Messer, K.; Herdtweck, E. ja Dömling, A., Massive parallel catalyst screening: toward asymmetric MCRs, *Org. Lett.*, **2003**, *5* (22), 4021-4024.

[63] Owens, T. D.; Araldi, G. L.; Nutt, R. F. ja Semple, J. E., Concise total synthesis of the prolyl endopeptidase inhibitor eurystatin A via a novel Passerini reaction–deprotection–acyl migration strategy, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42* (36), 6271–6274.

[64] Faure, S.; Hjelmgaard, T.; Roche, S. P. ja Aitken, D. J., Passerini Reaction-Amine Deprotection-Acyl Migration Peptide Assembly: Efficient Formal Synthesis of Cyclotheonamide C, *Org. Lett.*, **2009**, *11* (5), 1167-1170.

[65] Miloserdov, F. M.; Kirillova, M. S.; Muratore, M. E. ja Echavarren, A. M., Unified Total Synthesis of Pyrroloazocine Indole Alkaloids Sheds Light on Their Biosynthetic Relationship, *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140* (16), 5393-5400.

[66] Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q. Z.; Lu, Y. ja Wessjohann, L. A., Total synthesis of tubulysin U and V, *Angew. Chem.*, **2006**, *118* (43), 7393-7397.

[67] (a) Sasse, F.; Steinmetz, H.; Heil, J.; Hofle, G. ja Reichenbach, H., Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubule, *J. Antibiot*. **2000**, *53* (9), 879–885. (b) Steinmetz, H.; Glaser, N.; Herdtweck, E.; Sasse, F.; Reichenbach, H. ja Hofle, G.,

Isolation, crystal and solution structure determination, and biosynthesis of tubulysins-powerful inhibitors of tubulin polymerization from myxobacteria, *Angew. Chem.,* **2004**, *116* (37), 4996-5000. (c) Khalil, M. W.; Sasse, F.; Lünsdorf, H.; Elnakady, Y. A. ja Reichenbach, H., Mechanism of action of tubulysin, an antimitotic peptide from myxobacteria, *ChemBioChem,* **2006**, *7* (4), 678–683 (d) Kaur, G.; Hollingshead, M.; Holbeck, S.; Schauer-Vukasinovic, V.; Camalier, R. F.; Dömling, A. ja Agarwal, S., Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product, *Biochem. J.,* **2006**, *396* (2), 235–242.

[68] Henkel, B.; Beck, B.; Westner, B.; Mejat, B. ja Dömling, A, Convergent multicomponent assembly of 2-acyloxymethyl thiazoles, *Tetrahedron Lett*., **2003**, *44* (50), 8947 – 8950.

[69] Nowruzi, B.; Wahlsten, M. ja Jokela, J., A Report on Finding a New Peptide Aldehyde from Cyanobacterium Nostoc sp. Bahar M by LC-MS and Marfey's Analysis, *Iran. J. Biotechnol*. **2019**, *17* (2).

[70] Liu, L.; Jokela, J.; Wahlsten, M.; Nowruzi, B.; Permi, P.; Zhang, Y. Z.; Xhaard, H.; Fewer, D. P. ja Sivonen, K., Nostosins, trypsin inhibitors isolated from the terrestrial cyanobacterium Nostoc sp. strain FSN, *J. Nat. Prod*. **2014**, *77* (8), 1784–1790.

[71] Wang, X.; Feng, J.; Xu, Z.; Ye, T.; Meng, Y. ja Zhang, Z., Total Synthesis and Stereochemical Assignment of Nostosin B, *Mar. drugs.* **2017**, *15* (3), 58.

[72] Hartikainen S., *Passerini- ja Ugi-reaktiot luonnonainesynteesissä*, Pro gradu –tutkielma, Jyväskylän yliopisto, kemian laitos, Jyväskylä, 2015.

[73] Rauniyar, V. ja Hall, D. G., Rationally improved chiral Brønsted acid for catalytic enantioselective allylboration of aldehydes with an expanded reagent scope, *J. Org. Chem*. **2009**, *74* (11), 4236-4241.

[74] Taylor, J. E.; Daniels, D. S. B. ja Smith, A. D., Asymmetric NHC-catalyzed redox α-amination of α-aroyloxyaldehydes, *Org. Lett*. **2013**, *15* (23), 6058-6061

[75] Marsella, J. A., Dimethylformamide. Kirjassa: Mark, H. F.; Kirk, R. E.; Grayson, M.; Othmer, D. F. ja Eckroth D., *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3 painos, John Wiley & Sons, New-York, USA, 2000.

[76] Zhao, W.; Huang, L.; Guan, Y. ja Wulff, W. D., Three-Component Asymmetric Catalytic Ugi Reaction—Concinnity from Diversity by Substrate-Mediated Catalyst Assembly, Angew. Chem., Int. Ed., 2014, 53 (13), 3436-3441.

[77] Köse, D. A. ja Zümreoglu-Karan, B., Mixed-ligand complexes of boric acid with organic biomolecules, *Chem. pap.* **2012**, *66* (1), 54-60.

[78] Nguyen, T. N. ja May, J. A., Enantioselective organocatalytic conjugate addition of organoboron nucleophiles, *Tetrahedron Lett*., **2017**, *58* (16), 1535-1544.

[79] Evans, D. A.; Miller, S. J.; Brown, J. M.; Layzell, T. P. ja Ramsden, J. A., *Handbook of Reagents for Organic Synthesis. Chiral Reagents for Asymmetric Synthesis*, John Wiley & Sons, Chichester, Englanti, 2003.

[80] Carreira, E. M. ja Kvaerno, L., *Classics in stereoselective synthesis*, 1 painos, John Wiley & Sons, Weinheim, Saksa, 2009.

[81] Wu, T. R. ja Chong, J. M., Ligand-Catalyzed Asymmetric Alkynylboration of Enones: A New Paradigm for Asymmetric Synthesis Using Organoboranes, *J. Am. Chem. Soc*., **2005**, *127* (10), 3244-3245.

[82] Wu, T. R. ja Chong, J. M., Asymmetric conjugate alkenylation of enones catalyzed by chiral diols, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129* (16), 4908-4909.

[83] Roush, W. R.; Palkowitz, A. D. ja Palmer, M. J., Reactions of diisopropyl tartrate modified allyl- and (*E*)- and (*Z*)-crotylboronates with β-alkoxy-α- methylpropionaldehydes: a reagent-based solution to the acyclic dipropionate problem, *J. Org. Chem*., **1987**, *52* (2), 316-318.

[84] Sun, H.; Roush, W. R.; Candito, D. A.; Blanchot, M. ja Lautens, M., Synthesis of (*S,S*)-diisopropyl tartrate (*E*)-crotylboronate and its reaction with aldehydes:(2*R*,3*R*,4*R*)-1,2-dideoxy-2-ethenyl-4,5-*O*-(1-methylethylidene)-xylitol, *Organic syntheses; an annual publication of satisfactory methods for the preparation of organic chemicals*, **2011**, *88*, 181.

[85] Roush, W. R.; Ando, K.; Powers, D. B.; Palkowitz, A. D. ja Halterman, R. L., Asymmetric synthesis using diisopropyl tartrate modified (*E*)- and (*Z*)-crotylboronates: preparation of the chiral crotylboronates and reactions with achiral aldehydes, *J. Am. Chem. Soc*., **1990**, *112* (17), 6339-6348.

[86] Lane, C. A., Alkyleneboratoalkyl acrylates and methacrylates*, US Pat.,* 2,994,713, 1961.

[87] Hall, D. G., Structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives. Overview of their reactions and applications. Kirjassa: *Boronic Acids*, 1 painos, John Wiley & Sons, Weinheim, Saksa, 2005.

[88] Wróblewska, A.; Paluch, P.; Wielgus, E.; Bujacz, G.; Dudek, M. K. ja Potrzebowski, M. J., Approach toward the Understanding of Coupling Mechanism for EDC Reagent in Solvent-Free Mechanosynthesis, *Org. Lett.*, **2017**, *19* (19), 5360-5363.

[89] Williams, A. ja Ibrahim, I. T., A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-(dimethylamino) propyl) carbodiimide (EDC), *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103* (24), 7090-7095.

[90] Zervas, L., *Peptides: Proceedings of the Sixth European Symposium*, Pergamon press, Lontoo, Englanti, 1963, 27-33.

[91] Sebestyén, M.; Kóczán, G.; Csámpai, A. ja Hudecz, F., $NaBH_4$–a novel method for the deprotection of N_ω-nitro-arginine, *Tetrahedron Lett.,* **2016**, *57* (5), 546-548.

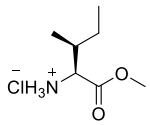
[92] Aitali, M.; Allaoud, S.; Karim, A.; Meliet, C. ja Mortreux, A., Enantioselective reduction of aromatic ketones catalysed by chiral ruthenium (II) complexes, *Tetrahedron: Asymmetry,* **2000**, *11* (6), 1367–1374.

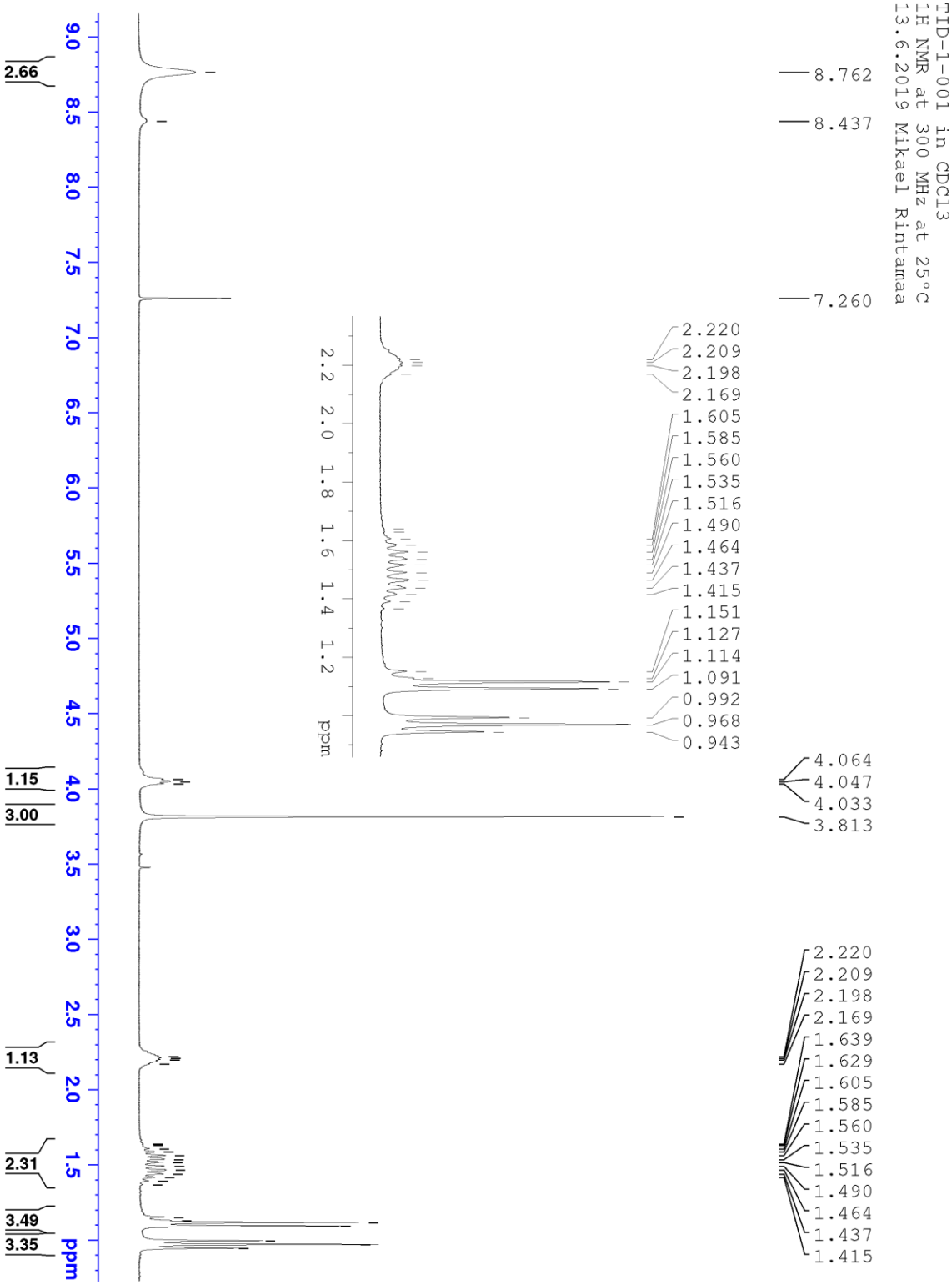
[93] Bowers, M. M.; Carroll, P. ja Joullie, M. M., Model studies directed toward the total synthesis of 14-membered cyclopeptide alkaloids: synthesis of prolyl peptides via a four-component condensation, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1,* **1989**, (5), 857-865.

[94] Wang, G. J.; Lai, T. C. ja Chen, C., Inhibitory effects of L-arginine derivatives on endothelium-dependent vasorelaxing response to acetylcholine of the rat aorta, *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39* (7), 611–617.

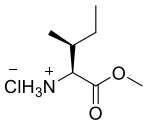
6. Liitteet

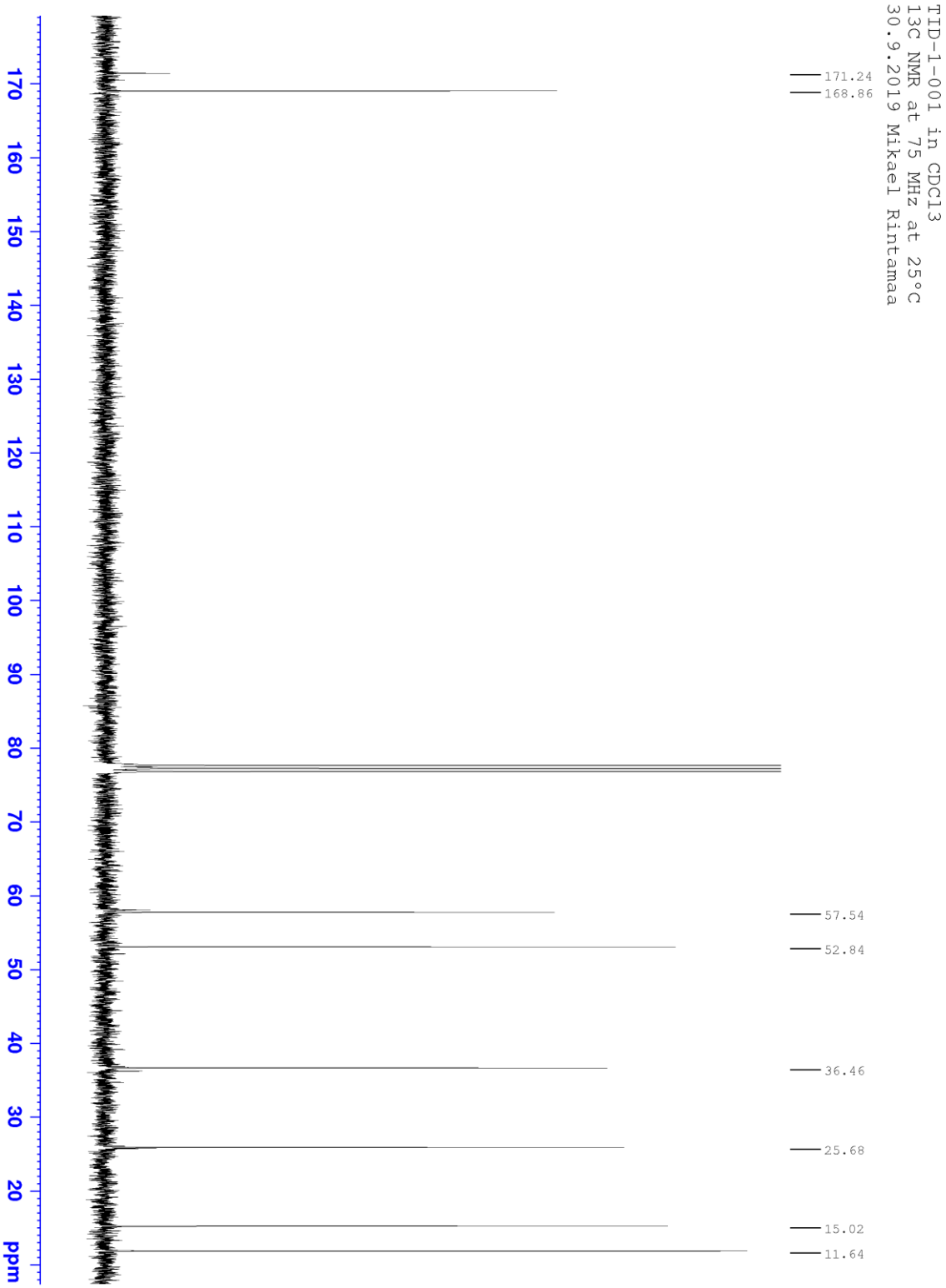
Liite 1


ClH3N
O
O

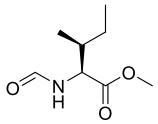

TID-1-001 in CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
13.6.2019 Mikael Rintamaa
8.762
8.437
7.260
2.220
2.209
2.198
2.169
1.605
1.585
1.560
1.535
1.516
1.490
1.464
1.437
1.415
1.151
1.127
1.114
1.091
0.992
0.968
0.943
4.064
4.047
4.033
3.813
2.220
2.209
2.198
2.169
1.639
1.629
1.605
1.585
1.560
1.535
1.516
1.490
1.464
1.437
1.415
2.66
1.15
3.00
1.13
2.31
3.49
3.35
ppm
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2

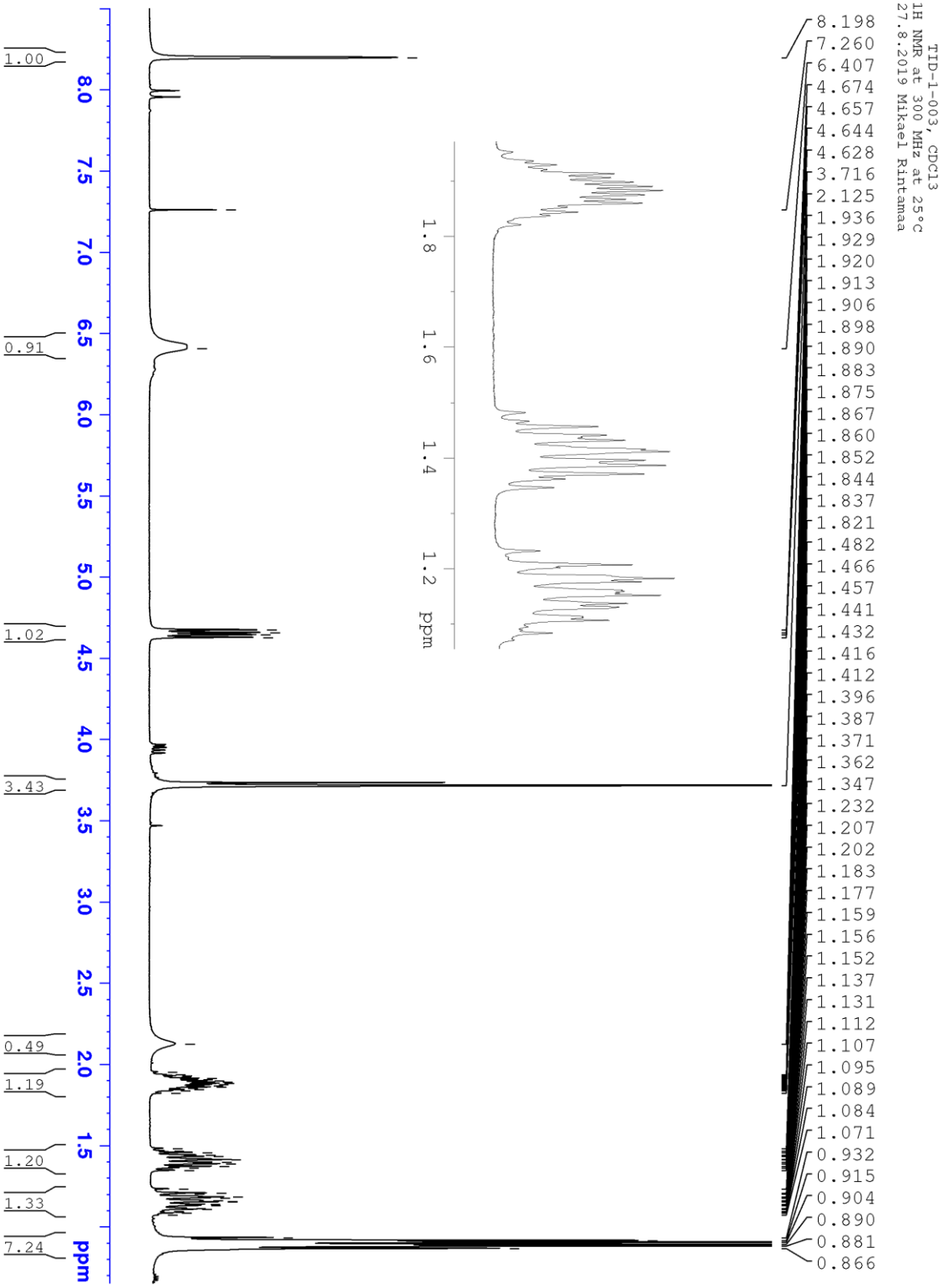
Liite 2


ClH3N
O
O

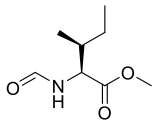

TID-1-001 in CDCl3
13C NMR at 75 MHz at 25°C
30.9.2019 Mikael Rintamaa
171.24
168.86
57.54
52.84
36.46
25.68
15.02
11.64
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

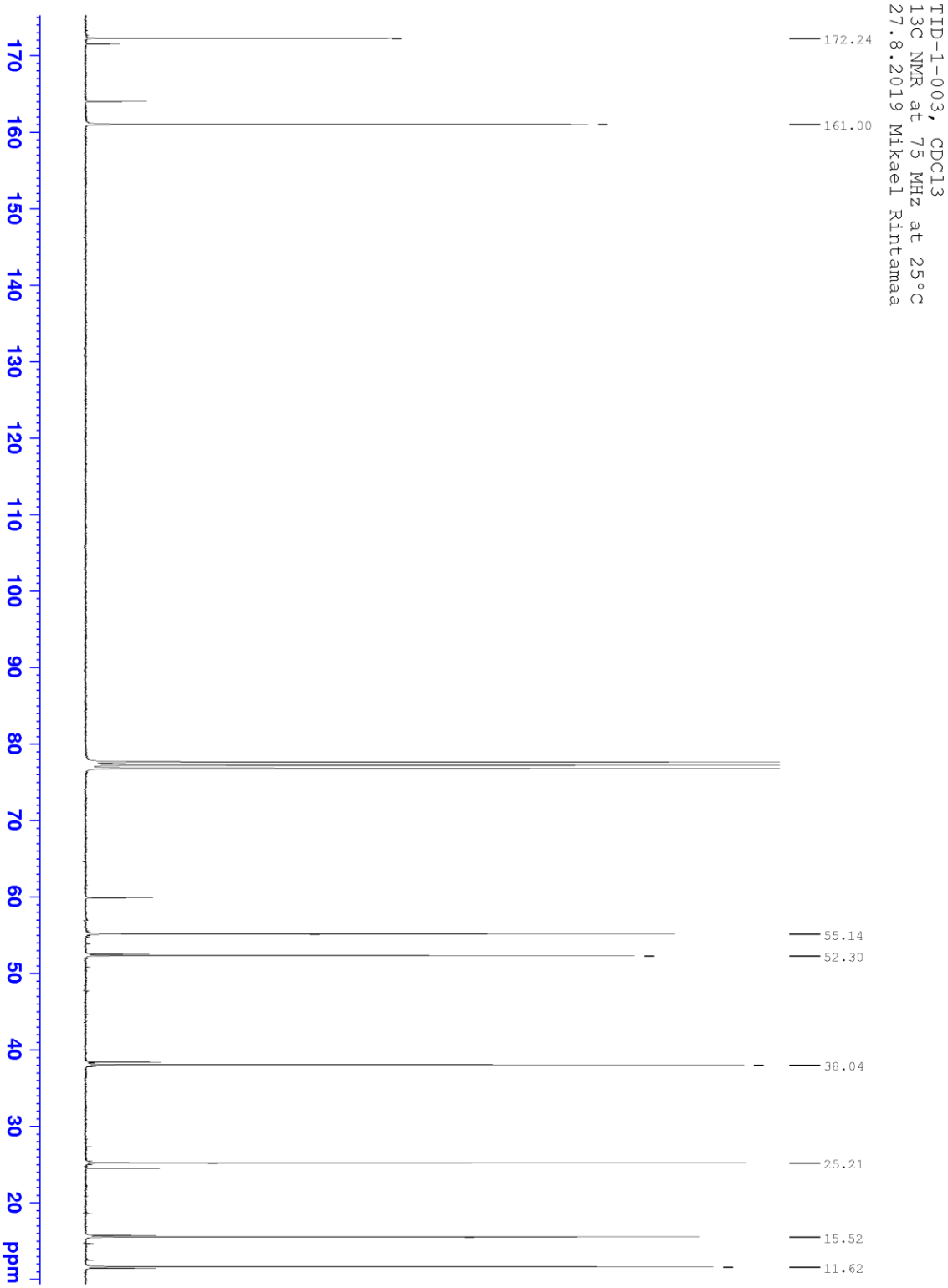
Liite 3



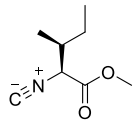

TID-1-003, CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
27.8.2019 Mikael Rintamaa
8.198
7.260
6.407
4.674
4.657
4.644
4.628
3.716
2.125
1.936
1.929
1.920
1.913
1.906
1.898
1.890
1.883
1.875
1.867
1.860
1.852
1.844
1.837
1.821
1.482
1.466
1.457
1.441
1.432
1.416
1.412
1.396
1.387
1.371
1.362
1.347
1.232
1.207
1.202
1.183
1.177
1.159
1.156
1.152
1.137
1.131
1.112
1.107
1.095
1.089
1.084
1.071
0.932
0.915
0.904
0.890
0.881
0.866
1.00
0.91
1.02
3.43
0.49
1.19
1.20
1.33
7.24
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm
1.8
1.6
1.4
1.2
ppm

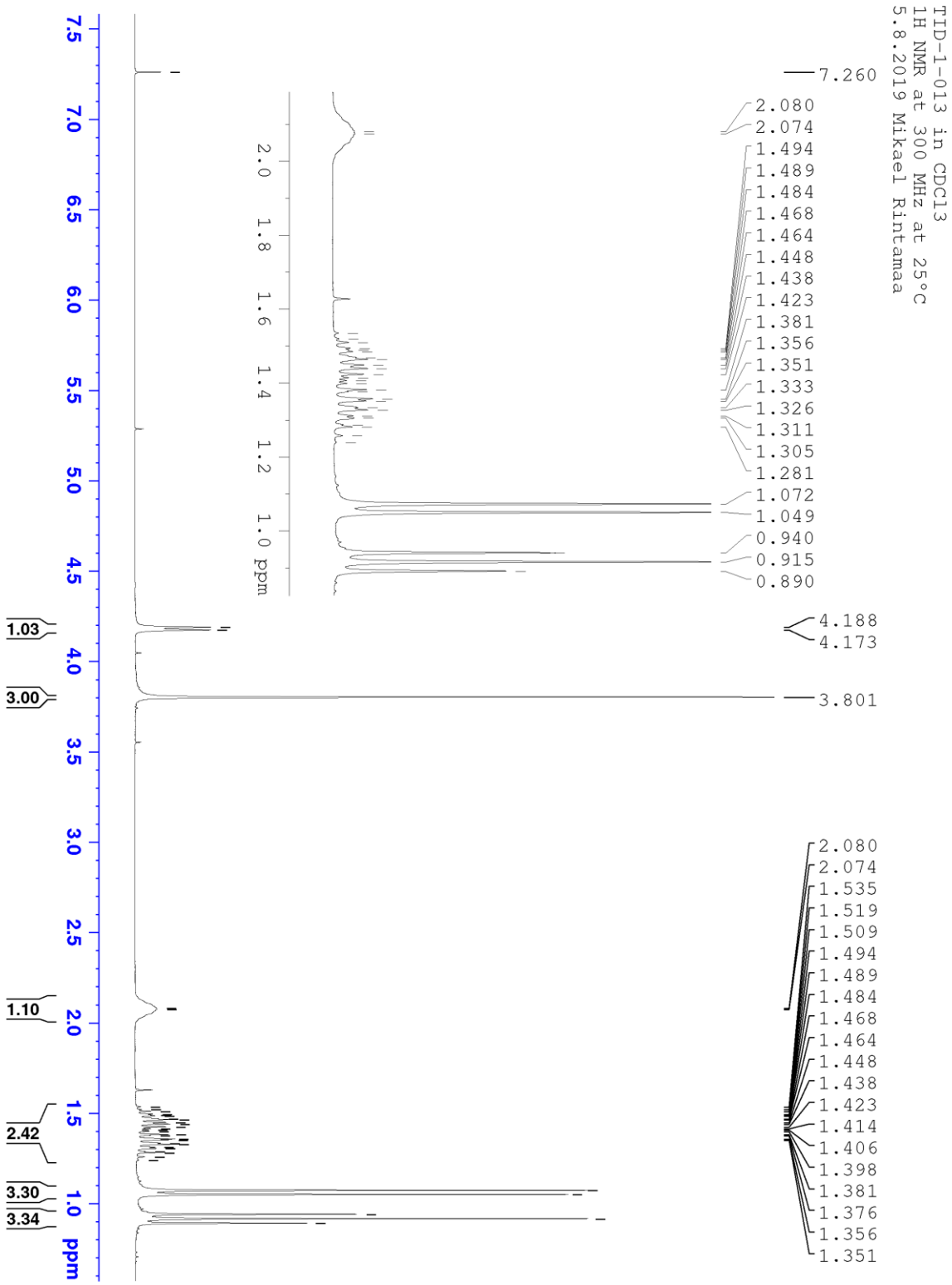
Liite 4



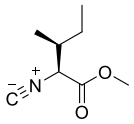

TID-1-003, CDCl3
13C NMR at 75 MHz at 25°C
27.8.2019 Mikael Rintamaa
172.24
161.00
55.14
52.30
38.04
25.21
15.52
11.62
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

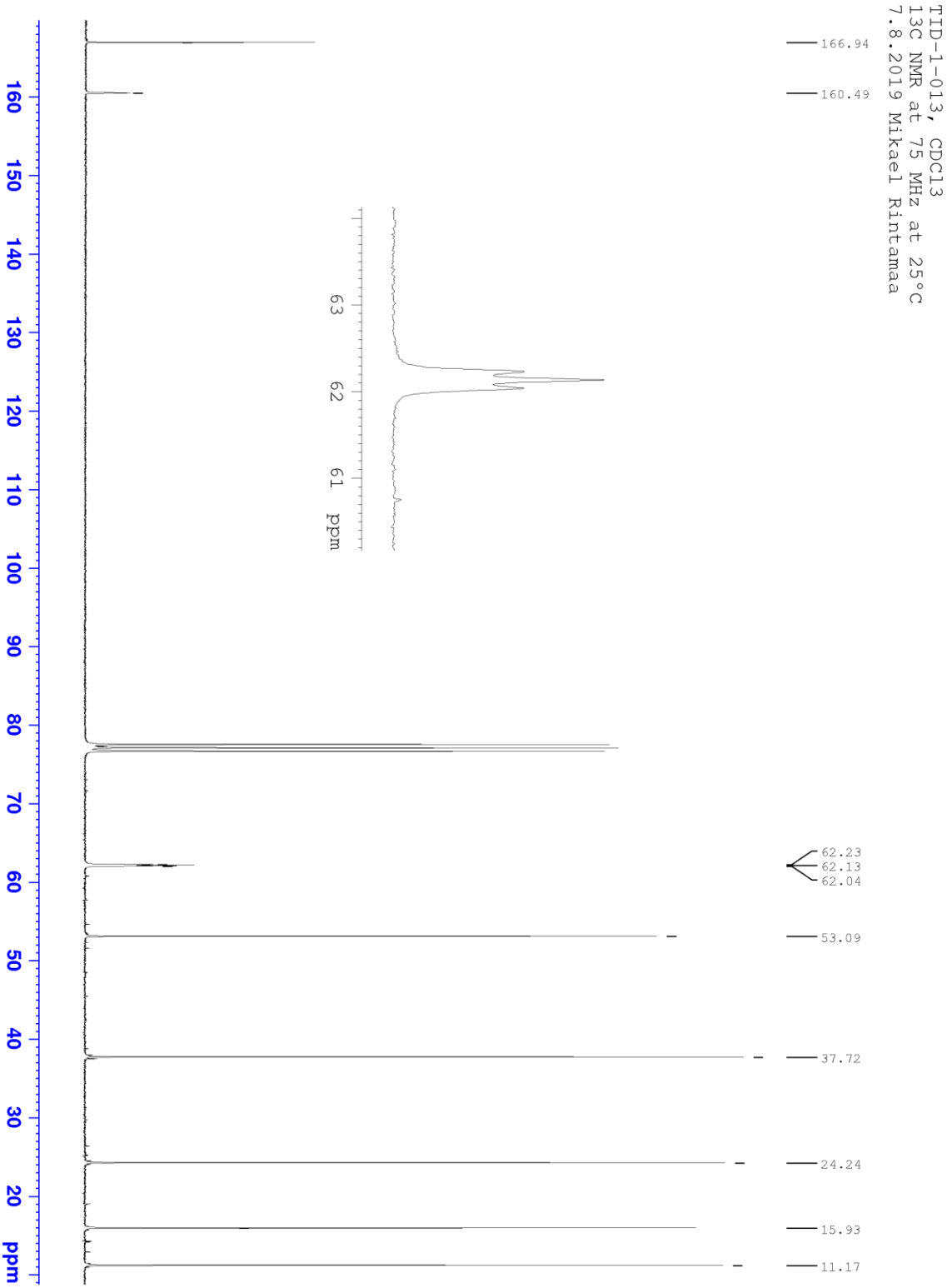
Liite 5



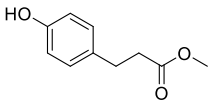

TID-1-013 in CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
5.8.2019 Mikael Rintamaa
7.260
2.080
2.074
1.494
1.489
1.484
1.468
1.464
1.448
1.438
1.423
1.381
1.356
1.351
1.333
1.326
1.311
1.305
1.281
1.072
1.049
0.940
0.915
0.890
4.188
4.173
3.801
2.080
2.074
1.535
1.519
1.509
1.494
1.489
1.484
1.468
1.464
1.448
1.438
1.423
1.414
1.406
1.398
1.381
1.376
1.356
1.351
1.03
3.00
1.10
2.42
3.30
3.34
ppm

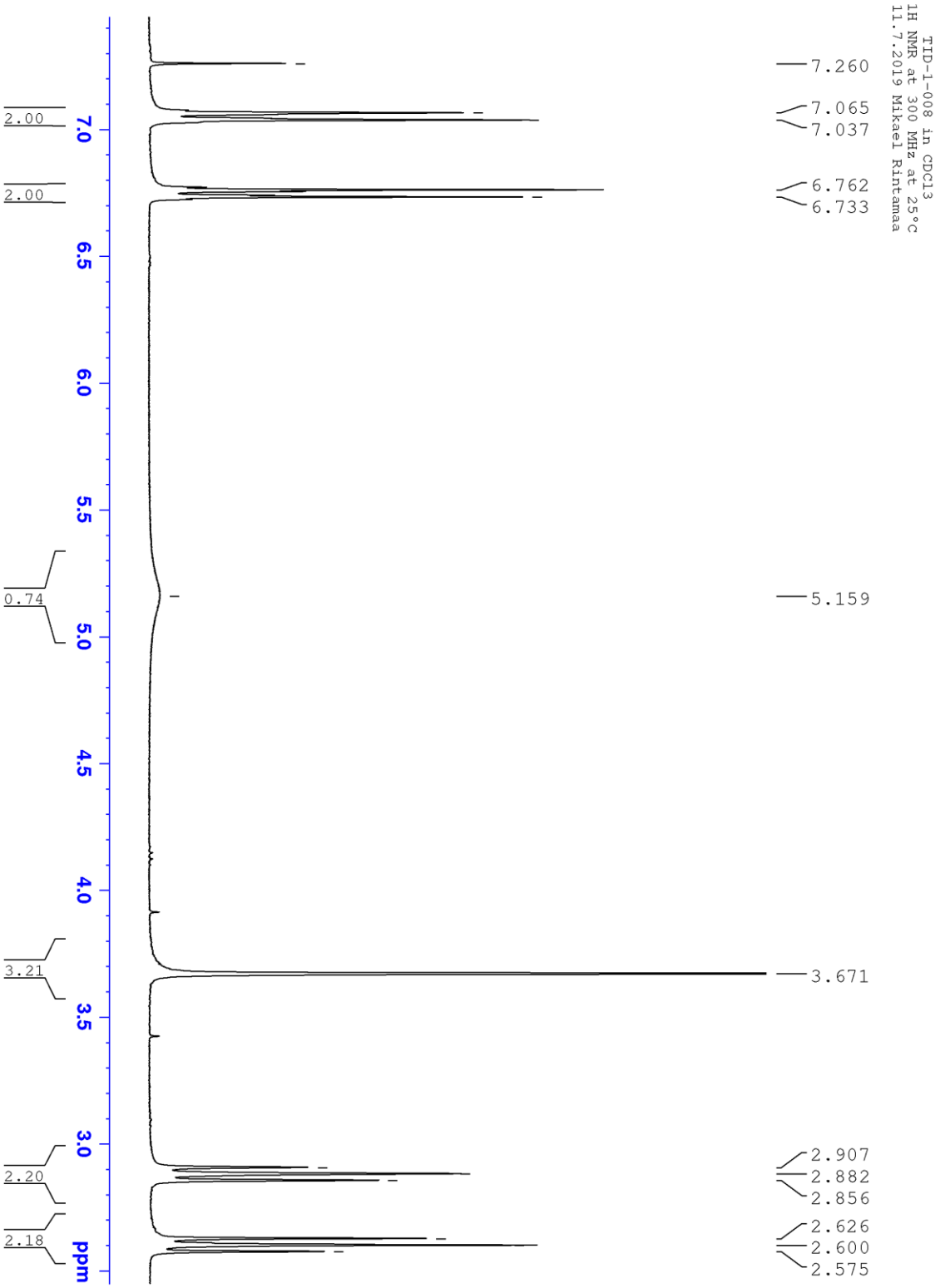
Liite 6



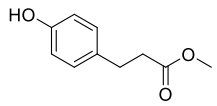

TID-1-013, CDCl3
13C NMR at 75 MHz at 25°C
7.8.2019 Mikael Rintamaa
166.94
160.49
62.23
62.13
62.04
53.09
37.72
24.24
15.93
11.17
63
62
61
ppm
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

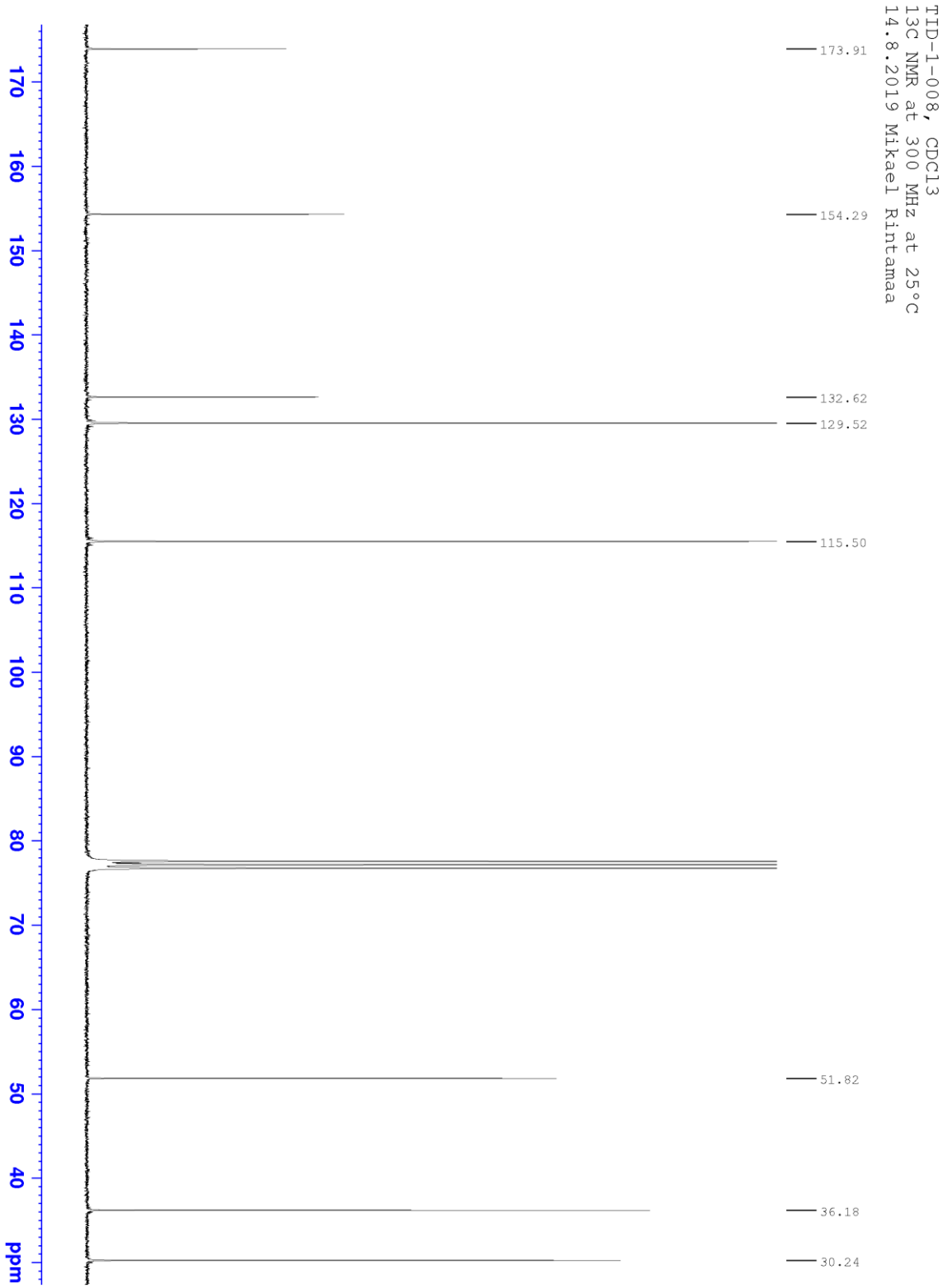
Liite 7


HO
O
O

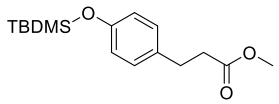

TID-1-008 in CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
11.7.2019 Mikael Rintamaa
7.260
7.065
7.037
6.762
6.733
5.159
3.671
2.907
2.882
2.856
2.626
2.600
2.575
2.00
2.00
0.74
3.21
2.20
2.18
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
ppm

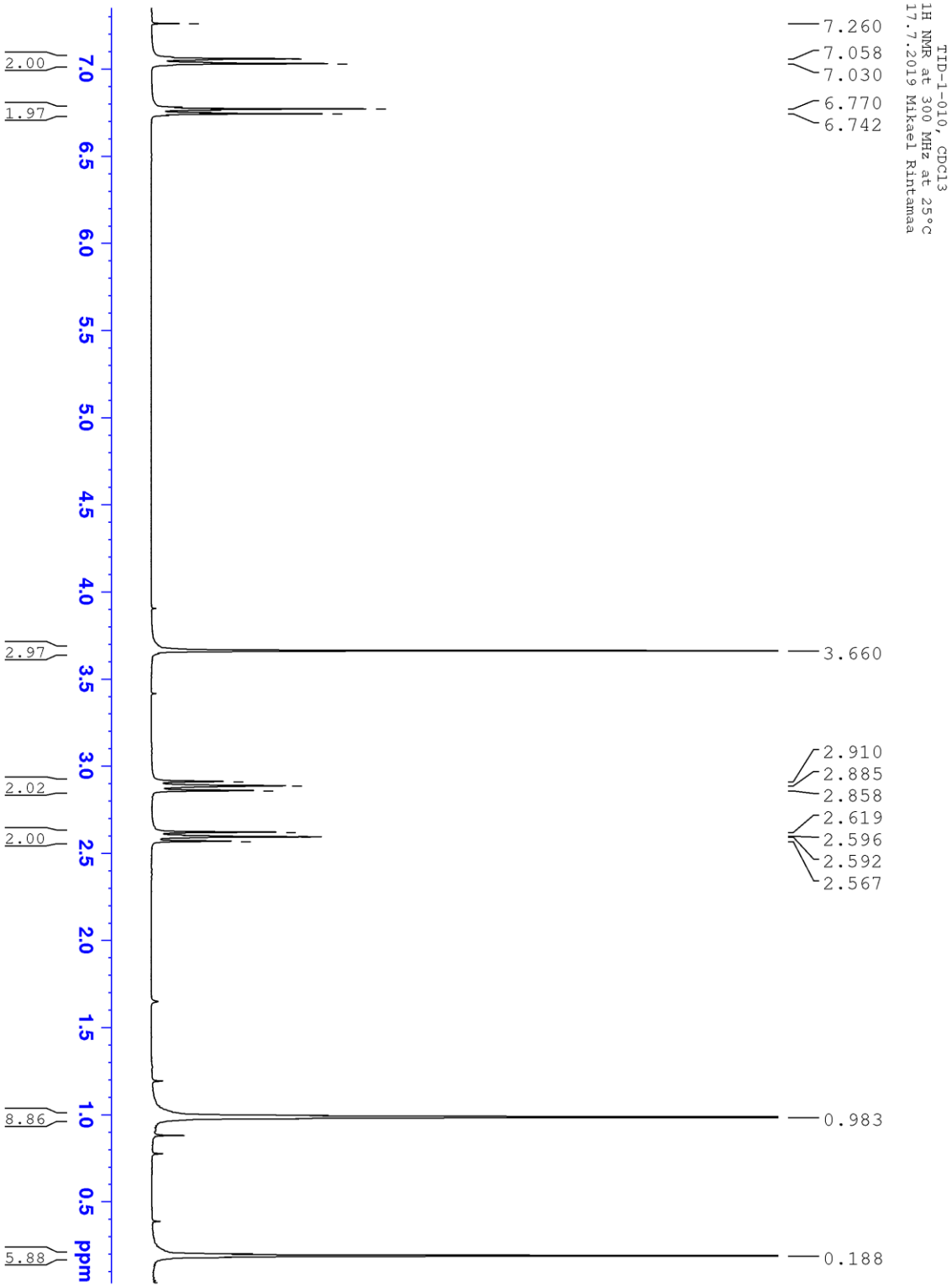
Liite 8


HO
O
O

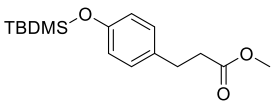

TID-1-008, CDCl3
13C NMR at 300 MHz at 25°C
14.8.2019 Mikael Rintamaa
173.91
154.29
132.62
129.52
115.50
51.82
36.18
30.24
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

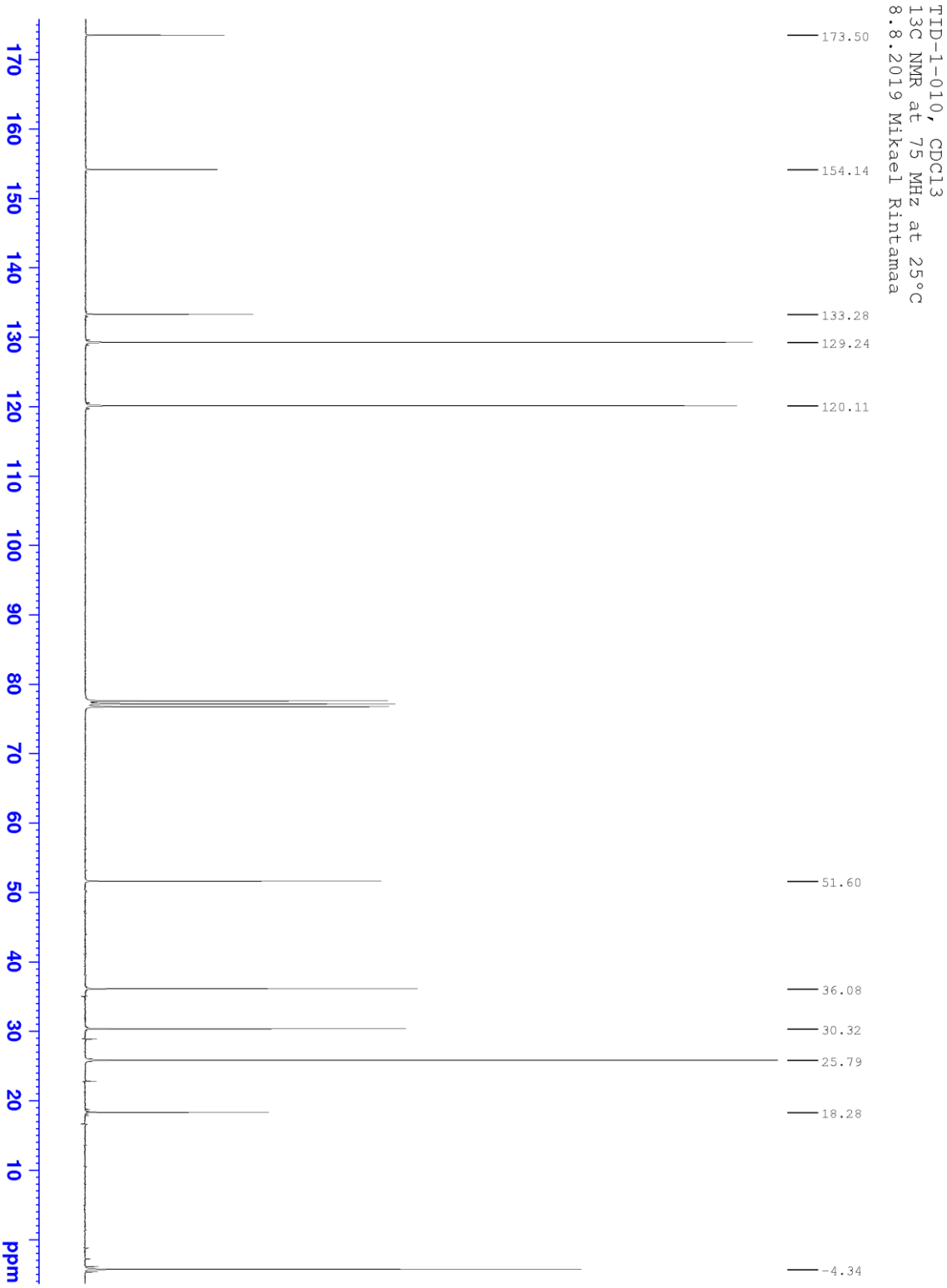
Liite 9


TBDMS
O
O
O

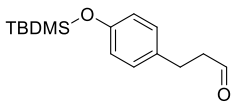

TID-1-010, CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
17.7.2019 Mikael Rintamaa
7.260
7.058
7.030
6.770
6.742
3.660
2.910
2.885
2.858
2.619
2.596
2.592
2.567
0.983
0.188
2.00
1.97
2.97
2.02
2.00
8.86
5.88
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm

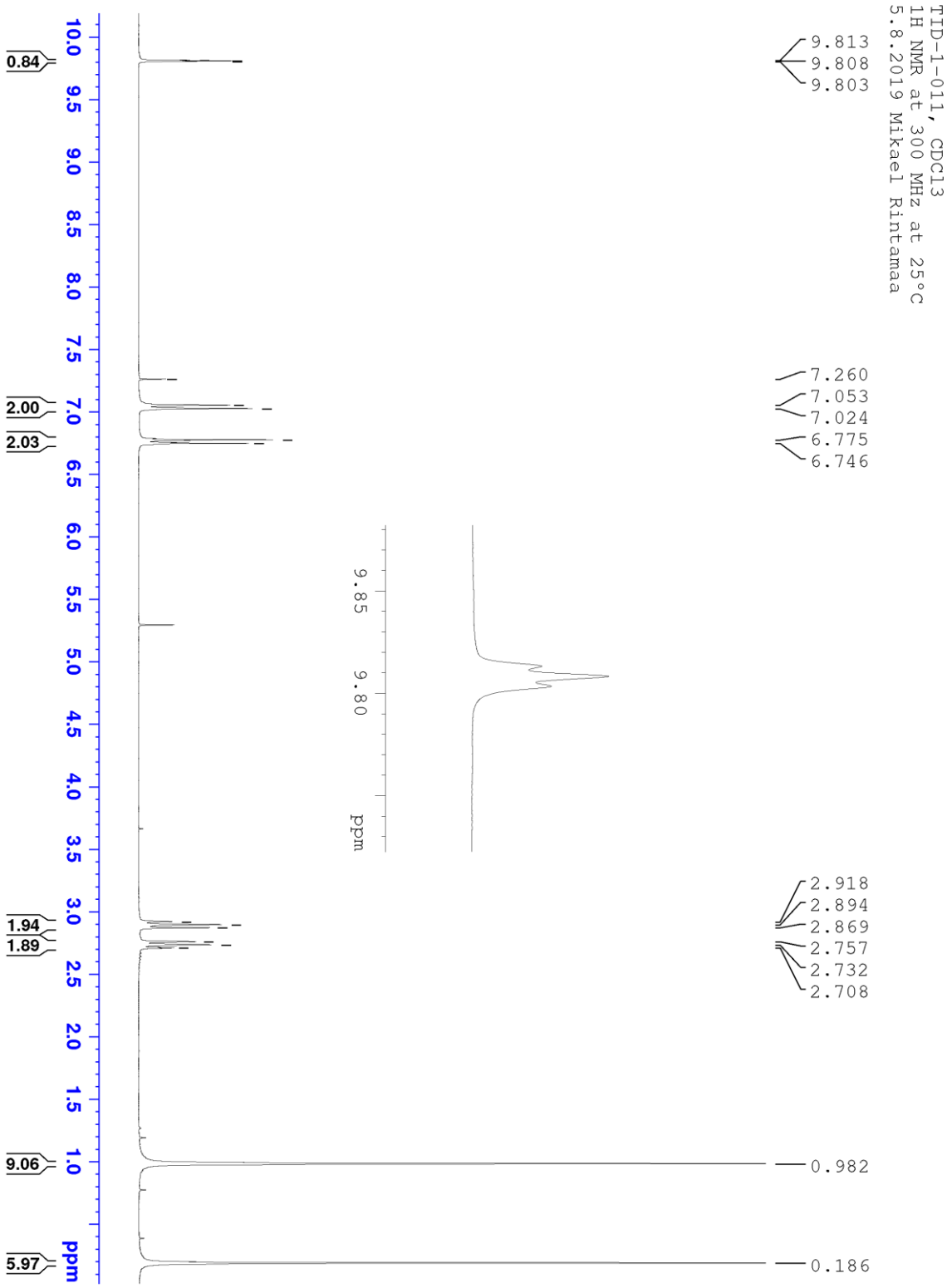
Liite 10


TBDMS
O
O
O

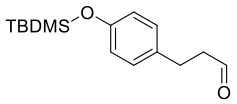

TID-1-010, CDCl3
13C NMR at 75 MHz at 25°C
8.8.2019 Mikael Rintamaa
173.50
154.14
133.28
129.24
120.11
51.60
36.08
30.32
25.79
18.28
-4.34
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm

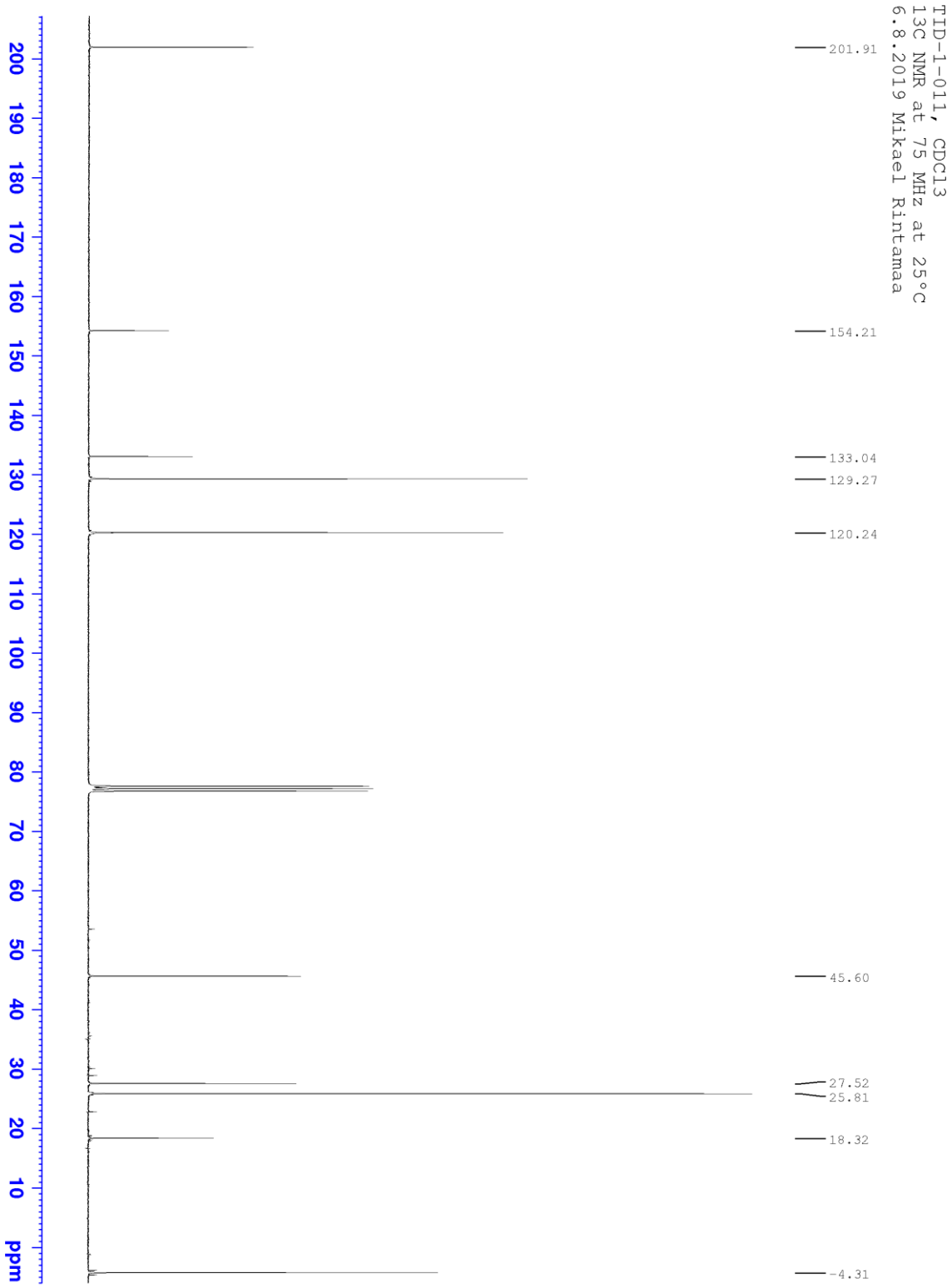
Liite 11


TBDMS
O
O

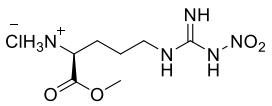

TID-1-011, CDCl3
1H NMR at 300 MHz at 25°C
5.8.2019 Mikael Rintamaa
9.813
9.808
9.803
7.260
7.053
7.024
6.775
6.746
2.918
2.894
2.869
2.757
2.732
2.708
0.982
0.186
0.84
2.00
2.03
1.94
1.89
9.06
5.97
9.85
9.80
ppm

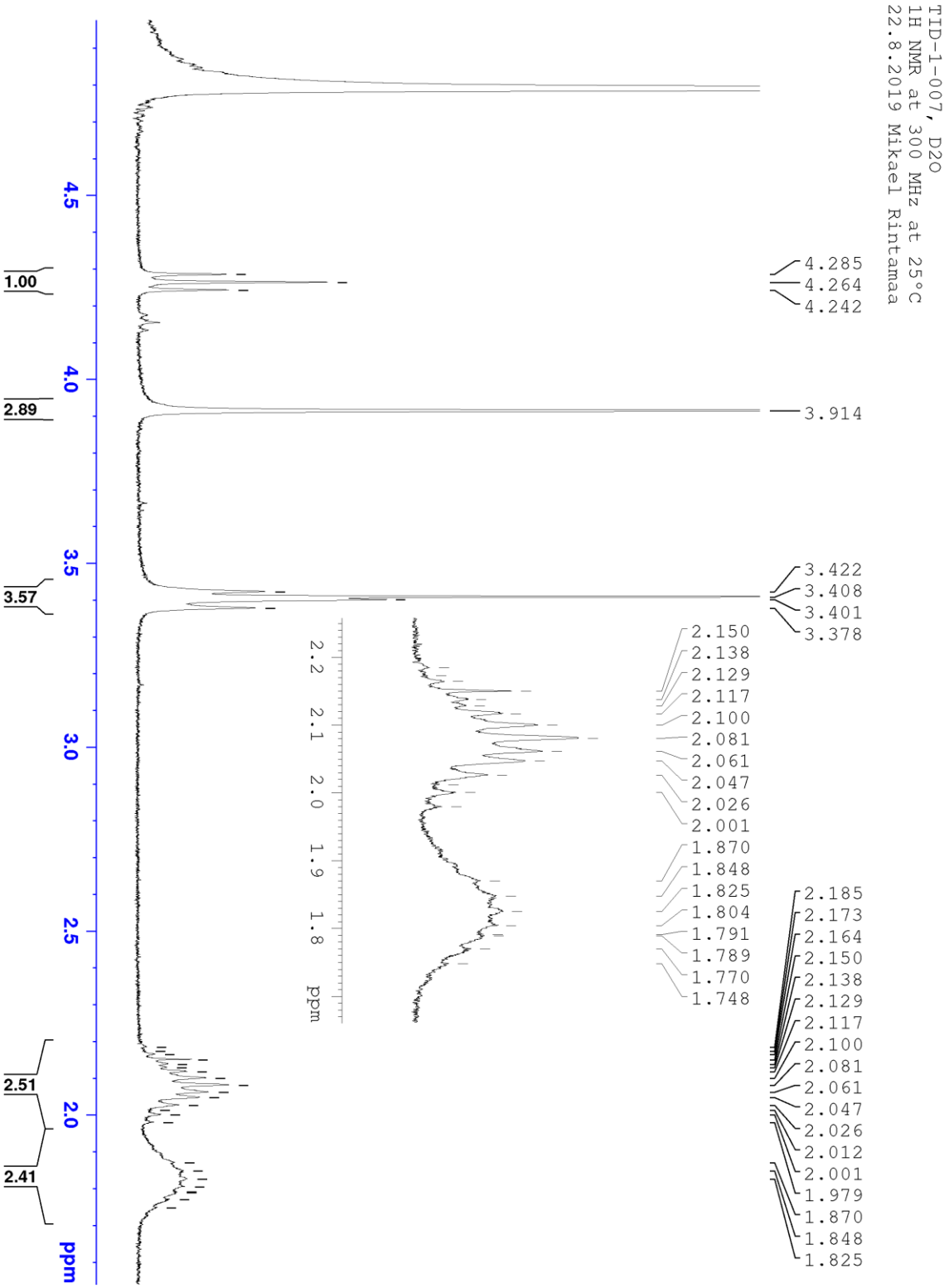
Liite 12


TBDMS
O
O

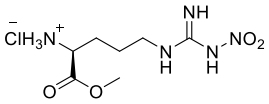

TID-1-011, CDCl3
13C NMR at 75 MHz at 25°C
6.8.2019 Mikael Rintamaa
201.91
154.21
133.04
129.27
120.24
45.60
27.52
25.81
18.32
-4.31
200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 ppm

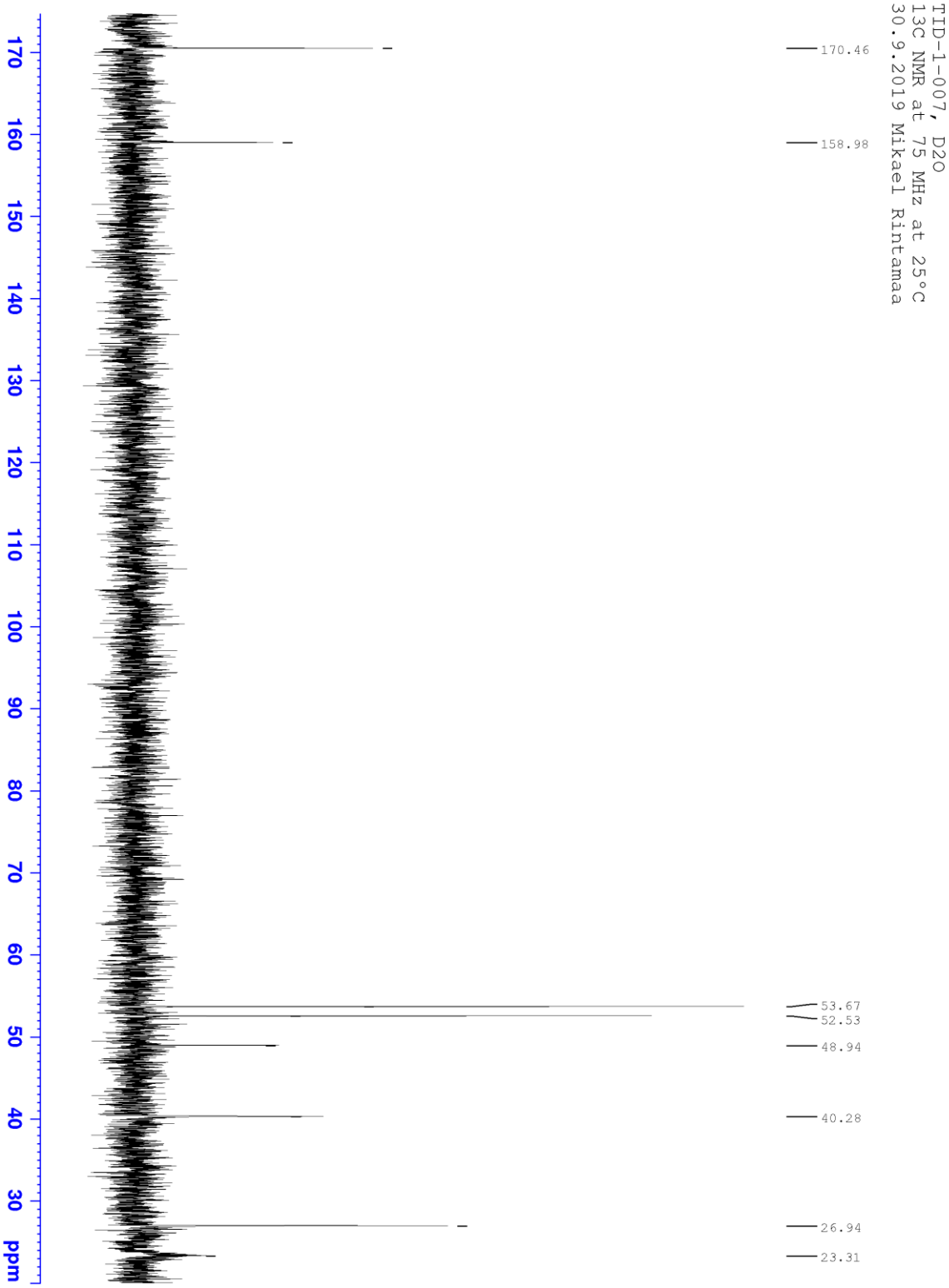
Liite 13


ClH3N+
NH
N
H
N
H
NO2
O
O

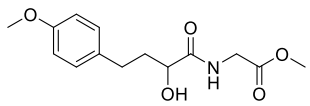

TID-1-007, D2O
1H NMR at 300 MHz at 25°C
22.8.2019 Mikael Rintamaa
4.285
4.264
4.242
3.914
3.422
3.408
3.401
3.378
2.150
2.138
2.129
2.117
2.100
2.081
2.061
2.047
2.026
2.001
1.870
1.848
1.825
1.804
1.791
1.789
1.770
1.748
2.185
2.173
2.164
2.150
2.138
2.129
2.117
2.100
2.081
2.061
2.047
2.026
2.012
2.001
1.979
1.870
1.848
1.825
1.00
2.89
3.57
2.51
2.41
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
ppm
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
ppm

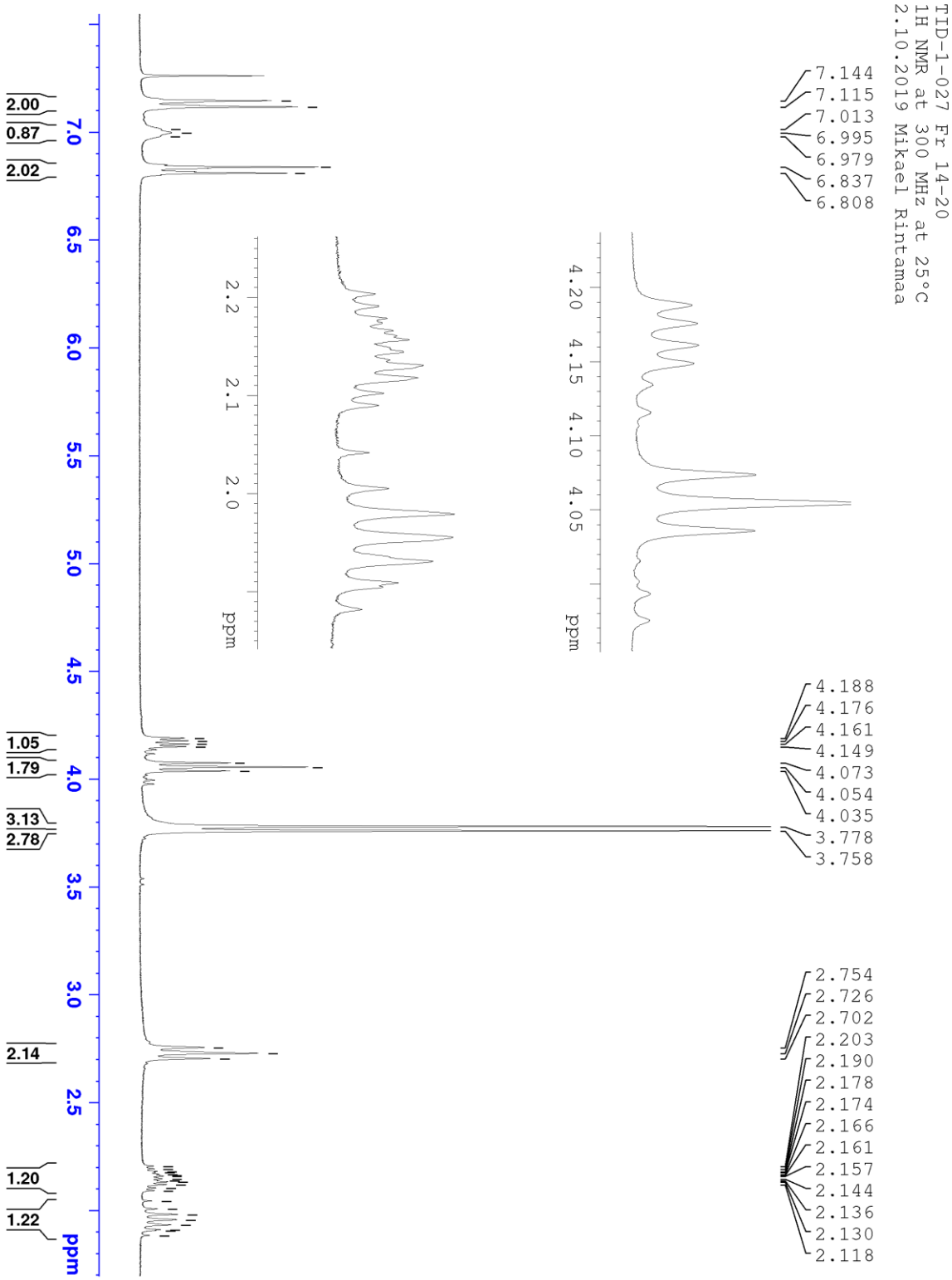
Liite 14


NH
ClH3N+
NO2
N
H
N
H
O
O

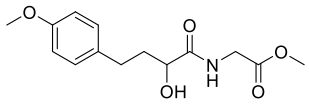

TID-1-007, D2O
13C NMR at 75 MHz at 25°C
30.9.2019 Mikael Rintamaa
170.46
158.98
53.67
52.53
48.94
40.28
26.94
23.31
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
ppm

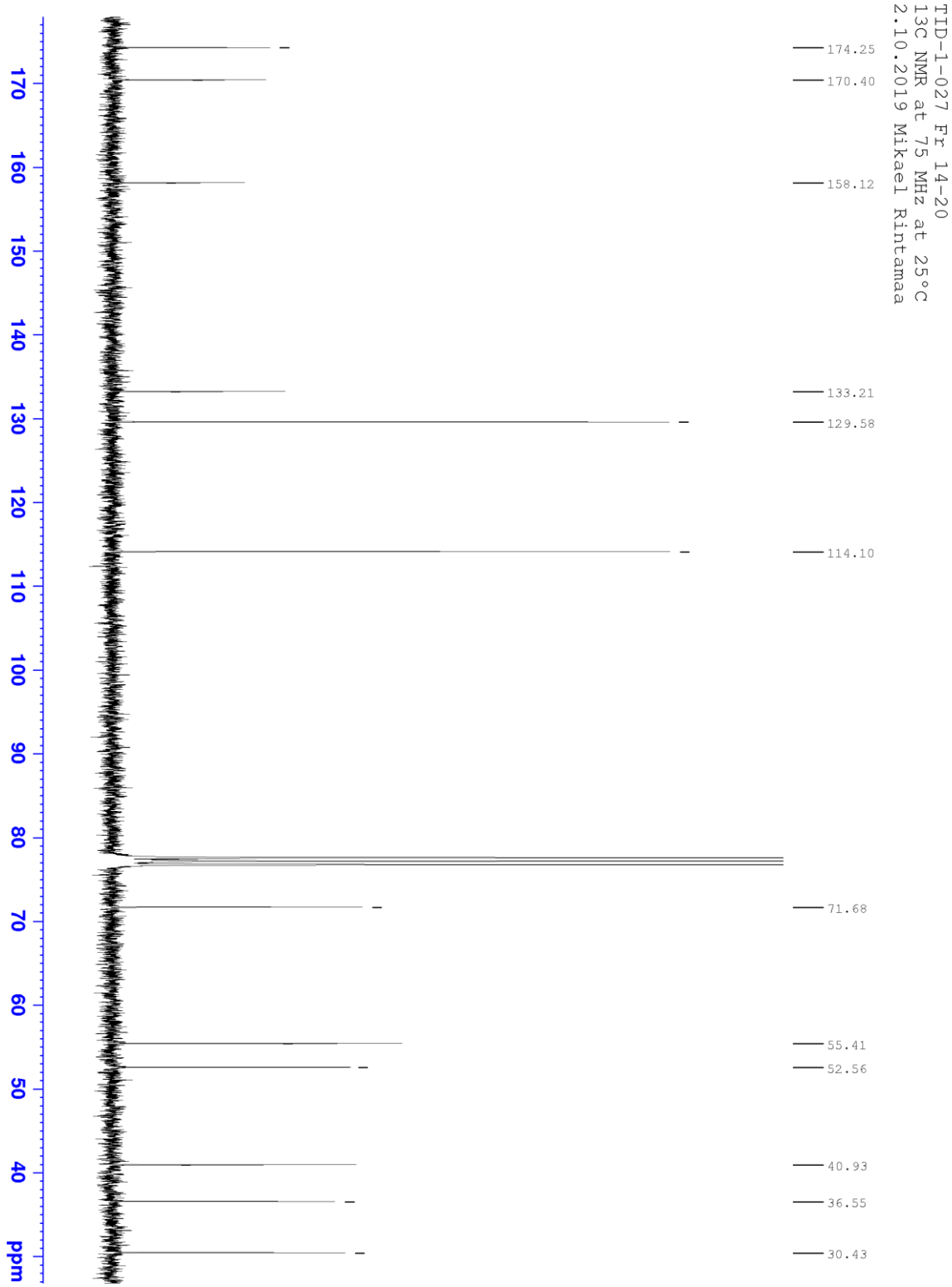
Liite 15




TID-1-027 Fr 14-20
1H NMR at 300 MHz at 25°C
2.10.2019 Mikael Rintamaa
7.144
7.115
7.013
6.995
6.979
6.837
6.808
4.188
4.176
4.161
4.149
4.073
4.054
4.035
3.778
3.758
2.754
2.726
2.702
2.203
2.190
2.178
2.174
2.166
2.161
2.157
2.144
2.136
2.130
2.118
2.00
0.87
2.02
1.05
1.79
3.13
2.78
2.14
1.20
1.22
ppm

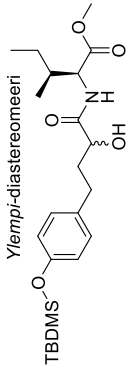
Liite 16

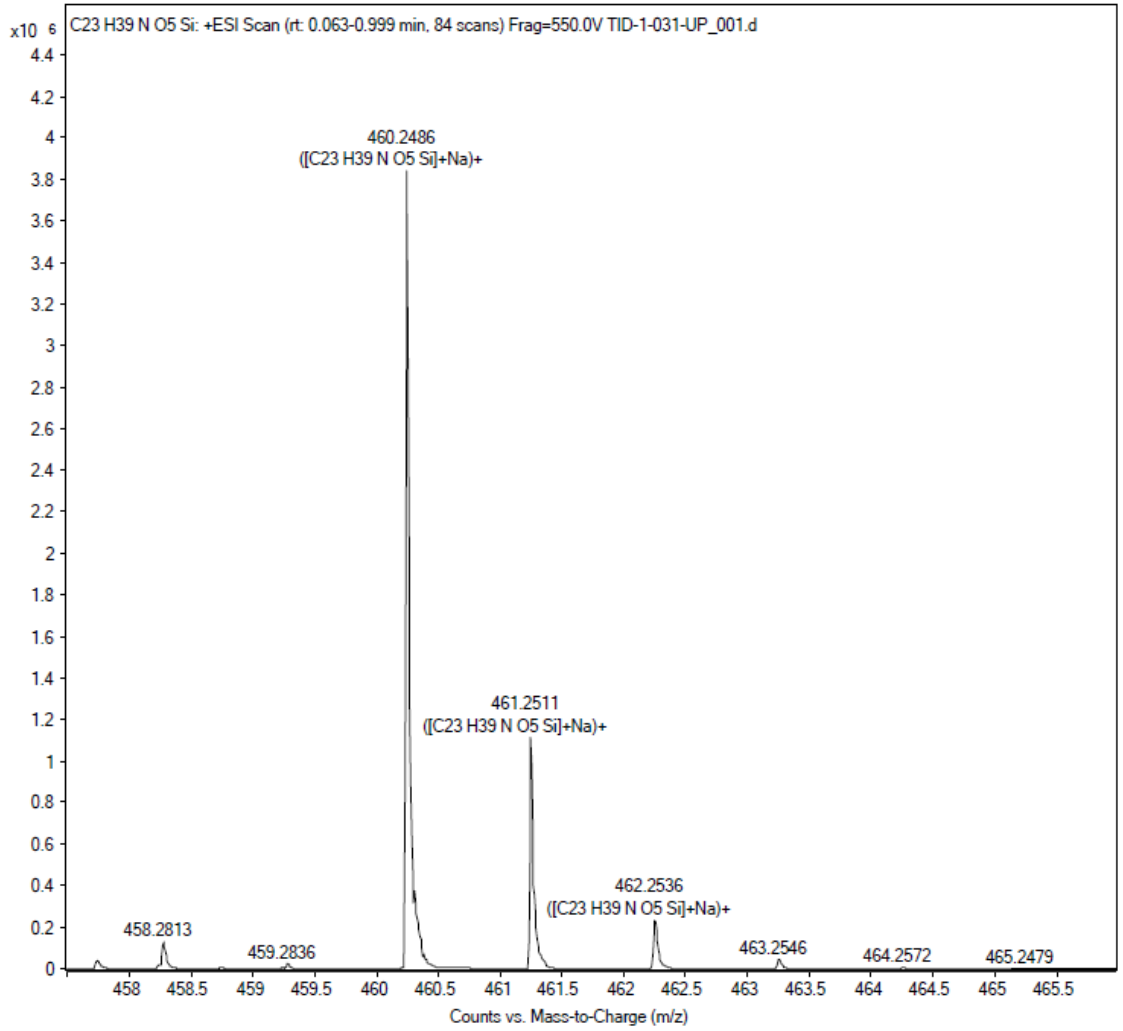

O
O
N
H
O
O
OH


TID-1-027 Fr 14-20
13C NMR at 75 MHz at 25°C
2.10.2019 Mikael Rintamaa
174.25
170.40
158.12
133.21
129.58
114.10
71.68
55.41
52.56
40.93
36.55
30.43
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

Liite 17

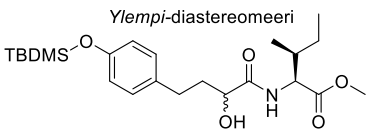
Sample Name	TID-1-031-UP	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-031-UP_001.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-031-UP, 1uM in MeOH	**Acquired Time**	12/11/2019 10:49:13 AM (UTC+02:00)

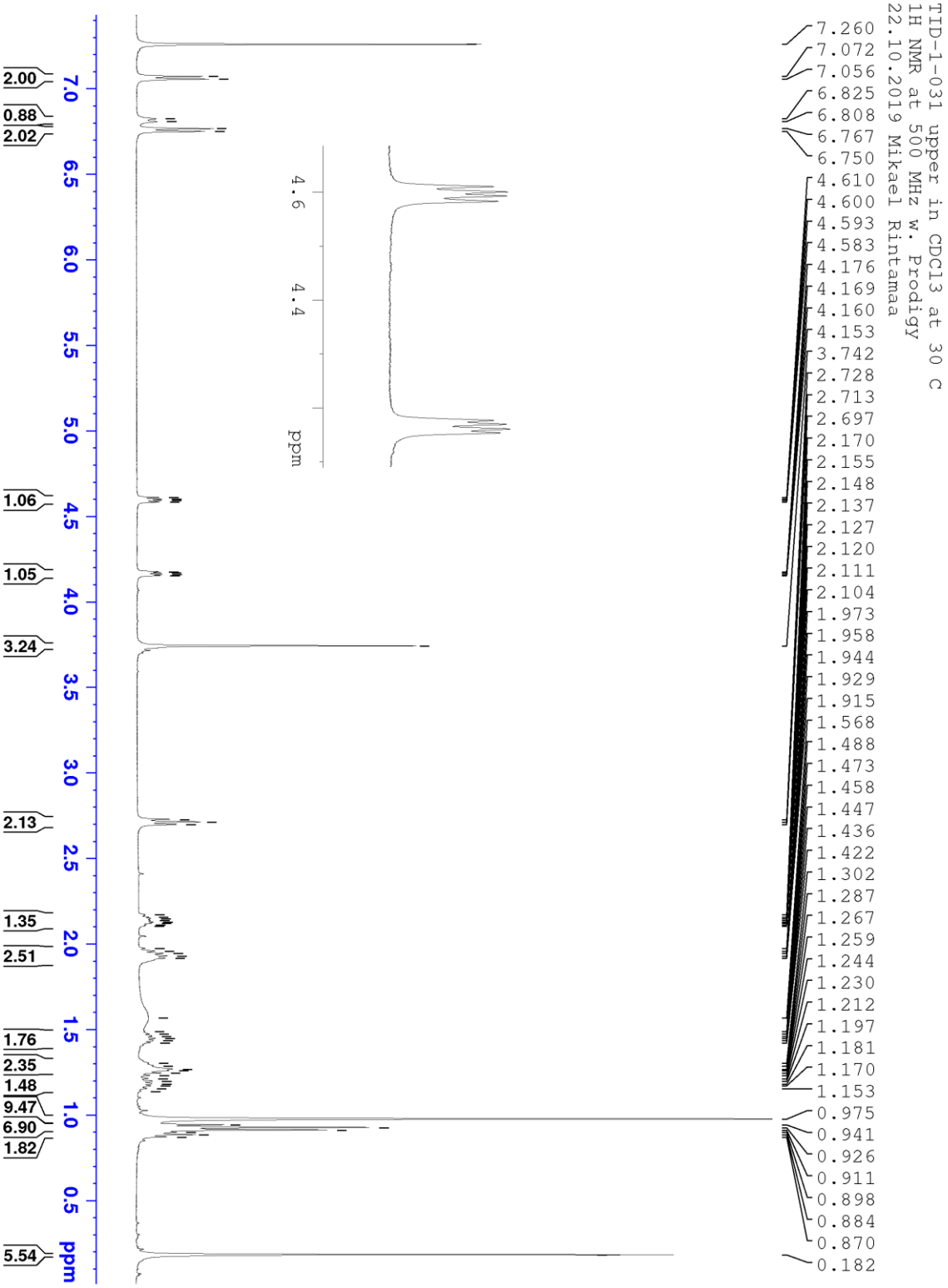




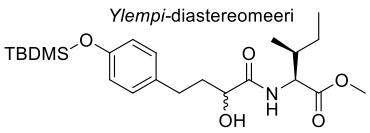
Liite 18

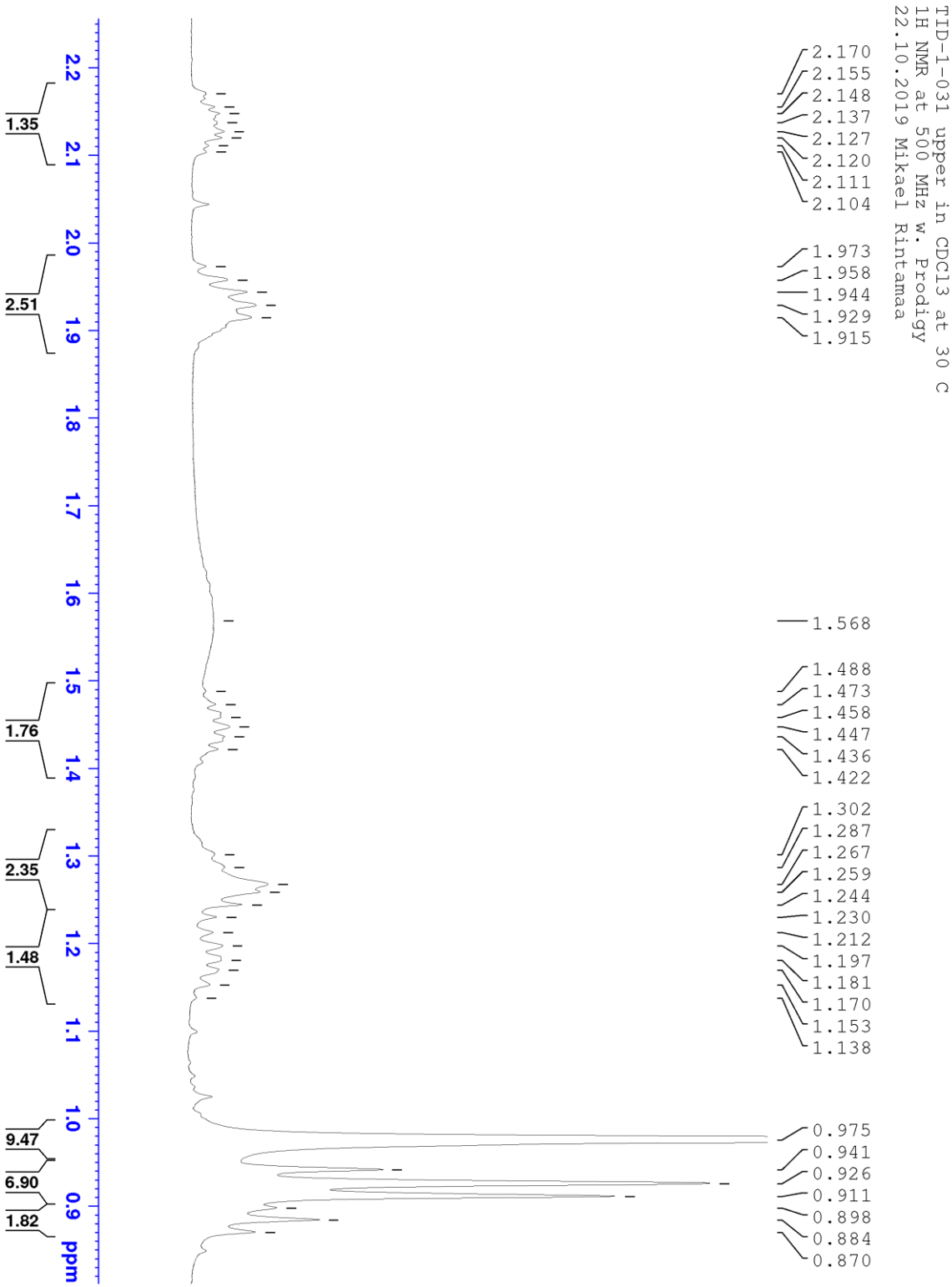
Ylempi-diastereomeeri



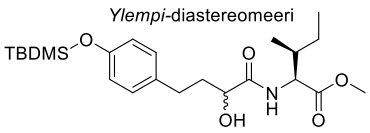


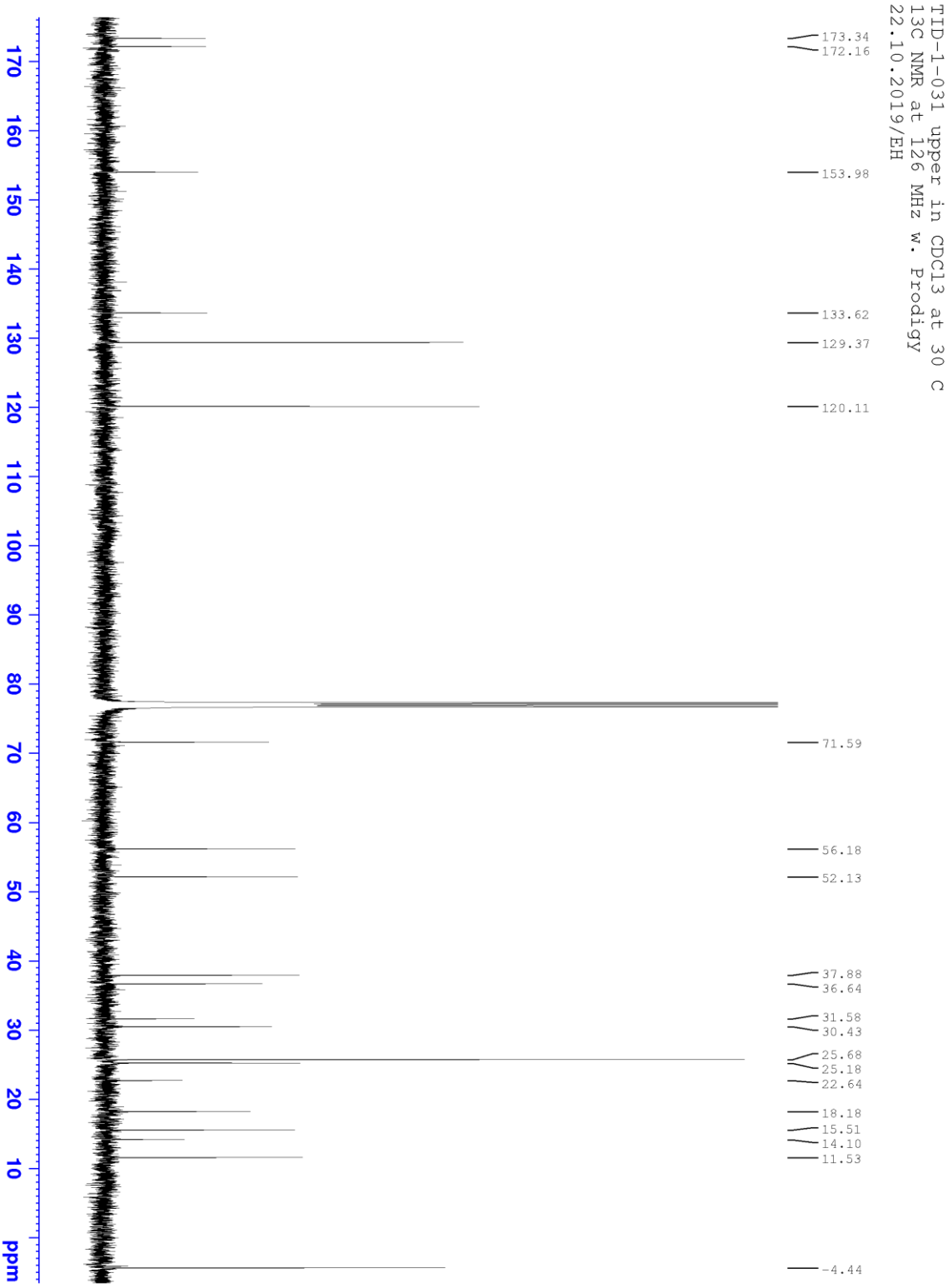
Liite 19


Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
OH
O
O


TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
22.10.2019 Mikael Rintamaa
2.170
2.155
2.148
2.137
2.127
2.120
2.111
2.104
1.973
1.958
1.944
1.929
1.915
1.568
1.488
1.473
1.458
1.447
1.436
1.422
1.302
1.287
1.267
1.259
1.244
1.230
1.212
1.197
1.181
1.170
1.153
1.138
0.975
0.941
0.926
0.911
0.898
0.884
0.870
1.35
2.51
1.76
2.35
1.48
9.47
6.90
1.82
2.2
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
ppm

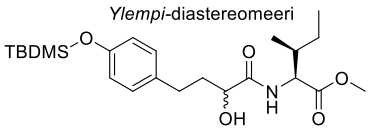
Liite 20

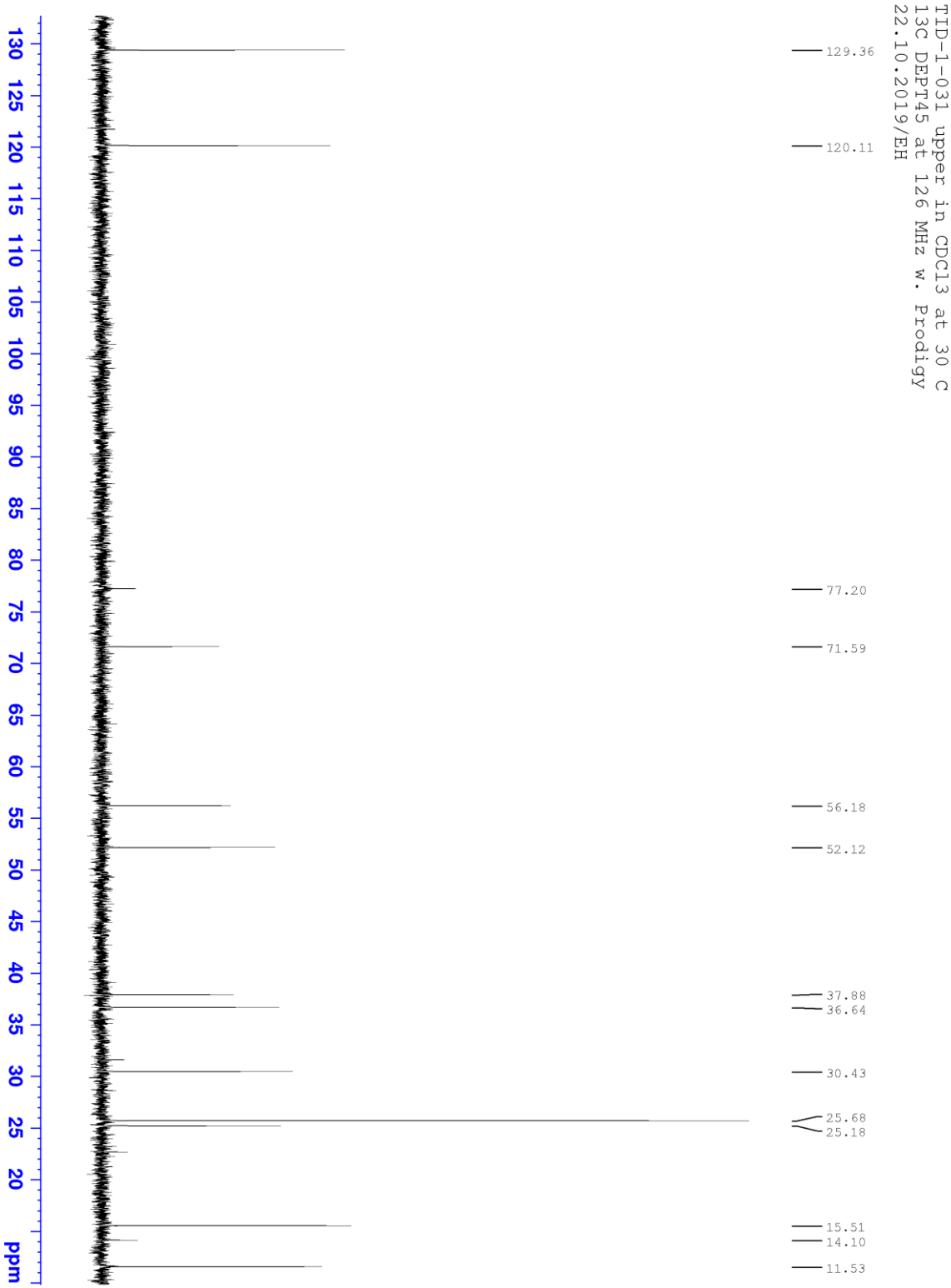

Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
13C NMR at 126 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH
173.34
172.16
153.98
133.62
129.37
120.11
71.59
56.18
52.13
37.88
36.64
31.58
30.43
25.68
25.18
22.64
18.18
15.51
14.10
11.53
-4.44
ppm

