

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**PRO GRADU -TUTKIELMA**  
**Kahden homogeenisen katalyytin**  
**katalysoimat reaktiot**

Pro gradu – tutkielma

Jyväskylän yliopisto

Kemian laitos

25.7.2024

Teemu Silvasti



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO



## Tiivistelmä

Tämän *pro gradu* -tutkielman kirjallinen osa käsittelee kahden eri homogeenisen katalyytin reaktioita. Tutkielmassa syvennytään määrittämään mitä tämänkaltaiset reaktiot ovat ja miten ne kineettisesti voidaan määrittää olevan toista kertalukua katalyytin suhteen tapauksissa, jossa katalyytit ovat identtisiä yhdisteitä sekä mitä mahdollisia ongelmia ja haasteita tämän määrittämisen puolesta on olemassa. Kokeellinen osa puolestaan käsittelee bifunktionaalisella tioureakatalyytillä katalysoitua Pfau-d'Angelo-reaktiota, missä reaktion kirjallisuudessa kuvattu huono saanto viittasi edellämäinittujen ongelmien läsnäoloon. Tämän lisäksi kokeellisessa osassa haluttiin nähdä, pystyttäisiinkö näitä ongelmia ratkaisemaan ja käyttämään organokatalyyttiä käyttämään tutkimusryhmässä tutkitun humilisiini E:n synteessin Pfau-d'Angelo vaiheeseen.

Monet katalyytin suhteen toisen kertaluvun reaktiot eivät ole kahden katalyytin reaktioita laisinkaan, sillä useat tekijät saattavat häiritä katalyytin kertaluvun suuruutta erinäisin tavoin antaen väärän kuvan reaktion kineettisestä luonteesta. Tämä voi johtaa vääriin johtopäätöksiin erityisesti reaktiomekanismeja esittäessä. Kirjallisen osan alkupää pureutuu visuaalisiin kineettisiin menetelmiin mahdollisina vaihtoehtoina toisen kertaluvun määrittämiseen ja ohessa käydään läpi katalyytin inhibiitio, saturaatiokinetiikka ja autokatalyyysi vaihtoehtoisina syinä vääriin tulkintoihin katalyytin kertaluvusta. Tämän jälkeen kirjallisuudesta nostetaan esiin useita julkaisuja, joissa väitöksinä on katalyytin suhteen toinen kertaluku ja reaktioiden esittelyn jälkeen analysoidaan, pitääkö julkaisujen esittämä väite riittävästi perusteltua erinäisin tavoin, erityisesti kineettisesti.

Kokeellisessa osassa lähtökohtana oli ensin valmistaa reaktion katalyytin kaltainen yhdiste ja sitten käyttää sitä Pfau-d'Angelo reaktioon katalyyttinä. Reaktiota analysoitiin kromatografisin menetelmin konsentraation määrittämiseksi eri ajanhetkillä, jotta reaktiosta voitiin muodostaa reaktiokineettinen aikakonsentraatioprofiili kahdessa eri lähtöainekonsentraatioissa. Tämän profiilin avulla pyrittiin määrittämään tapahtuuko reaktiossa katalyytin inhibiitiot. Tässä määrittämisessä onnistuttiin ja saadun datan perusteella pystyttiin esittämään, että katalyytti myrkyttyy reaktiossa. Katalyytti paljastui myös toimimattomaksi humilisiini E:n synteessin Pfau-d'Angelo -vaiheeseen.

## Esipuhe

Tämä *pro gradu* -tutkielma suoritettiin Jyväskylän yliopiston kemian laitoksella orgaanisen kemian osastolla loppuvuoden 2023 ja kevään 2024 aikana. Aihe rajautui ensijaisesti mielenkiinnon kohteiteni mukaisesti, mutta lopulta ohjaajan suosittelun perusteella. Opintojen aikana olen saanut kuvan, että synteetikemia ja siihen liittyvä kineettinen mekanistinen tutkimus on kiehtovaa ja pyrkimyksenä oli tältä pohjalta avartaa näkökulmia. Aiheenpiirin mukana on tullut haasteita ja ongelmia, mitkä ovat olleet positiivisia ponnahduslautoja elinikäisen oppimisen tien alkuvaiheilla. Tutkielmani kirjallinen osa käsittelee etenkin katalyytikemian erikoisempaa osa-aluetta ja kokeellinen osa pohjautuu kineettisten menetelmien käytännön soveltamiseen, mikä kokonaisuutena oli mielenkiintoinen viipale nykykemialla. Tiedonhaussa on hyödynnetty Google Scholaria, SCOPUS -, ScienceDirect, Web of Science -ja Wiley Online Library -tietokantoja sekä Reaxysia.

Tutkielmani ohjaajana toimi professori Petri Pihko ja kokeellisessa osassa ohjaajinani olivat Eeki Tarkkonen ja FT Pradip Kumar Mondal. Haluan syvästi kiittää kaikkia kolmea saamastani ohjauksesta, opeista sekä näkökulmista tutkielman teon aikana, mutta myös luottamuksesta osaamiseeni itsenäiseen työskentelyyn. Lisäksi haluan kiittää FT Teppo Leinoa toimisesta tutkielmani toisena tarkastajana. Kiitos kuuluu myös Pihko Groupille kokonaisuutena, mikä teki laboratoriotyöskentelystä nautinnollista sekä opettavaista.

*Pro gradu* -tutkielma on ollut miellyttävä kokemus ja sen haastavuus on osaltaan kasvattanut tiedonjanoani kemiaa kohtaan. Samalla se on myös edesauttanut luomaan näkökulmaa tulevaisuudesta, jossa pääsisin toteuttamaan molekyylien suunnittelua ja mekanistista tutkimusta aivan kemiantutkimuksen huipulla ja mahdollisesti toteuttamaan lopullisen unelmani kemian kautta. Lopuksi haluan kiittää hyvää ystävääni Fabian Engelhardtia henkisestä tuesta tutkielmaa tehdessä. Se on ollut korvaamaton resurssi.

Jyväskylässä

25.07.2024



Teemu Silvasti



# Sisällysluettelo

<b>Tiivistelmä</b> .....	iii
<b>Esipuhe</b> .....	iv
<b>Sisällysluettelo</b> .....	v
<b>Käytetyt lyhenteet</b> .....	vii
<b>KIRJALLINEN OSA</b> .....	xi
<b>1. Johdanto</b> .....	1
<b>2. Kahden katalyytin reaktiot</b> .....	3
2.1.    Kaksoiskatalyyttisten reaktioiden pohja.....	3
2.2.    Kaksoiskatalyyysi identtisillä ja eriävillä katalyyteillä .....	6
2.3.    Luokitteluja kirjallisuudesta.....	7
2.3.1.    MacMillanin ja Allenin luokittelu .....	7
2.3.2.    Burésin ryhmän luokittelu .....	8
2.3.3.    Tutkielmaan sovellettu luokittelu .....	10
2.4.    Esimerkki kaksoiskatalyyttisestä systeemistä.....	11
<b>3. Toinen kertaluku (katalyytin suhteen)</b> .....	13
3.1    Kertaluvun merkitys ja syyt.....	13
3.2.    Reaktiokomponenttien kertaluvun määrittäminen .....	14
3.2.1.    RPKA, Reaktion etenemisen kineettinen analyysi .....	14
3.2.2.    VTNA, Aikamuuttujan suhteen normalisoitu analyysi.....	21
3.3.    Haasteet katalyytin kertaluvun osoittamisessa.....	28
3.3.1.    Inhibiitio .....	29
3.3.2.    Saturaatiokinetiikka.....	34
3.3.3.    Autokatalyyysi.....	39
3.3.4.    Muita haasteita .....	46
3.4    Ratkaisuja haasteisiin.....	47
3.5.    Tutkielmassa käytetty kineettinen näkökulma .....	48
<b>4. Tutkimuskysymys</b> .....	49
<b>5. Analysoitavat reaktiot</b> .....	50
5.1.    Kaksoiskatalyyysi .....	50
5.1.1.    Sugiuran ryhmän konjugaattiadditio .....	50
5.1.2.    Kassin ja Fanin Friedel–Crafts -alkylaatio .....	55
5.1.3.    Kiesewetterin ja Kazakovin renkaanavauspolymerisaatio .....	58
5.1.4.    Jørgensenin ryhmän kaskadikatalyyysi .....	65
5.1.5.    Duddingin ryhmän hydroamidaatio.....	69
5.1.6.    DiRoccon ryhmän fosfori–happisidoksen muodostus .....	76
5.1.7.    Crimminin ryhmän fluoridimetateesi .....	82

5.1.8. MacMillanin ryhmän kaskadikatalyysi .....	88
5.2. Kaksoiskokatalyysi .....	91
5.2.1. Jacobsenin ryhmän Povarov -reaktio .....	91
5.2.2. Hatakeyman ryhmän Morrita-Baylis-Hillman reaktio .....	98
5.2.3. Listin ryhmän proliinikatalyysi .....	100
5.2.4. Takemoton ryhmän bifunktionaalinen tioureakatalyysi .....	102
5.2.5. Endersin ryhmän ja Jørgenssenin ryhmän sekvivenssikatalyysit .....	104
5.2.6. Leen ryhmän synergistinen katalyysi .....	108
5.3. Analyysi .....	112
5.3.1. Katsaus kaksoiskatalyysin teemoihin .....	112
5.3.2. Katsaus kaksoiskokatalyysin teemoihin .....	113
5.3.3. Tulevaisuuden näkymät .....	114
<b>6. Yhteenveto .....</b>	<b>116</b>
<b>KOKEELLINEN OSA .....</b>	<b>117</b>
<b>7. Johdanto .....</b>	<b>118</b>
<b>8. Kokeellisen osan tulokset .....</b>	<b>120</b>
8.1. Reaktio seurannan tulokset .....	120
8.2. VTNA Same excess -tulokset .....	122
8.3. Katalyyttikokeiden tulokset .....	124
8.3.1. Synteetit .....	124
8.3.2. Tulosten tarkastelu .....	130
<b>9. Kokeelliset menetelmät .....</b>	<b>133</b>
9.1. Yleiset menetelmät .....	133
9.2. Synteetit .....	134
9.2.1. ( <i>R,R</i> )-1,2-Diammoniumsykloheksaani monotartraatti <sup>150</sup> .....	134
9.2.2. <i>N,N'</i> -((1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> )-sykloheksaani-1,2-diyyli)bis(4-metyyli bentsamidi) <sup>150</sup> .....	135
9.2.3. ( <i>S,S</i> )-1,2-Diammoniumsykloheksaani monotartraatti <sup>150,152</sup> .....	137
9.2.4. 1-((1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-2-aminosykloheksyyli)-3-(3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli)tiourea hydrokloridi <sup>153</sup> .....	138
9.2.5. Bentsyyli 3-(1-metyyli-2-oksosykloheksyyli)propanoaatti <sup>154</sup> .....	140
9.2.6. Metyyli ( <i>S</i> )-3-(1-metyyli-2-oksosykloheksyyli)propanoaatti <sup>146</sup> .....	141
9.2.7. Metyyli ( <i>S</i> )-3-(1-isopropyli-2-oksosyklopentyli)propanoaatti .....	142
9.3. Reaktio seuranta .....	143
9.3.1. Näytteiden valmistus ja mittaus menetelmä .....	144
9.4. Koe yhdellä ekvivalentilla katalyyttiä .....	144
<b>10. Yhteenveto .....</b>	<b>145</b>
<b>11. Kirjallisuusluettelo .....</b>	<b>146</b>
<b>12. Liitteet .....</b>	<b>160</b>

## Käytetyt lyhenteet

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
Ad	Adamantyyli	Adamantyl
Ar	Areeni-ryhmä	Arene group
Arg	Arginiini	Arginine
Asp	Aspartaattihappo	Aspartic Acid
B	Emäs	Base
$\text{BAr}^{\text{F}_4^-}$	Tetrakis(3,5-bis(trifluorometyyli)- fenyyl)boraatti	Tetrakis(3,5-bis(trifluoro- methyl)phenyl borate
$\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4^-$	Tetrakis(pentafluorofenyyl)- boraatti	Tetrakis(pentafluoro- phenyl) borate
BTM	Bentsotetramisoli	Benzotetramisole
${}^n\text{Bu}_4\text{NF}$	Tetrabutyyliammoniumfluoridi- hydridi	Tetrabutylammonium- fluoride hydride
Cbz	Bentsyylikloroformaatti-ryhmä	Benzyl chloroformate group
CSA	10-Kamferisulfonihappo	10-Camphorsulfonic Acid
DAST	Dietyyliaminirikkitrifluoridi	Diethylamine  Sulphurtrifluoride
DABCO	1,4-diatsabisyklo[2.2.2]oktaani	1,4-diazabicyclo[2.2.2]- octane
DBU	1,8-diatsabisyklo(5.4.0.)undek- 7-eeni	1,8-diazabicyclo(5.4.0.)- undec-7-ene
DFT	Tiheysfunktionaaliteoria	Density Functional Theory

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
DHP	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyraani	3,4-dihydro-2 <i>H</i> -pyran
DMAP	4-dimetyyliaminopyridiini	4-dimethylaminopyridine
dr	Diastereomeerinen suhde	Diastereomeric ratio
DYKAT	Dynaaminen kineettinen asym- metrinen transformaatio	Dynamic Kinetic Asymmetric Transformation
E	Elektrofiili	Electrophile
<i>ee</i>	Enantioylimäärä	Enantiomeric excess
En	Enamiini	Enamine
EWG	Elektronitiheyttä puoleensavetävä ryhmä	Electron Withdrawing Group
EXSY	Vaihtospektroskopia	Exchange Spectroscopy
His	Histidiini	Histidine
HOMO	Korkein miehitetty molekyyliorbitaali	Highest Occupied Mole- cular Orbital
HOTf	Trifluorometaanisulfonihappo	Trifluoromethanesulfonic Acid
ICMR	Isosyanaattipohjainen multikompo- nenttireaktio	Isocyanide-Based Multi- component reaction
Im	Iminium	Iminium
kat	Katalyytti	Catalyst
KSIE	Kineettinen liuotin isotooppiefekti	Kinetic Solvent Isotope Effect
LA	Lähtöaine	Starting material
LAK	Laktidi	Lactide

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
LG	Lähtevä ryhmä	Leaving Group
LUMO	Alin tyhjä molekyyliorbitaali	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
Me	Metyyli-ryhmä	Methyl-group
Me <sub>6</sub> TREN	Tris 2-(dimetyyliamino)etyyli amiini	Tris 2-(dimethyl- amino)ethyl amine
MS	Massaspektrometria	Mass Spectrometry
NBSA	<i>ortho</i> -nitrobentseenisulfonihappo	<i>ortho</i> -Nitrobenzene Sulfonic Acid
NHC	<i>N</i> -heterosykli	<i>N</i> -hetero cycle
NMR	Ydinmagneettinen Resonanssi	Nuclear Magnetic Reso- nance
NOE	Ytimen Overhauser -ilmiö	Nuclear Overhauser Effect
Nu	Nukleofiili	Nucleophile
<i>O</i> -MAT	<i>O</i> -monoasyylitartaarihappo	<i>O</i> -monoacyltartatic Acid
Ph	Fenyyliryhmä	Phenyl group
PT	Fenyylitetrasoli	Phenyltetrazole
PMDETA	Pentametyylidietyleenitriamiini	Pentaethyldiethylenetri- amine
R	Muuttuja -ryhmä	Variable group
<i>rac</i>	Raseeminen	Racemic

<u>Lyhenne</u>	<u>Suomeksi</u>	<u>Englanniksi</u>
RDS	Reaktionopeuden määrävä vaihe	Rate determining step
ROP	Renkaanavauspolymerisaatioreaktio	Ring Opening Poly- merization Reaction
RPKA	Reaktion etenemisen kineettinen analyysi	Reaction Progress Kinetic Analysis
S	Substraatti	Substrate
T	Tuote	Product
TACN	1,4,7-Triazasyklononaani	1,4,7-Triazacyclononane
TBAF	Tetra- <i>n</i> -butyylammoniumfluoridi	Tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
TFA	Trifluoroetikkahappo	Trifluoroacetic acid
TMEDA	Tetrametyylietyleenidiamiini	Tetramethylethylenedi- amine
TMS	Trimetyylisilaaniryhmä	Trimethylsilane group
TOF	Time-of-Flight	Time-of-Flight
TS	Siirtymätila	Transition state
U	Uraasiili	Uracil
VL	$\delta$ -Valerolaktoni	$\delta$ -Valerolactone
VT/IM	Välituote	Intermediate Product
VTNA	Aikamuuttujan suhteen normalisoitu analyysi	Variable Time Normali- zation analysis

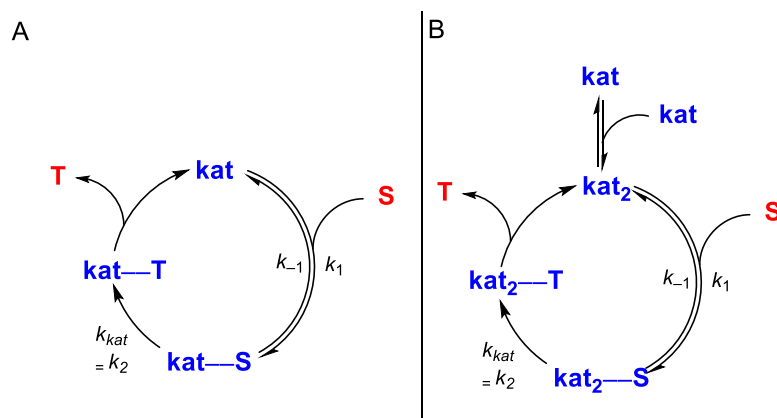
## **KIRJALLINEN OSA**

## 1. Johdanto

Klassisen katalyytikemian perustana on se, että reaktiossa on mukana yhdiste, joka muuttaa reaktiomekanismia ja nopeuttaa näin reaktiota. Tämä johtuu siitä, että katalysoidulla reaktiopollulla on alempi aktivaatioenergiavalli, jolloin katalyytin avustamana tuotetta muodostuu aikayksikköä kohti suurempi määrä verrattuna katalysoimattomaan reaktioon. Kahden eri katalyytin reaktioissa tämä periaate ei muutu. Reaktion nopeuttamiseen tarvitaan tällaisissa reaktioissa vain kaksi katalyyttiä, esimerki niin, että kahden eri katalyytin muodostama kompleksi on nopeampi katalyytti ja nopeuttaa katalyyttien syklin hitainta vaihetta. Katalyytit voivat myös vaikuttaa katalyyttisen syklin eri vaiheisiin. Esimerkiksi yksi katalyytti voisi toimia kuten klassisessa katalyysissä ja madaltaa aktivaatioenergiaa, kun taas toinen katalyyteistä taas aktivoisi substraattia ja tuottaisi reaktiivisemmän välituotteen.

Katalyysireaktioita voidaan tutkia reaktiokineettisesti ja yksi katalyytteihin liittyvä kineettinen tutkimusala kohdistuu katalyytin kertalukuun. Burés *et al.*<sup>1,2</sup> näkevät katalyytin kertaluvun merkityksen katalyysireaktioissa olevan perustavanlaatuinen reaktiomekanismeja tutkittaessa. Tätä Burés perusteli sillä, että katalyytin kertalukua analysoimalla voidaan verrata eri reaktionopeuslakeja eri reaktiomekanismien kohdalla.<sup>2</sup> Tämä vertailu sitten antaa pohjan jatkotutkimuksille, jotta se reaktion todennäköisempi mekanismi saataisiin selville vaihtoehtoista.

Kaaviossa 1 on esitetty yksinkertaistettu katalyyttinen sykli:



Kaavio 1. Yksinkertaistetut katalyyttiset syklit A) yhdellä katalyytillä ja B) katalyytin dimeerikompleksilla.



Yksinkertaisimmissa tapauksissa katalyytin kertaluku on reaktiossa yksi ja sen käyttäytyminen reaktiossa on kuvattu kaaviossa 1A. Katalyyttimolekyylä sitoutuu substraattiin **S** ja muodostaa kompleksin **kat:S**. Tämä kompleksä voi sitten reagoida edelleen toisen substraatin kanssa tai vaikka kaaviossa 1A olevassa tapauksessa mahdollistaa substraatin lohkeamisen. Tästä muodostuisi uusi kompleksä, esimerkiksi **kat:T**, mistä sitten tuote irtoaisi erilleen samalla regeneroiden katalyytin. Jos katalyytin kertaluku olisikin kaksi, olisi katalyyttinen sykli esimerkiksi kaavio 1B:n kaltainen. Tässä tapauksessa katalyyttimolekyylä muodostaisi dimeerikompleksin, mikä toimisi reaktiossa aktiivisena katalyyttinä monomeerikatalyytin sijaan. Kahden katalyytin reaktioissa toinen kertaluku katalyytin suhteen ilmenisi, kun katalyytit olisivat identtisiä. Vastaavasti jos katalyytit eivät ole identtisiä ei tätä toista kertalukua havaittaisi kinetiikkaa tutkittaessa. Kaavion syklit ovat kuitenkin yksinkertaistuksia ja esitettyjen kompleksien välille mahtuu mahdollisesti useampia vaihteita.

Tutkielman tavoitteena on tutustua kaksoiskatalyyttisiin reaktioihin (luku 2) käyden samalla läpi tarkemmin kineettisesti merkittäviä konsepteja, jotka liittyvät katalyyysiin (luku 3). Tässä tutkielmassa kaksoiskatalyyttisillä reaktioilla tarkoitetaan reaktioita, joissa katalyyttiseen sykliin osallistuu kaksi katalyyttispesiästä (luku 5). Nämä katalyytit ovat joko samoja (luku 5.1.) tai eriäviä yhdisteitä (luku 5.2.). Tutkielman esimerkit ovat pääasiallisesti organokatalyyttejä, mutta vastaavia esimerkkejä on myös metalli- tai organometallikatalyyysin parissa. Tutkielmassa käydään myös läpi kirjallisuudesta poimittuja luokittelujärjestelmiä kaksoiskatalyyttisille reaktioille (luku 2.3) antaen näkökulmaa, miten reaktioita on tähän mennessä käsitelty. Kineettisistä konsepteista pääasiallisesti tutkielma keskittyy katalyytin kertaluvun määrittämiseen (luku 3.2.) ja siihen liittyviin haasteisiin (luku 3.3.). Viimeisenä osa-alueena tutkielman kirjallisessa osassa on analyysi (luku 5.3.), jossa pyritään esittämään miten tutkimuksissa on mekanismeja perusteltu ja käydä läpi ovatko perustelut riittävät. Samalla pyritään myös näyttämään miten tämänkaltaisesta tutkimuksesta katalyyttien kohdalla voisi olla hyötyä tulevaisuuden kannalta katalyytikemian parissa.

## 2. Kahden katalyytin reaktiot

Tässä luvussa käsitellään kahden katalyytin systeemien perusteita. Kahden katalyytin systeemejä kutsutaan tästä edes 'kaksoiskatalyysiksi'. Luvussa 2.1 pohjustetaan kyseisten reaktioiden piirteitä. Luvussa 2.2. käydään läpi identtisten katalyyttien -ja eriävien katalyyttien kaksoiskatalyysin eroja. Luvussa 2.3. käsitellään kirjallisuudesta poimittuja luokitusjärjestelmiä. Nämä luokitukset eivät ole virallisia IUPACin ohjeistuksia, vaan pääasiassa ne ovat eri tutkimusryhmien näkökulmia aiheeseen. Näkökulmat ovat kuitenkin hyviä avartamaan aiheen mahdollisuuksia. Alaluvussa 2.3.3. muodostetaan tutkielmassa käytetty näkökulma kahden katalyytin reaktioiden luokittelusta katalyyttiyhdisteiden identiteetin perusteella.. Viimeisenä luvussa 2.4. otetaan esimerkiksi Sunojin ja Bhaskararaon<sup>3</sup> esittämä kaksoiskatalyyttinen reaktio näyttäen sen mekanismin kokonaisuudessaan.

### 2.1. Kaksoiskatalyyttisten reaktioiden pohja

Synteesit katalyyttien avulla ovat hyvin tärkeitä ja käytännöllisiä modernin kemian kannalta<sup>4,5</sup>, koska katalyyttien avulla voidaan tehdä reaktioita, mitkä ovat muuten saavuttamattomissa tai vaihtoehtoisesti ovat teollisesta näkökulmasta liian kalliita.<sup>6</sup> Katalyyttiset reaktiot ovat myös vaihtoehtona reaktioille, joissa käytössä on stoikiometriset määrät reagensseja. Lisäksi kyseiset stoikiometriset reaktiot ovat usein haastavia reaktio-olosuhteiltaan. Nämä olosuhteet voivat olla hyvinkin korkea lämpötila tai paine, myrkylliset ja muuten haitalliset reagenssit tai liuottimet sekä korkeat reagenssien konsentraatiot. Haasteena on myös reaktioiden käyttö laajemmissa mittasuhteissa reagenssien hinnan takia, mikä voi olla teollisesti kannattamatonta.<sup>6</sup> Katalyytit itsessään teoreettisesti eivät kulu reaktiossa ja niitä käytetään merkittävästi pienempiä määriä. Tämä mahdollistaa ekonomisesti kannattavampaa kemiaa. Pyrkimyksenä katalyysikemiassa on hyvien aktiivisuuksien, selektiivisyyksien ja laajan substraattivalikoiman saavuttaminen samalla pitäen reaktio-olosuhteet mietoina, mikä edesauttaa ekonomista kannattavuutta huomattavasti.<sup>5</sup>

MacMillan ja Allen totesivat:

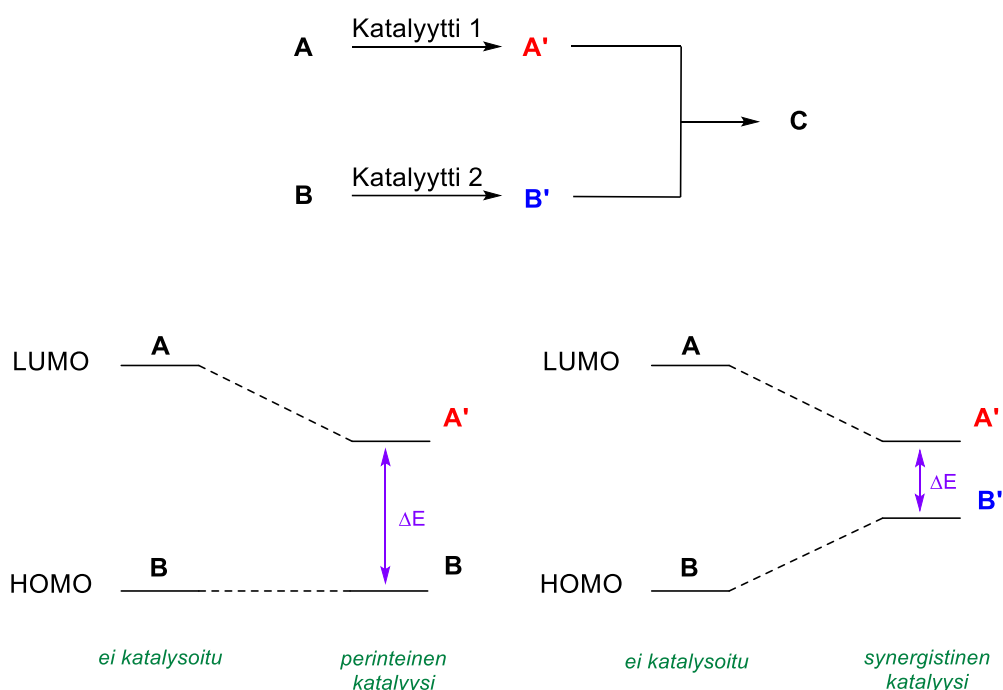
”This powerful catalysis strategy leads to several benefits, specifically synergistic catalysis can (i) introduce new, previously unattainable chemical transformations, (ii) improve the efficiency of existing transformations, and (iii) create or improve catalytic enantioselectivity where stereocontrol was previously absent or challenging.” [4]

Vaikkakin MacMillan ja Allen kohdistavat tämän näkemyksen synergisteen katalyysiin, voidaan näkemystä laajentaa muille multikatalyyttisille systeemeille. Perusteena tähän on se, että MacMillanin ja Allenin mainitsemat seikat eivät ole ainutlaatuisia synergistiselle katalyysille. Yleisesti ottaen katalyytit ovat hyvin spesifejä ja usein reaktiot saadaan toimimaan vain ainutlaatuisen katalyytin avulla ja vain yhden tyyppiselle substraatille.<sup>4</sup> Klassinen katalyysi kuitenkin on tuottanut laajan valikoiman reaktiopolkua ja reaktiotyyppejä useiden vuosikymmenien ajan. Saavutettua laajaa reaktioiden kirjoa voitaisiin siis laajentaa huomattavasti multikatalyyttisillä reaktioilla ja mahdollisesti jopa toteuttaa reaktioita, jotka muuten ovat käytännöllisesti mahdottomia.<sup>4</sup> Ajatuksena multikatalyyttiset reaktiot eivät ole mitenkään uusi. Luonto itsessään suosii tietyissä reaktioissa tai reaktiopoluissa tämän tyyppisiä systeemejä ja tietyt entsyymit toimivat kaksoiskatalyyttisesti.<sup>4,7</sup> Tästä esimerkkinä voidaan pitää tetrahydrofolaattia, joka on tärkeä koentsyymi hiiliyksiköiden siirtoihin. Tetrahydrofolaatti muodostuu dihydrofolaatista, joka on foolihapon metabolaatti, imiiniyksiikköön tapahtuvan vetysiirron takia. Entsyyminä toimiva dihydrofolaattireduktaasi aktivoi dihydrofolaatin kohti hydridiadditiota, kun imiini protonoituu. Samaan aikaan hydridi aktivoituu  $\text{NADP}^+$  koentsyymien avulla muodostaen  $\text{NADPH}$ :n. Muodostuva  $\text{NADPH}$  sitoutuu dihydrofolaattireduktaasiin tuoden mukanaan tarvittavan hydridin, minkä johdosta reaktiossa muodostuu tetrahydrofolaattia ja  $\text{NADP}^+$  regeneroituu. Reaktiossa siis on siis kaksi entsyymiä, dihydrofolaattireduktaasi ja tetrahydrofolaatti, yhtäaikaan aktivoimassa reagensseja, mikä on kaksoiskatalyyttisten reaktioiden perusolemus.<sup>4</sup>

Ongelmana multikatalyyttisissä systeemeissä on se mahdollisuus, että katalyytit reagoivat keskenään ei toivotulla tavalla.<sup>4,8</sup> Tämä voi johtaa reaktion sammumiseen itsestään tai reaktion inhibiitioon monin eri tavoin, kuten Lewis hapon ja -emäksen kompleksoitumisen johdosta.<sup>4</sup> Vaihtoehtoisesti on myös mahdollista, että katalyytti-katalyytti interaktiot tuottavat kompleksin, jonka tekemän katalyysireaktion tuotteena on jotain muuta kuin suunniteltu kohdemolekyylä. Kinetiikka voi olla toisena haasteena kaksoiskatalyyttisissä reaktioissa.<sup>4</sup> Mitä

enemmän reaktiokomponentteja tarvitaan reaktiovaiheeseen, sitä epätodennäköisempää itse tapahtuma on. Tämä tulee suoraan törmäysteorian<sup>9-11</sup> pohjalta. Koska katalyyttien konsentraatio reaktioissa on yleisesti ottaen hyvinkin matala stoikiometrisiin konsentraatioihin nähden, törmäysteorian tuoma näkökulma korostuu entisestään. Kyseinen seikka näkyy makroskooppisesti reaktionopeuden hidastumisena, mikä voi tapauskohtaisesti vaikeuttaa reaktioita.

Haasteet ovat tietysti vain hidasteita. Esimerkiksi katalyytti-katalyytti vuorovaikutuksia voi ennaltaehkäistä valitsemalla katalyytit tarkoin ja seulomalla yhdistepareja siten, että katalyytti-inhibiition mahdollisuus katalyyttien välillä on epätodennäköisempää. Tämä seulonta ei tietenkään ole täydellistä, mutta ennaltaehkäisevän suunnittelun avulla voidaan edesauttaa multikatalyyttisten systeemin lähtökohtia. Samoin kinetiikan puolesta voidaan katalyytit valikoida siten, että energiavallieron kaventaminen mahdollistaa reaktiot kuten MacMillan ja Allen esittivät synergistisen katalyyysin kohdalla.<sup>4</sup> Ajatuksena heillä oli kaavion 2 mukainen tilanne, jossa toisella katalyytillä aktivoidaan molempia substraatteja tehostaen klassisen katalyyysin ideaa.



Kaavio 2. MacMillanin ja Allenin konsepti synergistiselle katalyyysille.<sup>4</sup>

Käytännön toteutustapana ja yhtenä tutkimuskohteena monikatalyyttisille reaktioille on ns. ”yhden astian katalyyysi” (one-pot catalysis)<sup>8,12-17</sup>, jossa samassa reaktioseoksessa on useita keskenään yhteistyössä toimivia katalyyttejä. Terminä yhden astian katalyyysi ei kuitenkaan

esitä kantaa siihen, toimivatko katalyytit saman katalyyttisen syklin alla vai peräkkäisissä reaktioissa. Tämän yhden astian katalyyysin vahvuus on se, että välituotteita ei tarvitse eristää tai puhdistaa. Kyseinen vahvuus voi vähentää ajankäyttöä, työmäärää sekä saantojen vähenemistä niin merkittävästi, että vaihtoehtoiset ”monen astian katalyytit” ovat kannattamattomia eri resurssien käytön suhteen esimerkiksi pitkien totaalisynteesireittien kohdalla.<sup>8</sup>

## 2.2. Kaksoiskatalyyysi identtisillä ja eriävillä katalyyteillä

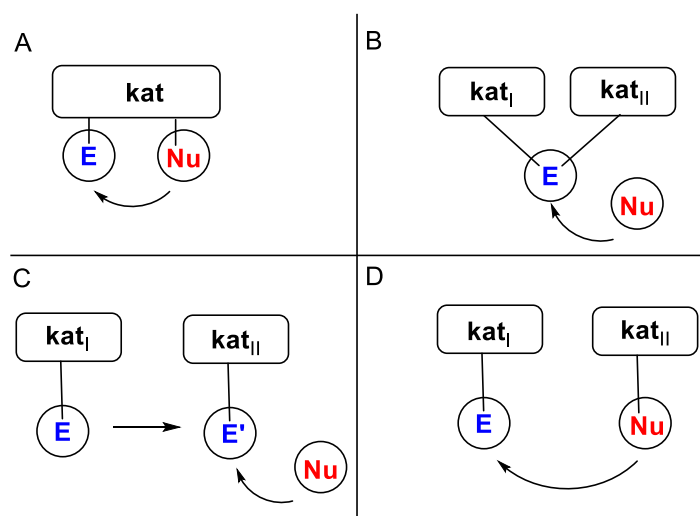
Reaktioita, joissa molemmat katalyytit ovat identtisiä keskenään, voidaan pitää kaksoiskatalyyysin alakategoriana. Terminä tähän voidaan käyttää kaksoiskatalyyysiä. Tämän kaltaisten tapausten erikoisuutena on se, että reaktiokineettisestä näkökulmasta voi katalyytin kertaluku olla muuta kuin yksi. Kuitenkin katalyytin kertaluvun eriävyys yhdestä ei takaa reaktion olevan kaksoiskatalyyttinen. Katalyytin kertalukua käsitellään tarkemmin myöhemmin tutkielmassa luvussa 3 samalla esitellen miten kaksoiskatalyyttisiä systeemejä voidaan tutkia kineettisesti.

Vastaavasti kahdella eriävällä katalyytillä tapahtuvat kaksoiskatalyyttiset reaktiot ovat mielenkiintoisia, koska kumpikin katalyytti voidaan valikoida reaktioon periaattessa itsenäisesti. Tämän kaltaisten systeemien kohdalla terminä voidaan käyttää kaksoiskokatalyyysiä, jotta tämän kaltaiset kaksoiskatalyyysireaktiot voidaan erottaa kaksoiskatalyyysitapauksista. Esimerkkinä voidaan pitää MacMillanin ryhmän ajatusta<sup>18</sup> diskreetistä kontrollista katalyyteillä. Heidän tutkimuksessaan<sup>18</sup> esitetyn mekanismin avulla voitaisiin modulaarisesti hallita enantio- ja diastereoinduktiota eli *R* vs. *S* ja *syn* vs. *anti* konfiguraatioita valitsemalla reaktiossa käytettyjen kaksoiskatalyyttien enantiomeerit sopivasti reaktion eri vaiheisiin. Tätä käsitellään tarkemmin luvussa 5.1.8.

## 2.3. Luokitteluja kirjallisuudesta

### 2.3.1. MacMillanin ja Allenin luokittelu

Multikatalyyttisiä reaktiota on pyritty luokittelemaan monin eri tavoin. MacMillan ja Allen<sup>4</sup> jakavat reaktiot bifunktionaaliseen katalyyysiin, kaksoisaktivaatiokatalyyysiin (double activation catalysis), kaskadikatalyyysiin (cascade catalysis) ja synergistiseen katalyyysiin.<sup>4</sup> Nämä vaihtoehdot ja niiden pääasialliset erot yksinkertaistettuna ovat esitettynä kuvassa 1:



Kuva 1. MacMillanin ja Allenin katalyyttisten systeemien luokitus, kun käytössä on kaksi katalyyttiä. A) Bifunktionaalinen katalyyysi, B) Kaksoisaktivaatiokatalyyysi, C) Kaskadikatalyyysi ja D) Synergistinen katalyyysi.<sup>4</sup>

Bifunktionaaliset katalyytit aktivoivat sekä nukleofiilin ja elektrofiilin yhtäaikaaisesti käyttäen eri funktionaalisia ryhmiä *yhden* katalyytin rakenteesta. Kun kaksi eri katalyyttiä aktivoivat vain toisen reagenssin, mutta yhteistuumiin, kyseessä on kaksoisaktivaatiokatalyyysi. Kaskadikatalyyysissä aktivoidaan vain toinen reagensseista, mutta sekvivenssinsä eli ensimmäinen katalyyttisen aktivaation ja kierron tuottama välituote aktivoituu toisen katalyytin toimesta siirtyen uuteen, erilliseen kiertoon. Viimeisenä on synergistinen katalyyysi, jossa kaksi eri katalyyttiä aktivoivat kumpikin erikseen toisen lähtöaineista ja muodostuneet välivaiheet reagoivat tämän jälkeen keskenään.<sup>4</sup>

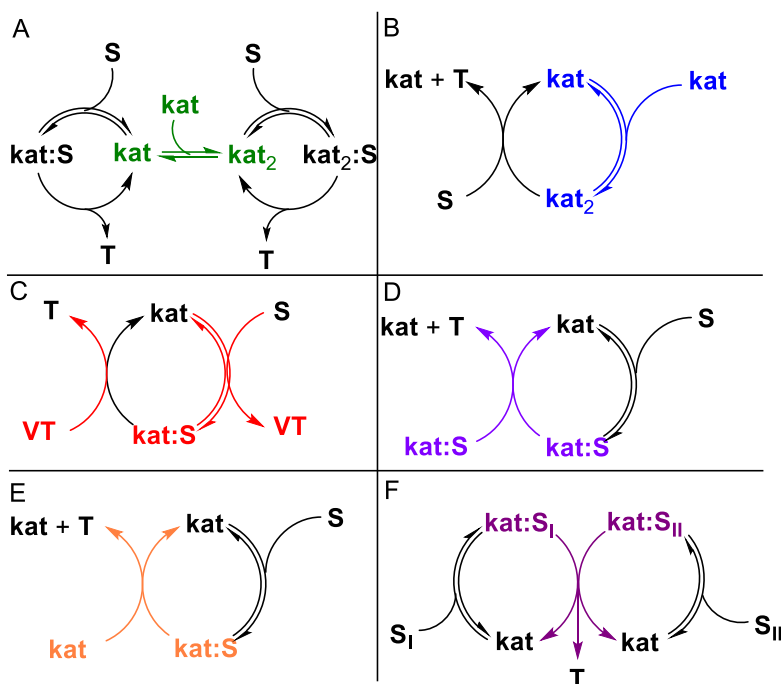
Luokittelun vahvuutena on sen yksinkertaisuus. Eri reaktiotyypit jakautuvat selkeästi omiin kategorioihinsa ja kategoriat itsessään eivät käsittele mekanistisesti samankaltaisia systeemejä. Visuaalisesti on siis helpohkoa erottaa esimerkiksi Kaskadikatalyyysi synergistisestä

katalyyseistä pelkän esitetyn mekanismin avulla. Kuitenkin MacMillan ja Allen eivät luokittelussaan esittele suoranaisia mekanismeja vaan kyseessä on, kuten edellä on esitetty, mallit ja niiden soveltaminen kuuluu tapauskohtaisesti tutkijoille itselleen. Täten esimerkiksi kirjallisuudessa ei välttämättä reaktioita esitetä kyseisen luokituksen avulla vaikkakin sille mahdollisuus olisi. Kritiikkinä MacMillanin ja Allenin luokitukselle on bifunktionaalisen katalyyssi, missä siis mekanismit reaktioille ovat erilaisia kuin muut kaksoiskatalyyttiset reaktiot, koska katalyyttejä on reaktioissa vain yksi. Tutkielmassa kuitenkin esitetään bifunktionaaliset katalyyssit kaksoiskatalyyttisinä reaktioina perustuen MacMillanin ja Allenin luokitukseen.

Patil *et al.*<sup>12</sup> esitti hyvin samanlaisen luokittelun kaksoiskatalyyttisille reaktioille perustuen aikaisemmin mainittuun ”yhden astian katalyyssiin”.<sup>12-17</sup> Erona luokituksilla on se, että Patilin ryhmän luokittelu käsittelee useamman erillisen katalyyssisyklin reaktioita, mikä toimii perustana kaksoiskatalyyttisyydelle reaktioissa.

### 2.3.2. Burésin ryhmän luokittelu

Burés *et al.*<sup>1</sup> jakoivat kaksikatalyyttiset reaktiot ensin tapauksiin, missä katalyytille tapahtuu dimerisaatio joko katalyyttisen syklin ulkopuolella (off-cycle) (kaavio 3A)<sup>1,19</sup> tai osa katalyyttistä sykliä(on-cycle). Jälkimmäisistä tapauksista oli useita esimerkkejä (kaavio 3B-F)<sup>1</sup>. Näitä olivat dimerisaatio kahden vapaan katalyyttispesieksen välillä (on-cycle dimerization of free catalyst) (kaavio 3B)<sup>1,20</sup>, katalyytti-substraatti kompleksin dimerisaatio toisen vastaavan kompleksin kanssa (on-cycle dimerization of downstream species) (kaavio 3D)<sup>1,21</sup>, katalyytti-substraatti kompleksin aktivoituminen toisen katalyytin avulla (parent-offspring species) (kaavio 3E)<sup>1,22</sup> ja kahden eri substraatin muodostamien katalyytti-substraatti kompleksien välinen reaktio (sibling species) (kaavio 3F)<sup>1,23</sup>. Burés nostaa myös esimerkiksi tapauksen (kaavio 3C)<sup>1,24</sup>, jota Martín-Matute ryhmän tutkimus<sup>24</sup> esitti kahden katalyytin reaktioksi, mutta mekanismin perusteella reaktiossa on vain yksi katalyytti. Tässä tapauksessa katalyytti nopeuttaa kuitenkin sekä välituotteen VT muodostumista että VT:n ja substraatin välistä reaktiota tuotteeksi. Tästä syystä reaktio voi kineettisesti olla toista kertalukua katalyytin suhteen, mikä voi johtaa siihen, että reaktion katalyyttisessä syklissä tulkitaan virheellisesti olevan kaksi katalyyttiä.<sup>24</sup> Tätä tapausta käsitellään tarkemmin luvussa 3.3.1.



Kaavio 3. Burésin *et al.*<sup>1</sup> esimerkit kaksoiskatalyyttisistä sykleistä. A) kierrosta erillisessä vaiheessa tapahtuva dimerisaatio<sup>1,19</sup>, B) Kahden vapaan katalyytin dimerisaatio<sup>1,20</sup>, C) Yksi katalyytti ja sen muodostava katalysoiva välituote<sup>1,24</sup>, D) katalyytti-substraatti kompleksi reagoi toisen vastaavan kompleksin kanssa<sup>1,21</sup>, E) katalyytti-substraatti kompleksi aktivoituu uudestaan katalyytin toimesta<sup>1,22</sup> ja F) kahden substraatin reaktio, missä substraateista muodostuvat kompleksi reagoivat keskenään synergistisesti<sup>1,23</sup>. **kat** = katalyytti, **S** = substraatti, **T** = tuote ja **VT** = välituote.

Burésin ryhmän esittämät mekanismit ovat yksinkertaistuksia oikeisiin tapauksiin nähden. Erona on se, että Burés tuo mukanaan kineettisen näkökulman, mikä edesauttaa esimerkiksi erottamaan kaksoiskatalyyysin ja kaksoiskokatalyyysin toisistaan. Mekanismeista kuitenkin puuttuu katalyytti–tuote -kompleksin muodostus, mikä tapahtuisi katalyytti–substraatti -kompleksin muodostumisen jälkeen syklissä. Nämä esitetyt esimerkkimekanismit kuvastavat oikeastaan epärealistista tilannetta, jossa tuote muodostuisi välittömästi katalyytti–substraatti -kompleksista ja kompleksin dissosiaation kinetiikka voisi olla reaktionopeutta määräävä. Voidaan epäillä, että tätä Burésin ryhmä olisi tätä tarkoittanut, mutta esitetyt yksinkertaistukset voivat tällaisen kuvan antaa. Synteettisillä katalyyteillä on kuitenkin hyvin harvinaista, että reaktiokineettisesti merkittävä katalyytin ja muodostuneen tuotteen dissosiaatio olisi nopeutta määräävä vaihe. Tällainen kinetiikka on pikemminkin entsyymien piirre ja täten tällainen analyysi ei sovellu synteettisten katalyyttien tarkasteluun ilman syvempiä perusteluja.



Alaluvussa 2.4. on esiteltyä esimerkkinä kaavio 3B:n tapaus laajemmin esimerkkinä siitä, miten paljon yksinkertaistusta Burésin ryhmä on tehnyt mallisyklejä muodostaessaan.

Myös mekanismeissa voidaan nähdä tilanteita, missä voi olla haastavaa käytännössä esittää eroavaisuuksia reaktioille. Esimerkiksi mekanismit B ja E (kaavio 3B ja kaavio 3E) ovat tilanteista, missä katalyytti-substraatti -kompleksi on lopulta trimeerinen, mutta mekanismien erona on ainoastaan kompleksin komponenttien sitoutumisjärjestys. Koska kaikki hitaimmat reaktiovaiheet syklissä voidaan nähdä (esi)tasapainoina, on vaikea arvioida onko yhdisteiden sitoutumisen järjestyksellä merkitystä. Tässä kohtaa pitäisi perustella kineettisesti tavalla tai toisella, että eri järjestys johtaisi erilaiseen lopputulokseen tai eri kinetiikkaan. Burésin luokittelun pääpaino on ollut mahdollistaa eri katalyysityyppien luokittelu esimerkinomaisesti eikä laatia kaiken kattavaa yleistä luokitusjärjestelmää. Mutta jos on pyrkimyksenä luoda eroa mekanismien B ja E välille, olisi oleellista esittää perusteluja asian suhteen.

### 2.3.3. Tutkielmaan sovellettu luokittelu

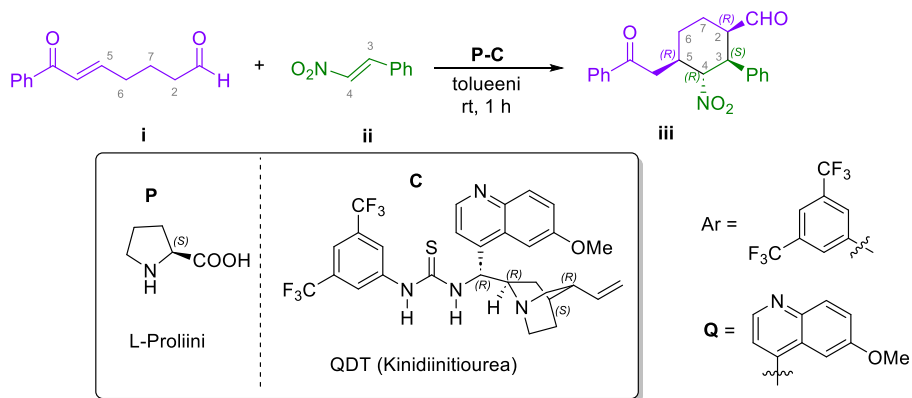
Vaikka esitetyt luokittelut ovat päteviä ja niitä on käytetty kirjallisuudessa laajalti, ne ovat kuitenkin vain yksittäisten tutkimusryhmien esittämiä näkökulmia sen sijaan, että kyseessä olisi esimerkiksi IUPAC:n määrittelemä termistö. Täten niiden käyttöä on syytä tarkastella kriittisesti. Tästä syystä tässä tutkielmassa sovelletaan hieman toisenlaista jaottelua. Pääasiassa kaksoiskatalyyttiset reaktiot luokitellaan joko identtisten katalyyttien kaksoiskatalyysireaktioihin eli kaksoiskatalyysihin ja eriävien katalyyttien kaksoiskatalyysireaktioihin eli kokatalyysihin, kuten luvussa 2.2. esitettiin. Tämän lisäksi kuitenkin voidaan käyttää esiteltyjä luokituksia luomaan näkökulmaa ja mahdollisesti tuomaan syvyyttä analyysihin eri reaktioiden kohdalla. Etenkin kaksoiskatalyysin kohdalla on helpompaa esittää reaktiot toisistaan erillään MacMillanin kaltaisen luokituksen avulla. Vaikka kyseisessä luokituksessa ei mekanismeja esitetä, on kyseinen luokitus hyvin yksinkertainen ja täten helpohko käsiteltävä. Tämän lisäksi pääasiallisesti tutkielmassa pyritään käyttämään Burésin ryhmän esimerkkejä hyödyksi kaksoiskatalyysireaktioita tarkastelllessa, sillä Burésin mekanismien luonne antaa tietyn kaltaista rakeisuutta muuten hyvinkin samankaltaisiin tapauksiin.

## 2.4. Esimerkki kaksoiskatalyyttisestä systeemistä

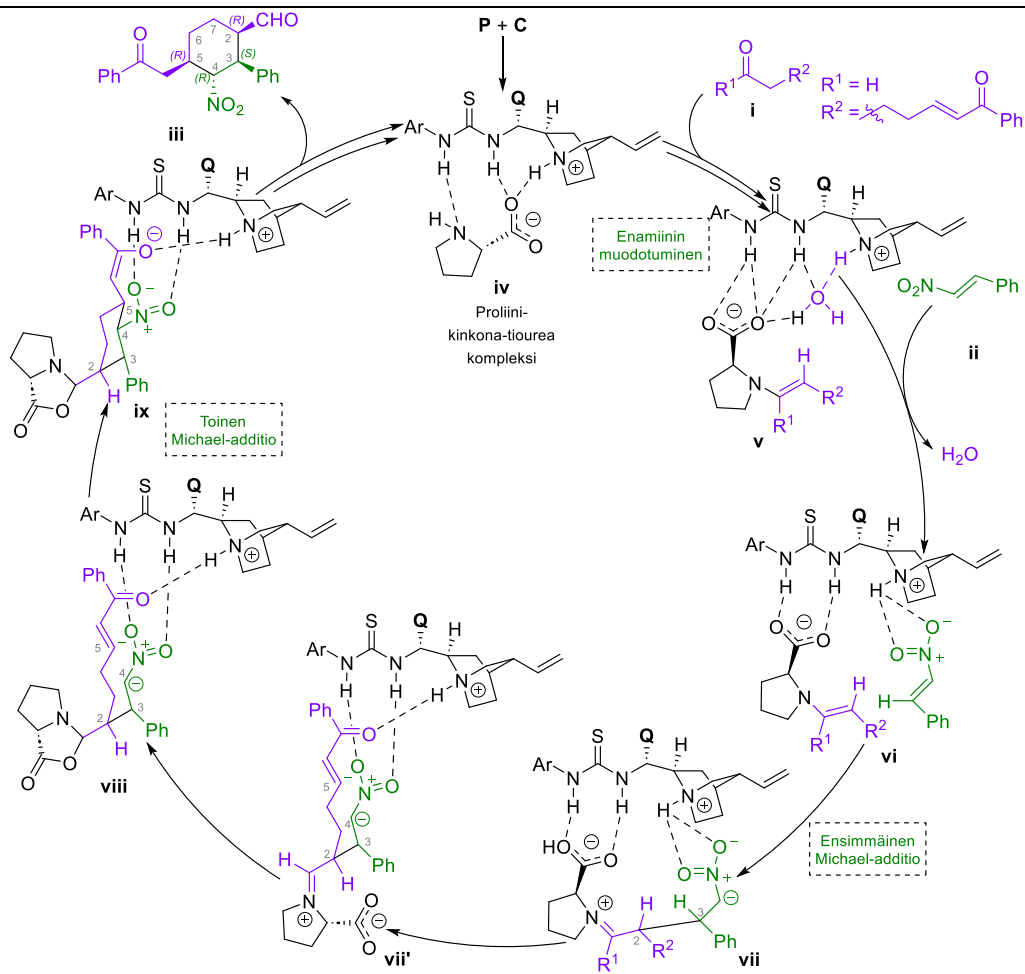
Samalla kun tutkielmassa esitetään kaksoiskatalyyttinen systeemi tarkemmin, voidaan myös perustella miksi Burésin ryhmän mallisyklit ovat yksinkertaistuksia todellisuuteen nähden. Esimerkiksi valikoitui Sunojin ja Bhaskararaon<sup>3</sup> tutkimus kahden kiraalisen organokatalyytin yhteistyöstä. Tarkemmin itse tutkimukseen ei tarvitse perehtyä tässä vaiheessa, mutta siinä esitetty mekanismi (kaavio 4B) on sopiva tarkoitukseen. Burésin ryhmän mallisyklin (kaavio 3B) mukaisesti tuote muodostuisi välittömästi katalyytin dimeerikompleksin muodostumisen jälkeisessä vaiheessa. Mallisykliä (kaavio 3B) käytetään, koska katalyytin dimeerikompleksin muodostumisen voidaan nähdä tapahtuvan osana kokonaissykliä ja esimerkiksi Burésin mallisyklin (kaavio 3A) kaltaista erillistä monomeerin katalysoimaa reaktiota ei esitetty Sunojin ja Bhaskararaon<sup>3</sup> tutkimuksessa. Esimerkkimekanismissa tämä tapahtuisi siis kompleksin **iv** muodostumisen jälkeen. Kaavion mekanismissa on kuitenkin vielä useampi vaihe tämän vaiheen jälkeen. Burésin malli myös antaa ymmärtää, kuten aikaisemmin mainittiin, että tuotteen dissosiaatio katalyyttikompleksista olisi kineettisesti merkitsevä. Sunojin ja Bhaskararaon mekanismissa tämä kuitenkin ei olettavasti pidä paikkaansa. Reaktionopeuden määräävää vaihetta (RDS) ei ole määritetty, sillä tutkimuksessa ei tehty tarkempia kineettisiä kokeita<sup>3</sup>. Kuitenkin mekanismin yhteydessä todetaan, että vain oleelliset vaiheet ovat esitetty<sup>3</sup> ja mekanismissa oleva kahden nuolen vaihe tuotteen dissosiaation kohdalla tarkoittaisi, ettei mekanismin tämä vaihe ole kineettisesti merkitsevä. Tietenkin on varmasti mahdollista, että dissosiaatiovaihe olisi katalyyttisen syklin nopeutta rajoittava, mutta tämä pitäisi osoittaa kokeellisesti.

Sunojin ja Bhaskararaon reaktio on hyvä kokonaisvaltainen esimerkki kahden katalyytin systeemistä. Se myös esittää ehkä sen yleisimmän tapauksen vastaavista reaktioista: reaktioissa katalyytit muodostavat dimeerikompleksin ja tämä kompleksi toimii reaktiossa aktiivisena katalyyttinä. Tämän Sunoj ja Bhaskararaon<sup>3</sup> perustelivat huomattavalla reaktionopeuden kasvulla, kun molemmat katalyytit olivat reaktiossa läsnä yksittäisiin yhdisteisiin verrattuna. Burésin ryhmän mallit myös esittävät vaihtoehtoisia tapauksia, missä kompleksit ovatkin trimeerejä tai jopa tetrameerejä. Näitä käydään tutkielmassa tarkemmin läpi luvussa 5.

A



B

Kaavio 4. A) Sunojin ja Bhaskararaon reaktio ja B) reaktion esitetty mekanismi.<sup>3</sup>

### 3. Toinen kertaluku (katalyytin suhteen)

Kertaluvut ovat mekanistinen piirre, joiden pääasiallisena tarkoituksena on edesauttaa mekanistista tulkintaa reaktioiden kohdalla reaktiokomponentteihin liittyen. Yleisesti ottaen katalyytin kertaluku on antamassa osviittaa sen mekanistisesta osallistumisesta reaktionopeuden määräävään vaiheeseen. Kaksoiskatalyyttisten reaktioiden kohdalla siis katalyyttien kertaluvuilla voidaan esittää onko molemmat katalyytit osallisena reaktiossa kineettisesti merkittävässä roolissa. Tätä voidaan käyttää hyödyksi eritoten, kun pyritään selvittämään kaksoiskatalyysireaktioiden luonnetta, koska niiden kohdalla katalyytin kertaluvun pitäisi olla kaksi. Luvussa käsitellään kahta eri menetelmää, RPKA:ta eli reaktion etenemisen kineettistä seuranta ja VTNA:ta eli aikamuuttujan suhteen normalisoitua analyysiä, reaktiokertaluvun määrittämiseen.