Liite 21

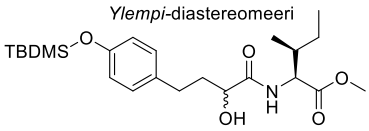
Ylempi-diastereomeeri

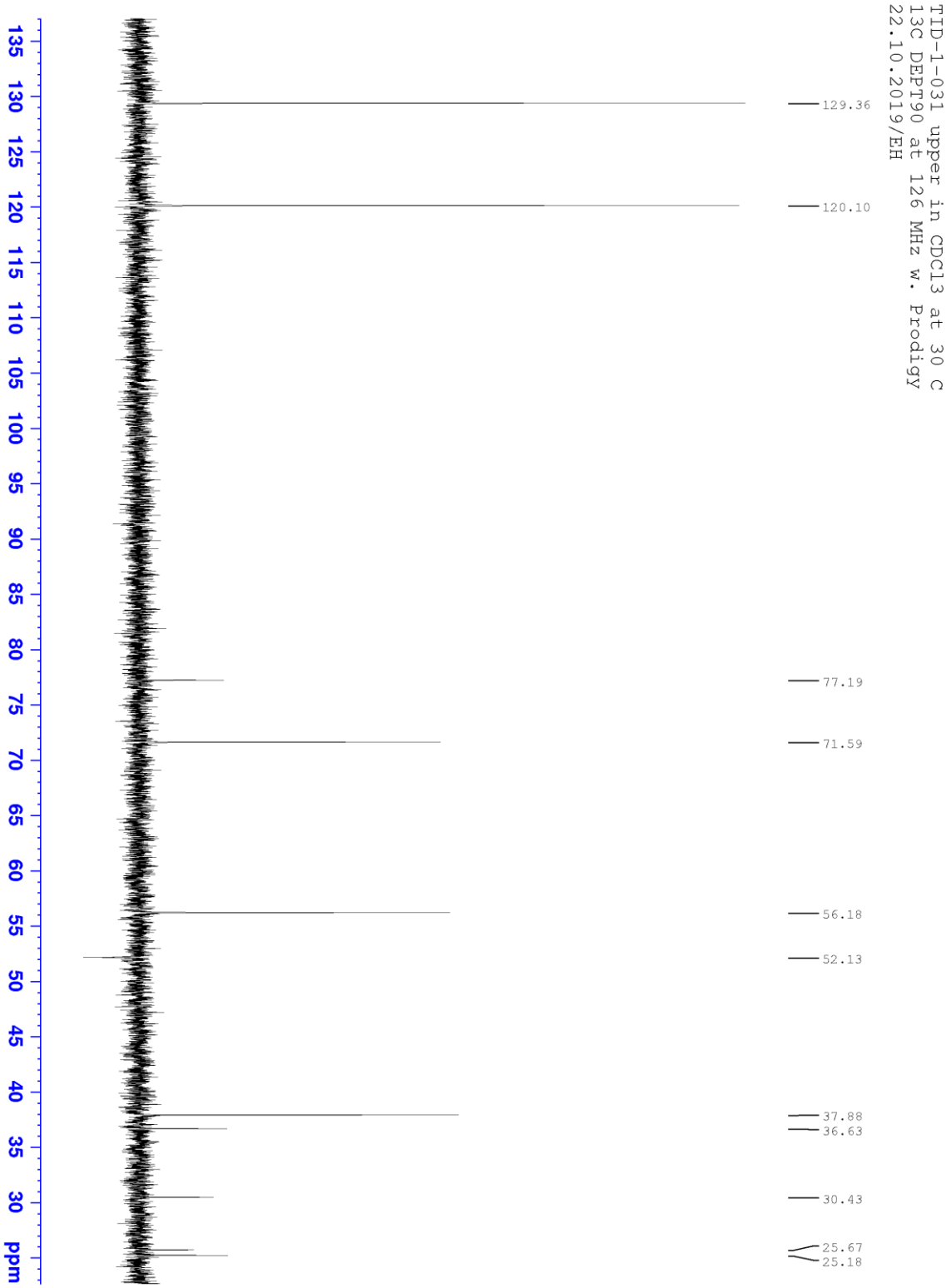




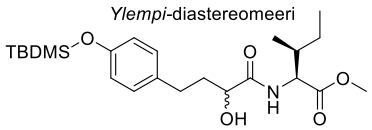
Liite 22

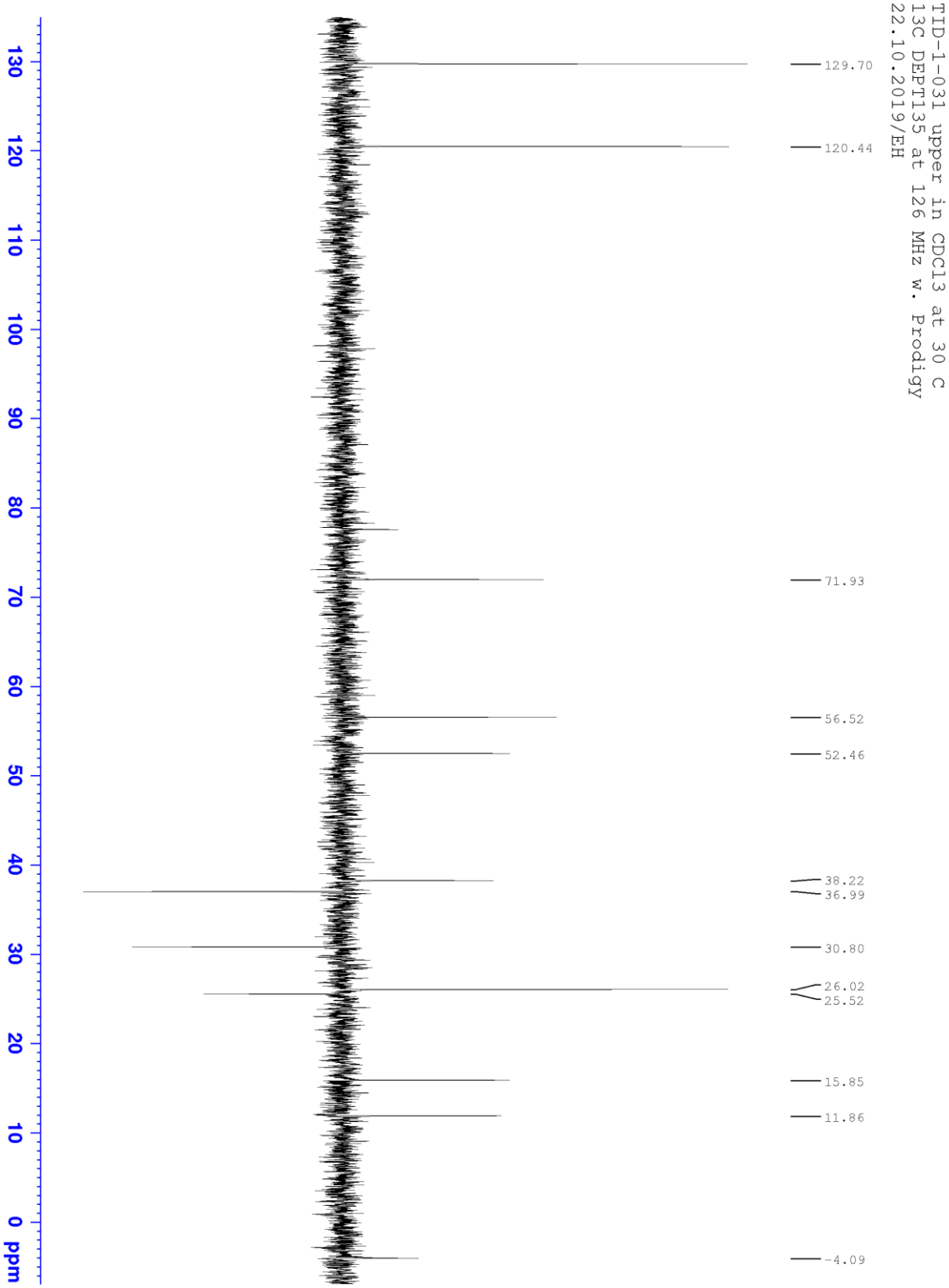
Ylempi-diastereomeeri



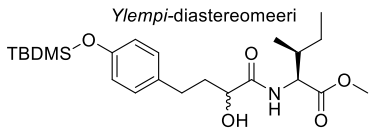


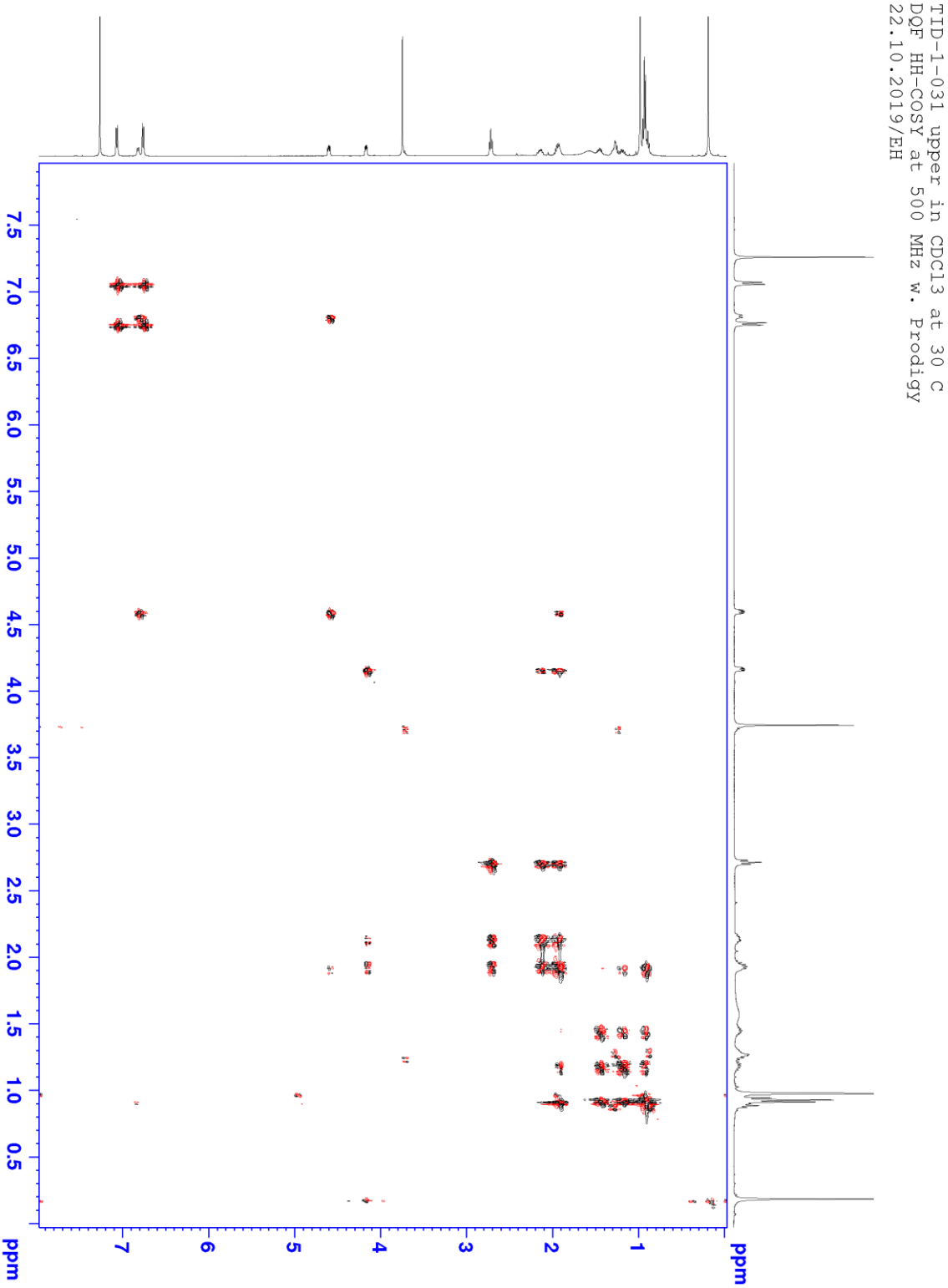
Liite 23


Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
OH
O
O

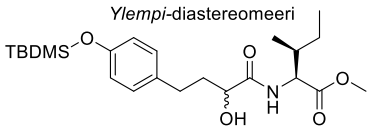

TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
13C DEPT135 at 126 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH
129.70
120.44
71.93
56.52
52.46
38.22
36.99
30.80
26.02
25.52
15.85
11.86
-4.09
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

Liite 24

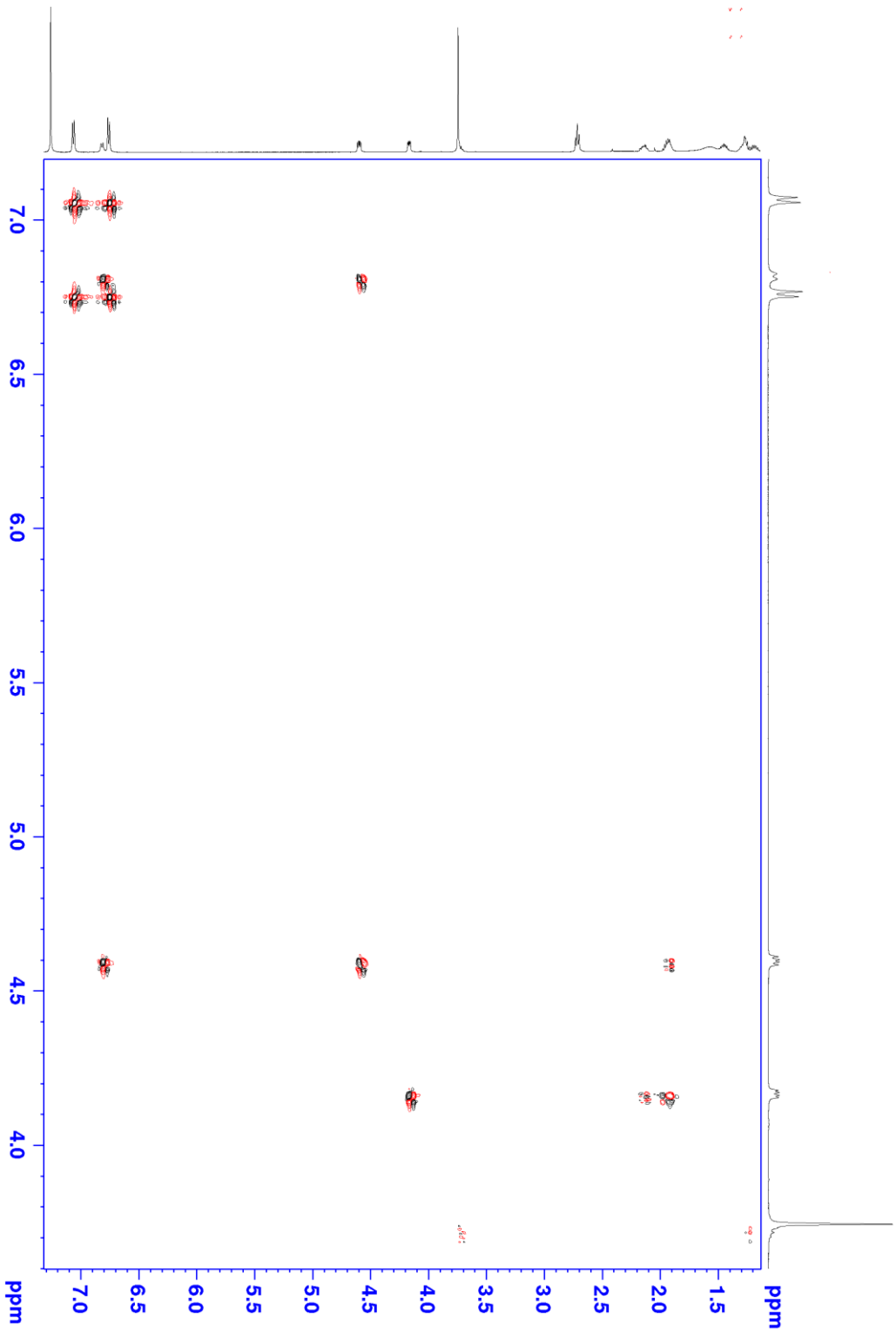

Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
DQF HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm
7
6
5
4
3
2
1

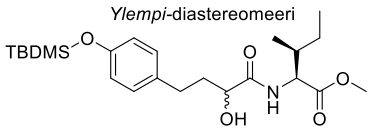
Liite 25

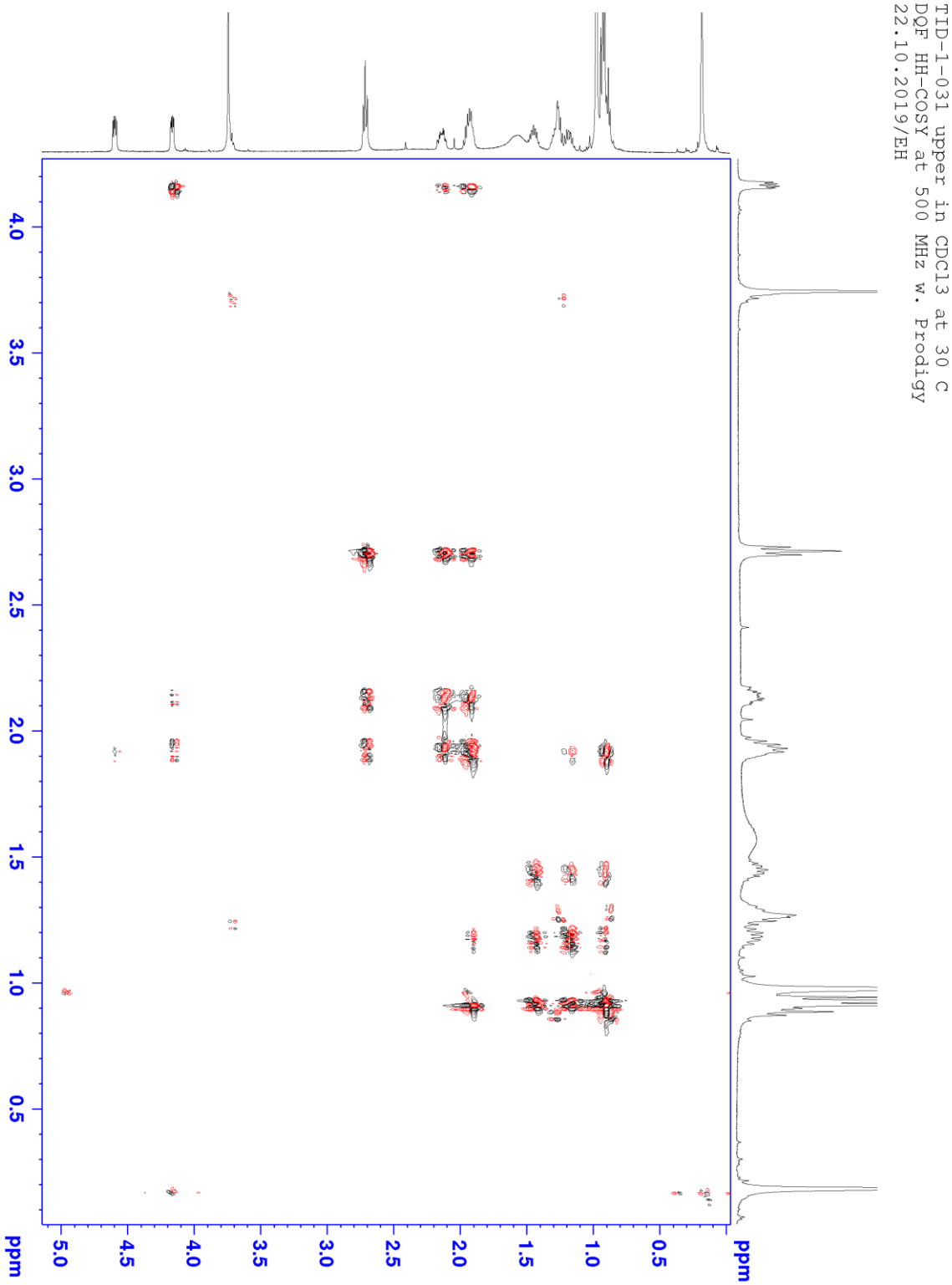


TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
DQF HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH

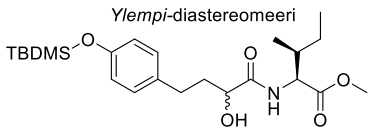


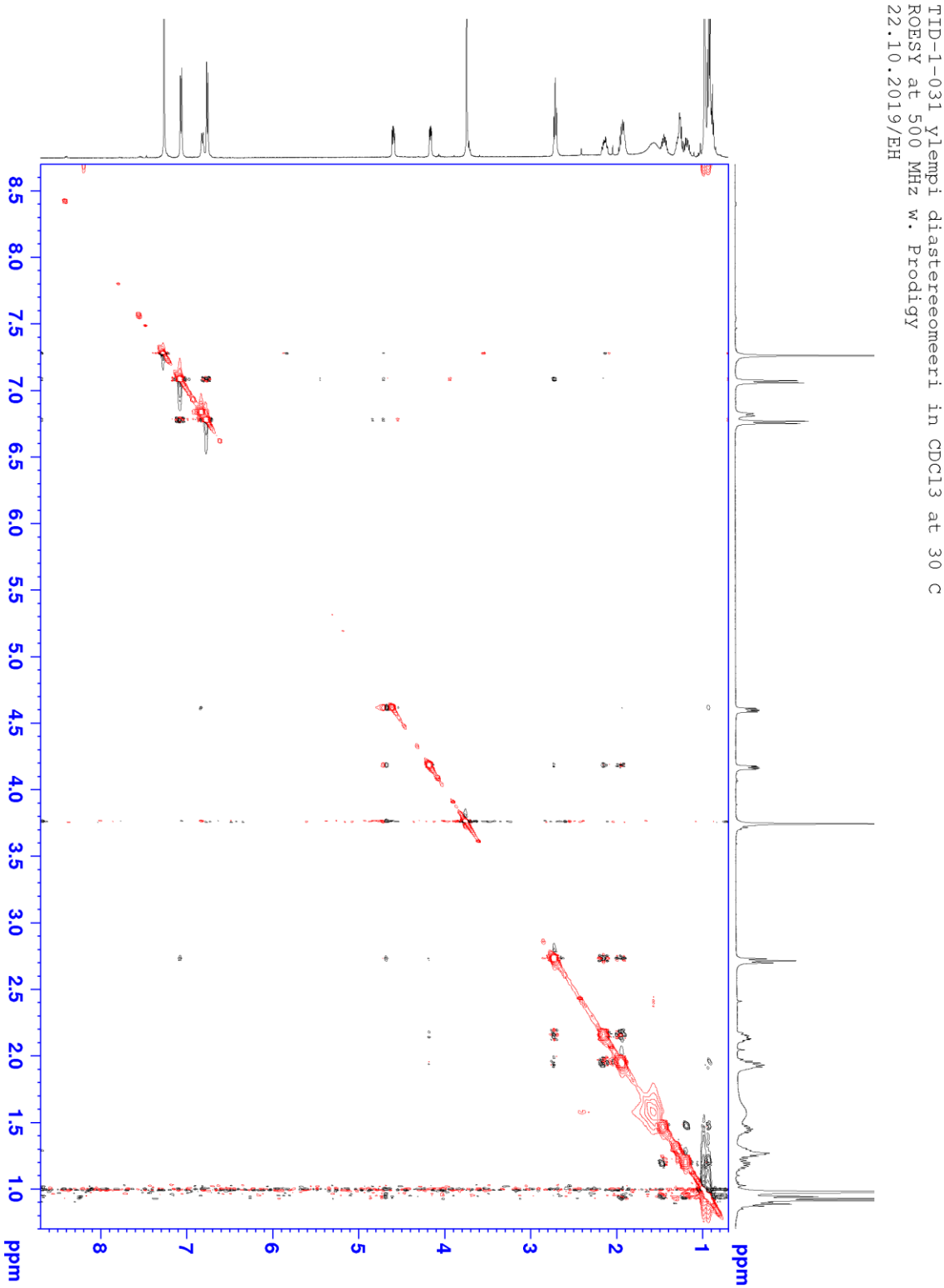
Liite 26


Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O

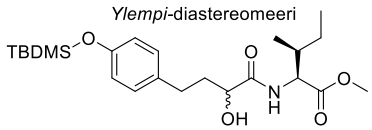

TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
DQF HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH
ppm
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
ppm

Liite 27

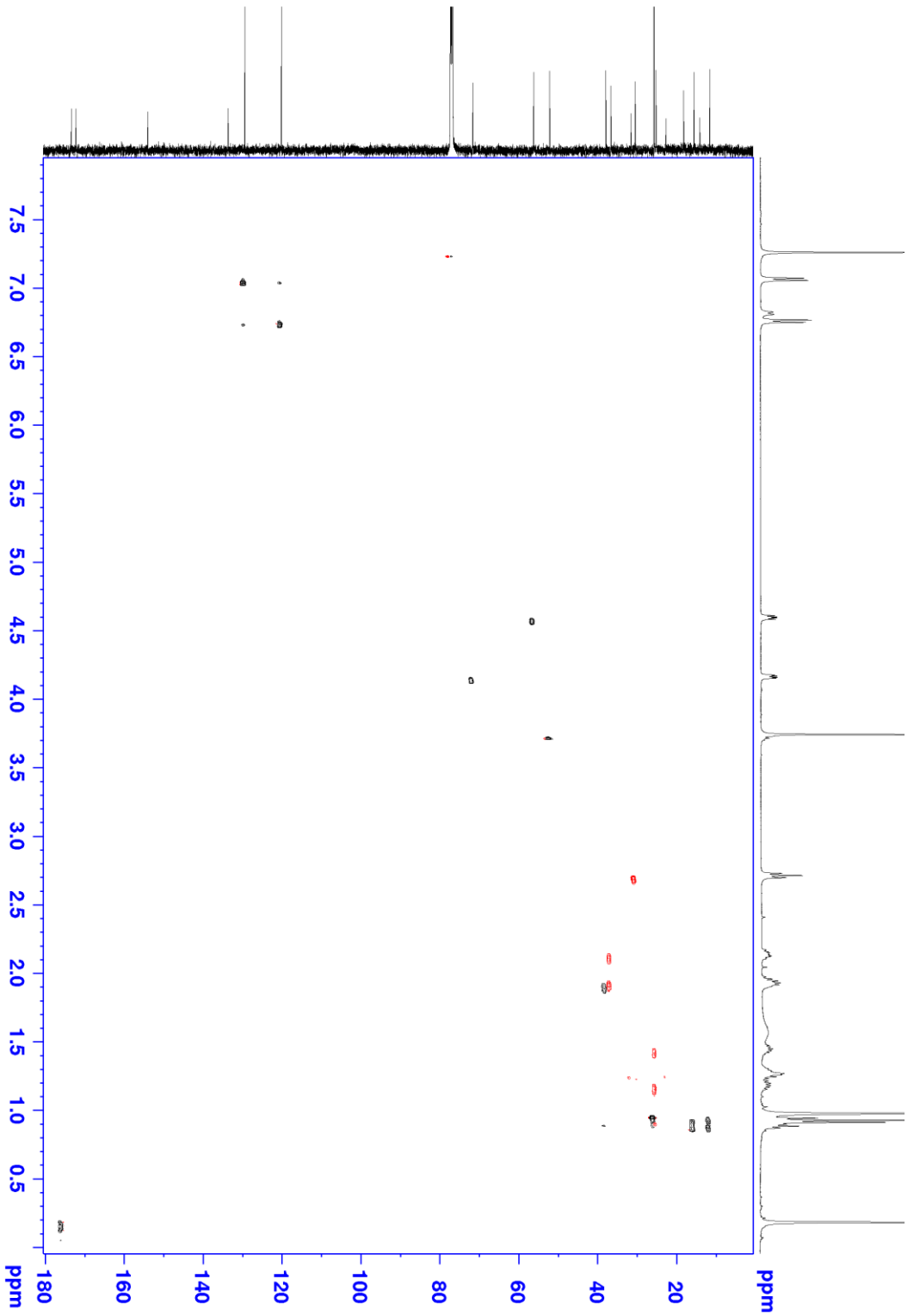

Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 ylempi diastereeomeeri in CDCl3 at 30 C
ROESY at 500 MHz w. Prodigy
22.10.2019/EH
ppm
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
8
7
6
5
4
3
2
1

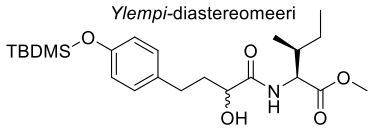
Liite 28

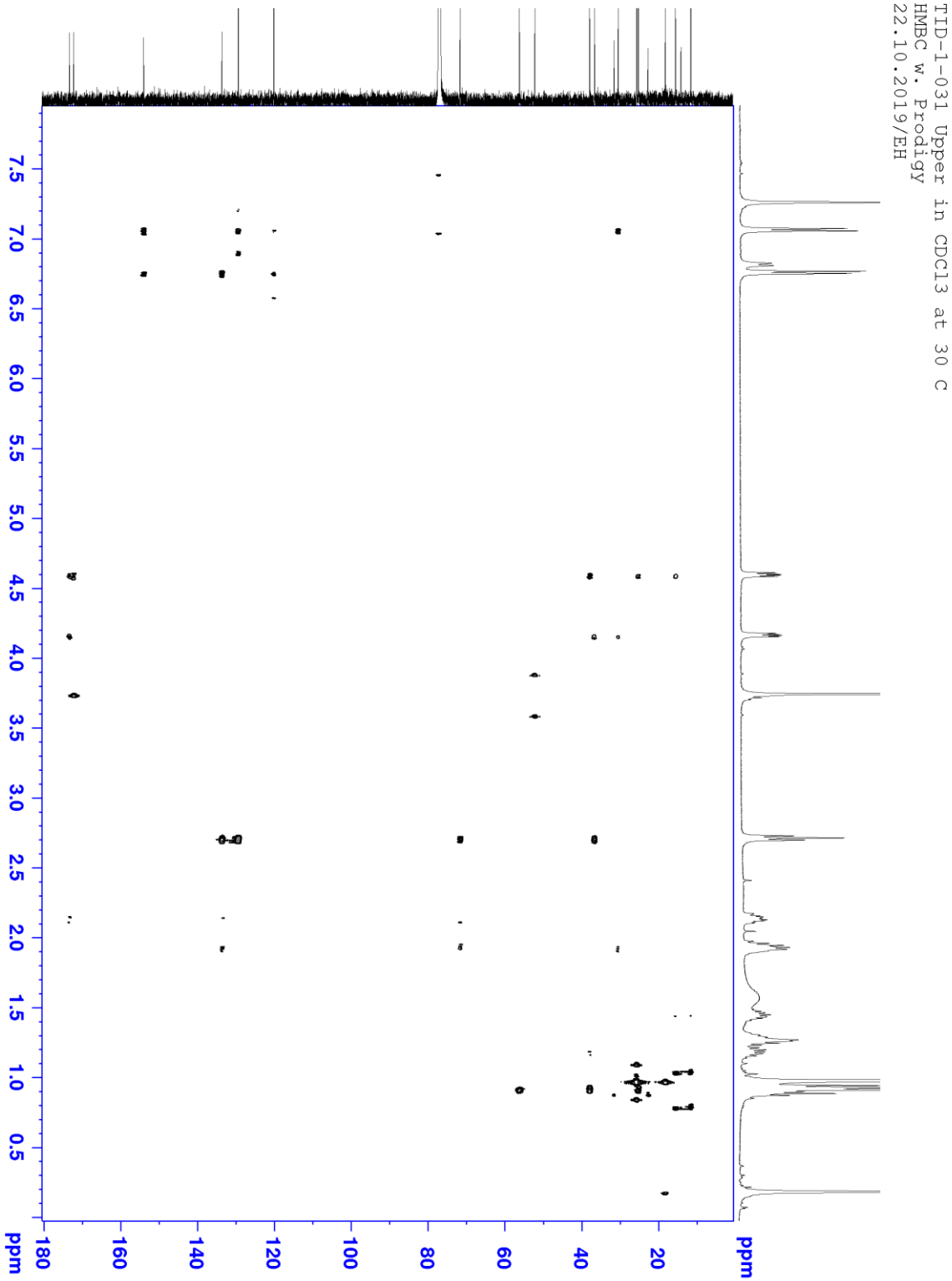


TID-1-031 upper in CDCl3 at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
22.10.2019/EH



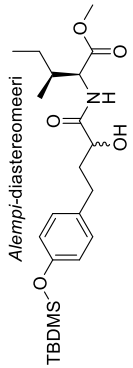
Liite 29

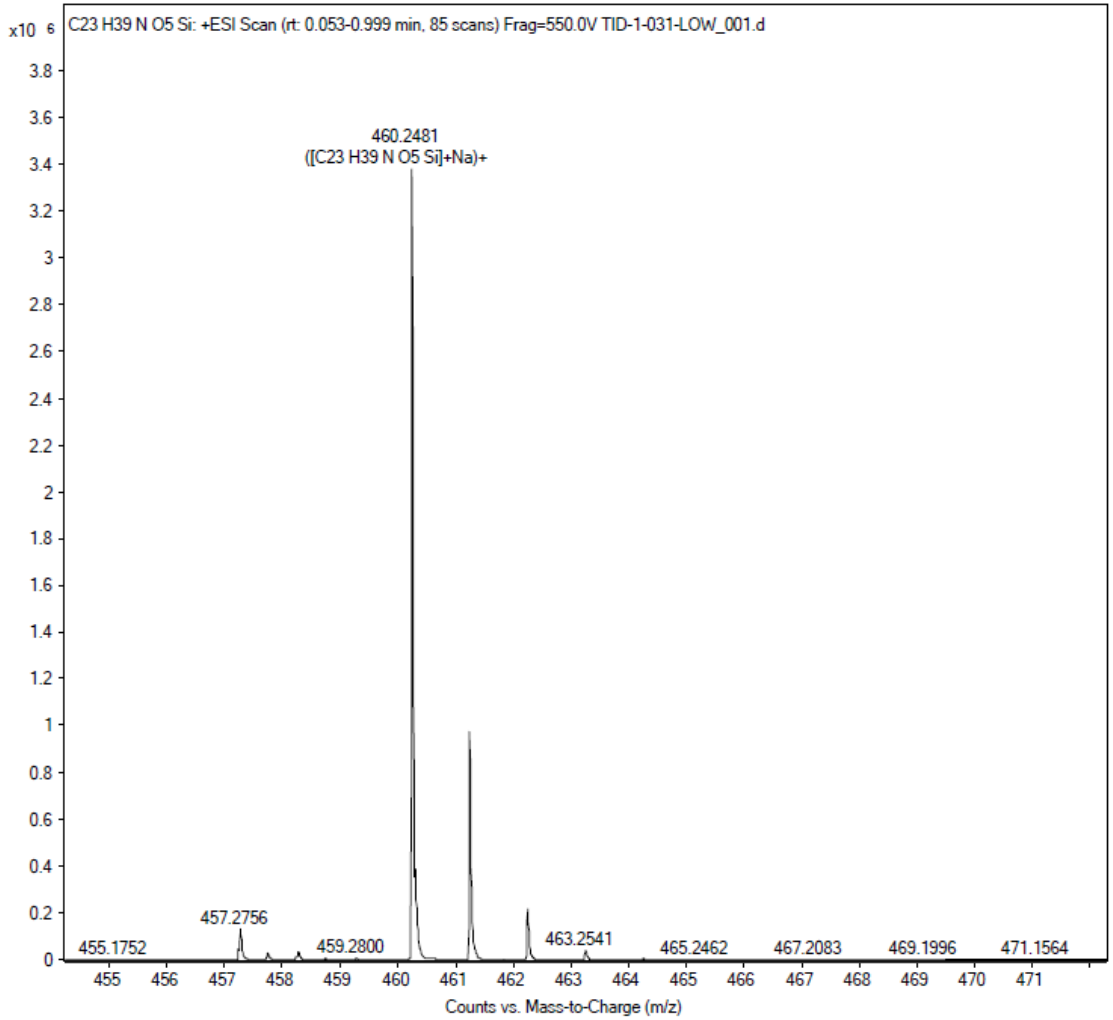

Ylempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 Upper in CDCl3 at 30 C
HMBC w. Prodigy
22.10.2019/EH
ppm
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5

Liite 30

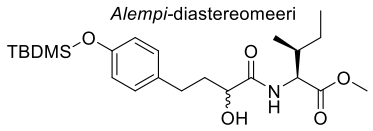
Sample Name	TID-1-031-LOW	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-031-LOW_001.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-031-LOW, 1uM in MeOH	**Acquired Time**	12/11/2019 12:14:13 PM (UTC+02:00)

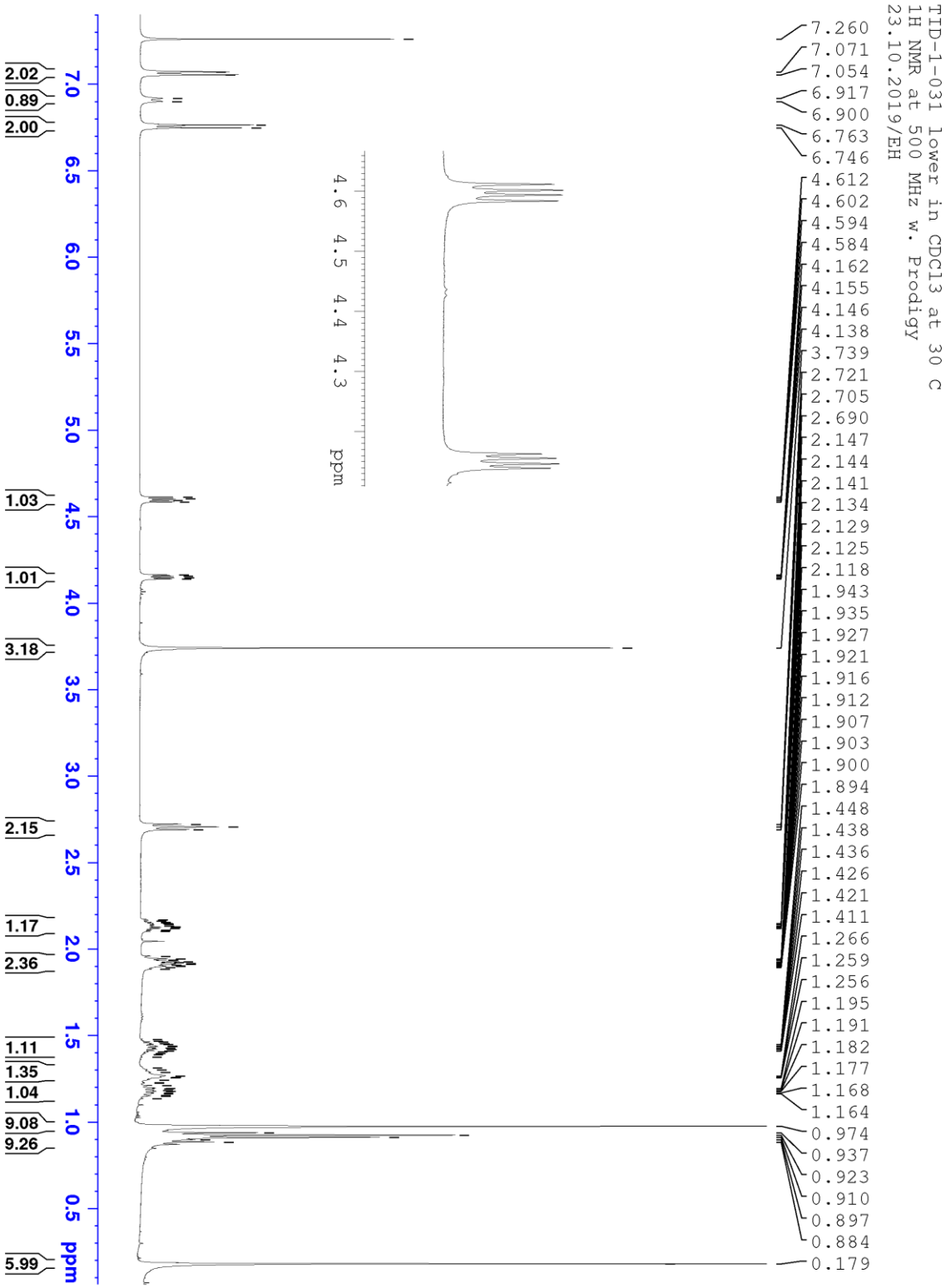




Liite 31

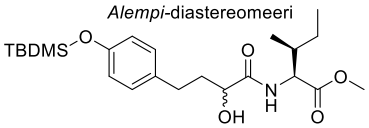
Alempi-diastereomeeri

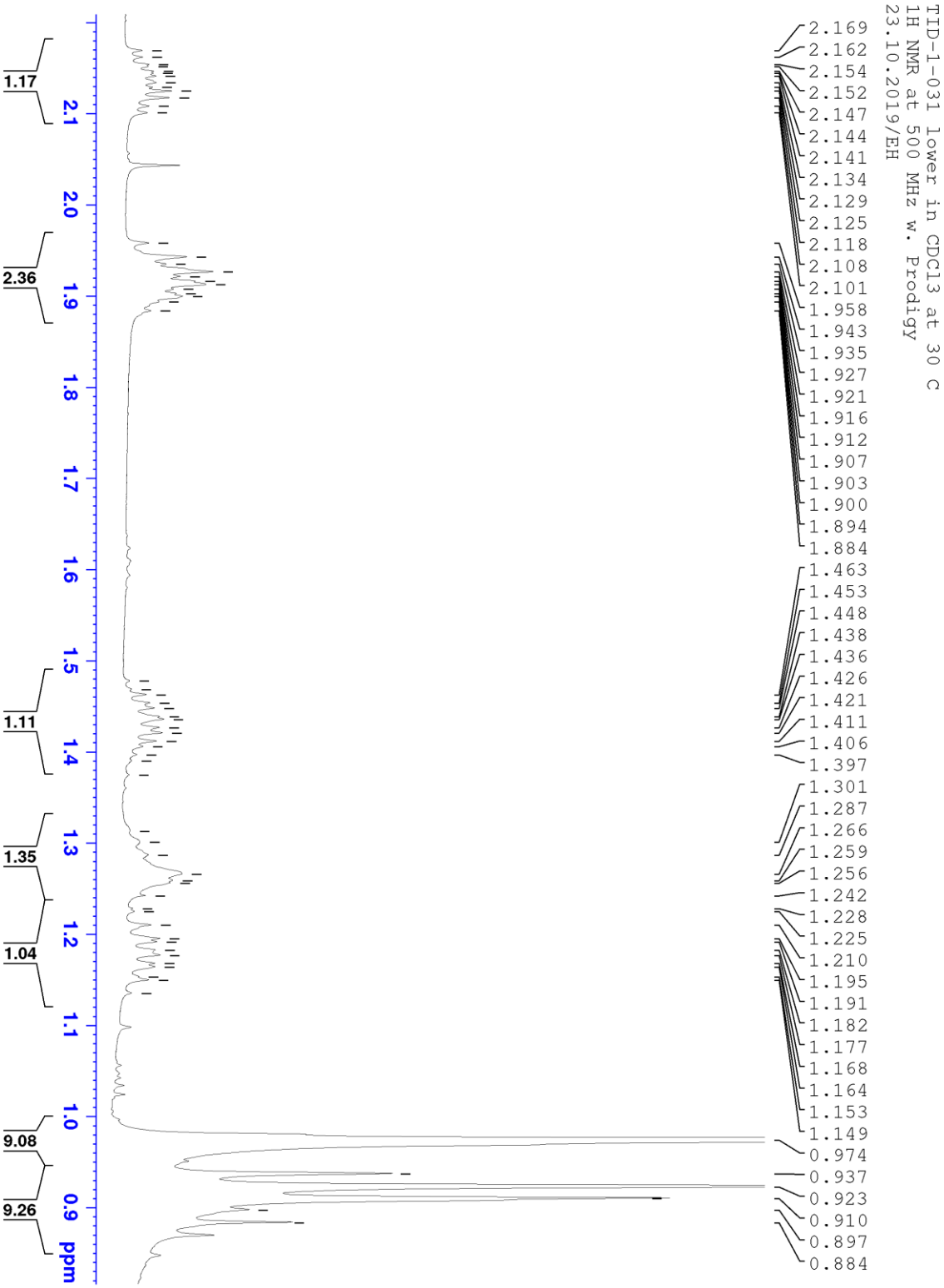




Liite 32

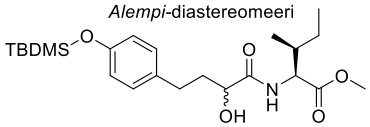
Alempi-diastereomeeri

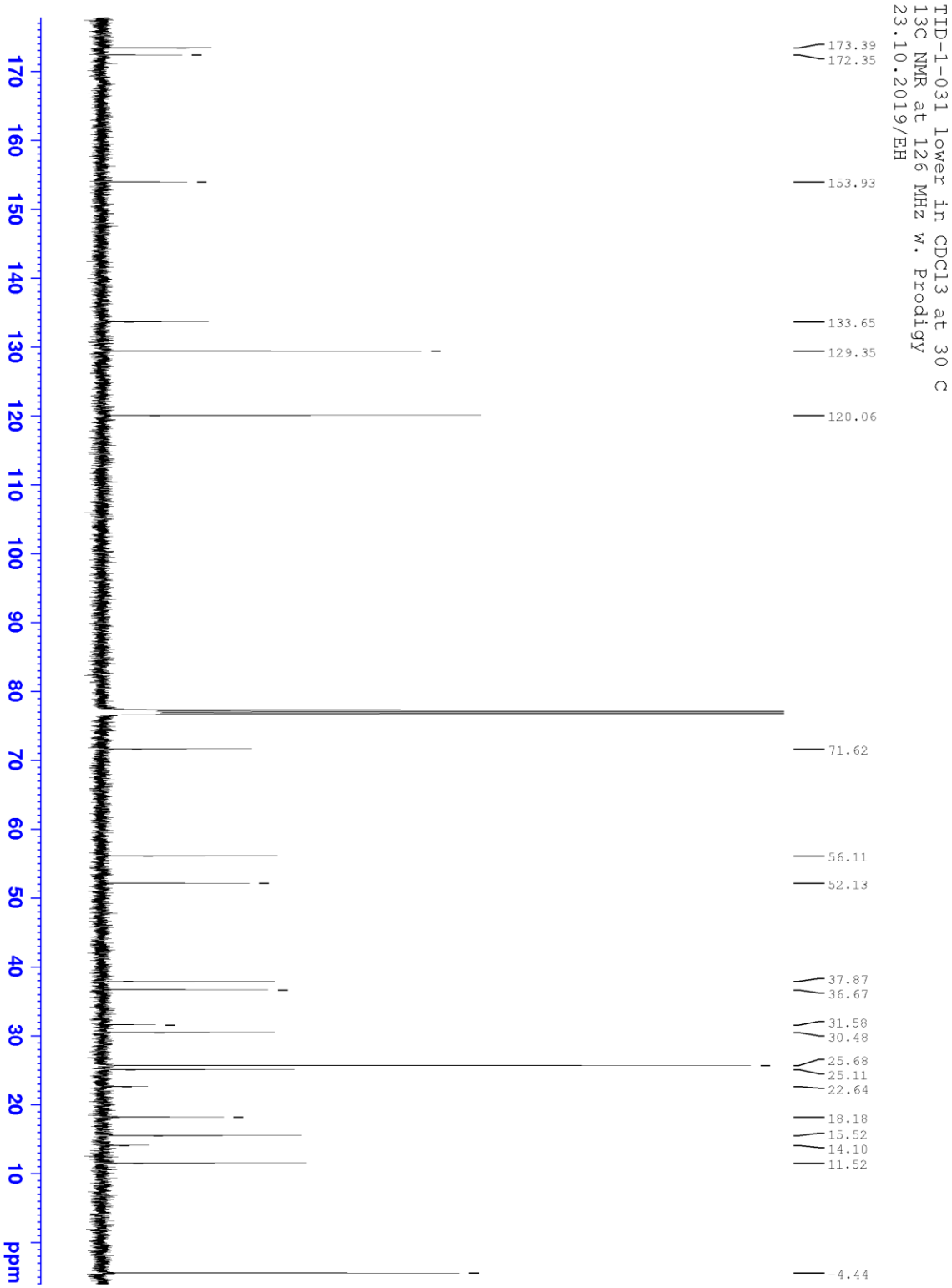




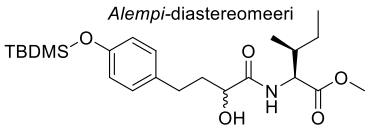
Liite 33

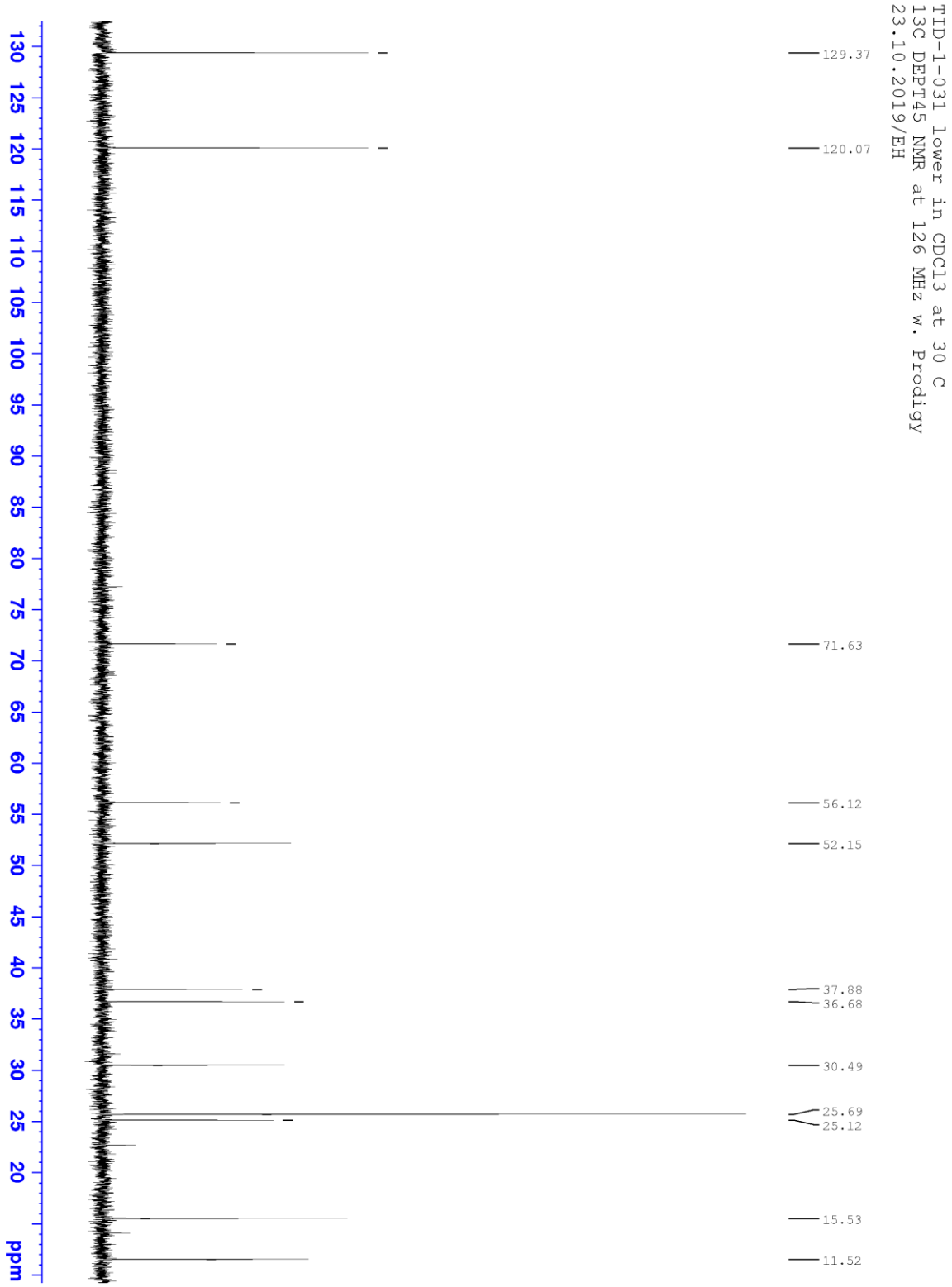
Alempi-diastereomeeri





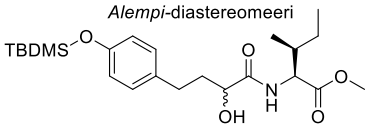
Liite 34

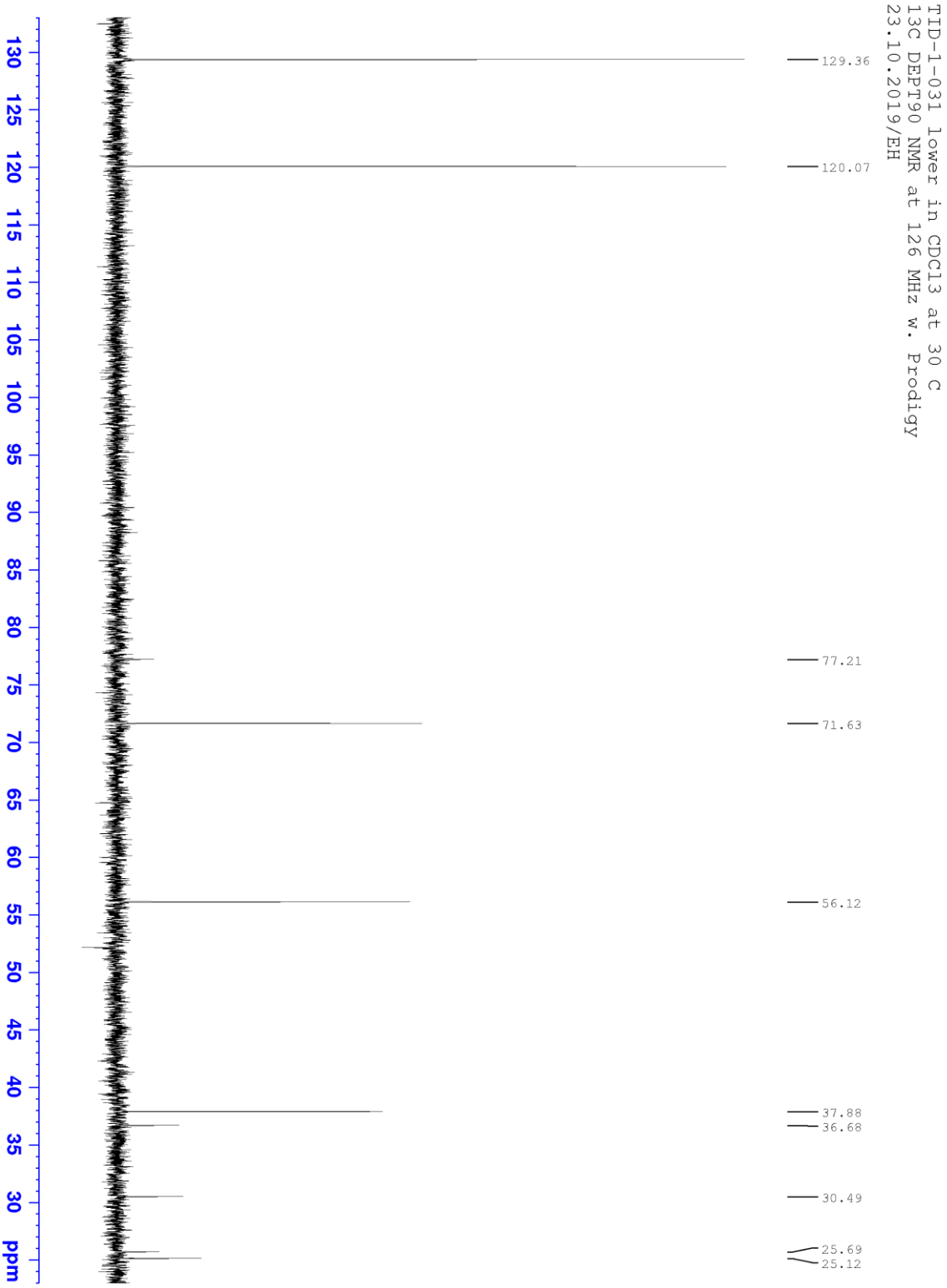

Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
13C DEPT45 NMR at 126 MHz w. Prodigy
23.10.2019/EH
129.37
120.07
71.63
56.12
52.15
37.88
36.68
30.49
25.69
25.12
15.53
11.52
130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20
ppm

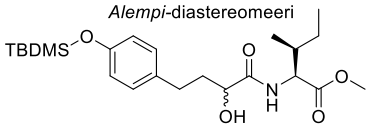
Liite 35

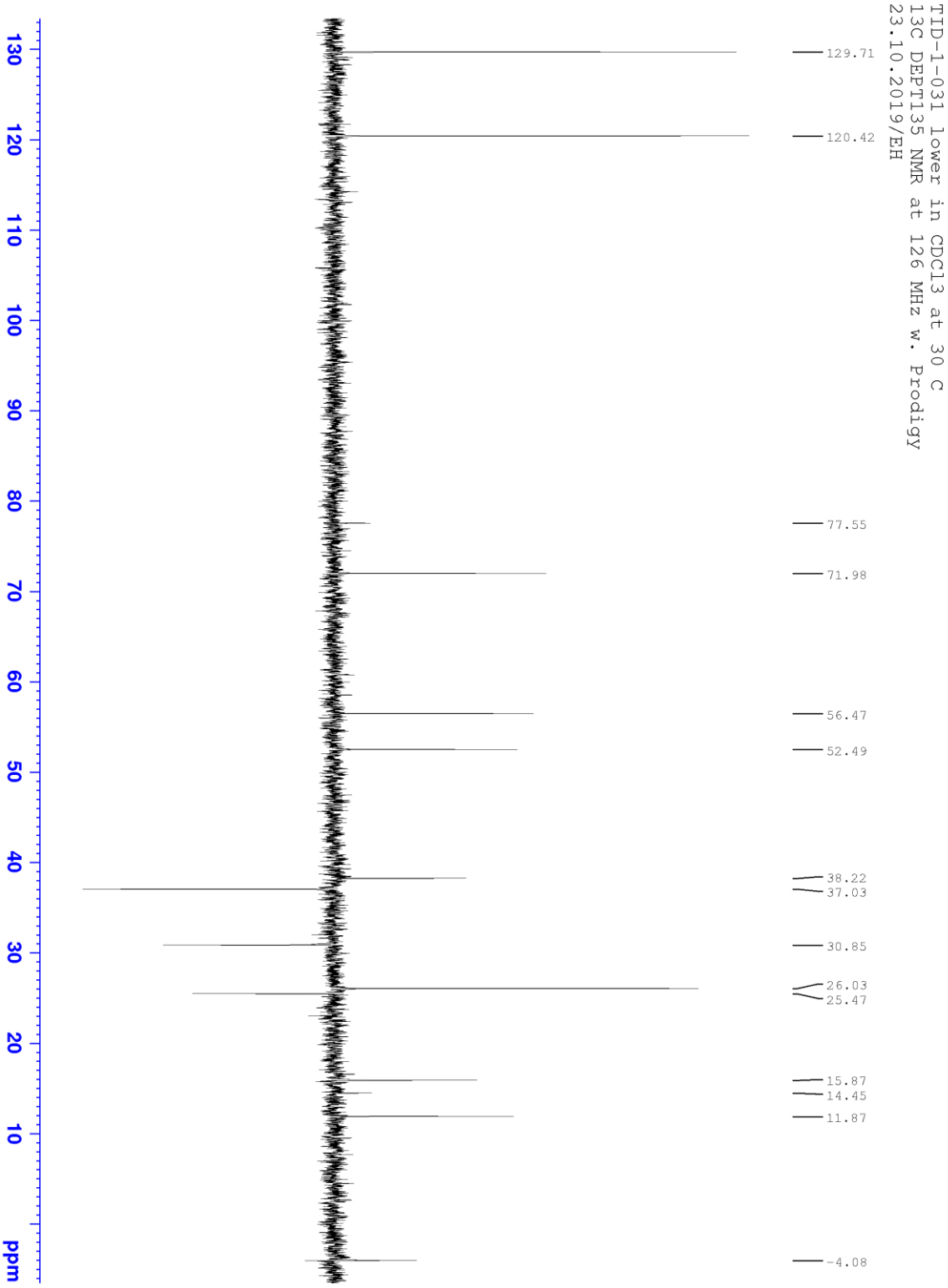
Alempi-diastereomeeri





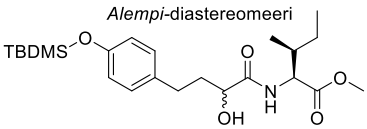
Liite 36

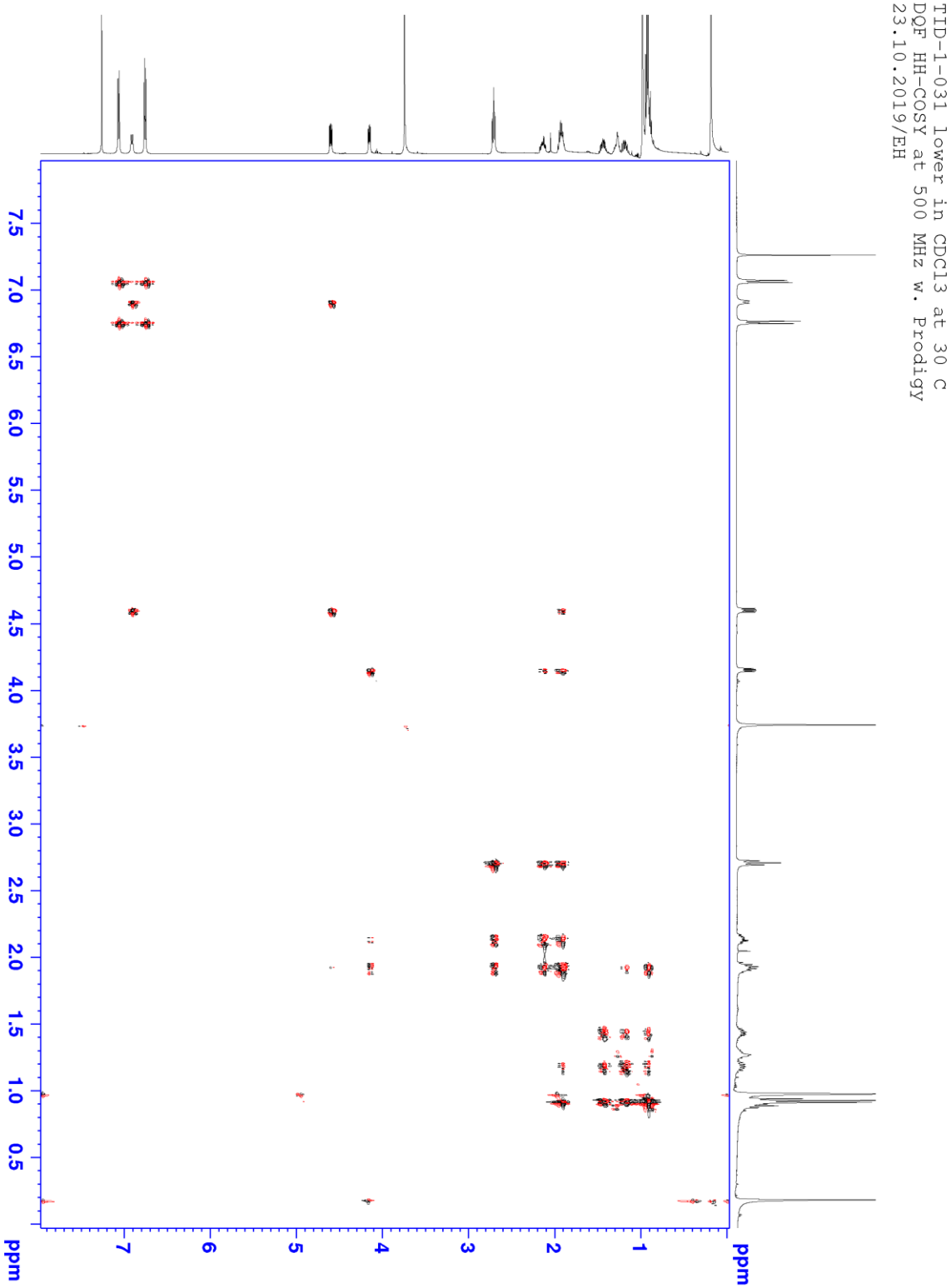

Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
13C DEPT135 NMR at 126 MHz w. Prodigy
23.10.2019/EH
129.71
120.42
77.55
71.98
56.47
52.49
38.22
37.03
30.85
26.03
25.47
15.87
14.45
11.87
-4.08
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm

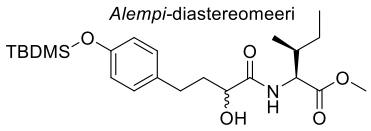
Liite 37

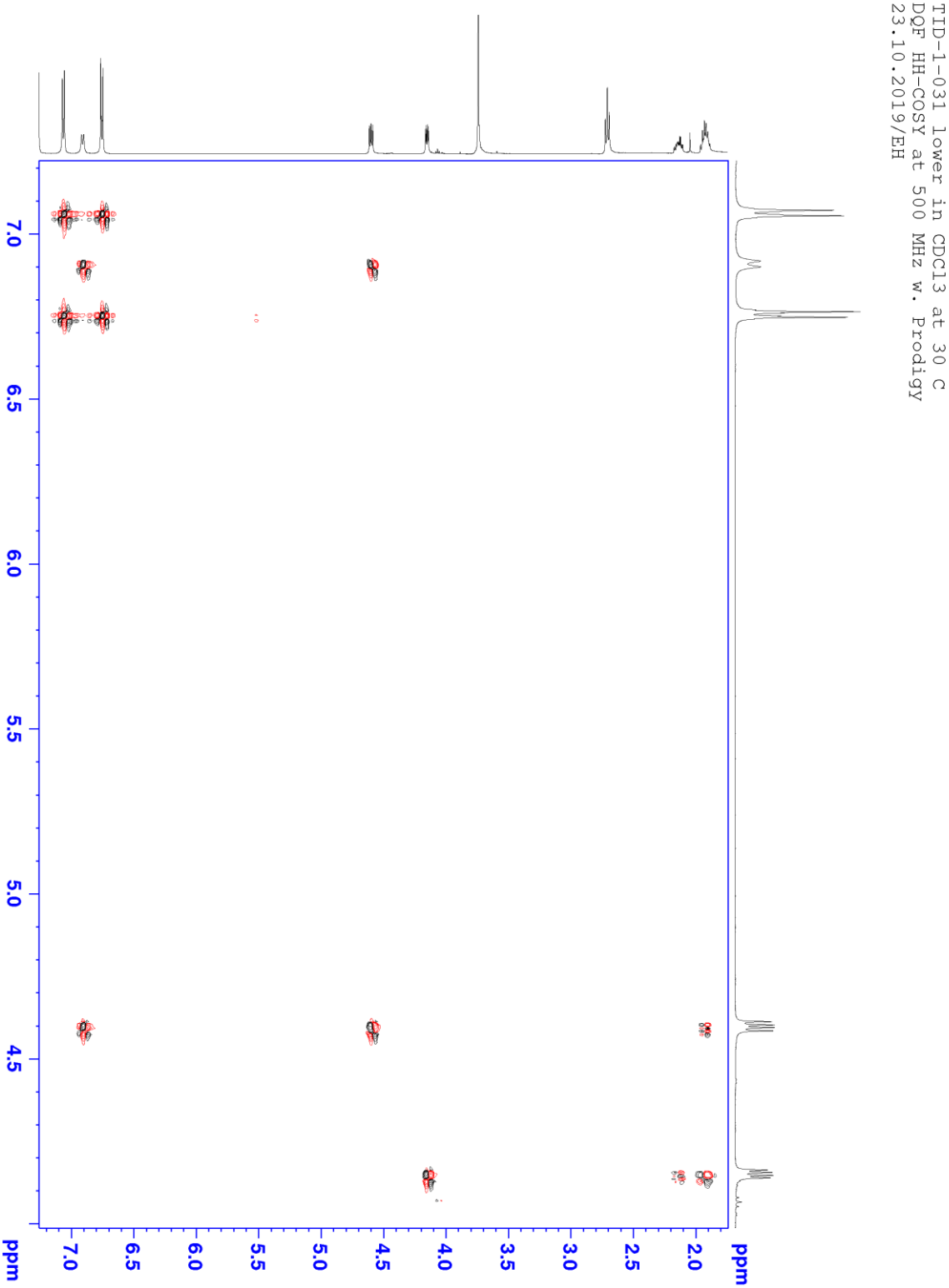
Alempi-diastereomeeri





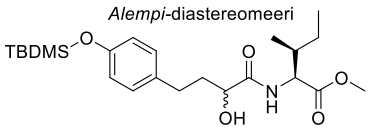
Liite 38


Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O

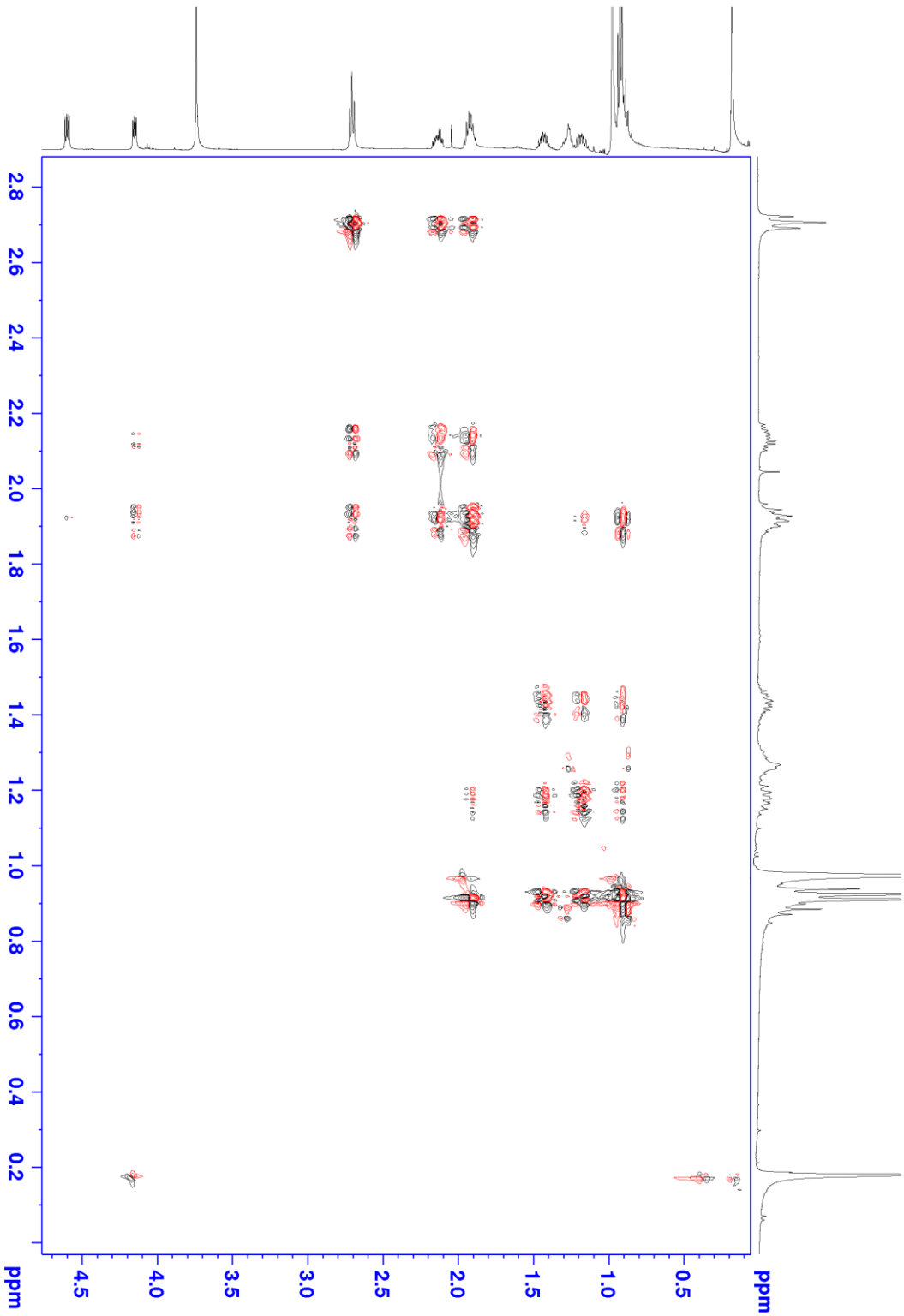

TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
DQF HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
23.10.2019/EH
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0

Liite 39

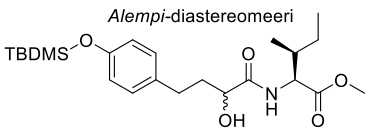
Alempi-diastereomeeri

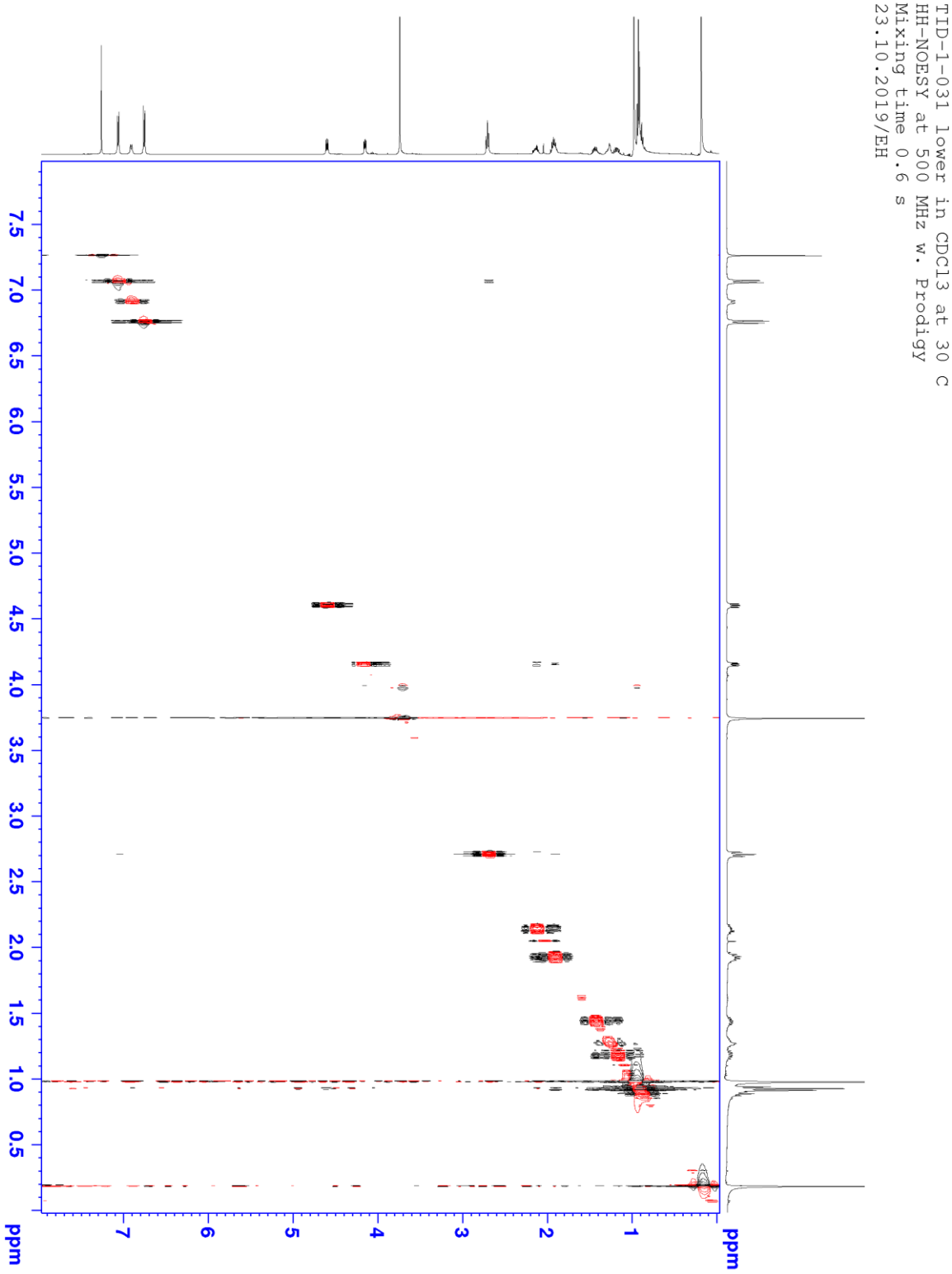


TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
DQF HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
23.10.2019/EH

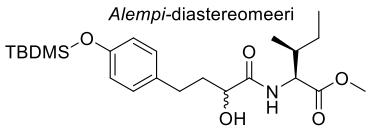


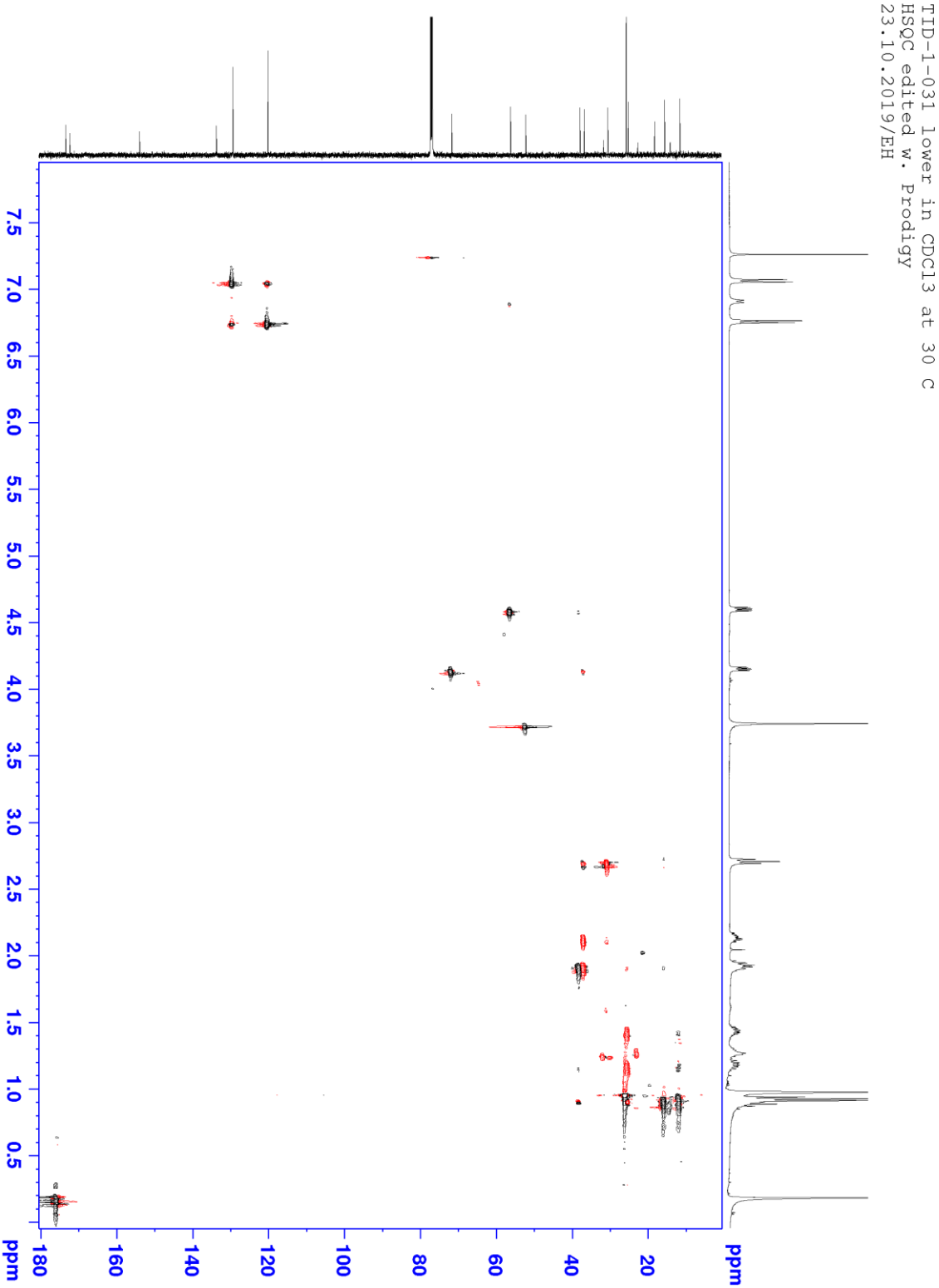
Liite 40


Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O

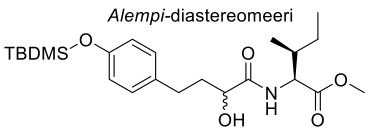

TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
HH-NOESY at 500 MHz w. Prodigy
Mixing time 0.6 s
23.10.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
7
6
5
4
3
2
1
ppm

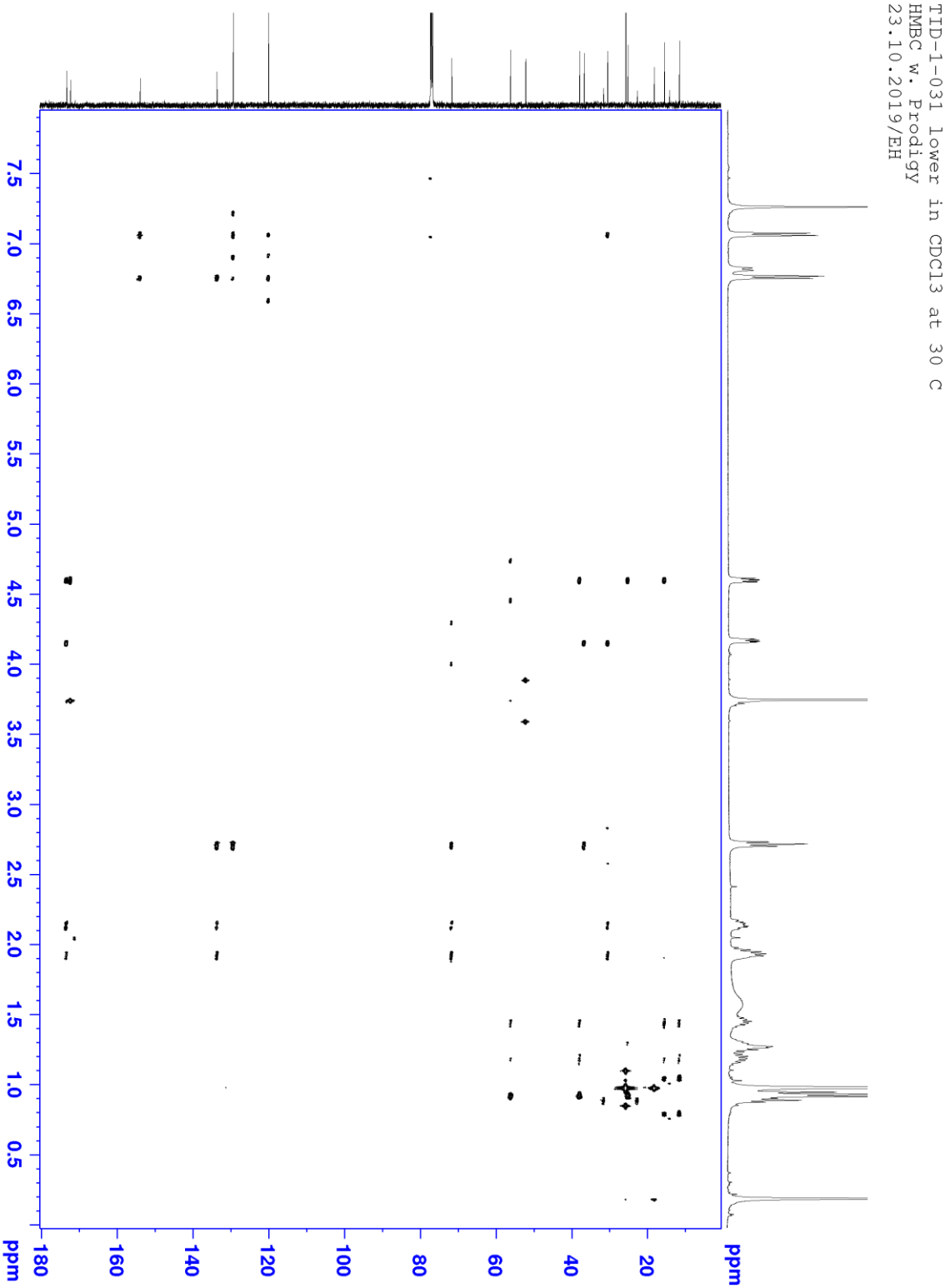
Liite 41


Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
OH
O
O


TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
23.10.2019/EH
ppm
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5

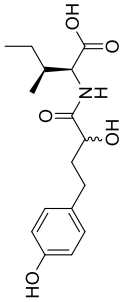
Liite 42

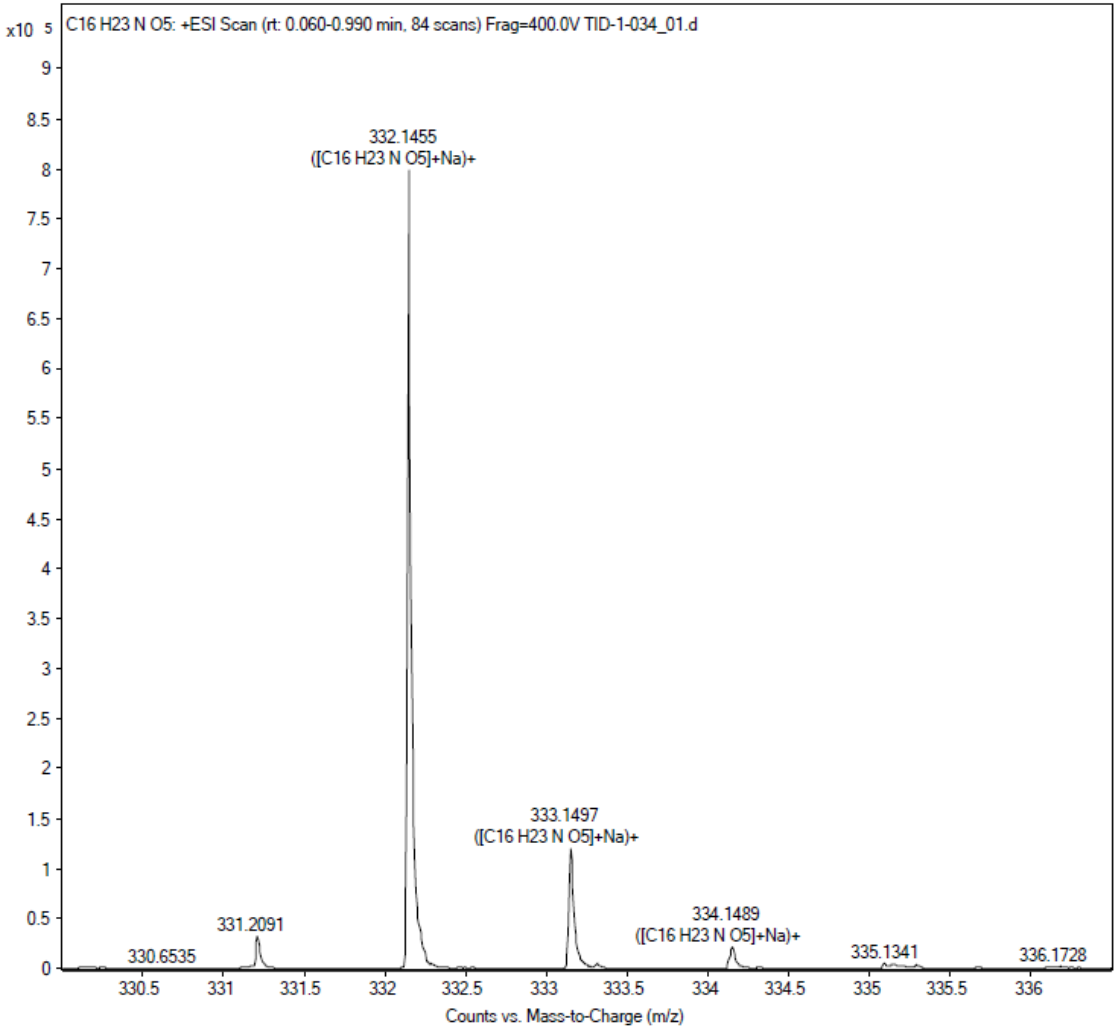

Alempi-diastereomeeri
TBDMS
O
O
N
H
O
OH
O


TID-1-031 lower in CDCl3 at 30 C
HMBC w. Prodigy
23.10.2019/EH
ppm
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5

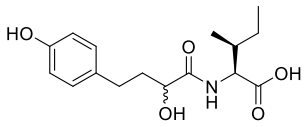
Liite 43

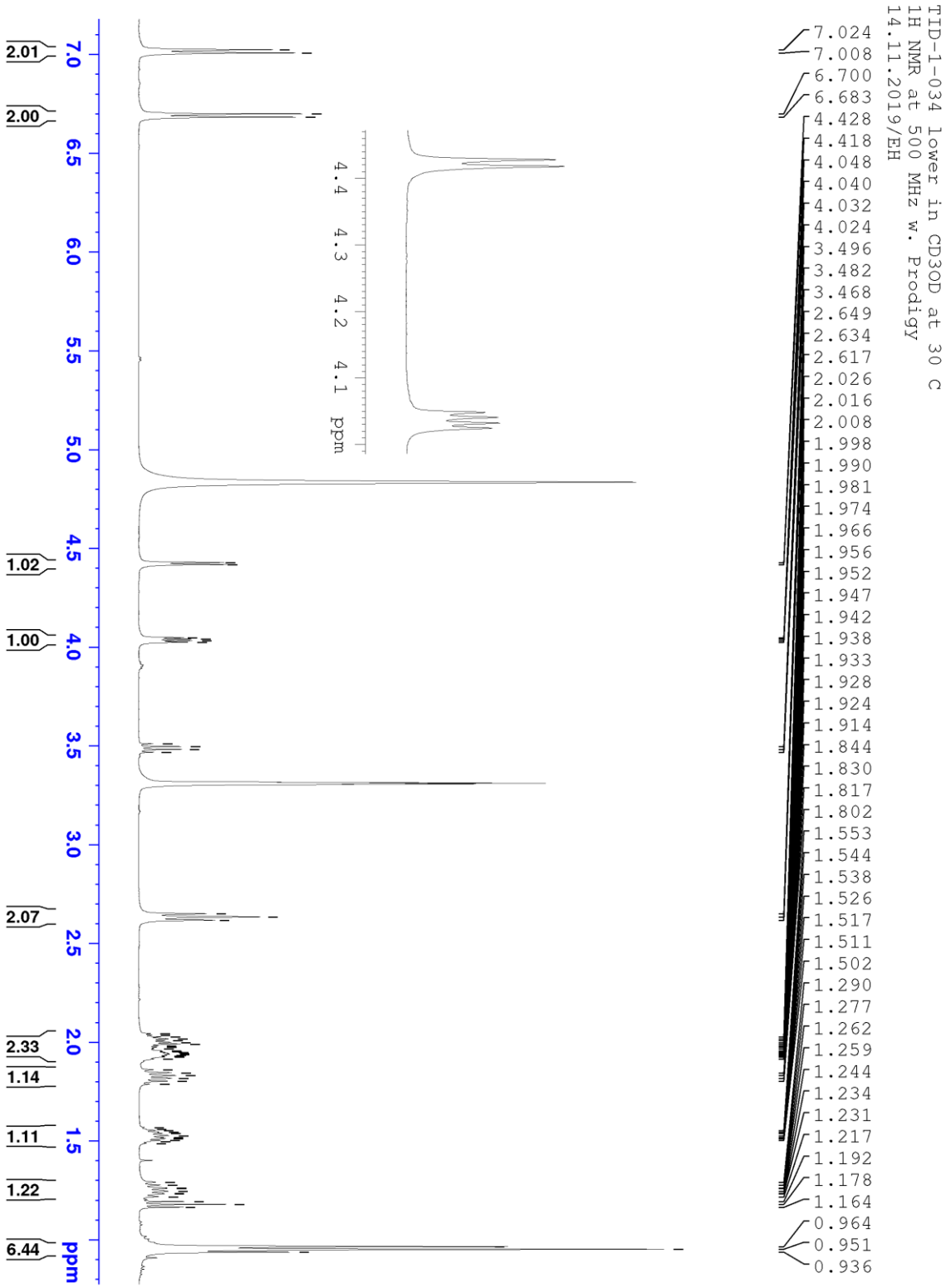
Sample Name	TID-1-034	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-034_01.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-034, 2uM in MeOH, QTOF Only, Pos.Mode	**Acquired Time**	11/29/2019 1:01:30 PM (UTC+02:00)



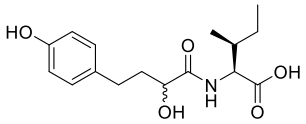


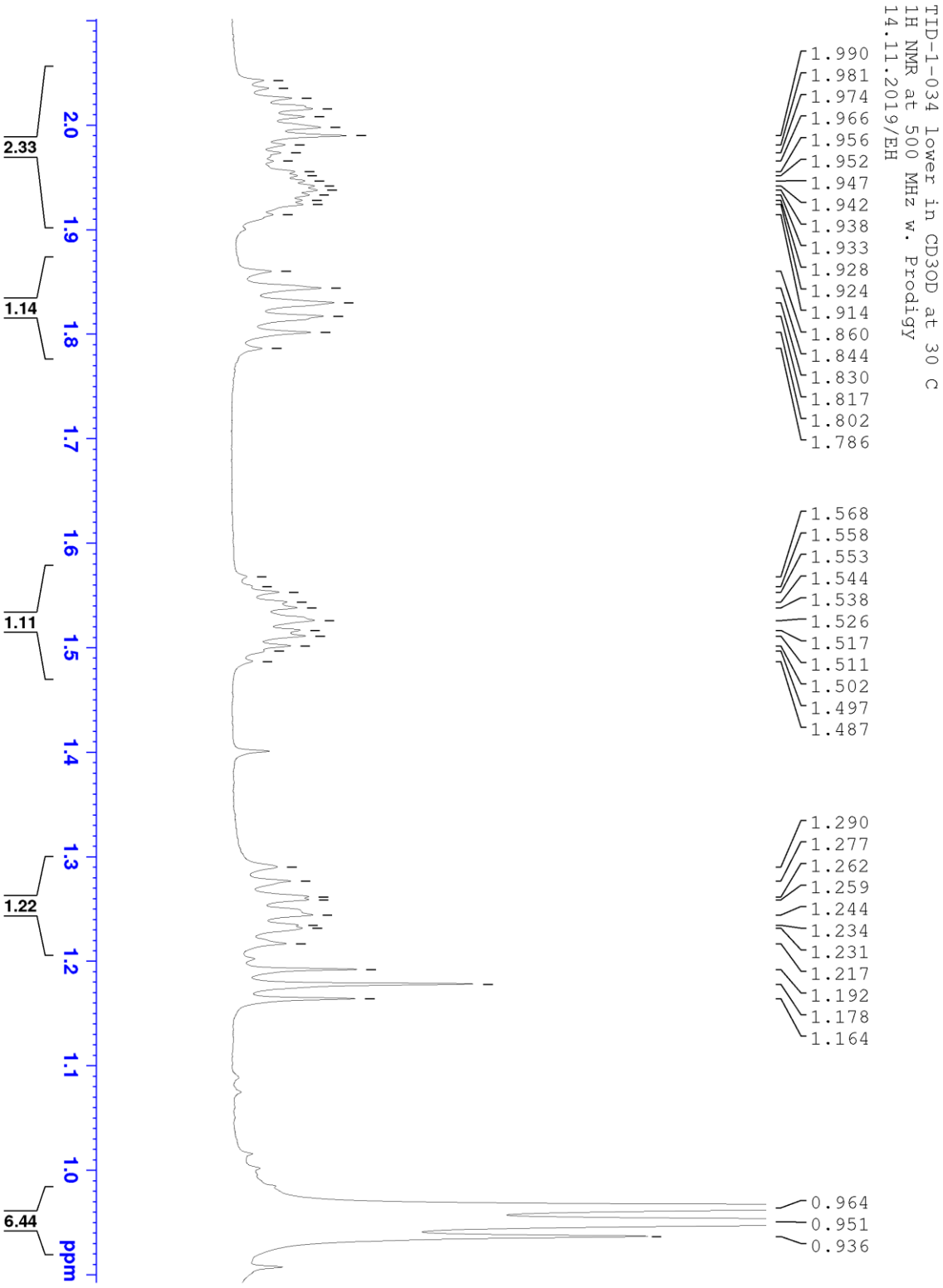
Liite 44


HO
O
N
H
OH
OH
O

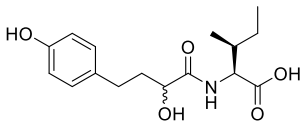

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
14.11.2019/EH
7.024
7.008
6.700
6.683
4.428
4.418
4.048
4.040
4.032
4.024
3.496
3.482
3.468
2.649
2.634
2.617
2.026
2.016
2.008
1.998
1.990
1.981
1.974
1.966
1.956
1.952
1.947
1.942
1.938
1.933
1.928
1.924
1.914
1.844
1.830
1.817
1.802
1.553
1.544
1.538
1.526
1.517
1.511
1.502
1.290
1.277
1.262
1.259
1.244
1.234
1.231
1.217
1.192
1.178
1.164
0.964
0.951
0.936
4.4
4.3
4.2
4.1
ppm
2.01
2.00
1.02
1.00
2.07
2.33
1.14
1.11
1.22
6.44
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm

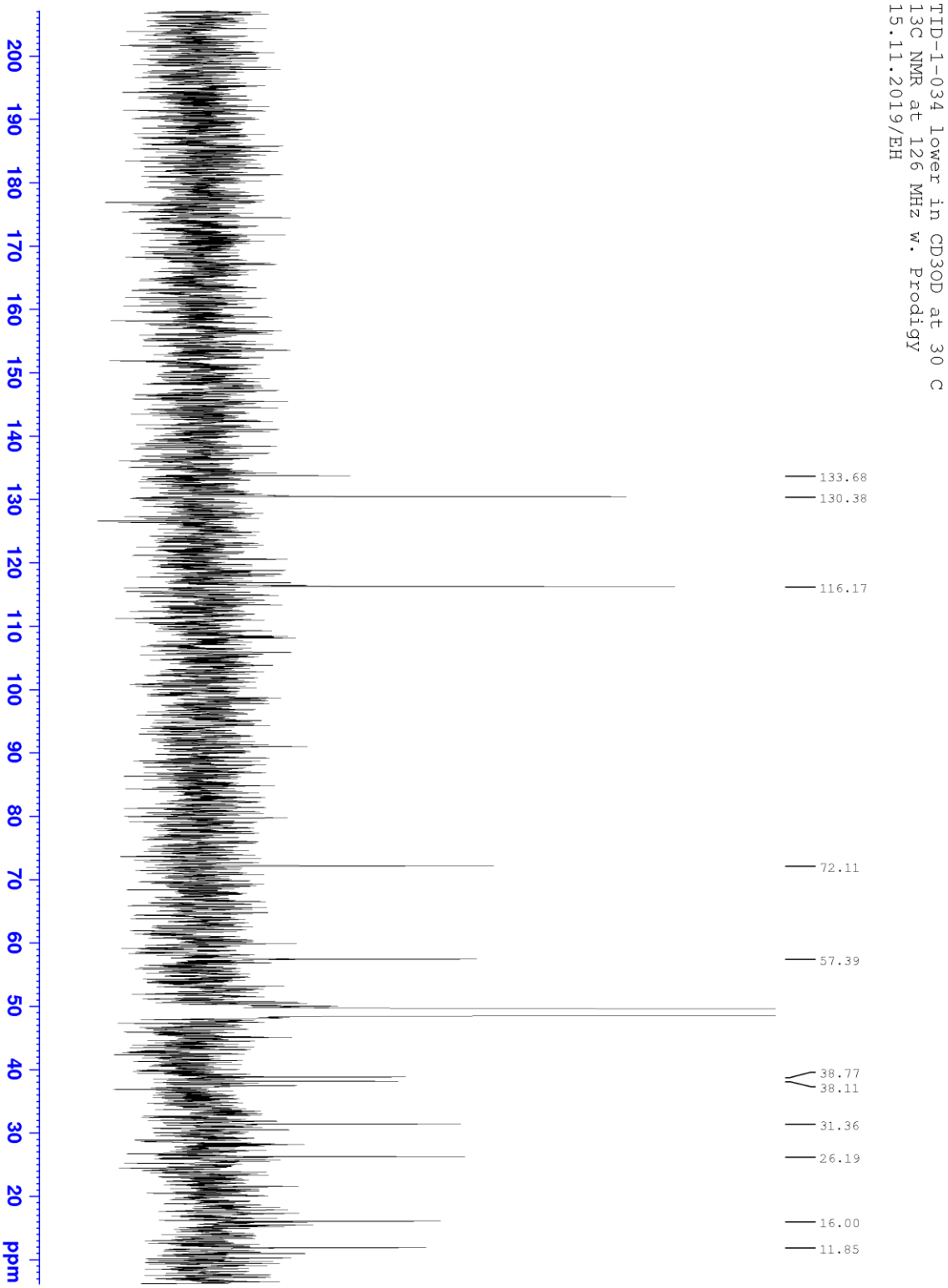
Liite 45


HO
O
OH
N
H
OH
O

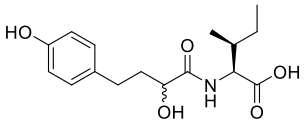

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
14.11.2019/EH
1.990
1.981
1.974
1.966
1.956
1.952
1.947
1.942
1.938
1.933
1.928
1.924
1.914
1.860
1.844
1.830
1.817
1.802
1.786
1.568
1.558
1.553
1.544
1.538
1.526
1.517
1.511
1.502
1.497
1.487
1.290
1.277
1.262
1.259
1.244
1.234
1.231
1.217
1.192
1.178
1.164
0.964
0.951
0.936
2.33
1.14
1.11
1.22
6.44
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
ppm