#### 3.1 Kertaluvun merkitys ja syyt

Kun reaktio on toista kertalukua, reaktionopeuslaissa esiintyvä nopeus  $v$  on verrannollinen kahden reaktiokomponentin konsentraatioiden tuloon. Yksinkertaisessa kahden molekyylin reaktiossa tämä ilmenee yhtälön 1 mukaisesti:

$$v = -\frac{d[\mathbf{A}]}{dt} = k[\mathbf{A}][\mathbf{B}] \quad 1$$

Tämä yhtälö tunnetaan reaktionopeuslakina ja se on differentiaali muodossaan yllä. Yhtälön integroitu ratkaisu on yleensä kinetiikassa oleellisempi muoto ja se on esitettyä yhtälössä 2:

$$\frac{1}{[\mathbf{B}]_0 - [\mathbf{A}]_0} \ln \frac{[\mathbf{A}]_0([\mathbf{B}]_0 - x)}{([\mathbf{A}]_0 - x)[\mathbf{B}]_0} = kt \quad 2$$

Kun puhutaan toisen kertaluvun reaktiosta yhden komponentin, esimerkiksi katalyytin suhteen, yhtälöt 1 ja 2 sievenevät yhtälöiksi 3–5:

$$v = k[\mathbf{A}]^2 \quad 3$$

$$\frac{-d[\mathbf{A}]}{2dt} = k[\mathbf{A}]^2 \quad 4$$

$$\frac{1}{[\mathbf{A}]} = \frac{1}{[\mathbf{A}]_0} + kt \quad 5$$

Yhtälöstä 5 voidaan nähdä, että reaktionopeuden kuvaaja tulee olemaan suora ( $y = mx + c$ ), jossa  $y = [\mathbf{A}]^{-1}$ ,  $x = t$ ,  $m = k$  ja  $c = [\mathbf{A}]_0^{-1}$ .<sup>25</sup>

Kun reaktio on toista kertalukua yhden komponentin suhteen, kyseisessä reaktiossa komponentin ajatellaan osallistuvan reaktionopeuden määrävään vaiheeseen (RDS, rate determining step) kahden ekvivalentin verran jokaista ensimmäisen kertaluvun komponenttia kohden. Tämä johtuu reaktiokinetiikan luonteesta, missä käsittelyssä on vain reaktioiden alkeisvaiheet. Katalyytin tapauksessa siis kaksi katalyyttimolekyyliä aktivoi tai sitoo substraatin tässä reaktiovaiheessa. Monimutkaisemmissa tapauksissa tämä voi myös tapahtua hieman ennen RDS:aa.

## 3.2. Reaktiokomponenttien kertaluvun määrittäminen

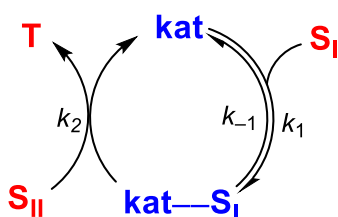
### 3.2.1. RPKA, Reaktion etenemisen kineettinen analyysi

RPKA eli reaktion etenemisen kineettinen analyysi (Reaction Progress Kinetic Analysis) on Donna G. Blackmondin<sup>26</sup> antama nimitys reaktiokinetiikan tutkimiseen seuraamalla reaktion nopeutta tai konsentraatioita ajan funktiona. Blackmond vertasi RPKA:ta aikaisemmin käytössä olleisiin menetelmiin, joissa reaktioita tutkittiin pääasiassa alkunopeusdatan avulla. Klassiset kineettiset menetelmät vaativat useita kokeita, joista tehtiin tulkintoja erilaisten kuvaajien, esim. Lineweaver-Burk yhtälöä hyväksi käyttäen.<sup>26,27</sup> Kuitenkin modernien työkalujen ”dramaattinen” kehitys tuottaa paljon suurempia määriä dataa reaktioista ja tätä varten Blackmondin mukaan oli tarve parannella kineettisen datan tulkintaa. Tähän RPKA soveltui hänen mukaansa hyvin, sillä menetelmällä pystytään seuraamaan koko reaktiota reaaliaikaisesti joko reaktionopeus- tai konsentraatiomittauksia hyväksi käyttäen.<sup>26</sup>

Blackmond myös kuvailee uusien graafisten menetelmien käyttöä reaktionopeuksien tutkimisessa RPKAn avulla. Blackmond esitti, että RPKA pystyy antamaan saman määrän kineettistä dataa vain murto-osalla kokeita klassisten kineettisten menetelmien vaatimien kokeiden määrästä. Samalla Blackmond kertoi, että RPKA antaa myös dataa katalyytin

aktivaation ja deaktivaation, tuoteinhibiition tai autokatalyyysin sekä substraatin vaikutusten osalta.<sup>26</sup> Kattavimmillaan RPKA pystyy semikvantitatiivisesti osoittamaan esitetyistä reaktiomekanismeista todennäköisimmän vaihtoehdon, mutta toisaalta RPKA:ta voi myös käyttää kvalitatiivisesti ja hyvin nopeasti reaktion ”sormenjäljen” löytämiseksi, jolloin reaktiosta voidaan saada yleishyödyllistä informaatiota mekanismin tulkitsemista varten.<sup>26</sup>

Yksi keskeinen etu RPKA:n käytössä on konsentraatioiden erotusten eli ns. ”excess” –kokeiden hyödyntäminen. Kaavio 5 esittää tilannetta, jossa katalyytti **kat** muodostaa substraatin **S<sub>I</sub>** kanssa kompleksin **kat:S<sub>I</sub>**, johon liittyy substraatti **S<sub>II</sub>** muodostaen tuotteen **T**:



Kaavio 5. Yksinkertainen mekanismi kahden substraatin katalyysireaktiolle.

Tälle syklille voidaan reaktionopeusyhtälö kirjoittaa alkeisvaiheiden reaktionopeuksien avulla (yhtälöt 6 ja 7)<sup>26</sup>:

$$v = \frac{k_1 k_2 [S_I] [S_{II}] [\text{kat}]_{tot}}{k_{-1} + k_1 [S_I] + k_2 [S_{II}]} \quad 6$$

$$v = \frac{a [S_I] [S_{II}] [\text{kat}]_{tot}}{1 + b [S_I] + c [S_{II}]} \quad 7$$

$$a = \frac{k_1}{k_{-1}} k_2, b = \frac{k_1}{k_{-1}}, c = \frac{k_2}{k_{-1}}$$

Koska molempien substraattien (**S<sub>I</sub>** ja **S<sub>II</sub>**) konsentraatiot ovat yhtälössä 7 sekä osoittajassa että nimittäjässä, Blackmond esitti, että reaktion kokonaiskerraluku substraattien suhteen tulee olemaan korkeintaan approksimaatio, koska substraattien konsentraatiot muuttuvat reaktion edetessä. Kuitenkin tämä muutos on sidottu stoikiometriaan ja täten jokaista konvertoituvaa molekyyliä **S<sub>I</sub>**, myös yksi **S<sub>II</sub>** täytyy konvertoitua.<sup>26</sup> Tästä seuraa yhtälö 8<sup>26</sup>:

$$[S_{II}] = [S_{II}]_0 - [S_I]_0 + [S_I] \rightarrow [S_{II}] = [\text{”excess”}] + [S_I] \quad 8$$

Parametri [”excess”] omaa samat yksiköt kuin **[S<sub>I</sub>]** tai **[S<sub>II</sub>]** (tyypillisesti siis M tai mM) ja sen ei tarvitse olla suuri kuten klassisissa kineettisissä kokeissa.<sup>26</sup> Parametri voi olla positiivinen,

negatiivinen tai nolla (ekvivimolaariset olosuhteet). Parametriin myös liittyy seuraavat huomiot<sup>26</sup>:

- [”excess”] on substraattien alkukonsentraatioiden erotus.
- [”excess”] ei muutu reaktion kuluessa, jos reaktiutilavuus on vakio
- [”excess”] *ei* ole identtinen reaktioekvivivalenttien tai prosentuaalisen reaktioylimäärän kanssa, mitkä muuttuvat reaktion kuluessa.

Kun yhtälön 8 sijoittaa yhtälöön 7 saadaan aikaan yhtälö 9:

$$v = a' \frac{["\text{excess}"][S_I] + [S_I]^2}{1 + b'[S_I]} [\text{kat}]_{\text{tot}} \quad 9$$

$$a' = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2 ["\text{excess}"]}, b = \frac{k_1 + k_2}{k_{-1} + k_2 ["\text{excess}']}$$

missä  $[\text{kat}]_{\text{tot}}$  ja [”excess”] ovat vakioita, sekä  $k_1$ ,  $k_2$  ja  $k_{-1}$  ovat vakioita jättäen ainoastaan  $[S_I]$ :n muuttujaksi. Yhtälö 9 osoittaa siis, kuinka [”excess”] parametri poistaa kahden konsentraation yhtäaikaisesta muuttumisesta tapahtuvan päänvaivan.<sup>26</sup> Yhtälö 9 myös näyttää miksi RPKA:n kanssa ei tarvita useita kineettisiä kokeita, missä yhden substraatin konsentraatio vakioidaan kokeellisesti (vale-nollanen kertaluvun reaktiot): kun [”excess”] parametri on tunnettu, reaktiossa ei tarvita muuta seurantaa kuin yhden valitun substraatin suhteen, koska se kertoo kaiken tarvittavan tiedon reaktion kinetiikasta.<sup>26</sup>

Tämän parametrin avulla myös päästään käsiksi niin kutsuttuihin ”same excess” ja ”different excess” -kokeisiin. ”Same excess” -kokeella tarkoitetaan tilannetta, jossa reaktion substraattien konsentraatioita muutetaan yhtäaikaisesti saman verran, siten että [”excess”] -parametri on sama kuin standardiolosuhteissa, muuttamatta muita olosuhteita. Tällä tavoin reaktiota voidaan seurata muuten identtisissä olosuhteissa pois lukien 1) muodostuneen tuotteen määrä ja 2) katalyytin läpikäymien kiertojen määrä (number of turnovers). Kun sitten näiden reaktioiden seurantadataa tutkitaan, voidaan ne asettaa päällekkäin ajan suhteen graafisesti. Tämä graafinen muokkaus kertoo, että tapahtuuko reaktiossa katalyytin deaktivaatiota tai onko reaktiossa tuotteen suhteen inhibiitiota. Näiden kahden vaihtoehdon väliltä voidaan selvyys saada tekemällä reaktio, jossa tuotetta on lisätty alkutilanteeseen tunnettu määrä. ”Different excess” kokeet puolestaan liittyvät yhtälön 9 kahteen muutettavaan parametriin,  $a'$  ja  $b'$ . Blackmond vertaa tilannetta algebran tilanteeseen, jossa käsissä on kaksi kolmen muuttujan ( $k_1$ ,  $k_{-1}$  ja  $k_2$ ) yhtälöä loputtomine ratkaisuihin. Kuitenkin, jos reaktio suoritetaan ainakin kahden eriävän [”excess”] määrän mukaisesti, saadaan yksi ylimääräinen yhtälö, jonka avulla loput kolme yhtälöä ratkeavat tuottaen ainutlaatuisen ratkaisun niihin kaikkiin.<sup>26</sup> Samaan tapaan kuin ”Same

excess” -kokeilla voidaan graafisesti data asettaa päällekkäin, voidaan myös ”different excess” -kokeen tulokset esittää graafisesti standardikokeen datan kanssa samassa kuvaajassa. Tällä tavoin voidaan mittauksista myös päätellä reaktiokomponenttien kertaluvut. Tosin tämä ei aina ole helppoa ja Blackmond esitteli tämän RPKA:n funktion tilanteessa, jossa kuvaajat eivät asetu päällekkäin helposti. Näissä tilanteissa, voidaan yhtälö 7 normalisoida jakamalla se substraattien konsentraatioilla. Ensin toisella ja sitten toisella. Nämä normalisoidut yhtälöt on esitetty yhtälöinä 10 ja 11<sup>26</sup>:

$$\frac{v}{[S_I]} = \frac{a[S_{II}][kat]_{tot}}{1 + b[S_I] + c[S_{II}]} \quad 10$$

$$\frac{v}{[S_{II}]} = \frac{a[S_I][kat]_{tot}}{1 + b[S_I] + c[S_{II}]} \quad 11$$

Näiden yhtälöiden kuvaajat voidaan sitten esittää standardikokeen reaktionopeusdatakuvaajan kanssa päällekkäin. Blackmondin esimerkissä ensimmäisen substraatin kohdalla tämä ei onnistu hyvin ja se kertoo, että ensimmäisen substraatin kertaluku ei ole yksinkertainen kokonaisluku ja täten  $b$  termin vaikutus yhtälöön ei ole mitätön. Sen sijaan toisen substraatin kohdalla tämä normalisoitu yhtälö antoi hyvän peiton ja siitä voitiin todeta, että data on riippumaton  $[S_{II}]$ :sta. Tämä kertoi, että yhtälön oikea puoli ei voi sisältää  $[S_{II}]$ :ää ja täten  $c[S_{II}]$  termi on oltava pieni muihin termeihin verrattuna ja täten yhtälön 11 voi sieventää yhtälöksi 12<sup>26</sup>:

$$\frac{v}{[S_{II}]} = \frac{a[S_I][kat]_{tot}}{1 + b[S_I]} \quad 12$$

$$\frac{k_2}{k_{-1}} [S_{II}] \ll \frac{k_1}{k_{-1}} [S_I]$$

$$\frac{k_2}{k_{-1}} [S_{II}] \ll 1$$

Tästä voitiin graafisesti todeta, että reaktio on ensimmäistä kertalukua substraatin  $[S_{II}]$  suhteen. Samalla voitiin todeta, että reaktio omaa saturaatiokinetiikan  $[S_I]$ :än suhteen. Kuvaajassa ei myöskään ollut vaakasuoraa osuutta, mistä Blackmond pystyi esittämään, että reaktio ei ollut vielä saavuttanut saturaatiota  $[S_I]$ :än suhteen reaktio-olosuhteissa. Yhtälön 12 voi myös kirjoittaa Michaelis-Menten muotoon (yhtälö 13)<sup>26</sup>:



$$v' = \frac{V'_{max} [S_I]}{K'_M + [S_I]} \quad 13$$

$$v' = \text{"normalisoitu nopeus"} = \frac{v}{[S_{II}]}$$

$$V'_{max} = k_1 k_2 [\mathbf{kat}]_{tot}$$

$$K'_M = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Kun yhtälöön 13 sijoittaa kokeelliset arvot, voidaan Michaelis-Menten parametrit  $V'_{max}$  ja  $K'_M$  määrittää ongelmitta. Vaihtoehtoisesti yhtälön 12 voi myös esittää Lineweaver-Burk muodossa ja tästä lineaarisesta esityksestä voi saman kvantitaavisen informaation saada yhtä helposti. Blackmond esitti artikkelissaan, että saman datan saaminen klassisilla menetelmillä olisi vaatinut ainakin kaksi Lineweaver-Burk kuvaajaa, jossa data olisi saatu kahdesta sarjasta reaktioita, missä  $[S_{II}]$ :n arvot olisi pidetty (kahtena eri) vakiona samalla kuin  $[S_I]$ :ää olisi muutettu. Blackmond arvioi, että kyseiseen projektiin olisi tarvittu ainakin ”puolisen tusinaa” reaktiota per sarja ja että RPKA vähentää tätä määrää ainakin neljän kertaluvun verran.<sup>26</sup>

Samalla periaatteella voidaan myös määrittää katalyytin kiertofrekvivenssi (TOF, turnover frequency). TOF on vastaava ”normalisointi” yhtälölle 7, mutta jakamalla katalyytin konsentraatiolla  $[\mathbf{kat}]_{tot}$  (yhtälö 14)<sup>26</sup>:

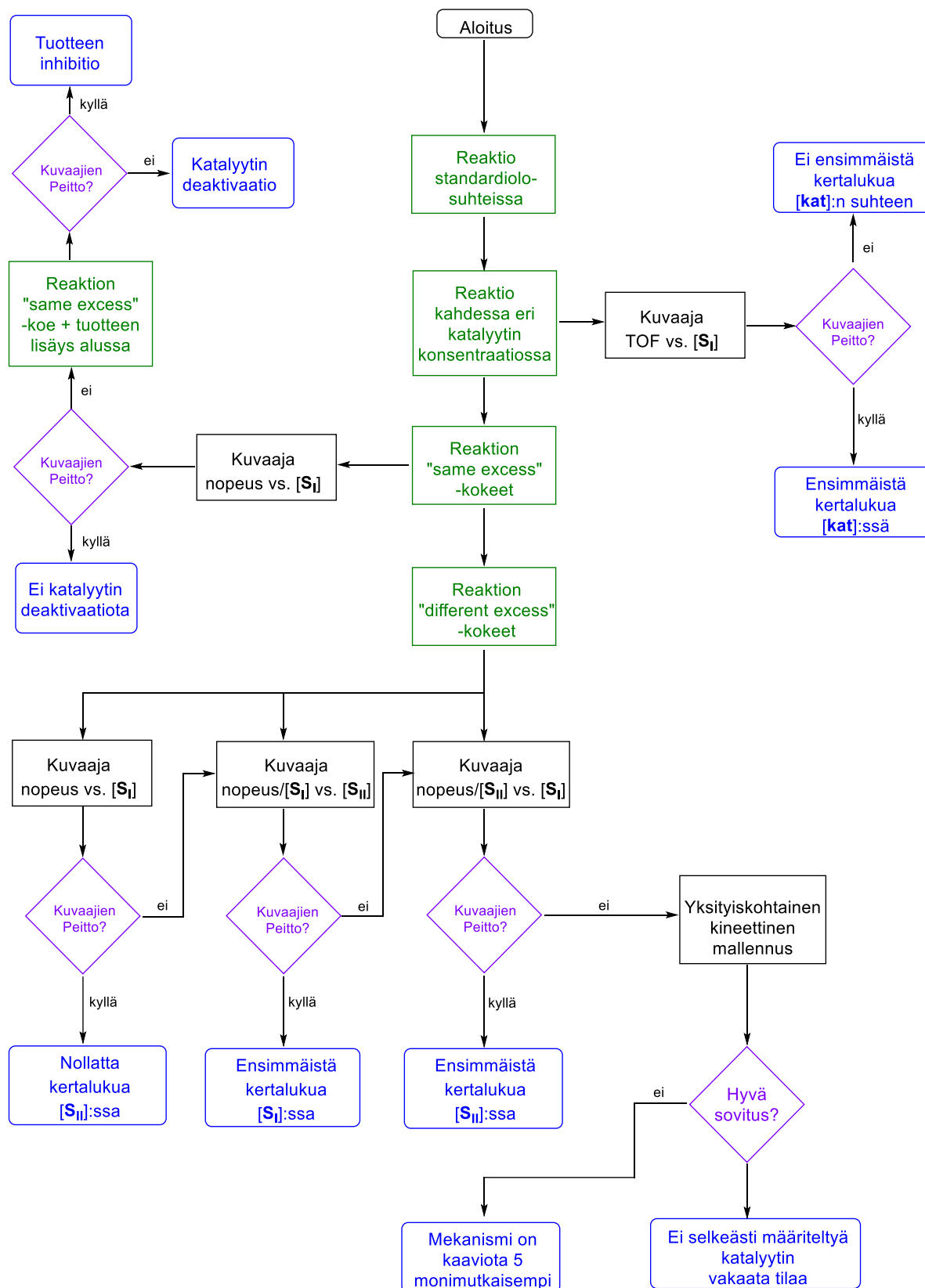
$$\frac{v}{[\mathbf{kat}]_{tot}} = \frac{a[S_I][S_{II}]}{1 + b[S_I] + c[S_{II}]} = \text{TOF} \quad 14$$

Tästä johtuen voidaan reaktiolle tehdä ”same excess” -kokeet, mutta kahdella eri katalyytin konsentraatiolla ja saatua dataa verrata esimerkiksi  $[S_I]$ :ään. Jos kuvaajat peittävät toisensa, reaktio on ensimmäistä kertalukua katalyytin suhteen.<sup>26</sup> Tässä on kuitenkin huomattava, että menetelmä olettaa katalyytin konsentraation pysyvän reaktiossa vakiona. TOF lasketaan jakamalla jokainen nopeusdatapiste tällä vakiolla sen sijaan, että muissa graafisissa nopeusyhtälöissä jaettaisiin muuttuvalla substraattien konsentraatioilla. Toisena huomiona on, että reaktiosta ei tarvitse tietää substraattien kertalukuja, jotta katalyytin kertaluvun voi määrittää, jos TOF on määritetty ”same excess” -kokeilla.<sup>26</sup>

Vaikka esimerkkinä Blackmond on käyttänyt yksinkertaista kahden substraatin reaktiota, voidaan menetelmää soveltaa myös monimutkaisempiin tilanteisiin.<sup>28–32</sup> Kuitenkin Blackmond huomauttaa, että RPKA ei välttämättä sovellu käyttöön, jos reaktiosysteemi on monimutkainen. Esimerkiksi tämän kaltaisesta systeemistä on tilanne, missä molempien (tai useamman) substraattien kertaluvut eivät ole yksinkertaisia kokonaislukuja tai katalyytti on lähes 50:50 suhteella vapaana spesiesinä **kat** tai kompleksina **kat:S<sub>I</sub>**. Tämä johtaa tilanteeseen, missä

reaktionopeuden määräävää vaihetta ei voida tarkasti määritellä. Blackmond ehdotti, että kyseiset reaktiot tarvitsevat paljon yksityiskohtaisempia kineettisiä kokeita, jotta nopeusvakiot voidaan systeemistä määrittää.<sup>26</sup> Blackmondin on esittänyt RPKA:n käyttöön myös alla esitetyn vuokaavion (kaavio 6), jonka avulla voi reaktion kineettistä analyysiä tekemään niinkin aikaisessa vaiheessa, että mekanimista reaktiossa ei tarvitse olla mitään tietoa. Tämä vuokaavio olisi siis hyvä olla se ensimmäinen askel, kun reaktiokinetiikan kokeita lähdetään suunnittelemaan RPKA menetelmän kautta.

Vuokaaviosta voidaan nähdä, että RPKA:lla ei katalyytin toista kertalukua voi havaita suoraan. Vuokaavion (kaavio 5) reitti siirtyy monimutkaisemman mekanismin vaihtoehtoon sen jälkeen, kun  $\text{TOF vs. [S]}$  kuvaajan peiton puutteesta havaitaan kertaluvun olevan muuta kuin yksi katalyytille. Kuitenkin RPKA on hyödyllinen siinä, että sillä voidaan eliminoida yleisimmät syyt sille, miksi reaktionopeus ei välttämättä ole aina suoraan verrannollinen katalyytin konsentraation (ensimmäisen kertaluvun kinetiikka). Katalyytin deaktivaatio voidaan havaita, kun RPKA:n ”same excess” -kokeita käytetään ja täten, jos reaktio näyttää olevan toista kertalukua katalyytin suhteen, mutta kyseistä deaktivaatiota ei nähdä ”same excess” -kokeissa, on oletettavaa, että jokin muu syy selittää kertaluvun, mikä sitten voi tutkijaa ohjeistaa seuraaviin kokeisiin ja toisten menetelmien soveltamiseen asian varmistamiseksi. Tästä esimerkkinä on seuraavan luvun menetelmä VTNA, mikä itsessään sisältää RPKA:n opit ja tekniikat.

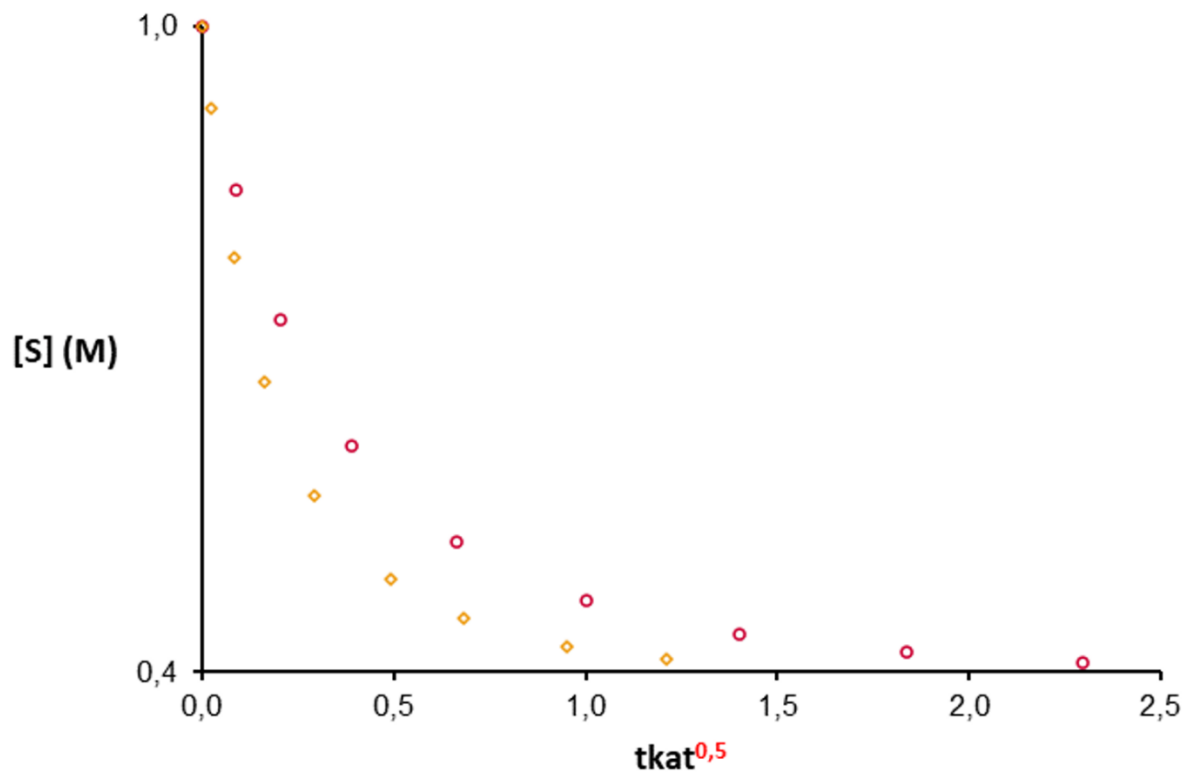
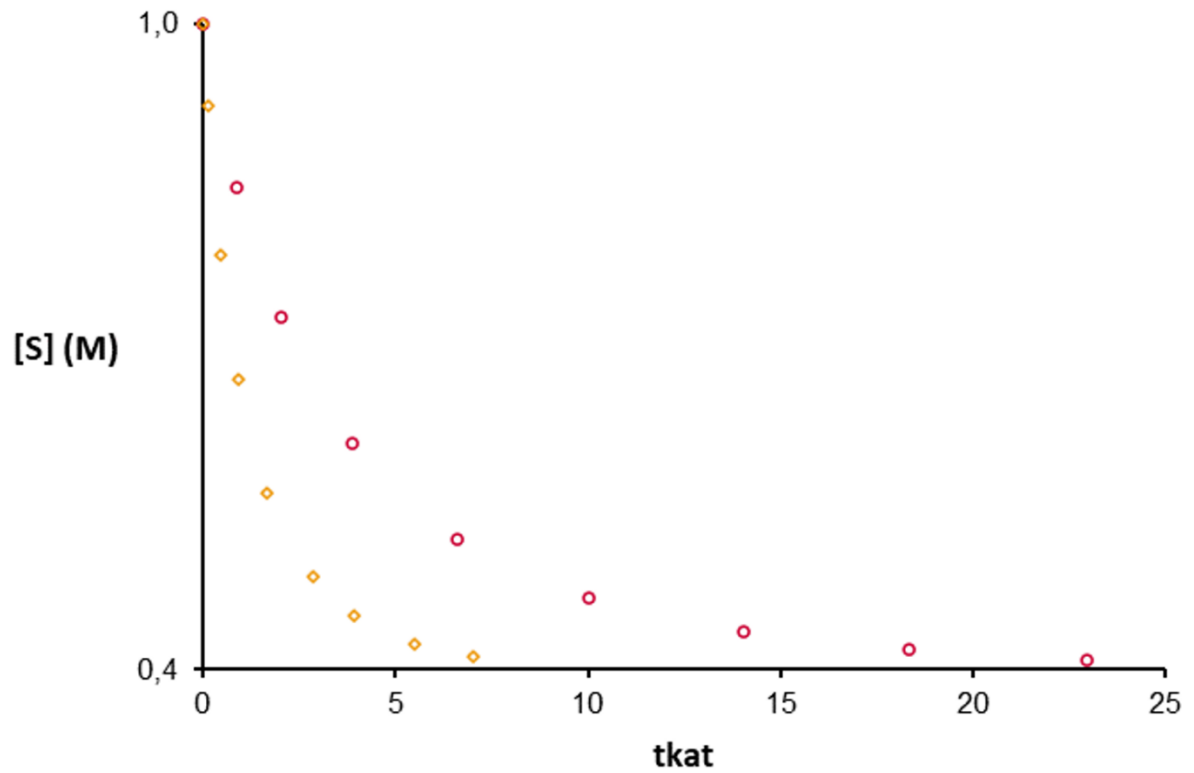


Kaavio 6. Blackmondin esittämä vuokaavio RPKA:n käyttöön reaktiokinetiikan tutkimiseen kahden substraatin reaktiossa.<sup>26</sup> Vihreä = koe, musta = kuvaajien muodostus, purppura = kysymys datan sopimisesta kuvaajaan ja sininen = johtopäätös.

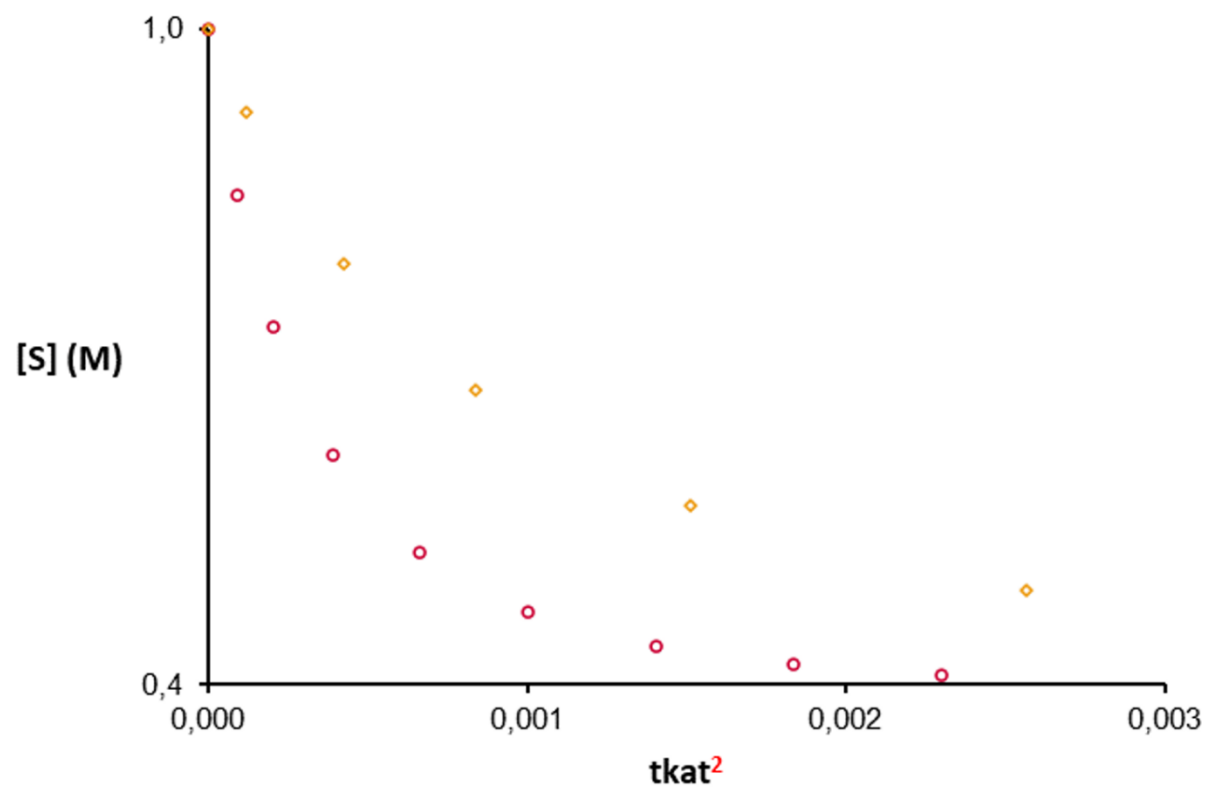
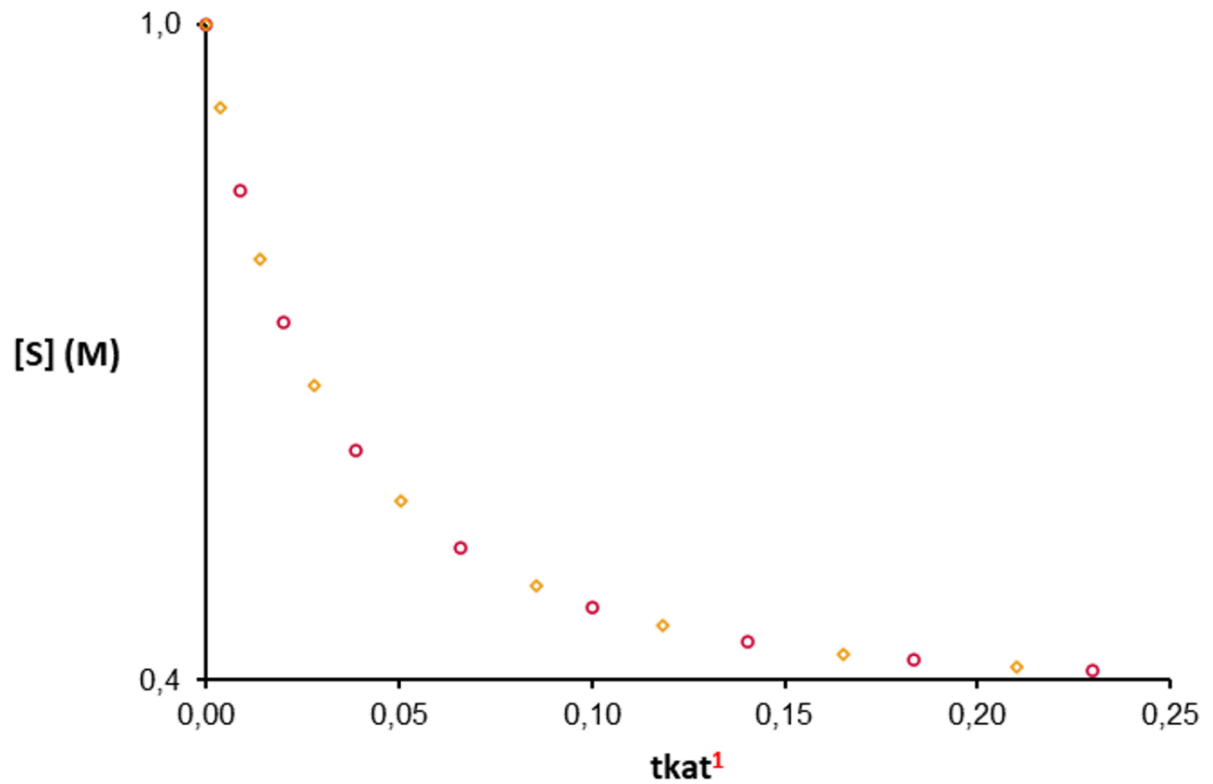
### 3.2.2. VTNA, Aikamuuttujan suhteen normalisoitu analyysi

Edellisen luvun RPKA:n heikkoutena on se, että siihen vaaditaan reaktionopeusdataa.<sup>26,33</sup> Tämän datan saaminen reaktioista suoraan eli differentiaalisesti<sup>26,33</sup> voi olla haastavaa, koska vain muutamat kokeelliset menetelmät sopivat tähän<sup>33</sup> (esimerkiksi reaktiokalorimetria<sup>34</sup>) ja nämä menetelmät välttämättä eivät sovellu kaikille reaktioille. Sen sijaan tämän voi kiertää käyttämällä epäsuoria eli ns. integroituvia<sup>26,33</sup> menetelmiä, joissa tuotteen tai lähtöaineen konsentraatiota kuvataan reaktioajan funktiona.<sup>34,35</sup> Näistä yleisin<sup>33</sup> perustuu reaktion alkunopeuksien määrittämiseen, missä lähtöaineiden konsentraatioita vaihdellaan reaktion alussa.<sup>33</sup> Valitettavasti näistä kokeista saadaan informaatiota vain lyhyistä reaktioajoista ja matalan konversion reaktioista,<sup>33,36-48</sup> ja reaktion loppuajan datasta luovutaan, jolloin menetetään loppureaktiolle olennaista informaatiota. Toisessa menetelmässä<sup>33</sup> konsentraatiodata sijoitetaan ennalta valikoituun funktioon mielivaltaisten parametrien avulla ja tätä funktiota derivoidaan matemaattisesti entisestään, jotta hetkellisiä reaktionopeuksia voidaan arvioida eri reaktioaikojen kohdalla.<sup>26,33,49-51</sup> Kuitenkin tämä mielivaltainen funktion valinta voi aiheuttaa vinoumaa tuloksiin ja kun käytössä on yleinen matemaattinen funktio, esimerkiksi korkean asteen polynomiset funktiot, voi reaktionopeuksiin ilmestyä artefakteja.<sup>34</sup> Tältä pohjalta ja parannellen RPKA:ta, Burés (ja Nielsen)<sup>33-35</sup> kehittivät VTNA:n eli aikamuuttujan suhteen normalisoidun analyysin. Ensimmäisenä muotona tämä menetelmä on vain ”graafinen analyysi”<sup>33</sup>, jossa reaktion primääridataa eli konsentraatiota  $[S_1]$  verrataan normalisoituun aikaskaalaan  $t[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}^n$ . Tämä termi mahdollistaa reaktioiden vertailun eri katalyyttien määrillä suoraan.<sup>33</sup> Valittu normalisointi on teoreettisesti kytketty faktaan katalyytin konsentraation vakiona pysymisestä reaktiossa. Täten  $t[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}^n$  -termistä tulee parametri, joka kuvaa reagenssin konsentraatiota jokaista aikamäärettä kohden, riippumatta siitä kuinka monimutkainen itse funktio loppujen lopuksi on. Burésin mukaan tämä efektiivisesti tarkoittaa sitä, että kaikki konsentraatiodata kompressoidaan katalyytin määrään muuttamatta kuvaajien muotoa.<sup>33</sup>

Aikanormalisointi tapahtuu siten, että aikamääreet kerrotaan katalyytin kokonaiskonsentraatiolla  $[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}$ , jokaista koetta kohdin samalla kun saatu arvo korotetaan mielivaltaiseen potenssiin. Tätä mielivaltaista eksponenttia sitten muutetaan, kunnes kaikki korjatut kuvaajat peittävät toisensa.<sup>33</sup> Kuvissa 2 ja 3 on esitetty yksinkertaisen Michaelis-Menten systeemin simuloitua kuvaajia eri katalyytin määrillä



Kuva 2. Michaelis-Menten systeemin aikanormalisoidut konsentraatioprofiilit. Mielivaltainen eksponentti (1 tai 2) muuttaa kuvaajien peittoa.  $\circ$  1 mol%,  $\diamond$  3 mol%.<sup>33</sup>



Kuva 3. Michaelis-Menten systeemin aikanormalisoidut konsentraati-profiilit. Mielivaltainen eksponentti (1 tai 2) muuttaa kuvaajien peittoa.  $\circ$  1 mol%,  $\diamond$  3 mol%. Eksponentin ollessa 1, kuvaajat peittävät toisiaan ja näin katalyytin oikeaksi kertaluvuksi saadaan 1.<sup>33</sup>

ja eri oletetuilla katalyytin kertaluvuilla. Erot normalisoitujen konsentraatioiden välillä ovat suuremmat reaktion loppupuolella, koska katalyytin määrän vaikutus on additiivinen.<sup>33</sup>

Yleisenä hyötynä aikanormalisoidulle menetelmälle on sen käytännön helppous: konsentraatioprofiileja voi verrata keskenään suoraan. Siksi vertailussa säästetään aikaa ja työtä, kun profiileista ei tarvitse määrittää reaktionopeusdataa.<sup>33</sup> Samoin kokeellisen työn määrä vähenee muihin epäsuoriin menetelmiin verraten, koska reaktioiden määrää voidaan vähentää kuten RPKA:ssa. Tämä johtuu ”graafisen analyysin” kyvystä verrata koko reaktioprofiilia sen sijaan, että verrattaisiin vain yksittäisiä datapisteitä, mikä on alkunopeusmenetelmän ongelmana.<sup>33</sup> Myös itse datapisteiden määrän ei tarvitse olla suuri. Esitetyissä kuvaajissa on käytetty vain kymmentä datapistettä, ja niillä saadaan hyvin selvästi esiin kuvaaja. Tämä on varsin viehättävä ominaisuus menetelmälle reaktioihin, joihin ei voi soveltaa *in situ* -seurantaa ja täten reaktioista joudutaan ottamaan useita näytteitä tai useita reaktioita, jotka sammutetaan eri vaiheissa. Näissä vaihtoehtoissa on hankalaa saada tarpeeksi paljon datapisteitä alkunopeusmenetelmän käyttöä varten. Burés tuo esiin esimerkin ”graafisen analyysin” vahvuudesta tilanteen, jossa konsentraatioiden mittauksissa on ollut paljon epätarkkuutta. Tällaisissa tilanteissa ihmisen visuaalisen analyysin kyky voi eliminoida yksittäisten virheiden vaikutusta jatkuvaan profiiliin ja trendien tunnistamiseen kyseisistä profiileista.<sup>33</sup>

Kuitenkin Burés huomauttaa, että ”graafinen analyysi” ei ole kaikkivoipainen. Menetelmään sisältyy huomautuksia, jotka pitää olla tiedossa ennen kuin menetelmää voi soveltaa tarkemmin. Esimerkiksi normalisoitu abskissa-akseli pitää skaalata uudelleen viimeiseen arvoon (kuten kuvissa 2 ja 3 on tehty), jotta profiilit ovat vertauskelpoisia. Tämän lisäksi menetelmän ollessa *visuaalinen* ei siihen ole matemaattista funktiota. Ilman funktiota analyysissä ei voida tutkia analyysin virheen raja-arvoja ja täten monimutkaisemmissa tilanteissa Burés ehdottaa hyvälle peitolla raportoitavaksi kertaluvun vaihteluväliä. Kuten muissakin analyysimenetelmissä, ei analyysistä ole hyötyä, jos katalyytin määrä ei ole tunnettu tai se muuttuu tuntemattomasti reaktion kuluessa. Näin voi tapahtua, kun katalyytti deaktivoituu tai reaktiossa on katalyyttisiä määriä epäpuhtauksia, jotka vaikuttavat reaktiokinetiikkaan.<sup>33</sup>

Toisessa julkaisussa<sup>34</sup> Burés esitteli menetelmänsä syvällisemmin VTNA:na ja kuinka se pystyy suoriutumaan samoista reaktioanalyyseistä kuin RPKA eli määrittämään myös reagenssien kertaluvut katalyytin kertalukujen ohella. Tätä varten Burés esitteli tarkemmin normalisoinnin matemaattista muotoa kertomalla, että kun kuvaajien aika-akseli vaihdetaan konsentraation S

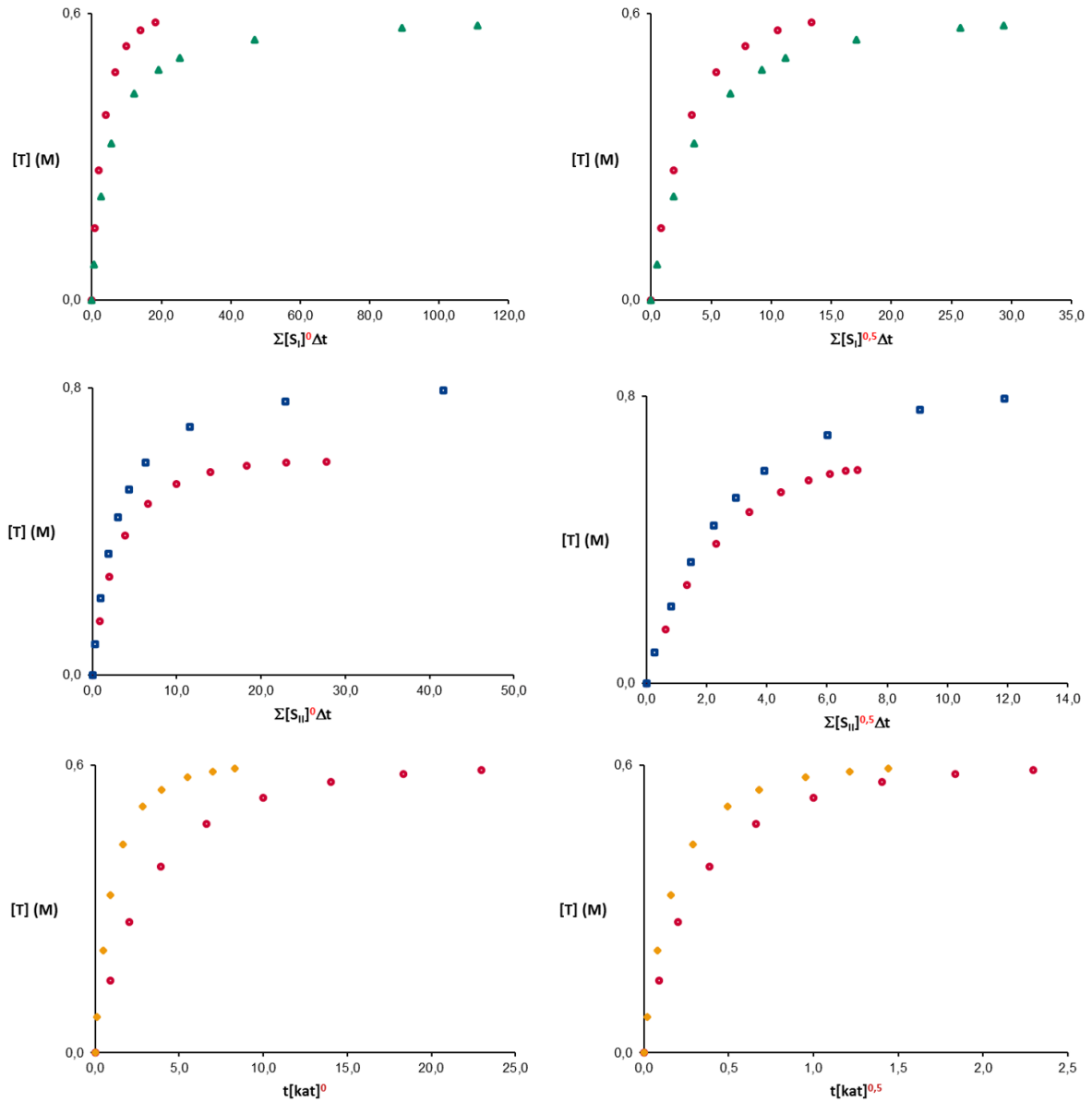
aikaintegraaliksi korotettuna potenssiin  $\alpha$ , reaktioprofiilit peittävät toisensa, kun  $\alpha$  on valittu oikein. Tämä integraali on *a priori* tuntematon, mutta sitä voidaan approksimoida puolisuunnikassäännöllä (yhtälö 15)<sup>34</sup>:

$$\int_{t=0}^{t=n} [\mathbf{S}_I]^{\alpha} dt = \sum_{i=1}^n \frac{[\mathbf{S}_I]_i + [\mathbf{S}_I]_{i-1}}{2} (t_i - t_{i-1})^{\alpha} \quad 15$$

Tämä tarkoittaa sitä, että menetelmä normalisoi ajan kahden datapisteen välillä niiden keskimääräisten konsentraatioiden avulla. Ehkä intuitiivisemmin tämä tarkoittaa, että normalisoimalla aikaskaala reaktiokomponenttien konsentraatiota vastaan, voidaan jokaisen reaktiokomponentin kineettinen vaikutus poistaa reaktioprofiilista.<sup>34</sup> Tämän voi laajentaa niin monelle reaktiokomponentille kuin on tarpeen, ja ei ole väliä onko kyseisen komponentin konsentraatio vakio vai muuttuja reaktion kuluessa.<sup>34</sup> Tämän normalisoinnin voi myös tehdä yhtäaikaaisesti kaikille komponenteille, mistä muodostuu suora, jonka kulmakerroin on ekvivivalentti  $-k_{\text{obs}}$  parametrin kanssa. Tämä suora siten mahdollistaa kaikkien komponenttien yhtäaikaisen reaktiokertaluvun analyysin. Toisaalta tämä vaatii paljon tarkempaa kokeellista käsittelyä verrattuna visuaalisen peiton tarkasteluun. Burés siten huomauttaa, että on yksinkertaisempaa tehdä useampia kokeita sen sijaan, että yhden kokeen tarkkuutta parantaisi moninkertaisesti.<sup>34</sup>

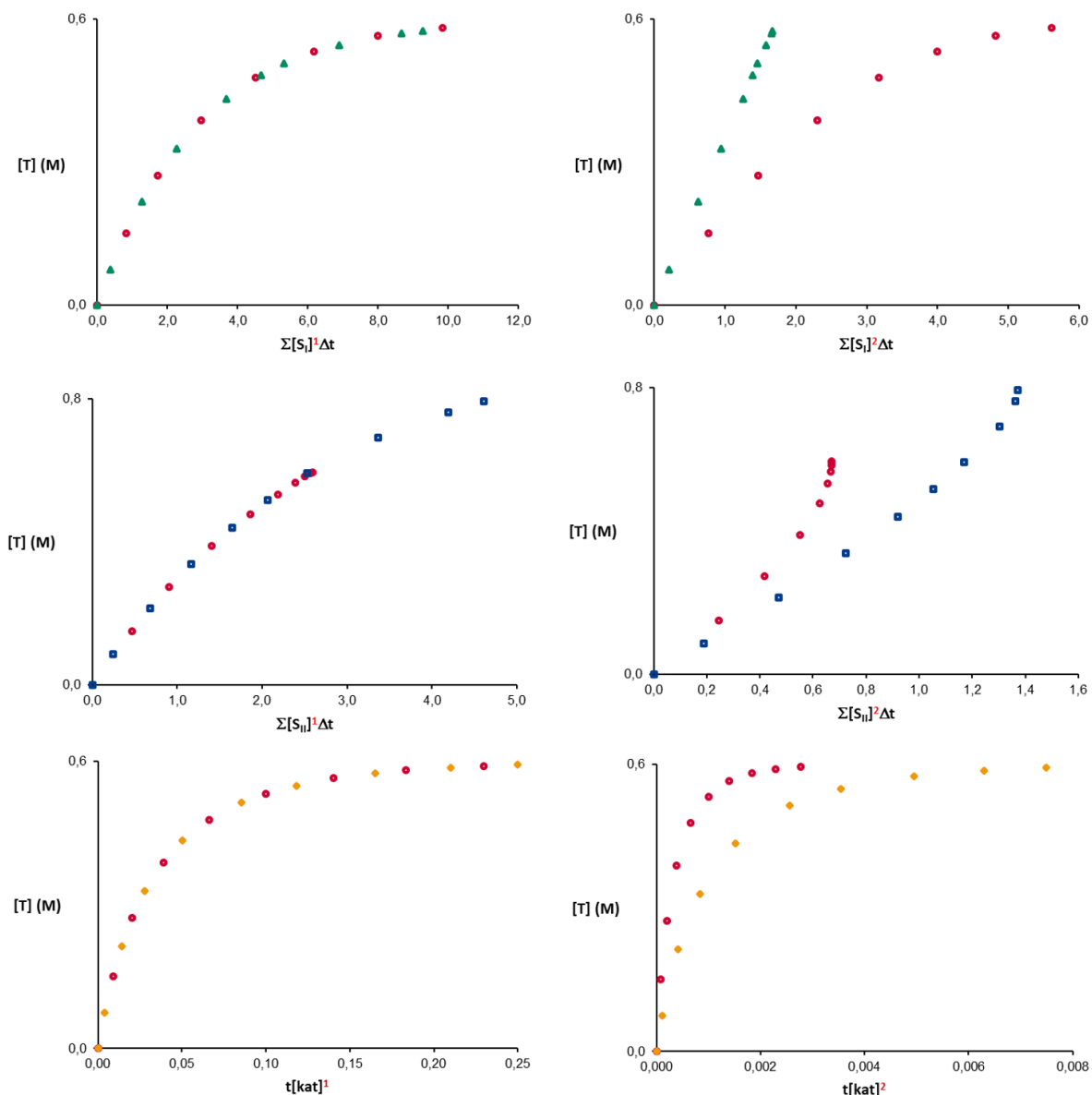
Kuvissa 4 ja 5 on esitetty graafisesti VTNA:n toimintaa kahden substraatin reaktiolle (kaavio 5). Datapisteet ovat tuotteen konsentraatiota, jotta eri kokeita voidaan vertailla helposti keskenään, mutta kyseiset kuvaajat voi tehdä mille vain reaktiokomponentille. Ensimmäisellä rivillä on tuotteen **T** konsentraatiot vs. ajanormalisoitu **S<sub>I</sub>** ( $\Sigma[\mathbf{S}_I]^{\alpha}\Delta t$ ) muuten identtisille kokeille, mutta substraatin **S** alkukonsentraatiota on muutettu (1.0 M vs. 0.6 M) ja kun kuvaajat saavuttavat peiton (kuva 5, ensimmäinen pystyrivi), on löydetty substraatin oikea kertaluku, joka on tässä tapauksessa 1. Sama on toistettu substraatille **S<sub>II</sub>** toisella rivillä (**[T]** vs.  $\Sigma[\mathbf{S}_{II}]^{\beta}\Delta t$ ), jossa alkukonsentraatioero oli 0.6 M vs. 0.8 M. Kolmannella rivillä on katalyytille kyseinen vertailu (0,01 M vs. 0,03M; **[T]** vs.  $\Sigma[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}^{\gamma}\Delta t$ ). Jos katalyytti ei merkittävästi deaktivoitu reaktiossa, termistä  $\Sigma[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}^{\gamma}\Delta t$  tulee  $t[\mathbf{kat}]_{\text{tot}}^{\gamma}$ . Tästä seuraa, että aikaisemmin esitetty ”graafinen analyysi” (kuva 2 ja kuva 3) sisältyy nyt täydellisesti VTNA:n sisään. Tämän lisäksi menetelmällä voidaan tutkia tilannetta, missä reaktiokomponenttien kineettinen vaikutus poistetaan matemaattisesti kuvaajasta yksi kerrallaan. Ensin substraatti **S<sub>I</sub>**, sitten **S<sub>II</sub>** ja viimeisenä katalyytti **kat**. Tuloksena muodostuu suora, josta voidaan määrittää  $k_{\text{obs}}$  (viite 34, kuva 2) suoran kulmakertoimena.<sup>34</sup>





Kuva 4. VTNA:n käyttöä reaktiokomponenttien kerralukujen tutkimisessa. Ensimmäinen rivi on substraatille  $S_I$ , toinen rivi substraatille  $S_{II}$ , kolmas rivi katalyytille  $kat$ . Ensimmäinen pystyrivi eksponentti  $a = 0$ , toinen pystyrivi  $a = 0,5$ .<sup>34</sup>

Tämä kulmakerroin on positiivinen eli suoraan havaittu reaktionopeus, jos VTNA:aa käyttää tuotteen konsentraatiota vastaan ja negatiivinen jos se on tehty reagenssien konsentraatiota vastaan. Burés myös esitti, että menetelmää voi käyttää tilanteessa, jossa komponenttien konsentraatio muuttuu reaktion aikana, esimerkiksi jos katalyytin deaktivaatio on merkittävää.



Kuva 5. VTNA:n käyttöä reaktiokomponenttien kertalukujen tutkimisessä. Ensimmäinen rivi on substraatille  $S_I$ , toinen rivi substraatille  $S_{II}$ , kolmas rivi katalyytille  $kat$ . Ensimmäinen pystyrivi eksponentti  $a = 1$ , toinen pystyrivi  $a = 2$ .<sup>34</sup>

Tähän vaaditaan, että jäljelle jäävän aktiivisen katalyytin määrää seurataan tarkasti reaktion kuluessa.<sup>4</sup> Reaktiokomponenttien kertaluku voi myös muuttua reaktion edetessä, esimerkiksi katalyyysin takia. Jos tämän tiedon haluaa saada selville, pitää analyysi tarkentaa vain kyseiseen reaktiovaiheeseen, mutta Burésin mukaan tämän pitäisi olla täysin mahdollista. Hän myös kuitenkin huomauttaa, että mekanismien selvittämiseksi tämä ei ole välttämätöntä, ja reaktion kokonaiskertaluvuilla pärjää yleisissä tapauksissa.<sup>34</sup>

Myöhemmässä julkaisussaan Burés ja Nielsen<sup>35</sup> esittelivät molemmat RPKA:n ja VTNA:n vertailevasti ja keskustelivat visuaalisen kineettisen analyysin olemuksesta. Varsinkin oleellisena tähän artikkeliin oli kyseisten menetelmien vahvuudet ja heikkoudet. Pääasiallisina vahvuuksina esitettiin menetelmien kyky antaa informaatiota koko reaktiosta, kokeiden määrän väheneminen ja paremmin esitettävissä oleva data kuvaajien muodossa. Heikkoutena he pitivät menetelmien täsmällisyyttä vaikkakin menetelmät heidän mukaansa ovat tarkkoja.<sup>35</sup> Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että menetelmällä ei pystytä reaktioista määrittämään täsmällisesti kineettisiä parametrejä. Mutta tämä nähtiin sivuseikkana, koska menetelmän pääasiallinen kohde on ei niin täsmällisten parametrien kuten kertalukujen määrittäminen. Lopuksi vielä he esittävät yleisen matemaattisen yhtälön (yhtälö 16), mikä on siis yhtälö 15 kaikkien komponenttien kohdalta, VTNA:n käyttöön<sup>35</sup>:

$$\begin{aligned} & \Sigma [S_I]^\alpha [S_{II}]^\beta [kat]^\gamma \Delta t \\ & = \sum_{i=1}^n \left( \frac{[S_I]_i + [S_I]_{i-1}}{2} \right)^\alpha \left( \frac{[S_{II}]_i + [S_{II}]_{i-1}}{2} \right)^\beta [kat]^\gamma (t_i - t_{i-1}) \end{aligned} \quad 16$$

Kaiken kaikkiaan VTNA menetelmänä sopii hyvin toisen kertaluvun tutkimiseen. Kaavion 5 simuloituun reaktioon poiketen, kuvaajien peiton halutaan tapahtuvan, kun eksponentiksi on määritelty kaksi eli kuvan 5 toisen pystyvirin alimman kuvaajan kohdalla. Tämä ei kuitenkaan vielä takaa, että reaktio olisi varmasti toista kertalukua katalyytin suhteen, kuten Burés huomauttaa artikkelissaan.<sup>1</sup> Näitä tapauksia käsitellään tutkielmassa myöhemmin.