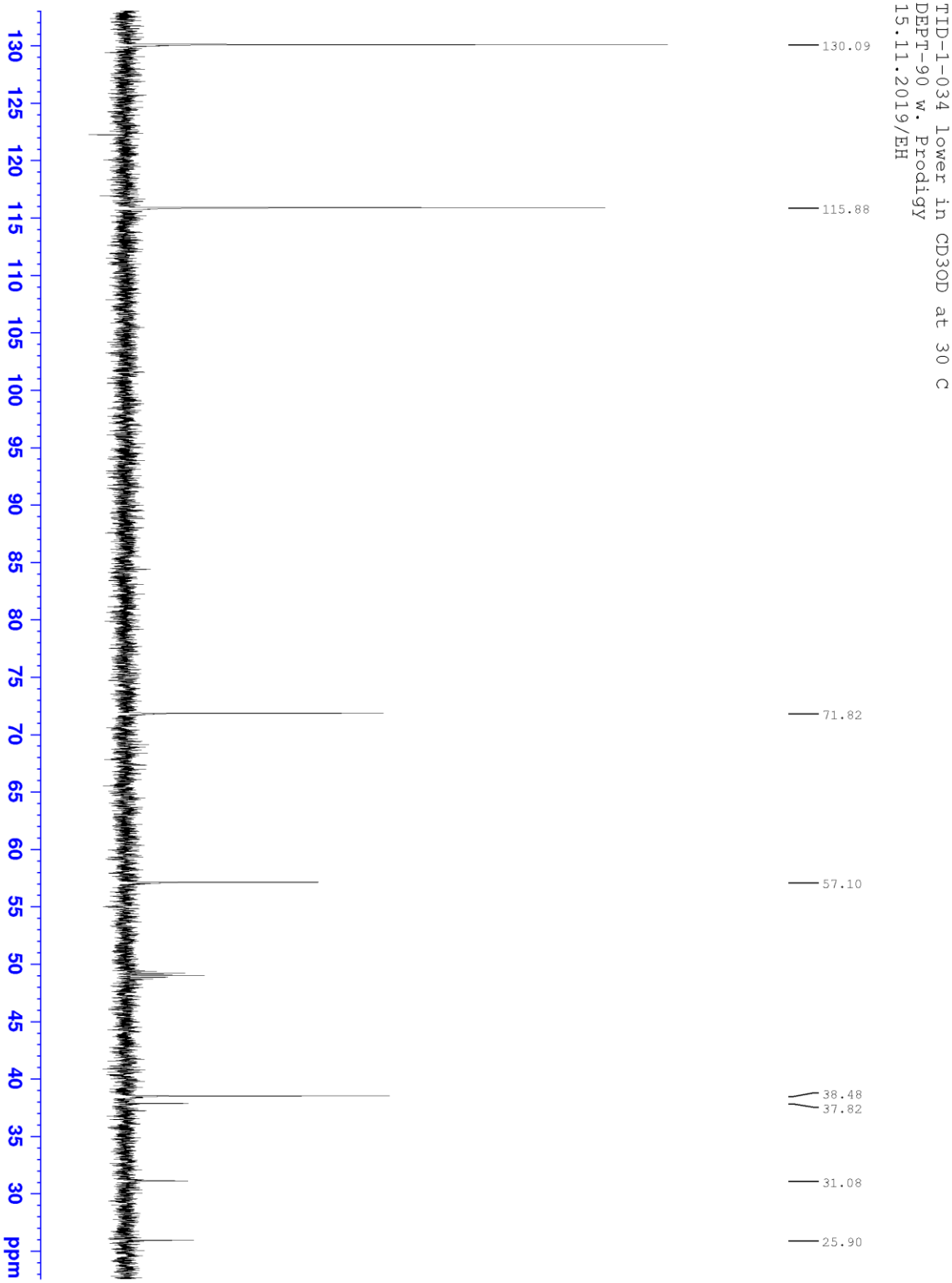
Liite 46


HO
O
OH
N
H
OH
O

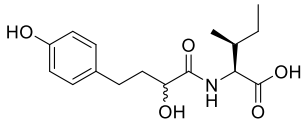

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
13C NMR at 126 MHz w. Prodigy
15.11.2019/EH
133.68
130.38
116.17
72.11
57.39
38.77
38.11
31.36
26.19
16.00
11.85
200
190
180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

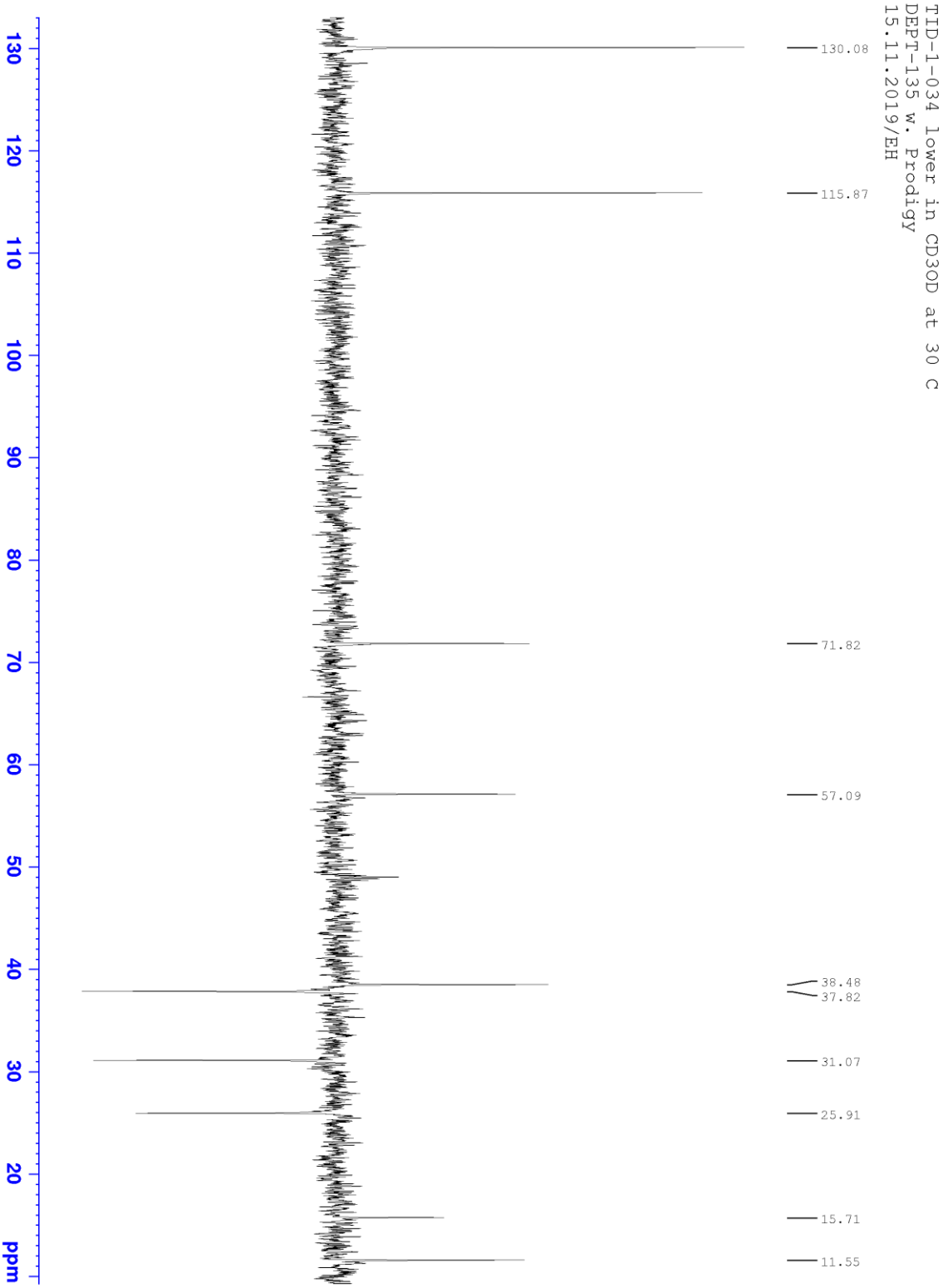
Liite 47


HO
O
N
H
OH
OH
O

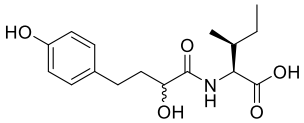

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
DEPT-90 w. Prodigy
15.11.2019/EH
130.09
115.88
71.82
57.10
38.48
37.82
31.08
25.90
130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 ppm

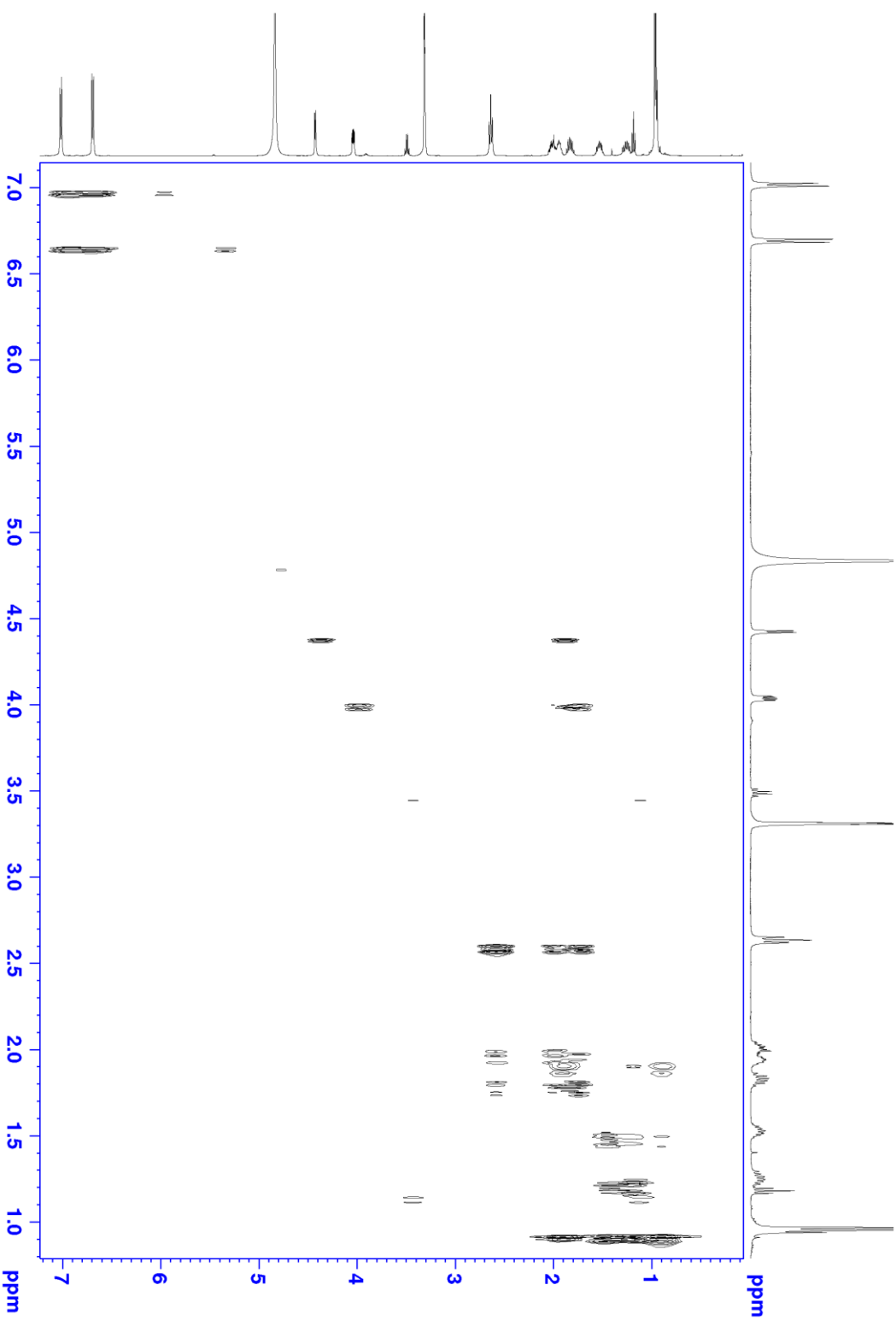
Liite 48


HO
O
OH
N
H
OH
O

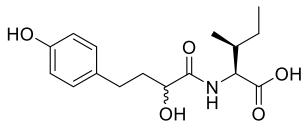

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
DEPT-135 w. Prodigy
15.11.2019/EH
130.08
115.87
71.82
57.09
38.48
37.82
31.07
25.91
15.71
11.55
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

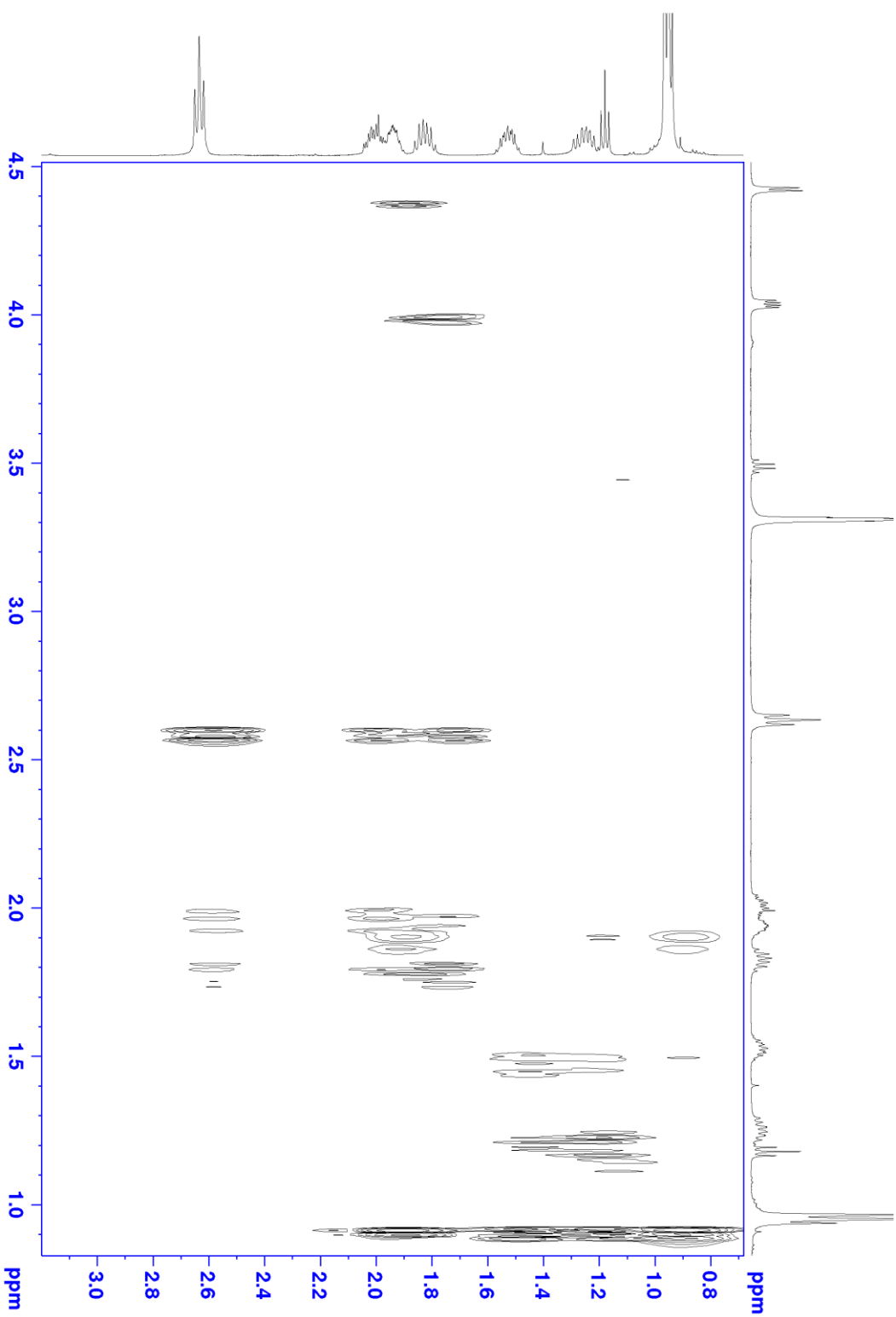
Liite 49


HO
O
N
H
OH
OH
O

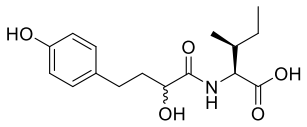

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
DQF-HH-COSY NMR at 500 MHz w. Prodigy
14.11.2019/EH
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
7
6
5
4
3
2
1

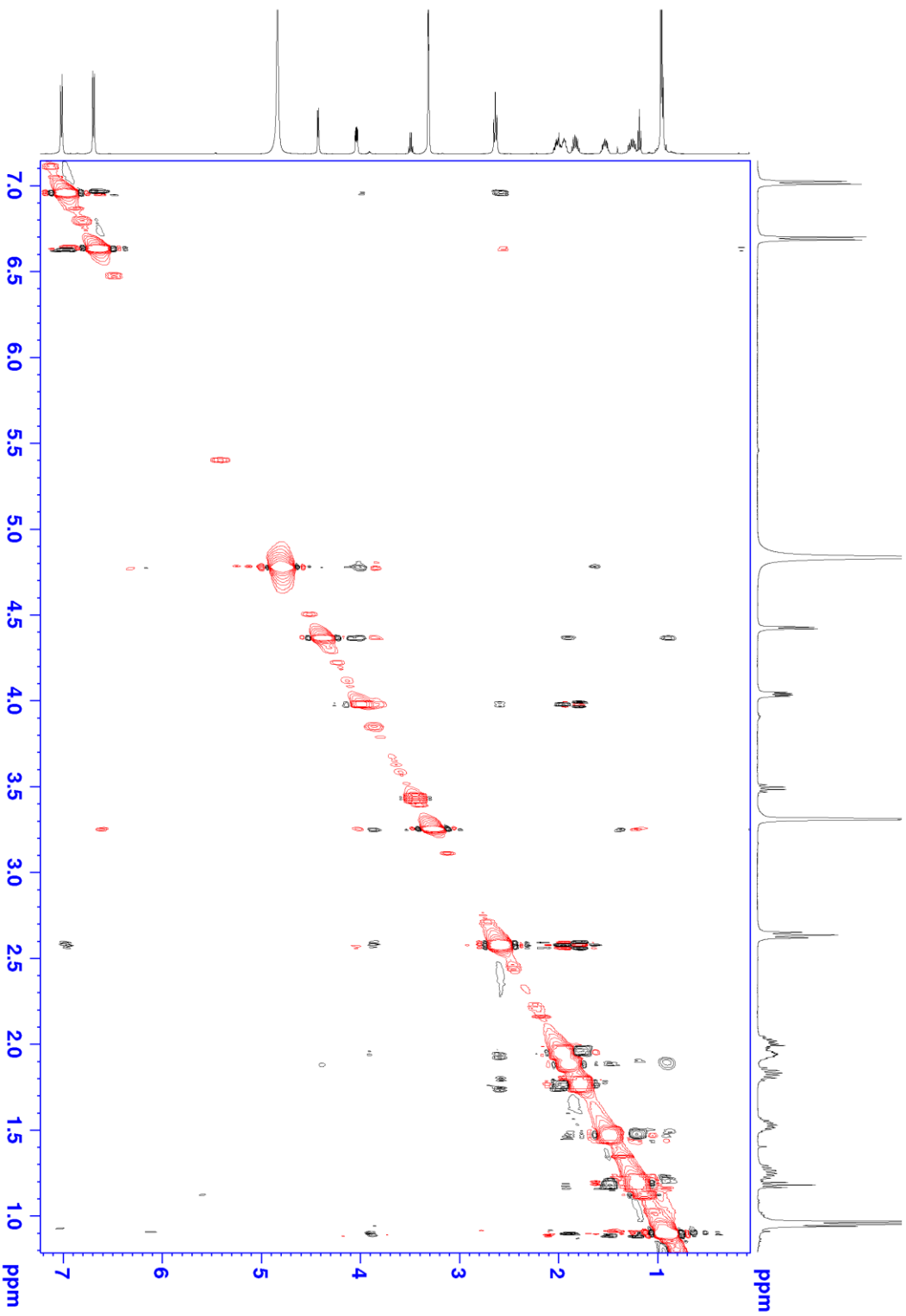
Liite 50


HO
O
OH
N
H
OH
O

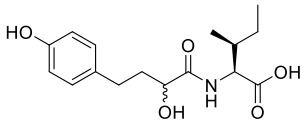

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
DQF-HH-COSY NMR at 500 MHz w. Prodigy
14.11.2019/EH
ppm
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
ppm
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5

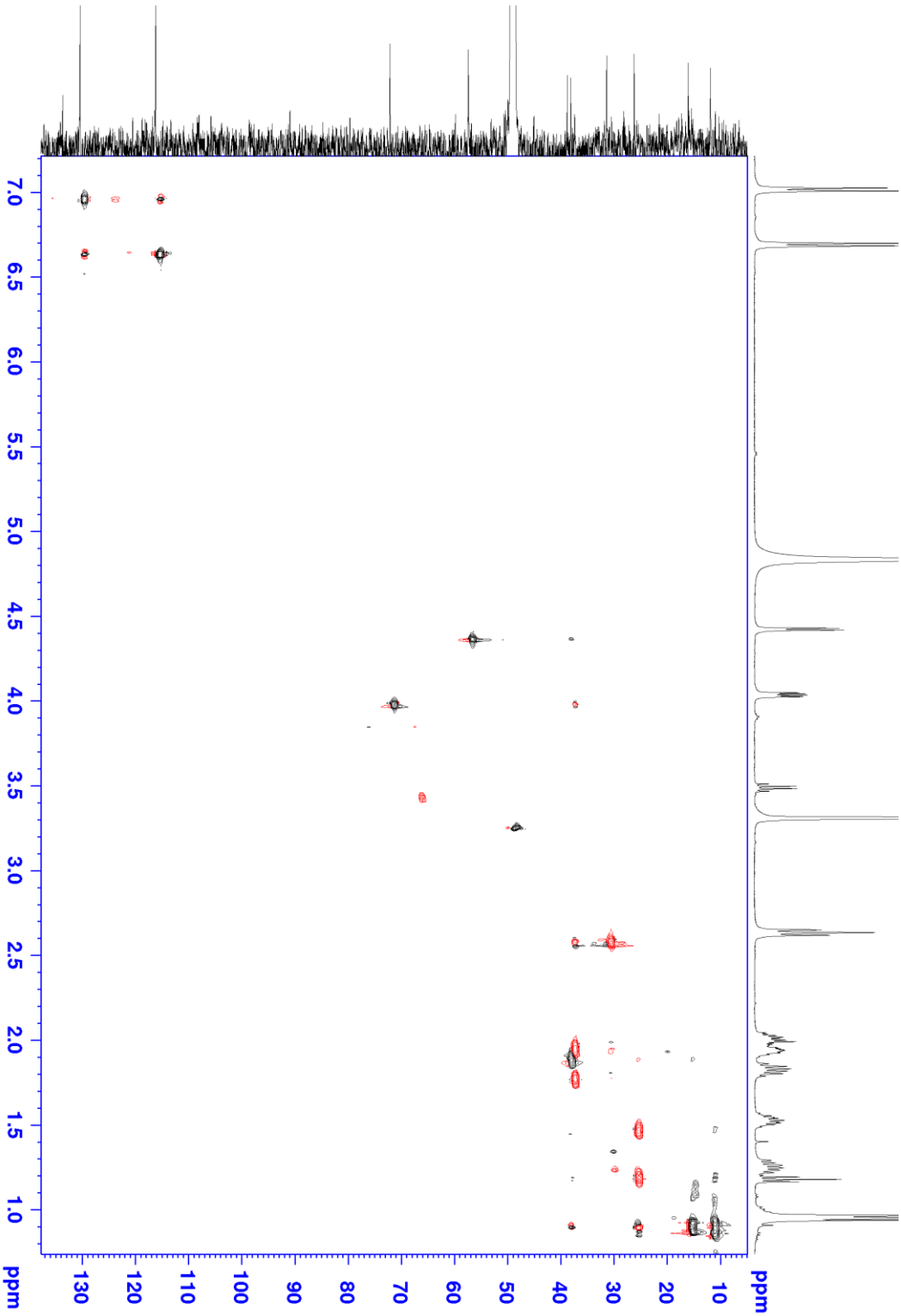
Liite 51


HO
O
OH
N
H
OH
O

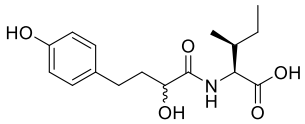

TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
HH-ROESY NMR at 500 MHz w. Prodigy
14.11.2019/EH
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
7
6
5
4
3
2
1

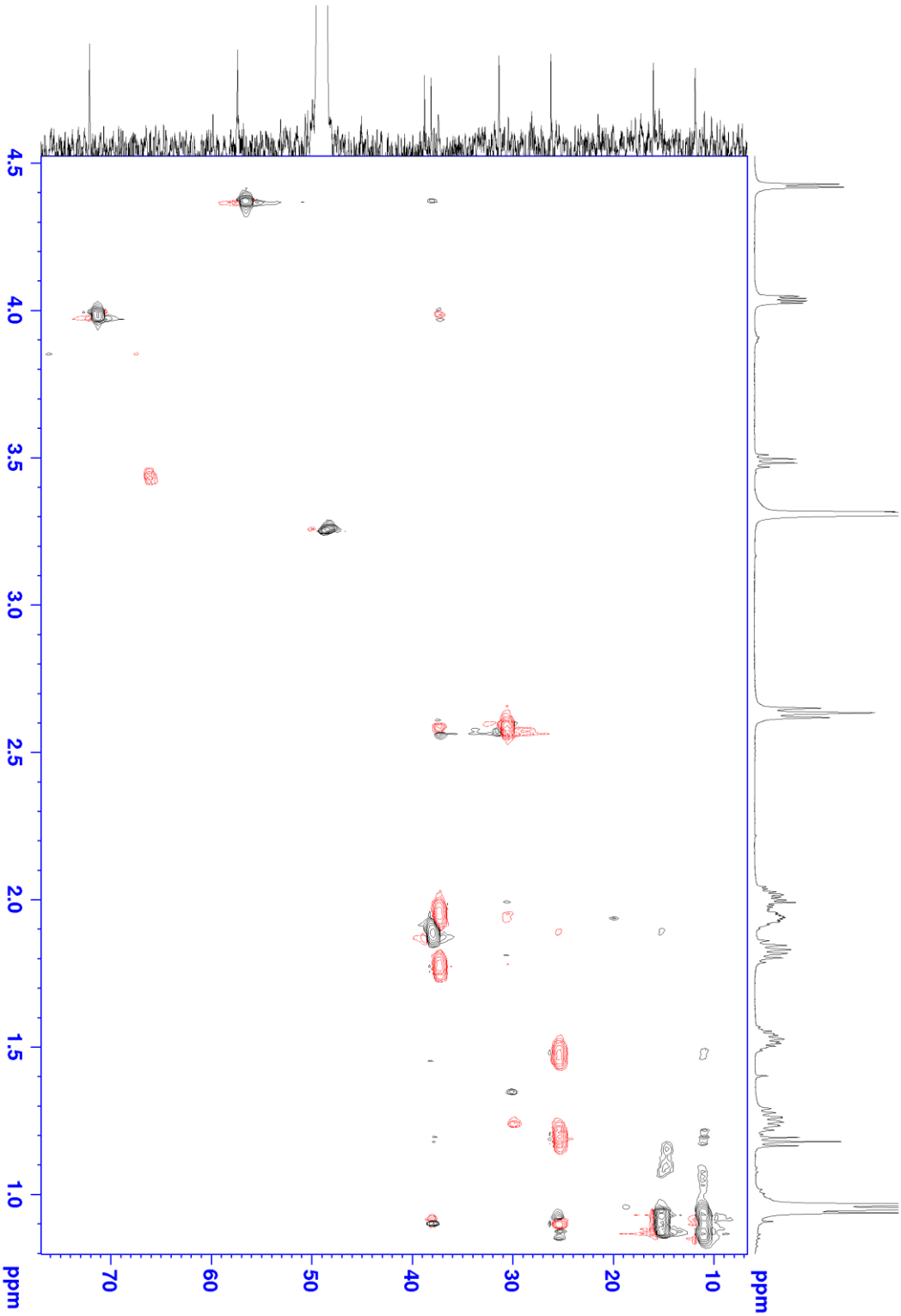
Liite 52


HO
O
N
H
OH
OH
O


TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
14.11.2019/EH
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10

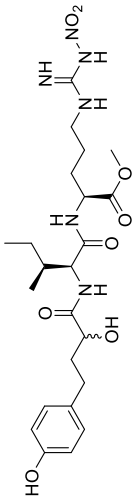
Liite 53

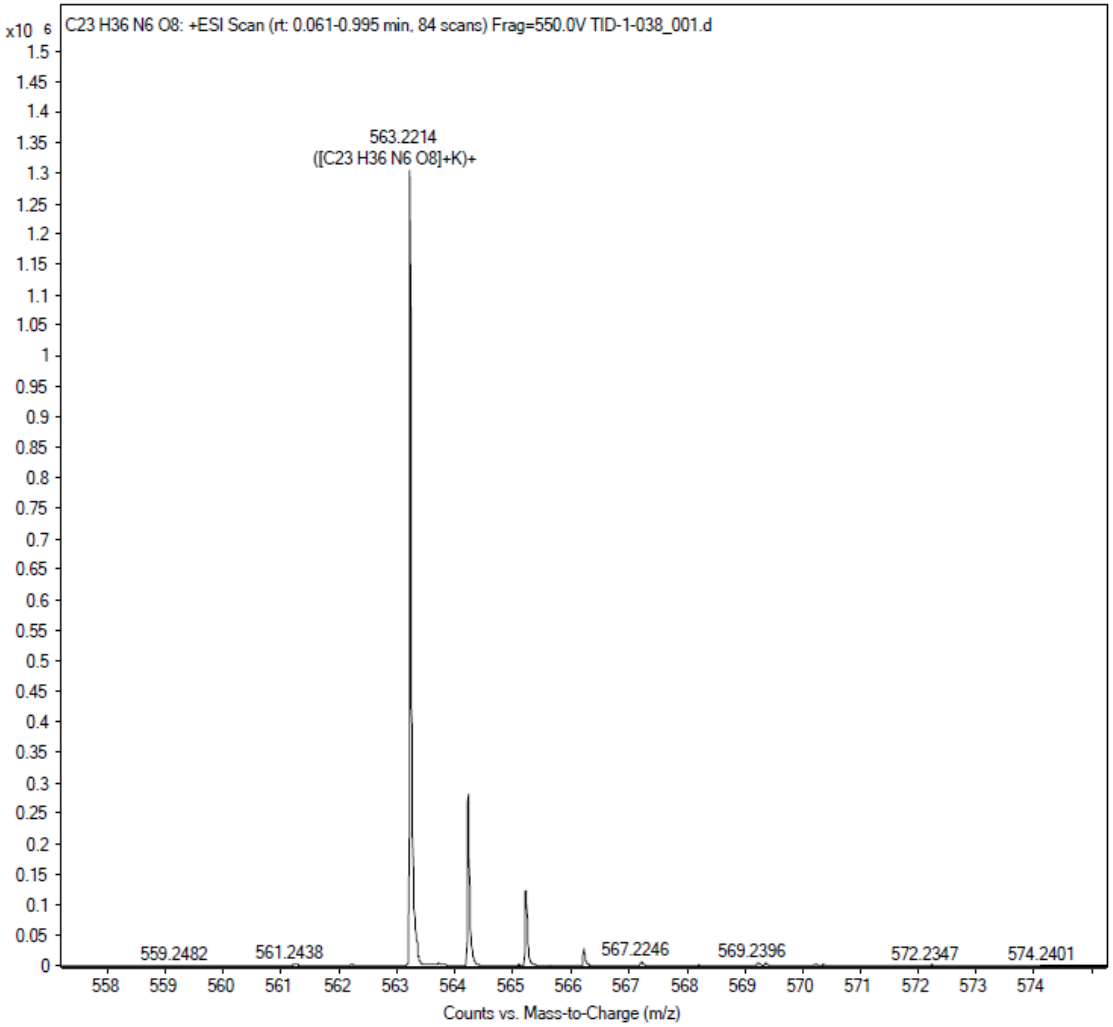

HO
O
N
H
OH
OH
O


TID-1-034 lower in CD3OD at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
14.11.2019/EH
ppm
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
70
60
50
40
30
20
10
ppm

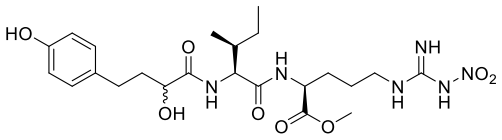
Liite 54

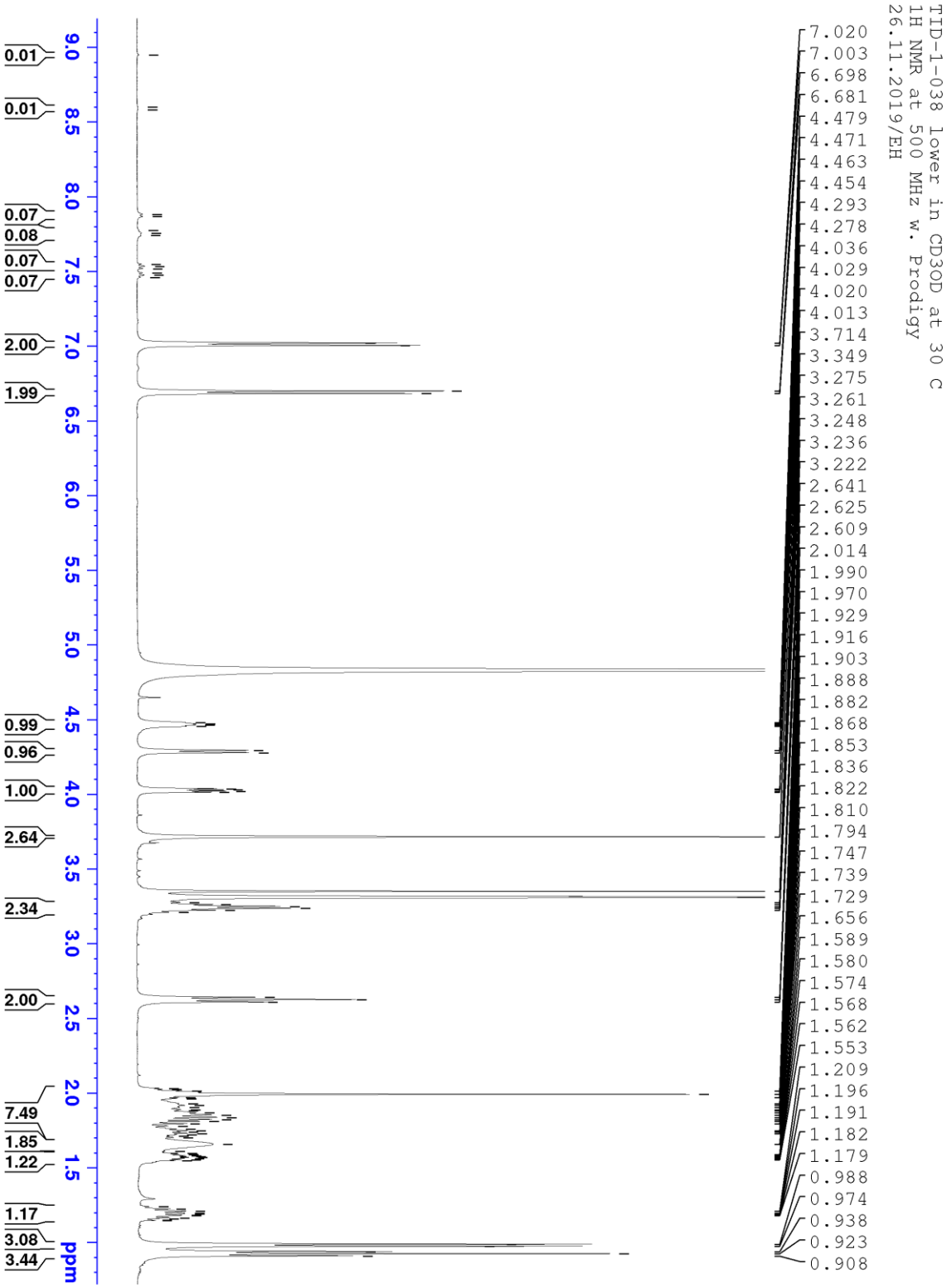
Sample Name	TID-1-038	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-038_001.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-038, 1uM in MeOH	**Acquired Time**	12/11/2019 12:45:52 PM (UTC+02:00)



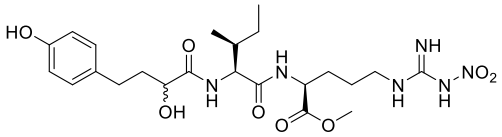


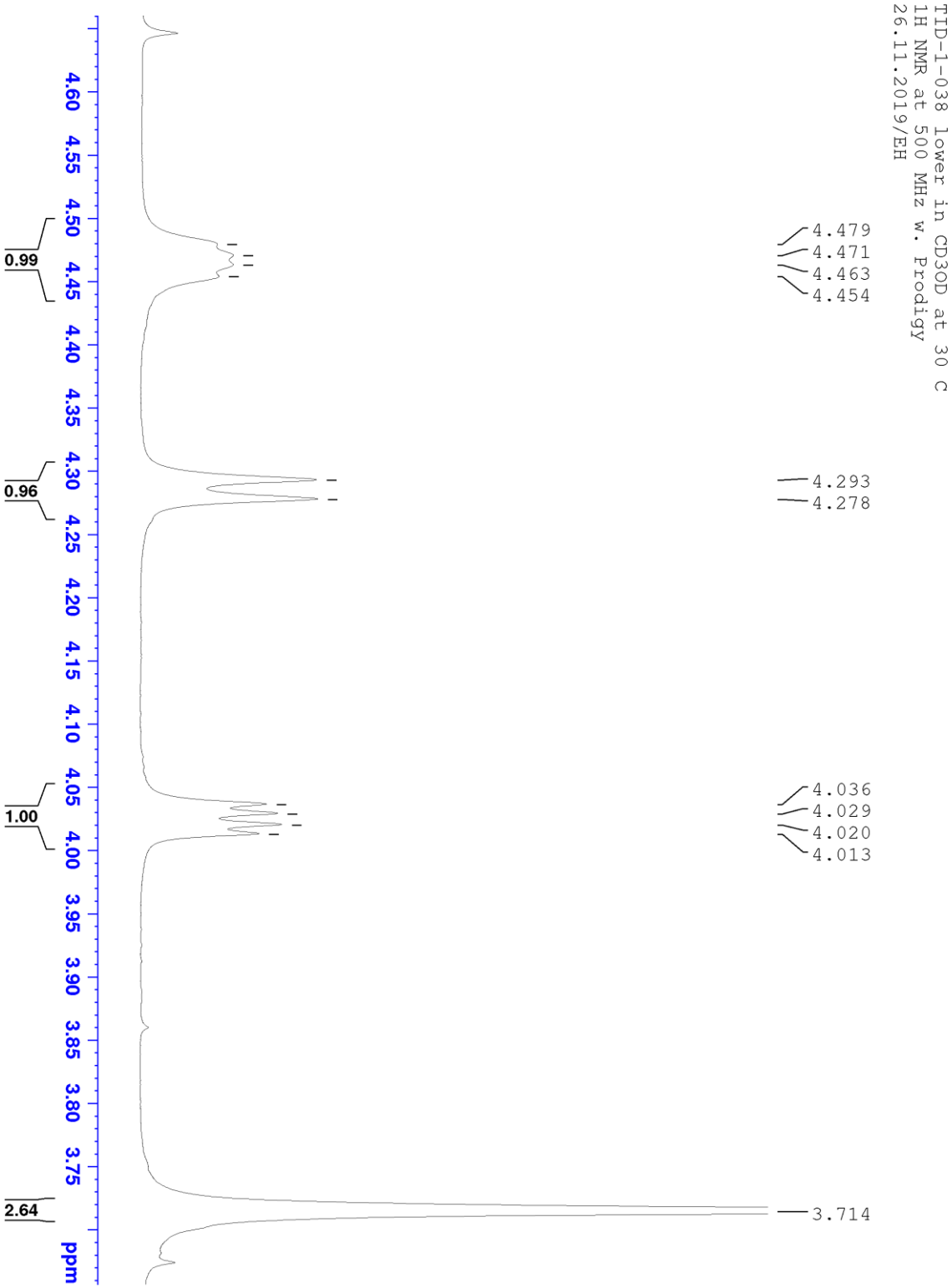
Liite 55


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
N
H
NH
N
H
NO2

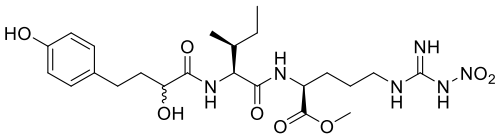

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
7.020
7.003
6.698
6.681
4.479
4.471
4.463
4.454
4.293
4.278
4.036
4.029
4.020
4.013
3.714
3.349
3.275
3.261
3.248
3.236
3.222
2.641
2.625
2.609
2.014
1.990
1.970
1.929
1.916
1.903
1.888
1.882
1.868
1.853
1.836
1.822
1.810
1.794
1.747
1.739
1.729
1.656
1.589
1.580
1.574
1.568
1.562
1.553
1.209
1.196
1.191
1.182
1.179
0.988
0.974
0.938
0.923
0.908
0.01
0.01
0.07
0.08
0.07
0.07
2.00
1.99
0.99
0.96
1.00
2.64
2.34
2.00
7.49
1.85
1.22
1.17
3.08
3.44
9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm

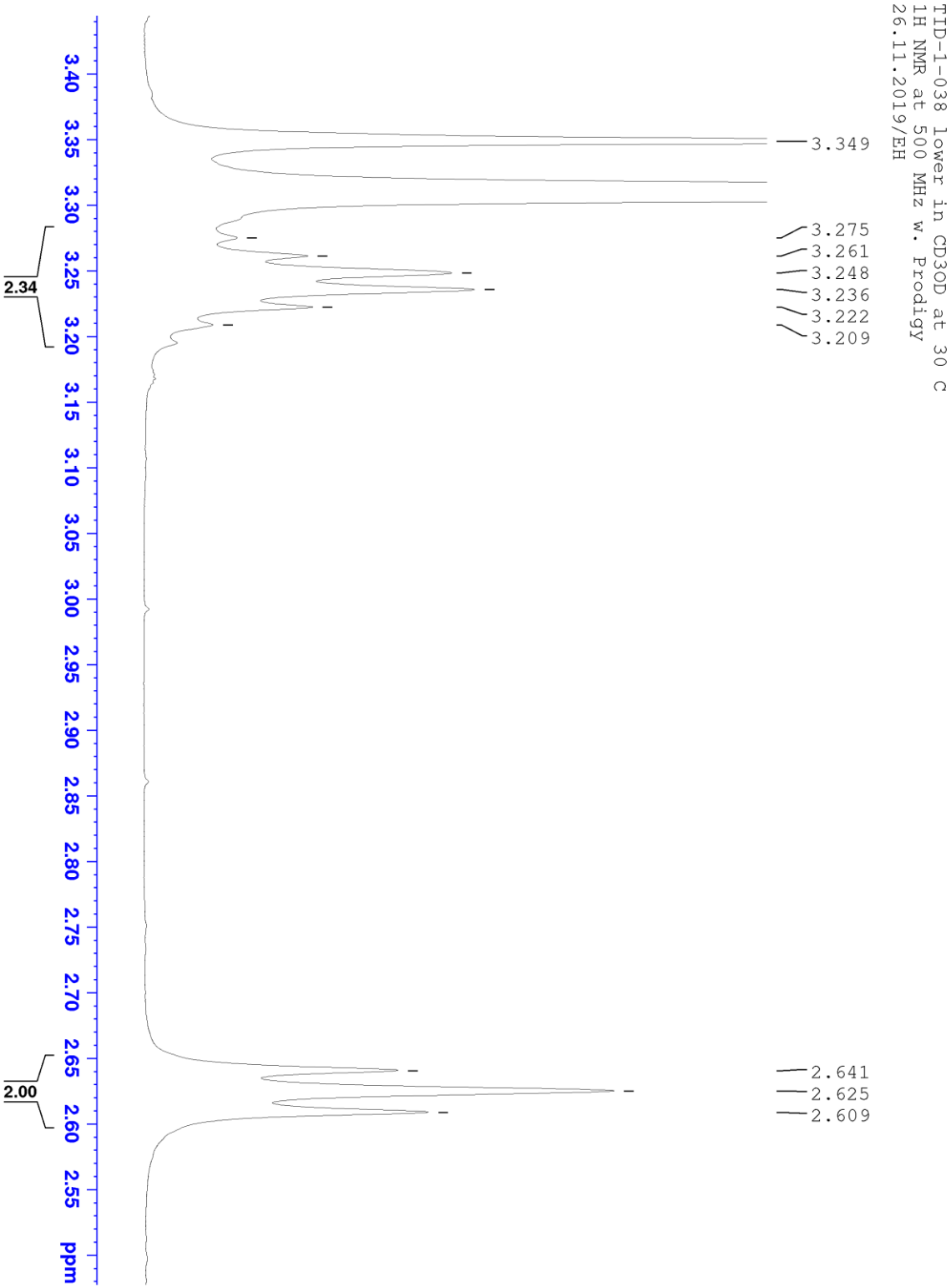
Liite 56


HO
OH
O
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

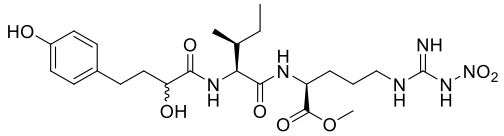

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
4.479
4.471
4.463
4.454
4.293
4.278
4.036
4.029
4.020
4.013
3.714
0.99
0.96
1.00
2.64
4.60
4.55
4.50
4.45
4.40
4.35
4.30
4.25
4.20
4.15
4.10
4.05
4.00
3.95
3.90
3.85
3.80
3.75
ppm

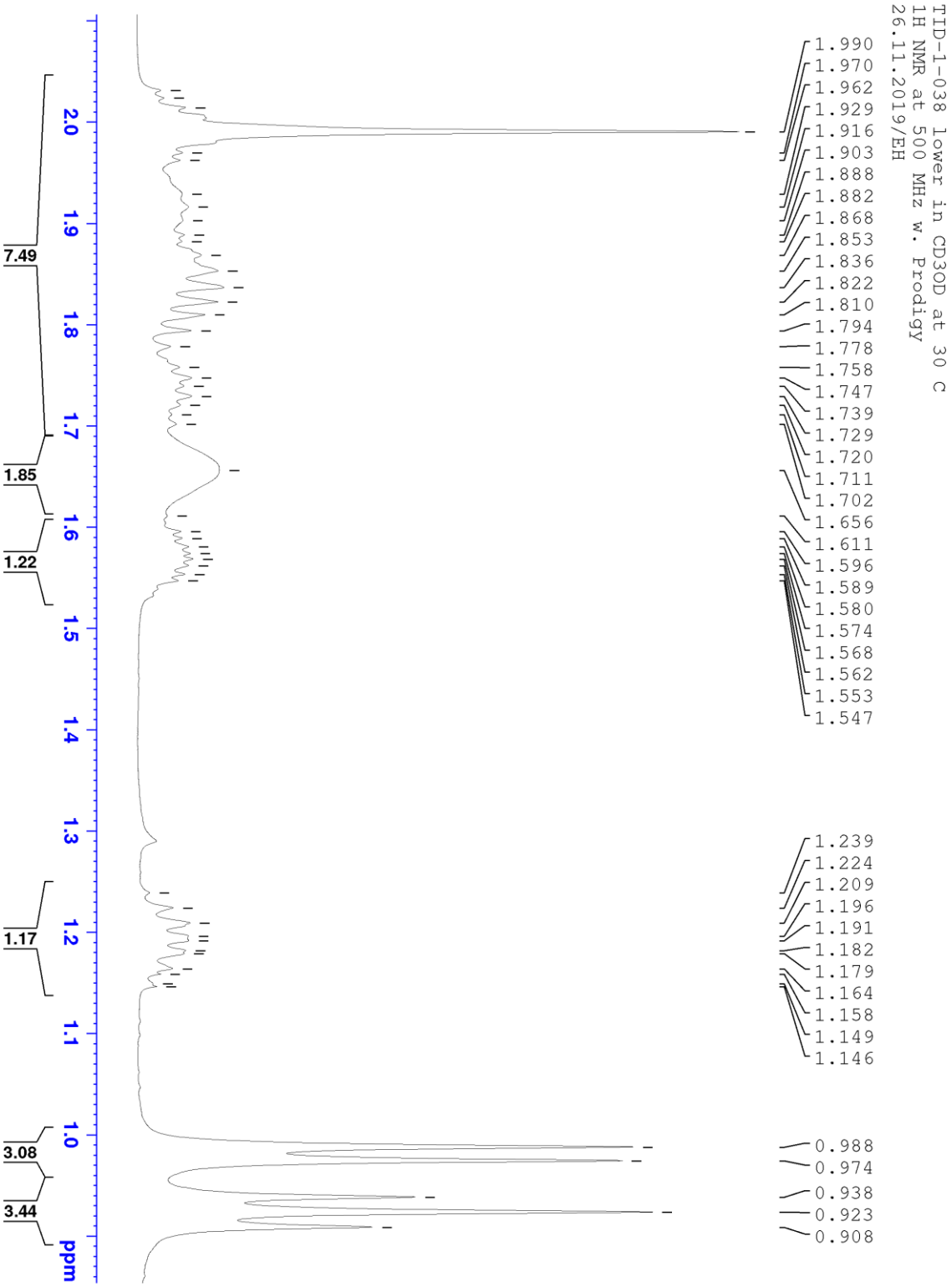
Liite 57


HO
OH
O
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

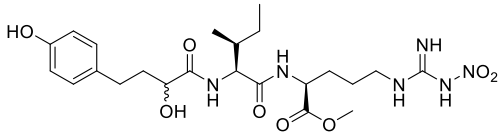

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
3.349
3.275
3.261
3.248
3.236
3.222
3.209
2.641
2.625
2.609
2.34
2.00
3.40
3.35
3.30
3.25
3.20
3.15
3.10
3.05
3.00
2.95
2.90
2.85
2.80
2.75
2.70
2.65
2.60
2.55
ppm

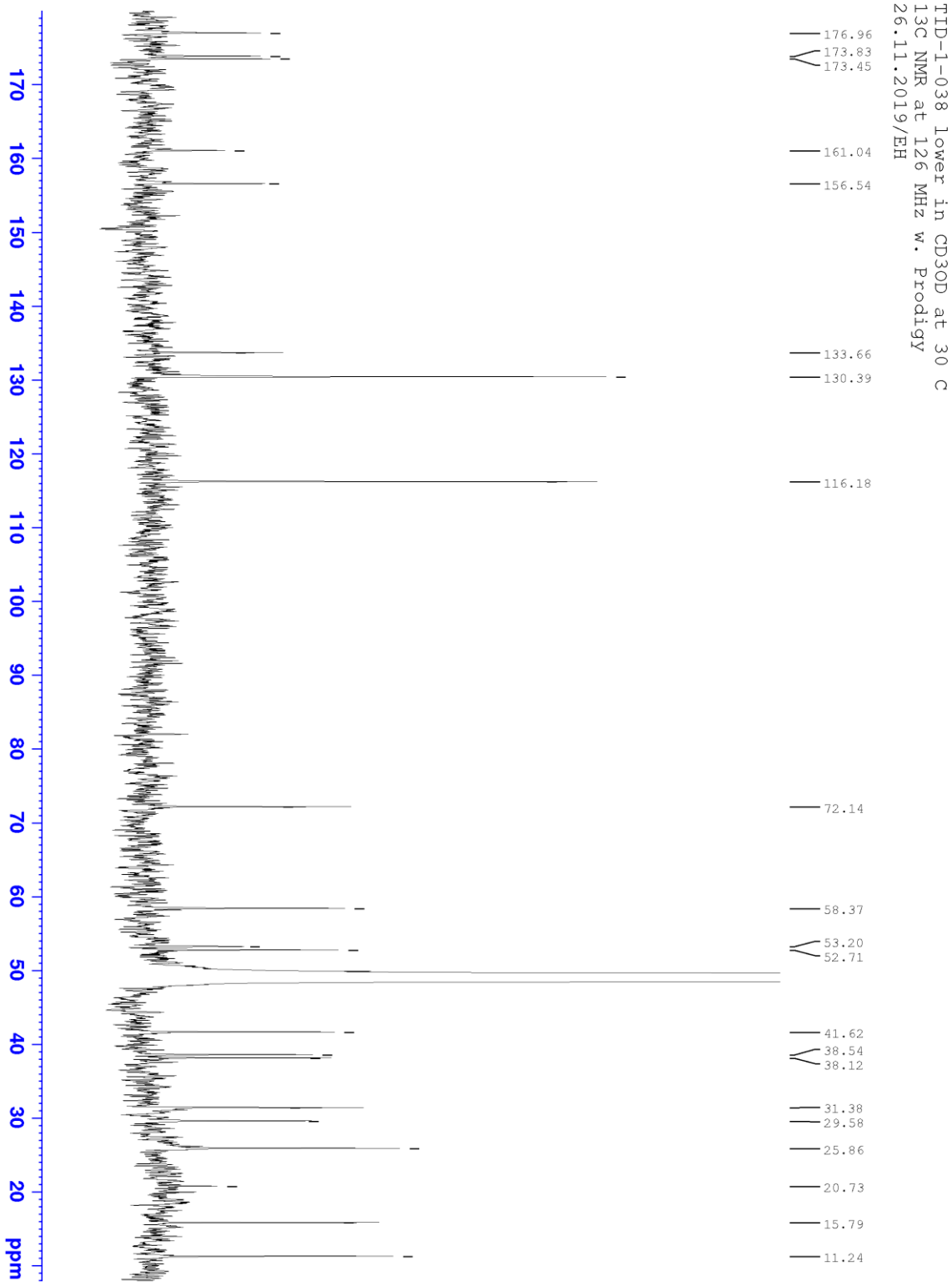
Liite 58


HO
O
OH
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

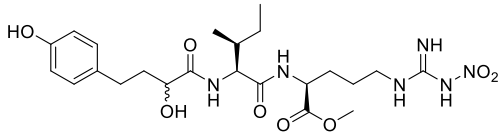

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
1.990
1.970
1.962
1.929
1.916
1.903
1.888
1.882
1.868
1.853
1.836
1.822
1.810
1.794
1.778
1.758
1.747
1.739
1.729
1.720
1.711
1.702
1.656
1.611
1.596
1.589
1.580
1.574
1.568
1.562
1.553
1.547
1.239
1.224
1.209
1.196
1.191
1.182
1.179
1.164
1.158
1.149
1.146
0.988
0.974
0.938
0.923
0.908
7.49
1.85
1.22
1.17
3.08
3.44
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
ppm

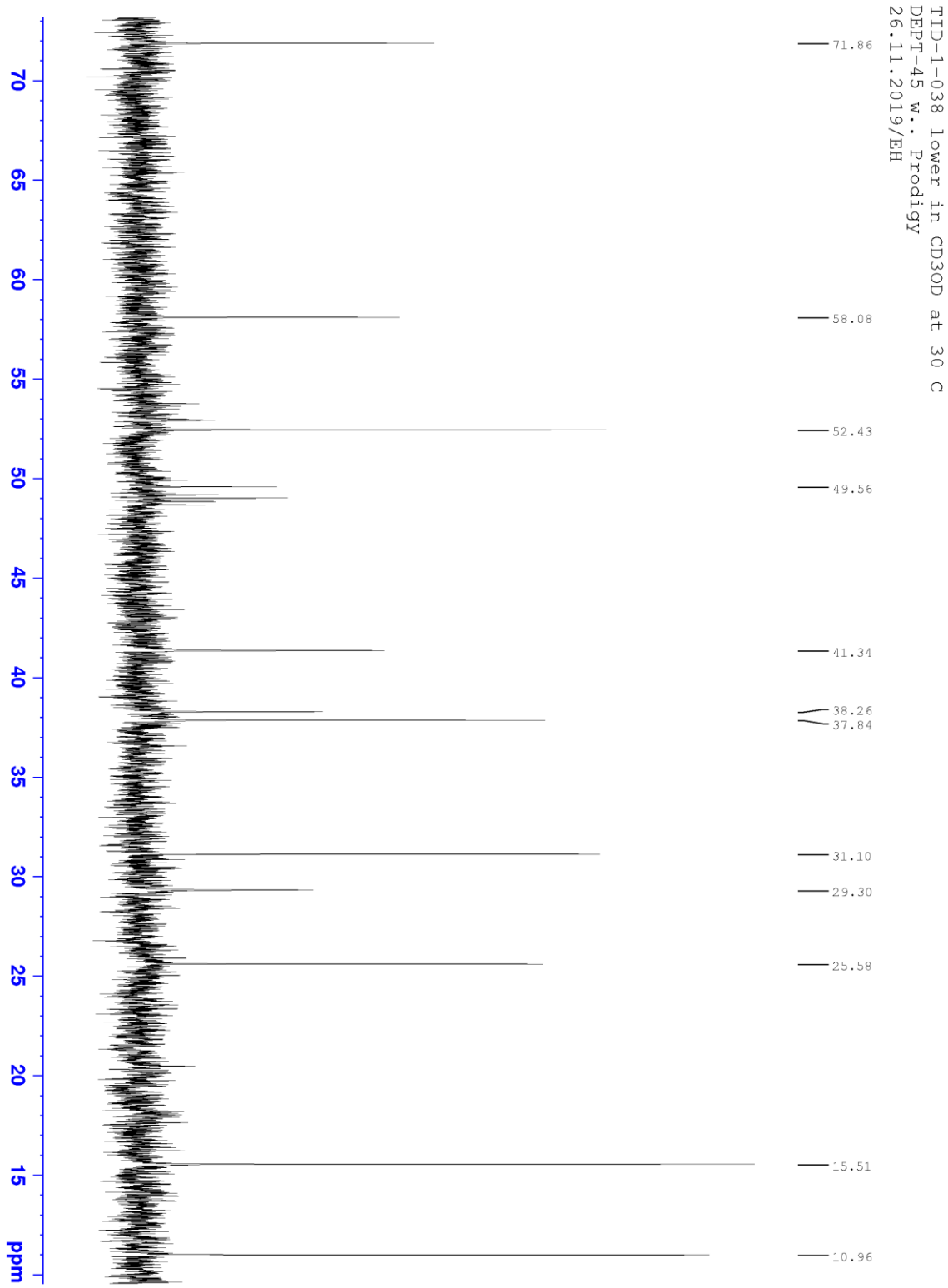
Liite 59

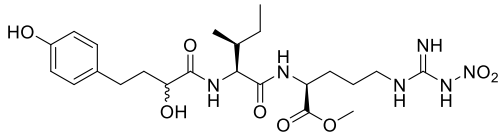

HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2


TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
13C NMR at 126 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
176.96
173.83
173.45
161.04
156.54
133.66
130.39
116.18
72.14
58.37
53.20
52.71
41.62
38.54
38.12
31.38
29.58
25.86
20.73
15.79
11.24
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

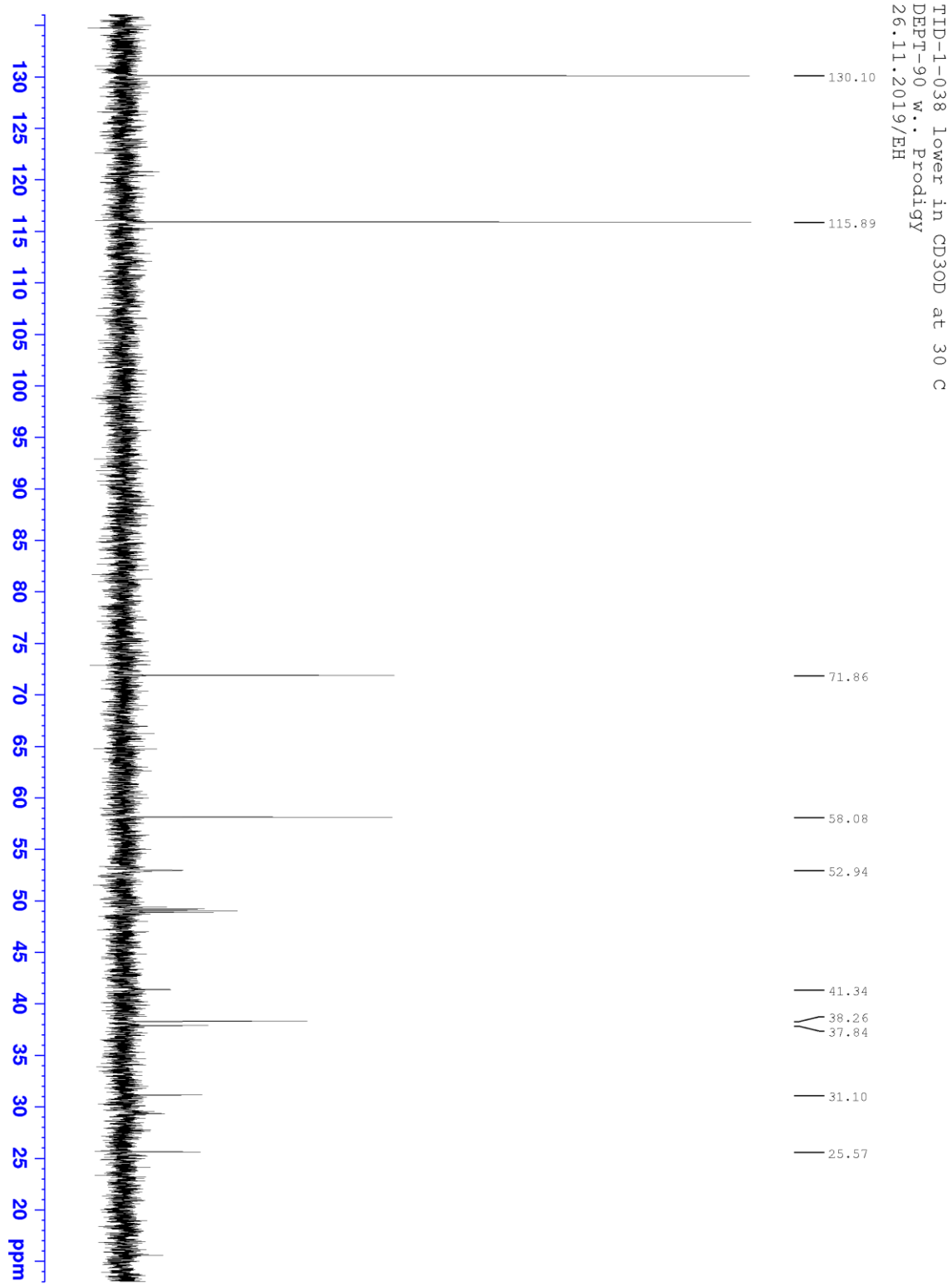
Liite 60


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
N
H
NH
N
H
NO2

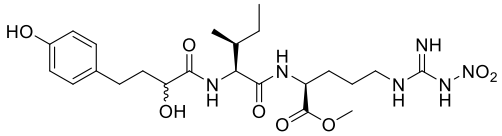

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
DEPT-45 w. Prodigy
26.11.2019/EH
71.86
58.08
52.43
49.56
41.34
38.26
37.84
31.10
29.30
25.58
15.51
10.96
70
65
60
55
50
45
40
35
30
25
20
15
ppm

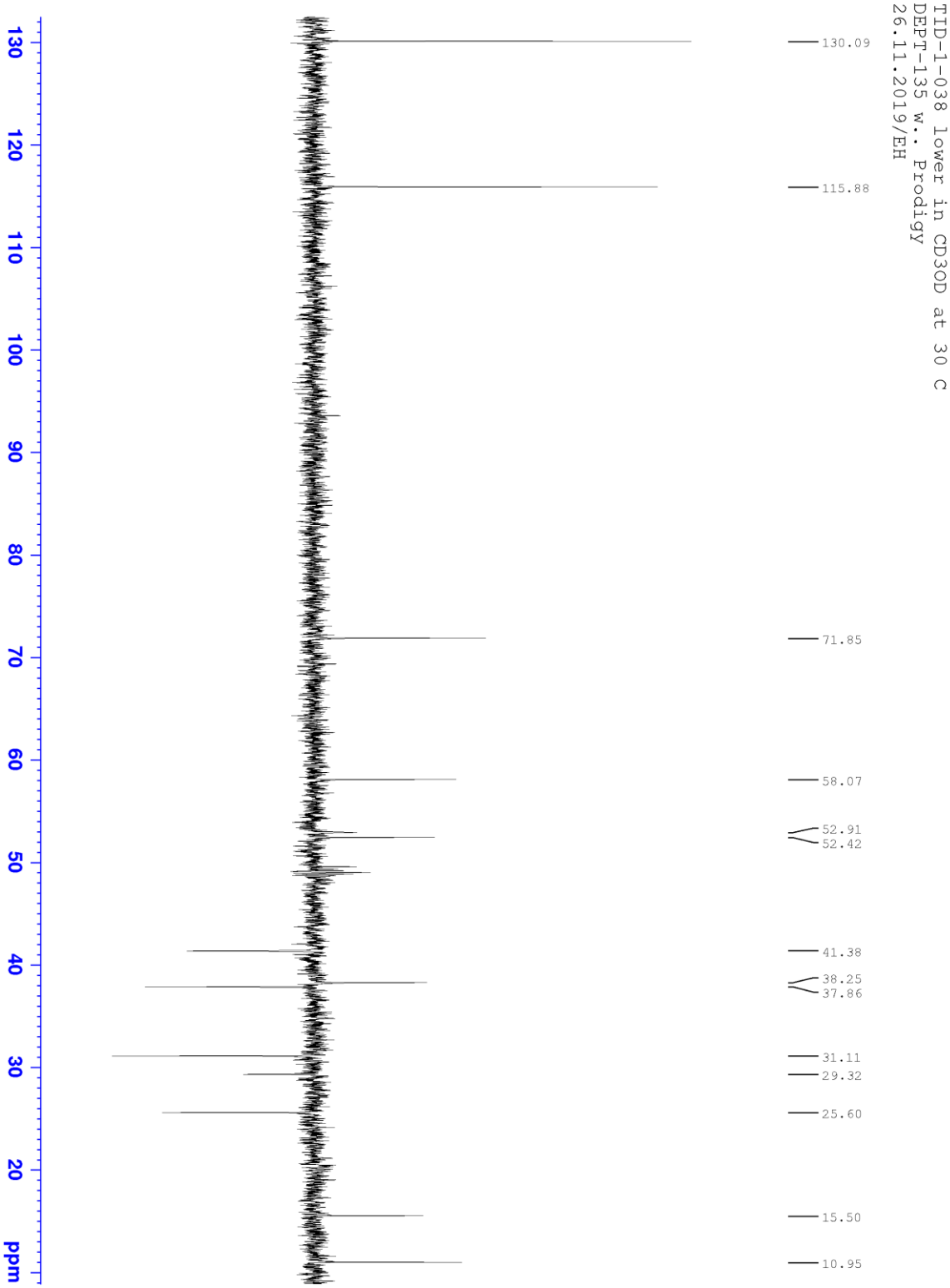

HO
OH
O
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

Liite 61

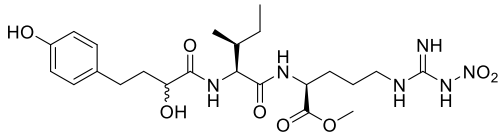

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
DEPT-90 w.. Prodigy
26.11.2019/EH
130.10
115.89
71.86
58.08
52.94
41.34
38.26
37.84
31.10
25.57
130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 ppm

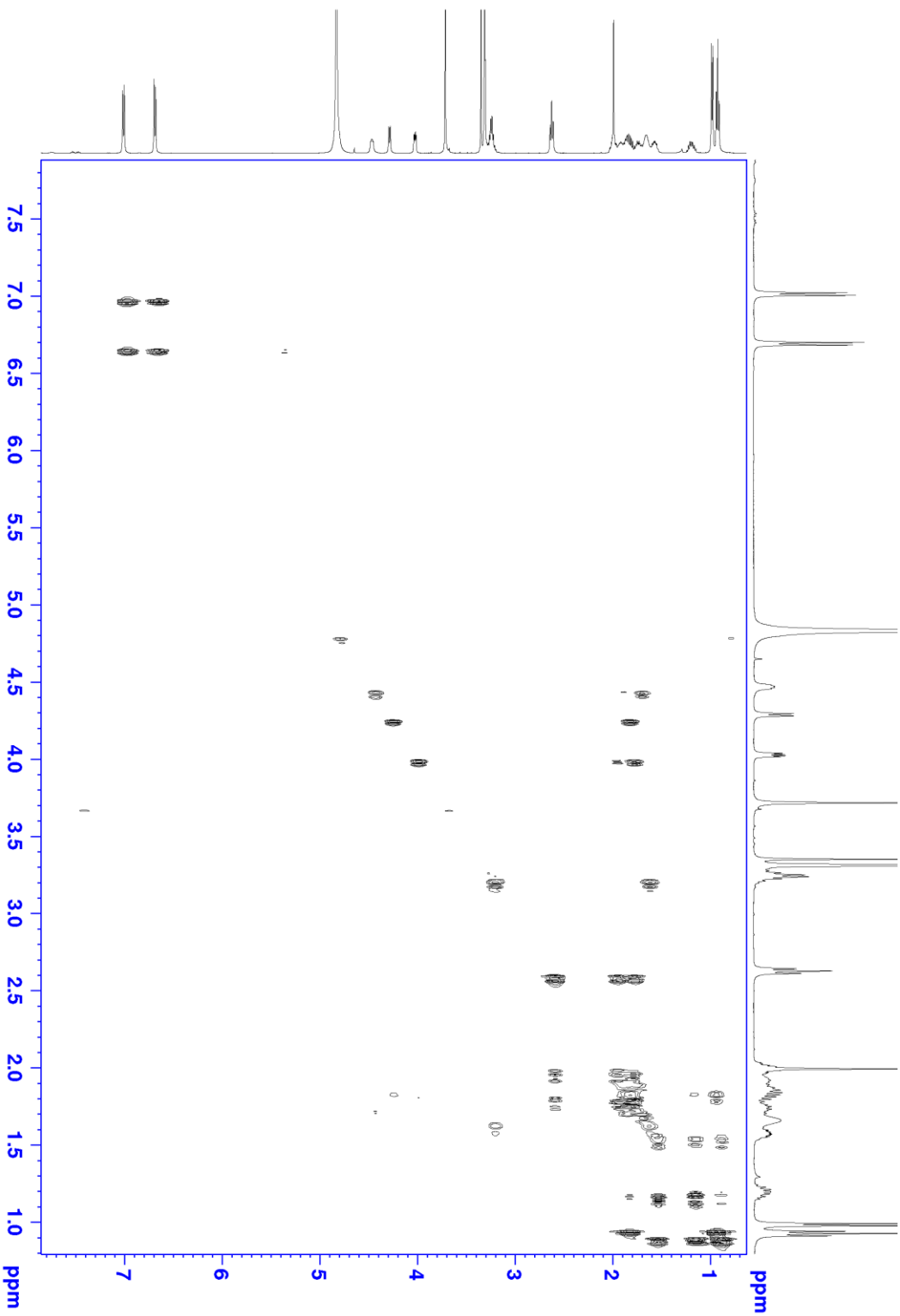
Liite 62


HO
O
OH
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

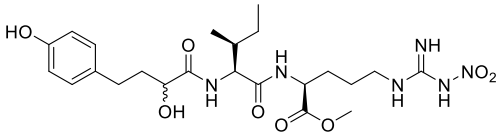

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
DEPT-135 w.. Prodigy
26.11.2019/EH
130.09
115.88
71.85
58.07
52.91
52.42
41.38
38.25
37.86
31.11
29.32
25.60
15.50
10.95
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

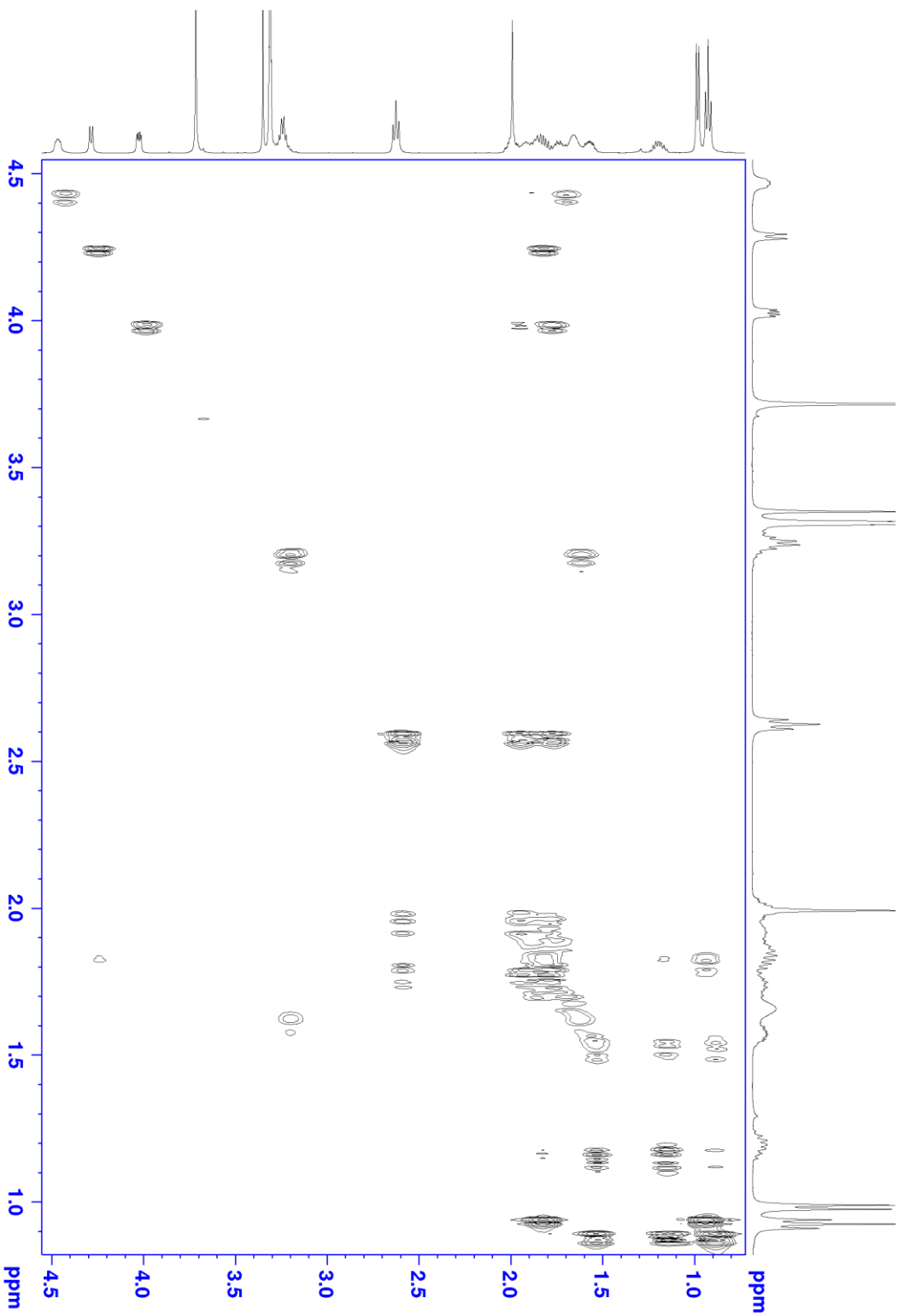
Liite 63


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
N
H
NH
N
H
NO2

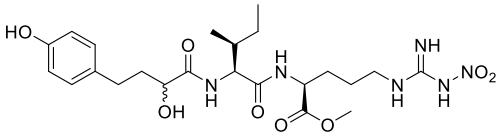

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
7
6
5
4
3
2
1

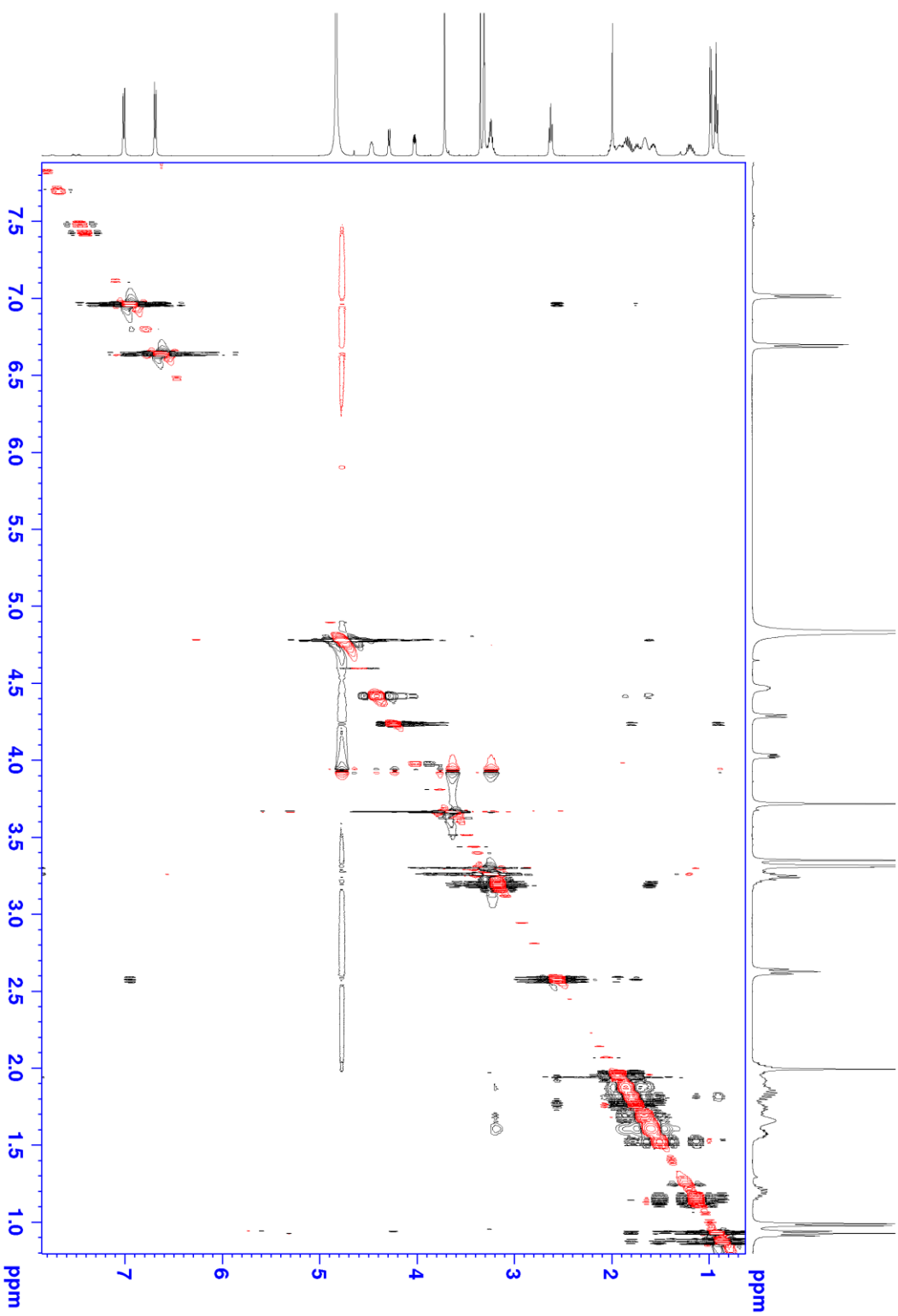
Liite 64


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

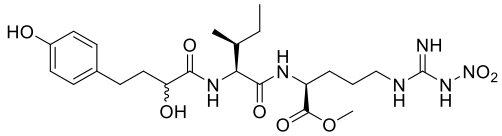

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0

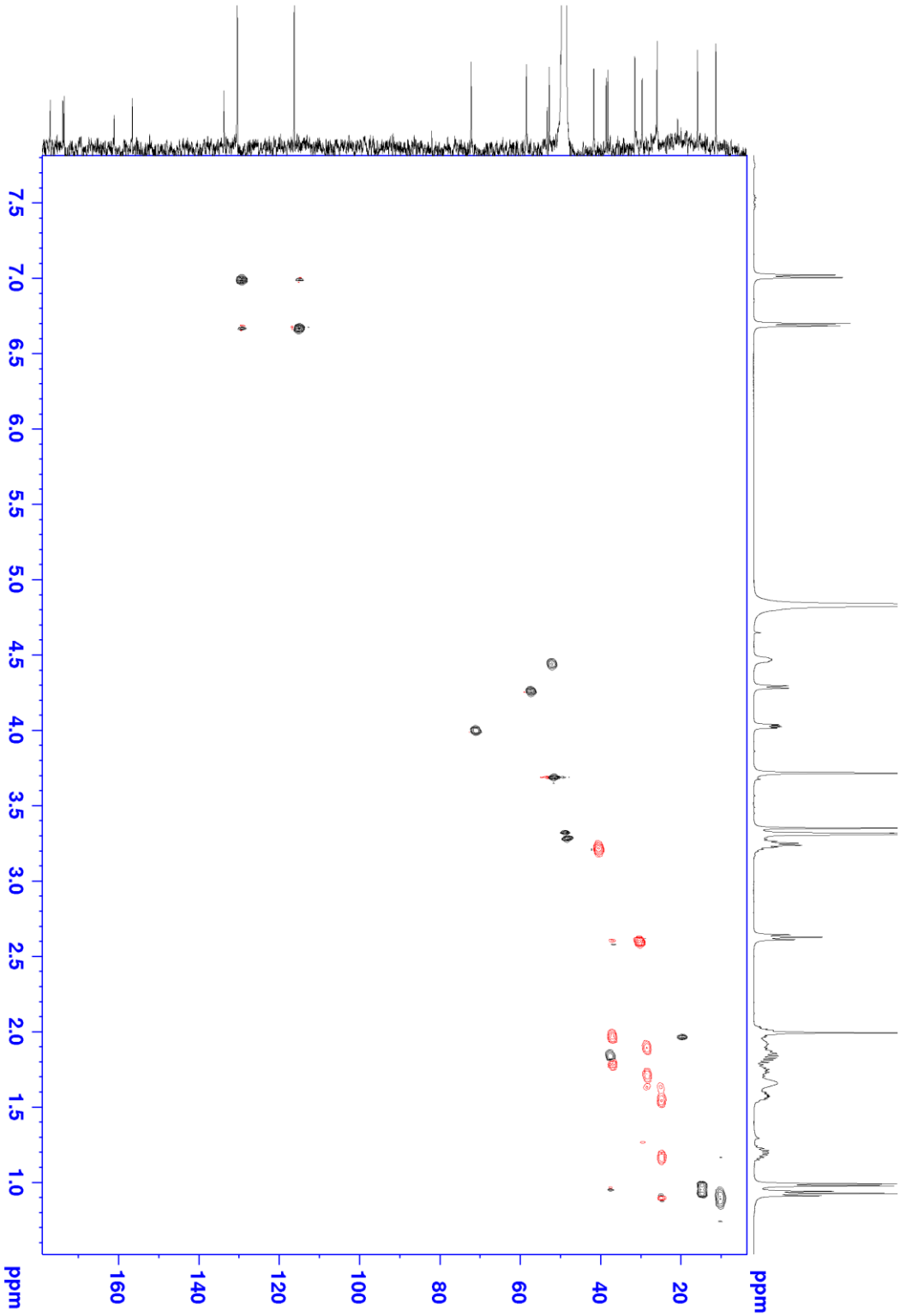
Liite 65


HO
O
OH
N
H
O
H
N
O
NH
N
H
N
H
NO2
O
O

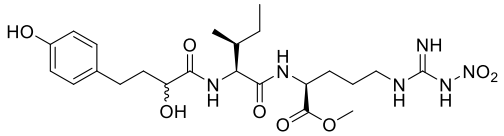

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HH-NOESY at 500 MHz w. Prodigy
Mixing time 0.6 s
26.11.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
7
6
5
4
3
2
1

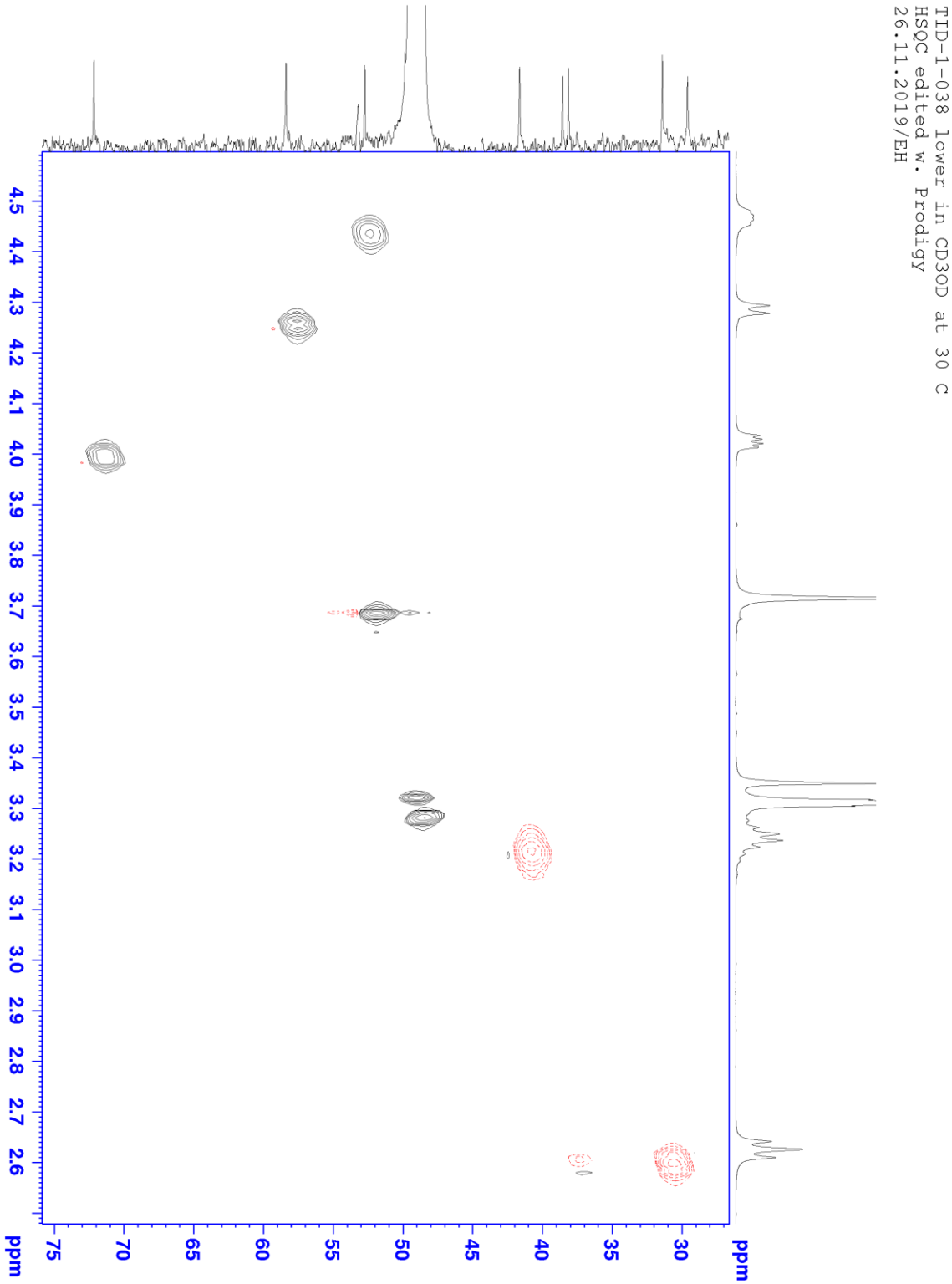
Liite 66


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

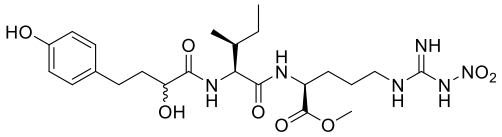

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm

Liite 67

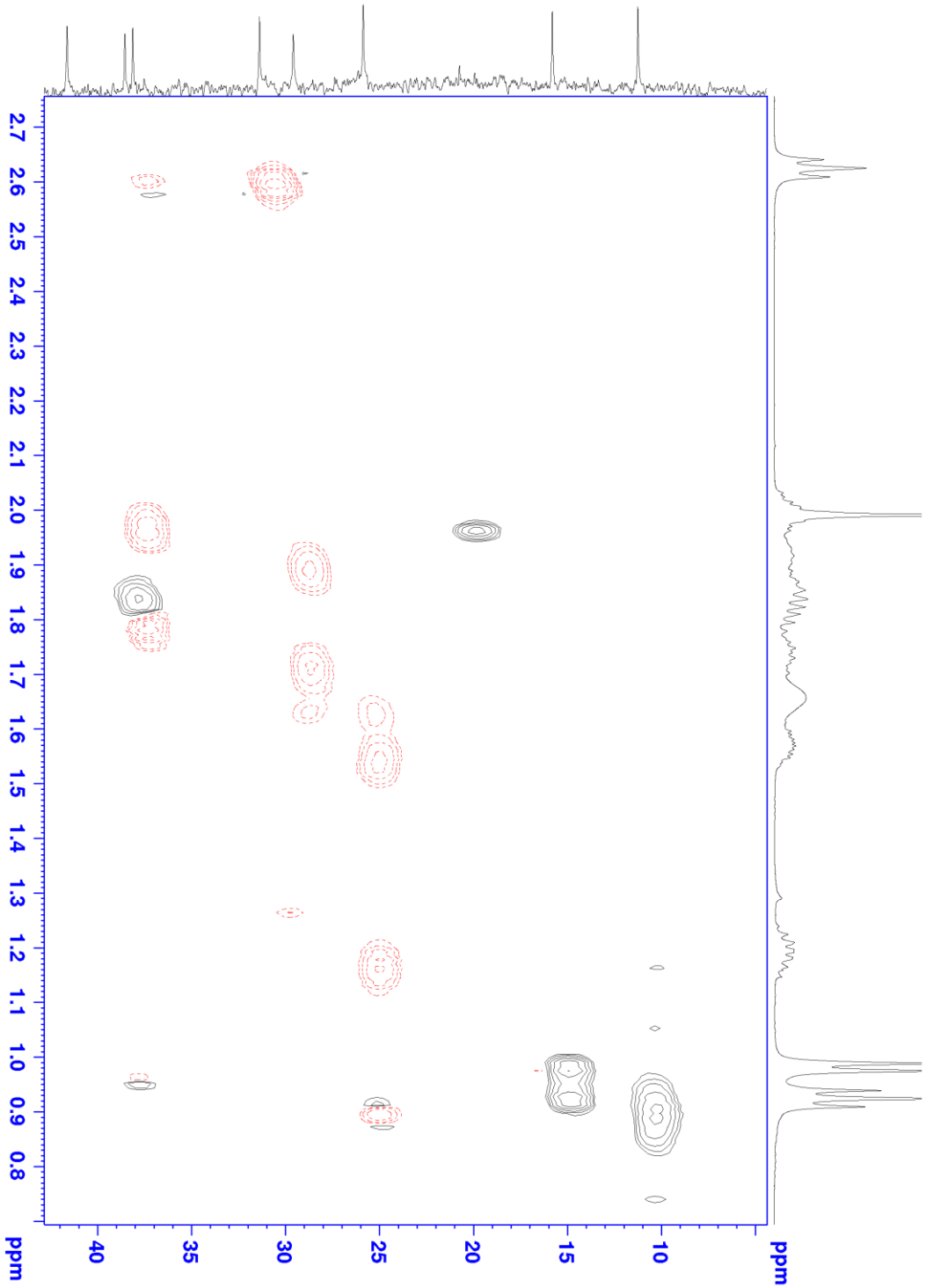

HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2


TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
75
70
65
60
55
50
45
40
35
30
ppm
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6

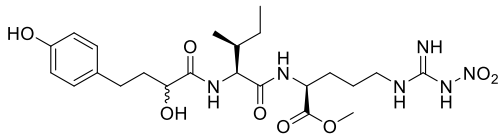
Liite 68

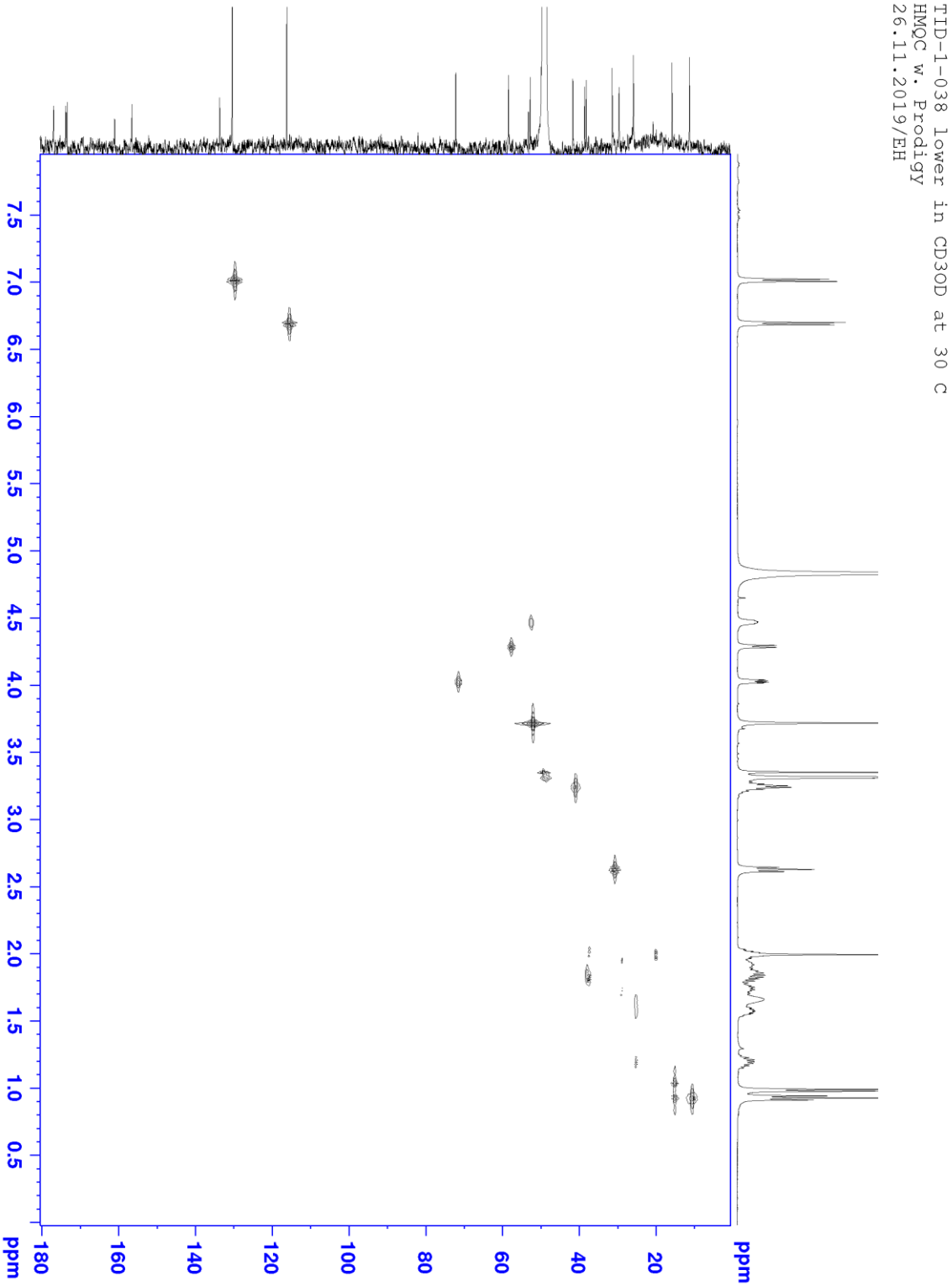


TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
26.11.2019/EH

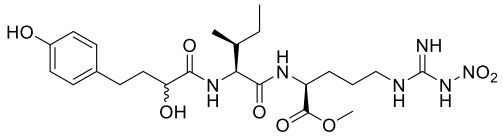


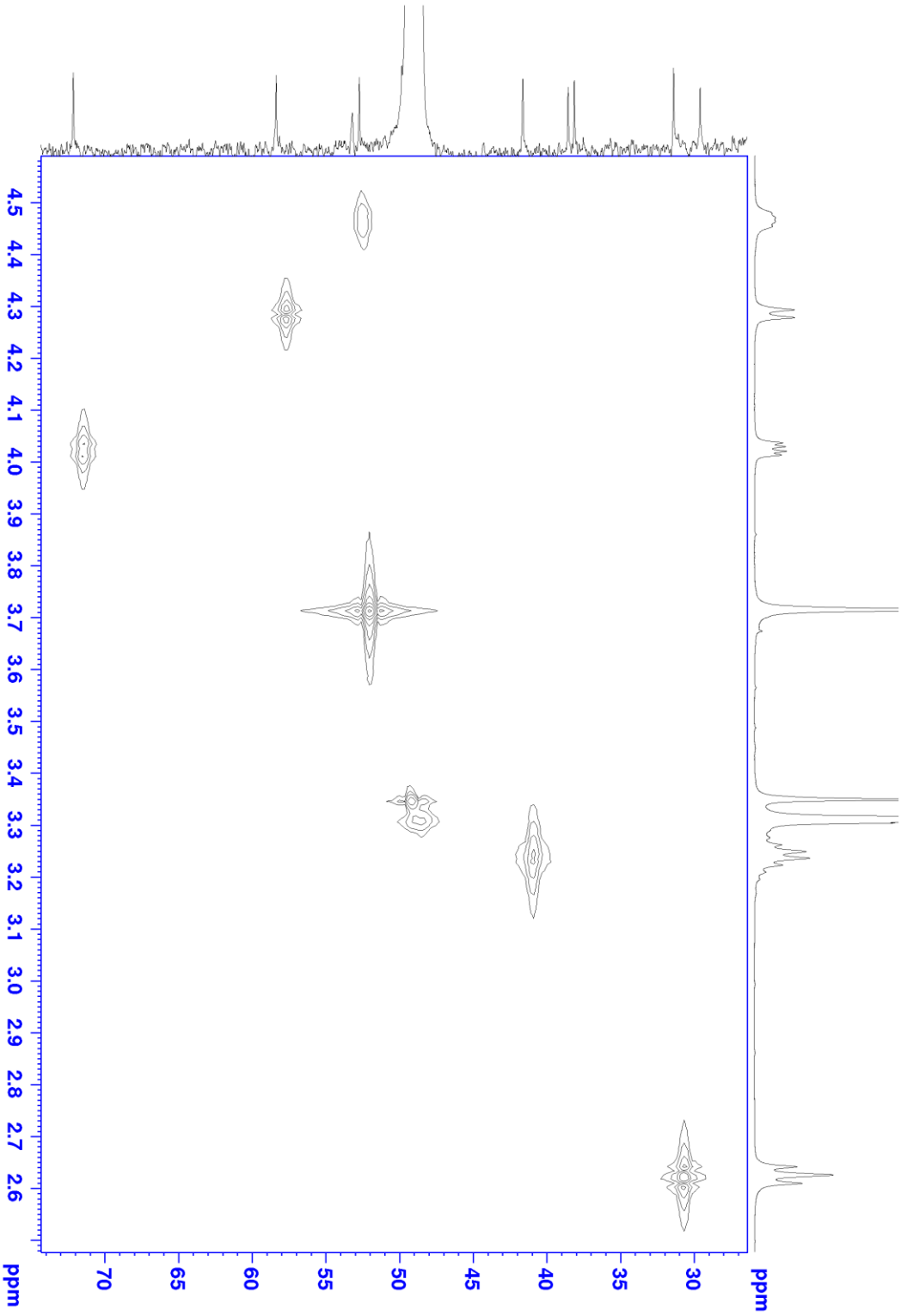
Liite 69


HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
N
H
NH
N
H
NO2

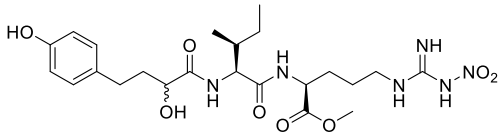

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HMQC w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5