### 3.3. Haasteet katalyytin kertaluvun osoittamisessa

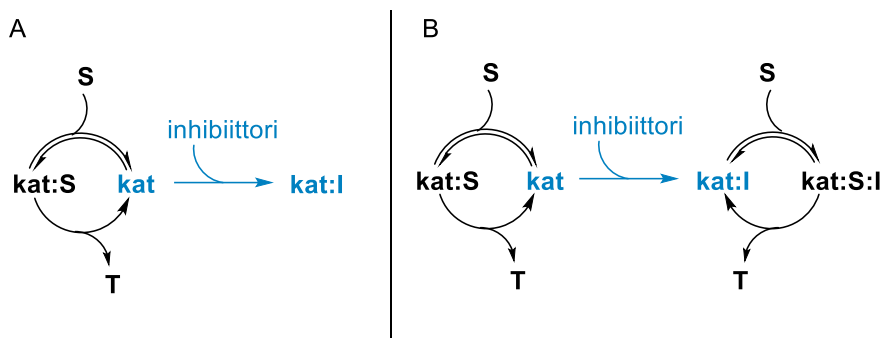
Katalyytin toinen kertaluku reaktiossa voi selittyä useiden eri mekanismien myötä. Näiden mekanismien erottaminen toisistaan voi olla haastavaa, koska siihen vaaditaan huolellista reaktionopeuslakien tulkintaa, kattavaa laboratoriokokeiden suunnittelua ja etenkin tarkkaa reaktio seuranta, jotta tutkittavista reaktioista saadaan edustavat reaktioprofiilit.<sup>1</sup> Tämä vaatii sitten, että reaktiosta joudutaan ottamaan useita datapisteitä reaktion edetessä. Usein kuitenkin tämä on joko käytännöllisesti haastavaa, aikaa vievää, ekonomisesti kallista tai muuten hankalaa tehdä täsmällisesti ja toistettavasti. Näin profiilit muodostuvat pienestä joukosta datapisteistä tai datapisteissä esiintyy virhettä, mikä sumentaa profiilin laatua. Molemmat vaihtoehdot voivat johtaa helposti virheisiin, kun reaktionopeuden käyrää sovitetaan paikoilleen. Liian vähäinen määrä datapisteitä voi johtaa tulkintaan, jossa reaktio näyttää toisen

kertaluvun reaktiolta (käyrä on siis suoran kaltainen), vaikkakin reaktio etenee oikeasti kertaluvultaan eri tavalla. Datapisteitä lisäämällä–voidaan tämän kaltaista virhettä välttää ja käyrän sovittaminen onnistuu tarkemmin. Tällöin kertaluvun määrittäminen tapahtuu tarkemmin ja näin vältetään ”väärää positiivisia” tapauksia. Vastaavasti heikko toistettavuus ja täsmällisyys datassa voi mahdollistaa vääränlaisen käyrän sovittamisen, mikä johtaa myös väärin positiivisiin tapauksiin. Täsmällisyyden ja tarkkuuden parantaminen tapahtuu näytteenotto ja -käsittely menetelmiä optimoimalla sekä esimerkiksi reaktio-olosuhteita paremmin hallitsemalla.

Lisäksi kuitenkin on olemassa tekijöitä, mitkä vaikuttavat itse mekanismeihin huomattavasti ja täten vaikkakin datan käsittely olisi optimaalista, voi väärään johtopäätökseen päätyä. Tällaisia tekijöitä ovat katalyytti- tai tuote-inhibiitio, saturaatiokinetiikka sekä autokatalyyysi. Näitä tekijöitä käsitellään tutkielmassa seuraavaksi tarkemmin.

### 3.3.1. Inhibiitio

Burés *et al.*<sup>1</sup> näyttävät julkaisussaan, että vaikka reaktiossa näyttäisi olevan kahden katalyytin yhteistoimintaa, se ei vielä välttämättä johda siihen, että kinetiikka olisi reaktiossa katalyytin suhteen toista kertalukua. Yleisin ja yksinkertaisin syy tähän on täydellinen tai vaillinainen reaktioinhibiitio, missä siis katalyytin aktiivisuus laskee reaktion edetessä ja näin reaktio hidastuu tai pysähtyy. Tämä voi johtua epäpuhtauksista, mutta myös kilpailevista reaktioista lopputuotteen kanssa.<sup>1</sup> Myös reaktiossa käytetty liuotin voi olla inhibiittori.<sup>1</sup> Katalyyttien sitoutuminen substraatteihin voi olla liian voimakasta ja tämän takia ne eivät vapaudu katalysoimaan reaktiota tarpeeksi nopeasti tai suuressa konsentraatiossa. Ensimmäisen kertaluvun reaktiot voivat siis näyttää omaavan suuremman kertaluvun tämän takia ja liian vähäisin perustein voi mekanistinen tulkinta reaktioille olla väärä. Kaaviossa 7 on esitelty tyypilliset reaktioinhibiitiomekanismit.<sup>1,52</sup>



Kaavio 7. Burésin artikkelin esimerkit katalyytin inhibiitiosta A) täydellisesti ja B) vaillinaisesti.<sup>1,52</sup> **I** = inhibiittori.

Kertaluvun määrittäminen reaktiosta vaatii reaktioprofiilin muodostamista konsentraatioprofileista reaktion eri hetkillä. Klassisesti tämä tarkoittaa reaktion nopeuden määrittämistä koko reaktiolle ja sen käyttämistä muiden komponenttien nopeuksien arviointiin. Kuitenkin tätä arviointia, sekä alkunopeuksien ja havaittujen nopeuksien käyttöä, tulee tehdä harkiten ja hallitusti, koska pienetkin erot voivat johtaa suuriin muutoksiin nopeuksissa ja näin muutoksiin itse kertaluvussa.<sup>1</sup>

Kirjallisuudessa inhibiittorin voimakkuuden voi esittää kahdella perustavanlaatuisella tavalla:  $IC_{50}$  -arvolla tai  $K_i$  -arvolla. Kuitenkin nämä ovat yleisesti esillä entsyymien parissa sen sijaan, että katalyyteille raportoitaisiin kyseisiä arvoja.  $IC_{50}$  tarkoittaa sitä konsentraatiota, mikä vähentää entsyymin aktiivisuutta 50 %:iin.  $K_i$  taas on dissosiaatiovakio (yhtälö 17):

$$K_i = \frac{[\text{kat}][\text{I}]}{[\text{kat} \cdot \text{I}]} \quad 17$$

$K_i$ :n yksiköinä ovat  $\text{mol L}^{-1}$  (M) ja sen avulla voidaan määrittää, kuinka voimakkaasti katalyytti sitoutuu substraattiin. Jos  $K_i$  on pieni, sitoutuminen on vahvaa ja vastaavasti suurilla arvoilla sitoutuminen on heikkoa. Kuitenkin  $K_i$  on hankalampi määrittää, sillä se vaatii reaktionopeuksien määrittämistä eri substraatin ja inhibiittorin konsentraatioissa.  $IC_{50}$  vaatii vain inhibiittorin konsentraation muutoksia samalla kuin substraatin konsentraatio pidetään vakiona. Inhibiitiotyyppejä on yleisesti otettuna kolme: kilpaileva inhibiitio (competitive inhibiitio)<sup>53</sup>, kilpailematon inhibiitio (uncompetitive inhibiitio)<sup>25,54,55</sup> ja ei-kilpaileva inhibiitio (non-competitive inhibiitio)<sup>55-57</sup>. Ei kilpailevaa inhibiitiota kutsutaan myös sekainhibiitioksi<sup>55</sup> (mixed inhibiitio). Kilpailevassa inhibiitiossa entsyymi sitoutuu substraattiin tai inhibiittoriin, mutta ei molempiin yhtäaikaaisesti. Inhibiittori estää substraatin sitoutumisen. Tästä on myös alamuotona allosteerinen kilpaileva inhibiitio, missä inhibiittori

sitoutuu toiseen aktiiviseen asemaan, mikä sitten estää entsyymin sitoutumisen entsyymille sopivaan aktiiviseen asemaan. Kilpailemattomassa inhibiitiossa substraatti sitoutuu entsyymiin, mutta tähän kompleksiin sitten sitoutuu inhibiittori, mikä estää reaktion etenemistä tästä eteenpäin. Ei-kilpailevassa inhibiitiossa, inhibiittori sitoutuu joko entsyymiin tai sen ja substraatin kompleksiin, mutta suositusta kumpaakaan.<sup>55</sup> Kaaviossa 8 on esitetty nämä inhibiition muodot visuaalisesti. Vastaavasti kaaviossa 9 on myös Michaelis-Menten tyyppinen katalyysisykli, missä mukana on myös inhibiittori.

Kun syklin (kaavio 9) reaktionopeutta laskee, voidaan käyttää yhtälöä 18:

$$v = \frac{k_2 K [\text{S}] \text{kat}_T}{1 + K [\text{S}] + K_i^{-1} [\text{I}]} \quad 18$$

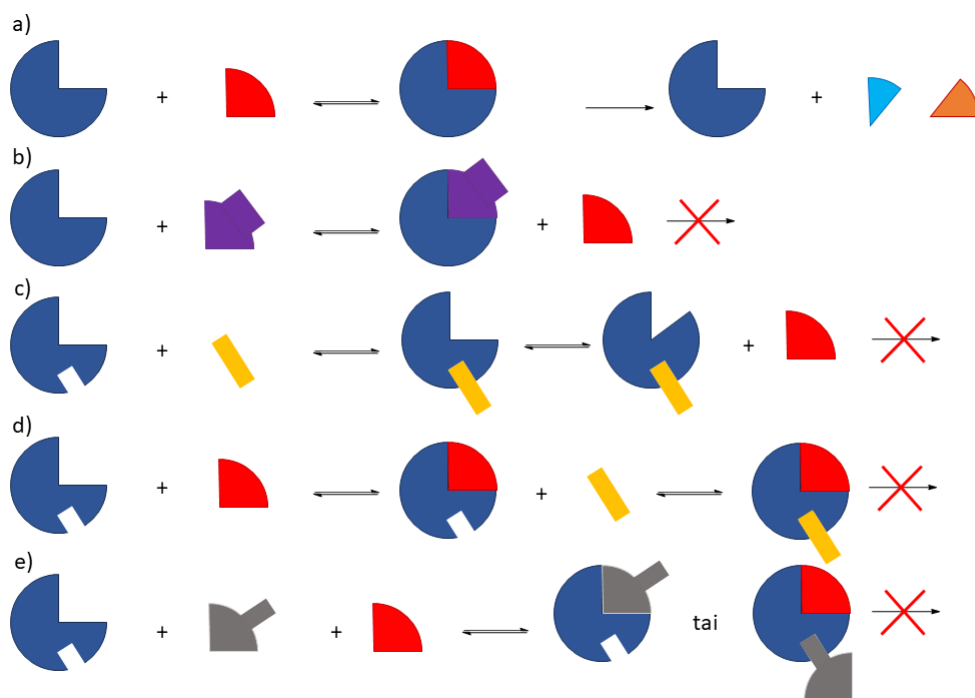
$$\text{kat}_T = \text{koko katalyytti} = [\text{kat}] + K [\text{kat}] [\text{S}] \rightarrow [\text{kat}] = \frac{\text{kat}_T}{1 + K [\text{S}]}$$

missä termi "1" edustaa vapaata entsyymiä,  $K[\text{S}]$  edustaa entsyymi–substraatti ja  $K_i^{-1}[\text{I}]$  edustaa entsyymi–inhibiittori kompleksia. Substraatin määrän voi olettaa pieneksi ja täten  $[\text{J-S}]$  on myös määrältään pieni. Yhtälö 18 sievenee siten muotoon (yhtälö 19):

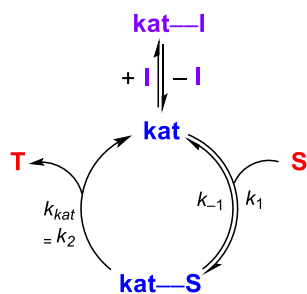
$$v = \frac{k_2 K [\text{S}] \text{kat}_T}{1 + K_i^{-1} [\text{I}]} \quad 19$$

Yhtälöä 19 voi sitten käyttää määrittämään  $K_i$ :n ja  $\text{IC}_{50}$  suhdetta.  $\text{IC}_{50}$  on se  $[\text{I}]$ , missä  $v$  on puolet tilanteesta, jossa  $[\text{I}]$  on 0. Tällöin  $v = k_2 K [\text{S}] \text{kat}_T$ . Kun halutaan  $v/2$ , pitää siis yhtälön 20 pitää paikkansa:

$$1 + K_i^{-1} [\text{I}] = 2, \quad 20$$



Kaavio 8. Entsyymien toimintaa ja inhibiitiotyyppejä. a) Entsyymien normaali mekanismi, b) kilpaileva inhibiitio, c) allosteerinen kilpaileva inhibiitio, d) kilpailematon inhibiitio ja e) ei-kilpaileva inhibiitio.



Kaavio 9. Michaelis-Mentenin sykli, missä mukana on inhibiittori I.

jolloin  $[I] = IC_{50} = K_i$ . Tämä pätee ainoastaan kun  $[S]$  on pieni. Jos se ei sitä ole, joudutaan ratkomaan yhtälö 21:

$$1 + K[S] + K_i^{-1}[I] = 2(1 + K[S])$$

$$K_i^{-1}[I] = 1 + K[S]$$

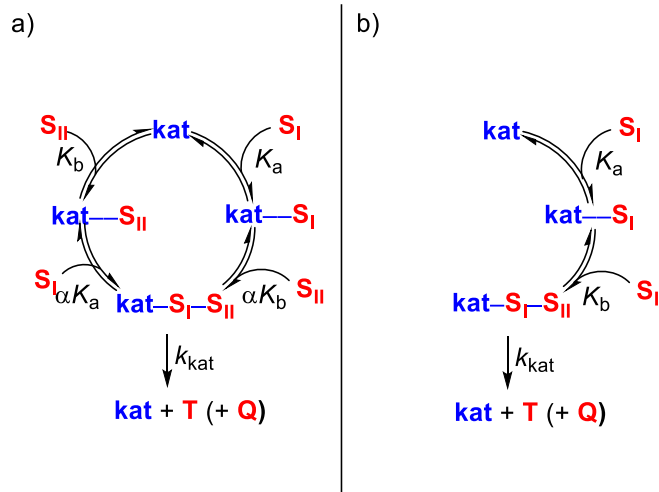
$$[I] = K_i(1 + K[S]) = K_i \left( 1 + \frac{[S]}{K_M} \right)$$

21

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \approx \frac{1}{K}$$

Täten,  $IC_{50}$ :n täytyy olla suurempi, kun substraattia on enemmän reaktiossa osallisena. Tämä ratkaistu muoto tunnetaan nimellä Cheng-Prusoff yhtälö.<sup>58</sup>

Jos substraatteja onkin kaksi, kinetiikka monimutkaistuu huomattavasti. Varsinkin kun reaktiossa on vaihtoehtoisia polkuja: niin kutsutut ”sattumanvarainen bi bi kinetiikka” ja ”järjestäytynyt bi bi kinetiikka”.<sup>58</sup> Kaaviossa 10 on esitetty kaaviot näistä vaihtoehdoista:



Kaavio 10. a) ”sattumanvarainen bi bi kinetiikan” katalyytin kierto ja b) ”järjestäytynyt bi bi kinetiikan” katalyytin kierto.

Pääasiallisena erona on siis missä järjestyksessä substraatit sitoutuvat entsyymiin. Sattumanvaraisessa bi bi kinetiikassa järjestys on nimenomaan sattumanvarainen, kun taas järjestäytyneessä substraatit menevät tietystä järjestyksessä ja näin **kat-S<sub>II</sub>** kompleksia ei muodostu merkittäviä määriä. Yhtälöt 22 ja 23 kuvaavat bi bi kinetiikoiden nopeuksia<sup>55,58</sup>:

$$v = \frac{k_{kat} [S_I] [S_{II}] kat_T}{[S_I] [S_{II}] + \alpha K_b [S_{II}] + \alpha K_b [S_I] + \alpha K_a K_b} \quad 22$$

$$v = \frac{k_{kat} [S_I] [S_{II}] kat_T}{[S_I] [S_{II}] + K_b [S_I] + K_a K_b} \quad 23$$

Huomiona se, että  $\alpha K_a K_b = \alpha K_b K_a$ . Kahden substraatin systeemeihin inhibiitio tapauksissa lisätään  $K_i^{-1} [I]$  termi nimittäjään.<sup>55,58</sup>

Inhibiition pystyy reaktiosta määrittämään joko RPKAn (luku 3.2.1.) tai VTNAn (luku 3.2.2.) ”same excess” -kokeilla. Jos reaktiossa havaitaan inhibiitiota, on syytä muokata reaktioolosuhteita, substraatteja, katalyyttiä ja reagensseja siten, että inhibiitiota ei enää havaita. Jos menetelmillä ei inhibiitiota havaita, mutta reaktiokinetiikka menetelmillä antaa viitteitä toisesta



kertaluvusta katalyytin suhteen, on tämä vahvistavana seikkana siihen, että reaktio on oikeasti toista kertalukua katalyytin suhteen.

### 3.3.2. Saturaatiokinetiikka

Kun käsitellään kahden vaiheen reaktiota (kaavio 11), voidaan yleisesti ottaen lähestyä katalyyssikinetiikkaa kahdesta näkökulmasta: esitasapainosta (pre-equilibrium) tai vakaan tilan oletuksesta (steady state approximation) eli Briggs-Haldane oletuksesta<sup>59</sup>.



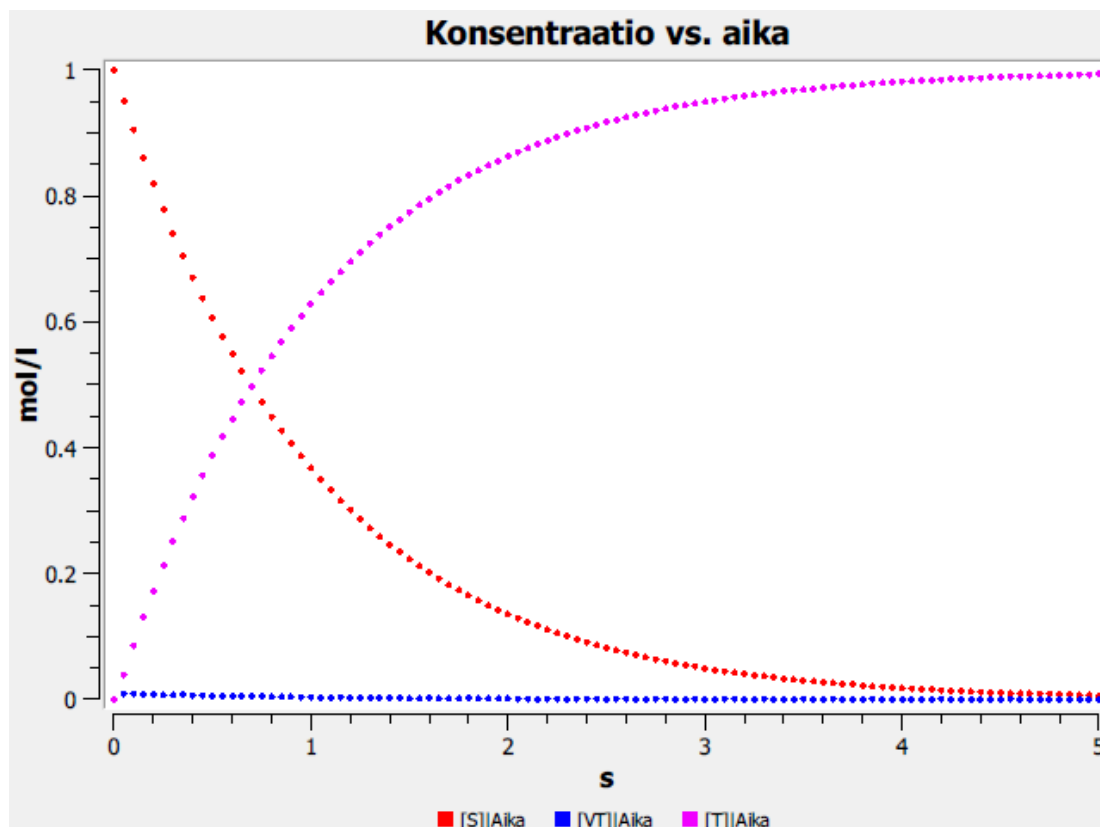
Kaavio 11. Esimerkki reaktio, missä voi muodostua nopeusvakioiden mukaan esitasapaino tai vakaa tila [VT]:n suhteen. S = lähtöaine(et), VT = välituote ja T = tuote.

Vakaan tilan oletus tapahtuu tilanteessa, missä katalyytti ja substraatti muodostavat reversiibelisti kompleksin (VT), mutta  $k_2$  on verrattain nopea ja täten kompleksi kuluu lähes välittömästi reaktiossa. Täten ajatuksena on, että kompleksin konsentraatio ei muutu reaktiossa ja tämä konsentraatio pysyy matalana. Matemaattisesti tämä on esitettyä yhtälössä 24:

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\text{VT}]}{\partial t} &= 0 = k_1[\text{S}] - k_{-1}[\text{VT}]_{SS} - k_2[\text{VT}] \\ [\text{VT}]_{SS} &= \frac{k_1[\text{S}]}{k_{-1} + k_2} \end{aligned} \quad 24$$

Reaktiossa siis ajatellaan, että [VT]:n suhteen muodostuu vakaa tila. Vakaa tila ei kuitenkaan tarkoita, että [VT] olisi vakio vaan, että se nopeasti kasvaa maksimiinsa ja sitten kuluu reaktion kuluessa pois. Tämä johtuu siitä, että jos [VT] olisikin nolla, ei reaktiotuotetta voisi muodostua lainkaan. Tämän takia vakaan tilan oletus on pätevä kun  $[\text{VT}] \ll [\text{LA}]$  ja [VT] kuluu hitaasti reaktion kuluessa. Tuotteen muodostusnopeus on yhtä kuin lähtöaineen kulutusnopeus (yhtälö 25):

$$\begin{aligned} \frac{\partial[\text{S}]}{\partial t} &= -k_1[\text{S}] + k_{-1}[\text{VT}]_{SS} = \frac{k_1 k_2 [\text{S}]}{k_{-1} + k_2} \\ \frac{\partial[\text{T}]}{\partial t} &= k_2[\text{VT}]_{SS} = \frac{k_1 k_2 [\text{S}]}{k_{-1} + k_2} \end{aligned} \quad 25$$



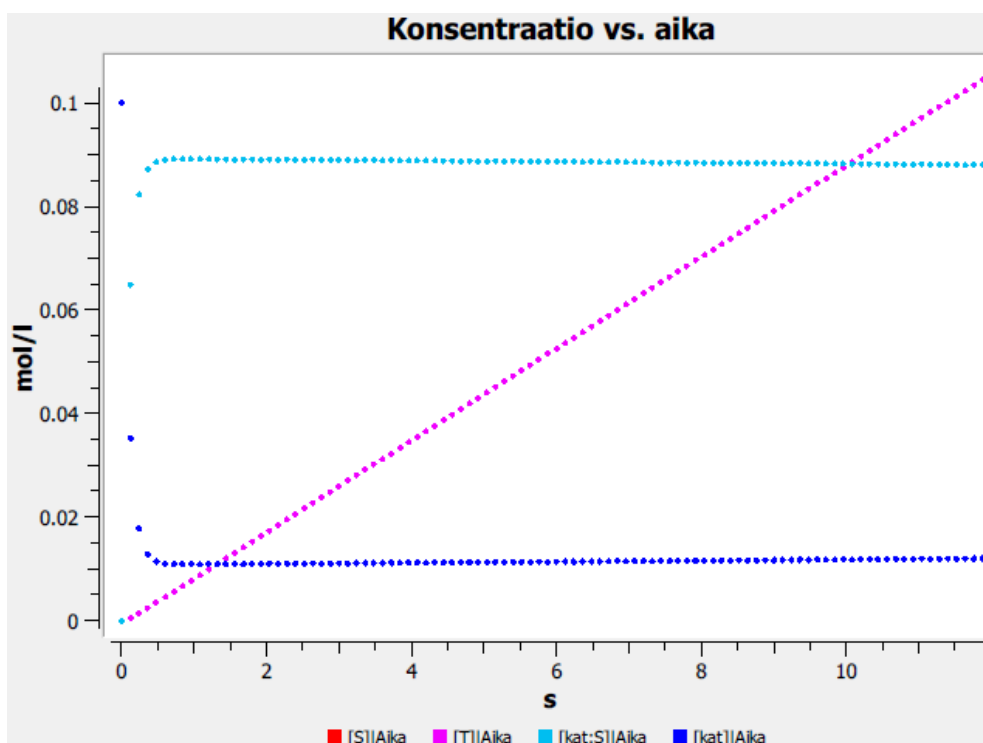
Kuva 6. Briggs-Haldane oletuksesta tehty kuvaaja. x-akseli on aika  $t$  sekunteina ja y-akseli on konsentraatio.

Kuvassa 6 on esitetty Briggs-Haldane oletuksesta kuvaaja. Kuvaajasta on huomioitava, että jos kuvaajaa suurennettaisiin, voitaisiin nähdä  $[VT]$ :n maksimi ennen kuin sen kuluminen alkaa.

Vaihtoehtoisesti esitasapaino-oletuksessa<sup>60</sup> reaktion (kaavio 11)  $k_2$  onkin verrattain hidas ja täten  $k_{-1}$  ajaa tasapainon  $S$ :n ja  $VT$ :n välille. Tästä voidaan muodostaa yhtälöt 26:

$$\begin{aligned}
 v &= k_2[\mathbf{kat} \cdot S] \\
 v &= k_2 K[\mathbf{kat}][S] && \text{esitasapaino} \\
 v &= \frac{k_2 K[S]J_T}{1 + K[S]} && 26 \\
 K &= \frac{[\mathbf{kat} \cdot S]}{[\mathbf{kat}][S]} && \text{voimassa kun } k_2 \ll k_{-1} \\
 kat_T &= [\mathbf{kat}] + K[\mathbf{kat}][S] && \text{koko entsyymi}
 \end{aligned}$$

Tästä nähdään ”1 +” nopeuslaki, missä termi 1 vastaa vapaata katalyyttiä ja  $K[S]$  entsyymi-substraattikompleksia, kuten yhtälössä 18. Katalyytin  $\mathbf{kat}$  lepotila reaktiossa on esitasapainossa kokonaan tai osittain substraattikompleksina riippuen tasapainovakion suuruudesta. Kuvassa 7 on esitetty esitasapainosta kuvaaja:



Kuva 7. Esitasapaino oletuksesta tehty kuvaaja. Huomiona, että substraatin S konsentraatio on paljon suurempi kuin katalyytin tai sen muodostaman kompleksin ja se ei näy kuvaajassa. x-akseli on aika  $t$  sekunteina ja y-akseli on konsentraatio.

Molemmissa tapauksissa oletuksia voidaan käyttää hyväksi, kun määritetään muiden reaktiokomponenttien kinetiikkaa. Mutta tämä kuitenkin vaatii, että oletuksen paikkansapitävyys pitää osoittaa. Esimerkiksi [VT]:n vaihtelu reaktion aikana voi vaikuttaa kinetiikkaan merkittävästi ja täten muuttaa esimerkiksi reaktion kertalukua.<sup>1</sup> Tällainen tapaus voi esiintyä esimerkiksi jos kaavion 9 reaktiota muuttaa siten, että välituotteeseen VT liittyy toinen substraatti. Täten esimerkiksi Briggs-Haldane oletuksen puolesta kinetiikka näyttää seuraavalta (yhtälöt 27):

$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = k_2[\text{VT}][\text{S}_\text{I}]$$

$$\frac{d[\text{VT}]}{dt} = k_1[\text{S}_\text{I}] - k_{-1}[\text{VT}] - k_2[\text{VT}][\text{S}_\text{II}] = 0$$

$$[\text{VT}] = \frac{k_1[\text{S}_\text{I}]}{k_{-1} + k_2[\text{S}_\text{II}]}$$

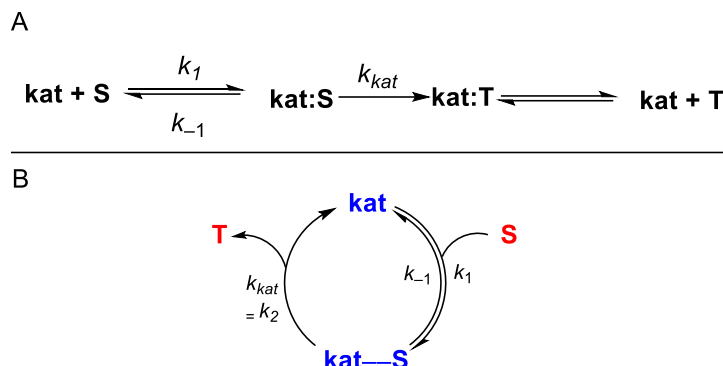
$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = \frac{k_1 k_2 [\text{S}_\text{I}] [\text{S}_\text{II}]}{k_{-1} + k_2 [\text{S}_\text{II}]}$$

27

Substraatin konsentraatio  $[\text{S}_\text{II}]$  esiintyy sekä osoittajassa että nimittäjässä. Tästä seuraa tilanne, jossa kasvattamalla  $[\text{S}_\text{II}]$ :tä vaiheittain, reaktionopeus kasvaa vähemmän ja vähemmän. Ilmiötä

kutsutaan saturaatiokinetiikaksi ja sen voidaan nähdä olevan esitasapaino-oletuksen erikoismuoto. Yksinkertaisin muoto saturaatiokinetiikasta on Michaelis-Menten malli.<sup>25,53,61–63</sup>

Mallista on esitetty reaktio ja sen katalyyttinen sykli (kaavio 12):



Kaavio 12. Michaelis-Menten –kinetiikkaa noudattava katalyyttinen reaktio. **S** = substraatti, **T** = tuote ja **kat** = katalyytti/entsyymi.

Matemaattisesti tämä on muodossa (yhtälö 28), joka oli aikaisemmin esitetty yhtälössä 18:

$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = k_{kat}[\text{kat:S}]$$

$$(k_2 + k_{-1})[\text{kat:S}] = k_1[\text{kat}][\text{S}] \quad (\text{BHO}) \quad 28$$

$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = \frac{k_1 k_{kat} [\text{kat}]_0 [\text{S}]}{k_{-1} + k_{kat} + k_1 [\text{S}]} = \frac{k_{kat} [\text{kat}]_0 [\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \quad K_M = \frac{k_{kat} + k_{-1}}{k_1}$$

Yhtälöstä 28 voidaan johtaa itse Michaelis-Menten yhtälö<sup>25,53,61–63</sup> (yhtälöt 29):

$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = k_{kat}[\text{J:S}] = k_{kat}K[\text{J}][\text{S}] = \frac{k_{kat}K[\text{J}]_0[\text{S}]}{1 + K[\text{S}]}$$

$$\therefore [\text{J}]_0 = [\text{J}] + [\text{J:S}] = [\text{J}] + K[\text{J}][\text{S}]$$

$$\therefore [\text{J}] = \frac{[\text{J}]_0}{1 + K[\text{S}]}$$

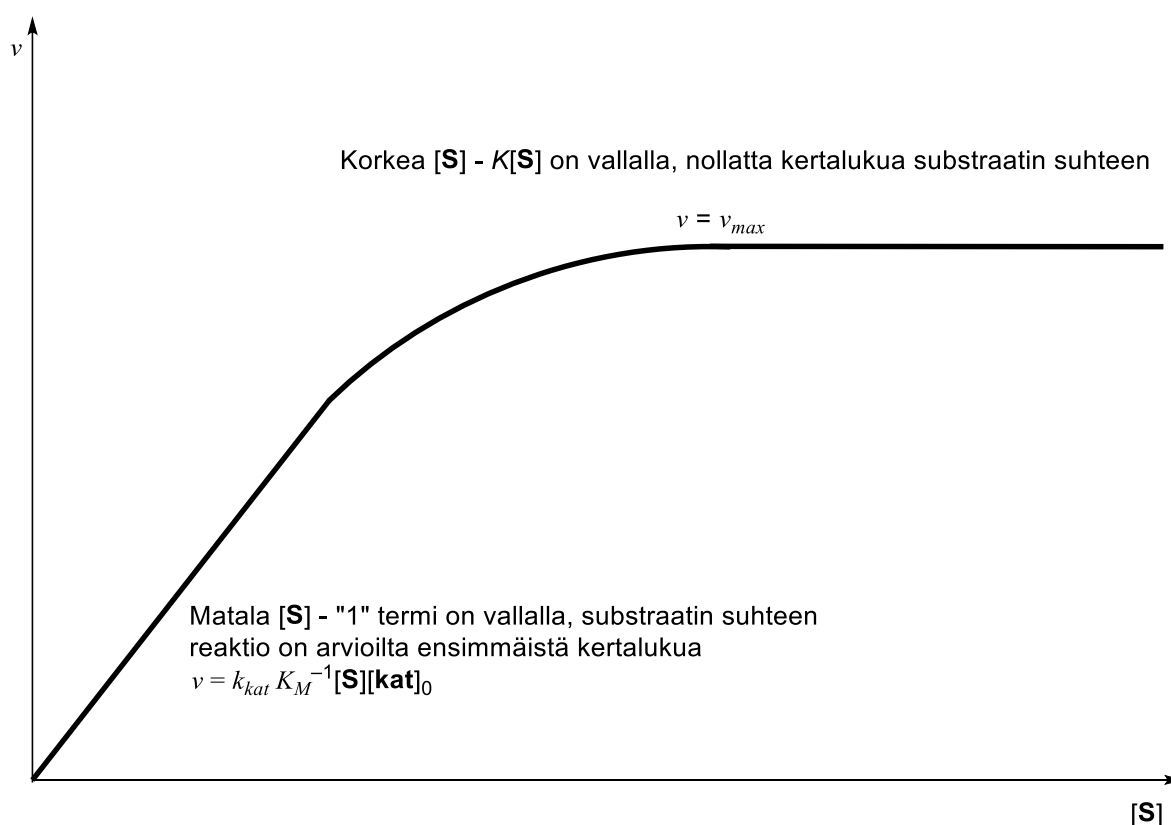
$$(k_2 + k_{-1})[\text{J:S}] = k_1[\text{J}][\text{S}] \quad (\text{BHO}) \quad 29$$

$$[\text{J:S}] = \frac{k_1[\text{J}][\text{S}]}{k_{-1} + k_{kat}}$$

$$\frac{d[\text{T}]}{dt} = k_{kat}[\text{J:S}] = \frac{k_1 k_{kat} [\text{J}][\text{S}]}{k_{-1} + k_{kat}} = \frac{k_1 k_{kat} [\text{S}]}{k_{-1} + k_{kat}} \left( \frac{[\text{J}]_0}{1 + K[\text{S}]} \right)$$

$$= \frac{v_{max}[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$

missä BHO tarkoittaa Briggs-Haldane oletusta. Termi  $k_{kat}K[\text{kat}]_0[\text{S}]$  vie reaktiota kohti tuotetta. Sekä reaktionopeusvakio  $k_{kat}$  ja tasapainovakio  $K$  ovat oleellisia, mutta pelkästään suuri  $K$  ei riitä katalyyttiseen aktiivisuuteen. Saturaatiokinetiikan voi esittää myös kuvaajan avulla (kuva 8). Kuvaajasta näkee suoraan miksi saturaatiokinetiikka voi olla ongelmana, kun käsitellään reaktiokinetiikkaa mahdollisille katalyytin suhteen toisen kertaluvun reaktioille. Jos konsentraatiot ovat liian pieniä, reaktion kertaluvut eivät välttämättä kuvasta oikeaa tilannetta vaan kertovat katalyytin saturaatiosta. Täten toisen kertaluvun havaitseminen katalyytille pitänee tarkastaa mahdollisesti laajentamalla konsentraatioaluetta reagensseille, jotta mahdolliset muutokset voidaan havaita. Saturaation havaitseminen kuitenkin voi olla käytännöllisesti haastavaa. On helppoa sanoa, että reaktiota pitäisi tutkia laajalla katalyytinkonsentraatioalueella, mutta kokeellisesti se voi vaatia paljon, varsinkin, jos sitoutuminen on heikkoa.



Kuva 8. Saturaatiokinetiikka kuvaajana. x-akselina on substraatin  $\text{S}$  konsentraatio ja y-akselina reaktionopeus. Kuvaaja näyttää reaktionopeuden muuttuvan ensimmäisen kertaluvun kinetiikasta nollan kertaluvun kinetiikkaan, kun substraatin konsentraatio kasvaa tarpeeksi.

### 3.3.3. Autokatalyyysi

Autokatalyyttisessä reaktiossa reaktion tuote pystyy katalysoimaan reaktiota ja täten muuttamaan sekä reaktiomekanismia että reaktion kinetiikkaa.<sup>64</sup> Kuitenkin isotermisen autokatalyyttisen reaktion kineettinen profiili on hyvin selväluonteinen ja täten sen tunnistaminen on yksinkertaista.<sup>64</sup> Selväluonteisuus johtuu autoamplifikaatiosta, missä isotermisesti reaktion nopeus kasvaa suhteessa reaktiotuotteen konsentraation nähden.<sup>64–66</sup> Matemaattisesti autokatalyyysin voi ilmaista muodossa (yhtälö 30)<sup>64</sup>:

$$\begin{aligned}\frac{d[\mathbf{T}_A]}{dt} &= K(\mathbf{T}_A, \mathbf{W}) \cdot [\mathbf{T}_A]^n + f(\mathbf{W}) \\ K(\mathbf{T}_A, \mathbf{W}) \cdot [\mathbf{T}_A]^n &\gg f(\mathbf{W}) \\ n &> 0,\end{aligned}\tag{30}$$

missä  $\mathbf{T}_A$  on autokatalyytti, esimerkiksi juuri reaktion tuote,  $\mathbf{W}$  on kaikkien muiden reaktiokomponenttien konsentraatio. Jos  $K(\mathbf{T}_A, \mathbf{W})$  on laskeva funktio  $\mathbf{T}_A$ :sta,  $K(\mathbf{T}_A, \mathbf{W})$ :n pitäisi vähentyä hitaammin kuin  $[\mathbf{T}_A]^n$  kasvaa eli  $K(\mathbf{T}_A, \mathbf{W}) \times [\mathbf{T}_A]^n$  on nouseva funktio mille tahansa positiiviselle  $[\mathbf{T}_A]$ .<sup>64</sup> Reaktionopeus autokatalyyttiselle reaktiolle on sievennetty muoto yhtälöstä 30 (yhtälö 31):

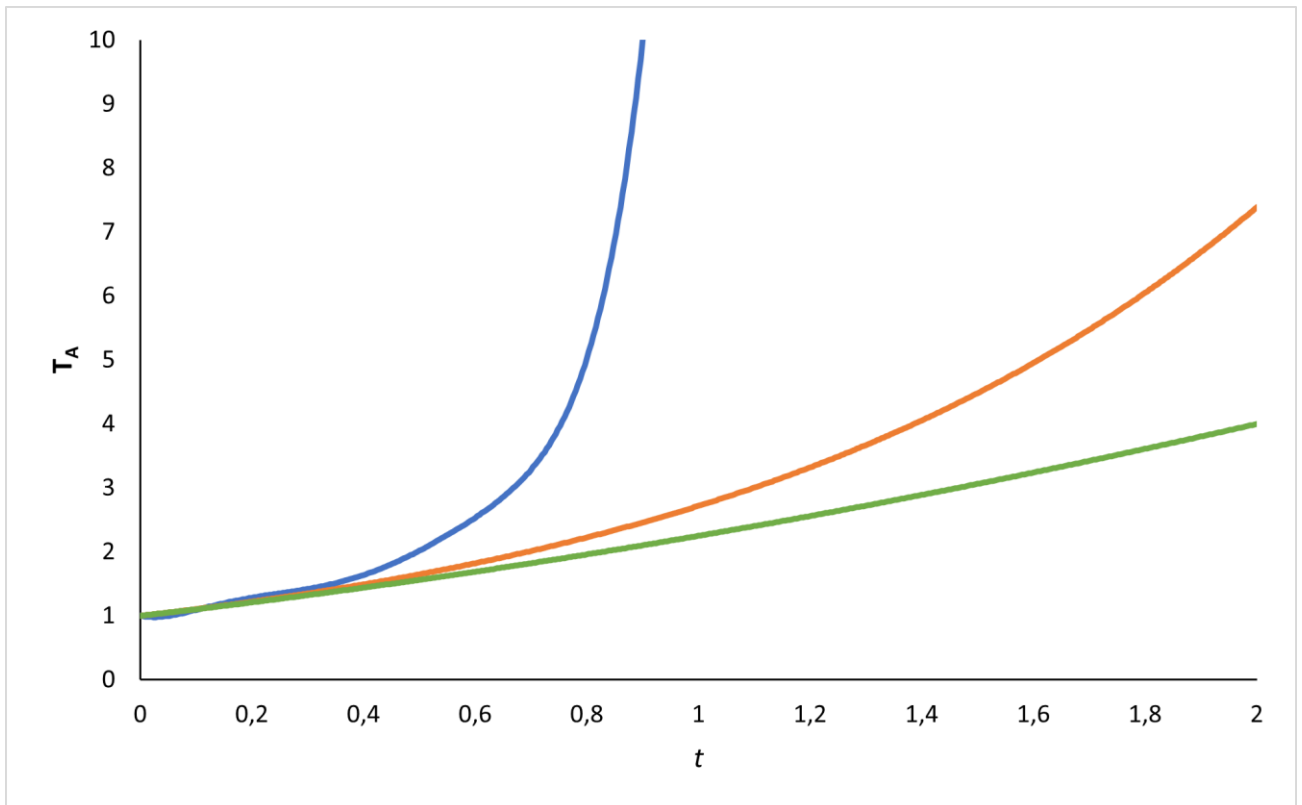
$$\frac{d[\mathbf{T}_A]}{dt} = K(\mathbf{W}) \cdot [\mathbf{T}_A]^n + f(\mathbf{W})\tag{31}$$

Tämä yhtälö kertoo autokatalyyysin ”voimakkuudesta”, mikä on yksi autokatalyyysin tärkeimpiä ominaisuuksia<sup>64,67,68</sup> ja yhtälön 31 avulla voidaan ”voimakkuus” määrittää kvantitatiivisesti.<sup>64</sup> Funktion jyrkkyys määräytyy eksponentin  $n$  mukaan, mistä johtuvia seuraamuksia pitää tarkastella erikseen: matemaattisessa esityksessä pitää ottaa huomioon integraalifunktion  $\mathbf{T}_A(t)$  muoto sekä substraattien ja tuotteiden massatasapainon mukana tulevan differentiaaliyhtälön muoto. Integraaliyhtälöt arvoille  $n = \frac{1}{2}, 1, 2$ ;  $K(\mathbf{W}) = k$ ;  $f(\mathbf{W}) = 0$  ja  $\mathbf{T}_A(t=0) = \mathbf{T}_{A0}$  tuottavat vastaavat parabolisen (yhtälö 32), eksponentiaalisen (yhtälö 33) ja hyperbolisen (yhtälö 34) funktiojoukon. Yhtälöistä on kuvaajat kuvassa 9:

$$\mathbf{T}_A = \frac{k}{4}t^2 + k\sqrt{\mathbf{T}_{A0}t} + \mathbf{T}_{A0}\tag{32}$$

$$\mathbf{T}_A = \mathbf{T}_{A0}e^{kt}\tag{33}$$

$$\mathbf{T}_A = \frac{\mathbf{T}_{A0}}{1 - \mathbf{T}_{A0}kt}\tag{34}$$



Kuva 9. Funktiojoukon (yhtälöt 32 – 34) kuvaajat. Vihreä on parabolisen kasvun kuvaaja (yhtälö 32), oranssi on eksponentiaalista kasvun kuvaaja (yhtälö 33) ja sininen on hyperbolisen kasvun kuvaaja (yhtälö 34).<sup>64</sup> x-akselina on aika  $t$  ja y-akselina on autokatalyytin  $T_A$ :n konsentraatio.

Kaaviossa 13 on esimerkkinä kaksi simuloitua autokatalyyttistä reaktiota:



Kaavio 13. Kaksi simuloitua autokatalyyttistä reaktiota.

Simuloituille reaktioille nopeuslait ovat seuraavat (yhtälöt 35 ja 36):

$$\frac{d[T_A]}{dt} = k[T_A][S] \quad 35$$

$$\frac{d[T_A]}{dt} = k[T_A]^2[S] \quad 36$$

Yhtälöistä näkee suoraan, että reaktiot ovat ensimmäistä ja toista kertalukua  $[T_A]$ :n suhteen. Kuitenkin huomiona on se, että kyseiset konsentraatiot eivät ole riippumattomia, sillä  $T_A$  muodostuu  $S$ :stä, joten reaktiossa vallitsee massatasapaino (yhtälö 37):

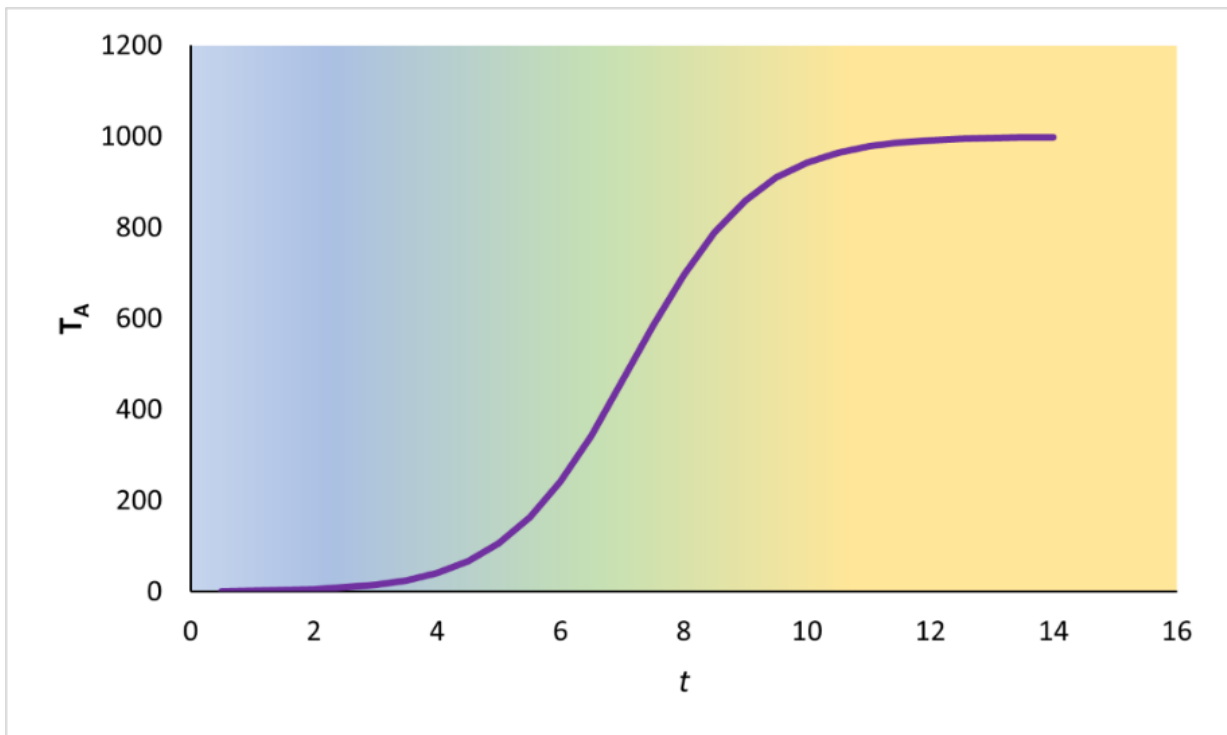
$$[T_A] + [S] = [T_{A0}] + [S_0] = W_0, \quad 37$$

minkä takia, kun yhtälöihin 35 ja 36 sijoitetaan  $[S] = W_0 - [T_A]$  saadaan yhtälöt 38 ja 39:

$$\frac{d[T_A]}{dt} = k[T_A]W_0 - k[T_A]^2 \quad 38$$

$$\frac{d[T_A]}{dt} = k[T_A]^2W_0 - k[T_A]^3 \quad 39$$

Näistä nähdään, että  $T_A$  on joko neliöllinen (yhtälö 38) tai kuutiollinen (yhtälö 39). Näitä termejä käytetään kirjallisuudessa autokatalyyysireaktioissa, mutta ne eivät vastaa eksponentiaalista ja hyperbolista kasvua, kuten yllä on kuvattu.<sup>64</sup>



Kuva 10. Yhtälön 40 kuvaaja, kun  $W_0 = 1000$ ,  $k = 0,001$  ja  $T_{A0} = 1$ . x-akselina on aika  $t$  ja y-akselina on autokatalyytin  $T_A$ :n konsentraatio. Kuvaaja on jaettu eri vaiheisiin väreillä kertoen, kuinka konsentraation muutos ajan suhteen muuttuu reaktion edetessä.

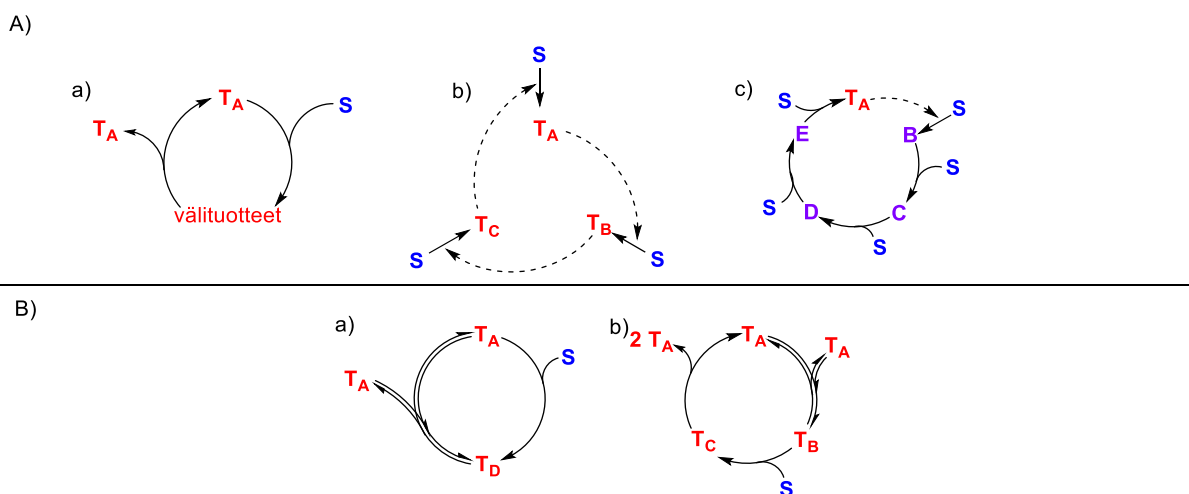
Kun autokatalyyttisiä reaktioita lähdetään tutkimaan kineettisesti, täytyy ensin integroida yhtälö 38 seuraavalla raja-arvolla:  $T_A(t = 0) = T_{A0}$ . Tästä saadaan sigmoidaalinen funktio (yhtälö 40), josta on ohessa kuvaaja (kuva 10):



$$T_A = \frac{W_0}{1 + \frac{(W_0 - T_{A0})}{T_{A0}} e^{-W_0 kt}} \quad 40$$

Kuvaajasta näkee, että reaktiolla on kolme luonteenomaista vaihetta: (i) viivevaihe (sininen), (ii) eksponentiaalinen vaihe (vihreä) ja (iii) saturaatiovaihe (keltainen). Vaiheita ei kuitenkaan ole tarkkaan määritelty, vaan niiden rajat ovat epätarkat ja pitkälti reaktiosta riippuvia. Kuitenkin peruseriaatteena on, että viivevaiheessa tuotetta on muodostunut vain vähän, eksponentiaalinen vaihe tulee viivevaiheen jälkeen ja tuotetta on muodostunut tarpeeksi, jotta reaktionopeuden kiihtyminen on näkyvässä parhaiten ja saturaatiovaihe on reaktion lopetusvaihe, missä substraatti on kulunut pois.<sup>64</sup>

Koska reaktioissa substraatin määrä on yleisesti rajallinen ja autokatalyyttiset systeemit ovat kinetiikaltaan eksponentiaalisia, on sigmoidaalisen kuvaajan havaitseminen reaktionopeuden määrittämisessä ensimmäinen merkki autokatalyyttistä reaktiossa. Kuitenkin esimerkiksi aikaisemmin mainittu Briggs-Haldane oletus (luku 3.3.2.) voi muodostaa kuvaajassa näkyvän viivevaiheen ja täten todistukseksi reaktion autokatalyyttisyydelle tarvitaan, että reaktionopeus kasvaa tuotetta lisättäessä. Tämän kontrollikokeen voi tehdä esimerkiksi RPKA:n (luku 3.2.1) tai VTNA:n (3.2.2) avulla. Teoreettisesti autokatalyyttisten reaktioverkostojen ja reaktiomekanismien määrä on loputon. Kuitenkin tiettyjä yhtäläisyyksiä on havaittu tutkimalla oikeita reaktioita teoreettisesti (kaavio 14)<sup>64</sup>. Yksinkertaisimmillaan autokatalyyttinen reaktio on suora (kaavio 14Aa), mutta siinä olevat välituotteet voivat olla monimutkaisia ja niistä useat voivat olla stabiileja, josta muodostuva reaktioverkosto voi olla hyvinkin mutkikas. Tästä esimerkkinä Semenovin tutkimus antaa käänteisen Krebs-syklin.<sup>64,69,70</sup> Vastaavasti epäsuorasta autokatalyyysistä (kaavio 14Ab) esimerkkinä oli Hinshelwoodin tutkimus<sup>64,71</sup>, missä tuote ei autokatalysoi muodostumistaan vaan se katalysoi katalyytin muodostumista, mikä sitten katalysoi tuotteen muodostumista. Hinshelwood huomauttaa, että katalyyttien lukumäärästä riippumatta, systeemi saavuttaa eksponentiaalisen vaiheen viivevaiheen jälkeen. Viivevaiheessa voidaan havaita, että reaktionopeus heilahtelee.<sup>64,71</sup> Semenovin ryhmän julkaisu<sup>64</sup> huomauttaa, että usein autokatalyyttisissä reaktioissa ei kuitenkaan ole useita katalyyttisesti aktiivisia yksilöitä, vaan sen sijaan yhden katalyytin ohella on ei-katalyyttisiä välituotteita (kaavio 14Ac). Näistä esimerkkeinä olivat Semenovin ja Skorbin tutkimukset tioesterien<sup>64,72</sup>, atsialkyynien<sup>64,73</sup> ja formaldehydisulfidin<sup>64,74</sup> parissa.<sup>64,75</sup> Tällaisissa reaktioissa on kuitenkin aina mukana kuvaajan viivevaihe, jonka kesto on tietysti riippuvainen ei-katalyyttisesti aktiivisten välituotteiden lukumäärästä.<sup>64</sup>



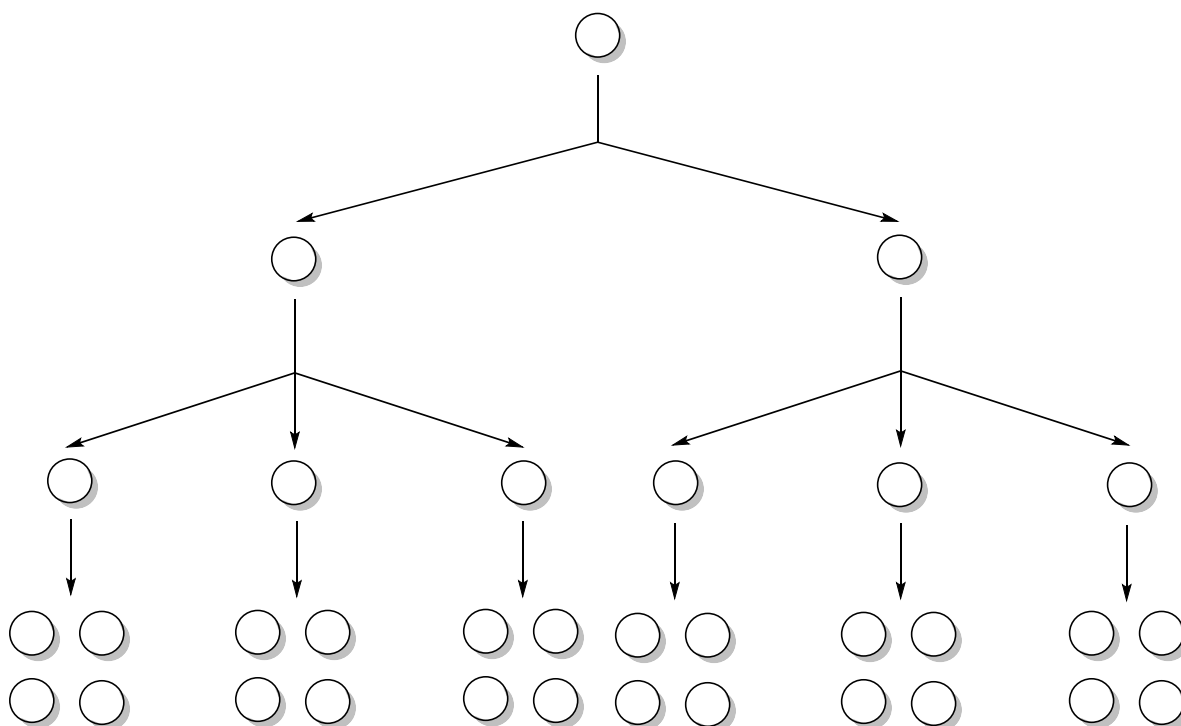
Kaavio 14. A) Esimerkkejä autokatalyyttisistä reaktioista, joissa reaktionopeudella on eksponentiaalinen kasvu ja B) Esimerkit a) parabolisesta kasvusta ja b) hyperbolisesta kasvusta reaktionopeudella. Punaiset ovat katalyyttisesti aktiivisia yhdisteitä, purppurat ei-aktiivisia ja siniset ovat substraatteja.  $T_D$  parabolisessa systeemissä on usein  $T_A$ :n dimeeri.<sup>64</sup>

Kaaviossa 14A olevat esimerkit ovat kaikki eksponentiaalisesta reaktionopeuden kasvusta autokatalyyttisessä systeemissä. Parabolisen tai hyperbolisen reaktionopeuden kasvun omaavat systeemit ovat harvinaisempia ja niistä on esimerkit kaaviossa 14B. Huomionarvoisin esimerkki parabolisesta systeemistä on tilanne, jossa templaattireaktiossa (template reaction) tapahtuu voimakasta tuotteen inhibiitiota, koska reaktiossa muodostuu ei-aktiivinen dimeeri (kaavio 14Ba).<sup>64,76–79</sup> Paraboliseen kinetiikkaan päädytään, kun tasapaino aktiivisen monomeerin ja ei-aktiivisen dimeerin välillä on vahvasti dimeerin puolella. Jos kuitenkin tasapaino on vahvasti monomeeriin päin, kinetiikka vaihtuu eksponentiaaliseksi.<sup>64,80</sup> Eliöiden seksuaalinen lisääntyminen on esimerkkinä autokatalyyttisestä systeemistä, missä reaktionopeuden kasvu on hyperbolista.<sup>64</sup> Kemiallisia reaktiota hyperbolisiin systeemeihin on vähän ja teoreettisesti mahdolliset tapaukset ovat parabolisten tapausten kaltaisia, mutta aktiivisena katalyyttinä on muodostuva dimeeri (kaavio 14Bb).<sup>64,81</sup>

Reaktion kertaluku autokatalyyttisissä systeemeissä ei kuitenkaan ole itsestään selvä ominaisuus reaktioille. Tämä johtuu autokatalyyysin kuluessa reaktiossa muuttuvasta kineettisestä profiilista. Esimerkiksi reaktio voi siirtyä parabolisesta kineettisestä profiilista eksponentiaaliseseen ja täten reaktion kertaluku, ja täten myös katalyytin kertaluku, voi muuttua. Esimerkkinä on yhtälö 41<sup>64</sup>:

$$\frac{d[\mathbf{T}_A]}{dt} = \frac{k_1[\mathbf{T}_A]}{k_2 + [\mathbf{T}_A]} \quad 41$$

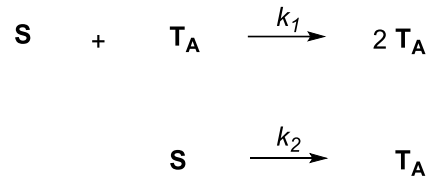
Semenovin artikkeli esittää tämän yhtälön malliksi autokatalyyttiseen entsyymien muodostukseen reaktiossa, jossa tapahtuu tuotteen inhibiitiota. Reaktion alkuvaiheessa, missä  $[\mathbf{T}_A]$  on matala,  $k_2 \gg [\mathbf{T}_A]$  ja kasvu on eksponentiaalista. Reaktion kesivaiheilla, kun  $k_2 \approx [\mathbf{T}_A]$ , kasvu onkin parabolista ja reaktion loppupuolella,  $k_2 \ll [\mathbf{T}_A]$  ja kasvu on lineaarista. Myös yhtälö 30 voi olla epäpätevä kuvaamaan autokatalyyttistä systeemiä, jos huomioidaan ajatus ”fertiiliydestä”<sup>64</sup>. Ajatuksena on, että replikaattorin ”fertiiliys” kasvaa jokaisen syklin kohdalla: ensimmäisessä syklissä replikaattori tuottaa yhden tytäryksilön, minkä takia seuraavassa syklissä tuotanto onkin neljä eli yhteensä yksilöitä on kahden syklin jälkeen kuusi. Jo kolmannen syklin kohdalla nousee tuotanto 24:n yksilöön. Kasvu on siis nopeampaa kuin parabolisissa systeemissä, mutta se ei ole hyperbolista kasvua, vaan se on kertomallista (factorial). Tästä on esitetty visuaalinen malli kaaviossa 15<sup>64</sup>:



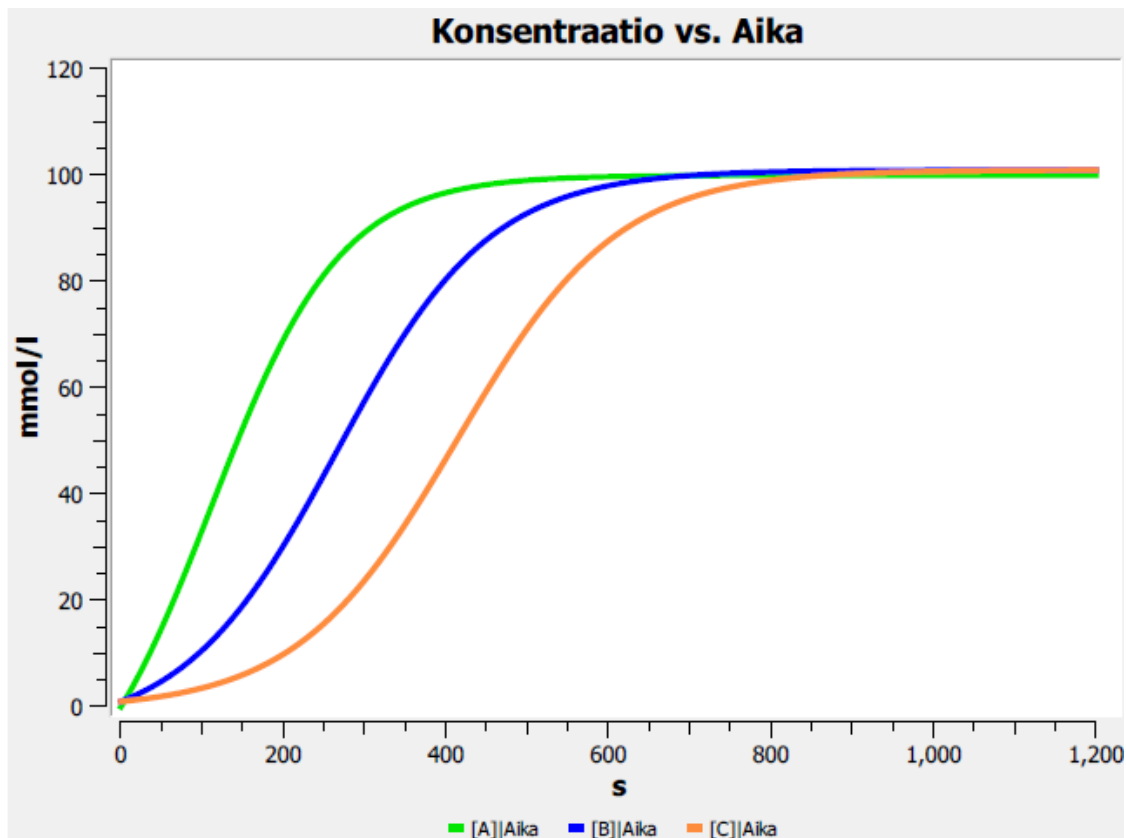
Kaavio 15. Esimerkki kertomallisesta kasvusta.<sup>64</sup>

Katalyyysireaktioita tutkittaessa on huomioitava, että jokaisen katalyyttisen reaktion ohella reaktioseoksessa tapahtuu myös ei-katalyyttinen taustareaktio. Tämä ei-katalyyttinen reaktio voi olla mitätön nopeudeltaan, mutta teoriassa se on aina olemassa. Sama pätee myös autokatalyyttisiin systeemeihin, missä tämä ei-katalyyttinen reaktio on initiaattorina autokatalyyysille ja täten kyseisen ei-katalyyttisen reaktiopulun vaikutus on merkittävä koko

reaktion kannalta. Tämä johtuu siitä, että liian nopea ei-katalyyttinen reaktio peittää autokatalyyttisten systeemien dynamiikan ja täten systeemin luonnonvalintaominaisuudet<sup>64,75</sup>, bistabiliteetti ja reaktiorintaman eteneminen ja reaktion heilahteleva käytös katoavat.<sup>64,82</sup> Tätä varten voidaan käsitellä yksinkertaista autokatalyyttistä reaktiota ja sen ei-katalyyttistä reaktiopolkua (kaavio 16):



Kaavio 16. Yksinkertainen autokatalyyttinen reaktio ja sen ei-katalyyttinen reaktiopolkua.<sup>64</sup>



Kuva 11. Kuvaajat kaaviossa 16 oleville simuloituille reaktioille eri reaktionopeuksilla. Simulaation parametrit olivat:  $[S_0] = 100 \text{ mM}$ ,  $[T_{A0}] = 0$ ,  $k_1 = 0,0001 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ja  $k_2 = 0.0025 \text{ s}^{-1}$  (vihreä, A),  $k_2 = 0.0005 \text{ s}^{-1}$  (sininen, B) sekä  $k_2 = 0.00005 \text{ s}^{-1}$  (oranssi, C).<sup>64</sup> x-akselina on aika  $t$  ja y-akselina autokatalyytin  $T_A$  konsentraatio.

Suoraan reaktionopeuksia ei voida vertailla, koska toinen niistä on ensimmäistä kertalukua ja toinen toista kertalukua.<sup>64</sup> Täten Semenovin ryhmän<sup>64</sup> ajatuksena oli vertailla reaktionopeuksia reaktion puolivälissä, kun puolet substraatista **S** on kulunut. Kun autokatalyyysi on vain kaksi kertaa nopeampi kuin ei-katalysoitu reaktio, kuvaajan sigmoidaalinen luonne ei ole näkyvissä. Vaikka nopeus ero olisi kymmenkertainen, reaktioiden kinetiikka eroaa vain vähän toisistaan. Vasta, kun autokatalyyttinen reaktio on sata kertaa taustakreaktiota nopeampi, voidaan tämä kineettinen ero nähdä kuvaajassa (kuva 11).<sup>64</sup> Semenovin ryhmän tutkimuksen<sup>64</sup> mukaan tämä kvantitatiivinen ero kineettisessä käyttäytymisessä eri reaktionopeuksien suhteiden välillä autokatalyyttisissä -ja ei-katalysoiduissa reaktioissa kertoo kvalitatiivisesta erosta emergenttien dynaamisten tapahtumien läsnäolon ja poissaolon välillä. Tämän suhteiden eron tärkeyden autokatalyyttisten ja suorien reaktioiden välillä toi esiin von Kiedrowski tutkimuksissaan.<sup>64,78,79</sup>

Katalyytin suhteen toisen kertaluvun määrittämisen suhteen autokatalyyysin tuoma ongelma on juuri sen vaikutus muuhun reaktiokinetiikkaan. Autokatalyyttisen tuotteen muodostuminen reaktiossa tulee kilpailemaan alkuperäisen katalyytin kanssa ja täten systeemiin muodostuu kaksi erillistä katalyyttistä reaktiota. Kuitenkin on täysin mahdollista, että itse autokatalyytti toimii näennäisesti toisen kertaluvun oletuksella, jos esimerkiksi reaktiossa muodostuu hyperbolisen systeemin tarvitsema katalyyttisesti aktiivinen dimeeri. Tämän lisäksi tietenkin hankaluutena on itse kineettinen profiili. Autokatalyyysin profiili on hyvin selkeä (kuva 10), mutta sen havaitseminen kokeellisesti voi tarvita paljon datapisteitä ja täten huolimattomasti tehty reaktioseuranta voi antaa vääränlaisen kuvan reaktion profiilista.

### 3.3.4. Muita haasteita

Yleisesti ottaen katalyytin suhteen toisen kertaluvun reaktiot ovat harvinaisia ja kuten Burés *et al.*<sup>1</sup> huomauttavat yleisesti syynä toisen kertaluvun havaitsemiseen katalyytin suhteen on jokin muu seikka kuin se, että katalyyttimolekyylejä on reaktionopeuden määräävässä vaiheessa mukana kaksi. Tutkielmassa käydyt syyt eivät ole ne kaikki seikat vaan on varmasti muitakin syitä, mitkä aiheuttavat illuusion kertalukuja tutkittaessa toisesta kertaluvusta katalyytin suhteen. Kuitenkaan näiden läpikäyminen ei ole tutkielman kannalta niin tärkeää, että näitä kolmea enempää kannattaisi mainita tarkemmin. Pääasiallisesti kuitenkin voidaan todeta, että ilmiön harvinaisuuden takia, on syytä tuoda esiin useita eri näkökulmia, menetelmiä ja analyyttisiä lähestymistapoja vahvistaakseen hypoteesia. Kuten Burés totesi<sup>1</sup>: ”A reaction

mechanism can never be proven, only disproven”, ja koska katalyytin rooli on mekanistinen, on tärkeää tutkimuksessa olla niin kattava ja perusteellinen, että toisen kertaluvun oletusta katalyytin suhteen on vaikea todistaa vääräksi. Mikä itsessään on se tieteellisen todistamisen lähtökohta. Asioita ei todista suoraan vaan vaihtoehtoisesti selitykset todistetaan vääräksi jättäen jäljelle todennäköisimmän selityksen väitteelle.

### 3.4 Ratkaisuja haasteisiin

Pääasiallisesti luvussa käsiteltyihin haasteisiin lääkkeenä on muu todistusaineisto kinetiikan ohella. Kinetiikka on vain yksi osa-alue reaktiomekanismien tutkimista ja täten se ei voi kattavasti vastata kaikkiin kysymyksiin eikä se ole edes sen tarkoituskaan. Sen sijaan on tärkeää käyttää kineettisiä kokeita ja menetelmiä luomaan kineettinen profiili reaktiolle, mitä sitten voidaan käyttää vertailuna muiden kokeiden, esimerkiksi kineettisten isotooppiefektikokeiden tai crossover-kokeiden, tai muiden menetelmien, esimerkiksi laskennallisen kemian, kanssa. Kun kinetiikasta saatua dataa vertailee muihin lähestymistapoihin, voidaan muodostaa mekaniismista tieteellisen yhteisymmärryksen kaltainen yhtenväinen näkemys.

Jos kuitenkin päämenetelmänä ovat kineettiset kokeet, on syytä ottaa huomioon tässä luvussa esitetyt seikat ja muutenkin varmistua kineettisten tulosten laadusta esimerkiksi reaktioseurannan avulla, jotta vahvistus oletuksille on tukevampi. Jos reaktiossa epäillään inhibiitiota tai katalyytin hajoamista, Blackmondin RPKA ja Burésin VTNA antavat oivat työkalut näiden selvittämiseen. Muita tapauksia varten on hyvä tukeutua Burésin katsausartikkelissaan<sup>1</sup> esittämään kritiikkiin, jotta mekaniismit voidaan erottaa toisistaan. Lisäämällä kineettisiä kokeita, laajentamalla tutkitun katalyytin konsentraatioaluetta ja tutkimalla reaktiota riittävällä määrällä eri katalyyttikonsetraatioita, voidaan katalyyttiin liittyvää kineettistä datan määrää parantaa. Tämä edesauttaa havaitsemaan vaihtoehtoisia selityksiä oletetulle kertaluvulle. Samalla Burés on myös esittänyt käytännön lähestymistapoja kineettisen datan laadun parantamiseen esimerkiksi minimoimalla virheet katalyytin alkukonsentraatioissa tai pyrkimällä pitämään reaktion lämpötila vakiona.<sup>1</sup>

Tämän lisäksi Burés myös esitti datan käsittelyyn liittyvän seikan, jos tutkimuksissa käsitellään reaktionopeusdataa. Nopeusdatasta pitäisi vähentää mahdolliset ei-katalysoiduista tausta-reaktioista aiheutuva reaktionopeus, sillä näkyvä (apparent) reaktionopeus on muutoin

alhaisempi kuin oikea reaktionopeus. Tämän Burés demonstroi matemaattisesti derivoimalla elastisuuskertoimen (yhtälö 43)<sup>2,83</sup> reaktiosta, jossa on huomattava taustalla tapahtuva ei-katalysoitu reaktio (yhtälö 42)<sup>1</sup>:

$$v_{näkyvä} = (k_{kat} [\mathbf{kat}]_T^\alpha + k_{eikat}) [\mathbf{S}_I] [\mathbf{S}_{II}] \dots \quad 42$$

$$\varepsilon_{[\mathbf{kat}]_T}^{v_{näkyvä}} = \frac{dv_{näkyvä}}{d[\mathbf{kat}]_T} \frac{[\mathbf{kat}]_T}{v_{näkyvä}} = m \cdot \alpha \quad m = \frac{1}{1 + \frac{k_{eikat}}{k_{kat} [\mathbf{kat}]_T^\alpha}} < 1 \quad 43$$

Reaktion näkyvä nopeus on aina pienempi kuin oikea nopeus, koska molemmat nopeusvakiot ovat positiivisia ja täten  $m < 1$ . Mitä suurempi on ei-katalysoidun reaktion nopeus, sitä pienempi on  $m$  ja näin sitä suurempi ero näkyvän ja oikean nopeuden välille muodostuu.<sup>1</sup> Muutenkin Burés ehdottaa “normalisoidun herkkyyden analyysiä” reaktiokomponenttien kertalukuja tutkittaessa, sillä siitä saatava data on hänen mukaansa oleellista reaktiomekanismien puolesta ja sen avulla pystyy käsittelemään monimutkaisempia katalyyttisiä reaktioita ja systeemejä, mihin aikaisemmin käytetyt kinetiikan yhtälöt eivät välttämättä sovellu täysin.<sup>2,25,84–86</sup>

### 3.5. Tutkielmassa käytetty kineettinen näkökulma

Kuten kaksoiskatalyyttisten reaktioiden esittelyluvussa mainittiin, tutkielmassa analysoitavat reaktiot ovat jaoteltu kaksoiskatalyysireaktioihin ja kaksoiskokatalyysireaktioihin. Kineettisesti tämä merkitsee sitä, että kaksoiskatalyyttiset reaktiot ovat ne kiinnostavimmat tapaukset, sillä niissä katalyytin suhteen toisen kertaluvun oletus on olemassa sillä perusteella, että kaksoiskatalyyttiseen reaktioon tarvitaan kaksi katalyyttiä samaan katalyysikiertoon. Kokatalyyttiset reaktiot puolestaan ovatkin tapauksia, missä kaksoiskatalyyttisyys täyttyy mutta toista kertalukua ei olettavasti katalyytin suhteen ole, sillä katalyytit ovat eri yhdisteitä ja täten eri reaktiokomponentteja ja kineetiikan reaktionopeuslaeissa, ne omaavat omat terminsä sen sijaan, että termi esiintyisi yhtälöissä kahdesti. Omalta osaltaan tällaiset kaksoiskatalyyttireaktiot ovat kuitenkin mielenkiintoisia tapauksia ja täten niihinkin pauneudutaan osiltaan vaikkakin kineettinen näkökulma jää vähäisemmäksi.

## 4. Tutkimuskysymys

Primäärisenä tutkimuskysymyksenä tutkielman kirjallisessa osassa on: *ovatko analysoidut reaktiot katalyytin suhteen toista kertalukua?* Analysoitavilla reaktioilla tarkoitetaan seuraavassa luvussa kirjallisuuden tapauksia, missä kirjoittajat ovat esittäneet katalyytin olevan toista kertalukua tai muuten näyttäneet reaktion olevan kaksoiskatalyyttinen. Tämä kysymys on pääasiallisesti reaktiomekanistinen, ja täten sääntönä pätee tutkielmassa aikaisemmin esitetty toteamus: reaktiomekanismeja ei voida todistaa todeksi, vaan ainoastaan vääriksi. Täten tutkimuskysymykseen vastatessa tapauksien kohdalla kriteereinä ovat todistusaineiston laajuus, monipuolisuus ja merkittävyys. Koska tutkielman pääpainona on ollut reaktiokinetiikka, myös analyysissä painotetaan kinetiikan menetelmiä. Etenkin tapauksien kohdalla on huomion arvoista keskittyä siihen, että on mahdollinen katalyytin inhibiitio huomioitu tai pois suljettu tavoin tai toisin.

Analysoitavat reaktiot ovat myös jaoteltu kaksoiskatalyyysi -ja kaksoiskokatalyyysi reaktioihin. Kineettisesti tällä on merkitystä siitä näkökulmasta, että toisen kertaluvun oletus vaatii, että komponenttia on reaktionopeuden määräävässä vaiheessa käytössä kahden ekvivivalentin verran. Tämä kahden ekvivivalentin määrä reaktionopeuden määräävässä vaiheessa toteutuu todennäköisimmin kaksoiskatalyyysissä ja täten nämä reaktiot ovat tutkimuskysymyksen kannalta ne oleellisimmata. Kaksoiskokatalyyysiä käsitellään kuitenkin ajatuksella, että ne ovat hyvänä esimerkkinä miksi kaksoiskatalyyttisyys ei tarkoita toista kertalukua katalyytin suhteen. Analyysien jälkeen tutkielmassa myös esitetään muutamia kokeita tai näkökulmia, joilla mahdollisesti voisi tutkimusten väitteelle rakentaa vielä kattavampaa pohjaa tai muuten parannella jo olemassa olevaa todistusaineistoa.

Sekundäärisenä tutkimuskysymyksenä kirjallisessa osassa voidaan esittää seuraava: *Miksi katalyytin suhteen toisen kertaluvun reaktioita pitäisi tutkia?* Tähän vastataan, kun kaikki analysoitavat reaktiot on käyty läpi ja analyyseistä on muodostettu kokonaisvaltaisempi kuva kaksoiskatalyyttisiin reaktioihin.



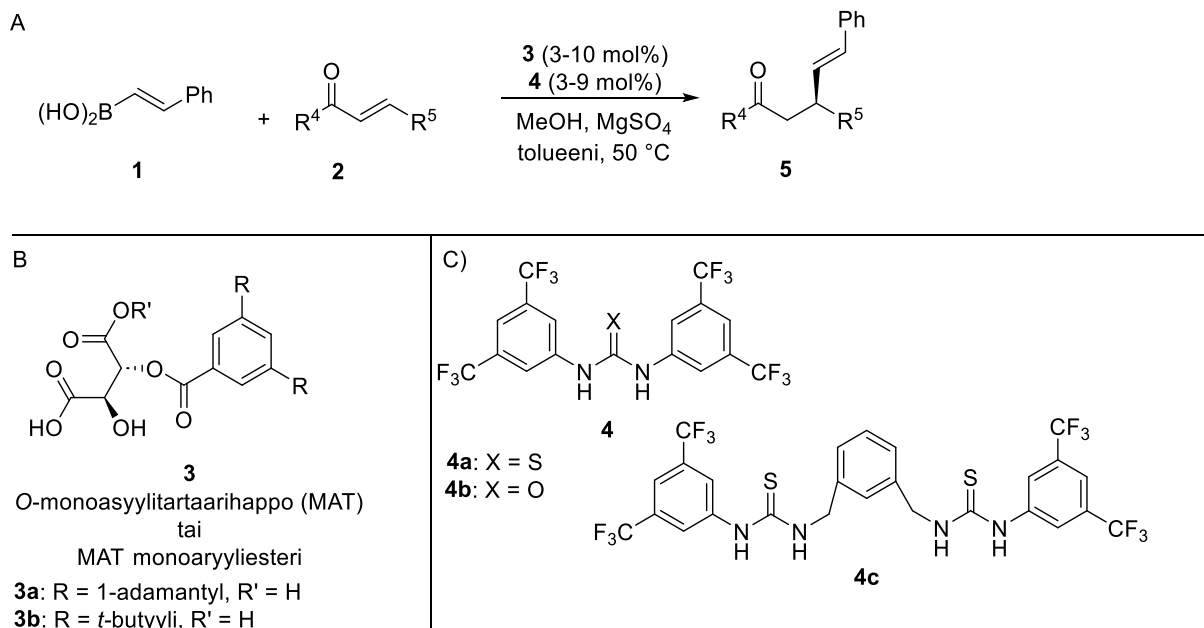
## 5. Analysoitavat reaktiot

### 5.1. Kaksoiskatalyysi

Tämän kaltaiset reaktiot ovat siis tapauksia, missä katalyyttisessä syklissä on mukana sama katalyytti kahteen kertaan. Tämä mahdollistaa, että reaktio on toista kertalukua katalyytin suhteen, mikä sitten havaitaan esimerkiksi luvussa 3. esitetyin menetelmin. Myös muiat tapoja toisen kertaluvun riippuvuuden havaitsemiseen voidaan käyttää ja näitä tapoja kuvataan esimerkkien kohdalla.

#### 5.1.1. Sugiuran ryhmän konjugaattiadditio

Ensimmäisenä esimerkkinä kahden katalyytin yhteistyölle reaktiossa voidaan pitää Sugiuran työryhmän<sup>87</sup> konjugaattiadditioreaktiota, missä boroonihappo liitetään enantioselektiivisesti tyydyttymättömään ketoniin. Tätä reaktiota katalysoi *O*-monoasyyliitartaarihappo (MAT) ja kokatalyyttinä toimii (tio)urea katalyytti. Reaktiosta on malli kaaviossa 17.<sup>87</sup>



Kaavio 17. A) Sugiuran ryhmän tutkima konjugaattiadditio reaktio boroonihapon **1** ja ketonin **2** välillä. B) Pääkatalyyttinä toimiva MAT **3** ja sen johdannaiset. C) Kokatalyyttinä toimivat (tio)ureat **4**.<sup>87</sup>

Sugiuran ryhmä oli jo aikaisemmin näyttänyt **4a**:n toimivan hyvin katalyyttinä kalkonin **2a** ( $R^4 = R^5 = Ph$ ) ja (*E*)-styryyliboroonihapon **1** välillä tuottaen adduktin **5aa** korkealla saannolla sekä käytännöllisellä *ee*:llä (88 %).<sup>87,88</sup> Kun katalyytin konsentraatiota pudotettiin 10 mol%:sta 3 mol%:iin, reaktion saanto puolittui ja selektiivisyys kärsi huomattavasti.<sup>87</sup> Kun joukkoon lisättiin 9 mol% Schreinerin tioureaa **4a**, saatiin reaktion saanto ja selektiivisyys kohoamaan takaisin alkuperäisesti verrattaviin tuloksiin. Mekanismia varten Sugiuran ryhmä lähti tutkimaan reaktiokinetiikkaa **4b**:n avulla hyödyntäen <sup>1</sup>H NMR-spektroskopiaa. Saadun datan avulla, tutkimusryhmä päätteli reaktionopeuden olevan ensimmäistä kertalukua substraattien sekä MAT katalyytin suhteen.<sup>87</sup> Tästä rakentuivat yhtälöt 44–46 (viite 87, taulukko 2):

$$\frac{d[7aa]}{dt} = k'[2a][1] = k'[2a]^2 \quad 44$$

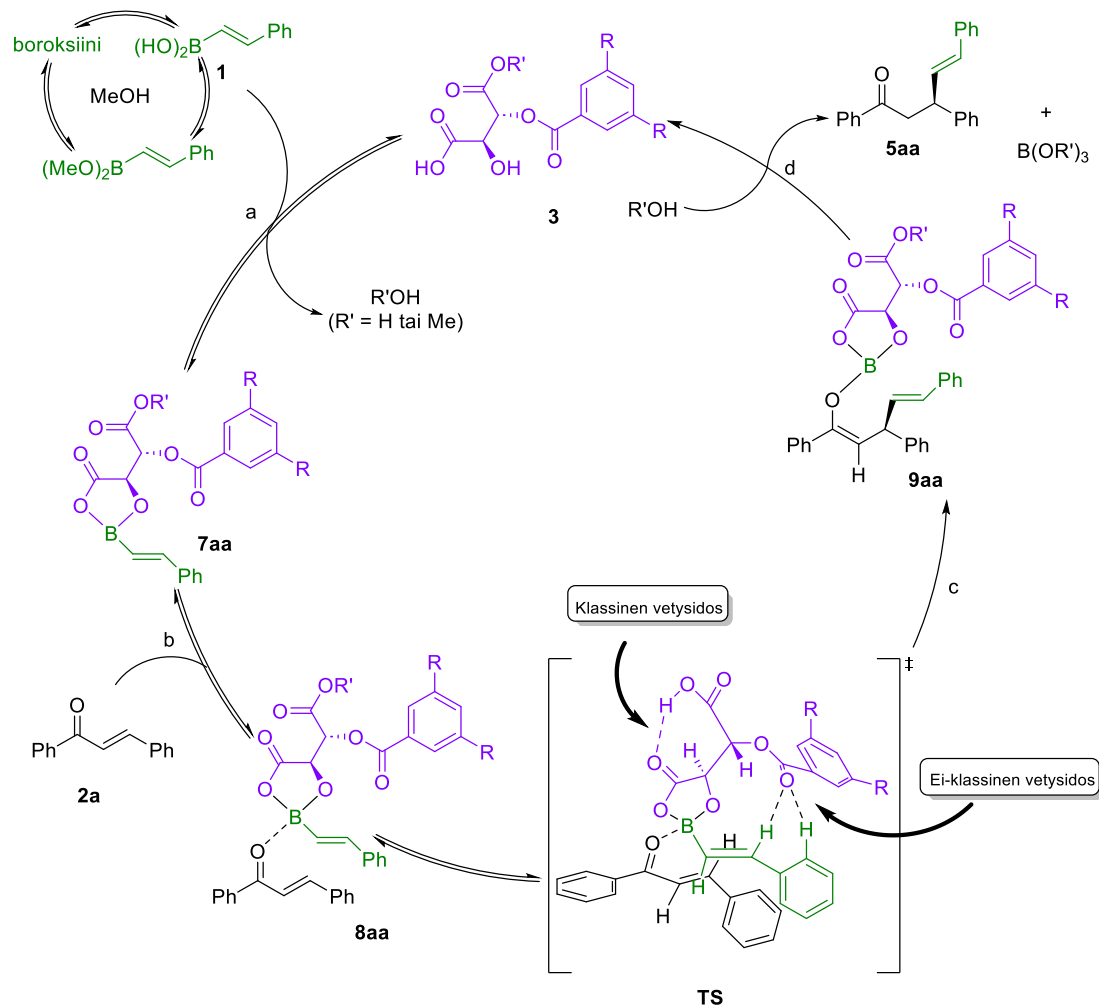
$$\frac{1}{[2a]} - \frac{1}{[2a]_0} = 2k't \quad 45$$

$$k' = k[2a] \quad 46$$

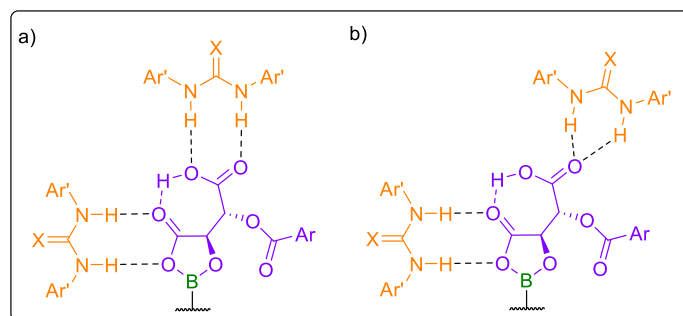
Kun **4a**:n ja **4b**:n kineettistä efektiä kokatalyyttinä lähdettiin tutkimaan, ryhmä huomasi, että  $k'$  **4a**:n tai **4b**:n suhteen oli toista kertalukua. Katalyyteistä **4b** oli hieman aktiivisempi **4a**:han verrattuna ja ilman **3b**:tä kumpikaan katalyyteistä eivät vaikuttaneet reaktionopeuteen. Samalla tutkimuksessa huomattiin enantioselektiivisyyden kasvavan, kun kokatalyyttiä käytettiin, mutta yllättäen enantioselektiivisyys laski kokatalyytin konsentraation kasvaessa. Tästä Sugiuran ryhmä päätteli, että reaktion nopeuden määräävässä vaiheessa kaksi molekyyliä **4a**:ta tai **4b**:tä osallistuu siirtymätilaan, ja tämän perusteella he esittivät oletuksensa reaktiomekanismista (kaavio 18).<sup>87</sup>

Mekanismissa MAT -katalyytti **3** reagoi ensin boroonihapon **1**, tai vastaavan boroksiinin tai metyyliesterin, kanssa muodostaen dioksaborolanonin **7aa**. Enoni **2a** muodostaa kolmiarvoisen kompleksin **8aa**, kun se reagoi **7aa**:n kanssa. Koska substraattien ja tämän MAT-katalyytin suhteen tämä reaktio on tähän mennessä ensimmäistä kertalukua, Sugiuran tutkimus päätteli **8aa**:n muodostumisen olevan reversiibeliprosessi. **8aa** sitten reagoi **4a**:n tai **4b**:n katalysoimana muodostaa nopeuden ja stereokemian määräävän siirtymätilan **TS**, josta se muodostaa boronienolaatin **9aa**, mikä sitten nopeasti protonoituu metanolin tai veden takia muodostaen tuotteen **5aa**. Sivutuotteena olevan boraatin  $B(OR')_3$  voi nähdä reaktiota inhiboivana tekijänä, jos se reagoi katalyytin **4** kanssa, mutta Sugiuran ryhmä sulki pois tämän vaihtoehdon kontrollikokeella, missä reaktioseokseen lisättiin  $B(OMe)_3$  (1,0 ekvivivalentti) metanolin (2,4 ekvivivalenttia) sijaan. Tässä kokeessa reaktionopeus ei muuttunut lainkaan.<sup>87</sup>

Koska reaktio oli **4a**:n tai **4b**:n suhteen toista kertalukua, tutkimusryhmä muodosti kaksi vaihtoehtoa molekyylien osallistumiselle reaktioon (kuva 12).<sup>87</sup>

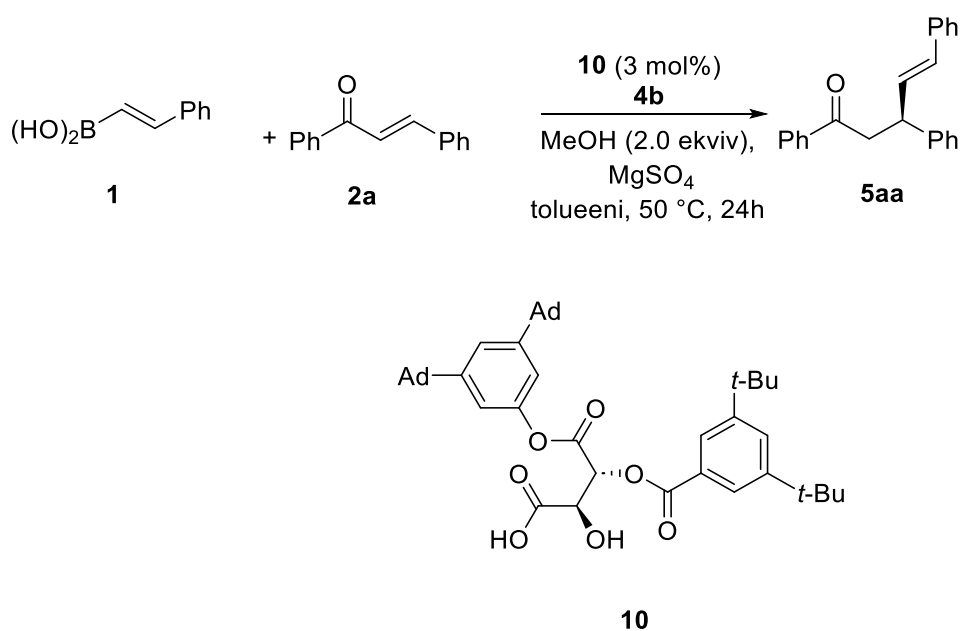


Kaavio 18. Sugiuran ryhmän esittämä mekanismi **3**:n ja **4**:n katalysoimalle konjugaattiadditioreaktiolle.<sup>87</sup>



Kuva 12. Sugiuran ryhmän ehdottamat vaihtoehdot, miten kokatalyytti **4a** tai **4b** aktivoivat MAT-katalyyttiä **3**.<sup>87</sup>

Havaittu toisen kertaluvun kinetiikka antoi osviittaa, että reaktiota voisi myös katalysoida tietyillä bis(tiourea)-yhdisteillä. Tarkemmissa tutkimuksissa havaittiinkin, että 3 mol% bis-tioureakatalyyttiä **4c** oli yhtä tehokas katalyytti kuin 6 mol% **4a**:ta. Tämän lisäksi Sugiuran ryhmä mietti, että miten katalyytin aktiivisuuden käy, jos kokatalyytin aktivoima karboksyyliiryhmä MAT-katalyytissä olisikin suojattu esteriryhmänä. Seulonnan tuloksena, he löysivät 3,5-di(1-adamantyyli)fenyyli esterin **10**, mikä toimi tarkoituksen mukaisesti reaktioolosuhteissa (kaavio 19). Tämä reaktio myös nopeutui kokatalyytin **4b** läsnäollessa, mutta tällä kertaa katalyytin kertaluku oli yksi **4b**:n suhteen, mikä oli todisteena alkuperäisen reaktion olevan toista kertalukua **4a**:n ja **4b**:n suhteen.<sup>87</sup>



Kaavio 19. Sugiuran tutkimuksen konjugaattiadditioreaktio MAT monoaryylesterin **10** katalysoimana. [**4b**] = 0, 3 tai 6 mol%. Ad = adamantyyli.<sup>87</sup>

Reaktio myös suoritettiin vaihtamalla substraatteja kokeillen elektronirikkaita, heterosyklisiä boroonihappoja, joilla myös saatiin reaktion saanto ja selektiivisyys pidettyä korkeina. Tämän lisäksi kalkonin **2a**, aryyliiryhmiä substituointiin ja näistä *o*-metoksisubstituoitu kalkoni toimi selektiivisemmin kuin vastaavat *m*-metoksi - ja *p*-metoksisubstituoidut kalkonit. Sugiuran ryhmä päätteli tästä, että korkea selektiivisyys voitiin saavuttaa elektronirikkailla ja steerisesti ahtailla aromaattisilla substitueinteilla  $\beta$ -asemassa kalkonin rakenteessa.<sup>87</sup> Kuitenkin kaikissa tilanteissa 3 mol% katalyyttiä **10** ja kokatalyyttiä **4b** antoivat paremman selektiivisyyden kuin 10 mol% **4b**.<sup>87</sup>

Perusteluina toisen kertaluvun oletukselle **4a:n** ja **4b:n** suhteen on laskennallinen kemia, kinetiikan tutkimiseen käytetty <sup>1</sup>H-NMR spektroskopia sekä bistioureakatalyytti **4c**, mikä oli kinetiikaltaan ensimmäistä kertalukua. Vahvimpana esityksenä Sugiuran ryhmällä oli tämä bistioureakatalyytti, sillä reaktiokinetiikka oli tehty alkunopeusmenetelmällä. Burés ryhmineen on huomauttanut sen ongelmista ja siitä johtuvista epätarkkuuksista.<sup>1</sup> Varsinkin kun käytössä oli myös log-log lähestymistapa alkunopeuksiin, mikä aiheuttaa Burésin mukaan varsin paljon epätarkkuutta kineettiseen profiiliin.<sup>1</sup>

Tämän takia reaktion seurannan voisi päivittää käyttämällä VTNA:ta, minkä avulla reaktiokineettiset profiilit olisivat mahdollisesti edustavampia. Tällä tavoin pystyttäisiin myös varmistamaan, että alkuperäisessä käytössä olleet menetelmät ovat olleet sopivia ja niillä saadut johtopäätökset ovat päteviä. VTNA:n avulla pystyttäisiin myös selvittämään mahdollisen inhibiition kohtalo katalyyteille. Sugiuran ryhmä oli inhibiition vaikutusta määrittänyt vain liuottimen kohdalla, mutta tämä ei vielä takaa, että katalyytteinä toimineet tioureat eivät olisi inhibiition vaikutuksen alaisia. Täten VTNA:n ”same excess” -kokeilla voitaisiin tämä seikka selvittää ja varmistua siitä, ettei inhibiitio selitä tuloksia.

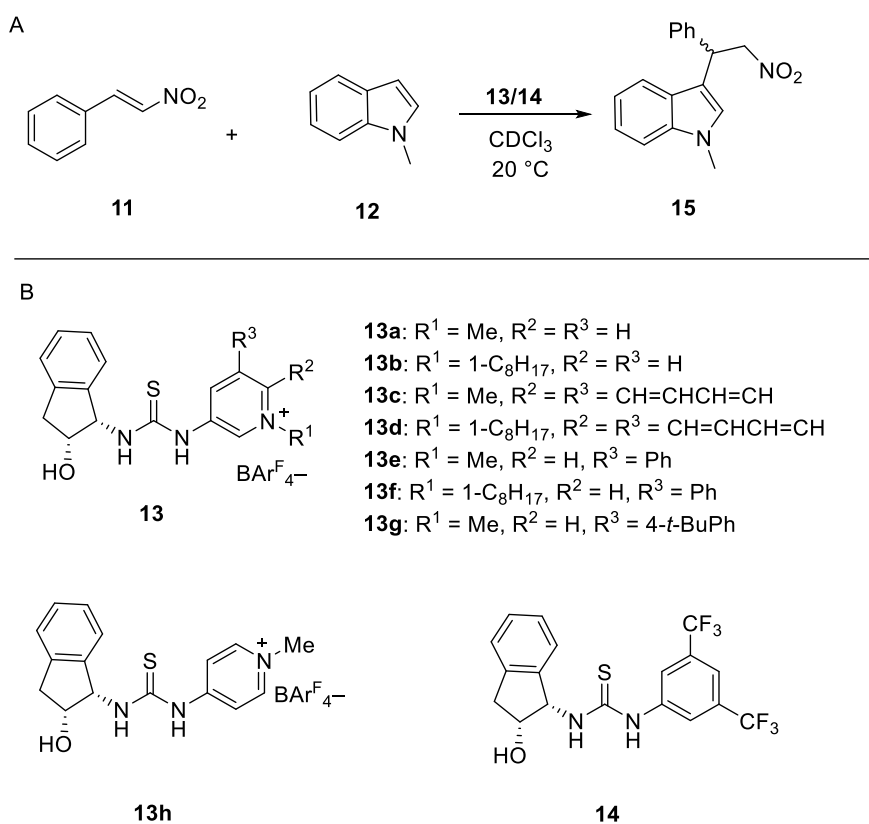
Bistioureakatalyytillä tehdyt kokeet sekä laskennallisesti määritetty reaktiopolkua kahdella tioureamolekyylillä kuitenkin antavat osviittaa, että toisen kertaluvun väitteessä on jotain perustaa. Tällä erää siis voidaan todeta, että todisteiden valossa toisen kertaluvun väite on mahdollinen ja varteenotettava vaihtoehto, kunnes inhibiitio kokeet ovat tehty ja käytössä on parempi reaktiokinetiikan menetelmä. Nämä voivat joko kumota väitteen tai vahvistaa sitä, joten niiden tekeminen olisi jatkotutkimuksen kannalta välttämätöntä.

Koska bistioureakatalyytti on kuitenkin tehokkaampi katalyytti kuin monotioureat, voidaan Sugiuran ryhmän julkaisua pitää esimerkkinä mahdollisuuksista toisen kertaluvun kinetiikan hyödyntämiseen katalyyttien suunnittelussa sekä niiden tehokkuuden optimoinnissa. Tätä varten olisi mahdollisesti hyvä kokeilla reaktiota kasvattamalla bistioureaan välissä olevan hiiliketjun pituutta tai vaihtamalla siinä esiintyvä bentseeni pelkäksi hiili–hiili sillaksi. Tämä voisi piirtää parempaa kuvaa katalyytin optimaalisuudesta ja siitä onko sitä vielä mahdollista parantaa.

### 5.1.2. Kassin ja Fanin Friedel–Crafts -alkylaatio

Fan ja Kass<sup>89</sup> tutkivat myös tiourepohjaisia katalyyttejä. Niiden erityinen etu on **4**:ssa esiintyvä kaksi N–H vetysidosdonoria. Fan ja Kass<sup>89</sup> esittivät, että reaktionopeudet korreloivat yleisesti organokatalyytin happamuuteen<sup>89–92</sup> ja tästä syystä elektroneja puoleensvetäviä eli EWG-ryhmiä, kuten 3,5-bis(trifluorometyyli)-fenyyliarengasta, käytetään rutiininomaisesti tioureaan happamuuden lisäämiseksi.

Esimerkkinä tästä onkin **4a** eli Schreinerin tiourea, jossa näitä 3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli renkaita on kaksi. Aikaisemmassa tutkimuksessaan Fan ja Kass<sup>93</sup> osoittivat, että vaihtamalla yhden tai molemmat näistä EWG-ryhmistä varaukselliseksi *N*-metyylipyridiumionikeskuksiksi, reaktionopeuksia voitaisiin nostaa huomattavasti.<sup>89,93,94</sup> Fan ja Kass näkivät mahdollisena edistysaskeleena käyttää kiraalista tioureaa, jossa 3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyliarengas olisikin korvattu kationilla, jolloin voitaisiin aikaansaada tehokas enantioselektiivinen organokatalyytti.<sup>89,93</sup> Fanin ja Kassin standardireaktio ja katalyytit ovat kuvattu kaaviossa 20:



Kaavio 20. A) Fanin ja Kassin Friedel–Crafts-reaktion reaktioyhtälö ja -olosuhteet ja B) käytössä olleet kiraaliset katalyytit.<sup>89</sup>

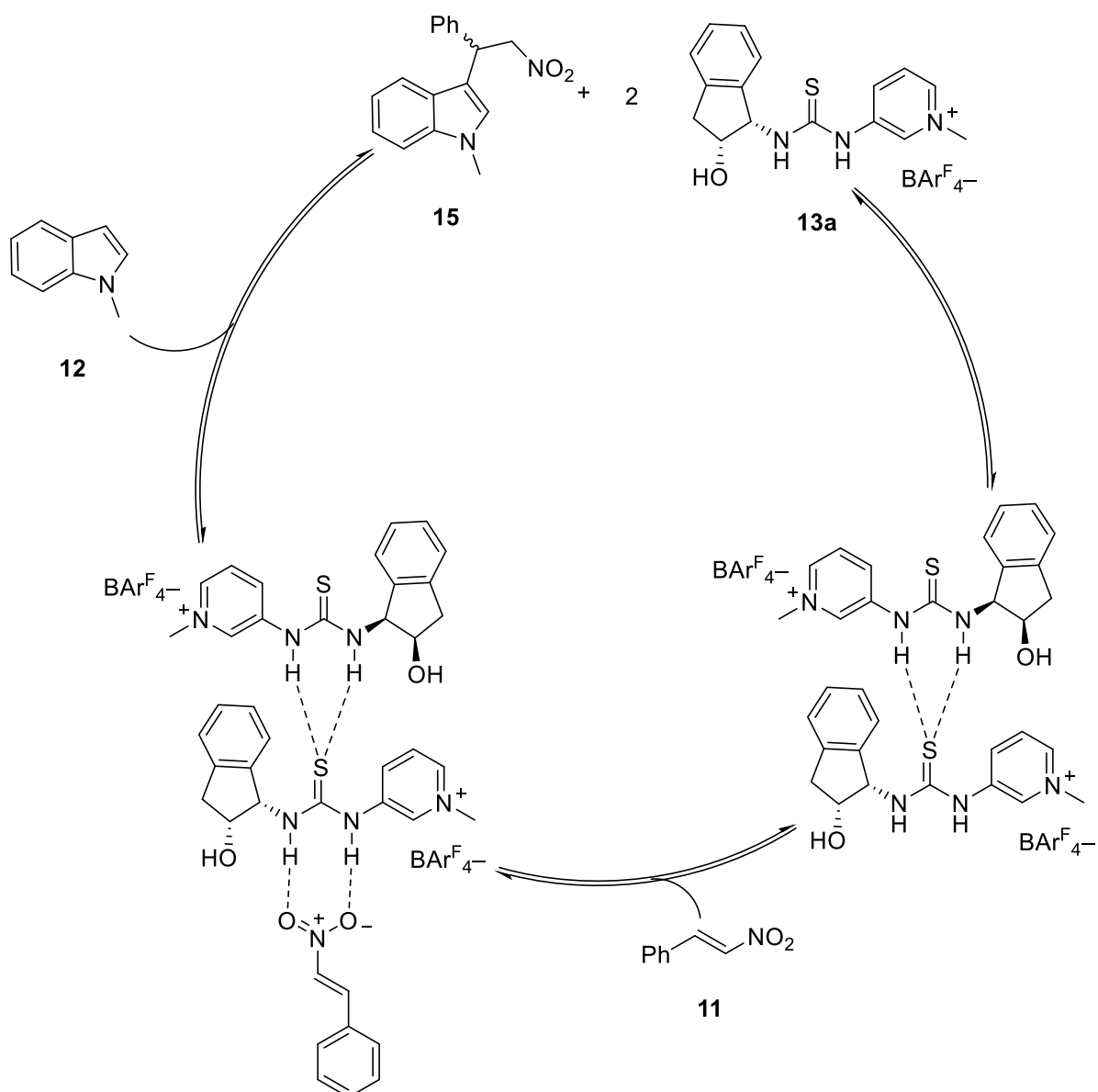
Kineettiset kokeet paljastivat Fanille ja Kassille, että reaktio oli kokonaisuudessaan toista kertalukua ja ensimmäistä kertalukua indolin **12** ja *trans-b*-nitrostyreenin **11** suhteen. Kineettisiin kokeisiin, Fan ja Kass käyttivät alkunopeusmenetelmää. Katalyytin konsentraatioina heillä oli 1, 5, 10 ja 20 mol%, ja nostamalla katalyytin konsentraatiota reaktion puoliaika putosi 140 tunnista aina 7 tuntiin. Kun tästä datasta piirrettiin käyrä (viite 89, kuva 3) kuvaamaan toisen kertaluvun reaktionopeuskertoimien muutosta katalyytin konsentraatioiden neliöiden funktiona, käyrästä muodostui suora. Tästä Fan ja Kass päättelivät katalyytin olevan reaktiossa dimeerinen yksikkö. Tämän teorian vahvistamiseksi, he käyttivät <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopiaa tutkien molempien tioureaan NH-signaalien kemiallisen siirtymän muutosta katalyytin konsentraation funktiona. Fan ja Kass havaitsivat, että kun katalyytin konsentraatio kasvoi, signaalit siirtyivät lineaarisesti alakentälle. Tämä oli merkinä nopeasta tasapainosta monomeerin ja dimeerin välillä, missä assosiaatiovakio olisi matala, ja tällöin katalyytti esiintyisi liuoksessa pääasiassa monomeerinena. Tätä hyödyntäen, Fan ja Kass esittivät katalyyttiseksi kierroksi ja mekanismiksi seuraavaa (kaavio 21).<sup>89</sup>

Tämä mekanismiesitys vastaa siis Burésin *et al.*<sup>1</sup> esittämää kahden vapaan katalyytin dimerisaatiota reaktiosyklissä (kaavio 3B). Myöhemmässä tutkimuksessaan Fan ja Kass (ja Payne)<sup>94</sup> huomauttivat, että toisen kertaluvun oletus reaktioon on pätevä kun  $K \cdot [\mathbf{11}] \ll 1$ , johtuen heidän käyttämästään yhtälöstä (yhtälö 47):

$$v = \frac{k_{obs}[\mathbf{11}][\mathbf{12}]}{1 + K[\mathbf{11}]} \quad 47$$

Jatkotutkimuksessa, Fan *et al.*<sup>94</sup> käyttivät <sup>1</sup>H NMR-spektroskopiatriausta, jossa **13**:n konsentraatio oli 8.3 mM ja **11**:n ylimäärää vaihdeltiin 1–28 ekvivalentin välillä. Tuloksena paljastui, että kun tasapainovakio on pieni (esimerkiksi titrausdatasta saatu  $K = 27 \text{ M}^{-1}$ ), reaktion kinetiikka katalyytin suhteen on ensimmäisen ja toisen kertaluvun väliltä.<sup>94</sup> Tutkimuksessa käytetyille katalyyteille tämän merkitys oli se, että yksinkertainen kokonaisluvullinen kertaluki ei ole katalyyteille itsestäänselvyys<sup>94</sup> ja että muiden katalyyttien kohdalla Kassin ryhmä käytti reaktioiden puoliaikoja ja suhteellisia nopeuksia nopeusprofiilien muodostamiseen.<sup>94</sup> Reaktionopeuteen vaikutti myös vastaioni: kun katalyytin vastaioini vaihdettiin tetrakis(3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli)boraatista ( $\text{BAr}^{\text{F}_4^-}$ ) tetrakis(pentafluorofenyyli)boraattiin ( $\text{B}(\text{C}_6\text{F}_5)_4^-$ ), nopeus hidastui. Kassin ryhmä osoitti myös uudemman kerran, että reaktion suhteellisen nopeuden ja katalyytin konsentraation neliön suhteen löytyy lineaarinen korrelaatio,<sup>94</sup> mikä tukee ajatusta siitä, että katalyytin aktiivinen yksikkö on dimeerinen. Tämän tueksi julkaisussa viitattiin myös Gimennon ja Herreran<sup>95</sup> tutkimukseen. Kass ryhmään päättelivät dimeerin tuoman tehostti elektrofiilinen aktivaatio

monomeeriin verrattuna on tässä tapauksessa tarpeeksi merkittävä, jotta siirtymätilassa indolin ja nitrostyreenin välisen kompleksin pääsee reagoimaan, huolimatta dimeerin muodostumiseen liittyvästä entropiatappiosta. Jos katalyytin konsentraatio on liian matala, tämä elektrofiilinen aktivaatio dimeerin avulla jää liian heikoksi ja reaktio ei siten etene.<sup>95</sup>



Kaavio 21. Mekanismi Fanin ja Kassin Friedel–Crafts reaktiolle, kun katalyyttinä on **13a**.<sup>89</sup>

Katalyytin konsentraation ollessa matala, voidaan ehkä pohtia olisiko reaktiossa jonkinlaista saturaatiokinetiikkaa olemassa, mikä muuttaisi reaktion profiilia ja täten häiritseisi kineettistä tulkintaa. Tätä pitäisi tutkia tarkemmin ja tähän soveltuisi hyvin lisäämällä uusia kokeita eri



katalyytin konsentraatioissa. Varsinkin suuremmilla arvoilla, voisi nähdä paremmin, miten kinetiikka muuntautuu, jos laisinkaan.

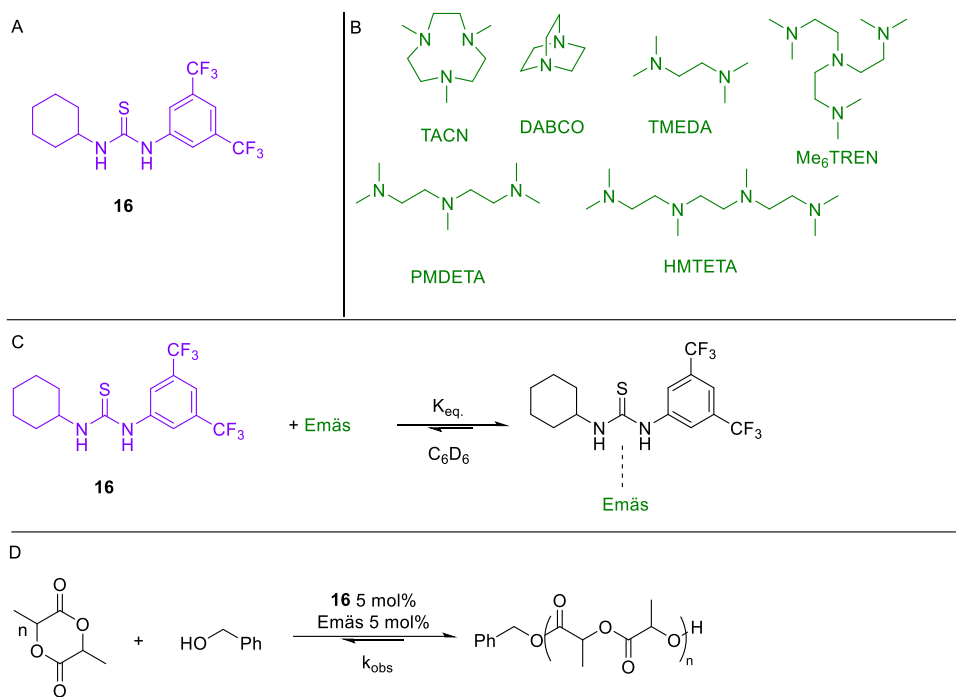
Burés *et al.*<sup>1</sup> tutkimuksessaan oli ottanut Kassin ja Fanin reaktion esille tapaustutkimuksena ja mainitseekin, että vaikka Kassin ja Fanin esittämä mekanismi voi olla mahdollinen, myös Burésin ryhmän omat esitykset (katalyyttisen reaktion ohella taustalla on myös ei-katalyyttinen reaktio tai jokin katalyyttimyrkky inhiboi katalyyttiä alhaisilla konsentraatioilla) vaihtoehtoisille mekanismeille voivat olla mahdollisia. Tätä varten ehdotuksena oli tehdä koe, missä katalyytin konsentraationa olisi  $> 30$  mM, millä voitaisiin ehkä paremmin nähdä mekanismin luonnetta.

Kuitenkin tässäkin reaktiossa voisi olla hyvä, jos reaktiokinetiikan menetelmäksi otettaisiin VTNA sen sijaan, että reaktioiden nopeuksista tehtäisiin suhteellisia vertailuja. Fan ja Kass (ja Payne) eivät esittäneet katalyytin dimerisaatiolle muita perusteluja kuin kineettiset kokeet. Jos jollakin menetelmällä pystyttäisiin osoittamaan, että katalyytti dimerisoituu ennen kuin se aktivoi substraatin, olisi tämä kinetiikan ohella väitettä toisesta kertaluvusta vahvistava todiste. Myös laskennallisen kemian käyttö olisi suotavaa, koska tämän avulla pystyttäisiin väitettä katalyytin dimerisaatiosta perustelemaan paremmin.

Tällä hetkellä väite on hieman heikohko, sillä perusteena on vain kinetiikka ja siitäkin puuttuu Burésin ryhmän mainitsevat kokeet, millä vaihtoehtoiset mekanismit voitaisiin kumota. Mutta koska kritiikki on annettu vain teoreettiselta pohjalta, näen väitteen toisesta kertaluvusta katalyytin **13** kohdalta pitävän paikkansa. Väitteen voi kuitenkin nähdä reunatapauksena ja täten, jos kokeellista perustaa väitteelle lisätään tai väite kumotaan kokeellisin perustein, näkökulmani vaihtuisi tämän katalyytin suhteen.