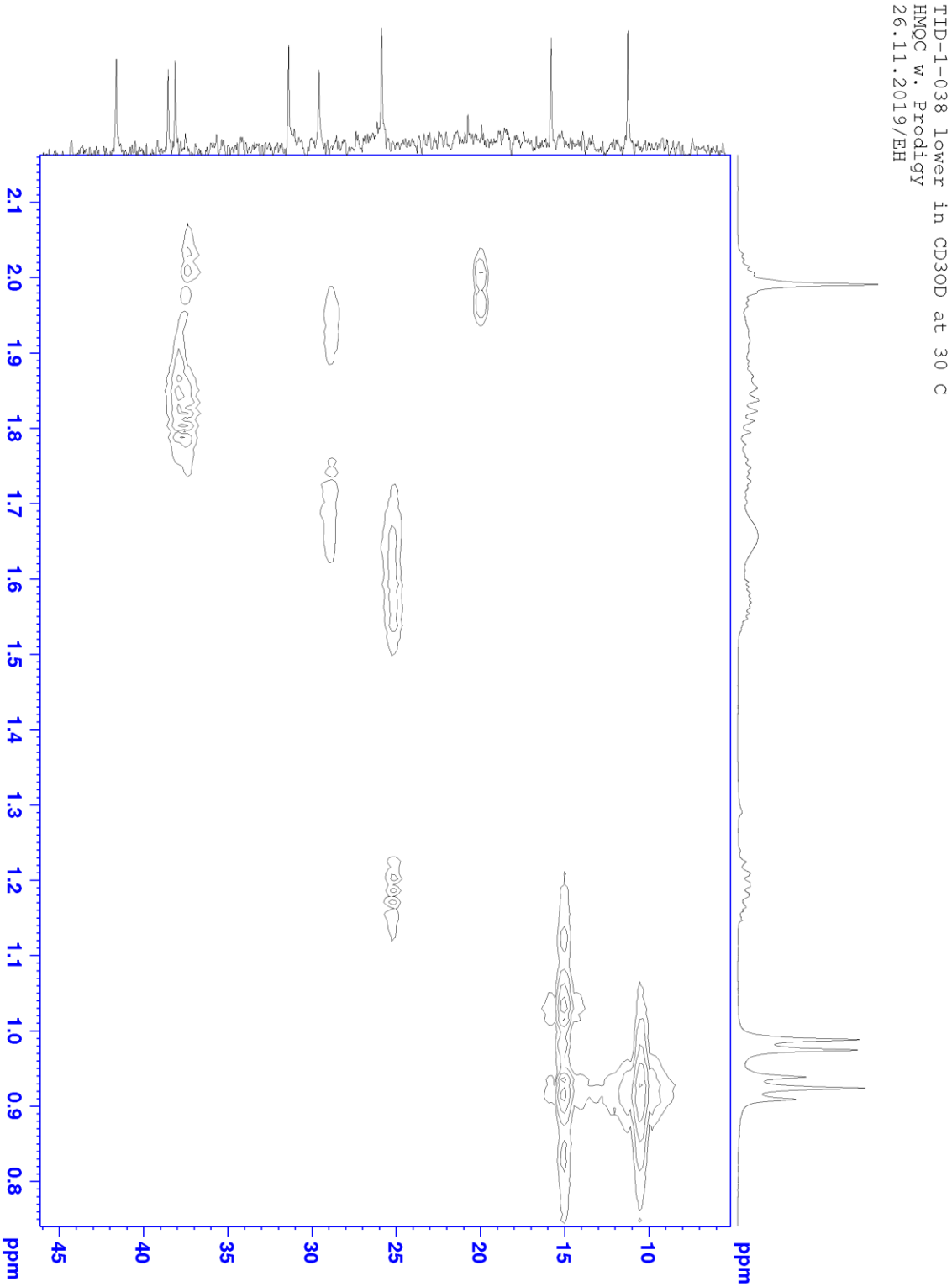
Liite 70


HO
O
OH
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2

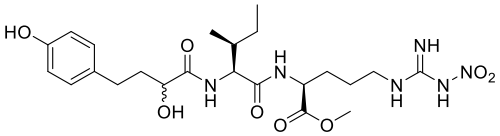

TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HMQC w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
70
65
60
55
50
45
40
35
30
ppm
4.5
4.4
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6

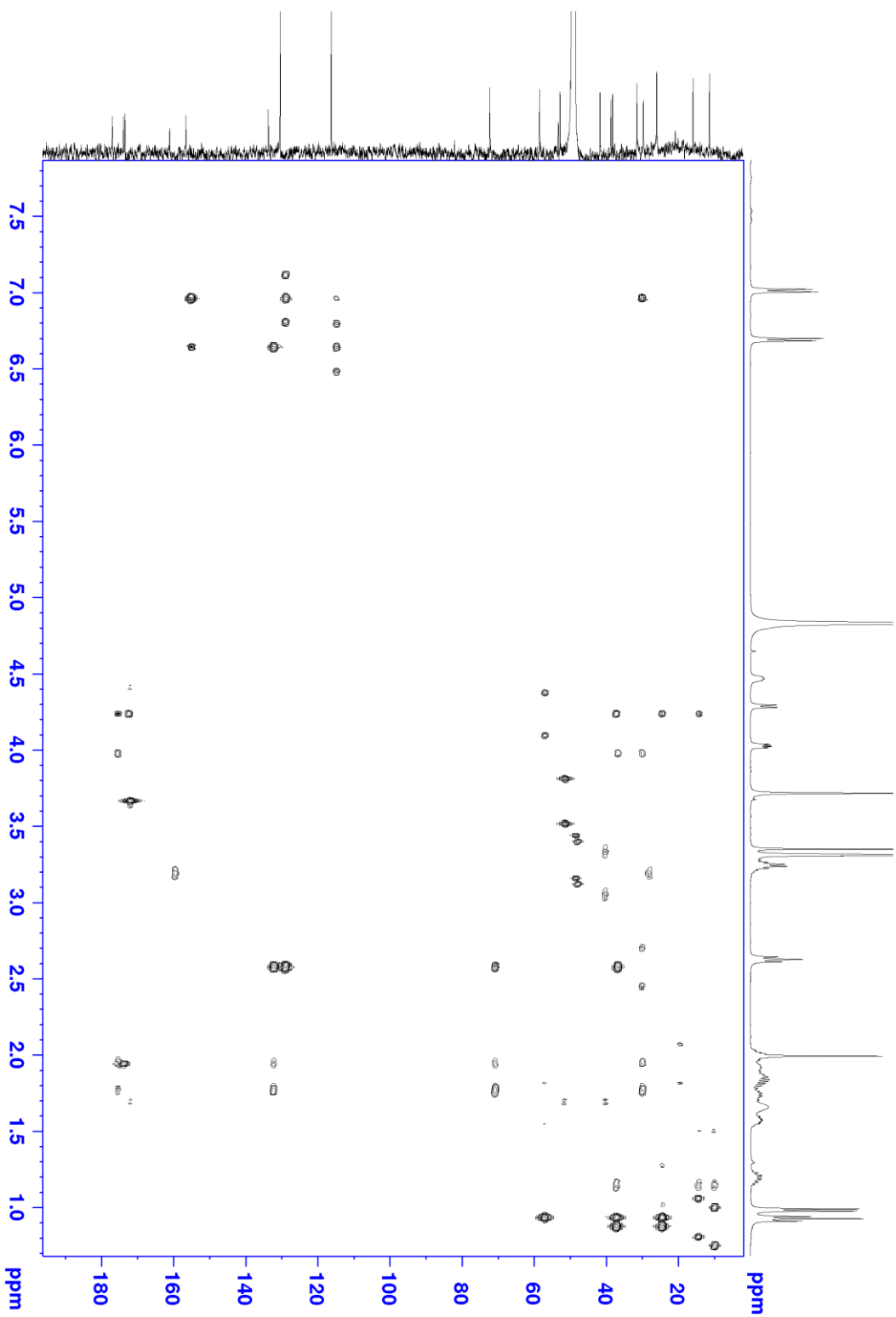
Liite 71


HO
O
OH
N
H
H
N
O
O
O
NH
N
H
N
H
NO2


TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HMQC w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
45
40
35
30
25
20
15
10
ppm
2.1
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8

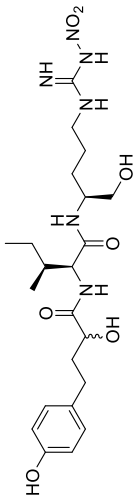
Liite 72

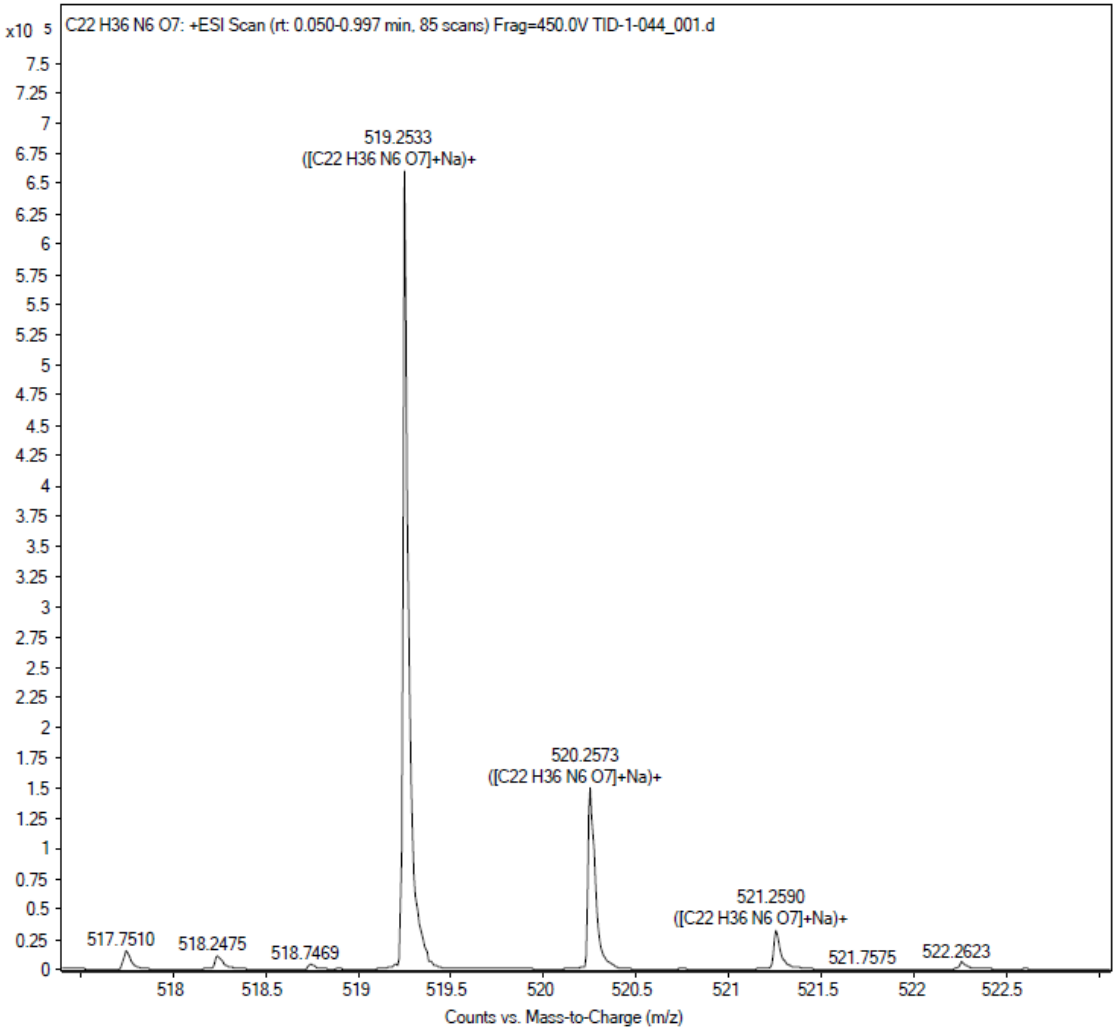

HO
OH
O
N
H
O
H
N
O
O
O
N
H
NH
N
H
NO2


TID-1-038 lower in CD3OD at 30 C
HMBC w. Prodigy
26.11.2019/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
180
160
140
120
100
80
60
40
20
ppm

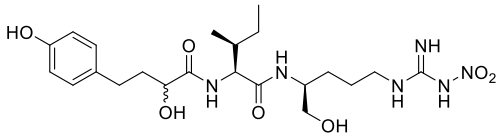
Liite 73

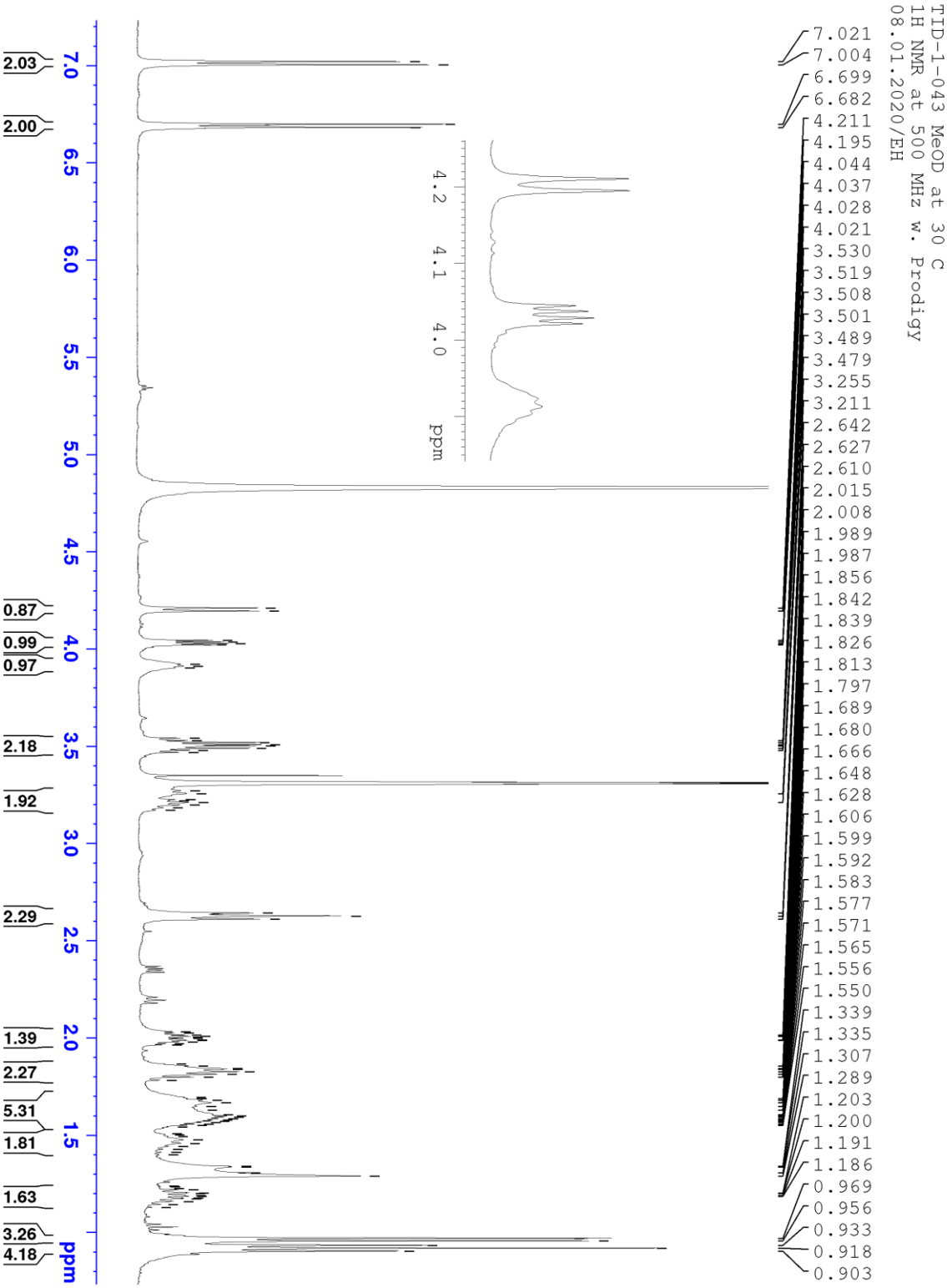
Sample Name	TID-1-044	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-044_001.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-044, 1uM in MeOH	**Acquired Time**	1/22/2020 1:20:01 PM (UTC+02:00)



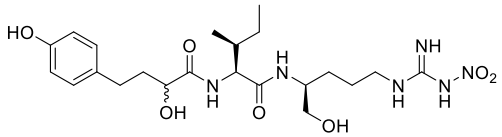


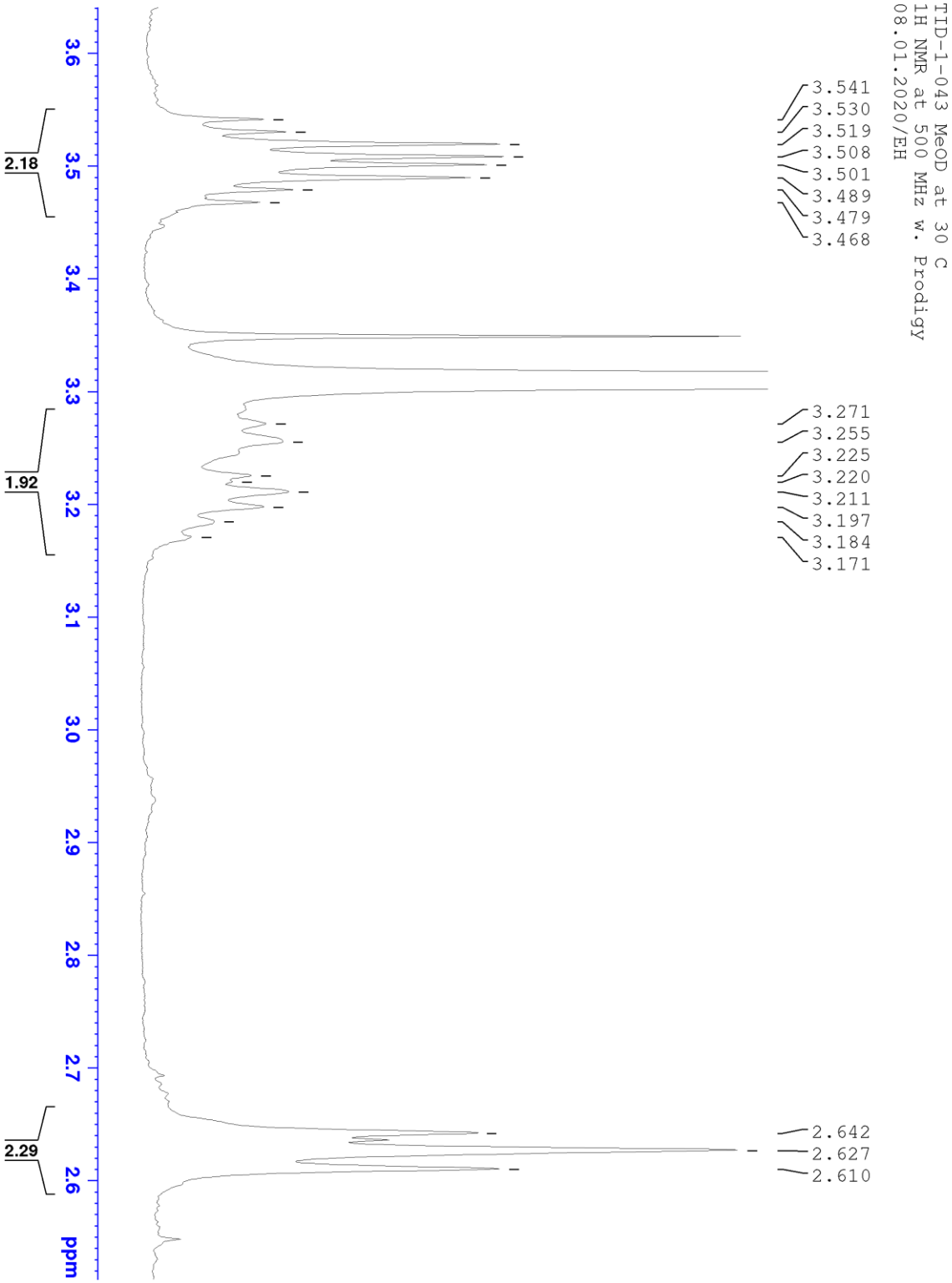
Liite 74

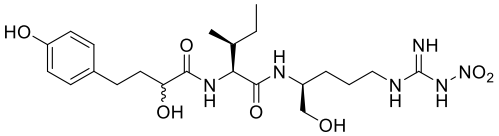

HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2


TID-1-043 MeOD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
7.021
7.004
6.699
6.682
4.211
4.195
4.044
4.037
4.028
4.021
3.530
3.519
3.508
3.501
3.489
3.479
3.255
3.211
2.642
2.627
2.610
2.015
2.008
1.989
1.987
1.856
1.842
1.839
1.826
1.813
1.797
1.689
1.680
1.666
1.648
1.628
1.606
1.599
1.592
1.583
1.577
1.571
1.565
1.556
1.550
1.339
1.335
1.307
1.289
1.203
1.200
1.191
1.186
0.969
0.956
0.933
0.918
0.903
2.03
2.00
0.87
0.99
0.97
2.18
1.92
2.29
1.39
2.27
5.31
1.81
1.63
3.26
4.18
ppm

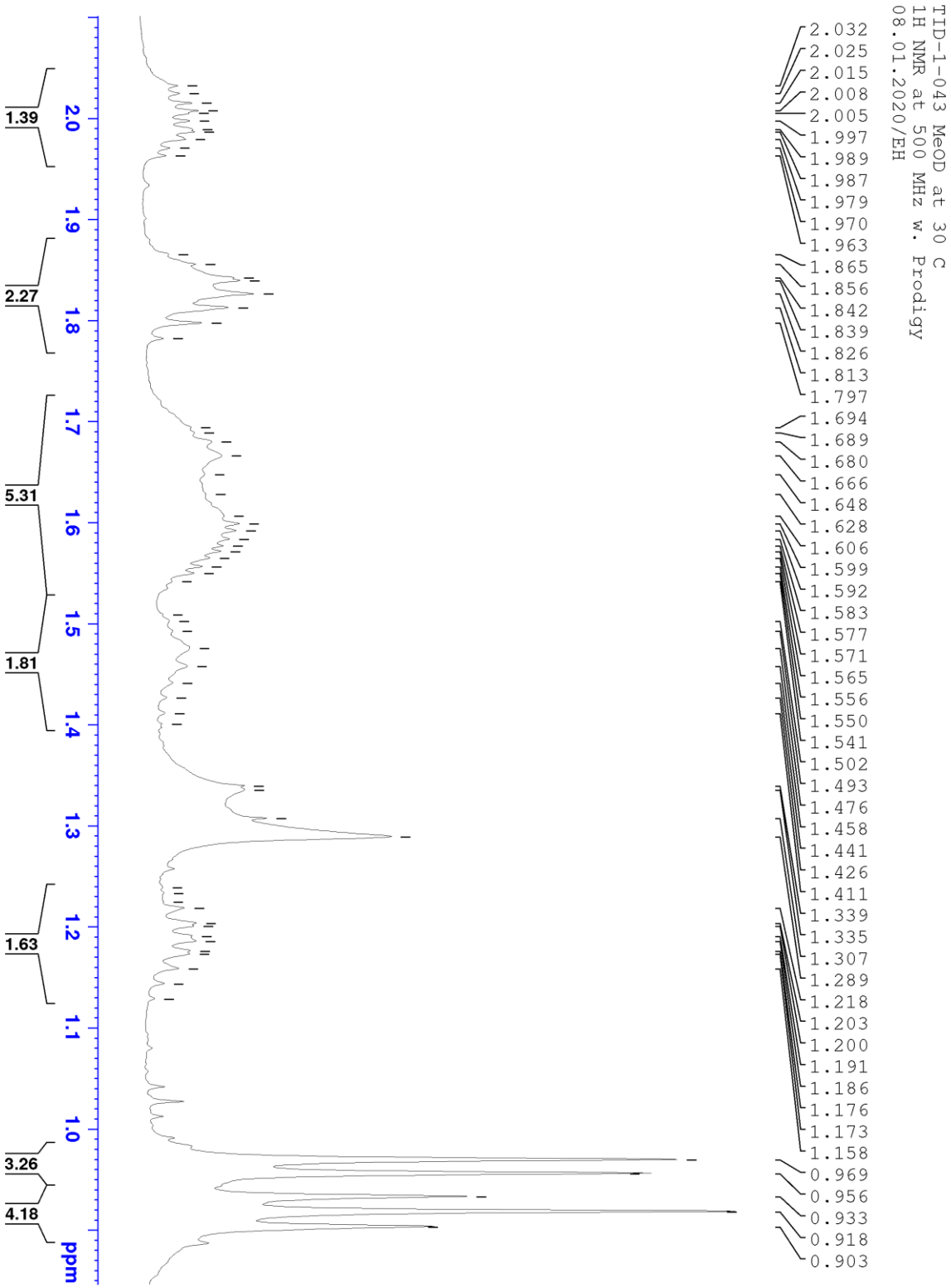
Liite 75

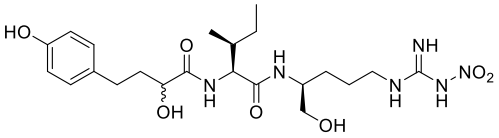

HO
O
OH
N
H
H
N
O
NH
N
H
N
H
NO2
OH


TID-1-043 MeOD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
3.541
3.530
3.519
3.508
3.501
3.489
3.479
3.468
3.271
3.255
3.225
3.220
3.211
3.197
3.184
3.171
2.642
2.627
2.610
2.18
1.92
2.29
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
3.0
2.9
2.8
2.7
2.6
ppm

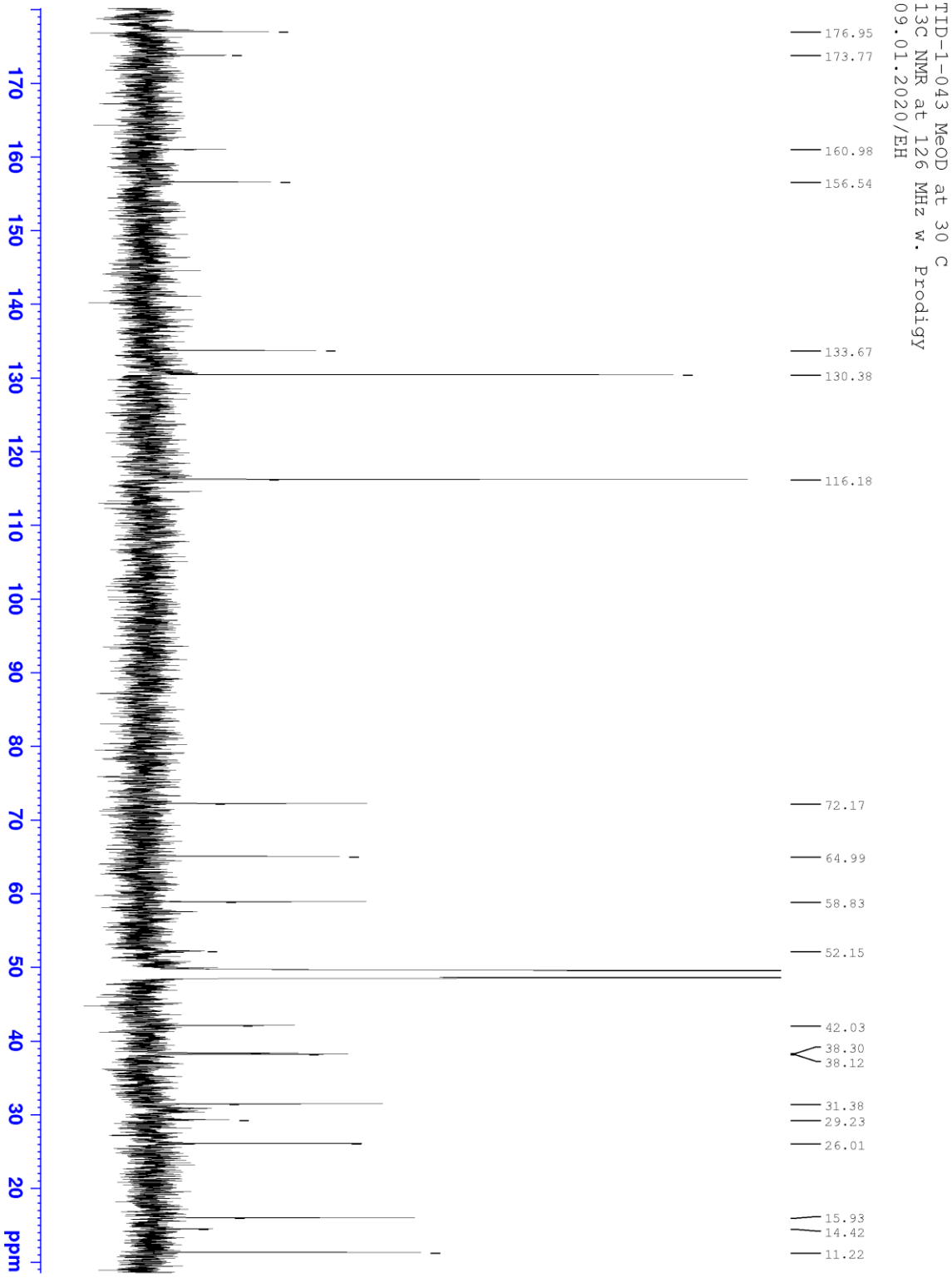

HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
N
H
NH
N
H
NO2

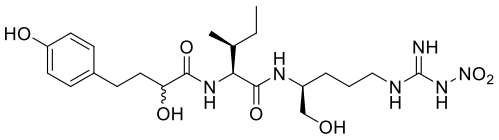
Liite 76


TID-1-043 MeOD at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
2.032
2.025
2.015
2.008
2.005
1.997
1.989
1.987
1.979
1.970
1.963
1.865
1.856
1.842
1.839
1.826
1.813
1.797
1.694
1.689
1.680
1.666
1.648
1.628
1.606
1.599
1.592
1.583
1.577
1.571
1.565
1.556
1.550
1.541
1.502
1.493
1.476
1.458
1.441
1.426
1.411
1.339
1.335
1.307
1.289
1.218
1.203
1.200
1.191
1.186
1.176
1.173
1.158
0.969
0.956
0.933
0.918
0.903
1.39
2.27
5.31
1.81
1.63
3.26
4.18
2.0
1.9
1.8
1.7
1.6
1.5
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
ppm

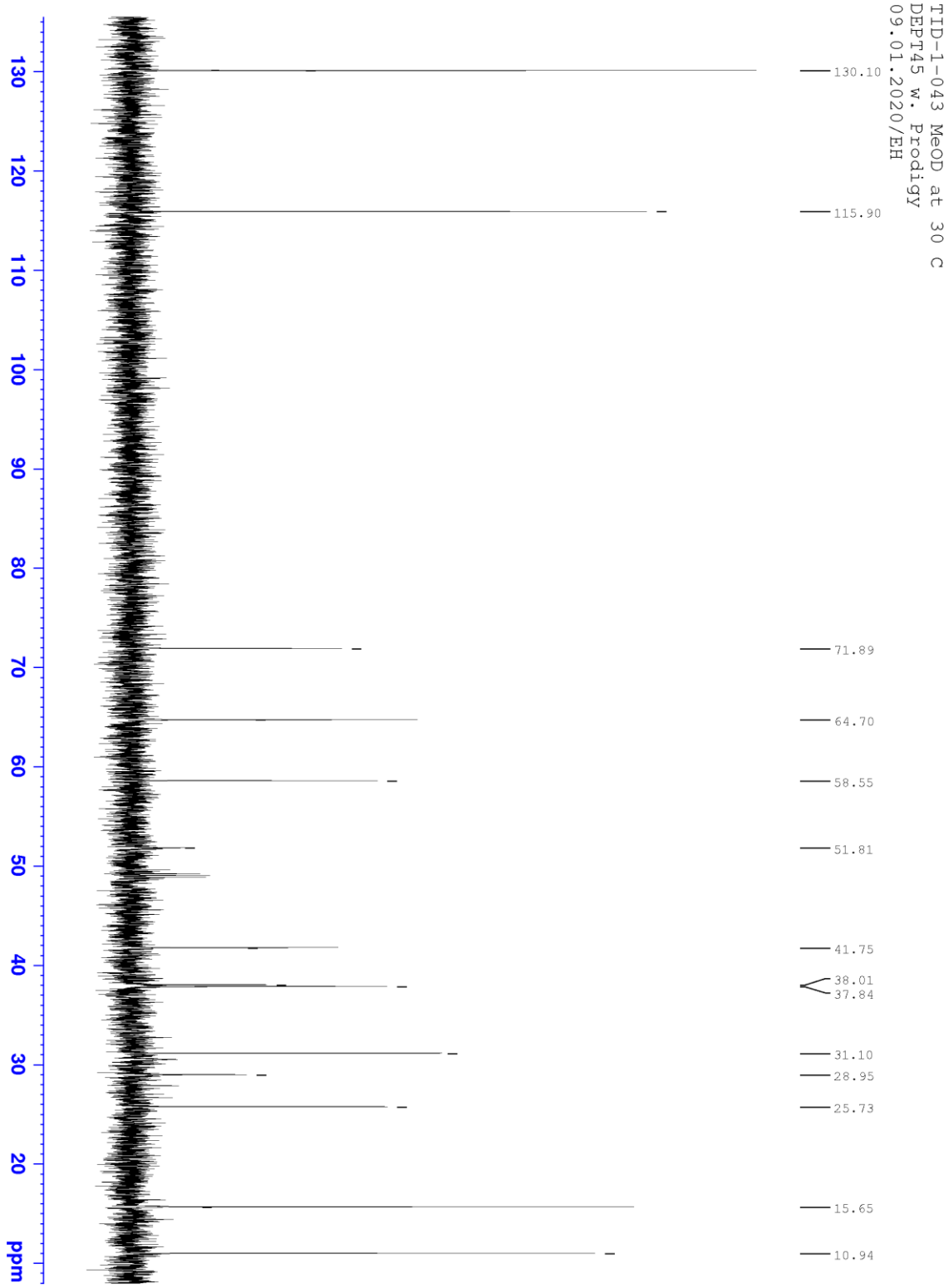

HO
O
OH
N
H
H
N
O
NH
N
H
N
H
NO2
OH

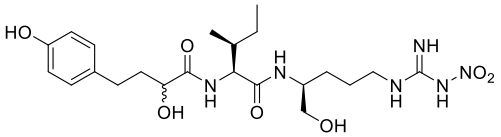
Liite 77


TID-1-043 MeOD at 30 C
13C NMR at 126 MHz w. Prodigy
09.01.2020/EH
176.95
173.77
160.98
156.54
133.67
130.38
116.18
72.17
64.99
58.83
52.15
42.03
38.30
38.12
31.38
29.23
26.01
15.93
14.42
11.22
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

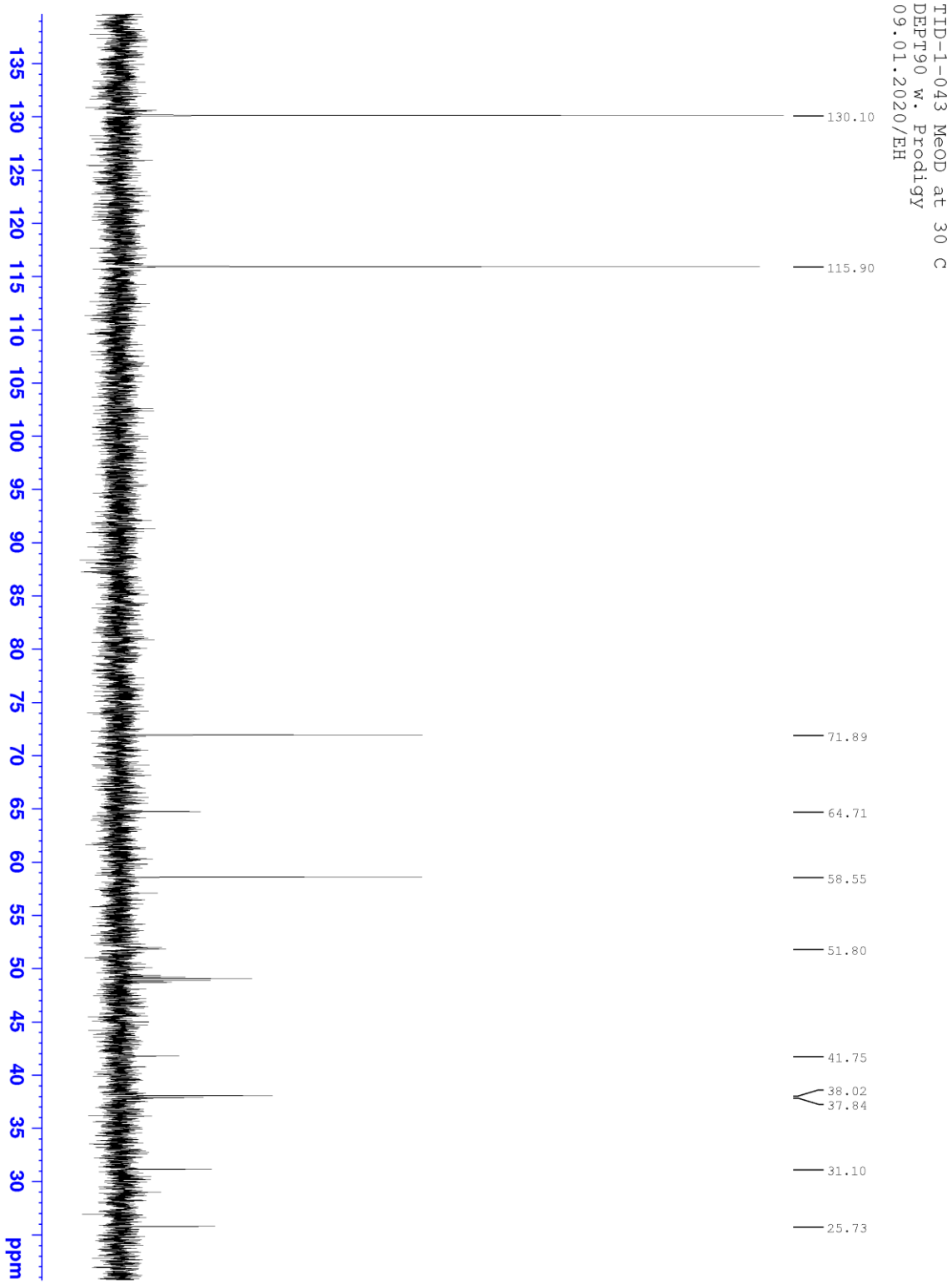

HO
O
OH
N
H
O
H
N
OH
NH
N
H
N
H
NO2

Liite 78

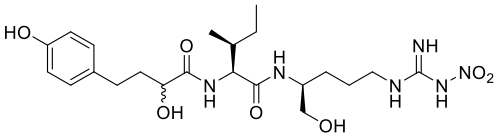

TID-1-043 MeOD at 30 C
DEPT45 w. Prodigy
09.01.2020/EH
130.10
115.90
71.89
64.70
58.55
51.81
41.75
38.01
37.84
31.10
28.95
25.73
15.65
10.94
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

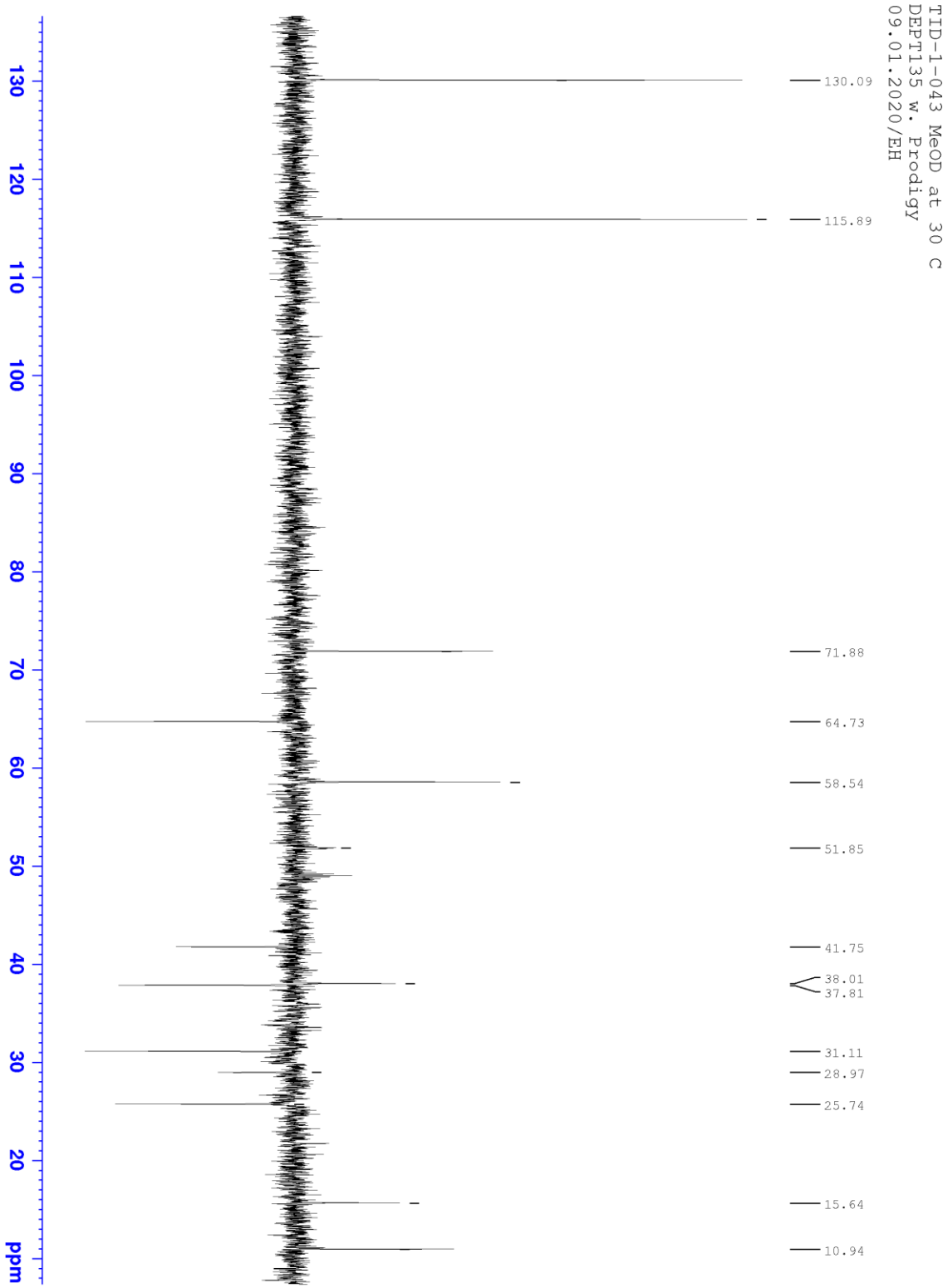

HO
O
OH
N
H
O
H
N
OH
N
H
NH
N
H
NO2

Liite 79

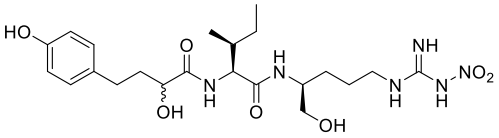

TID-1-043 MeOD at 30 C
DEPT90 w. Prodigy
09.01.2020/EH
130.10
115.90
71.89
64.71
58.55
51.80
41.75
38.02
37.84
31.10
25.73
135 130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 ppm

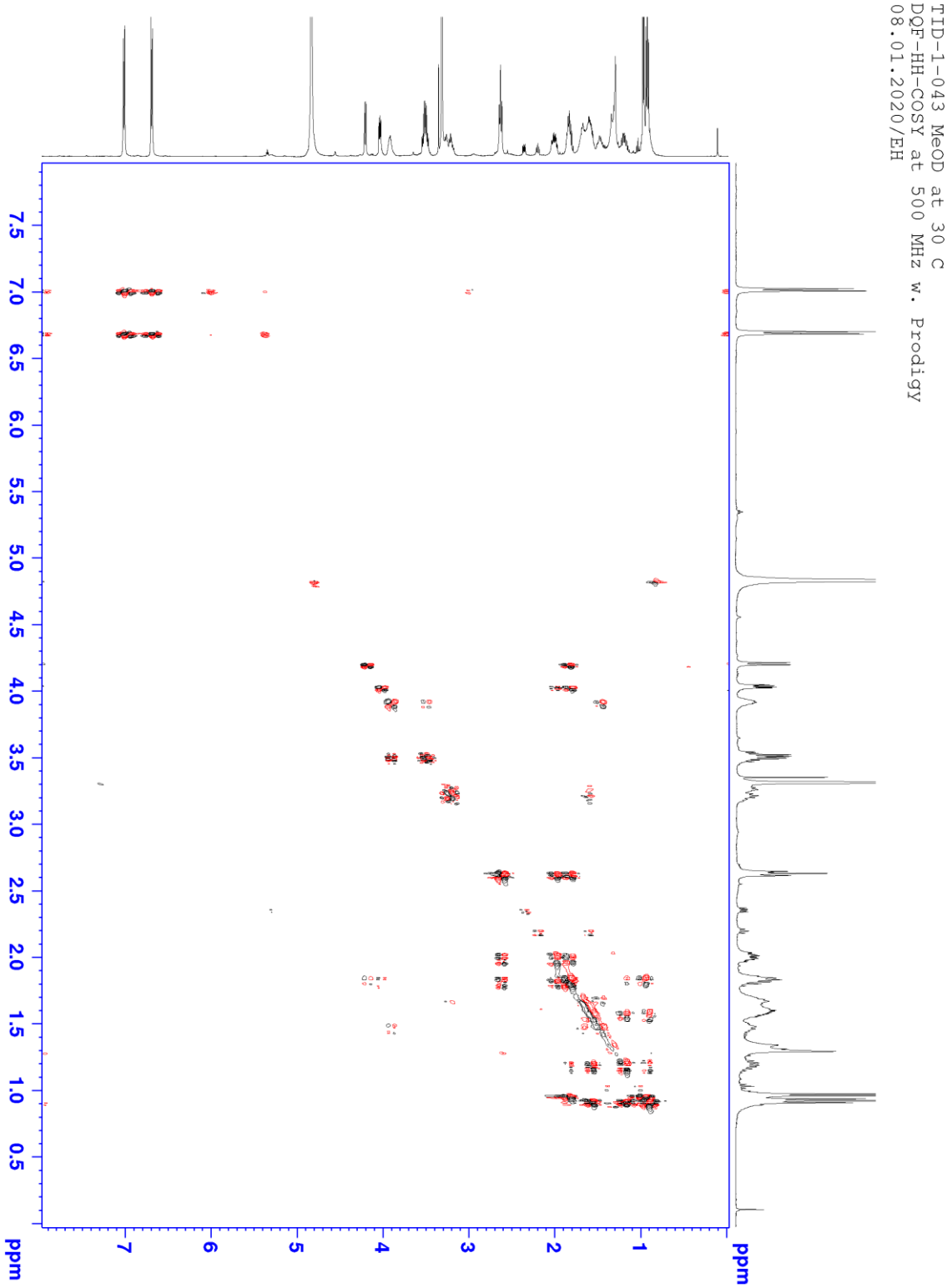
Liite 80


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2

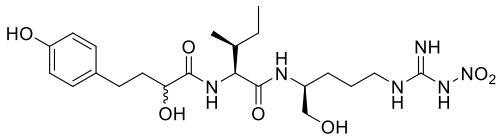

TID-1-043 MeOD at 30 C
DEPT135 w. Prodigy
09.01.2020/EH
130.09
115.89
71.88
64.73
58.54
51.85
41.75
38.01
37.81
31.11
28.97
25.74
15.64
10.94
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

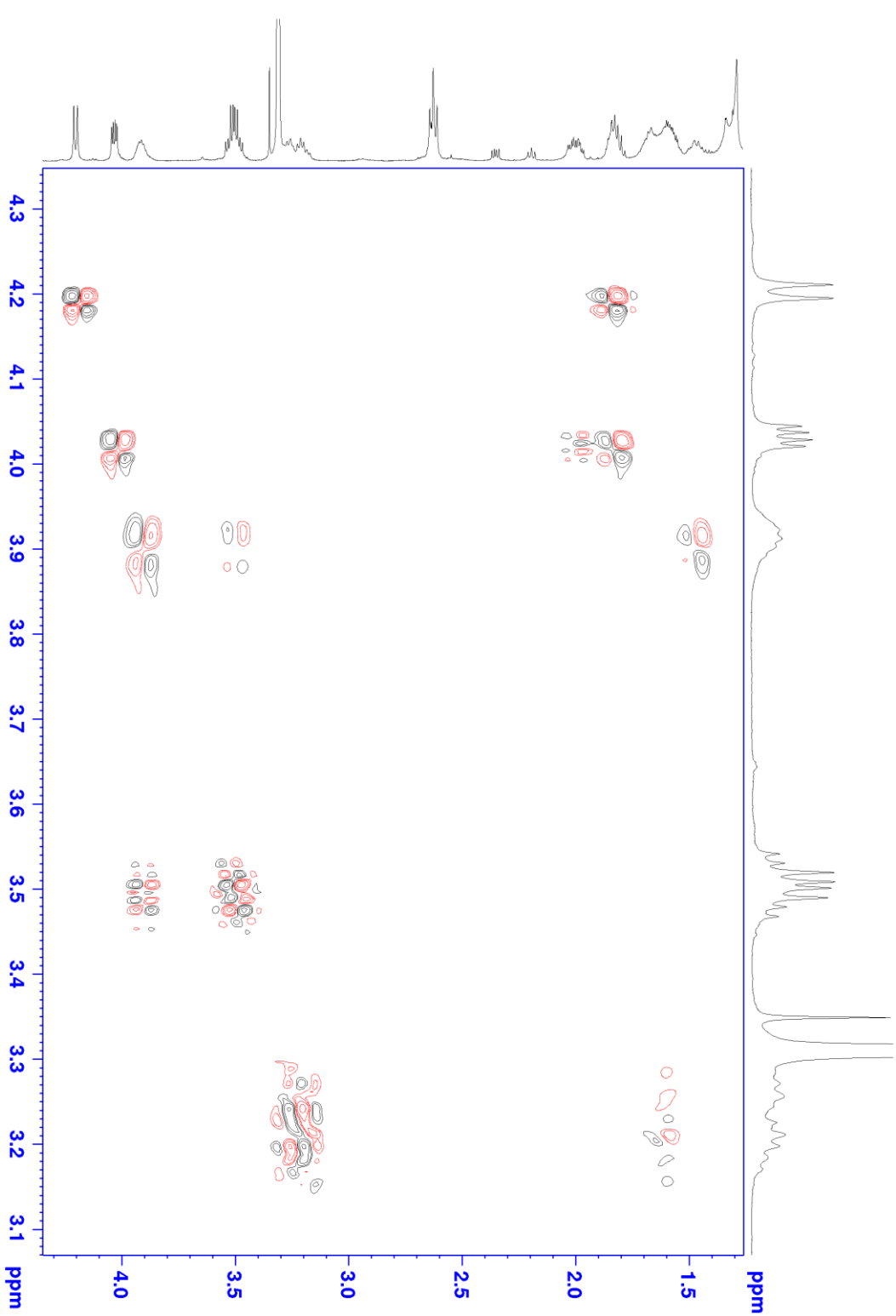
Liite 81


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2

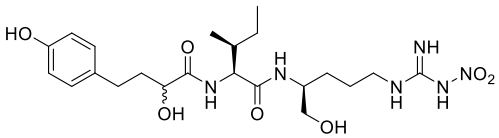

TID-1-043 MeOD at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
7
6
5
4
3
2
1