### 5.1.3. Kiesewetterin ja Kazakovin renkaanavauspolymerisaatio

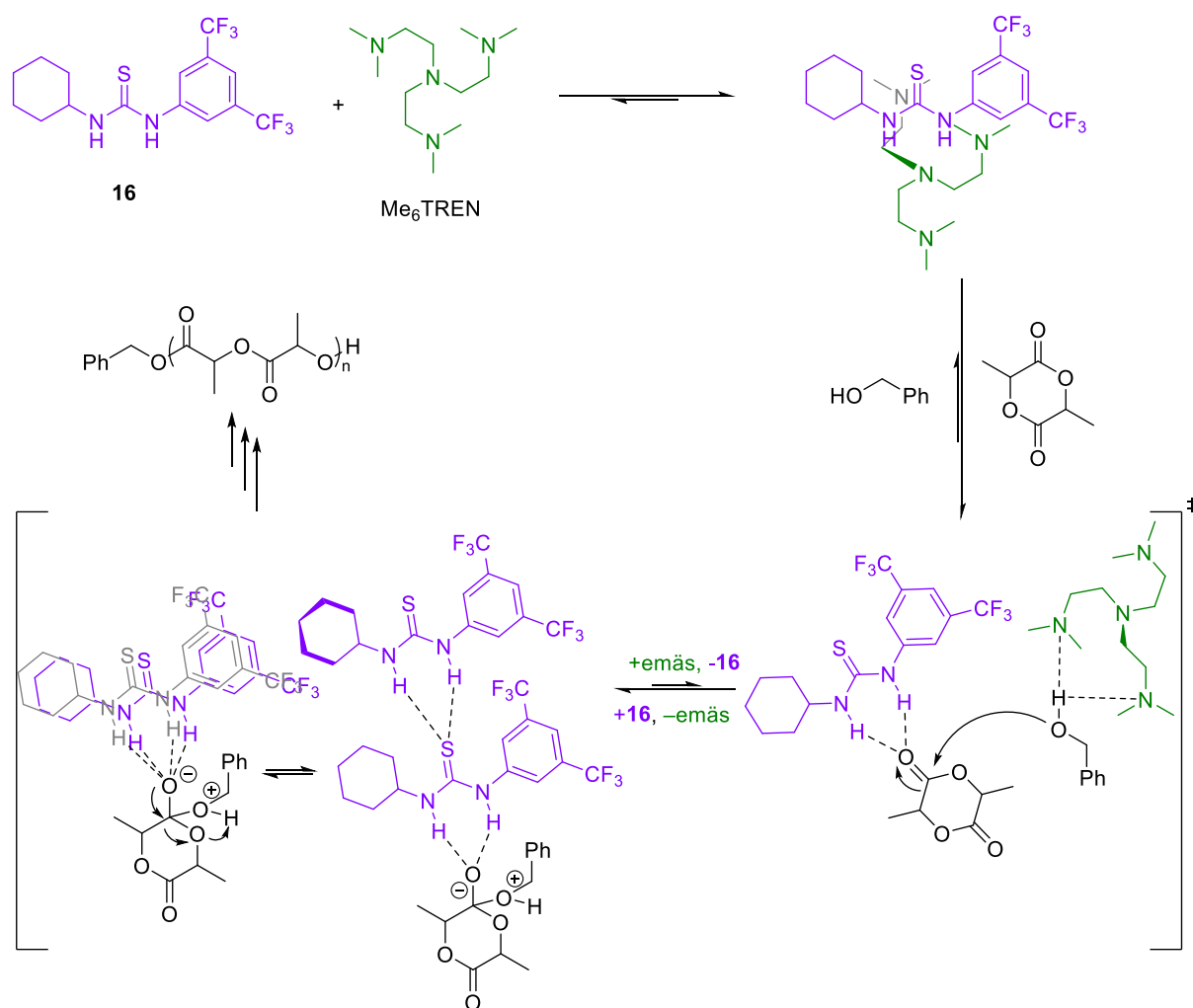
Kolmantena esimerkkinä kaksoiskatalyyttisistä toisen kertaluvun reaktioista voidaan pitää Kazakovin ja Kiesewetterin tutkima reaktiota<sup>96</sup>, jossa  $\delta$ -valerolaktoni (VL) ja laktidin (LAK) renkaanavauspolymerisaatio tehtiin tioureaan **16** ja emäksen avulla (kaavio 22):



Kaavio 22. A) Kazakovin ja Kiesewetterin käyttämä tioureakatalyytti, B) reaktiossa mahdollisesti käytettävät alkyyliamiiniemäkset, C) Alkyylialimiinin ja katalyytin **16** sitoutumisvakio ja D) renkaanavauspolymerisaatio sekä havaittu reaktionopeus.<sup>96</sup>

Termodynaamisesti Kazakov ja Kiesewetter käsittelivät reaktion kokatalyytin sitoutumista ajatuksella, että alkyyliamiinin ja **16** välinen  $K_{eq}$  sitoutumisvakio on samaa mittaluokkaa ja täten se ei ennusta kokatalyytin aktiivisuutta. Alkyyliamiinin/**16** sitoutumisvakion havaittiin olevan  $K_{eq} = 6.4\text{--}32$  eli  $\Delta\Delta G^\circ = 0.95$  kcal/mol. Koska  $K_{eq} > 1$ , katalyyttikompleksin muodostumisen nähtiin tapahtuvan ennen itse reaktiota.<sup>96</sup> Jokaisen katalyytti/emäsparin kohdalla tehty sitoutumisvakion lämpötilariippuva määrittäminen mahdollisti sitoutumisen termodynaamisten parametrien määrittämisen. Kazakovin ja Kiesewetterin<sup>96</sup> mukaan sitoutumisen entalpia ja entropia olivat erilaiset kaikille katalyytti/emäs pareille, mutta  $\Delta H^\circ$  ja  $\Delta S^\circ$  näyttivät omaavan identtiset trendit parien välillä. Tämän he totesivat olevan samankaltainen entalpia–entropia kompensatioefektille entsyymikatalyysin parissa. Kompensatioefekti tuloksena katalyytti–substraatti -kompleksin muodostumisen ( $\Delta G^\circ$ ).<sup>96</sup> ROP reaktion kohdalla kuitenkin sitoutumisvakio ei kuvaile substraatin affiniteettia katalyytin aktiiviseen osaan, vaan pikemminkin kuinka hyvin kokatalyytteinä toimivat amiinit assosioituvat itse primääriseen katalyyttiin. Kazakov ja Kiesewetter<sup>96</sup> kuvailevat tämän kokatalyyttien assosiaation luovan efektiivisesti ”aktiivinen osan” systeemiin.<sup>96</sup>

Kazakov ja Kiesewetter esittivät, että havaittu reaktionopeus  $k_{\text{obs}}$  L-laktidin ROP:lle (L-LAK, 0.5 mmol, 1 M) bentsyylialkoholin (0.01 mmol) toimiessa initiaattorina saatiin [L-LAK]:n muutoksesta ajan suhteen, kun emästä ja **16**:a oli molempia 0.025 mmol.<sup>96</sup> Reaktio oli ensimmäistä kertalukua L-LAK:n suhteen.<sup>96</sup> Kineettisesti Kazakov ja Kiesewetter lähtivät tutkimaan reaktiota ajatuksella, että käytettävät amiinit inhiboisivat reaktiota, koska näin oli raportoitu aikaisemmin vastaavissa reaktioissa. Kuitenkin Kazakov ja Kiesewetter havaitsivat, että heidän reaktiossaan tämä ei pidä paikkansa. He käyttivät L-LAK:n ROP reaktiota tutkiakseen amiinin vaikutusta ja kun  $[\text{Me}_6\text{TREN}] < [\mathbf{16}] = 0,05 \text{ M}$ , reaktio oli ensimmäistä kertalukua amiinin suhteen. Kun amiinia oli ylimäärin tioureaan **16** nähden, eli  $[\text{Me}_6\text{TREN}] < [\mathbf{16}] = 0,05 \text{ M}$ , reaktio olikin amiinin suhteen nollatta kertalukua. Tämän Kazakov ja Kiesewetter esittivät kertovan siitä, että ylimääräinen amiini ei vaikuta reaktiokinetiikkaan tai katalyysiin.



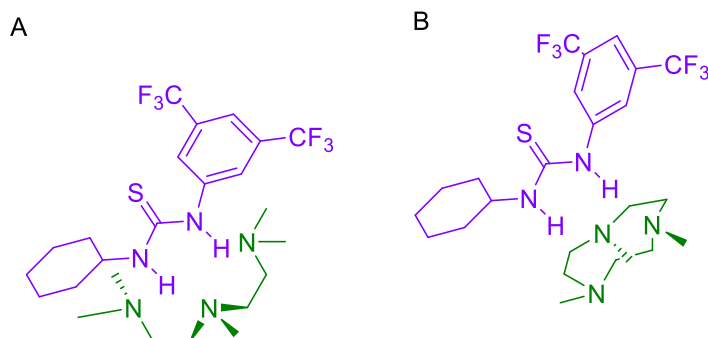
Kaavio 23. Kazakovin ja Kiesewetterin esittämä reaktiopolkua ROP-reaktiolle ja siinä esiintyvät mahdolliset siirtymätilat.<sup>96</sup>

Myös havaittu siirtymä ensimmäisestä kertaluvusta nollanteen kertalukuun konsentraation kasvaessa kohti ekvivivalenttia määrää **16**:ta kertoi Kazakovin ja Kiesewetterin mukaan katalyyttisten olosuhteiden vallitessa siitä, että tetra-amiini ja **16** sitoutuisivat 1:1 moolisuhteessa.<sup>96</sup> Tämän pohjalta Kazakov ja Kiesewetter laajensivat kineettiset kokeet tilanteeseen, jossa  $[16] > [Me_6TREN] = 0,05 \text{ M}$ , minkä johdosta he havaitsivat reaktion olevan toista kertalukua **16**:n suhteen. Tämä tulos viittasi kahden **16**:n osallistumista reaktiomekanismiin. Kazakovin ja Kiesewetterin mukaan useamman vetysidoksen muodostuminen yksittäiseen karbonyylihapteen on mahdollista vetysidosten elektrostaattisen luonteen takia. Tästä syystä he esittivät kaksi mahdollista siirtymätilaa reaktiolle, joista ensimmäisenä oli kahden **16** monomeerin aktivoima karbonyyliryhmä ja toisena oli että **16** aktivoi toisen **16**:n, joka sitten aktivoi karbonyylin. Tästä he muodostivat mahdollisen mekanismin (kaavio 23).<sup>96</sup>

Kineettisiä kokeita jatkettiin moolisuhteilla  $[16] = [Me_6TREN]$ . Kokeista saatiin kaksi ekvivivalenttia nopeusriippuvuutta  $k_{obs}$  vs.  $[16]^2$ . Nämä riippuvuudet olivat molemmat lineaarisia.<sup>96</sup> Kazakovin ja Kiesewetterin päätelmänä oli, että koska reaktio vaatii sekä **16**:sen että amiinin edetäkseen, nopeuden määräävänä vaiheena olisi alkoholin nukleofiilinen hyökkäys monomeeriin, jossa katalyytit aktivoisivat vaihetta toisistaan riippumatta. Tämä vastaisi jälkimmäistä nopeusriippuvuutta, mutta aikaisemmin havaitun nollannen kertaluvun skenaario amiinin kohdalla, oli ristiriidassa kyseisen päätelmän kanssa. Nollannen kertaluvun tilanne vastaisi ajatusta, että nopeuden määräävä vaihe mekanismissa olisi vasta nukleofiilisen hyökkäyksen jälkeen ja näin amiini ei enää osallistuisi reaktioon. Tämä vastaisi Kazakovin ja Kiesewetterin mukaan aikaisemmin julkaistuja laskennallisia tuloksia ROP-reaktioon vetysidoskatalyyteillä.<sup>96</sup> Kazakov ja Kiesewetter vaihtoivat emäksen  $Me_6TREN$ :sta TMEDA:han tutkiakseen emäksen osallistumista siirtymätilaan tarkemmin.  $[TMEDA]$ :n ollessa  $0,05 \text{ M}$  ja  $[TMEDA] < [53]$ , reaktio on **16** suhteen ensimmäistä kertalukua ja  $[TMEDA]$ :n suhteen nollatta kertalukua kun  $[16] = 0,05 \text{ M}$  ja  $[TMEDA] > [16]$ . Kun  $[TMEDA] = [16]$ , reaktio oli **16** suhteen ensimmäistä kertalukua siten, että  $k_{obs}$  vs.  $[16]$  ja  $k_{obs}$  vs.  $([TMEDA] + [16])$  olivat lineaarisia. Tästä Kazakov ja Kiesewetter päättelivät, että kokatalyyttinä toimivan emäksen identiteetti vaikuttaa katalyytin **16** kineettiseen käyttäytymiseen.<sup>96</sup>

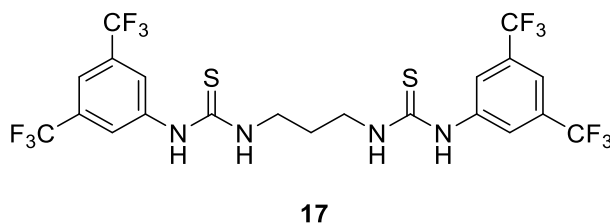
Tätä varten Kazakov ja Kiesewetter siirtyivät tutkimaan laskennallisesti geometria optimoidulla DFT/B3LYP 6-31G\*\* tasolla emästen koordinoitumista katalyyttiin **16**. Aluksi vertailuun otettiin PMDETA ja TACN (kuva 13), koska rakenteellisesti nämä emäkset olivat lähellä

toisiaan. Eroksi muodostui **16**:seen koordinoituvien tyyppien määrä. PMDETA pystyy koordinoimaan kaikkien kolmen tyyppiatomien vapaat elektroniparit sen sijaan, kun TACN ei pystynyt geometriansa takia vastaavaan. Vastaavasti Me<sub>6</sub>TREN pystyy koordinoimaan rakenteensa takia kolme vapaita elektroniparia neljästä mahdollisesta. Kazakovilla ja Kiesewetterillä oli lähtökohtana, että parhaiten ROP-reaktiota katalysoiva emäs ei pysty koordinoimaan kaikkia tyyppiatomien vapaita elektronipareja **16**:een. Tämän perusteella edellä mainittu emäksen identiteettivaikutus ROP reaktion todettiin paikkansa pitäväksi.<sup>96</sup>



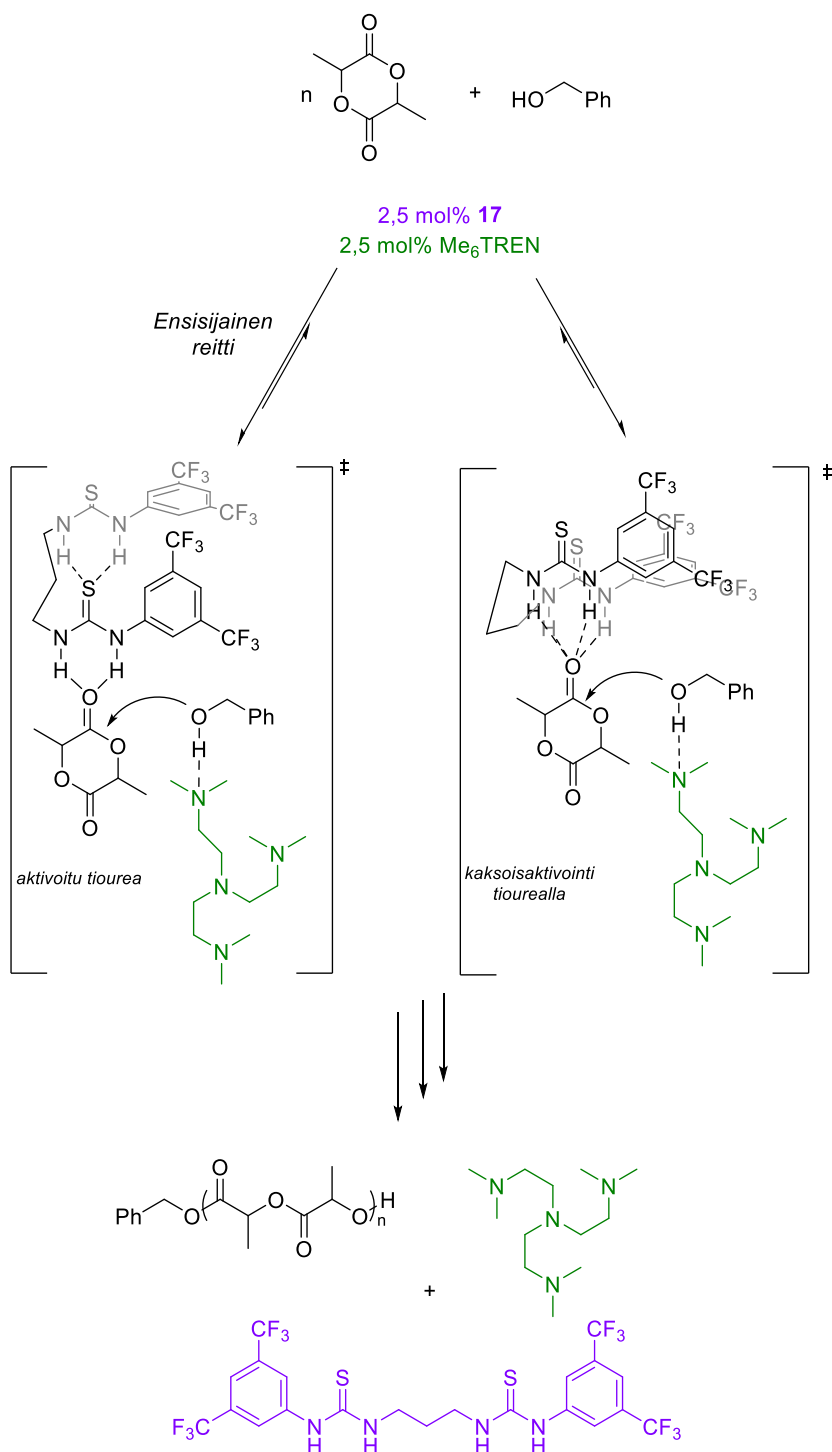
Kuva 13. A) PMDETA:n koordinoituminen katalyyttiin **16**, B) TACN:n koordinoituminen katalyyttiin **16**.<sup>96</sup>

Samaan aikaan, Kiesewetterin ryhmässä tutkittiin<sup>97</sup> samaa reaktiota bis(tiourea) **17**:lla (kuva 14). Ideana oli, että bis-tioureaan **17** käytöllä voitaisiin saada vahvistettua oletusta kaksoiskatalyysistä, koska **17**:ssa molemmat reaktioon tarvittavat tioureaoryhmät ovat aina saatavilla.<sup>97</sup>



Kuva 14. Kiesewetterin ryhmän bis(tiourea) -katalyytti.<sup>97</sup>

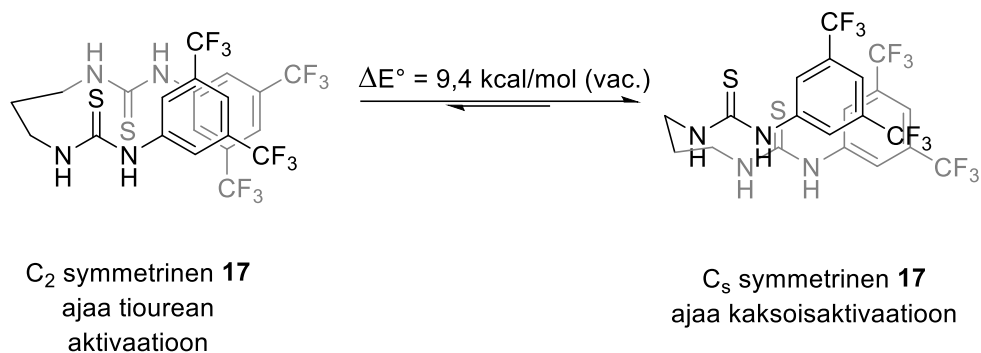
Tutkimuksessa osoittautui, että **17** nopeuttaa reaktiota huomattavasti. Siinä missä **16**/HMTETA (5 mol% molempia) ROP-reaktio saavutti 94 % konversion 90 minuutissa, **17**/HMTETA (2,5 mol % molempia) saavutti 90 % konversion 15 minuutissa.<sup>97</sup> Bis(tiourea) **17**:sella mahdollistui myös mahdollisen siirtymätilan (kaavio 24, kaksi vaihtoehtoa) tutkiminen laskennallisesti.



Kaavio 24. Kiesewetterin ryhmän esitys bis(tiourea) -katalyytin **17** mekanismivaihtoehdoista ROP-reaktiolle, mikä toimii todisteena toisen kertaluvun oletukselle katalyytin **16** kohdalla.<sup>97</sup>

Kiesewetterin ryhmän tutkimus esitti mekanismin tueksi myös laskennallisen kemian tuloksia. B3LYP/6-31G\*\* geometria optimoidulla menetelmällä tutkimus esitti, että C<sub>2</sub> symmetrinen rakenne **17**:selle johtaisi tioureaan aktivaatioon toisella tiourealla ja se olisi stabiilimpi vaihtoehto C<sub>s</sub> symmetriselle **17**:n rakenteelle, mikä olisi vaatimuksena karbonyylin

kaksoisaktivaatioon. Energialtaan  $C_2$  symmetrinen rakenne oli  $5,4 \text{ kcal mol}^{-1}$  ja  $C_s$  symmetrinen rakenne  $9,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ .<sup>97</sup> Kaaviossa 25 on esitetty kyseiset symmetriat:



Kaavio 25. Kiesewetterin ryhmän laskennallisesti määritellyt symmetriat bis(tiourea) - katalyytille **17**.<sup>97</sup>

Kiesewetterin ryhmän esittämä mekanismi **17**:n katalysoimalle reaktiolle laskennallisen tiedon perusteella on kuvattu kaaviossa 24. Vastaavasti tämä laskennallinen lähestymistapa ja etenkin esitys bis(tiourea) **17**:n vaikutuksesta reaktionopeuteen on siis todisteena ajatukselle, että Kazakovin ja Kiesewetterin<sup>96</sup> reaktio olisi katalyytin **16** suhteen toista kertalukua.

Vahvimpana todisteena katalyytin suhteen toisen kertaluvun kinetiikkaväitteelle Kiesewetterin ja Kazakovin reaktiossa on bistioureaalla tehdyt kokeet. Kuten Sugiuran tutkimuksessa<sup>87</sup>, tämän ”vahvistetun toisen kertaluvun” käyttäytyminen on hyvin lupaava seikka, varsinkin kun se on perusteltu laskennallisesti. Kineettinen peruste väitteelle on myös hyvällä pohjalla sen lisäksi, että tutkimuksessa dimeerisen katalyytin olemassaoloa on määritetty NMR-titrauksella. Kuitenkin vahvistaakseen väitettä, olisi reaktioseuranta hyvä tehdä VTNA:n avulla. Tämä myös edesauttaisi selvittämään mahdollisuutta inhibiitiosta katalyytin suhteen. Inhibiitio on hyvin yleinen selitys sille, miksi katalyytit voivat tuottaa näennäisesti toisen kertaluvun reaktiokinetiikan ja täten tämän syyn poissulkeminen olisi perusteltavaa. Laskennallisen kemian tulokset tukevat tässä tapauksessa ajatusta, että ROP-reaktiossa on toisen kertaluvun katalyyttistä kyse. Tällä hetkellä todistusaineiston valossa on järkevää esittää, että reaktio on katalyytin **16** suhteen toista kertalukua tai ainakin se vahvin vaihtoehto mekanistisesti. Kuitenkin mainitut inhibiitio-kokeet ja VTNA:lla tehty seuranta voi tämän väitteen kumota kuten aikaisemmissakin tapauksissa.

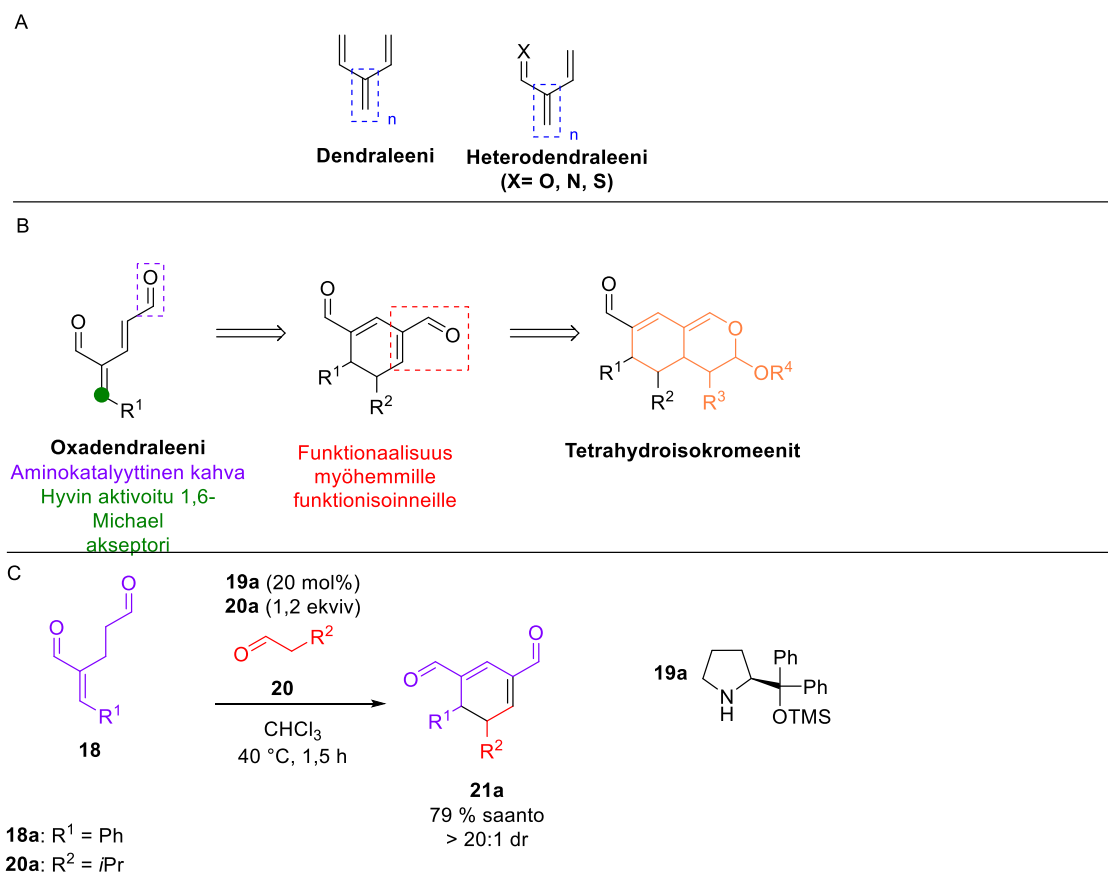
Bistioureaan käyttö on myös esimerkkinä toisen kertaluvun kinetiikan tutkimisen hyödyistä. Koska bistiourea oli reaktionopeudeltaan huomattavasti suurempi kuin pelkät tioureat, voidaan käytettyä bistioureaa pitää toisen kertaluvun kinetiikan pohjalta optimoituina katalyyttinä ROP-reaktiolle. Täten tämä pohjustaa ajatusta katalyyttien suunnittelussa niiden tehokkuuden optimoinnissa käyttäen toisen kertaluvun oletusta pohjana. Tähän liittyen jatkotutkimuksena tämän osalta voisi olla hiiliketjun kasvattaminen tai siihen väliin bentseenirenkaan saattaminen, jotta voitaisiin piirtää kuvaa siitä, että onko tämä katalyytti **17** se optimaalisin vaihtoehto.

#### 5.1.4. Jørgensenin ryhmän kaskadikatalyyysi

Katalyyttisten kaskadi eli dominoreaktioiden kohdalla tyypillisesti toisen kertaluvun oletus ei pidä paikkansa, koska katalyyttiset syklit ovat eri reaktioita. Kuitenkin on mahdollista, että katalyyttiset syklit voivat olla kahden katalyytin reaktioita. Koko reaktioon osallistuisi siis vähintään kolme katalyyttiä. Jørgensenin tutkimus<sup>98</sup> tetrahydroisokromeenien valmistuksessa oksadendraleeneista on sopiva esimerkkitapaus tällaisesta systeemistä. Kaaviossa 26 on esitetty Jørgensenin ryhmän suunnitelma reaktiosta, jossa tapahtuu kaksi reaktiovaihetta

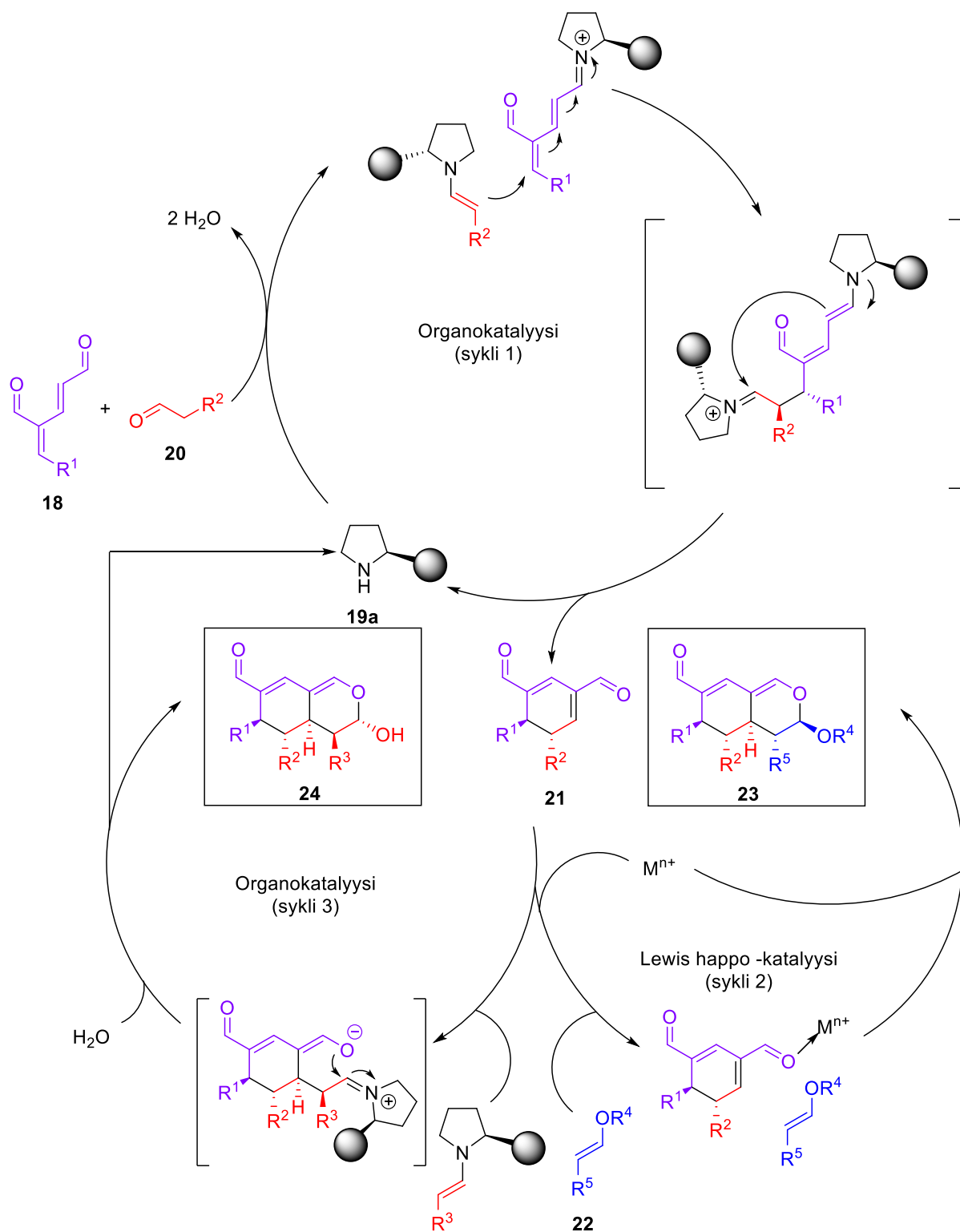
Jørgensenin ryhmän ajatuksena oli käynnistää reaktio käyttäen haarautunutta dienaalia **18a** ( $R^1 = Ph$ ) ja aldehydiä **20a**, kun katalyyttinä toimi **19a**. Katalyytin roolina oli muodostaa vinyloginen iminium-ioni **18a**:sta ja enamiini aldehydistä **20a**. Tämä vaihe muodostaisi koko kaskadikatalyyysin ensimmäisen syklin ja näin tuote **21a** on vain välituote, joka reagoi edelleen toisen katalyytin avulla kohti haluttua tetrahydriisokromeenirakennetta. Mekanistisesti Jørgensenin tutkimus esitti reaktion kokonaisuutena (kaavio 27).<sup>98</sup>



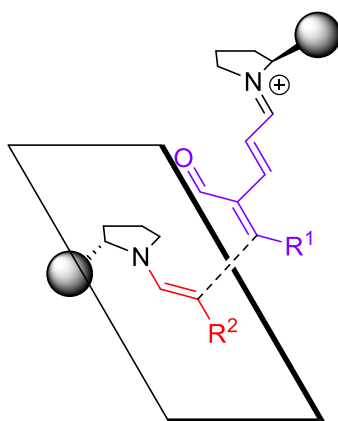


Kaavio 26. A) Dendraalienien rakenne, B) Yleisluontoinen visio reaktiosekvivenssistä, C) Jørgensenin ryhmän reaktioyhtälö.<sup>98</sup>

Syklit 2 ja 3 ovat kaskadireaktion jälkimmäiset osuudet ja ne ovat Jørgensenin ryhmän tutkimuksen valossa yhdellä katalyytillä toimivia reaktioita, kun taas sykli 1 on kaksoiskatalyyttinen ja oletettavasti toista kertalukua katalyyttin suhteen. Jørgensenin ryhmä ei tehnyt kineettisiä kokeita varmistaakseen katalyytin, vaan he käyttivät MS-TOF:ia välivaiheiden tunnistamiseen. Kun **18a**:ta ja **19a**:ta sekoitettiin vastaava vinyloginen iminium-ioni havaittiin spektrissä runsaimpana ionina.<sup>98</sup> **20a**:ta vastaava enamiini on yleisesti tunnettu, kun **20** ja **19a** reagoivat keskenään ja tämän perusteella he päättelivät reaktiossa kuluvan kahden ekvivivalentin verran katalyyttiä substraattia kohden. Jørgensenin ryhmä päätteli myös katalyytin aktivoivan reagensseja kahdesti, koska heidän reaktionsa oli verrattaen nopea ja katalyyttiä oli huomattavasti vähemmän kuin vastaavissa Michael reaktioissa.<sup>98</sup> Stereokemian kannalta, Jørgensenin ryhmä esittivät kuvassa 15 olevaa tilannetta, jossa enamiini hyökkää iminium-ionin takapuolelta:



Kaavio 27. Katalyyttien kierto Jørgensenin ryhmän kaskadireaktiossa. Sykli 1 on oletettavasti toista kertalukua katalyytin **19a** suhteen.<sup>98</sup>



Kuva 15. Enamiinin hyökkäys vinylogiseen iminium-ioniin sen takapuolelta Jørgensenin ryhmän kaskadireaktion en-simmäisessä syklissä.<sup>98</sup>

Jørgensenin ryhmän lähestymistapa MS-TOF:n avulla on toimiva perustelemaan, että kaskadireaktion ensimmäisessä syklissä muodostuu kyseinen iminium-ioni. Kun tähän lisätään perusteluna esitetyn enamiinin, on toisen kertaluvun esitys katalyytille jo aluillaan. Jørgensenin ryhmä ei eksplisiittisesti väitä, että reaktio olisi toista kertalukua, mutta esitetty mekanismi ja ajatus kaksoisaktivaatiosta on implisiittinen väite kertaluvulle. Tästä syystä olisi hyödyllistä tutkimuksen kannalta pyrkiä tutkimaan reaktiota myös kineettisten kokeiden avulla, jotta esitetty kaksoisaktivaatio olisi vahvemalla pohjalla.

Kinetiikan tutkimiseen sopisi tässä tapauksessa VTNA. Tosin Jørgensenin ryhmän julkaisu on samalta vuodelta kuin Burésin VTNA-menetelmän julkaisu, ja täten on ehkä ongelmallista odottaa, että Jørgensenin ryhmä olisi käyttänyt menetelmää tutkimuksessaan. Mutta muitakin kineettisiä menetelmiä on ja niiden puute kokonaisuudessaan vie vähän pohjaa implisiittiselle väitteelle katalyytin toisen kertaluvun reaktiosta. Tämän lisäksi on täysin mahdollista, että reaktiossa tapahtuu katalyytin inhibiitiota, ja tämä pitäisi selvittää myös ennen kuin kokonaiskuva katalyytin toisesta kertaluvusta olisi vahvalla pohjalla. Myös laskennallinen lähestymistapa voisi tuoda lisää todisteita kaksoiskatalyyysistä.

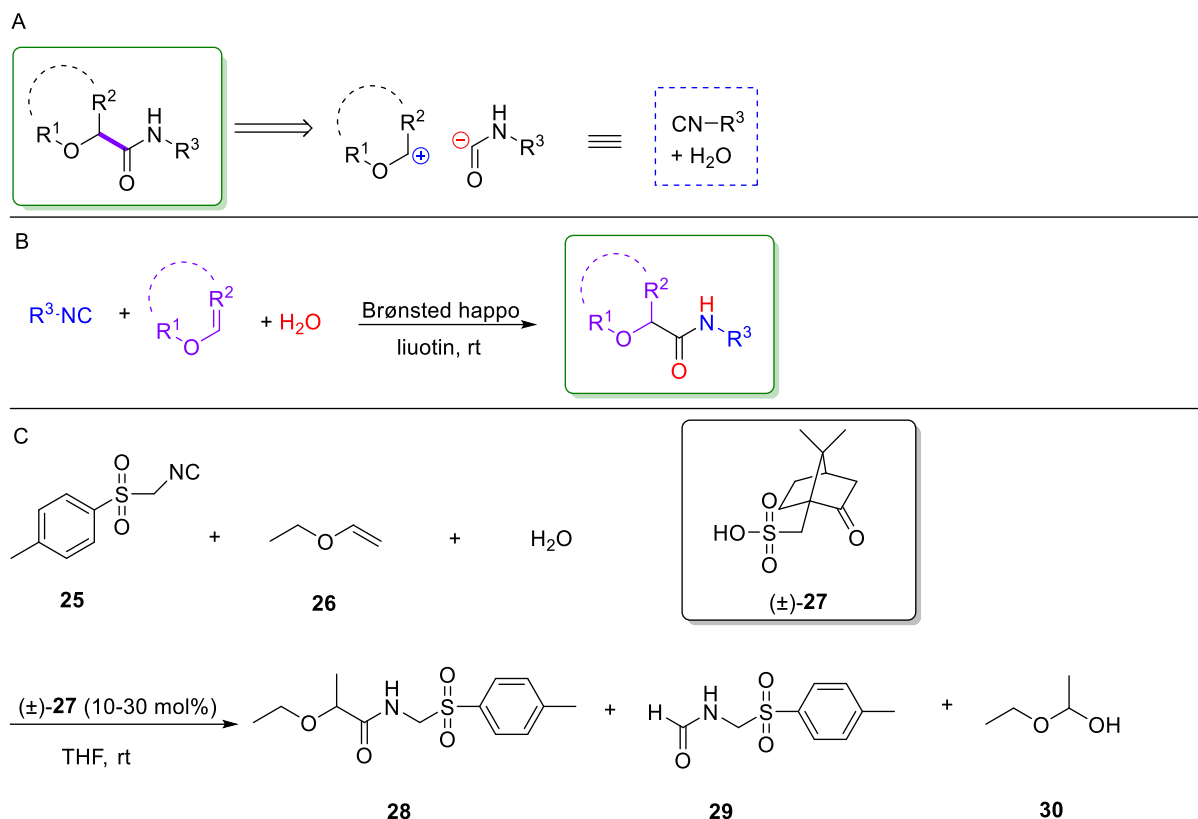
Kokonaisuudessaan Jørgensenin ryhmän reaktiota voidaan pitää trikatalyyttisenä sillä, vaikka kaskadin ensimmäisen syklin voidaan tehdä irrallaan, on se osana isompaa reaktioverkkoa. Tässä verkossa katalyyttien määrä on kolme, jos ensimmäisessä syklissä katalyyttejä osallistuu sykliin kaksi, kuten Jørgensenin ryhmä esitti. Kuitenkin reaktion ensimmäinen sykli on hyvä esimerkki

kaksoiskatalyyttisistä toisen kertaluvun reaktioista, missä katalyyttinä eivät ole tioureat tai niiden kaltaiset vetysidosdonorit.

### 5.1.5. Duddingin ryhmän hydroamidaatio

Duddingin tutkimuksen<sup>99</sup> hydroamidaatio reaktio kolmella komponentilla on seuraava esimerkki kahden katalyytin reaktiosta. Ajatuksena oli amidiryhmän liittäminen orgaanisiin molekyyliin ilman perinteisiä menetelmiä, mitkä ovat olleet karboksyylihappojen ja niiden johdannaisten kondensaatioreaktiota samalla kun joukossa on stoikiometrisiä määriä aktivoivia tai kytkeviä reagensseja.<sup>99</sup> Syynä tähän on se, että käytetyt reagenssit ovat yleensä myrkyllisiä, vaarallisia, kalliita ja tuottavat määrällisesti paljon jätettä.<sup>99</sup> Yksikin näistä seikoista olisi riittävä perustelu uusien menetelmien kehittämiseen ja näin Duddingin ryhmä kääntyi katalyyttien puoleen. Katalyytit itsessään eivät takaa vastausta ongelmaan, vaan kuten yleistä on, näistäkin monet ovat myrkyllisiä tai reaktio-olosuhteet ovat hyvin rankkoja, mikä kaventaa reaktion laajuutta substraattien suhteen merkittävästi. Tämän takia katseet kääntyivät kohti isosyanaattipohjaisia multikomponenttireaktioita (ICMR), joista esimerkiksi Passerini-<sup>100–103</sup> ja Ugi<sup>104,105</sup> tyyppiset reaktiot ovat myös mahdollisesti organokatalysoituja.<sup>99</sup> Duddingin ryhmällä oli myös taka-ajatuksena oksokarbenium-ionien funktionalisointi, mikä olisi mahdollista selektiivisen, organokatalyyttisen hydroamidaation avulla. Tämä taka-ajatus loi Duddingin ryhmälle vision (kaavio 28) reaktiosta. Kaaviossa 28C on myös tutkimuksessa esitetty reaktioyhtälö. Vaihtoehtoisia katalyyttejä ja olosuhteita kokeiltiin tietenkin, mutta nämä olivat ne optimaaliset. Tästä tutkimus kääntyi kinetiikan ja VTNA:n<sup>33–35</sup> puoleen.

Yhdisteet **25** ja **26** valikoituivat reaktioon niiden synteettisen hyödyn ja suhteellisen selkeiden reaktioprofiilien perusteella (käytännössä tarkoittaen vähiten sivutuotteita). Reaktioiden etenemistä seurattiin <sup>1</sup>H -NMR spektroskopiolla, kunnes noin puolet **25**:sta oli kulunut reaktiossa. Syynä tähän rajaukseen oli analyysin helpottaminen vähentämällä mahdollisten kertalukujen muutoksista johtuvaa epätarkkuutta. Katalyytin stabiiliisuutta tutkittiin pienentämällä reaktiokomponenttien konsentraatioita 0.4 M saman aikaisesti ja vertaillen kontrolliin.



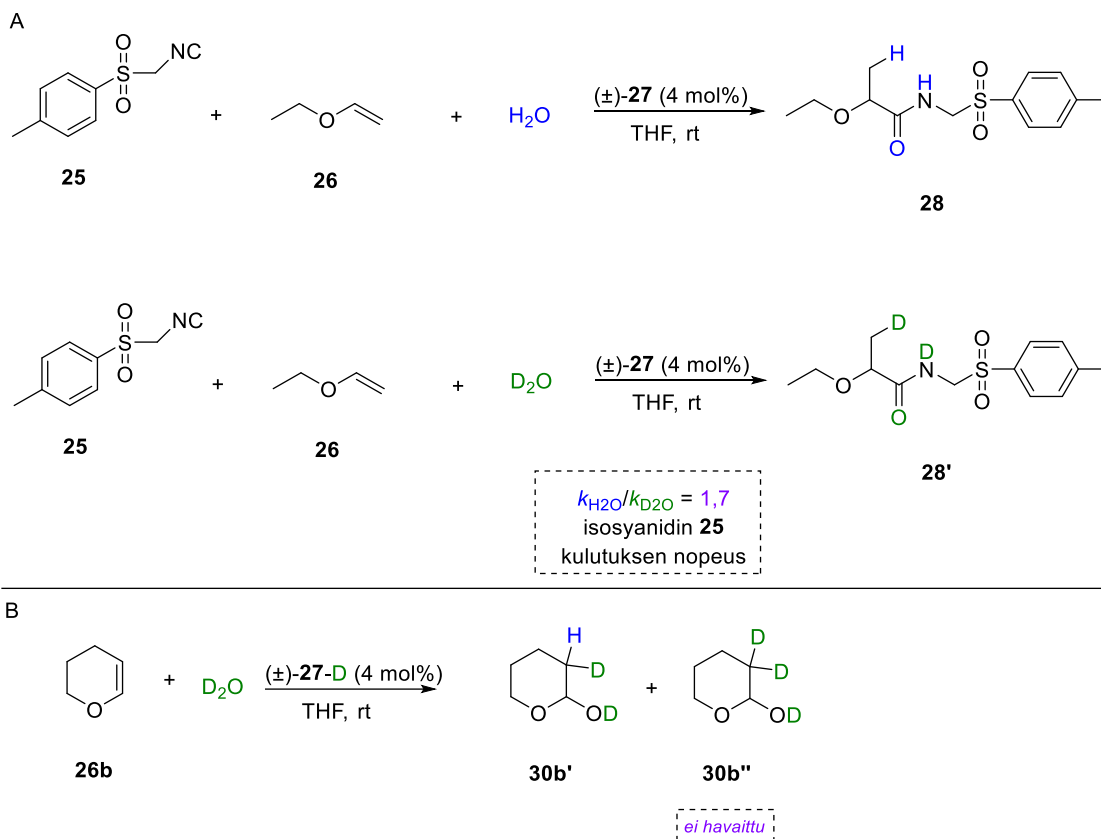
Kaavio 28. Duddingin ryhmän visio reaktiosta, A) Retrosynteettinen lähestyminen amidiasyylianioni -ja karbenium synthoneihin. B) Synteettisesti kiinnostava  $\alpha$ -oxygenoitu amidi ja C) Reaktioyhtälö ja olosuhteet.<sup>99</sup>

Tällä tavoin Duddingin ryhmä pystyivät tutkimaan reaktiokinetiikkaa eri lähtötilanteesta. Myös kolmas koe tehtiin, missä reaktio oli standardi olosuhteissa, mutta konversio vietiin vain 45 %:iin. Nämä kolme koetta näyttivät, että tuotteet eivät inhiboi katalyyttiä merkittävästi, mutta sen sijaan katalyytti deaktivoitui miedosti reaktion kuluessa.<sup>99</sup>

Burésin<sup>34</sup> aikamuuttujan suhteen normalisoitua analyysiä (VTNA) hyödyntäen Duddingin ryhmä määrittivät katalyytin kertaluvuksi kaksi. He jatkoivat edelleen päättelyä, että reaktion nopeuden määräävään vaiheeseen kuuluu kaksi Brønsted-happo–molekyyliä tehden reaktiosta kaksoiskatalyyttisen. Kun tutkimustuloksia vertailtiin Maedan *et al.*<sup>100</sup> sekä Morokuman ja Ramozzin<sup>102</sup> tuloksiin, ne olivat yhteisymmärryksessä ajatuksesta kahden happomolekyylin osallistumisesta sykliin Passerini -reaktioissa. Kun katalyytin kertaluku oli tiedossa, Duddingin ryhmä tutki muiden reaktiokomponenttien konsentraatiiriippuvuuksia. Visuaalisesti he päättelivät **25**:n olevan kertaluvultaan 1,5; mikä vastasi reaktion nopeuden kasvua tilanteessa, jossa alkukonsentraatiota kasvatettiin. **26**:sen kertaluvuksi tuli samoilla menetelmillä, ja

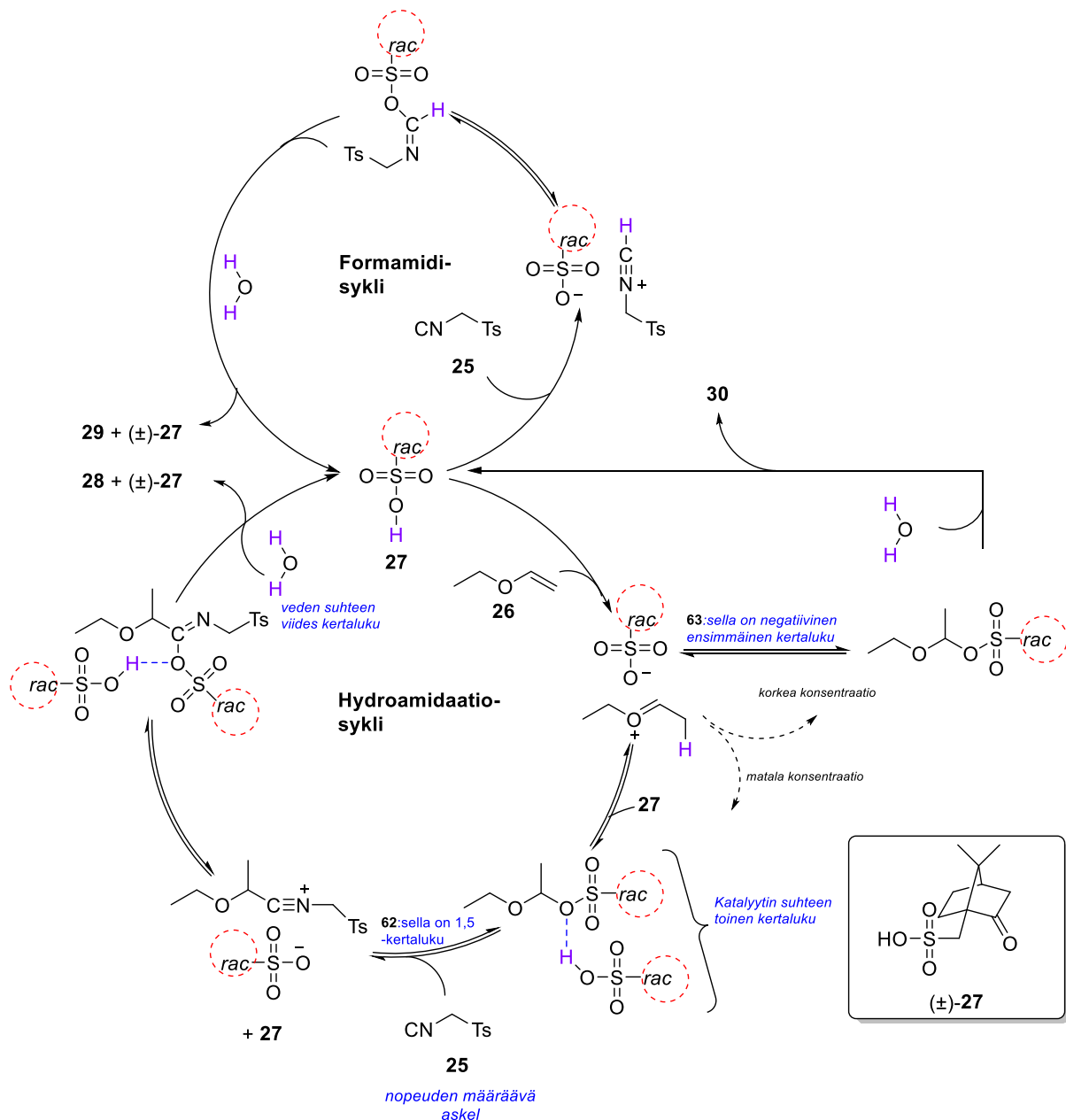
konsentraatiota nostaan, yksi mutta sen etumerkki oli negatiivinen. Tähän Duddingin ryhmällä ajatuksena oli, että **26** muodostaa katalyytin kanssa ohimenevän asetaalin ja tämä tasapaino hidastaa pääreaktiota. Tämän muodostuva asetaali ajateltiin myös reagoivan edelleen veden kanssa muodostaen sivutuotteen **30**. Siitä seurauksena tutkimusryhmä määrittä kerraluvun myös vedelle, joka heidän tuloksenansa oli viisi. Kun käytetty vinyylieetteri vaihdettiin vähemmän reaktiiviseen vaihtoehtoon kineettisten trendien yleistämiseksi, Duddingin ryhmä huomasivat reaktioprofiilien muuttuvan monimutkaisimmiksi, koska sivutuotteita alkoi muodostua numeerisesti paljon. Vaikka konsentraatioriippuvuudet muuttuivat hieman, kineettiset trendit pysyivät identtisinä.<sup>99</sup>

Mekanismin perinpohjaista tutkimusta varten Duddingin ryhmä luotasivat mahdollisten nitrilium-väliaineiden roolia reaktiossa. Tätä varten he lähtivät tutkimaan kineettisiä liuotinisotopiefektiiä analysoimalla isosyanidin **25** kulutusta NMR:llä vaihtaen liuotimen vedestä deuteriumoksidiksi. Normaaliksi KSIE arvoksi  $k_{H_2O}/k_{D_2O}$  tuli 1.7. Vaikkakin ryhmä kyseistä arvoa ei yksilöi yhteen efektiin, kun se on kokoelma useita efektejä yhdessä, Duddingin ryhmä assosioi normaalin KSIE:n katalyytin konjugaattiemäksen ja nitrilium-yksikön muodostavaan, ohimenevään ionipariin. Teoreettisesti yli yhden KSIE:t ovat ionin muodostumisesta johtuvia<sup>99</sup>. Tutkimus rakensi yksinkertaistetun systeemin 3,4-dihydro-2*H*-pyraanista (DHP), Deuteriumoksidista (D<sub>2</sub>O) ja deuteroidusta CSA:sta (10-kamferisulfonihappo, (±)-**27**). Tämän systeemin ideana oli tarkistaa, että Brønsted happo on reaktion aktiivinen katalyytti hydronium-ionin sijaan. Samalla ajatuksena oli tutkia hapon erilaisia katalyyttisiä moodeja tutkimalla hydratoituja sivutuotetta tarkemmin. Duddingin ryhmä esittivät, että teoriassa sivutuotteena oleva **30b** esiintyisi kahdessa muodossa **30b'** ja **30b''** johtuen nopeasta, reversiibelistä deuterioitumisesta ioniparin muodostumisen yhteydessä spesifisen happokatalyyysi -teorian perusteella. Kuitenkin tutkimusryhmä ei havainnut **30b''**:tä, mikä oli todisteena CSA:n **27** roolille katalyyttinä.<sup>99</sup> Kaaviossa 29 on esitetty nämä kokeet. Näiden tutkimusten valossa, Duddingin ryhmä pystyi esittämään hypoteettisen mekanismin reaktiolle, missä esiintyy oletettavasti kolme kilpailevaa reaktiopolkua (kaavio 30).



Kaavio 29. Duddingin ryhmän deuterium leimatut kokeet, A) KSIE efektin tutkiminen ja B) kokeellinen indikaatio, katalyytin osallistumisesta reaktioon.<sup>99</sup>

Ensimmäinen näistä on isosyanidin **25** protonointi **27**:n avulla, minkä jälkeen muodostuva nitrilium-ioni reagoi muodostuvaan sulfonaatin kanssa. Tämän jälkeen formamidin muodostus tapahtuu samanaikaisesti katalyytin regeneraation kanssa, kun vesi toimii nukleofiilina additiossa. Vaihtoehtoisesti CSA-vinyylieetteriaddukti muodostuu, kun CSA **27** protonoi vinyylieetterin ja tämä addukti reagoi hydratoitumalla muodostaen ei-halutun sivutuotteen **30**.<sup>99</sup> Kuten edellä todettiin, tämä vaihtoehto on todennäköinen korkeissa konsentraatioissa ja täten **26**:n konsentraation täytyy olla matala. Tämä mahdollistaa CSA:n toisen kertaluvun kinetiikan reaktiossa.<sup>99</sup> Katalyyysi tapahtuu vetysidoksen kautta ja tämä vetysidos aktivoi vinyylieetterin nopeutta rajoittavaan isosyanidin additiovaiheeseen, missä muodostuvat nitrilium-ioni jää loukkuun sulfonaattiin. **27** ja vesi lopulta yhteistuumin vievät reaktion loppuun, missä vesi ajaa kahta roolia: se tuottaa halutun  $\alpha$ -oksygenoidun amidituotteen sekä pyöräyttää katalyytin takaisin sykliin käytettäväksi.<sup>99</sup>

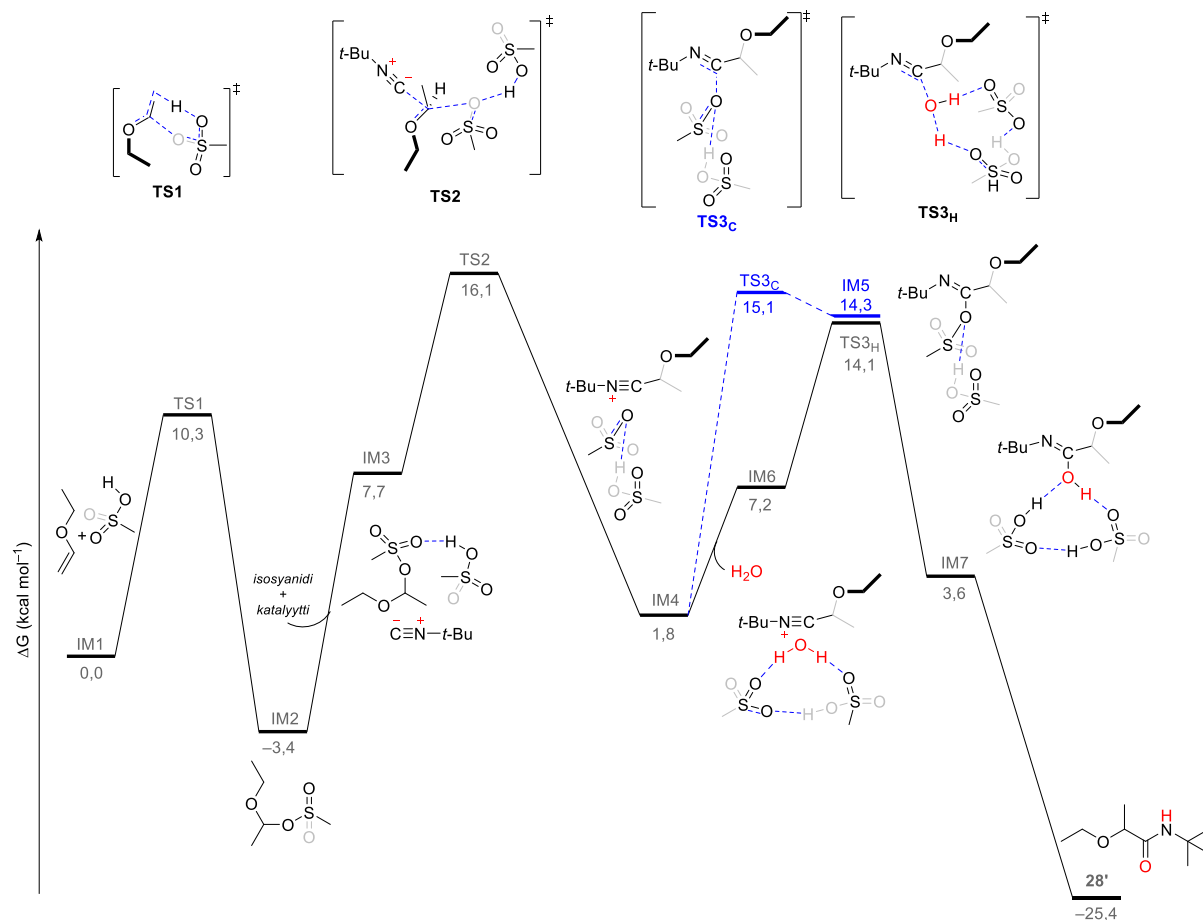


Kaavio 30. Duddingin ryhmän esittämä mahdollinen mekanismi ja katalyytin kierto kineettisten kokeiden pohjalta.<sup>99</sup>

Mekanismin esitettyään, Duddingin ryhmä kääntyi laskennallisen kemian puoleen vahvistaakseen näkemyksensä. DFT-laskut tehtiin (IEFPCM<sub>(THF)</sub>)B3LYP/6-311+G(2d,p)//B3LYP/6-31+G(d,p) tasolla. 10-Kamferisulfonihappo vaihdettiin metaanisulfonihapoksi systeemin yksinkertaistamiseksi. Isosyanidin **25** roolia ajoi *tert*-butyyliisocyanidi ja **26** oli sama etyyli vinyylieetteri kuin itse tutkimuksessa. Kaaviossa 31 on esitetty reaktion vapaan energian profiili. **IM1** reagoi keskitetyn protonin siirron välityksellä, toisin kuin mekanismin (kaavio 30) vaihteittainen protonin siirto. Tämän jälkeen välituote **IM3** reagoi



isosyanidin ja katalyytin läsnä ollessa kolmen komponentin kompleksin kautta, jonka siirtymätila on  $S_N2$ -tyyppinen. Tämän tuloksena on väliaine **IM4**. Huomattavaa on, että tämä endergoninen prosessi vaatii kaksi happomolekyyliä vahvistaen tutkimuksen ajatusta toisesta kertaluvusta katalyytin suhteen. Samalla **IM2**:sen ja **IM4**:sen energiaero kertoo negatiivisesta ensimmäisestä kertaluvun konsentraatiiriippuvuudesta vinyylieetterille prosessissa vahvistaen ajatukset mekanismin tästä osuudesta. Myös lasketut arvot **IM4**:selle ovat yhteisymmärryksessä KSIE-kokeiden tulosten kanssa nitrilium-kationin läsnäolosta.<sup>99</sup>



Kaavio 31. Duddingin ryhmän esittämä vapaan energian profiili vinyylieetterin hydroamidaatioon CSA:n avulla.<sup>99</sup>

Duddingin tutkimusryhmän laskennalliset tulokset eivät ajatusta nitriliumionin reaktiosta yhden katalyyttiekvivivalentin kanssa, koska se on energieettisesti epäsuotuisa (**TS3<sub>C</sub>** C = katalyytin lisäys) ja siitä muodostuva väliaine **IM5** on liian epävakaata. Vaihtoehtoinen näkemys Duddingin ryhmällä oli, että nitrilium reagoi vesimolekyylin kanssa, jolloin reaktiopolkua menee siirtymätilan **TS3<sub>H</sub>** (H = vesi) kautta. Erikoisuutena tässä siirtymätilassa on 10-jäseninen rengas, joka aktivoi vesimolekyylin nukleofiilista additiota samaan aikaan, kun protonin siirto tapahtuu. Tuloksena on väliaine **IM7**. Tämä väliaine sitten tautomerisoituu tuotteeksi **28'**.

Ryhmä epäili kyseessä olevan yksinkertainen happo–emäs mekanismi, mutta koska heidän mukaansa tautomerisaatio on hyvin kiistanalainen aihe siihen liittyvien tulkinnanvaraisuuksien takia, he eivät paneutuneet kyseiseen vaiheeseen sen tarkemmin. Nämä tulkinnanvaraisuudet myös ovat esteenä laskennalliselle lähestymistavalle prosessin suhteen.<sup>99</sup>

Tutkimuksessa on esitetty laaja-alaisesti todistusaineistoa ajatukselle, että reaktio olisi kaksoiskatalyyttinen ja toista kertalukua. Visuaaliset kineettiset kokeet, laskennallinen lähetysmistapa sekä kineettiset isotooppiefektikokeet muodostavat yhtenevän kuvan ja olisi helpohkoa todeta, että Duddingin ryhmän tutkimuksessa esitetyssä mekanismissa olisi perää. Kuitenkin huomion arvoisena seikkana on mekanismissa esiintyvä sivusykli, joka tuottaa katalyyttisesti sivutuotetta. Tämä sivureaktion olemassaolo voi vaikuttaa katalyytin kinetiikkaan ja täten sitä pitäisi tutkia tarkemmin. Esimerkiksi pyrkimällä tavoin tai toisin inhiboimaan kyseinen sivureaktio täysin, voisi kertoa tarkemmin sivureaktion kineettisistä vaikutuksista itse pääreaktioon.

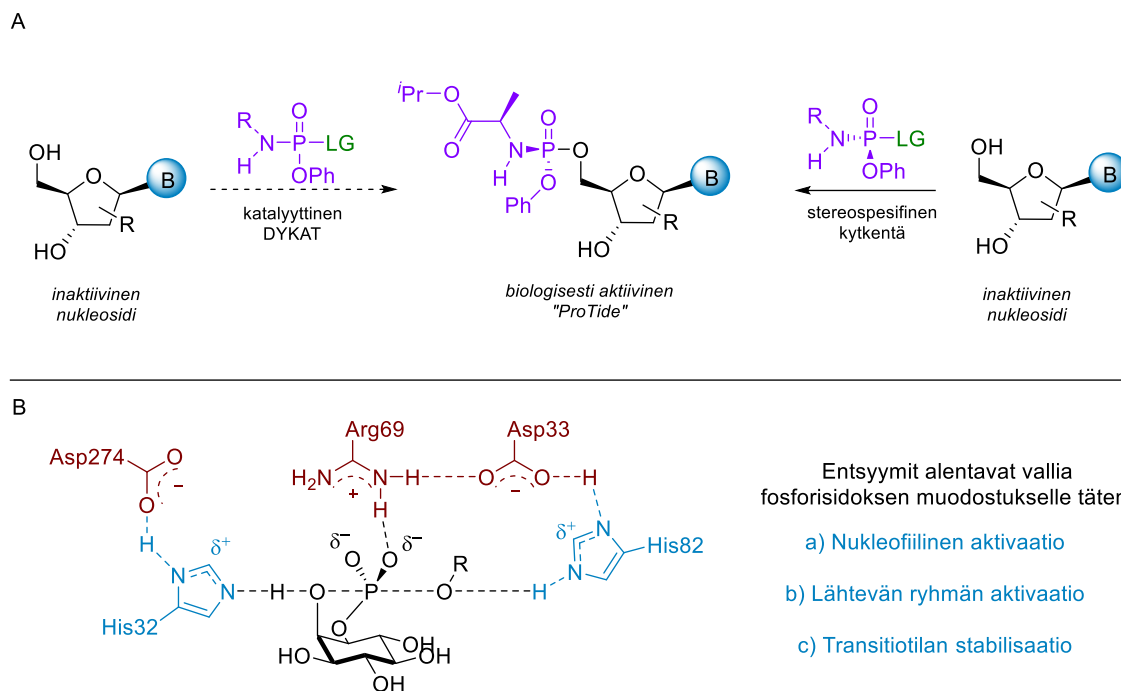
Burés *et al.*<sup>1</sup> olivat ottaneet reaktion tapaustutkimukseksi ja esittivät visuaalisten kineettisten kokeiden analyysin olevan vaikeaa, sillä Duddingin ryhmä oli määrittäneet reaktiprofiilit eri reagenssien konsentraatioissa ja että normalisoituja profiileja voidaan suoraan vertailla vain pienellä alueella koko VTNA:n kuvaajasta. Burésin ryhmä myös huomautti, että VTNA:n käytössä oli jätetty muutamat datapisteet huomiotta. Kun nämä puuttuvat datapisteet lisättiin VTNA-kuvaajiin voitiin nähdä selvästi, että kuvaajat eivät enää peitä toisiaan, kun katalyytin kertaluvuksi oletetaan kaksi. Sen sijaan Burésin analyysissä tutkijat saivat paremman peiton VTNA-kuvaajille, kun oletukseksi otettiin ajatus inhibiittorin läsnäolosta. Tästä syystä he ehdottivat lisäkokeita, missä katalyytin konsentraationa olisi 0,2 mol%, mikä antaisi osviittaa onko reaktiossa oikeasti mukana inhibiittori, jonka vaikutus näkyisi alhaisilla katalyyttikonsentraatioilla.

Täten loppupäätelmänä reaktiolle on ristiriitainen: Todistusaineistoa toiselle kertaluvulle on merkittävästi ja todisteina on muutakin aineistoa kuin pelkästään kineettisiä kokeita. Toisaalta olisi oleellista tehdä Burésin ehdottamat tarkistukset ja lisäkokeet kinetiikan puolesta ja varmistua asiasta. Tämän lisäksi datapisteiden huomiotta jättäminen pitäisi tutkimuksessa selittää, jotta niiden pois jättäminen olisi perusteltua. Tällä hetkellä reaktiota voidaan pitää katalyytin suhteen toisen kertaluvun tapauksena, mutta muita selityksiä ei voida kokeellisen näytön perusteella täysin sulkea pois.

### 5.1.6. DiRoccon ryhmän fosfori–happisidoksen muodostus

Seuraavana analysoitavana reaktiona on DiRoccon ryhmän tutkimus<sup>106</sup> pronukleotidilääkkeiden parissa. Kyseisten yhdisteiden ydinosa on kiraalinen fosfori, minkä stereoselektiivinen synteesi on heidän mukaansa ratkaisematon ongelma. Tämä on oleellista lääketieteellisistä syistä, missä lääkkeen biologiseen aktiivisuuteen vaaditaan nukleosidin fosforylaatio. Kuitenkin trifosfaattinukleosidit ovat huonoja vaihtoehtoja lääkkeiksi johtuen niiden epästabiilisuudesta ja vaikeuksista läpäistä soluseinä.<sup>106</sup> DiRoccon ryhmä esitti Cahardin *et al.*<sup>107</sup> ja Sofian *et al.*<sup>108</sup> ProTide (pronukleotidi) -alustan (kaavio 32A) olevan selkeästi tehokkaampi vaihtoehto, sillä rakenteessa ilmenevä 5'-aryloxyfosforiamidaattiosa edistää soluseiniä läpäisykykyä sekä fosforylaation nopeutta.<sup>106–108</sup> Julkaisu huomauttaa, että stereokemia yhdisteen fosforissa vaikuttaa lääkkeen voimakkuuteen, metabolismin nopeuteen ja myrkyllisyyteen, tehden stereokontrollista synteessissä erittäin kriittisen. Samalla he mainitsevat, että standardimetodit stereoselektiiviseen synteisiin P-stereogeenisten proilääkkeiden kohdalla ovat olleet kiraalisten apumolekyylien tai kiraalisten, ei-raseemisten fosforylaatioyhdisteiden käyttöä, mikä on supistanut mahdollisuuksia merkittävästi ja täten yleistä, katalyyttistä metodia ei ole ollut käytettävissä.<sup>106</sup>

DiRoccon ryhmä mainitsi kuinka fosfori(V) heteroatomisidosten muodostaminen katalyyttisesti ja stereoselektiivisesti vaatisi akiraalisen yhdisteen epäsymmetrisointia tai dynaamista kineettistä asymmetristä transformaatiota (dynamic kinetic asymmetric transformation, DYKAT), viitaten Dutartren *et al.*<sup>109</sup>, Steinreiberin *et al.*<sup>110</sup> ja Farnhamin *et al.*<sup>111</sup> tutkimuksiin.<sup>106</sup> Kuitenkin nämä metodit kärsivät katalyytin matalasta aktiivisuudesta ja heikosta selektiivisyydestä.<sup>106,112,113</sup> DiRoccon tutkimus toteaa ongelmien johtuvan yleisesti hyväksytyn mekanismin puutteesta happi-fosfori(V)-sidosten muodostumiselle, mikä tekee yleisen metodin löytämisestä tai kehittämisestä hankalaa. Toisena havaintona heillä oli kemoselektiivisyys, sillä synteessissä on mahdollista, että molemmat hydroksyyli-ryhmät aktivoituvat umpimähkäisesti.<sup>106</sup>

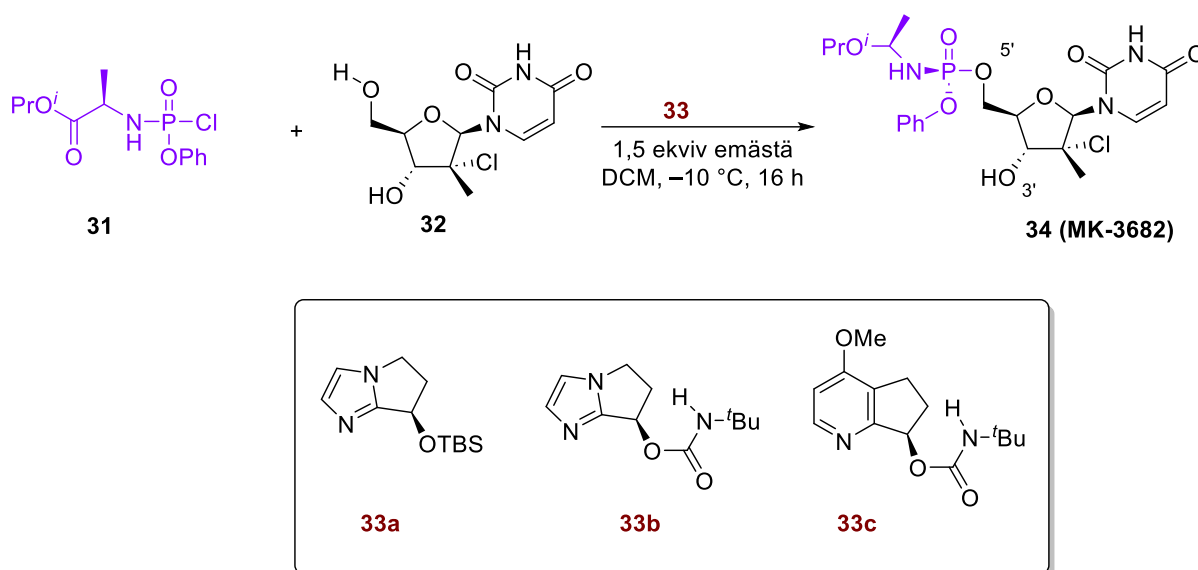


Kaavio 32. DiRoccon ryhmän esittämä synteettinen strategia ja konsepti fosfori–happi sidoksen muodostamiselle. A) Lähetysmita- ja ProTide -yhdisteiden synteesiin. LG = lähtevä ryhmä, B = emäs. B) Pentavalentti siirtymätila P–O sidoksen muodostukselle fosfatidylinositoli-spesifisessä fosfolipaasi C:ssä.<sup>106</sup> Siirtymätilan ehdottajana on Ryan *et al.*<sup>114</sup>

Kuitenkin DiRoccon ryhmä näki mahdollisuuksia entsyymien puolella, sillä niiden on näytetty katalysoivan fosfori–happi sidoksen muodostumista reaktiosarjassa, jossa esiintyy nukleofiilinen aktivaatio yleisellä emäskatalyyysillä, lähtevän ryhmän aktivaatio yleisellä happokatalyyysillä sekä oksyanionikuoppa -tyyppisellä siirtymätilan stabilisaatioefektillä (kaavio 32B).<sup>106</sup>

DiRoccon ryhmä lähti tutkimaan ProTide MK -3682 (**34**):n muodostusreaktiota eli klorofosforiamidaatin **31** ja nukleosidin **32** välistä reaktiota (kaavio 33). Ensimmäisenä he tutkivat miten akiraaliset, nukleofiiliset katalyytit vaikuttavat substratin vinoutumiseen stereokemiallisesti. Havaintona oli, että tuotetta saatiin 52:48 (*R*):(*S*) suhteella, mikä kertoi reaktion olevan ettei substraatti juurikaan kontrolloi stereokemiaa, vaan stereokemiaan voitaisiin vaikuttaa katalyytin avulla. Kun katalyytit vaihdettiin kiraalisiksi, monet olivat tehottomia stereokontrollin suhteen. Kuitenkin Liun *et al.*<sup>113</sup> Weintraubin ja Tiernanin<sup>115</sup> sekä Zhangin *et al.*<sup>116</sup> käyttämät yhdisteet olivat DiRoccon ryhmän näkökulmasta lupaavia. Täten tutkinnan alle tulivat yhdisteet **33**. Katalyytti **33a** saavutti vaatimattoman saannon (60 %) ja

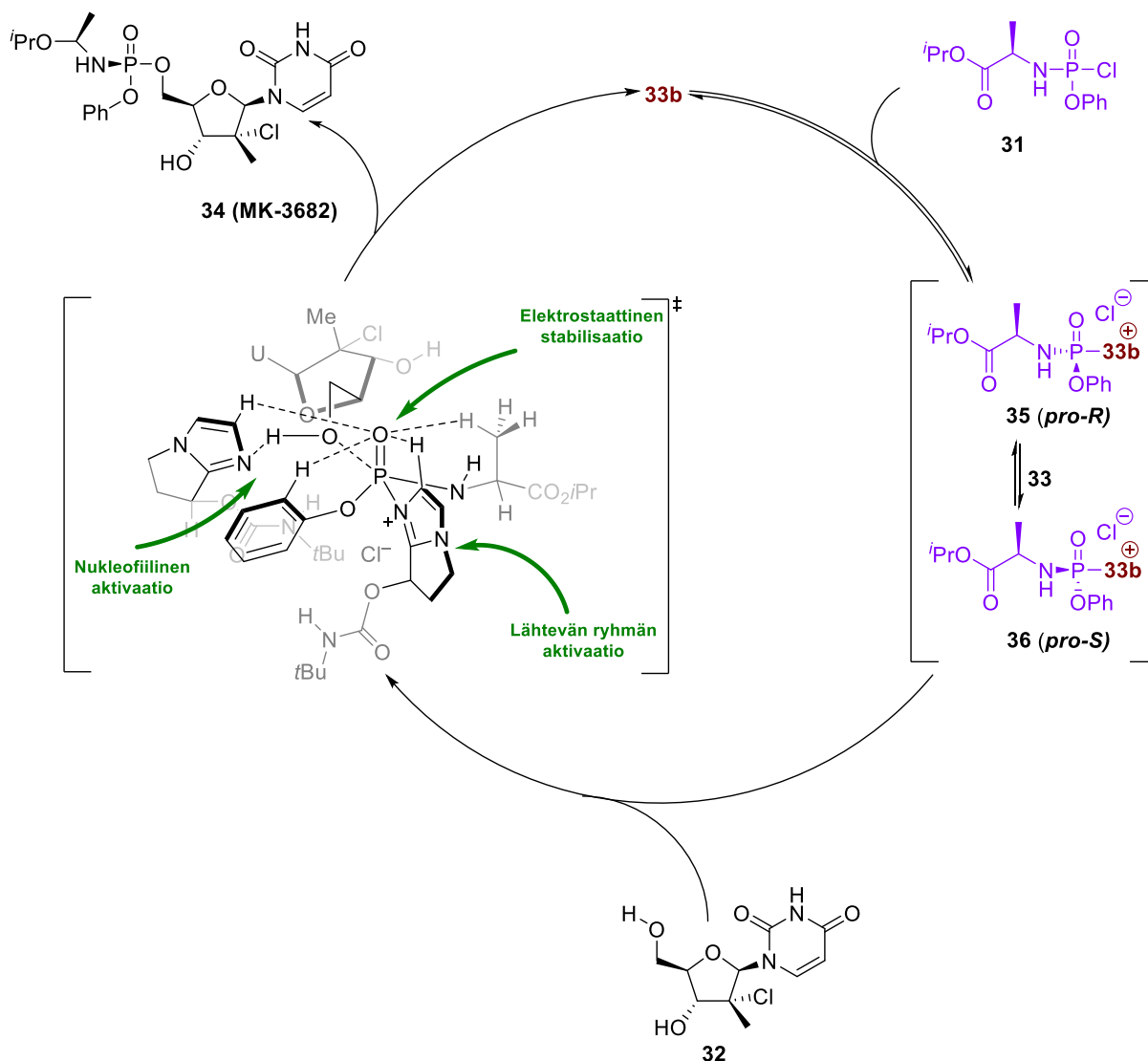
79:21 selektiivisyyden halutulle (*R*)-stereokemialle fosforin kohdalla. Vaihtamalla katalyytin stereokemiaa *R*:stä *S*:ään, DiRoccon tutkimusryhmä huomasi stereokemiallisesti yhteensopimattoman suhteen (saanto 47 %, 44:56 selektiivisyys (*S*)-stereokemialle) ja päättelivät nukleosidin **32** ”tunnistautuvan kiraalisesti”. Tämä päätelmä myös vahvistettiin käyttämällä <sup>1</sup>H NMR-spektroskopiaa, jossa ytimen Overhauser-ilmio (Nuclear Overhauser Effect, NOE) havaittiin katalyytin sitoutuessa substraattiin (viite 106, kuva S27). Katalyytti **33b** puolestaan paransi selektiivisyyttä keskinkertaiseksi (89:11 dr) 20 mol% annoksella samalla kun se osoitti erinomaista kemoselektiivisyyttä 5' hydroksyyliin.<sup>106</sup>



Kaavio 33. DiRoccon ryhmän reaktioyhtälö sekä käytetyt katalyytit.<sup>106</sup>

Kun DiRoccon ryhmä optimoi reaktiota, huomattiin stereoselektiivisyyden riippuvan katalyytin konsentraatiosta siten, että korkeamman selektiivisyyden sai korkeammalla katalyytin konsentraatiolla. Tämä vaikutti viittaavan korkeamman kuin ensimmäisen kertaluvun kinetiikkaan. Käyttämällä RPKA:ta (Reaction Progress Kinetic Analysis) aika-konsentraatioprofiilien analyysiin, DiRoccon ryhmä havaitsi reaktion olevan toista kertalukua katalyytin **33b** suhteen ja ensimmäistä kertalukua nukleosidin **32** suhteen. Tämän lisäksi reaktiossa käytetty emäs, 2,6-lutidiini sekä **31** molemmat näyttivät kinetiikaltaan olevan saturoituja. DiRoccon ryhmä päätteli tästä, että **31** päätyy nopeasti tasapainoon aktivoitujen yhdisteiden **35** ja **36** kanssa (kaavio 34), ja että P–O sidoksen muodostuminen on reaktion nopeuden määräävä vaihe. Tämä tulos vahvistettiin <sup>1</sup>H ja <sup>31</sup>P NMR-spektroskopian avulla, sillä **33**:n P-epimeerinen suhde ei muuttunut merkittävästi reaktion aikana.<sup>106</sup> EXSY-kokeiden (Exchange Spectroscopy) avulla DiRoccon ryhmä näytti reaktio-olosuhteiden alla tapahtuvan

**35:n** ja **36:n** välisen konversion tapahtuvan nopeasti estäen **35:n** **36:n** tasapainon muutoksien vaikuttavan stereokemiaan.<sup>106</sup>



Kaavio 34. DiRoccon ryhmän esittämä mekanismi **34:n** synteesille. U = Uraasiili (Uracil).<sup>106</sup>

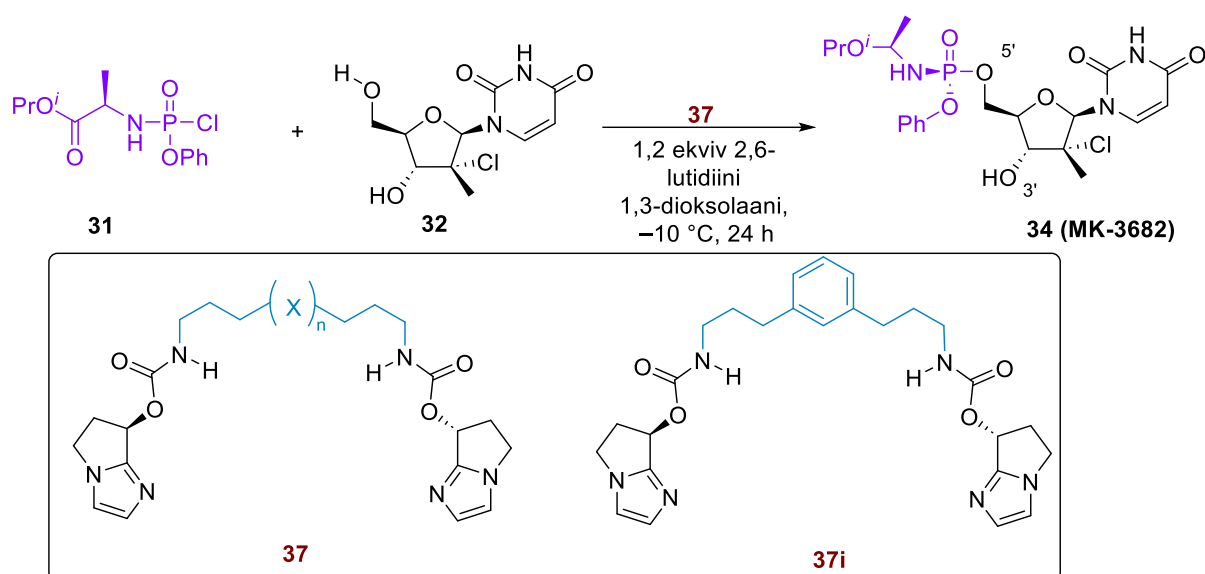
DiRoccon ryhmä käytti hyväksi DMAP:in (4-dimetyyliaminopyridiini) katalysoiman alkoholin asylaation mekanistisia tutkimuksia selittääkseen miksi heidän reaktiossaan nopeuden määrävään vaiheeseen kuuluu myös vasta-anionin yleinen emäskatalyysi.<sup>106,117</sup> Tutkimusryhmä argumentoi katalyyysin tapahtuvan entsyyminkaltaisesti, missä yhtäaikaisesti fosforidonori aktivoituu sekä 5'-hydroksiryhmä deprotonoituu (yleinen emäskatalyysi). Tämä samanaikainen aktivaatio selittäisi miksi katalyytti nopeuttaa reaktiota kaksoiskatalyyttisesti. Tätä hypoteesia tutkiakseen, DiRoccon ryhmä suunnitteli **33a**:ta vastaavan pyridiinijohdannaisen **33c**, mikä ei itsessään olisi tarpeeksi nukleofiilinen aktivoitakseen **31**:a. Kun stereokemiallisesti vastaavaa

**33c**:tä käytettiin emäksenä **33b**:n kanssa, huomattiin fosforin stereoselektiivisyyden kasvavan 2,6-lutidiiniin verrattaen.<sup>106</sup> Vastaavasti kun pyridiinin stereokemian vaihtoi vastakkaiseksi, stereoselektiivisyys putosi huomattavasti. Reaktio ei myöskään etene ilman **33b**:tä, mikä kertoi molempien olevan tarpeellisia stereokontrollin kannalta. Vahvistaakseen yleisen emäskatalyysin läsnäoloa, tutkimusryhmä teki myös KSIE-kokeet reaktiolle ja saivat positiivisen efektin ( $k_H/k_D = 1,45$ ), kun nukleosidin **32** 5' ja 3'-hydroksiryhmät deuterointiin.<sup>106</sup>

Vahvistaakseen kokeellisia tuloksia, DiRoccon ryhmä lähestyi tätä normaalista poikkeavaa aktivaatiota laskennallisten metodien avulla. DFT-metelminä käytettiin dispersikorjattuja B3LYP/6-31G\*\*, M06L/6-31+G\*\* ja M06-2X/def2-TZVPP -menetelmiä sekä konformaatiollista otantarutiinia. Tulokset arvioivat sidoksenmuodostusvallin olevan kineettisesti epäsuotuisa (n. 30 kcal mol<sup>-1</sup>), jos reaktiossa ei ole mukana yleistä emästä.<sup>106</sup> Kun joukossa on kaksi **33b** molekyyliä, pentavalentti siirtymätila todennäköisesti muodostuu 5' hydroksiryhmän sitoutumisella eksogeeniseen imidatsoliin. Tämä yleinen emäsefekti alentaa siirtymätilan energiaa n. 10 kcal mol<sup>-1</sup>, mikä mahdollistaa reaktiopulun vallin yli sidoksen muodostumiseen.<sup>106</sup> Samat laskennalliset menetelmät myös paljastivat useita interaktioita, jotka stabiloivat polarisoitunutta P–O sidosta (kaavio 34). Imidatsolikatioonin ja apikaalisen P–O välillä suosii koplanaarista asetelmaa, mikä tuo mukanaan selvästi erottuvan CH–O interaktion. Tämä johtuu fosforyloituneen imidatsolin happanevasta  $\alpha$ -C–H sidoksesta, mikä muistuttaa oksyanioni-kuoppaa ja täydentää fosfolipaasien katalyysitriadin: Lähtevän ryhmän aktivointi, yleinen emäskatalyyysi sekä oxyanionin stabilisaatio.<sup>106</sup> DiRoccon ryhmä arvioi, että kaikki nämä seikat muodostavat siirtymätiloille n. 2,3 kcal mol<sup>-1</sup> eron halutun fosforin (*R*)-stereokemian hyväksi.<sup>106</sup>

Koska **33b**:n muodostumisen stereoselektiivisyys oli vielä suhteellisen vaatimaton (89:11 dr), tutkimuksessa haluttiin suunnitella ja valmistaa parempi katalyytti, joka hyödyntäisi **33b**:n kohdalla havaittuja seikkoja paremmin. DiRoccon ryhmä lähestyi tätä Konslerin *et al.*<sup>118</sup> sekä Denmarkin ja Ghoshin<sup>119</sup> inspiroimana, mikä myös vastasi Spinkin *et al.*<sup>97</sup> tutkimusta. Ajatuksena oli siis, että sitomalla kaksi **33b**:n kaltaista yhdistettä yhteen, voidaan korkeasti järjestäytyneen siirtymätilasta johtuvaa entropiasakkoa vähentää samalla, kun yhdisteiden yhteistyötä kasvatetaan. Laskennallisesti DiRoccon ryhmä määrittä sidosillan vähimmäispituudeksi 6-hiiliatomia ja he lähtivät vertailemaan linkkerillä varusteltujen dimeerien vaikutusta reaktioon samoissa olosuhteissa. Pisimillään linkkerin pituudeksi tuli 10 hiiliatomia (**37a-g**). Lyhyet linkkerit, 6 tai 7 hiiliatomia, paransivat saantoa merkittävästi, mutta eivät parantaneet selektiivisyyttä huomattavasti. 8 hiiliatomia paransi saantoa

merkittävästi (90 %) ja selektiivisyyttä (97:3 dr) tuoden esiin merkittävän muutoksen lyhyempiin ketjuihin. 9 hiilen ketju maksimoi selektiivisyyden 98:2 dr:ään ja 10 hiilinen linkkeri puolestaan vähensi saantoa ja selektiivisyyttä antaen merkin linkkerin pituuden ylärajasta. Tämä tutkimusryhmän mielestä johtui mahdollisesta joustavuudesta ketjussa antaen molekyyllille enemmän rotationaalisia vapausasteita liikkuu. Tästä syystä DiRoccon ryhmä päätti valmistaa linkkerin, jossa nämä vapausasteet olisivat minimaaliset lisäämällä 1,3-fenyylin ketjun keskelle. Tämä katalyytti omasi optimaalisen reaktiivisuuden eli verrannollisen nopeuden  $k_{rel} = 10$  vs. **33b** ja paransi selektiivisyyttä entisestään 99:1 dr:ään.<sup>106</sup> Kaaviossa 35 on esitetty tämä optimoitu reaktio sekä linkitetyt katalyytit.



Kaavio 35. DiRoccon tutkimuksen reaktioyhtälö ja -olosuhteet sekä linkkeröidyt katalyytit.<sup>106</sup>

Tutkimusryhmä optimoi siirtymätilat uudelleen tälle katalyytille ja saivat laskennallisesti  $2,6\text{ kcal mol}^{-1}$  eron stereokemialle suosien haluttua P-(*R*)-konfiguraatiota. Tämä oli yhtenevä kokeellisesti havaitun selektiivisyyden kanssa. Samaten katalyytin **37** tuoma molekyylinen sisäinen yhteistyö validoitiin kokeellisesti, kun reaktio havaittiin olevan **37**:n suhteen ensimmäistä kertalukua. DiRoccon ryhmä pelkäsi, että linkkeröinti deaktivoisi katalyytin sillä perusteella, että kilpaileva bisfosforiamidaatioreaktio dimeerille olisi nopeampi vaihtoehto. Kuitenkin P–O-sidoksen muodostus olikin paljon nopeampi kuin klorofosforamidaatin aktivaatio. Perusteena oli ensimmäisen kertaluvun kinetiikka **31**:sen suhteen ja nollannen kertaluvun kinetiikka **32**:n suhteen. Tämä myös merkitsi sitä, että reaktion nopeuden määräävä vaihe muuttuu klorofosforiamidaatin aktivaatioksi. Koska P–O-sidoksen muodostuminen on paljon nopeampi kuin **32**:n aktivaatio, DiRoccon ryhmä arveli tasapainoon ajautumisen olevan stereokemian määräävä vaihe. Mutta <sup>31</sup>P NMR-kokeet paljastivat vain yhden havaitun yksikön



ja tästä, tutkimusryhmä päätteli tasapainoon ajautumisen olevan nopea ja vallin olevan matala fosoforin inversiolle kooperatiivisen siirtymämekanismiin ("a cooperative displacement mechanism") takia.<sup>106</sup>

DiRoccon ryhmän monet kokeet ovat perusteluna, että tukittu reaktio olisi kaksoiskatalyyttinen. Vakuuttavimpana tekijänä katalyytti **37**, koska sen osoittama aktiivisuus, selektiivisyys ja rakenne itsessään perustelee miksi **33b**:tä tarvitaan kaksi molekyyliä yhden sijaan. Kineettiset kokeet sekä laskennalliset tulokset vahvistivat näkemystä.

Burés *et al.*<sup>1</sup> olivat ottaneet DiRoccon ryhmän tutkimuksen tapauskohtaiseen käsittelyyn. He esittivät, että vastaavan peiton visuaaliseen kineettiseen analyysiin sai lisäämällä reaktioon inhibiittorin ja käsittelemällä katalyyttiä ensimmäisellä kertaluvulla ja täten ehdotuksena oli, että tämän inhibiition mahdollisuuden voisi kokeellisesti osoittaa tekemällä reaktio 5,5 mol% katalyytin konsentraatiolla. Tämä tietenkin olisi oleellista tutkimustuloksen validoinnin kannalta ja sen suorittaminen voisi mahdollisesti muuttaa väitteen paikkaansa pitävyyttä.

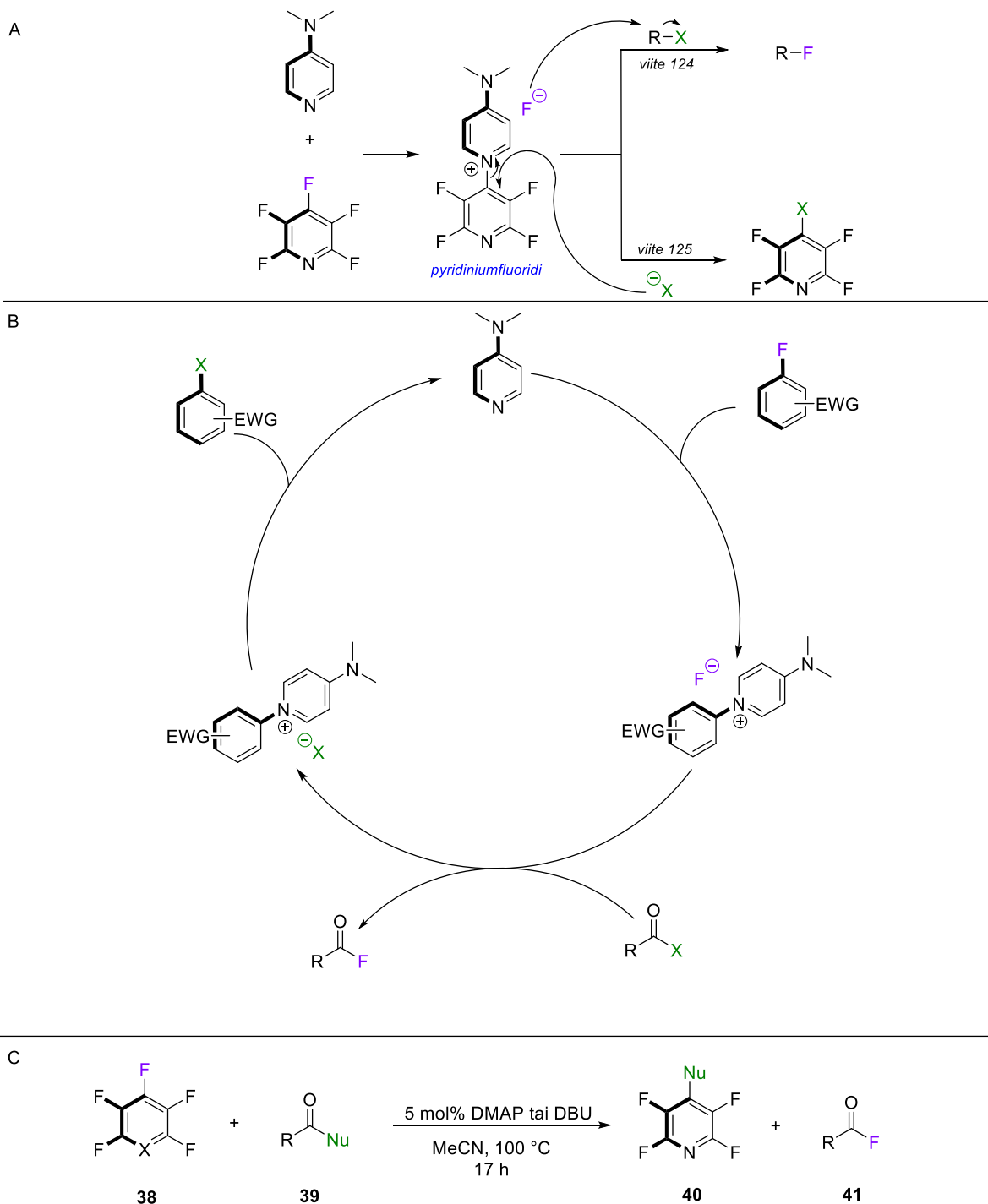
Kuitenkin kokonaisuutena DiRoccon *et al.*<sup>106</sup> esittämän reaktion voidaan olettaa noudattavan toisen kertaluvun kinetiikkaa katalyytin suhteen, sillä kaikki muu todistusaineisto kinetiikan ohella on merkittävää. DiRoccon reaktio toimii myös malliesimerkkinä Yoshimitsun *et al.*<sup>87</sup> ja Spinkin *et al.*<sup>97</sup> tutkimusten ohella tilanteesta, missä toisen kertaluvun oletusta on hyödynnetty paremman, multifunktionaalisen katalyytin suunnitteluun ja käyttöön. Tämänkaltainen lähetysmistapa on, kuten aikaisemminkin, se tulevaisuuden mahdollisuus kaksoiskatalyysireaktioille. Vastaavien optimoitujen katalyyttien käytön voisi nähdä luontaisena askeleena kohti DiRoccon ryhmän mainitsemaa ajatusta synteettisistä entsyymeistä. Vaikkakin heidän katalyyttinsä ei vielä ole DiRoccon ryhmän mukaan se täydellinen tapaus, on se kuitenkin lupaava lähtökohta ja perusta tuleville tutkimuksille aiheeseen.

### 5.1.7. Crimminin ryhmän fluoridimetateesi

Crimminin työryhmän<sup>120</sup> fluoridin metateesireaktio valittiin seuraavaksi tarkasteluun. Lähtökohtana heillä oli se, että fluoridiyhdisteet ovat hankalia ja kestäättömiä syntetisoida nykyisillä metodeilla ja tähän tarvitaan ratkaisu, sillä fluoridiyhdisteet ovat tärkeitä monella eri kemian osa-alalla ja sovelluksissa, kuten lääketieteessä, maanviljelyssä sekä

jäähdytystekniikkassa.<sup>120</sup> Nykyiset synteessimetodit tukeutuvat atomieconomisesti tehottomiin reagensseihin kuten tetrabutylammoniumfluoridiin (TBAF), dietyyliaminorikkitrifluoridiin (DAST) sekä 1-klorometyyli-4-fluoro-1,4-diazonobisyklo[2.2.2.]oktaani-bis(tetrafluoroboraattiin) samalla kun fluorin poistoreagensseja tarvitaan stoikiometrisiä määriä, jotta termodynaamisesti vahva hiili-fluori -sidon voidaan rikkoa.<sup>120</sup>

Crimminin ryhmä näki katalyyysin lääkkeenä tähän ongelmaan ja täten ryhmä lähti tutkimaan asiaa aluksi käyttäen Saundersin *et al.*<sup>121</sup> stoikiometristä fluoridin metateesireaktiota mallina, jossa katalyyttinä toimi Rh-kompleksi. Tämä metateesi perustuu edelleen Arisawan *et al.*<sup>122,123</sup> tutkimukseen, jossa [RhH(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]-yhdistellä pystyttiin saavuttamaan tasapaino fluoroareenien ja esterien tai tioesterien välillä muodostaen funktionalisoituja areeneja ja karbonyylifluorideja. Crimminin tutkimus halusi kuitenkin käyttää yksinkertaisia nukleofiilejä metallien sijaan, sillä tämä Rh-kompleksi muiden vastaavien metallien tavoin on kallis ja mahdollisesti sitä tarvitaan myös stoikiometrisiä määriä.<sup>120</sup> Inspiraationa oli myös Murrayn *et al.*<sup>124</sup> S<sub>N</sub>Ar reaktio 4-(dimetyyliamino)pyridiin (DMAP) ja pentalfluoropyriidin välillä muodostaen pyridiumfluoridisuolan (kaavio 36A). Tämä suola pystyttiin eristämään ja käyttämään F<sup>-</sup> -ionilähteenä fluoraukseen tiettyjen organohalidien kanssa. Mielenkiinto Crimminin ryhmällä oli myös Schmidtin *et al.*<sup>125</sup> raportti, jossa kyseinen suola toimi itse elektrofiilinä ulkoisten nukleofiilien läsnäollessa. Tämä vei Crimminin ryhmän ajatukset mahdollisesti yhdistää molemmat aktivaatiomuodot ja näin luoda katalyyttinen metateesi (kaavio 36B).<sup>120</sup> Crimminin ryhmä päätyi tekemään reaktion pentafluoroareenien ja joukon sopivia yhdisteitä (happoanhydritit, dimetyylidikarbonaatti, *S*-fenyylitioasetaatti, bentsoyylikloridi, bentsoyylylsyanidi ja bentsoyyli-isotiosyanaatti) välillä. Fluoroareeniksi valikoitui aluksi pentafluoropyridiini, koska se oli jo osoittautunut toimivaksi haluttuun S<sub>N</sub>Ar -reaktioon, mutta myöhemmin myös muita pentafluoroareeneja tutkittiin tarkemmin. Reaktio-olosuhteet on esitetty kaaviossa 36C.<sup>120</sup>



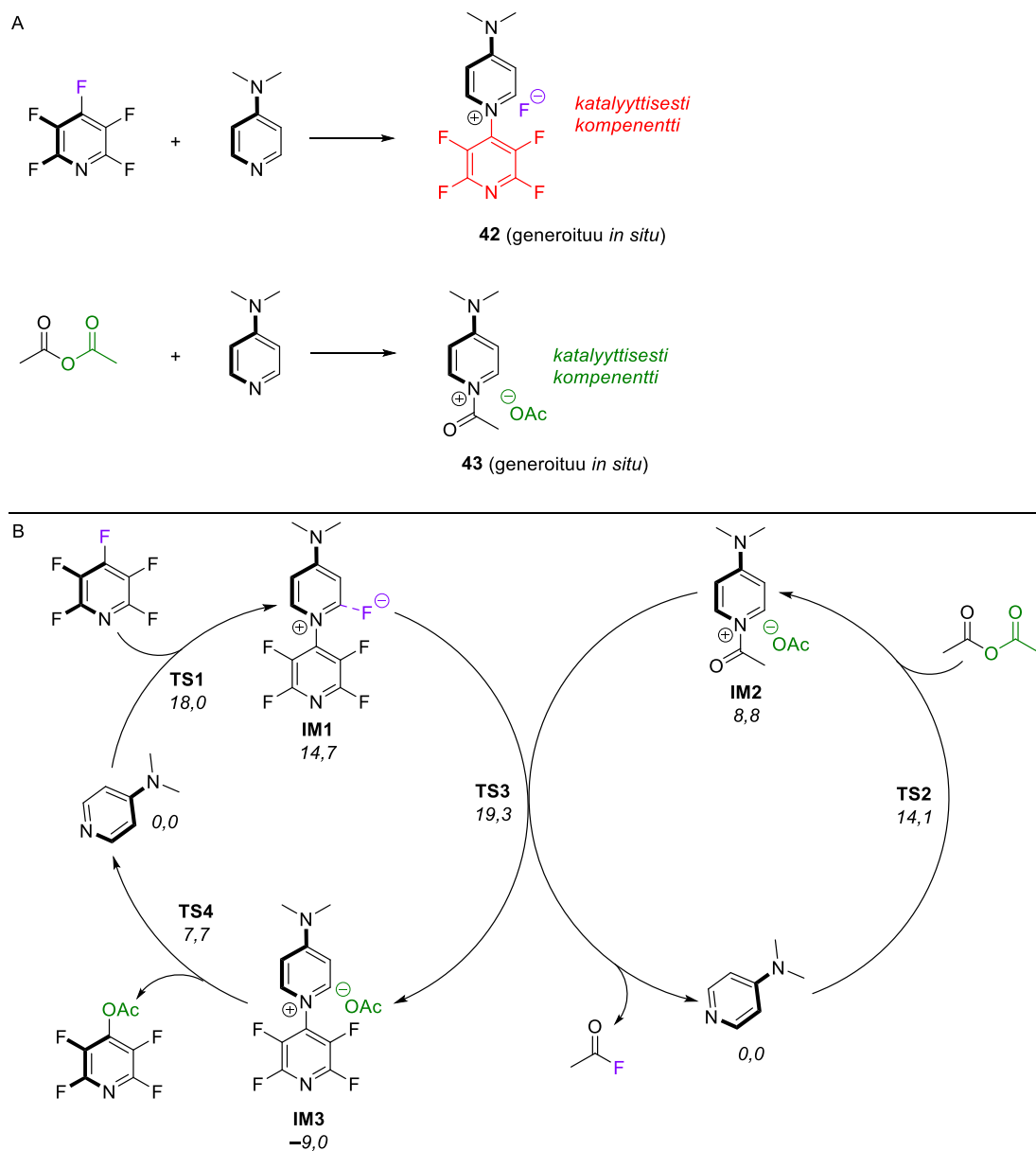
Kaavio 36. A) Crimminin ryhmän fluoridimetateesin pohja Sandfordin ryhmän ja Schmidtin ryhmän tutkimuksiin nojaten, B) Crimminin tutkimuksen katalyyttisen metateesin luonnostelma ja C) Crimminin tutkimuksen fluoridimetateesin reaktio-olosuhteet.<sup>120</sup>

Tuotteita reaktiossa muodostuu siis kaksi: funktionalisoitu fluoroareeni **40** ja asyylifluoridi **41** ja molemmat ovat synteesien kannalta käyttökelpoisia.<sup>120</sup> Crimminin ryhmä oli sitä mieltä, että asyylifluoridin muodostuminen on se termodynaaminen seikka, joka ajaa reaktiota eteenpäin. Samalla he huomasivat, että tuotteiden saannot korreloivat keskenään ja ne voitiin eristää

toisistaan. Kun reaktion laajuutta tutkittiin, voitiin reaktiolla muodostaa C–O, C–Cl, C–C, C–N ja C–S sidoksia fluoroareeneihin. Crimminin ryhmä havaitsi regioselektiivisyyden reaktiosas, mikä viittasi ennustettuun  $S_NAr$ -mekanismiin. Kun reaktiossa käytettiin vähemmän stabiileja nukleofiilejä, saannot putosivat odotetusti. Samaten vähemmän fluorisubstituoidut areenit pudottivat saantoa merkittävästi. Hyvin reaktiiviset substraattit sen sijaan saattoivat muodostaa seoksen mono- ja disubstituoitujen tuotteiden välillä. Kun *S*-fenyylitioasetaattia käytettiin generoimaan hyvin nukleofiilinen bentseenitiolaatti anioni, voitiin reaktion substraattivalikoimaa kasvattaa myös vähemmän substituutujen fluoroareenien suuntaan. Kuitenkin tämä vaati, että katalyytti vaihdettiin DMAP:ista DBU:ksi (1,8-diatsabisyklo(5.4.0)undek-7-eeni). DBU ei kuitenkaan soveltunut muihin reaktioihin laisinkaan ja tuotteita ei muodostunut sitä käytettäessä.<sup>120</sup>

Mekanismia selvittääkseen Crimminin ryhmä lähti tutkimaan pentafluoropyridiinin ja bentsoeanhydridin välistä metateesireaktiota käyttäen 5 mol% DMAP:ia katalyyttinä. Ensimmäisenä reaktiota seurattiin <sup>19</sup>F NMR-spektroskopiolla ja tällä saatiin selville, että tuotteet **40** ja **41** muodostuvat yhtäaikaisesti ja yhtä nopeasti. Vaihtamalla nukleofiilin etikkahappoanhydridiin reaktiota voitiin seurata käyttämällä stoikiometristä määrää DMAP:ia. Tällä tavoin Crimminin ryhmä havaitsi, että reaktiossa muodostui ennakoitu pyridiumfluoridisuola **42**, jonka todettiin olevan katalyyttisesti kompetentti havaitsemalla muodostuva kompleksi (kaavio 37A). Samaten etikkahappoanhydridin kohdalla stoikiometrisissä olosuhteissa muodostui **43** ja sekin todettiin katalyyttisesti kompetentiksi (kaavio 37A) havaitsemalla sen läsnäolo reaktioseoksessa. Crimminin ryhmä analysoi reaktion kinetiikkaa käyttämällä VTNA-menetelmää. Tällä määritettiin reaktion olevan ensimmäistä kertalukua fluoroareenin suhteen, ensimmäistä kertalukua happoanhydridin suhteen ja toista kertalukua DMAP:in suhteen. Tämä myös vahvistettiin käyttämällä alkunopeuksia kineettisen profiilin muodostamiseen. Tästä tutkimusryhmä argumentoi, että DMAP aktivoi molempia metateesiin osallistuvia substraatteja yhtäaikaisesti reaktion nopeuden määräävässä vaiheessa, jotta kahden ekvivivalentin osallistuminen olisi mekanistisesti mielekstä. Mekanismitseksi ehdotettiin tilannetta, jossa katalyytti toimii synergistisen katalyyysin tavoin kahdessa yhtäaikaisessa syklissä, josta ne yhdessä tuottavat tuotteen (kaavio 37B). Crimminin ryhmä totesi, että reaktiossa voidaan myös käyttää <sup>18</sup>Bu<sub>4</sub>NF:tä (tetrabutyyliammoniumfluoridihydridi) tai Me<sub>4</sub>NOAc:tä (tetrametyyliammoniumasetaatti), mutta molemmat pudottivat reaktionopeuden n. puoleen DMAP:iin verrattuna.<sup>120</sup> Vahvistaakseen kineettisten kokeiden esittämää todistusaineistoa, tutkimusess tarkasteltiin reaktiota myös DFT-laskennan kautta. B3LYP/6-311+G-(d,p)//B3LYP/6-31G(d)<sup>117,126</sup> funktionaalinen- ja hybridipohjalajitelma olivat

käytetyt metodit ja niiden lisäksi liuotindispersiokorjaukset asetonitriilille olivat käytössä, sillä tätä laskennallista menetelmää on käytetty myös aikaisemmin asetylisaatioreaktioihin DMAP:in katalysoimana.<sup>117,120,126</sup>



Kaavio 37. A) Katalyyttisen kompetenssin vahvistamiseen Crimminin ryhmän tehdyt stoikiometriset reaktiot ja B) Fluoridmetateesin ehdotettu mekanismi.<sup>120</sup>

Laskennat osoittivat reaktion olevan eksergooninen ( $\Delta G = -5,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ ). Crimminin ryhmä laski kahden leikkaavan syklin avainvaiheet ja tästä he määrittivät, että molemmat siirtymätilat menevät joko yhtäaikaisen  $S_NAr$ -mekanismin mukaisesti tai vaihtoehtoisesti yhtäaikaisen

nukleofiilisen additio–eliminaatio-mekanismin mukaisesti. Tutkimusryhmä laski, että reaktio tapahtuu myös helposti näissä olosuhteissa ja täten reaktion energiavallit pentafluoropyridiinille (**TS-1**,  $\Delta G^\ddagger = 18,0 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) ja etikkahappoanhydridille (**TS-2**,  $\Delta G^\ddagger = 14,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ ) ovat matalat samalla kuin laskettiin, että DMAP on herkempi nukleofiilisille hyökkäyksille  $F^-$  - ja  $OAc^-$  ionien toimesta alkuperäisten reagenssien sijaan.<sup>120</sup> Siirtymätilojen energioiden laskuista Crimminin ryhmä ennusti, että reaktion nopeuden määräävä vaihe liittyisi **TS3**:seen sekä vapautetun fluoridi-ionin nukleofiiliseen hyökkäykseen **IM2**:seen. Kuitenkin tutkimus huomatti, että tähän päätelmään pitää suhtautua varovasti mallinnuksen monimutkaisuuden takia vaikkakin kyseinen päätelmä olisi yhtenevä empiiristen tutkimusten ja kineettisen datan kanssa.<sup>120</sup>

Tämä tutkimus on hyvin kineettisesti perustelu toisen kertaluvun väitteelle. Aluksi ryhmä määrittä katalyytin kertalukua neljällä eri katalyytin konsentraatiolla ja muodostaen reaktionalkunopeuksista log-log kuvaajat. Kuten edellä todettiin, log-log kuvaajat tuovat mukanaan mahdollisuuden virheisiin ja täten menetelmää ei tulisi käyttää katalyytin kertalukuja tutkittaessa *ainoana* menetelmänä. Crimminin ryhmä ei pelkästään tyytynyt log-log kuvaajiin vaan he myös varmistivat katalyytin toisen kertaluvun VTNA:lla, mistä saatu tulos vastasi alkunopeuksista saatuja tuloksia. Harmillisesti tosin tutkimuksessa ei selvitetty tapahtuuko katalyytille inhibiitiota, mikä voisi olla toinen mahdollinen selitys havaitulle toisen kertaluvun riippuvuudelle. Nämä inhibiitiokokeet olisi helposti voitu tehdä myös VTNA:n avulla. Mahdollisen inhibiition tutkiminen pitäisi tehdä ennen kuin kertaluvun määrittäystä voi miettiä VTNA:lla, koska VTNA:n kertaluvun määrittäminen perustuu ajatukseen, että katalyytin konsentraatio ei reaktiossa muutu ja tämä ei inhibiition tapahtuessa pidä paikkaansa. Mekanismita tutkittiin myös laskennallisesti ja myös nämä tulokset tukivat kineettistä tutkimusta entisestään. Täten voidaan pitää täysin mahdollisena, että katalyytin toisen kertaluvun oletus pitäne paikkansa muiden vaihtoehtoisten todisteiden puuttuessa. Lisäpohjaa väitteelle voitaisiin saada, jos mekanismissa esitetyt välituotteet pystyttäisiin eristämään samasta reaktioseoksesta.