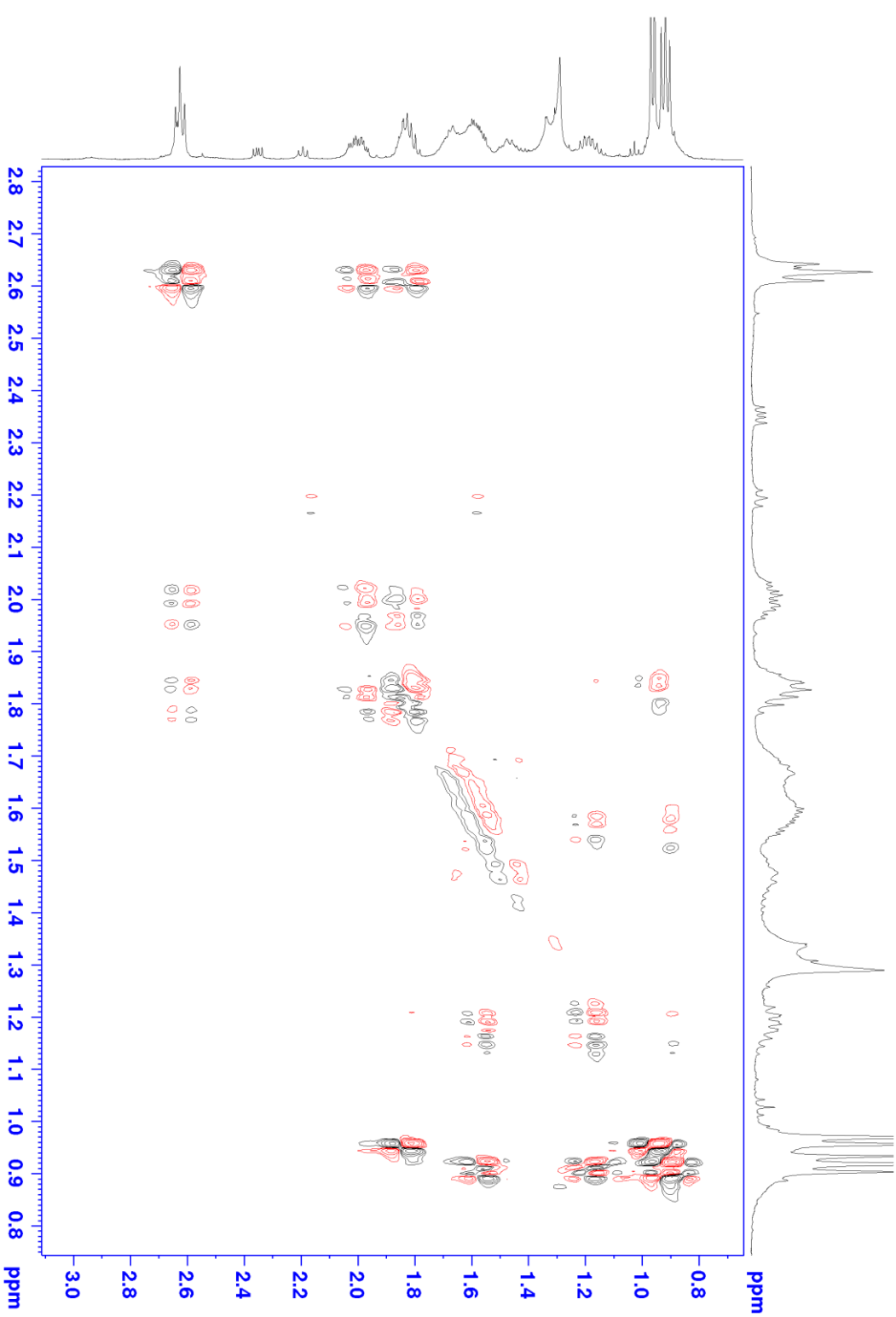
Liite 82


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
N
H
NH
N
H
NO2

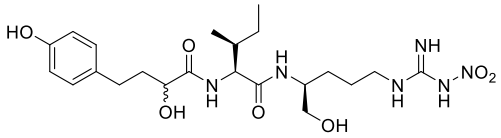

TID-1-043 MeOD at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1
ppm
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5

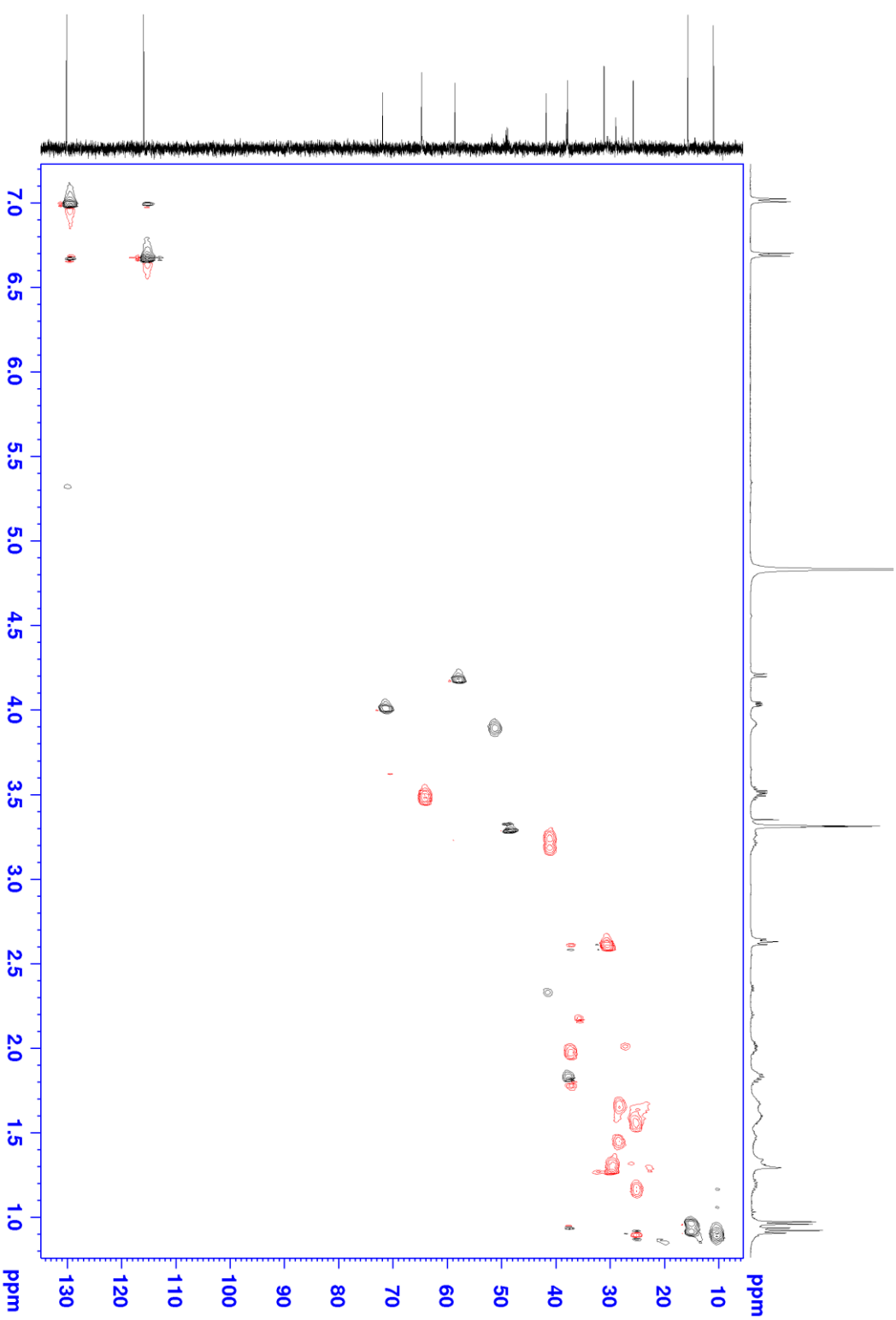
Liite 83


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2

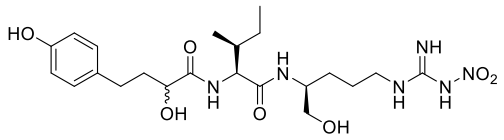

TID-1-043 MeOD at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
2.8
3.0
ppm
0.8
0.9
1.0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2.0
2.1
2.2
2.3
2.4
2.5
2.6
2.7
2.8

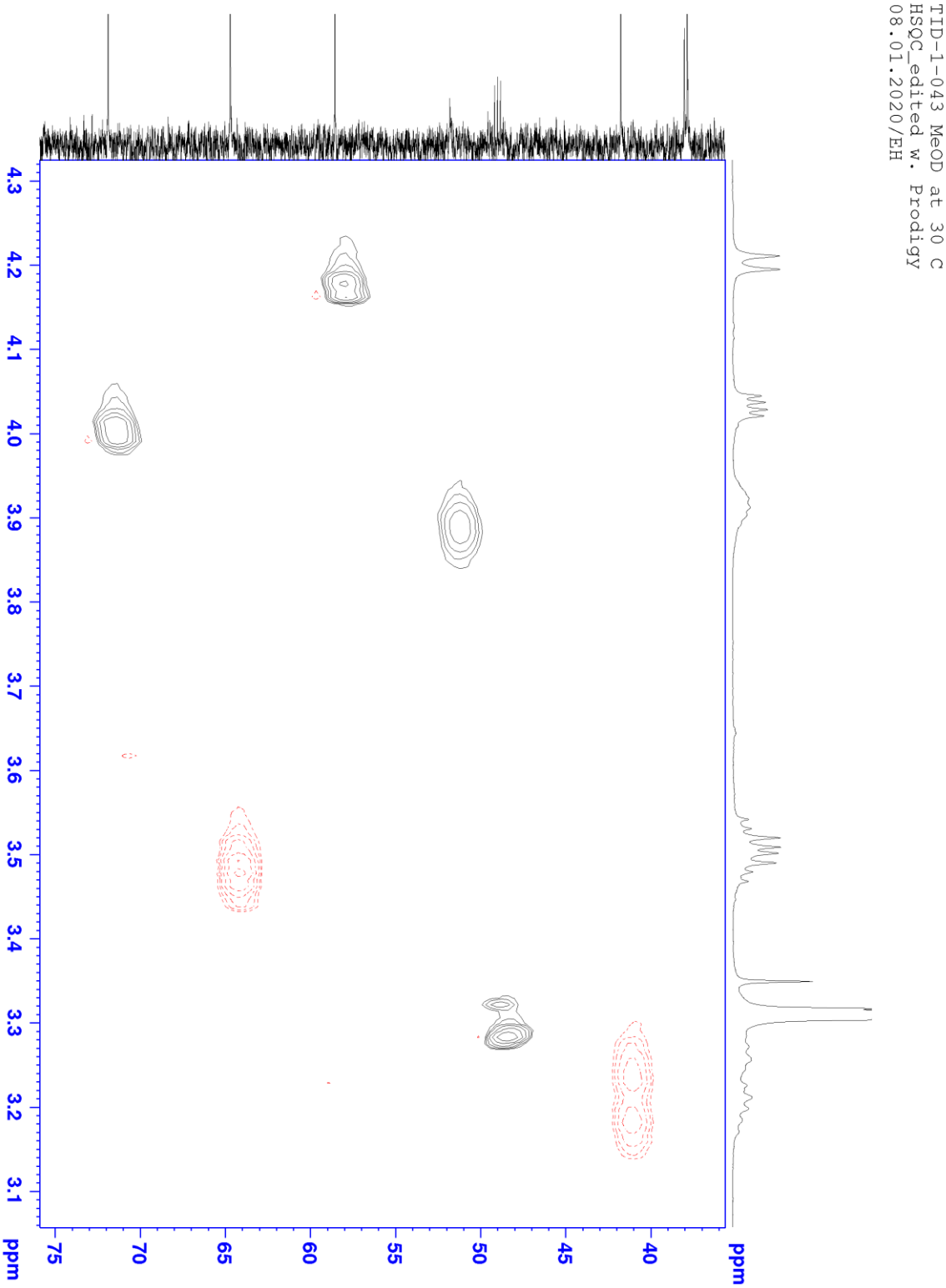
Liite 84


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2

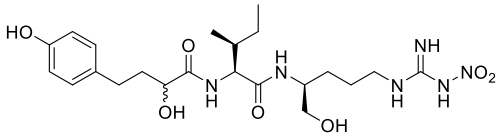

TID-1-043 MeOD at 30 C
HSQC_edited w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10

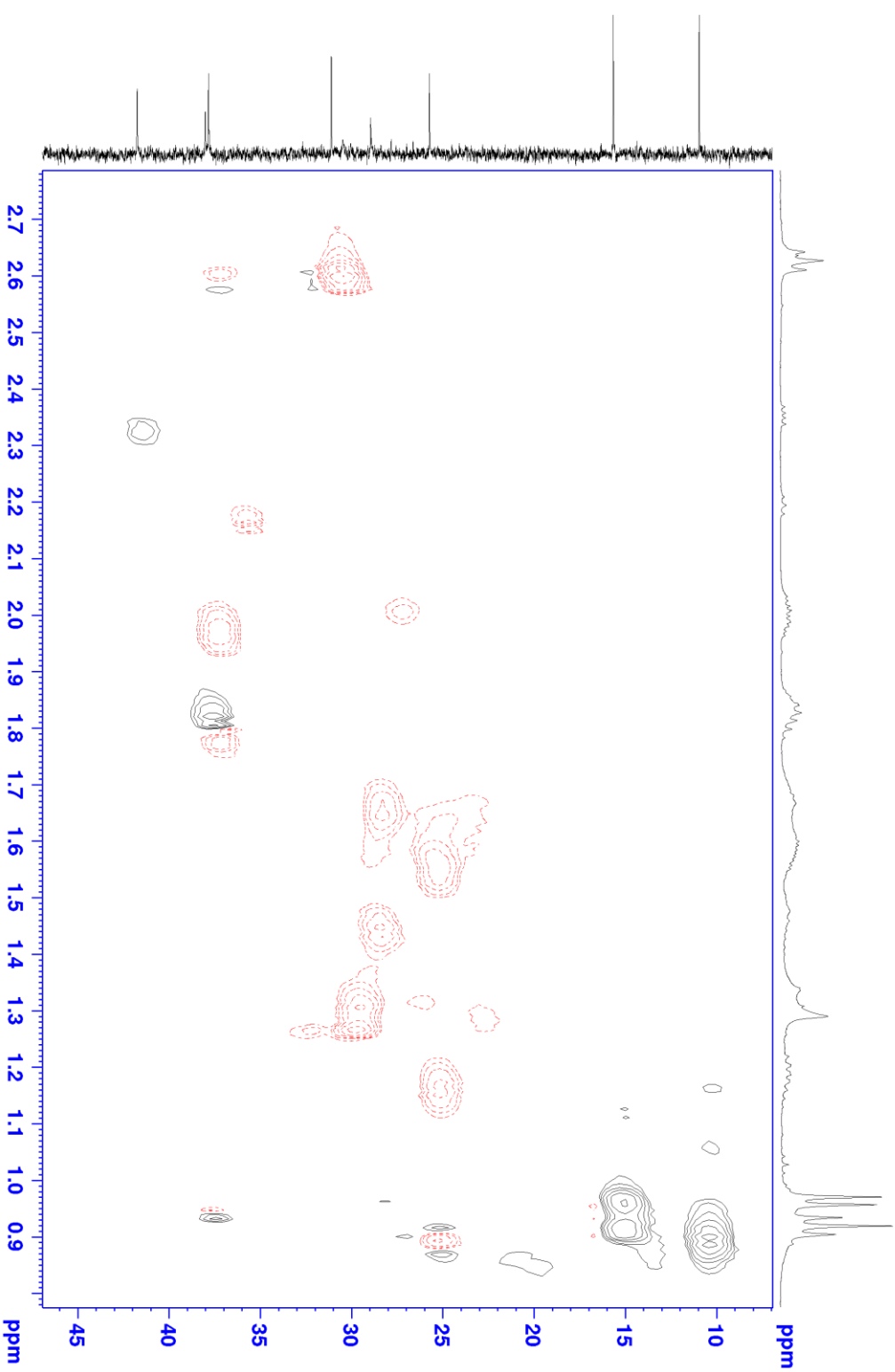
Liite 85


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
NH
N
H
N
H
NO2

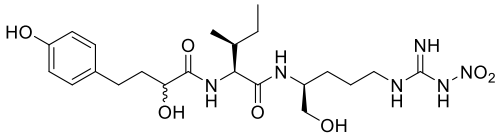

TID-1-043 MeOD at 30 C
HSQC_edited w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
75
70
65
60
55
50
45
40
ppm
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.7
3.6
3.5
3.4
3.3
3.2
3.1

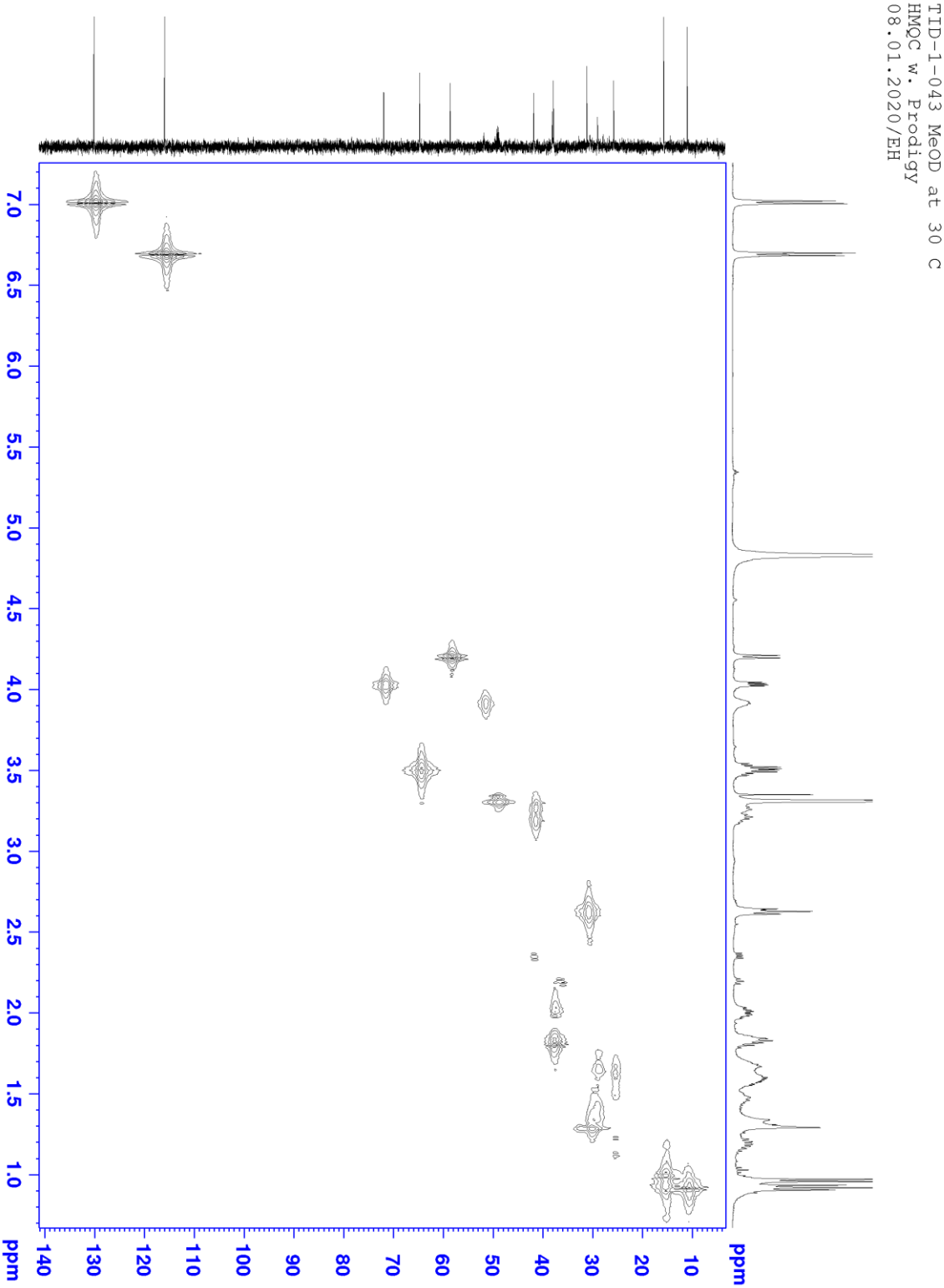
Liite 86


HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
N
H
NH
N
H
NO2

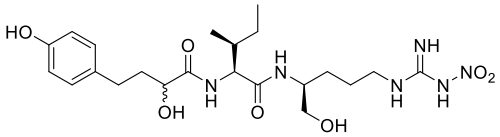

TID-1-043 MeOD at 30 C
HSQC_edited w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
10
15
20
25
30
35
40
45
ppm
0.9
1.0
1.1
1.2
1.3
1.4
1.5
1.6
1.7
1.8
1.9
2.0
2.1
2.2
2.3
2.4
2.5
2.6
2.7

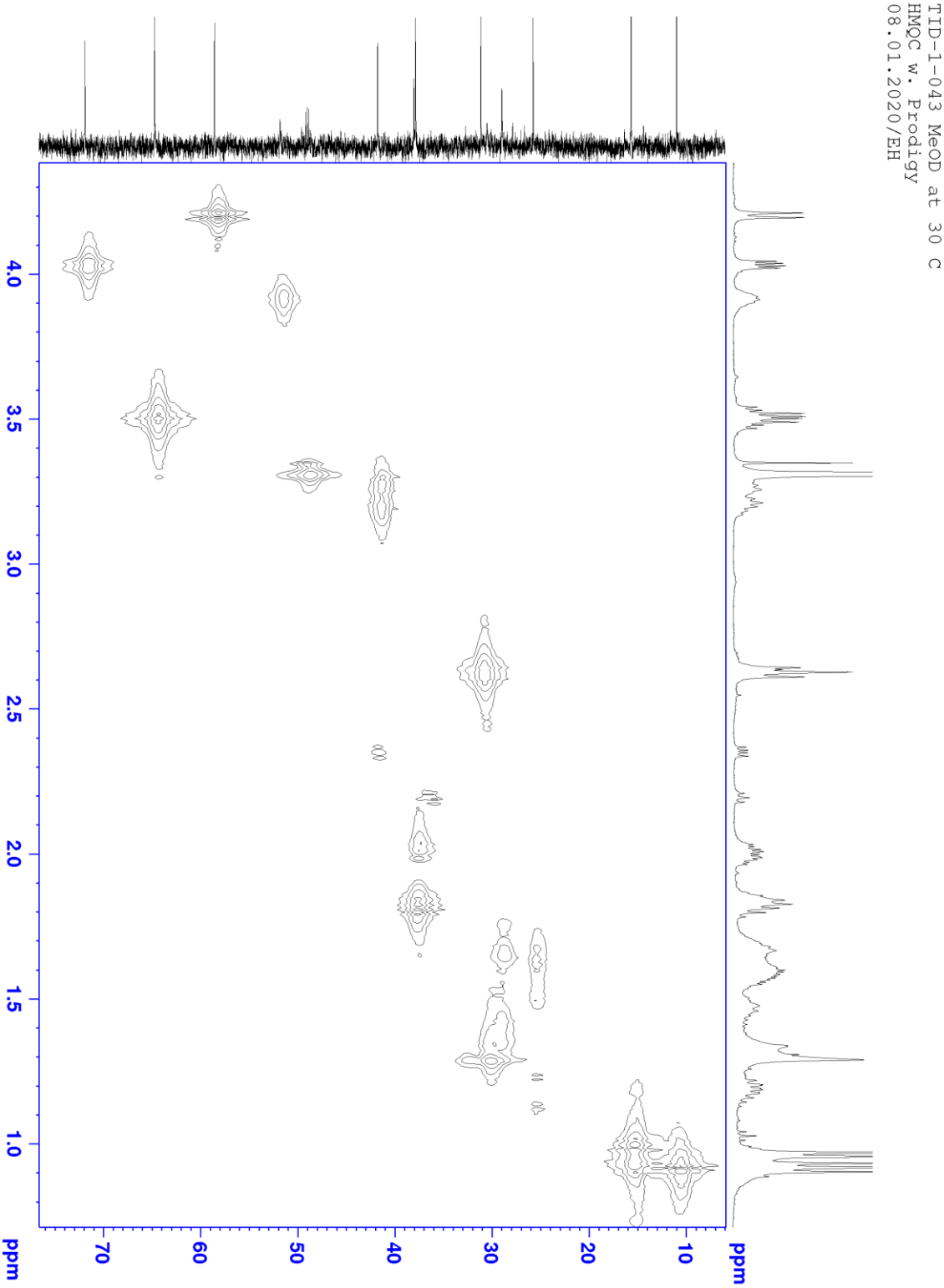
Liite 87

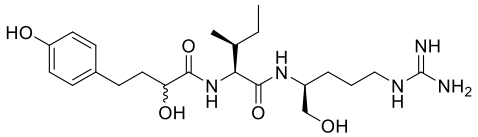

HO
O
OH
N
H
O
H
N
OH
N
H
NH
N
NO2
H


TID-1-043 MeOD at 30 C
HMQC w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0

Liite 88


HO
O
OH
N
H
H
N
O
NH
N
H
N
NO2
OH


TID-1-043 MeOD at 30 C
HMQC w. Prodigy
08.01.2020/EH
ppm
10
20
30
40
50
60
70
ppm
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4.0



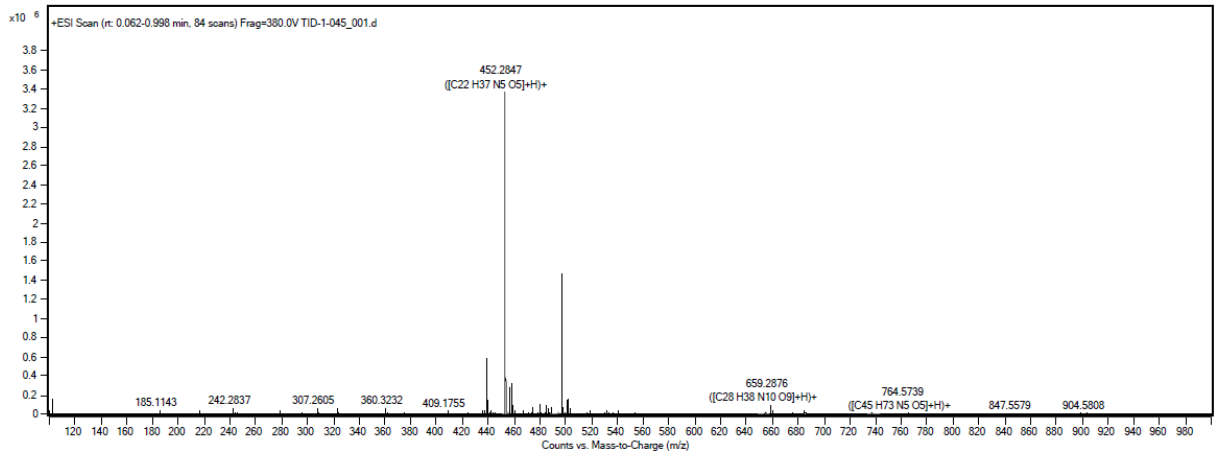
Liite 89

Qualitative Analysis Report

Data File	TID-1-045_001.d	**Sample Name**	TID-1-045
Sample Type	Sample	**Position**	
Instrument Name	Agilent 6560	**User Name**	
Acq Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Acquired Time**	1/22/2020 12:45:06 PM (UTC+02:00)
IRM Calibration Status	Success	**DA Method**	MicroESI QTOF-Only AccMass.m
Comment	TID-1-045, 1uM in MeOH		
Method part to run:	Acquisition Only	**Sample Group**	
Info.		**Stream Name**	LC 1
Acquisition Time (Local)	1/22/2020 12:45:06 PM (UTC+02:00)	**Acquisition SW Version**	6200 series TOF/6500 series Q-TOF B.09.00 (B9044.1 SP1)
QTOF Driver Version	8.00.00	**QTOF Firmware Version**	24.723
Tune Mass Range Max.	1700		

Spectra

Fragmentor Voltage	Collision Energy	Ionization Mode
380	0	ESI

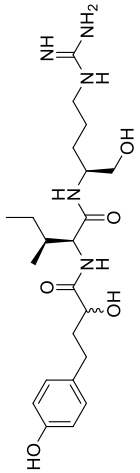


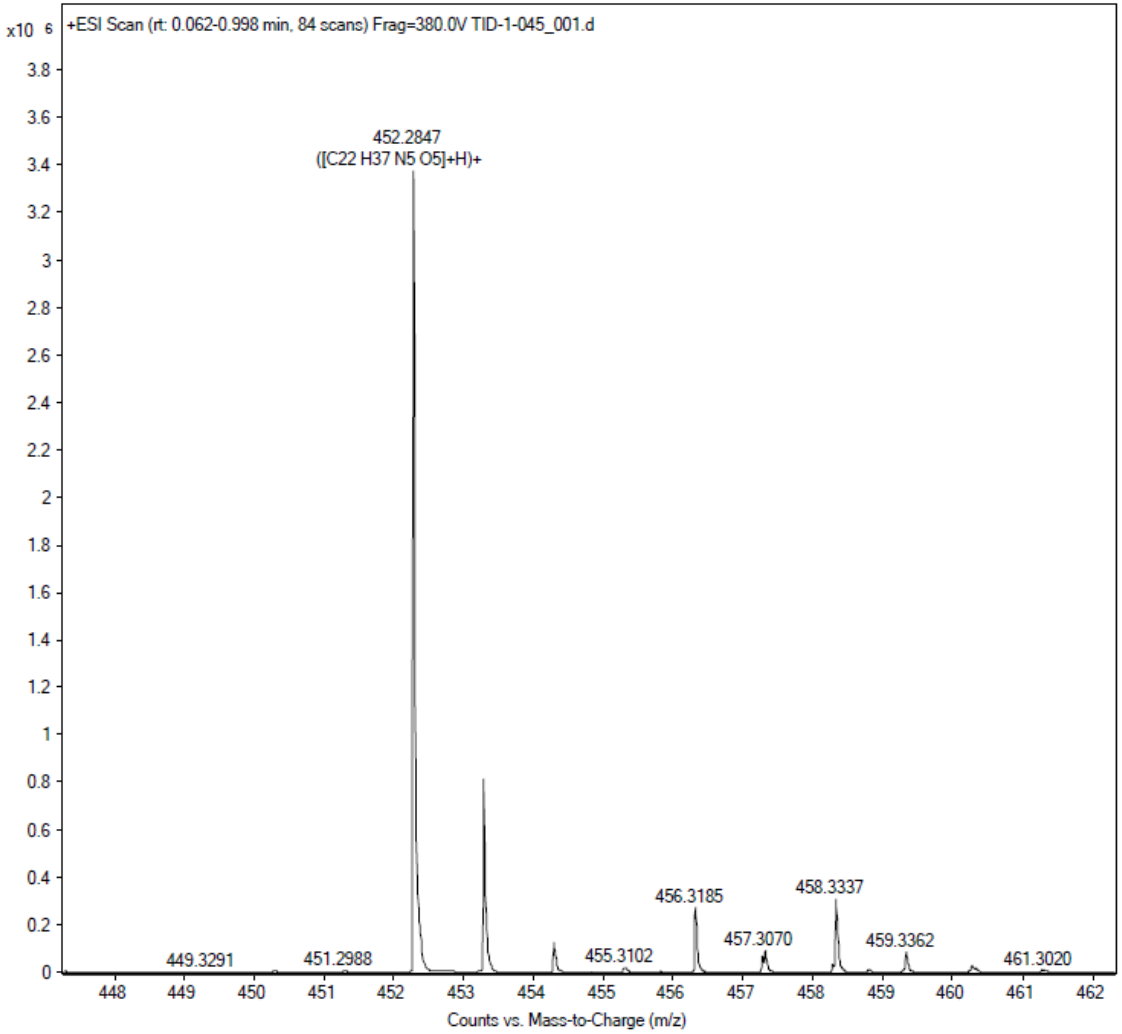
Peak List

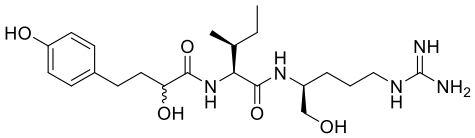
m/z	z	Abund	Formula	Ion
102.1276	1	157134.26		
438.296	1	575594.58		
452.2847	1	3374988.99	C22 H37 N5 O5	(M+H)+
453.2889	1	855894.78	C22 H37 N5 O5	(M+H)+
456.3185	1	275014.61		
458.3337	1	310266.92		
496.3107	1	1478091.51		
497.3169	1	319323.45		
500.3447	1	140426.1		
502.3597	1	157336.03		

Liite 90

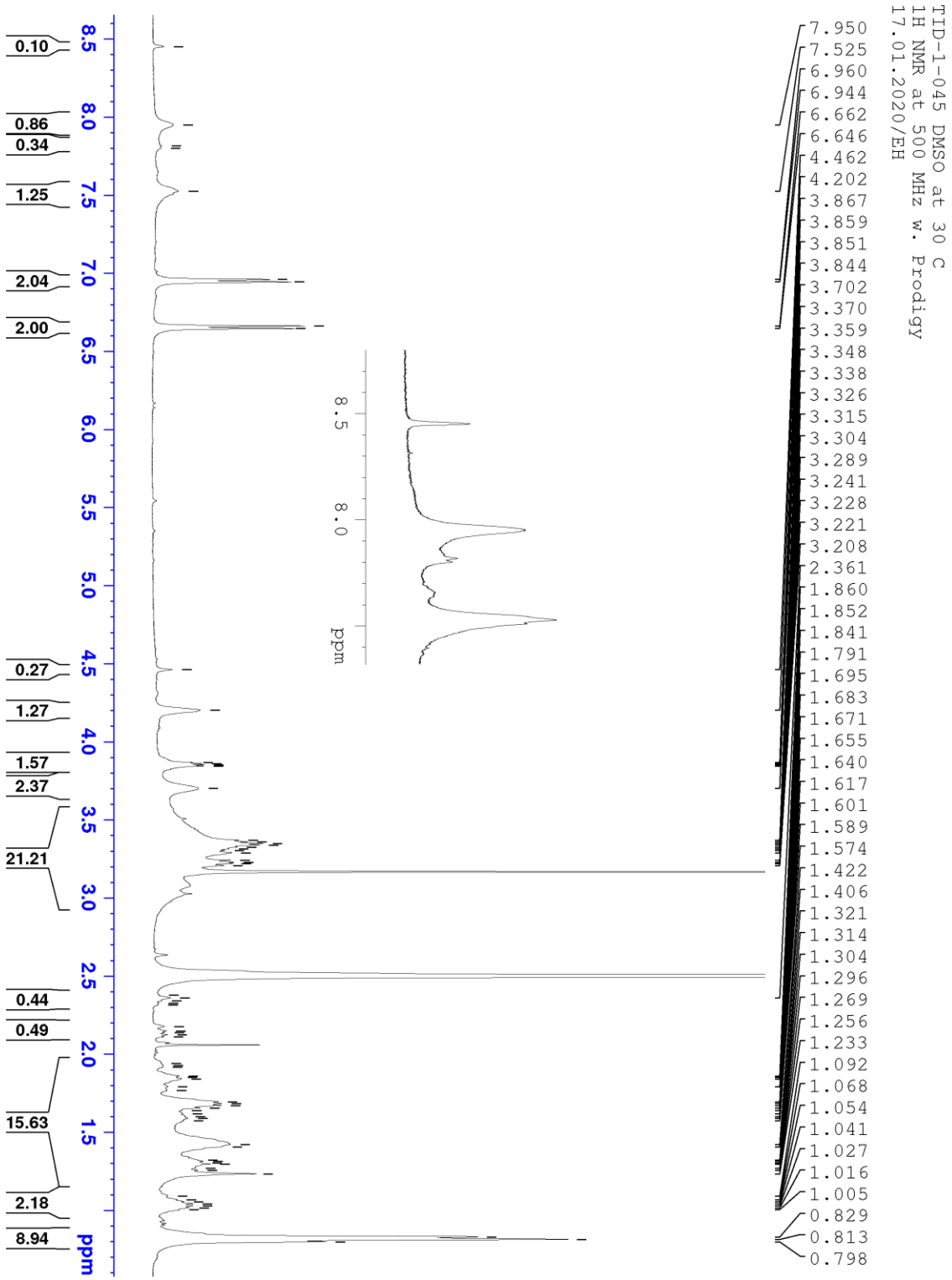
Sample Name	TID-1-045	**Position**		**Instrument Name**	Agilent 6560
User Name		**Inj Vol**	0	**InjPosition**	
Sample Type	Sample	**IRM Calibration Status**	Success	**Data Filename**	TID-1-045_001.d
ACQ Method	MicroESI QTOF-Only AccMass.m	**Comment**	TID-1-045, 1uM in MeOH	**Acquired Time**	1/22/2020 12:45:06 PM (UTC+02:00)

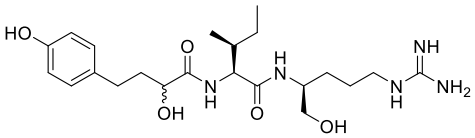




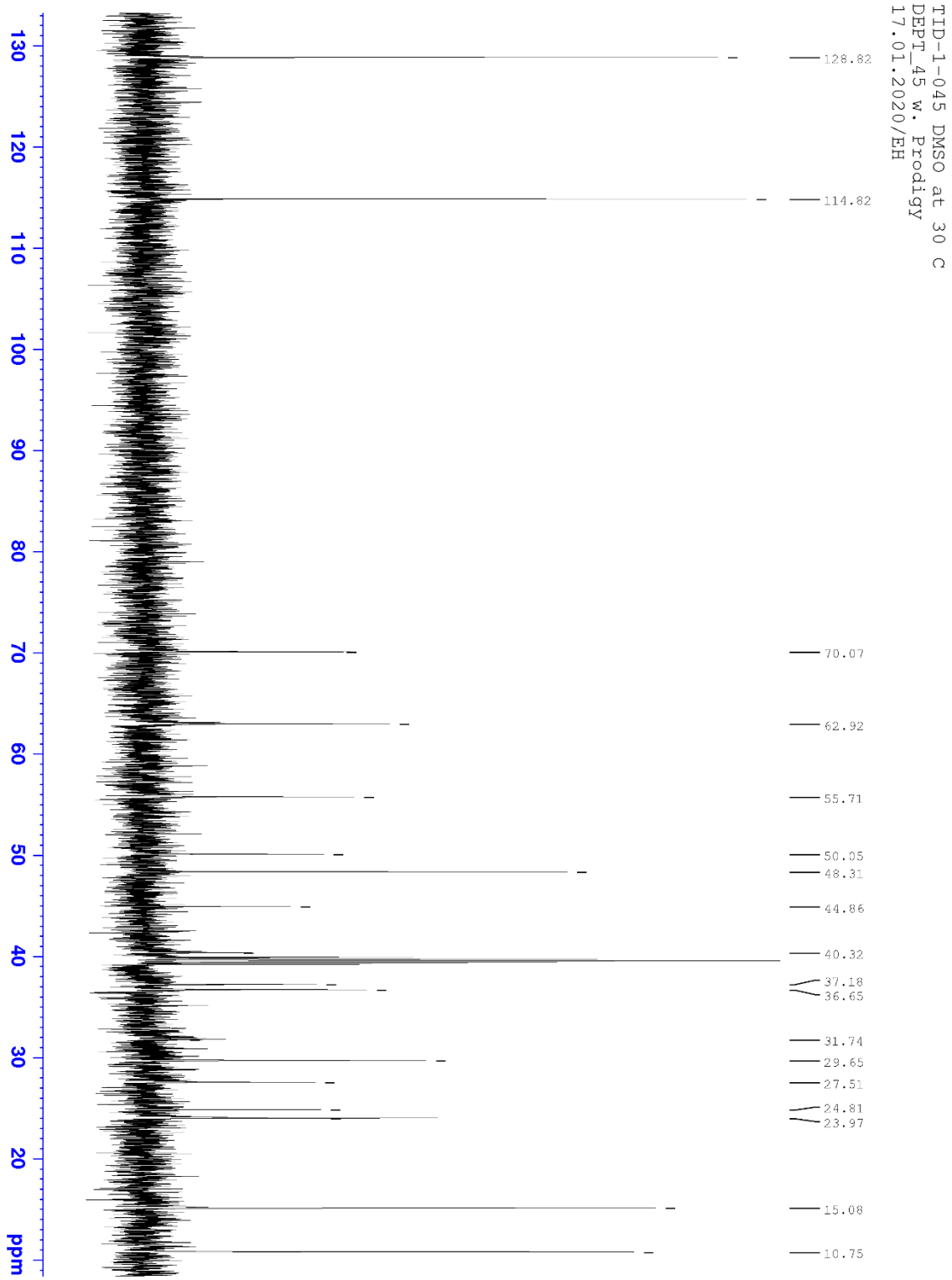

HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
N
H
NH
NH2

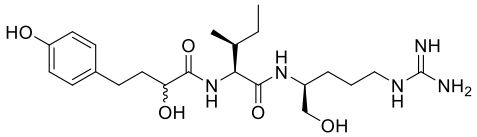
Liite 91


TID-1-045 DMSO at 30 C
1H NMR at 500 MHz w. Prodigy
17.01.2020/EH
7.950
7.525
6.960
6.944
6.662
6.646
4.462
4.202
3.867
3.859
3.851
3.844
3.702
3.370
3.359
3.348
3.338
3.326
3.315
3.304
3.289
3.241
3.228
3.221
3.208
2.361
1.860
1.852
1.841
1.791
1.695
1.683
1.671
1.655
1.640
1.617
1.601
1.589
1.574
1.422
1.406
1.321
1.314
1.304
1.296
1.269
1.256
1.233
1.092
1.068
1.054
1.041
1.027
1.016
1.005
0.829
0.813
0.798
0.10
0.86
0.34
1.25
2.04
2.00
0.27
1.27
1.57
2.37
21.21
0.44
0.49
15.63
2.18
8.94
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
ppm

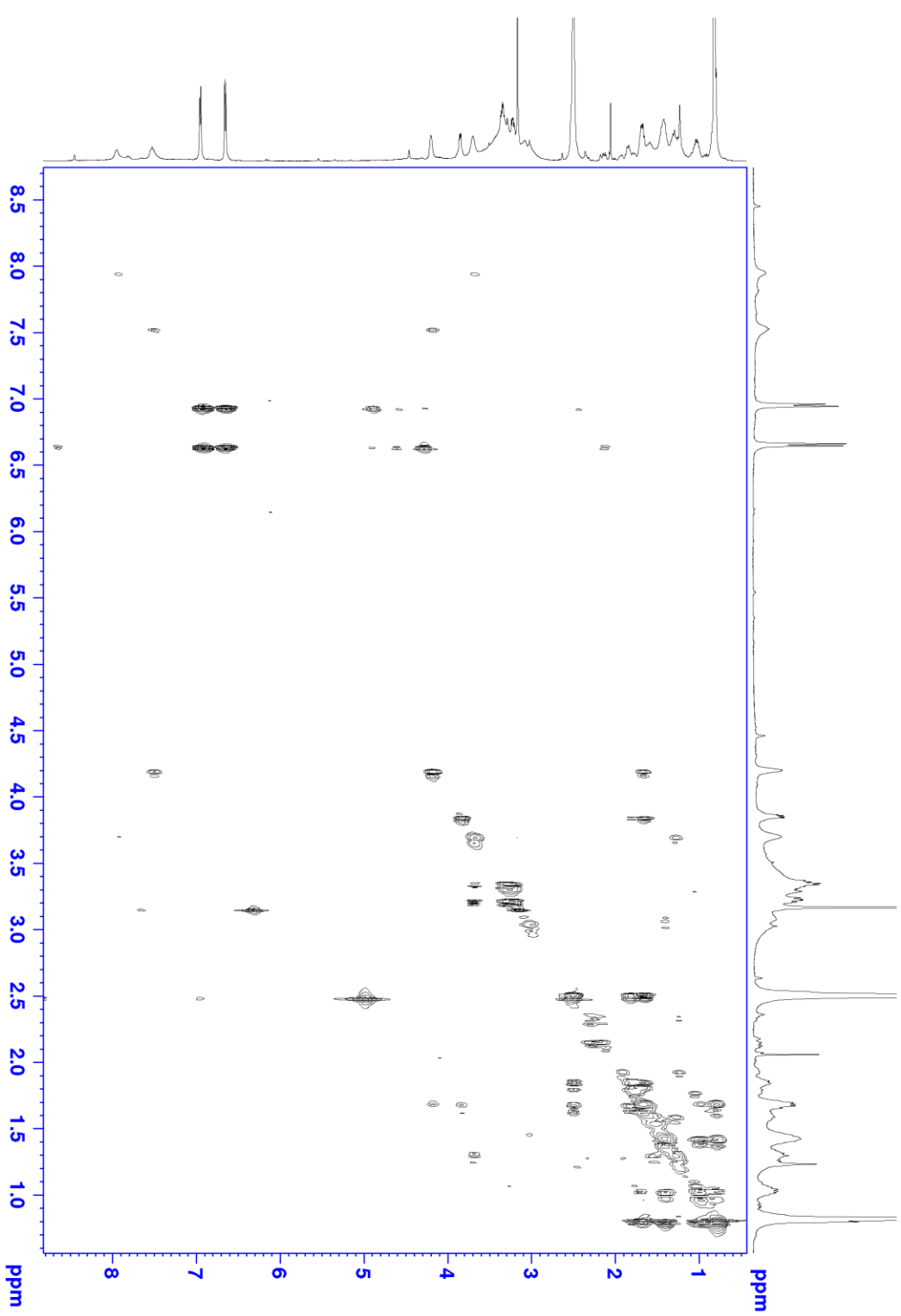

HO
O
OH
N
H
H
N
O
OH
N
H
NH
NH2

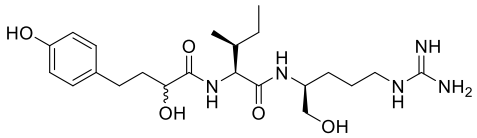
Liite 92


TID-1-045 DMSO at 30 C
DEPT_45 w. Prodigy
17.01.2020/EH
128.82
114.82
70.07
62.92
55.71
50.05
48.31
44.86
40.32
37.18
36.65
31.74
29.65
27.51
24.81
23.97
15.08
10.75
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
ppm

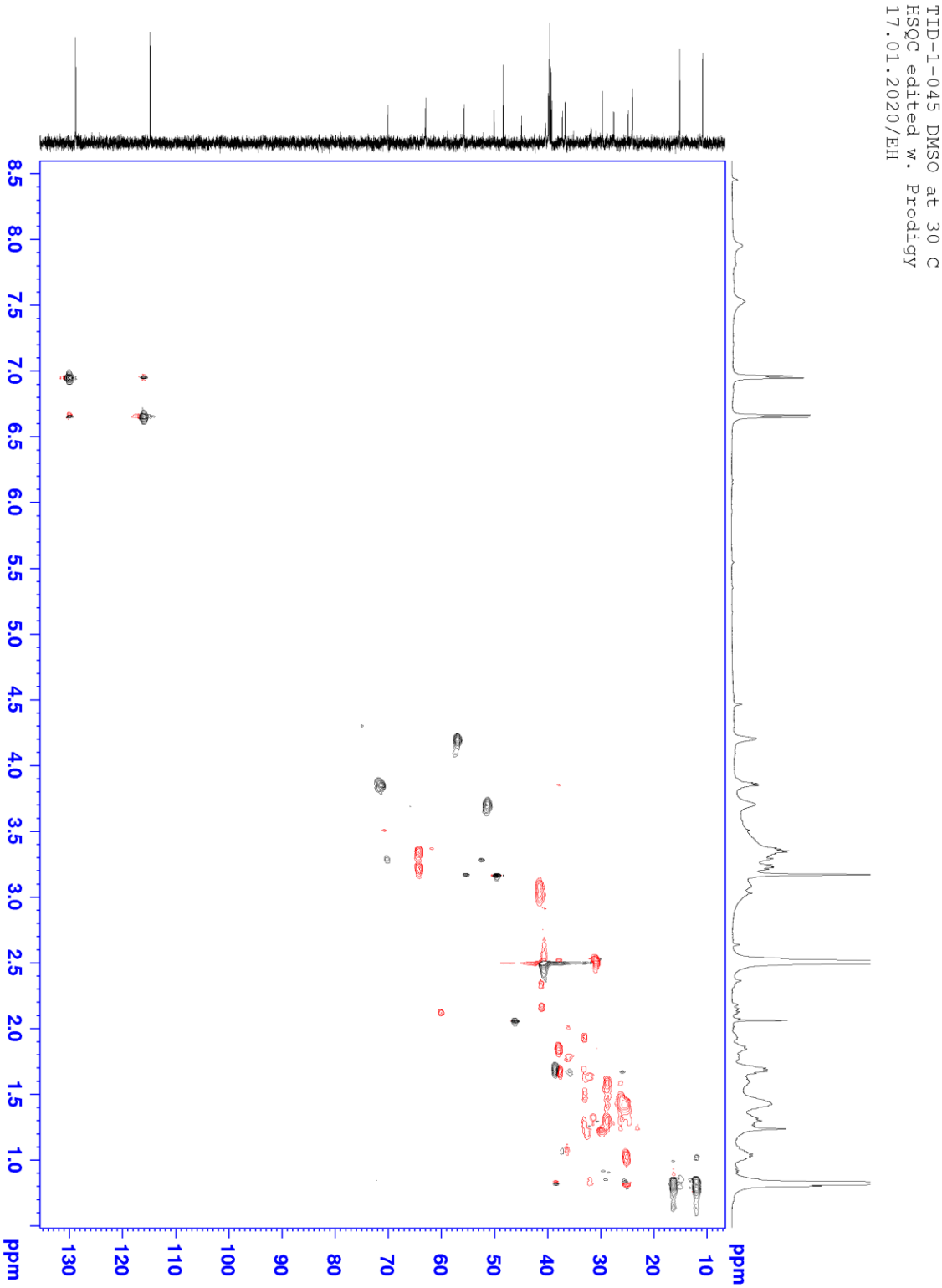

HO
O
OH
N
H
O
H
N
OH
N
H
NH
NH2

Liite 93


TID-1-045 DMSO at 30 C
DQF-HH-COSY at 500 MHz w. Prodigy
17.01.2020/EH
ppm
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
8
7
6
5
4
3
2
1


HO
O
OH
N
H
O
H
N
OH
N
H
NH
NH2

Liite 94


TID-1-045 DMSO at 30 C
HSQC edited w. Prodigy
17.01.2020/EH
ppm
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10