Toisin kuten aikaisemmissa tapauksissa, tässä reaktiossa ei tämän mekanismin perusteella pystyttäisi optimoimaan ns. ”vahvistettua toisen kertaluvun” katalyyttiä. Mekanismita vaatii kaksi erillistä reaktiota, joista syntyneet välivaiheet reagoivat sitten keskenään ja katalyytti–substraatti-komplekseista muodostuvat halutut tuotteet. Katalyytille tehtävät jatko-optimoinnit täytyisi siis keskittää ajatukseen, että katalyytti toimii kahdessa reaktiossa yhtäaikaaisesti. Ajatuksena tämä on tietenkin mielenkiintoinen, sillä oikeasti toisen kertaluvun katalyytit ovat

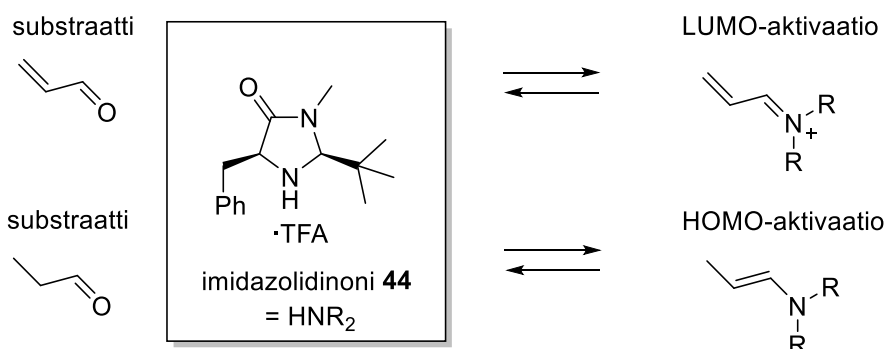
hyvin harvinaisia. Mekanistisesti olisi myös mahdollista tutkia reaktiota kineettisten isotooppiefektikokeiden avulla, jos mekanismissa esiintyvä fluori tai protoni saataisiin leimattua isotoopin avulla.

### 5.1.8. MacMillanin ryhmän kaskadikatalyysi

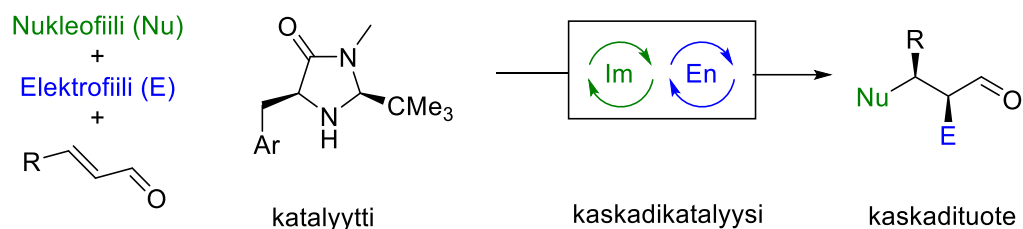
MacMillanin ryhmä<sup>18</sup> totesi, että biologisissa systeemeissä ja luonnossa reaktiot etenevät perättäisesti usean reaktion sykleissä, ilman, että välivaiheita eristetään välillä. Tästä inspiroituneena ryhmän ajatuksena oli ottaa myös katalyysikemiassa käyttöön ns. kokoonpanolinjastot, joiden oleellisena ominaisuutena on samassa reaktioseoksessa yhtäaikaaisesti toimivat olevat entsyymit.<sup>18</sup> Tämä edellyttää, että entsyymit eivät inhiboi toistensa reaktioita eivätkä myöskään muuten tuo reaktioon ei haluttuja tapahtumia, joista esimerkkeinä MacMillanin ryhmä käytti katalyytti–katalyytti-interaktioita, ligandin vaihdoksia tai redox–tapahtumia. Kun tätä periaatetta sovelletaan sitten synteettisiin katalyysireaktioihin, voidaan puhua kaskadi-, viesti- tai sekvivenssikatalyyseistä.<sup>4,12,18</sup> Ajatuksena on siis, että ensimmäisen katalyysireaktion tuote tai välituote katalysoidaan toisella katalyytillä heti ja näin toinen katalyysireaktio tapahtuu sarjassa ensimmäisen kanssa. Pääasiallisena erona näille kolmelle käytetylle termille on se, milloin tämä toinen katalyysireaktio lähtee tapahtumaan ja vaatiiko se katalyytin lisäystä vasta ensimmäisen reaktion loputtua.

Kaskadikatalyyysin ideana on, että molemmat katalyytit ovat reaktioseoksessa jo valmiiksi ja kun ensimmäinen sykli on valmis, toinen katalyysireaktio lähtee välittömästi etenemään. Tästä esimerkkinä onkin MacMillanin tutkimuksen imidatsolidinonien katalysoima reaktio, jossa katalyytti ensin aktivoi substraattia iminiumionina ja sen jälkeen toisessa syklissä sama katalyytti muodostaakin enamiininin. Pohjana reaktiolle on se, että iminium-ionina katalyytti laskee LUMO:n energiaa, kun taas enamiinina katalyytti nostaa HOMO:n energiaa, eli iminiumioini reagoi nukleofiilien ja enamiini taas elektrofiilien kanssa. MacMillanin tutkimusryhmän käyttämä katalyytti ja idea on havainnollistettu kaaviossa 38.<sup>18</sup> Kaaviossa 39 on esitettyä tutkimusryhmän esittämä suunnitelma reaktion mekanismille.

A



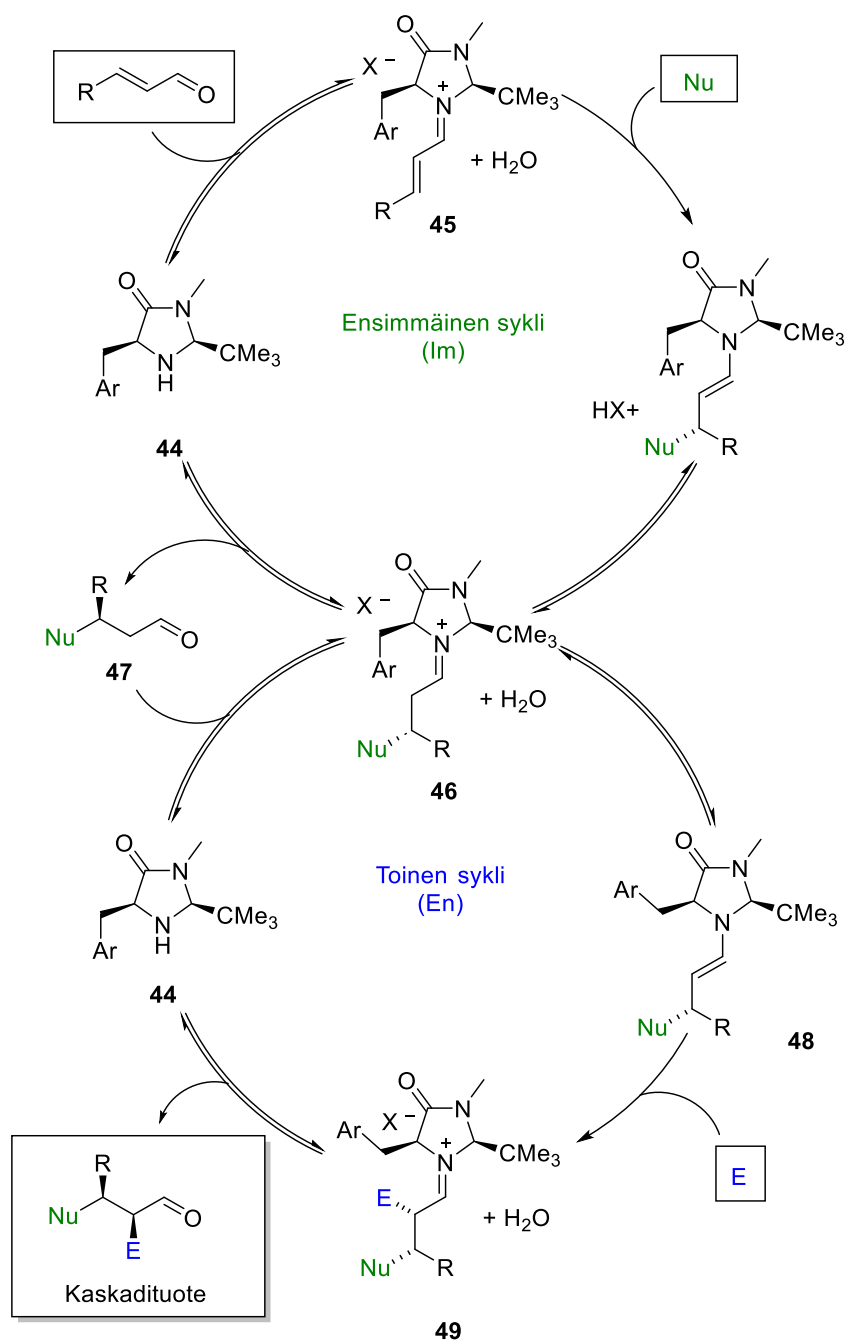
B



Kaavio 38. MacMillanin ryhmän havainnollistus Kaskadikatalyysille. A) Imidatsolidonit ja niiden katalyyttiset ominaisuudet ja B) Kaskadikatalyyssi: ominaisuuksien yhdistäminen.<sup>18</sup>

MacMillanin ryhmän aikaisemmat tutkimukset osoittivat, että katalyytin **44** reaktio  $\alpha,\beta$ -tydyttymättömien aldehydien kanssa tuottaa aktivoitua iminiumioinia **45**, mikä enantioselektiivisesti reagoi yleisten  $\pi$ - tai hydrido-nukleofiilien (Nu) kanssa tuottaen iminiumin **46**, josta muodostuisi konjugaattiadditio tuote **47** regeneroiden katalyytin **44**. **47** voi sitten reagoida uudelleen katalyytin kanssa muodostaen **46** ja nopean hydrolyysin seurauksena, reaktioon muodostuisi enamiini **48**. Tämä aktivoitu enamiini mahdollistaisi hyvin diastereoselektiivisen addition elektrofiilien suhteen (E).<sup>18</sup> Pääasiallisena tavoitteena prosessille oli, että enamiinin additiovaihe olisi katalyytin hallitsema sen sijaan, että sen stereoselektiivisyys substraatin puolesta määräytyisi. Tällöin se mahdollistaisi halutun diastereoselektiivisyyden kokonaisuudelle välittämättä siitä millainen stereokemia on ensimmäisen katalyyttisen kierron tuloksena.<sup>18</sup> Vaikka suunnitelmana oli koko prosessin toteuttaminen yhdellä katalyytillä, kuten **44** kohdalla näin kävisi, oli suunnitelmissa myös mahdollista hallita reaktion stereokemiaa käyttämällä eri katalyyttejä molempiin sykleihin.





Kaavio 39. MacMillanin artikkelin esittämä mekanismi Kaskadikatalyyysille **44**:sta toimiessa katalyyttinä.<sup>18</sup>

Tällä tavoin saataisiin reaktioon modulaarinen hallinta enantio -ja diastereoinduktion osalta (esim. *R* vs *S*, *syn* vs. *anti*).<sup>18</sup> Kuitenkin suunnitellusta mekanismista voidaan nähdä, että kumpaankaan sykliin katalyytti ei osallistu moninkertaisella ekvivalentilla ja näin voi päätellä, että katalyytin suhteen reaktiot ovat ensimmäistä kertalukua. Tietenkin täyden

varmuuden saamiseksi, olisi olennaista tehdä kineettiset kokeet katalyytin kertaluvun tarkistamiseksi, koska niillä myös voisi varmistaa, että mekanismi vastaa kaaviossa esitettyä.

MacMillanin ryhmän reaktio on esimerkkinä tilanteesta, jossa reaktio on identtisten katalyyttien kaksoiskatalyysireaktio kokonaisuudessaan, mutta ei kuitenkaan toista kertalukua. Tämä johtuu siitä, että kaskadireaktion eri katalyytinkierrot ovat kineettisesti eri reaktioita ja täten vaikkakin kokonaisuudessa katalyytti osallistuu reaktioon kahden ekvivivalentin verran, se ei sitä tee yksittäisissä reaktioissa. Tästä johtuen ei ole edes järkevää esittää esimerkiksi tarkempia todistusaineistoa.

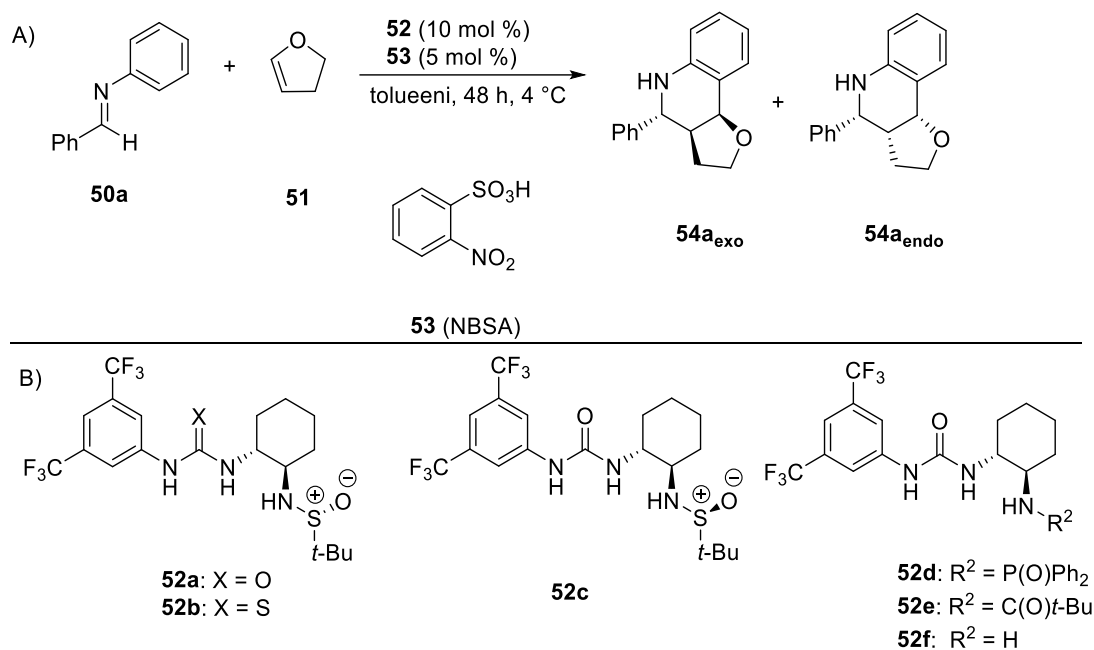
## 5.2. Kaksoiskatalyysi

Tämän kaltaiset kaksoiskatalyysireaktiot ovat tapauksia, missä reaktiossa on kaksi eri katalyyttiä. Täten toisen kertaluvun oletus katalyytin suhteen ei voi pitää paikkaansa. Tämän tyyppisiä reaktioita on useita ja täten esimerkeiksi valikoitu vain muutamat ehkä silmiinpistävimät reaktiot samalla, kun ne edustavat luvussa 2. esiteltyjä kirjallisuuden luokitteluja. Kuitenkin kaksoiskatalyysireaktioilla voi olla erinäisiä ominaisuuksia ja mahdollisuuksia, mitä ei kaksoiskatalyysillä voida tuoda esiin. Näitä myös esitellään tässä luvussa.

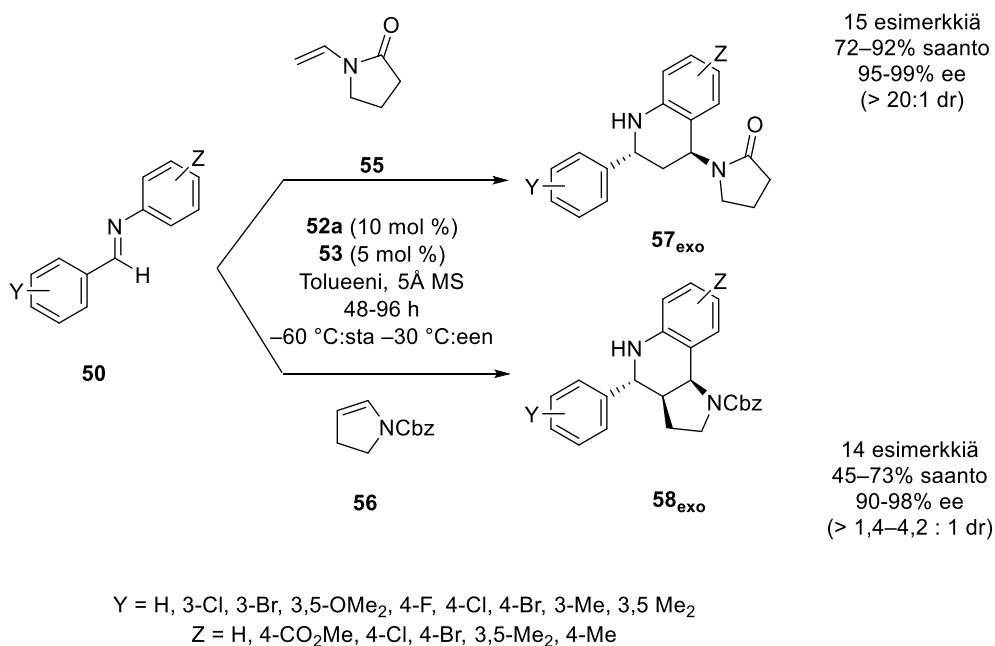
### 5.2.1. Jacobsenin ryhmän Povarov -reaktio

Kun puhutaan kaksoisaktivoidusta kaksoiskatalyyttisysteemistä, tarkoitetaan siis reaktiota, jossa ensin yksi katalyytti aktivoi substraatin ja sitten toinen katalyytti aktivoi tämän aktivoidun dimeerisen kompleksin, jonka jälkeen tämä trimeerinen kompleksi reagoi halutun reagenssin kanssa.<sup>4,12</sup> Tästä esimerkkinä voidaan pitää Jacobsenin ryhmän<sup>127</sup> kiraalisten ureoiden ja Brønsted hapon yhteistyötä Povarov-reaktion pohjana. Povarov-reaktio tunnetaan myös [4+2] sykloadditiona *N*-aryyli imiinien ja elektronirikkaiden olefiinien välillä. Jacobsenin ryhmän tutkimuksessa nämä roolit ottivat bentsyyliideenianiliini **50a** ja 2,3-dihydrofuraani **51**. Katalyytteinä heillä oli käytössä bifunktionaaliset ureajohdannaiset **52** sekä *ortho*-nitrobenseenisulfonihappo (NBSA) **53**. Reaktion malli on esitetty kaaviossa 40.<sup>127</sup>

Reaktio itsessään paljastui hyvinkin monimuotoiseksi, sillä Jacobsenin tutkimus laajensi reaktion koskettamaan myös erilaisiin nukleofiileihin ja laajaan kirjoon *N*-aryyli-imiinejä siten, että enantioselektiivisyys ei kärsinyt merkittävästi.<sup>127</sup> Parhaiten reaktio toimi katalyytillä **52a** ja sen 2:1 suhteella NBSA:han **53** kryogeenisissä olosuhteissa. Tästä kirjosta reaktioita on esimerkit kaaviossa 41.



Kaavio 40. A) Jacobsenin ryhmän esittämä reaktioyhtälö ja -olosuhteet Povarov-reaktiolle ja B) Käytetyt kiraaliset tioureakatalyytit.<sup>127</sup>

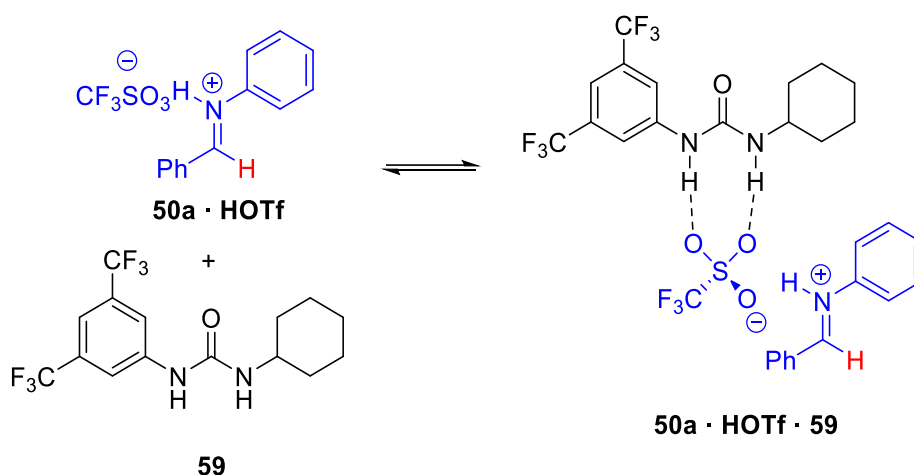


Kaavio 41. Jacobsenin ryhmän reaktion laajuus kahdella eri nukleofiilillä (**55** ja **56**) ja useilla eri *N*-aryyli-imiineillä **20**.<sup>127</sup>

Mekanismin selvittämiseksi Jacobsenin tutkimus käytti laskennallisia malleja sekä mekanistisia kokeita. Helpottaakseen mekanismin tulkintaa **52a**:n kanssa käytettiin trifluorometaanisulfonihappoa (HOTf, HO<sub>3</sub>SCF<sub>3</sub>), koska enantioselektiivisyys reaktiolle oli samankaltainen NBSA:n kanssa. Tutkimuksissa nukleofiilinä toimi **51** ja imiininä **50a**. <sup>1</sup>H NMR-spektroskopia ja reaktiokalorimetria olivat ensimmäisinä työkaluina ja sen lisäksi tehtiin kineettisiä kokeita 28 °C lämpötilassa. Nämä kineettiset kokeet paljastivat reaktion olevan [**51**] ja [**HOTf**] suhteen ensimmäistä kertalukua ja imiinin [**50a**] suhteen nollatta kertalukua. Tästä muodostettiin yhtälö 48.<sup>127</sup>

$$v = \frac{d[\mathbf{54}]}{dt} = k_{rac}[\mathbf{50a}]^0[\mathbf{51}]^1[\mathbf{HOTf}]_{tot}^1 \quad 48$$

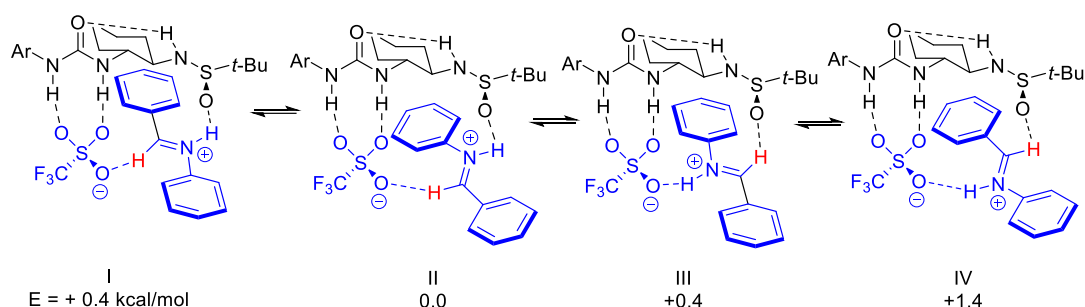
Johtopäätöksenä kokeista on se, että reaktiossa imiini **50a** protonoituu kvantitatiivisesti HOTf:n ansiosta, ja tästä muodostuva kompleksi **50a·HOTf** on katalyyttisen syklin lähtötilanne akiraaliselle happokatalyysille reaktio-olosuhteissa. *k<sub>rac</sub>* on toisen kertaluvun reaktionopeusvakio ei-enantioselektiiviselle sykloadditiolle kompleksin **50a·HOTf** ja **51** välillä. Jacobsenin ryhmä onnistuivat kvantitatiivisesti muodostamaan **50a·HOTf** kompleksin kosteusherkkänä suolana, joka oli myös heikosti liukoinen poolittoimiin liuottimiin. Kun suolon joukkoon lisättiin ei-kiraalinen urea **59**, liukoisuus nelinkertaistui, mikä pääteltiin johtuvan uuden kompleksin muodostumisesta (kaavio 42).<sup>127</sup>



Kaavio 42. Jacobsenin ryhmän protioiminiumtriflaattisuolan kompleksi **50a·HOTf** ja akiraalisen urean **59** kanssa muodostuva kompleksi **50a·HOTf·59**.<sup>127</sup>

Reaktiota seurattiin <sup>1</sup>H NMR-spektroskopiolla, ja formyyliprotoni (kaavio 42, punainen protoni) on herkkä iminium-ionin varauksen eron muutoksille. Katalyytin ja substraatin välisen kompleksin muodostumista pystyttiin seuraamaan kemiallisen siirtymän muuttumisen avulla.

Tämä johtuu vetysitoutumisesta **59** ja triflaattianionin välillä, mikä myös takaa liukoisuuden kasvun. Kun urea vaihdettiin sulfinamidoureaan **52a**, tämä liukoisuus kasvoi entisestään, ja kemiallinen siirtymä NMR spektrissä muuttui ennustetusti, kun iminium-ionin varauksen ero oli pienempi kuin **59** kanssa. **50a**·HOTf kompleksin kemiallinen siirtymä mitattiin 7.99 ppm formyyliprotonin kohdalta ja akiraalisen urean **59** kanssa  $^1\text{H-NMR}$  resonanssi siirtyi 0.14 ppm:ää yläkentälle (7.85 ppm) ja kun **59** vaihdettiin **52**:een siirtymä formyyliprotonilla oli 0,92 ppm alalentälle (8.91 ppm).<sup>127</sup> Laskennalliset analyysit **50a**·HOTf·**59** kompleksille vastasivat Jacobsenin ryhmän ajatuksia, ja näin he muodostivat neljä energieettisesti hyvin samankaltaista geometriaa kompleksille (kaavio 43).<sup>127</sup>



Kaavio 43. Jacobsenin tutkimuksen geometrinen tulkinta ja energia minimoidut rakenteet **50a**·HOTf·**52a**:lle, mitkä on laskettu käyttäen B3LYP/6-31G(d) DFT-tasoa. Ar = 3,5-(CF<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>.<sup>127</sup>

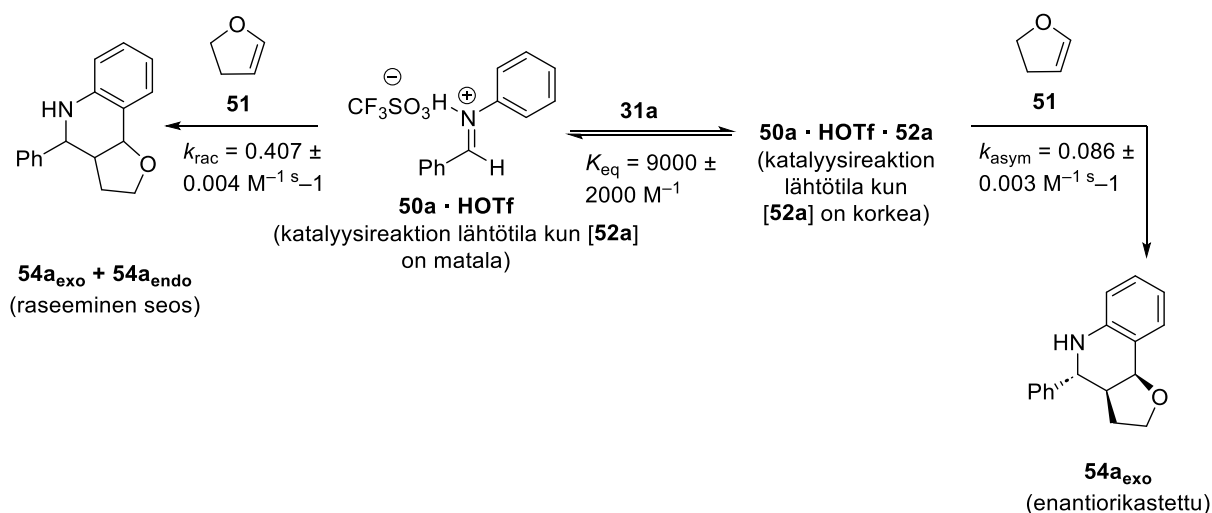
Havaitut stabilisaatioefektit katalyytin sulfamidiryhmän ja iminiumionin formyyliprotonin kohdalla näyttäytyivät tutkimuksessa Povarovin-reaktion nopeuden muutoksella. Kineettiset analyysit **50a**:n ja **51** reaktiolle HOTf:n ja **52a**:n kokatalysoimana osoittivat, että **52a**:n konsentraation kasvu aiheuttaa merkittävän reaktionopeuden laskun (viite 127, kuva 3D). Vastaavasti **59** nopeutti reaktiota hieman ureakatalyytin konsentraatioon kasvaessa. Kun reaktionopeuden yhtälöön lisätään **52a**:n termi, tulee yhtälöstä kahden termin nopeusyhtälö (yhtälö 49).<sup>127</sup>

$$v = \frac{d[\mathbf{54}]}{dt} = k_{rac}[\mathbf{50a} \cdot \text{HOTf}][\mathbf{51}] + k_{asym}[\mathbf{50a} \cdot \text{HOTf} \cdot \mathbf{52a}] \quad 49$$

jossa  $k_{asym}$  on toisen kertaluvun nopeusvakio enantioselektiiviselle sykloadditiolle **50a**·HOTf·**59** ja **51** välillä.<sup>127</sup>

Kineettiset kokeet pohjautuivat lähtönopeuksien tulkintaan reaktiossa **52a**:n konsentraatioiden suhteen kolmessa eri HOTf:n konsentraatiossa (0.8 mM, 2.0 mM ja 4.0 mM). **50a**:n konsentraatiot olivat joko 0.2 M tai 0.4 M, ja **51** konsentraatio oli 1.6M. Jacobsenin ryhmä havaitsi protoiminiumtriflaatin **50a**·HOTf ja **52a**:n välillä voimakkaan sitoutumisen, mikä

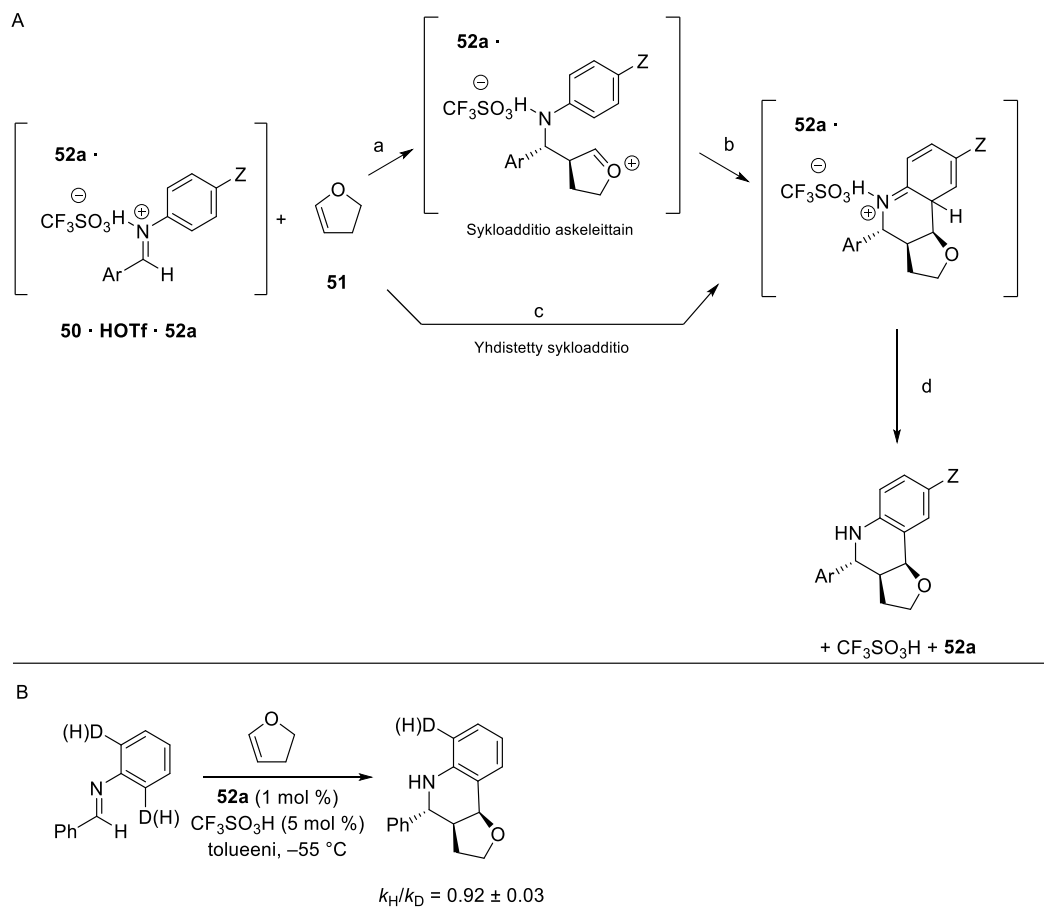
heidän näkemyksessään selittää reaktion korkean enantioselektiivisyyden **54a<sub>exo</sub>**:n muodostumiselle, vaikka HOTf:n katalysoima raseeminen reaktiopolkku (kaavio 44) on moninkertaisesti nopeampi. Heidän mukaansa tasapaino vakio on tarpeeksi korkea, jotta vapaita iminium-ioneja ei pääse muodostumaan ja tämän takia reaktio kulkeutuu asymmetriseen suuntaan. Tätä selektiivisyyttä voidaan vielä parantaa merkittävästi, kun reaktio tehdään matalassa lämpötilassa (–55 °C).<sup>127</sup>



Kaavio 44. Jacobsenin ryhmän kineettisten parametrien kaavio Povarovin reaktiossa raseemiselle ja enantioselektiiviselle vaihtoehdolle, kun **50a** ja **51** on kokatalysoitu **52a**:n ja HOTf:n avulla.<sup>127</sup>

Kun dihydrofuraanin **51** additiota **50a·HOTf·52a** -kompleksiin lähdettiin selvittämään, havaittiin että reaktion vaiheista (a – d, kaavio 45A) mikä tahansa voisi olla reaktionnopeuden määräävä ja enantioselektiivisyyden määräävä vaihe. Jacobsenin ryhmä ei myöskään havainneet primääristä kineettistä isotooppiefektiä, kun **50**:n aniliiniryhmän *ortho*-aseman protonit olivat vaihdettu deuteriumiksi (kaavio 45B). Tämä kertoi, että uudelleen aromatisoituminen (vaihe d, kaavio 45A), on kineettisesti nopea.<sup>127</sup> Reaktiosta tehtiin myös Hammett kuuvaja ja sen positiivinen korrelaatio saatiin tutkimalla anilinosubstituenttien vaikutusta reaktion nopeuteen, mikä kertoi että joko reaktion ensimmäinen vaihe a tai vaihtoehtoinen yhdistetty sykloadditio c olisivat reaktion nopeuden määräviä vaiheita. Tämä näkemys on kuitenkin ristiriidassa ajatuksen kanssa, että vaiheen b syklistaatio olisi hidas.<sup>127</sup> Laskennallisesti reaktioa tutkittiin B3LYP/6-31G(d)-tason avulla tai pistemmäisesti M05-2X/6-31+G(d,p) -tai MP2/6-31G(d) metelmällä. Laskennallisesti tutkimus näyttäisi matalimman energian polun sisältävän verrannollisesti nopean deprotonaation/uudelleen aromatisoitumisvaiheen endotermisen sykloaddition ohella, mikä on yhteisymmärryksessä

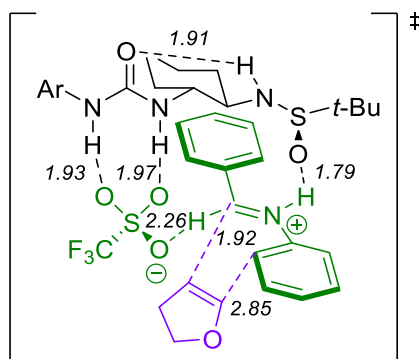
kineettisen isotooppiefektidatan kanssa. Laskenallinen tulos ehdotti kuvan 16 geometrian olevan alhaisin energialtaan ja vaihtoehtoiset geometriat (viite 127, kuva 4) olivat energioiltaan epäsuotuisia (1,3 kcal mol<sup>-1</sup> suurempi energia B3LYP/6-31G(d)-tasolla ja 3,6 – 3,9 kcal mol<sup>-1</sup> suurempi energia pistemmäisesti M05-2X/6-31+G(d,p) -ja MP2/6-31G(d) menetelmillä), mikä ehdottaisi reaktionopeuden määrääväksi vaiheeksi osittaista uudelleen hybridisaatiota aniiliniiryhmän *orto*-hiilen kohdalla. Tämä seikka kertoi vaiheen c:n yhdistetyn [4+2] sykloaddition olevan reaktion polku.<sup>127</sup>



Kaavio 45. A) Jacobsenin ryhmän esitys Povarovin reaktion mekanismille sekä mahdolliset reaktionopeuden määräävät vaiheet, Z = EWG tai EDG. B) Kineettisen isotooppiefektin koe kyseiselle reaktiolle.<sup>127</sup>

Jacobsenin tutkimuksen mukaan, kun geometrioita (kuva 16) tarkastelee, voi huomata, että katalyyttiin sitoutuneessa iminiumionissa toinen puoli on suojattu ja toinen taas avoimena reaktiolle. Tämän takia on odotettavaa, että reaktio-olosuhteissa, kaikki neljä kaavion 43 geometriaa voisivat mahdollistaa reaktion. Kuitenkin laskennallisesti Jacobsenin ryhmä totesi kompleksin I (kaavio 43) olevan suosituin vaihtoehto enantioselektiivisyyden kannalta johtaan kokeellisesti havaittuun **54a<sub>exo</sub>** tuotteeseen. Kompleksien II – IV osalta, ennustettiin

vaihtoehtoisten siirtymätilojen energioiden laskennallisesti olevan  $\geq 1.3$ -kcal mol<sup>-1</sup> kuin matalimman energian sykloaddition siirtymätilan energian. Tämä matalimman energian sykloaddition siirtymätilan vetysidokset ovat tutkimuksen mukaan muodoltaan iminiumin N–H $\cdots$ O<sub>sulfonamidi</sub> ja formyylin C–H $\cdots$ O<sub>sulfonaatti</sub> (kuva 16), mikä vastaisi kokeellista dataa.<sup>127</sup> Tämän lisäksi enantioselektiivisyyttä Jacobsenin ryhmän mukaan voidaan myös selittää  $\pi$ – $\pi$ -interaktioiden kohdalla katalyytin (CF<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N osuuden ja kationisen aniliiniosan välillä, mikä on mahdollista vain niissä siirtymätiloissa, jotka johtavat **54a<sub>exo</sub>** tuotteeseen.<sup>127</sup>

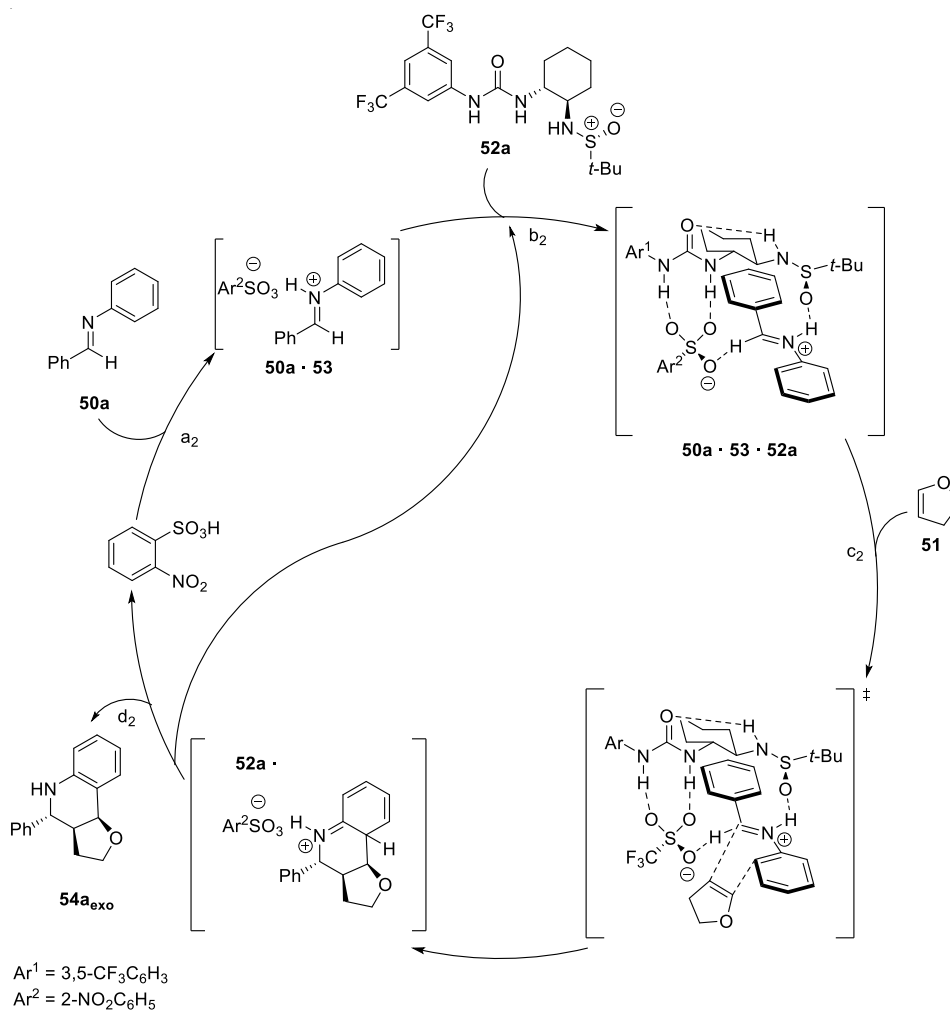


Kuva 16. Jacobsenin ryhmän geometrisesti ja energettisesti minimoitu, energialtaan matalin siirtymätila sykloadditiolle, mikä on laskettu B3LYP/6-31G(d) DFT tasolla. Sidospituudet ovat Ångstromeina. Ar = 3,5-(CF<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>.<sup>127</sup>

MacMillan ja Allen<sup>4</sup> kuvailivat luokituksissaan Jacobsenin ryhmän reaktiota kaksoisaktivoiduksi katalyysiksi (double-activated catalysis), kun taas Patil *et al.*<sup>12</sup> käsittelivät reaktiota yhteistyökatalyysinä. Jacobsenin ryhmä itse nimesivät reaktion myös yhteistyökatalyytiksi.<sup>127</sup> Kuitenkaan näille termeille esitettyjä katalyytinkiertoja ei artikkeleissa esitetty laisinkaan, mutta se omalta osaltaan voisi täydentää mekanismia (kaavio 45A). Kaaviossa 46 on esitetty hahmotelma kyseisestä mahdollisesta katalyysikierrosta Jacobsenin ryhmän reaktiolle, kun katalyytteinä toimivat **52a** ja **53**, sekä lähtöaineina ovat **50a** ja **51**.

Tämän katalyytin kierron pohjalta ajateltuna, tämä Povarov -reaktio vastaisi siis Burésin *et al.*<sup>1</sup> esittämää mekanismia, missä dimeerinen kompleksi aktivoituu toisen katalyyttimolekyylin toimesta trimeeriksi (kaavio 3E). Kuitenkin eriävänä seikkana on se, että katalyytit ovat eri yhdisteitä ja täten katalyytit eivät voi olla tämän mekanismin näkemyksen perusteella toista kertalukua.

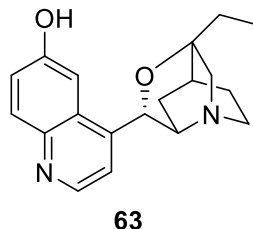
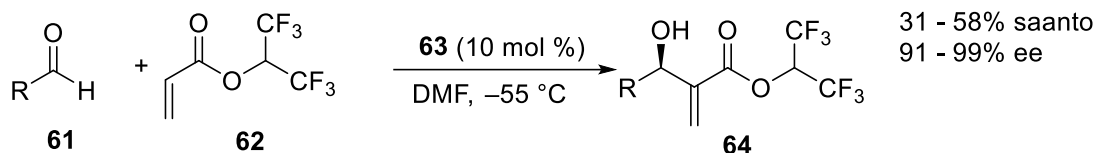




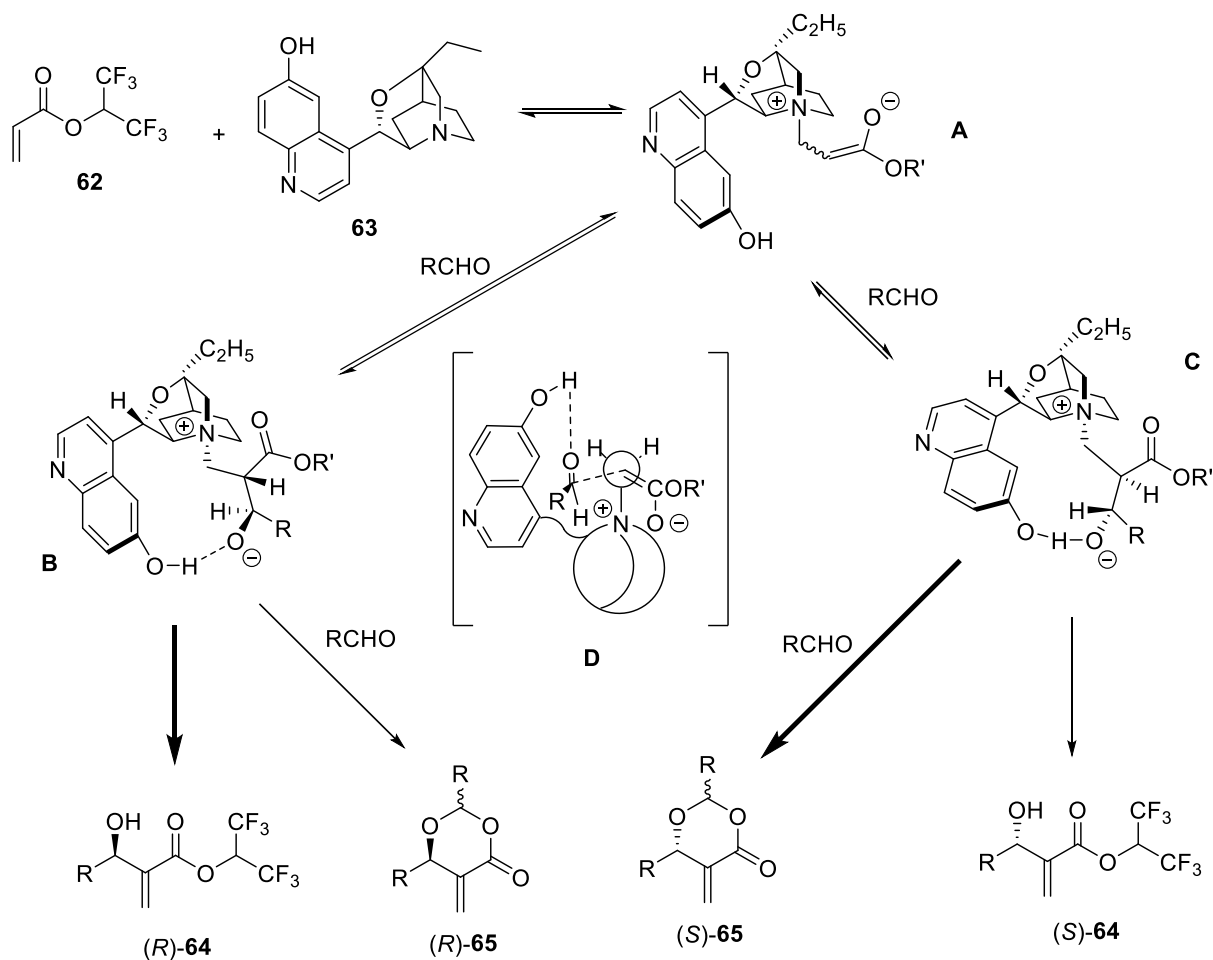
Kaavio 46. Katalyyttien **53** ja **52a** kierto Jacobsenin ryhmän Povarov-reaktiossa imiinin **50a** ja 3,5-dihydrofuraanin **51** välillä.  $a_2$  = Ensimmäinen katalyyssi,  $b_2$  = Toinen katalyyssi,  $c_2$  = sykloadditio,  $d_2$  = uudelleen aromatisoituminen.

### 5.2.2. Hatakeyman ryhmän Morrita-Baylis-Hillman reaktio

Kaksoiskokatalyyysin toisena analysoitavana tapauksena on Hatakeyman ryhmän<sup>128</sup> (Morrita)-Baylis-Hillman reaktio, jossa *iso*-kupreidiini **63** katalysoi reaktiota aldehydien **61** ja akrylaattin **62** välillä. Katalyytin toiminta perustuu happokatalyyysin ja nukleofiilikatalyyysin yhteistyöhön<sup>128,129</sup>. Hatakeyman ryhmän tutkima reaktio (kaavio 47) ja sen mekanismi (kaavio 48) on esitettyä seuraavaksi:



Kaavio 47. *Iso*-kupreidiiniin **63** katalysoimaa Baylis-Hillman reaktio.<sup>128</sup>



Kaavio 48. Hatakeyaman ryhmän esittämä mekanismi reaktiolle (kaavio 47).<sup>128</sup>

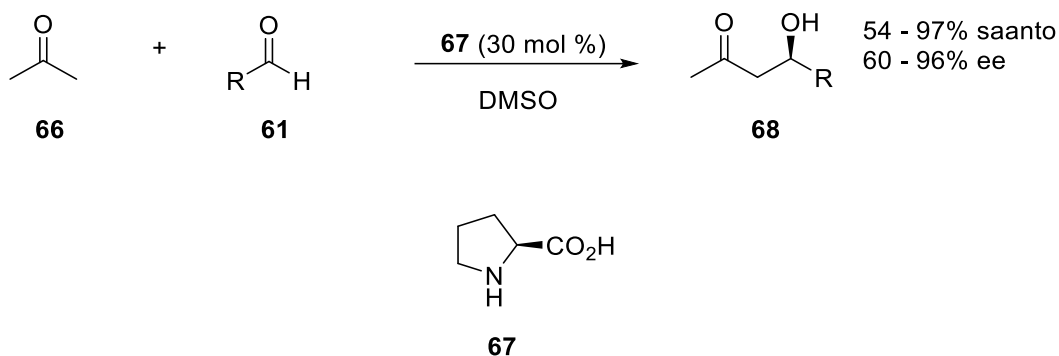
Hakateyama tutkimus esittää, että katalyytti reagoi ensin akrylaatin kanssa muodostaen enolaatin **A** ja tämä enolaatti reagoi aldehydin kanssa muodostaen kaksi betaiinisiirtymätilaa **B** ja **C**. Näitä siirtymätiloja stabiloivat vetysidokset, jotka muodostavat alkoksidi-ionin ja fenolin OH-ryhmän välille. Tämä luo melkein identtiset konformaatiot seuraavalle reaktiolle, jotka

toimivat joko E2 tai E1cb malilla stereoelektronisista syistä, mikä on näkyvillä Newmanin projektiossa **D**. Kuitenkin **C** siirtymätila kärsii steerisistä vaikutuksista, mikä työntää reaktion tapahtumaan toisen aldehydimolekyylin kanssa muodostaen dioksanonin **65**. Sen sijaan, **B** kykenee eliminaatioreaktioon muodostaen halutun esterin **64** ja regeneroimalla katalyytin. Muita todisteita, kuten kineettisiä kokeita, Hatakeyaman ryhmä ei esitä reaktiomekanismilleen (kaavio 48).<sup>128</sup>

Koska katalyyttejä reaktiossa on vain yksi, voi tästä nousta kysymysmerkkejä miksi systeemiä käsiteltäisiin kaksoiskatalyyttisenä systeeminä. Tämä johtuu siitä, että käytetty katalyytti on bifunktionaalinen ja tietystä näkökulmista tämä on riittävä seikka kaksoiskatalyyttisyydelle.<sup>4,129</sup> Kuitenkin tätä näkökulmaa voidaan pitää hieman hankalana ja paremmin sopivana klassisen katalyyysin alalajiksi. Sen sijaan bifunktionaalisia katalyyttejä voidaan pitää ensimmäisinä askeleina entsyymien suuntaan synteettisten katalyyttien puolesta ja täten omalla tavallaan nämä erikoistapaukset ovat silti mielenkiintoisia ja mahdollisesti tärkeitä vaihtoehtoja uusien katalyyttisten reaktioiden pohjalle. Tavallaan bifunktionaaliset katalyytit voidaan nähdä toisen kertaluvun katalyyttien optimaalisina vastineina, sillä ne tekevät sen mihin toisen kertaluvun esimerkit tarvitsevat kaksi katalyyttiä. Kuten kaksoiskatalyytitapausten yhteydessä esitettiin, on muutamissa tutkimuksissa ollut pyrkimykseenä luoda loppujen lopuksi bifunktionaalinen katalyytti toisen kertaluvun tilannetta hyödyntäen.<sup>87,97,106</sup>

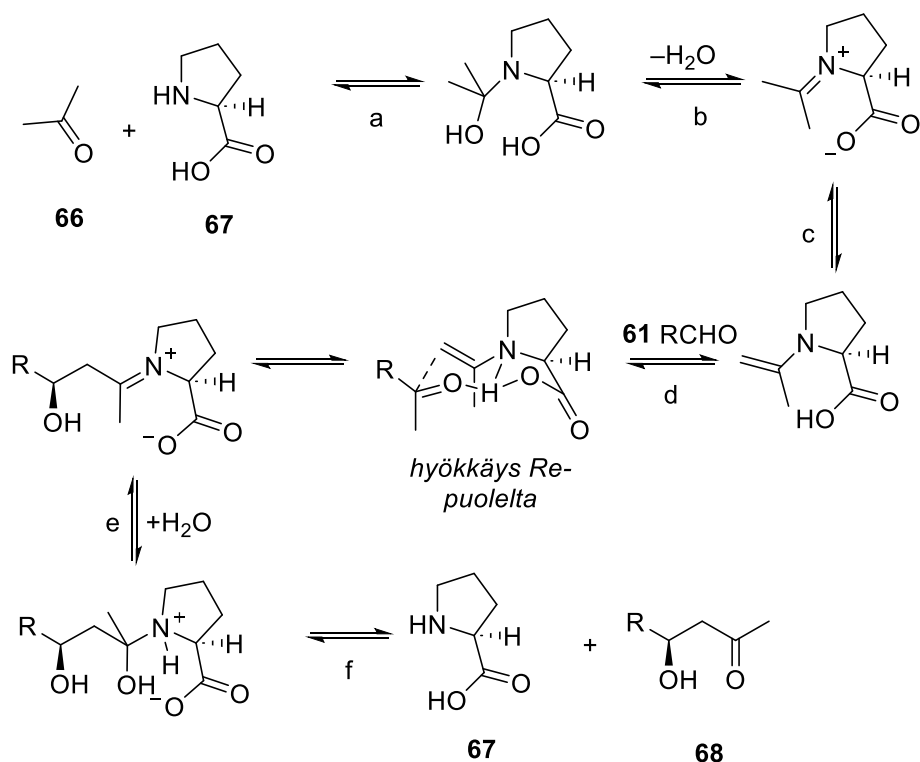
### 5.2.3. Listin ryhmän proliinikatalyyysi

Kuten Hatakeyaman ryhmän reaktion kanssa on Listin *et al.*<sup>130–132</sup> reaktio tapaus bifunktionaalisesta katalyytistä. Tämä katalyytti, proliini **67**, katalysoi asetonin **66** ja aldehydin **61** välistä reaktiota. Toisin kuin Hatakeyaman tutkimusryhmän reaktio, tässä bifunktionaalisuuden katalyytille tuo happokatalyyysin ja enamiinikatalyyysin yhteistyö. Kaaviossa 49 on esitetty kyseinen reaktio ja kaaviossa 50 on esitetty reaktiomekanismi.



Kaavio 49. Listin tutkimuksen reaktio aldehydin **61** ja asetonin **66** välillä proliinin **67** katalysoimana.<sup>130-132</sup>

Listin tutkimus kuvaili reaktiomekanismin tälle aldolireaktiolle olevan enamiini-tyyppiä, jossa proliini toimii ”mikro-aldolaasina” tuoden nukleofiilisen aminoryhmän ja happo/emäs -kokatalyytin karboksylaatin kautta. Tämä kokatalyytti on vaikuttamassa jokaisen mekanismin vaiheeseen tavalla tai toisella ja näin sen läsnäolo on välttämätön.



Kaavio 50. Listin ryhmän esittämä mekanismi reaktiolle (kaavio 49).<sup>130-132</sup>

Aminoryhmä tekee nukleofiilisen hyökkäyksen (a), jonka jälkeen karbinoliamiinivälituotteelle tapahtuu dehydraatio (b). Tämän jälkeen iminium välituote deprotonoituu (c), jonka jälkeen C-

C-sidoksen muodostuminen onnistuu (d). Tämän jälkeen iminium-aldoli välituote hydrolysoituu (e ja f), tuottaen halutun lopputuotteen **68** ja regeneroiden katalyytin **67**.<sup>130–132</sup> Listin ryhmä määrittivät myös, että reaktion enantioselektiivisyys johtuu metallivapaasta Zimmerman-Traxler-tyyppisestä siirtymätilasta, jossa kolmihaarainen vetysidosrakenne mahdollistaa reaktion tapahtuvan vain tältä puolen. Tätä varten Listin tutkimus nojasi Bahmanyarin *et al.*<sup>133,134</sup> laskennallisiin kokeisiin, jotka määrittivät tämän siirtymätilan olevan energieettisesti suosituin vaihtoehto.<sup>130–132</sup> Tämän lisäksi, Listin ryhmä käytti <sup>1</sup>H NMR-spektroskopiaa tutkiakseen välituotteiden muodostumista ja pystyivät havaitsemaan enamiini-välituotteen muodostavan signaalin 5 minuuttia reaktion aloituksesta. Mekanismia myös tutkittiin lineaariefektien kautta, ja näiden perusteella edellä mainitun siirtymätilan olemus vahvistui entisestään.<sup>130–132</sup>

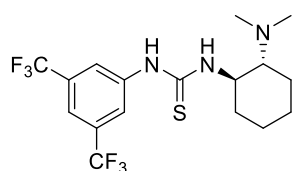
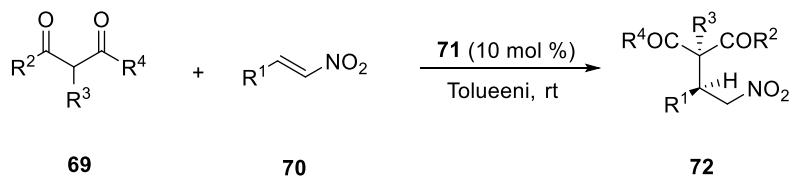
Listin proliinkatalyyysi on toisena esimerkkinä bifunktionaalisesta katalyyysistä kaksoiskaksoiskatalyyysiin liittyen. Eritoten tämä esimerkki on hyvä, sillä bifunktionaaliset katalyytit ovat usein isoja ja monimutkaisia molekyyliä kuten DiRoccon ryhmän<sup>106</sup>, Kiesewetterin ryhmän<sup>96</sup> ja Sugiuran ryhmän<sup>87</sup> tutkimuksessa, mikä poikkeaa Listin tutkimuksen katalyyttistä **67**. Tämä on vihjeenä yleisellä tasolla, että kaksoiskatalyyttiset molekyylit voivat olla yksinkertaisia, mikä voi olla etuna niiden käytöstä esimerkiksi totaalisynteesien parissa. Perustelna on se, että monimutkaisemman yhdisteen valmistaminen ja käyttäminen voi olla esimerkiksi ekonomisesti vaativaa.

#### 5.2.4. Takemoton ryhmän bifunktionaalinen tioureakatalyyysi

Klassisena tapauksena bifunktionaalisille katalyyteille on aminotiourea-katalyytit, kuten Takemoton (tio)ureakatalyytit<sup>129,135,136</sup>. 2003, Okino *et al.*<sup>135,136</sup> raportoivat reaktiossa, jossa he onnistuivat konjugaattiadditiossa malonaatin ja nitroalkanien välillä tioureyhdisteen katalysoimana. Tämä tiourea on sittemmin tunnettu Takemoton ureana tai Takemoton katalyyttinä.<sup>135,136</sup> Tämä reaktio ja Takemoton ryhmän ehdottama mekanismi on esitetty kaaviossa 51. Reaktiomekanismissa malonaatti **69** aktivoidaan katalyytin aminoryhmän avulla saattaen sen enolaattimuotoon deprotonaation johdosta, muodostaen siirtymätilan **E**. Kun reaktioon lisätään nitro-olefiini **70**, se reagoi **E** kanssa muodostaen joko kompleksin **F** tai **G**

vetysitoutumisen takia. Artikkelissa oletettiin reaktion menevän **F**:n kautta kompleksiin **D**, koska **D** stabiloi kahta negatiivista happiatomia ja positiivista typpiä parhaiten ja sen takia, että mahdollinen sykloheksyyli rakenne estää **69** lähestymisen kohti **70** muista suunnista. **D**:n nitronaatti ottaa aminoryhmältä protonin ja näin muodostaen tuotteen **72** ja regeneroi katalyytin **71**.<sup>136</sup>

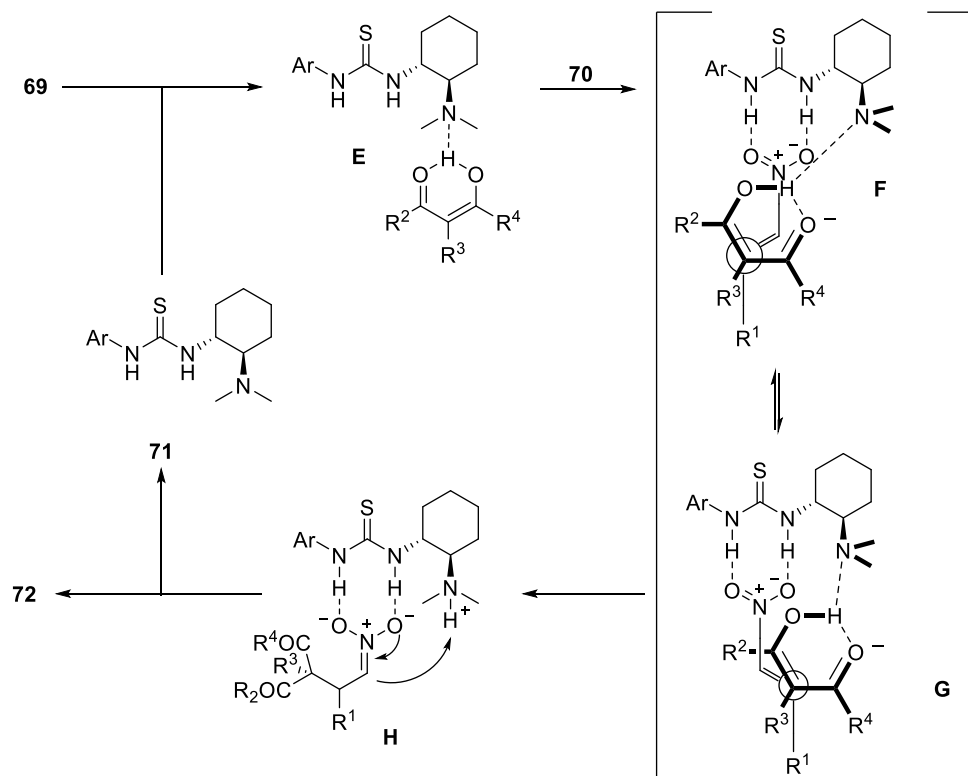
A



71

**72a:** R<sup>2</sup> = R<sup>4</sup> = OEt, R<sup>3</sup> = H, 81–94% ee, 64–96% yield;  
**72b:** R<sup>2</sup> = aryyli tai alkyylim R<sup>4</sup> = OMe tai OEt, 57/43–96/4 dr,  
 81–95% ee, 76–99% yield;  
**72c:** R<sup>2</sup> = R<sup>4</sup> = Me, R<sup>3</sup> = H, R<sup>1</sup> = Ph, 89% ee, 80% yield.

B



Kaavio 51. Takemoton tutkimuksen A) reaktio ja sen olosuhteet ja B) heidän esittämä mekanismi.<sup>135,136</sup>

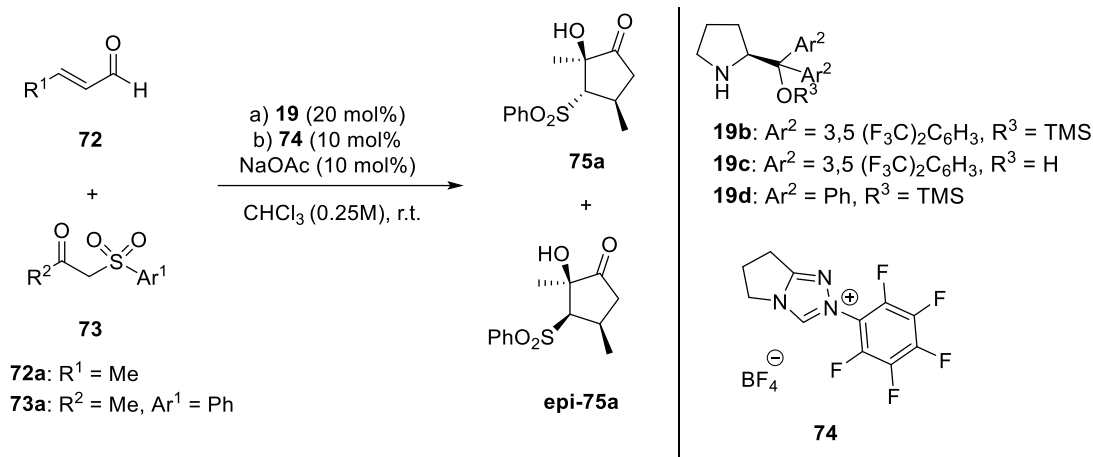
Mekanismia tutkittaessa Takemoton ryhmä käytti  $^1\text{H}$  NMR-spektroskopiaa vetysitoutumisen tutkimiseen ja selvittävät, että katalyytin happamat protonit ovat interaktiossa nitror ryhmän kahden hapen kanssa.<sup>136</sup> Tämän lisäksi Takemoton tutkimus selvitti kineettisin kokein Michael reaktion tapahtumia. Metodina heillä oli RPKA ja käyttämällä suurta ylimäärää **69**:ä, data kertoi reaktion olevan ensimmäistä kertalukua **69** suhteen. Samalla metodilla suoritettiin myös **70** kertaluku, joka sekin oli ensimmäistä kertalukua. Myös katalyytin kertaluku selvitettiin kuvaamalla kineettisen nopeusvakion suhdetta katalyytin alkukonsentraatioon saaden, että katalyytin kertaluku oli myös ensimmäistä kertalukua.<sup>136</sup> Epälineaarisen efektin tarkastelua **71** ja **72** välillä käytettiin myös mekanismin tutkimiseen, ja pääasiassa siihen, että oliko aktiivinen katalyytti kiraalinen vai ei kiraalinen ja koska lineaarinen efekti tuotteen ja katalyytin välillä oli hyvin selkeä, Takemoton ryhmä päätteli, että aktiivinen katalyytti on monomeerinen yksikkö vahvistaen **71** roolin reaktion katalyyttinä.<sup>136</sup>

Takemoton tutkimustyö kuitenkin paljastaa olennaisen seikan bifunktionaalista katalyyteistä, mikä ei sinällään suorasti tullut esiin Hatakeyaman tai Listin tutkimuksista. Kun kyseessä bifunktionaalisisissa katalyysireaktioissa on yksittäinen, mutta monifunktionaalinen katalyyttimolekyylä, on reaktiokinetiikka klassinen katalyysin kaltaista. Takemoton ryhmän kineettiset kokeet paljastavat, katalyytin kertaluvun olevan pääasiallisesti yksi (inhibiitio tietenkin tätä voi muuttaa<sup>1</sup>), mikä on klassiselle katalyysille tyypillistä. Tämä johtuu yksinkertaisesti syystä, että jokaiseen reaktionopeuden määräävään vaiheeseen osallistuu vain yhden ekvivivalentin verran katalyyttimolekyylejä ja tämä vaihe ei ole katalyytin dimerisaatiotyyppinen. Takemoton lineaariefektin kokeet paljastivat, että aktiivinen katalyytti oli monomeeri. Täten, vaikka bifunktionaaliset katalyytit ovat tiettyjen<sup>4</sup> parametrien mukaisesti kahden katalyytin systeemejä, ne eivät ole pääasiallisesti toista kertalukua katalyytin suhteen.

### 5.2.5. Endersin ryhmän ja Jørgenssenin ryhmän sekvivenssikatalyysit

Erona kaskadikatalyysireaktioilla ja sekvivenssikatalyysireaktioilla on se, milloin reaktion toinen sykli käynnistyy. MacMillanin ryhmän kaskadireaktiossa (luku 5.1.8.), toinen sykli käynnistyi välittömästi, koska sama katalyytti oli osallisena molempiin sykleihin. Sen sijaan sekvivenssikatalyysissä, toisen syklin katalyytti lisätään reaktioon myöhemmin ja näin ensimmäisen syklin annetaan viedä reaktionsa niin pitkälle kuin se kykenee. Tästä esimerkkinä on Endersin *et al.*<sup>137</sup> asymmetrinen Michael/ristibentsoini-reaktio, jossa sekundäärinen amiini

ja *N*-heterosyklinen karbeeni katalysoivat syklit järjestyksessä. Tämä reaktio on kuvattuna kaaviossa 52. Endersin ryhmä ei kuitenkaan esittänyt reaktiolle mekanismia, mutta kineettisten kokeiden avulla määrittivät molempien katalyyttien olevan ensimmäistä kertalukua.<sup>137</sup> Tästä Jørgenssenin ryhmä<sup>138</sup> rakensi vastaavan reaktion (kaavio 53A) ja mekanismin reaktion toiselle sekvivenssille eli NHC-katalyysille (kaavio 53B).<sup>138</sup>

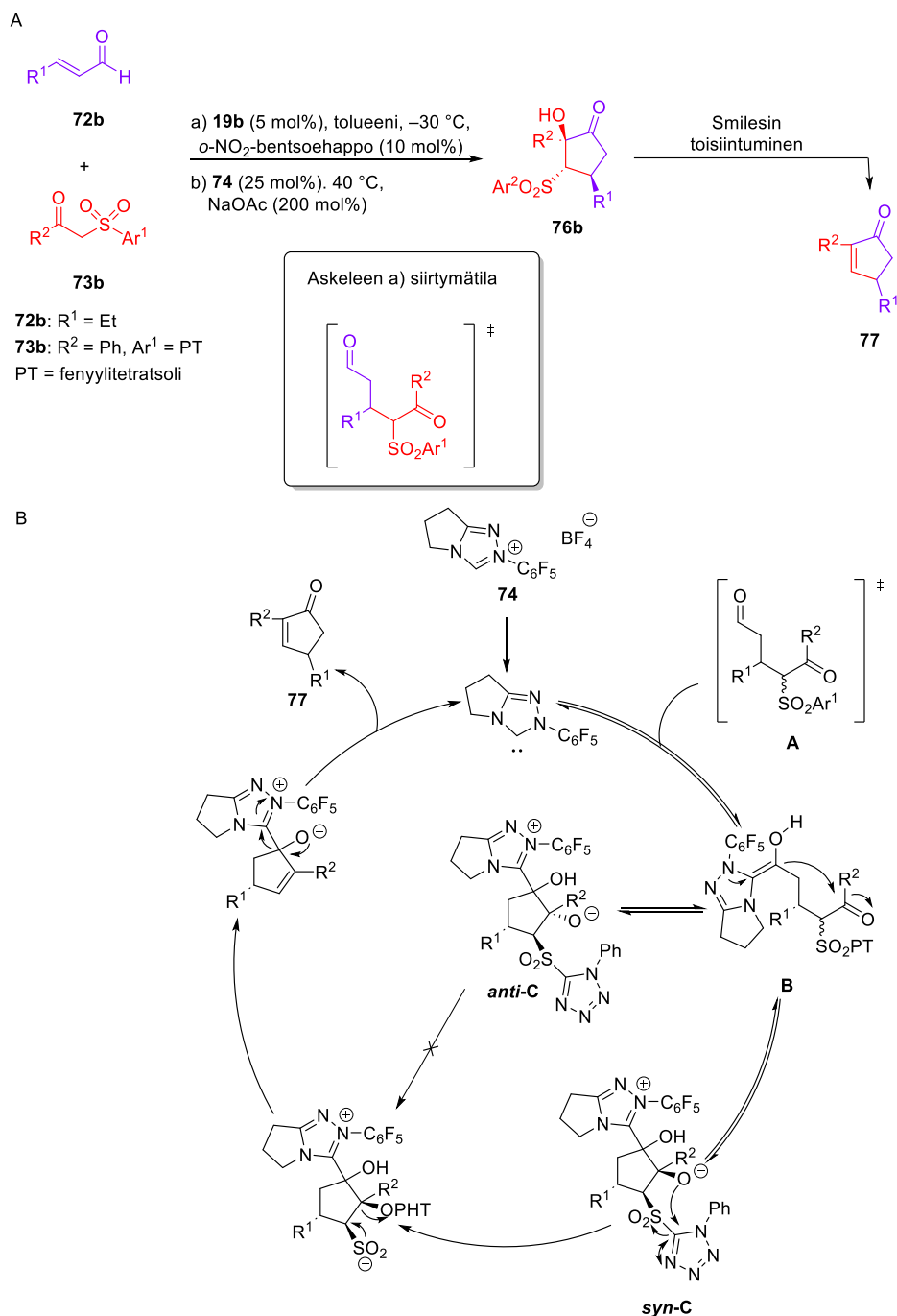


Kaavio 52. Endersin ryhmän Michael/ristibentsoini-sekvivenssireaktio.<sup>137</sup>

Reaktion a) vaiheessa **72b** katalysoituu iminium-ionin **19b** johdosta muodostaen välivaiheen **A**. Tämä välivaihe aktivoituu NHC:sta **74** muodostuneen karbeenin avulla muodostaen Breslowin välivaiheen **B**. Jørgenssenin ryhmän mukaan seuraavan vaiheen intramolekulaarinen hyökkäys aromaattiseen ketoniin on reaktion kannalta olennaisin vaihe, josta muodostuu viisirengasvälivaihe **C**, josta *syn*-asetelman vaihtoehto mahdollistaa Smilesin toisiintuminen.

Jos *anti*-stereokemia muodostuu, funktionaaliset ryhmät ovat liian kaukana toisistaan ja näin reaktio ei etene vaan välivaihe *anti*-**C** palaa takaisin **B**:seksi. Välivaiheen **A** epimeerit muodostuvat Jørgenssenin ryhmän mukaan 1:1 suhteella, koska sulfoniryhmän kantava stereokeskus ajautuu tasapainoon nopeasti ja näin myös välivaiheen **B** voidaan olettaa olevan 1:1 epimeerien seos. Kuitenkin vain toinen näistä on reaktiivinen ja näin tutkimusryhmällä oli oletuksena, että *syn*-**C**:tä muodostuu ylimäärin.<sup>138</sup>





Kaavio 53. A) Jørgensenin ryhmän variaatio Endersin tutkimuksen sekvivenssikatalyysille. B) Mekanismi sekvivenssin toisen osan NHC-katalyysille.<sup>138</sup>

Jørgensenin tutkimusryhmä ei kuitenkaan tehnyt reaktiolle kineettisiä kokeita, mutta olettaen reaktion olevan identtinen Endersin ryhmän reaktioon nähden, voidaan kinetiikan olettaa olevan myös identtinen ainakin kertalukujen suhteen. Täten myös sekvivenssikatalyysin kaltaiset reaktiot eivät pääasiallisesti ole katalyytin suhteen kertaluvultaan kaksi, jos ja kun mekanistisesti reaktion eri sykleihin osallistuu vain yksi katalyyttimolekyylireaktionopeuden

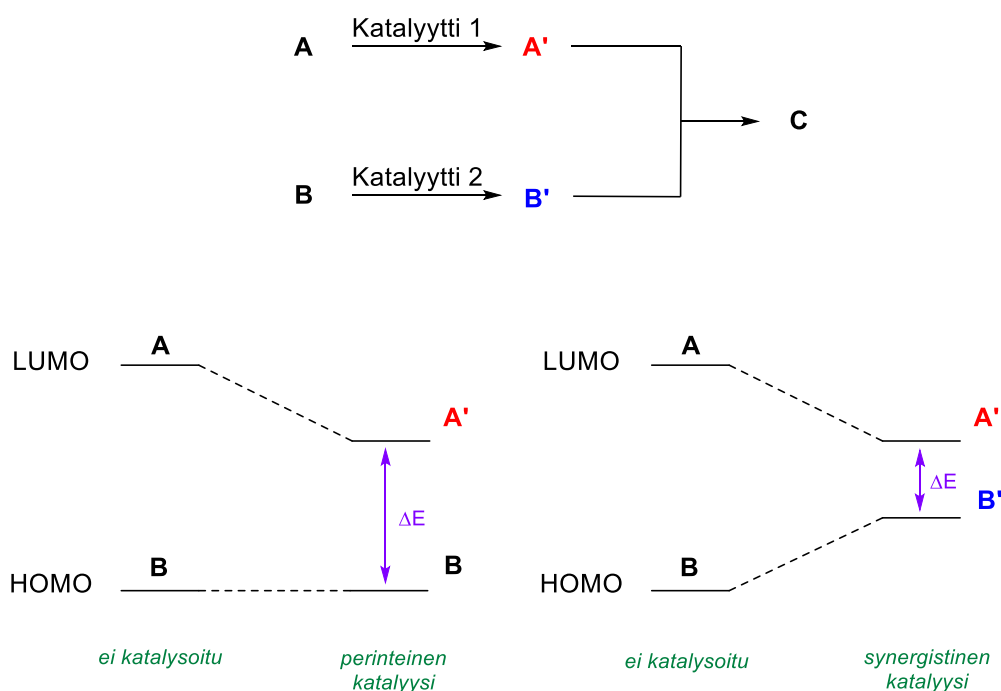
määrävssä vaiheessa. Tämä perustuu puhtaasti siihen, että kineettisesti kaskadi -ja viestityyppiset reaktiosysteemit omaavat useita reaktioita sisällään, joilla kaikilla on omat reaktionopeuden määrävät vaiheensa. Vaikkakin kokonaisvaltaisesti jälkimmäisen syklin eteneminen riippuu ensimmäisen syklin tuotteen muodostuksen nopeudesta, voidaan systeemille käyttää Briggs-Haldane kinetiikan eli vakaantilan (steady state) oletusta ja täten ajatella, että välituotetta ei muodostu kineettisesti merkittäviä määriä. Sekvivenssikatalyyseille olennaista on se, että toinen katalyytti lisätään reaktioseokseen vasta ensimmäisen reaktion päätyttyä. Tämä vahvistaa näkemystä, että reaktiot ovat kineettisesti erillisiä. Tosin sekvivenssikatalyyseille ei tarvitse Briggs-Haldane kinetiikan oletusta tehdä.

Tämän kaltaisten kaksoiskatalyyttisten systeemien vahvuutena kuitenkin on se, että varsinkin kaksoiskokatalyyseissä voidaan mahdollisesti eri katalyyteillä suoriutua eri tavoitteista. MacMillanin tutkimus<sup>18</sup> mainitsi, että katalyyttejä tarkoin valiten, voidaan kaskadisykleillä muokata diastereo -ja enantioselektiivisyyttä halutusti. Toinen katalyyteistä voi nimenomaan olla se substraatteja hallitseva osa, mikä mahdollistaa laajan kirjon eri tuotteita, kun taas esimerkiksi jälkimmäinen katalyytti vastaa asymmetristen synteisien päätavoitteesta. Tämä antaa siis hyvät mahdollisuudet siihen, että klassisessa katalyyysin tapauksessa kaikkea ei tarvitse asettaa yhden yhdisteen harteille. Tämä edesauttaa helpompien, nopeampien, ekonomisesti kannattavempien sekä luonnolle ystävällisempien katalyyttien käyttöä vähentämällä esimerkiksi katalyytin synteisiin tarvittavien resurssien kuten ajan, materiaalien ja menetelmien käyttöä.

Kaikki nämä kolme kaksoiskatalyyttisten reaktioiden variaatiota ovat siis pääasiallisesti ensimmäistä kertalukua, koska syklit katalyyssireaktioiden välillä ovat erillisiä ja tapahtuvat eriaikaisesti toistensa jälkeen. Kuitenkin on mahdollista, että tämän tyyppisessäkin reaktiossa on katalyytin suhteen toista kertalukua oleva reaktio, mutta silloin voidaan jo puhua trikatalyyttisestä reaktiosta, koska väistämättä toisessa syklissä itsessään on kaksi katalyyttiä ja kaskadi- tai sekvivenssikatalyyysin toisessa syklissä on oma reaktionsa käynnissä. Tästä esimerkkinä olikin Jørgensenin Kaskadikatalyyssi (luku 5.1.4.).

### 5.2.6. Leen ryhmän synergistinen katalyysi

MacMillan ja Allen<sup>4</sup> esittelivät neljännen tyyppin kaksoiskatalyyttisiin reaktioihin ja nimesivät sen synergistiseksi katalyysiksi. Pääideana on, että katalyytit eivät aktivoi samaa substraattia vaan aktivaatio tapahtuu kahdelle eri substraatille yhtäaikaaisesti, jonka jälkeen aktivoidut kompleksit sitten reagoivat keskenään. Visuaalisesti tämä konsepti on esitetty kaaviossa 54.



Kaavio 54. MacMillanin ja Allenin konsepti synergistiselle katalyysille.<sup>4</sup>

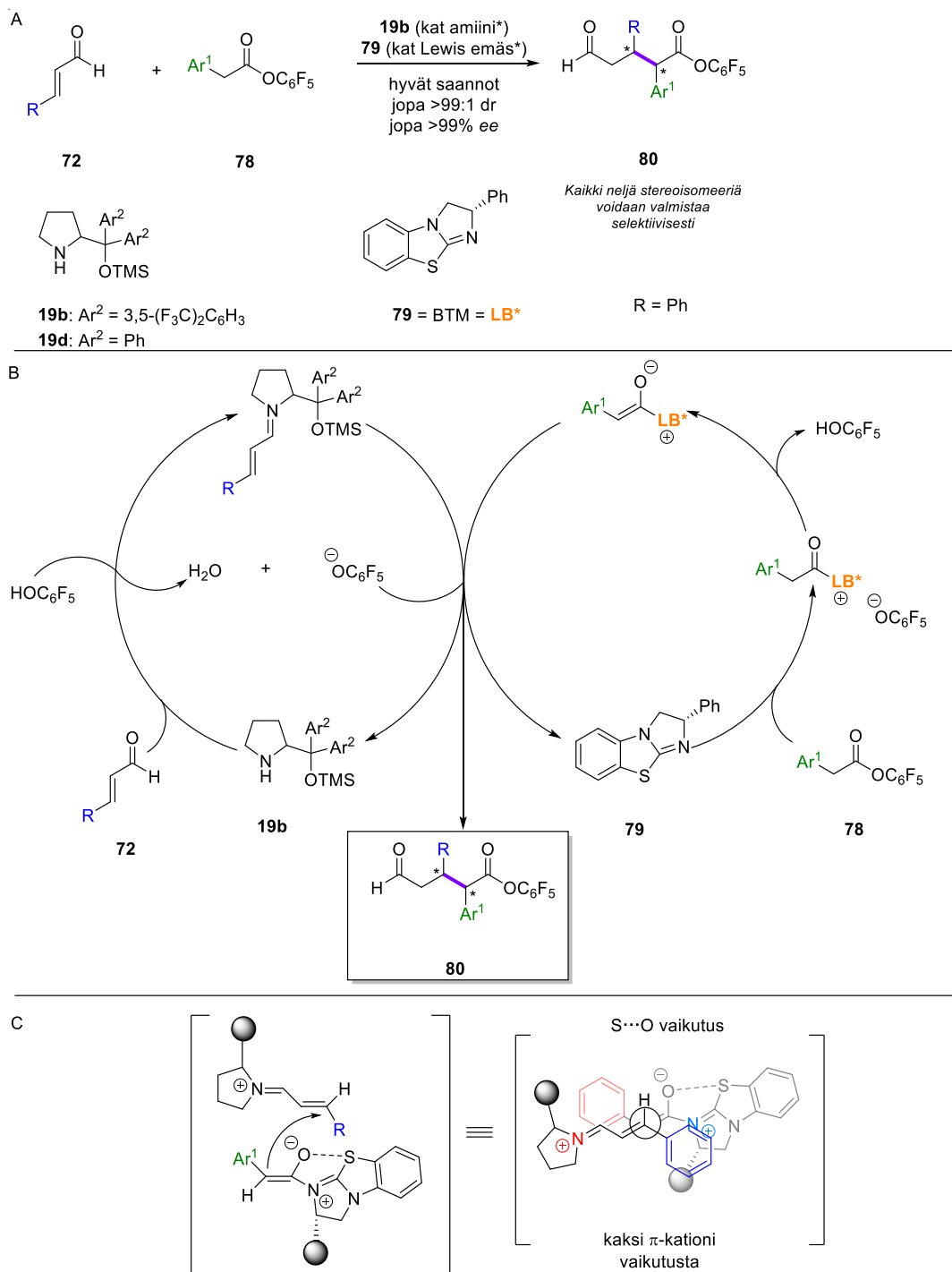
Tarkoituksena tällaisella kaksoiskatalyyttisellä lähestymistavalla on alentaa aktivaatioenergiavallia kahdesta eri suunnasta, kuten kaaviossa 54 on esitetty. Energeettisesti korkeamman HOMO:n omaava yhdiste on reaktiivisempi kuin ei aktivoidun reagenssin samalla, kun toisen yksilön LUMO:a alentamalla, kuten perinteisessä katalyysissä on yleistä, saadaan sekin reaktiiviseksi ja näin esimerkiksi kytkentäreaktiot saataisiin nopeutumaan. Ideana myös on se, että synergistisen katalyysin kautta voitaisiin päästä käsiksi reaktioihin, jotka eivät ole mahdollisia perinteisten katalyyttisten menetelmien puolesta.<sup>4</sup>

Kuten muidenkin kaksoiskatalyyttisten reaktioiden kohdalla, on synergistinen katalyysi mahdollista myös organo-organokatalyyttisesti, kuten Leen työryhmä<sup>139</sup> esitti heidän Michael-additioreaktionsa avulla, missä katalyytteinä oli iminium-ioni ja Lewis emäs (LB) kahdessa eri

syklissä, mutta samanaikaisesti tapahtuen. Kaaviossa 55 on esitetty reaktioyhtälö ja sen mekanismi.<sup>139</sup> Leen tutkimusryhmän esittämän mekanismin mukaisesti  $\alpha,\beta$ -tyydyttymätön aldehydi **72** reagoisi pyrrolidinikatalyytin **19b** kanssa muodostaen iminium-ionin samalla kuin isotiourea BTM **79** reagoisi aryylitikkahapon **78** kanssa muodostaen enolaatin ja nämä kaksi kiraalista kompleksia sitten reagoisivat keskenään muodostaen halutun C–C-sidoksen. Leen ryhmä huomauttaa, että perfluorofenyylin muodostaminen voisi olla edesauttavana tekijänä iminium-ionin muodostumisen kannalta ja täten senkin voisi nähdä omana katalyyttinä.<sup>139</sup> Kaavio 55C osuudessa Leen tutkimus esitti perustelut stereokemialle ja sille, että 1,5–S $\cdots$ O interaktio sekä typhen kationi– $\pi$ -interaktiot olisivat transiutilaa stabilisoivat tekijät mahdollistaen reaktion etenemisen ja selektiivisen diastereomeerin muodostumisen. Nimenomaan katalyyttien konformaatiota muuttaen voidaan sekä *anti*-että *syn*-additiotuotteet valmistaa erinomaisella stereohallinnalla (kaavio 56). *Syn*-tuotteet olivat kuitenkin epästabiileja ja näin tuotteet eristettiin vastaavina 1,5-aldehydihappoina **81** hydrolyysin jälkeen ja katalyyttinä jouduttiin käyttämään vähemmän steerisesti estynyttä **19d** pyrrolidiniä.<sup>139</sup>

Leen ryhmä ei kuitenkaan tehnyt reaktiolleen kineettisiä kokeita tai muutenkaan mekanismia ei tutkittu tarkemmin, joten kinetiikan kannalta on hankala esittää näkemyksiä, miten katalyytin kertaluvut menevät. Kuitenkin jos tämä esitetty mekanismi on pätevä, reaktiossa katalyytit osallistuvat kiertoihinsa vain yhden kerran per sykli ja näin tämän mekanismin pohjalta katalyyttien kinetiikan voidaan olettaa olevan ensimmäistä kertalukua.

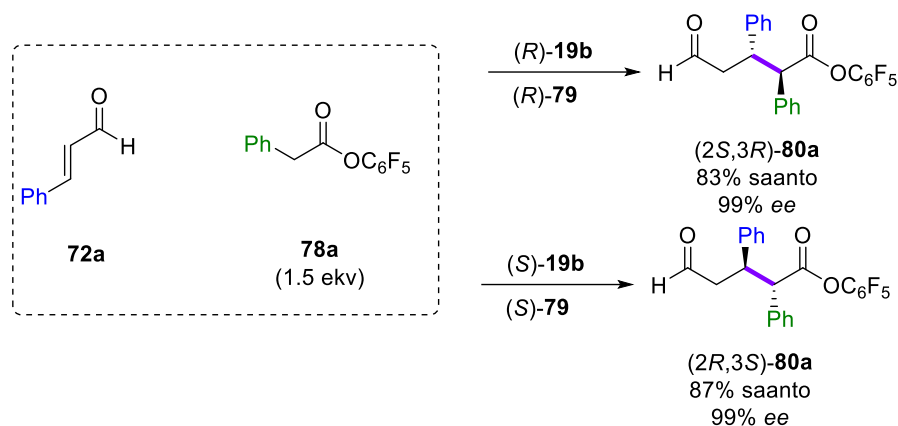
Kuitenkin olisi mielenkiintoista nähdä miten reaktioon mahdollisesti osallistuva perfluorofenyylä käyttäytyisi ja mahdollisesti sen kinetiikka voisikin olla muuta kertalukua kuin yksi. Kyseinen reaktio olisi kuitenkin silloin trikatalyyttinen ja täten kaskadikatalyysien kaltaisesti reaktio ei olisi enää tutkielman otsikon alle sopiva. Leen ryhmän reaktiota voidaan kuitenkin pitää esimerkkinä, miten yleisesti synergistiset katalyysireaktiot etenisivät ja näin yleisesti ottaen voidaan todeta, että tämän tyyppiset katalyysireaktiot eivät ole toista kertalukua, ellei molempiin sykleihin osallistu katalyyttinä sama reagenssi, jolloin tilanteena olisikin Burésin *et al.*<sup>1</sup> esittämä kahden substraatin aktivoituminen samalla katalyytillä (kaavio 3F), kuten tapahtui Crimminin ryhmän fluoridimetateesissa (luku 5.1.7.).



Kaavio 55. A) Leen ryhmän reaktioyhtälö ja olosuhteet, B) Reaktiolle ehdotettu mekanismi ja C) perustelut stereokemialle *anti*-selektiivisiin Michael-additioihin.<sup>139</sup>

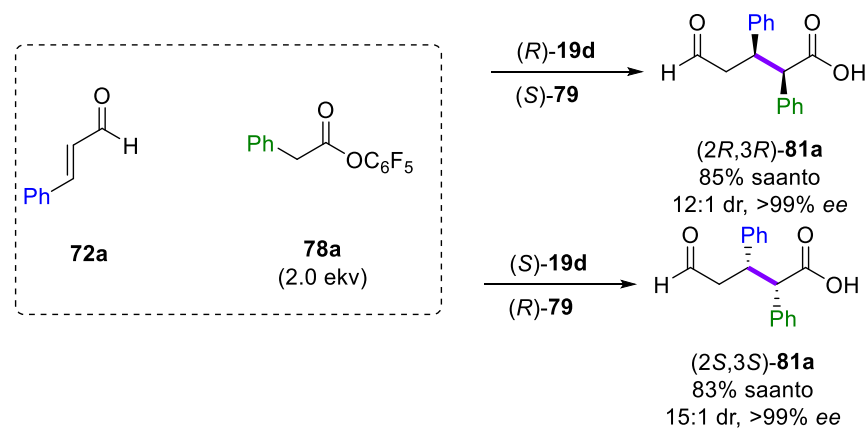
a) *Anti*-selektiivinen

olosuhteet: 10 mol% **19b**, 10 mol% **79**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.0 M), -10 °C, 18 h



b) *Syn*-selektiivinen

olosuhteet: 20 mol% **19d**, 20 mol% **79**, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (1.0 M), -10 °C, 18 h; jonka jälkeen Et<sub>3</sub>N, H<sub>2</sub>O, THF, r.t. 20 min



Kaavio 56. Leen ryhmän reaktio-olosuhteet selektiivisille Michael-additioille.<sup>139</sup>

Yhtenä vahvuutena kuitenkin synergistisessä katalyyseissä on se, että kaksi eri reaktiota voivat tapahtua yhtäaikaisesti reaktioseoksessa. Kaskadikatalyytit tapahtuvat järjestyksessä ja täten koko reaktiosysteemin reaktioaika voi kasvaa merkittävästi hitailla reaktioilla. Varsinkin jos ajatusta kaskadeista laajennetaan yleisemällä tasolle, missä teoreettisesti kaskadeja voidaan jatkaa sykli toisensa jälkeen. Synergistisissä katalyyseissä näin ei käy ja kuten konvergenteissa synteesissä, ainoastaan sen hitaimman syklin reaktioaika merkitsee makronäkökulmasta. Tähän kun lisää MacMillanin ja Allenin esittämän ajatuksen synergistisen katalyytin vahvuudesta, voi tämän tyyppisillä reaktiolla päästä käsiksi reaktioihin, mitkä muuten ovat hyvinkin hankalia. Kuten kaskadikatalyyseissä, myös synergistisen katalyytin kohdalla voisi nähdä mahdollisuuksia eri katalyyttien käytöstä eri tavoitteiden saavuttamiseen. Täten synergistisilläkin katalyyseillä voi pyrkiä suoriutumaan yksinkertaisilla katalyyteillä siitä mihin klassisissa katalyyseissä tarvitaan monimutkaisia ja hankalasti saatavia katalyyttejä.

### 5.3. Analyysi

Tässä luvussa esitetään analyysyjä luvussa esitettyihin reaktioihin ja niiden luonteeseen yleisellä tasolla. Lisäksi luvussa keskustellaan yleisemmän tason hyödyistä tutkia ja soveltaa esitetyjä reaktioita. Tämä kulminoituu esitykseen tulevasta ja siihen esitetään näkökulma miten tutkimusala voisi kehittyä eteenpäin.

#### 5.3.1. Katsaus kaksoiskatalyysin teemoihin

Kun alaluvun 5.1. esimerkkejä vertailee keskenään, voidaan huomata trendinä, että useat mahdolliset toisen kertaluvun katalyytit ovat (tio)urea -tyyppisiä eli pääasiallisesti katalyyttisenä yksikkönä toimii (tio)urean NH-protoneista mahdollistuva vetysidos. Kuitenkin esimerkiksi imiini-enamiini yhdistelmän reaktiot ovat esillä kahdesti (Jørgenssenin ja MacMillanin ryhmien reaktiot). Duddigin ryhmän ja DiRoccon ryhmän reaktiot erottautuvat joukosta, mutta nekään eivät sinällään kovin kaukana ole perustrendistä. Itsessään reaktiot ovat kuitenkin monimuotoisia Friedel–Crafts-alkylaatiosta polymerisaatioreaktioon ja konjugaattiadditioista fluorimetateesiin. Erikoisuutena esimerkkien kohdalla oli MacMillanin ryhmän reaktio, missä identtisten katalyytien käyttö ei merkinnyt toista kertalukua katalyytin suhteen itse kaksoiskatalyysireaktiossa johtuen reaktion kaskadityypistä.

Menetelmät kertaluvun määrittämiseen olivat myös moninaisia, joskin paikoin vajavaisia. Esimerkiksi Sugiuran ja Jørgenssenin ryhmien julkaisuista puuttui tarkemmat kineettiset kokeet esimerkiksi Burésin VTNA:n avulla. Kuitenkin huomiona on se, että Jørgenssenin ryhmän julkaisu on samalta vuodelta kuin VTNA ja täten ei välttämättä voida vaatia, että ryhmässä olisi oltu tietoisia menetelmästä, ja että ryhmässä olisi ollut resursseja kyseisen menetelmän sisällyttämiseen julkaisun kohdalla. Kuitenkin tämä sitten olisi mahdollisuus jatkaa tutkimusta ja tutkia mekanisme perinpohjaisesti sen sijaan, että ajatus vain heitettäisiin ilmoille ilman syvempiä perusteluja. Pääasiallisesti kuitenkin kaikissa reaktioissa on perusteltu toisen kertaluvun oletus katalyytin suhteen tavoin tai toisin ja täten vain esittämällä vastaperusteluja, kuten Burés *et al.*<sup>1</sup> teki Kassin ja Fanin<sup>89</sup>, Smajlagic *et al.*<sup>99</sup> ja DiRoccon *et al.*<sup>106</sup> kohdalla, voidaan oletus asettaa ristiriitaiseen valoon, kunnes esitetty kritiikki on kumottu kokeellisesti.

kaksoiskatalyyysin tutkimisen hyödyt kuitenkin nousee parhaiten esiin esimerkiksi Yoshimitsu *et al.*<sup>87</sup>, Kieseletterin ja Kazakovin<sup>96</sup> sekä DiRoccon *et al.*<sup>106</sup> julkaisujen myötä. Tutkimalla ja havaitsemalla toisen kertaluvun kinetiikkaa katalyytin kohdalla, voidaan tätä informaatiota käyttää hyödyksi tutkimaan itse mekanisme tarkemmin ja tästä sitten suunnitella katalyyttejä, jotka ovatkin ensimmäistä kertalukua katalyytin suhteen olemalla teknisesti molemmat aikaisemmat kaksi katalyyttimolekyyliä yhtä aikaa (esimerkiksi **37**) ja täten reaktioissa vahvistetaan toisen kertaluvun ominaisuuksia keinotekoisesti. Mikä taas sitten mahdollistaa niitä reaktioita, mitä MacMillan ja Allen<sup>4</sup> esittivät olevan vaikeita tai jopa mahdottomia yksittäisillä katalyyteillä, kuitenkin tuomatta mukanaan samalla mainitut kaksoiskatalyyttisten olosuhteiden tuomat haasteet.

### 5.3.2. Katsaus kaksoiskatalyyysin teemoihin

Kuten voidaan alaluvun 5.2. esimerkeistä huomata, reaktioiden kirjo on laajempi kaksoiskatalyyysissä. Varsinkin kun mukaan lasketaan bifunktionaaliset katalyytit sinällään. Teknisesti näitä ei voisi kaksoiskatalyyttisiksi laskea, sillä katalyyttejä on vain yksi, mutta toisesta näkökulmasta ne kuitenkin pystyvät toimimaan itsessään kuten olisivat kaksi eri katalyyttiä yhtä aikaa ja täten ne omaavat saman ajatuksen kuten DiRoccon *et al.*<sup>106</sup> optimoitu katalyytti **37**, mikä siis suoriutuu kahden katalyytin roolista yksinään. Tästä ehkä voisi luoda ajatusta tulevaan identtistestä bifunktionaalisesta katalyyysistä, mitkä olisivat siis toisen kertaluvun kaksoiskatalyyttien optimoituja johdannaisia.

Kineettisesti kaksoiskatalyyysit eivät pääsääntöisesti omaa mahdollisuutta toiseen kertalukuun katalyytin suhteen, ellei sitten jokin katalyyteistä osallistu esimerkiksi yhteen kaskadisyykliin kahden ekvivivalentin verran. Kuitenkin kuten Jørgensenin ryhmän kaksoiskatalyyysikaskadisyyklin kohdalla mainittiin, tällaisista reaktioista tulee ”korkeamman asteen multikatalyyttisiä systeemejä” esimerkiksi trikatalyyttisiä systeemejä.

Luvun teemana oli kuitenkin vain esitellä näitä reaktioita sekä hieman kartoittaa MacMillanin ja Allenin<sup>4</sup> sekä Patilin *et al.*<sup>12</sup> luokituksia kaksoiskatalyyttisiin reaktioihin sekä kertoa miksi kinetiikan kohdalta nämä reaktiot eivät tarvitse samankaltaista lähestymistapaa kuin kaksoiskatalyyysissä. Kuitenkin kinetiikka on hyvin oleellinen lähestymistapa mekanismien tutkimiseen ja täten myös nämä reaktiot ovat kineettisesti kiinnostavia, jos kuitenkaan eivät



tuota toista kertalukua katalyytin suhteen omaa. Täten esimerkiksi Jacobsenin ryhmän Poravov-reaktio oli esimerkillinen tapaustutkimus.

Luvun analysoitavien reaktioiden kohdalla myös käytiin läpi mahdollisuuksia, mitä kaksoiskatalyyysi voi tuoda mukanaan. Esimerkiksi bifunktionaalisten katalyyttien lähestyminen entsyymien suuntaan tai kaskadikatalyyysien mahdollinen kyky hallita reaktioita eri syklien avulla ovat vahvuuksia, mitkä puuttuvat klassisista katalyyseistä ja mahdollisesti ovat vähemmän merkittävässä roolissa identtisten kaksoiskatalyyttien kohdalla. Tämä siksi, että kahden identtisen katalyytin ei voida olettaa tekevän täysin eriäviä tehtäviä kuten substraatin ja stereoselektiivisyyden hallintaa eri tavoin. Toki myös tämä voi väitteenä olla väärä, sillä luonto ja kemia eivät ole koskaan yksinkertaisia.

### 5.3.3. Tulevaisuuden näkymät

Pitkänkätäimen unelmana ja tutkimustavoitteena katalyyssikemiassa on, ainakin yhdestä näkökulmasta, valmistaa synteettisesti entsyymien kaltasia katalyyttejä. Entsyymit luonnostaan ovat kehittyneet biologian kehityskulun myötä nykyiselle tasolle, missä ne voivat tehdä monimutkaisiakin (bio)kemiallisia reaktioita laimeissa ja elämälle sopivissa olosuhteissa. Esimerkiksi eläinkunnan eri edustajien aineenvaihduntojen yhteydessä. Tämä on ympäristön kannalta se suotuisin vaihtoehto, sillä näissä entsyymien tuottamisessa reaktiossa jätteet ja muut kuona-aineet ovat myös hyvin helpokohja ympäristölle. Vastaavasti synteetikemian laboratoriossa joudutaan lähes aina käyttämään hyvinkin myrkyllisiä ja luonnolle haitallisia yhdisteitä esimerkiksi liuottimina. Tämä pätee myös katalyyssikemiassa, joka on yleisesti todettu pyrkimään helpottamaan tätä taakkaa. Jo tältä kannalta pyrkimys entsyymien kaltaisiin synteettisiin katalyytteihin olisi tavoitteena hyvin suotuisa.

Sen lisäksi entsyymit ovat luonnon kehityskulun seurauksena hyvinkin tehokkaita tehtävissään ja olosuhteiden ollessa suotuisat. Ne saattavat toimia ympäristöissään sitkeämmin kuin synteettiset katalyytit. Katalyytin sitkeys, tai paremminkin kestävyys, on yksi katalyyttien ominaisuus, mitä pyritään parantelemaan etenkin teollisuuden ja laajemman käytön tarpeissa. Onhan se päivänselvää, että katalyyttimolekyylillä, joka pitää kykynsä katalysoida reaktiota esimerkiksi ”tuhat kertaa” on parempi kuin vastaava tapaus, mikä pystyy vain ”kymmeneen kertaan”. Tästä on siis hyvä ottaa opiksi katalyyttejä suunniteltaessa.

Kuitenkin tähän mennessä ei synteettiset entsyymien kaltaiset molekyylit ole tuottaneet läpimurtoa tutkimusalalle. Tämän lisäksi yleisesti nähdään ajatus olevan, että ei ole edes tietoa aina miksi nämä entsyymien kaltaiset molekyylit eivät toimi vaikka funktionaalisesti molekyylit olisivatkin hyvin samankaltaisia.<sup>140–144</sup> Yhtenä näkökulmana uusille tutkimuksille onkin ne asiat, mitä MacMillan & Allen<sup>4</sup>, Huang *et al.*<sup>18</sup> ja DiRocco *et al.*<sup>106</sup> tutkimuksissaan esittivät. Pyrkimyksenä onkin siis tutkia, jos kahden katalyytin, ja varsinkin multifunktionaalisten katalyyttien, pohjalta pystyttäisiin lähestymään tätä katalyysikemian tavoitetta. Tietysti lisänä on se, että biokemiassa reaktioissa ei tuotteita puhdisteta välissä vaan ne jatkavat seuraaviin reaktioihin omia polkujaan. Tämä onkin se pohja mihin etenkin kaksoiskatalyysireaktiot ja eritoten kaskadityyppiset katalyysireaktiot perustuvat. Teoriassa näitä systeemejä voidaan laajentaa niin pitkälle kuin on tarve, mutta käytännössähän jo useaan kertaan mainitut tekijät kuten katalyyttien inhibiitio ovat esteenä. Tämä on jo tutkimuskohteena esimerkiksi heterogeenisessä katalyysissä.<sup>145</sup>

Täten tulevaisuuden yhtenä tavoitteena katalyysikemiassa voisi olla homogeenisessä katalyysissä kanoonisesti tehtävät kahden eri katalyytin reaktiot. Etenkin jos käytössä on organokatalyytit, mitkä ovat lähempänä luonnon entsyymejä kuin esimerkiksi metallikatalyytit. Vastavaasti kaksoiskatalyyttiset systeemit luovat uraa toisesta suunnasta tähän tavoitteeseen ajatuksella suunnitella multifunktionaalisia katalyyttejä toisen kertaluvun oletuksen pohjalta. Tähän tietenkin sitten vaaditaan entistä parempia kineettisiä menetelmiä. Esitetty VTNA on hyvin tehokas työkalu, mutta se ei sovellu kaikkiin tilanteisiin. Täten sen paranteleminen onkin mahdollisesti esiaskel siihen, että kineettisesti voidaan katalyysireaktioita tutkia hyvinkin tehokkaasti niin laajissa olosuhteissa kuin mahdollista.

## 6. Yhteenveto

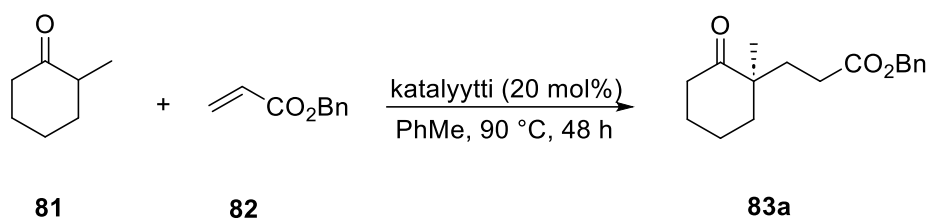
Tutkielmassa käytiin läpi kahden katalyytin reaktiota eri luokittelujärjestelmien pohjalta samalla avaten termistöä ja näkemyksiä aiheeseen. Esitettyjä luokitteluja käsiteltiin eri näkökulmista ja niiden käyttämättä jättämistä perusteltiin. Tästä sitten pystyttiin lähestymään pääasiallista näkökulmaa tutkia kyseisenlaisia reaktioita reaktiokineettisesti. Etenkin katalyytin kertaluvun näkökulmasta. Tätä varten esiteltiin muutamia yleisesti käytettyjä menetelmiä tarkasti sekä avattiin yleisiä ongelmia, miksi kertaluvun määrittämisessä voi olla haasteita. Tämä päti etenkin kaksoiskatalyyksille, jossa oletuksena voidaan esittää katalyytin olevan kertaluvultaan kaksi.

Tämän teoreettisen näkökulman perusteella pystyttiin ottamaan käsittelyyn useita tutkimuksia viimeisen kahden vuosikymmenen ajalta ja esittelemään kyseisten tutkimusten perustelut väitteille toisesta kertaluvusta tai muuten niin sanotusti kahden katalyytin aktivaatioista. Näitä perusteluja analysoitiin ja kritisoitiin etenkin kineettisestä näkökulmasta ja niistä koottiin yleisiä trendejä sekä tulevaisuuden mahdollisuuksia tutkimusaiheeseen liittyen. Etenkin pyrkimyksenä oli nostaa esiin ne toistuvat seikat, millä pystyttäisiin perustelevaan jatkotutkimuksia tai uusia tavoitteita vastaavanlaisille reaktiosysteemeille.

**KOKEELLINEN OSA**

## 7. Johdanto

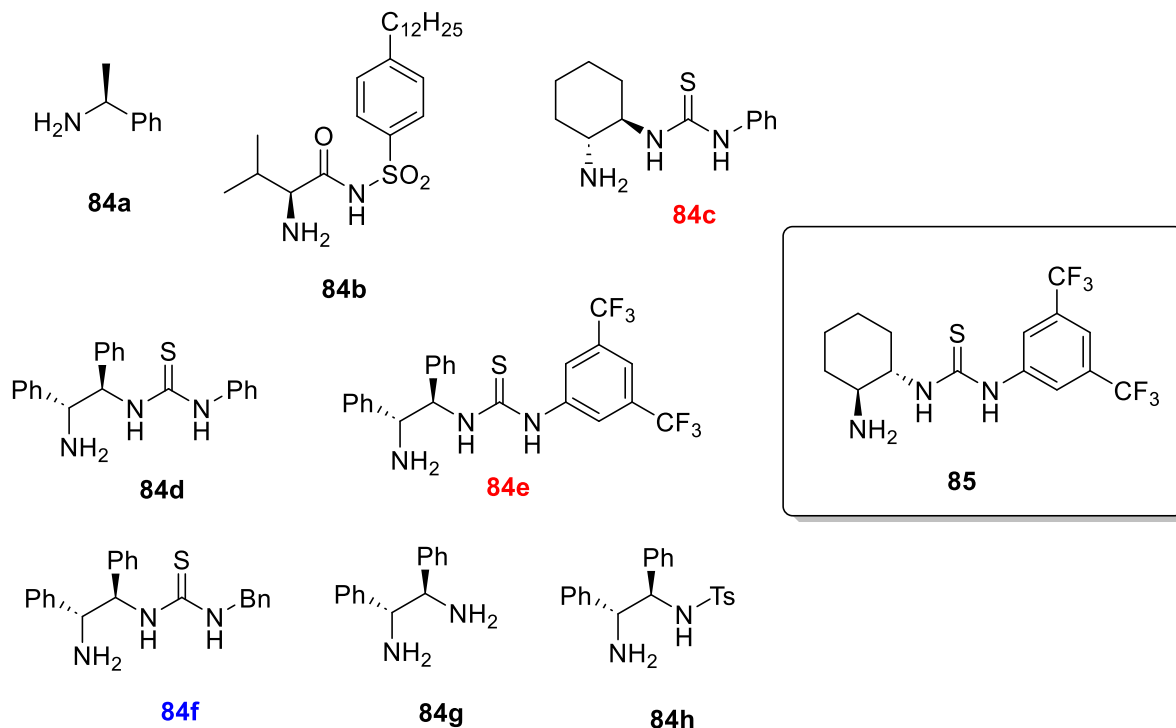
Carterin työryhmän<sup>146</sup> julkaisema versio Michael-additiosta on heidän mukaansa ensimmäinen katalyyttisesti tehty Pfau-d'Angelo reaktio. Pfau-d'Angelo -reaktio on asymmetrinen Michael-additio, joka käyttää hyödyksi kiraalisia imiinejä.<sup>147-149</sup> Carterin ryhmän reaktio on kuvattu kaaviossa 57. Reaktiossa siis katalyytin avulla muodostetaan imiini, joka tautomerisoituu regioselektiivisesti enemmän substituoiduksi enamiiniksi. Tämä mahdollistaa kyseisen välituotteen ja akrylaatin **82**:n välisen Michael-addition. Imiinin muodostuessa reaktioon muodostuu vettä, joka hydrolysoi addition jälkeisen kompleksin muodostaen tuotteen ja regeneroiden katalyytin.



Kaavio 57. Carterin ryhmän Pfau-d'Angelo reaktio.

Carterin mukaan kyseessä on ”kaksoiskatalyyysi” (dual catalysis)<sup>146</sup>. Käyttäen tutkielmassa jo esitettyjä vaihtoehtoja, ja Carterin ryhmän tarkentamana, kyseessä on bifunktionaalinen katalyyysi. Täten katalyytin rooli korostuu reaktiossa, sillä Carterin ryhmän vaatimuksena oli, että katalyytti sisältää 1) primäärisen amiinin, jonka avulla voidaan edesauttaa enamiinin muodostusta Michael akseptoria varten ja 2) Brønsted-happo osan, jonka avulla voitaisiin ennalta orientoida nukleofiili sekä edesauttaa enamiinin/imiinin muodostumista ja sen jälkeistä hydrolyysiä. Carterin tutkimuksen kohteeksi valikoitui bifunktionaaliset tiourea-amiini katalyytit, sillä ne sisälsivät molemmat vaatimukset yhtäaikaaisesti (kuva 17). Joukosta he löysivät sopivan katalyytin (**84f**), mutta samalla yksi tutkituista katalyytteistä (**84c**) saavutti vain 18 % saannon reaktiossa. Tämä oli kiinnostava havainto, sillä katalyytin määränä oli 20 mol% ja täten vaikutti siltä, että katalyytti ei pystynyt tekemään edes ensimmäistä kokonaista kierrosta syklissään. Havainto viittasi myös siihen, että syynä voisi olla katalyytin inhibiitio, mutta Carterin ryhmä ei tätä tutkinut tarkemmin, koska he löysivät optimaalisen katalyytin. Tutkimuksessa kuitenkin mekanismin perustelun yhteydessä huomattiin, että esimerkiksi bensyyliamiini ei kykene aktivoimaan elektrofiilinä toimivaa akrylaattia. Tämä voi olla yhtenä selittävänä syynä, miksi **84c**:n antama saanto on alhainen. Katalyytin inhibiition mahdollisuutta haluttiin kuitenkin tutkia ja menetelmäksi päädyttiin soveltamaan Burésin VTNA:n ”same

excess” -kokeita ottamalla reaktioista näytteitä tasaisin väliajoin ja analysoimalla konsentraation muutoksia näytteissä kaasukromatografian avulla.



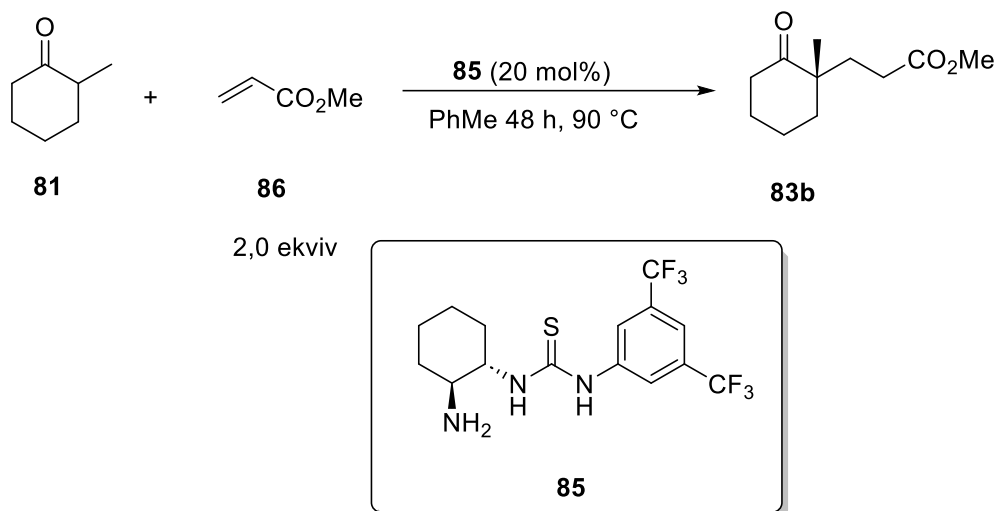
Kuva 17. Carterin ryhmän tutkimia tiourea-amiini katalyyttejä Pfau-d’Angelo reaktioon, joista sininen on parhaiten toiminut katalyytti ja **84c** on mielenkiintoisen heikosti toiminut katalyytti. **85** on tutkielmassa valmistettu katalyytti, mikä on suhteellisen lähellä punaisella merkittyjä yhdisteitä funktionaalisuudeltaan.

Kyseistä katalyyttiä ei kuitenkaan ollut saatavilla suoraan ja täten vastaavan tyyppistä katalyyttiä (kuva 17, **85**) ensin piti valmistaa ja sitä varten oli myös tarve raseemisen lähtöaineen resoluutioon enantiopuhtauden saavuttamiseksi. Näistä vaiheista koottiin tutkielmaan laboratoriossa tehtävä kokeellinen osa.

## 8. Kokeellisen osan tulokset

### 8.1. Reaktio seurannan tulokset

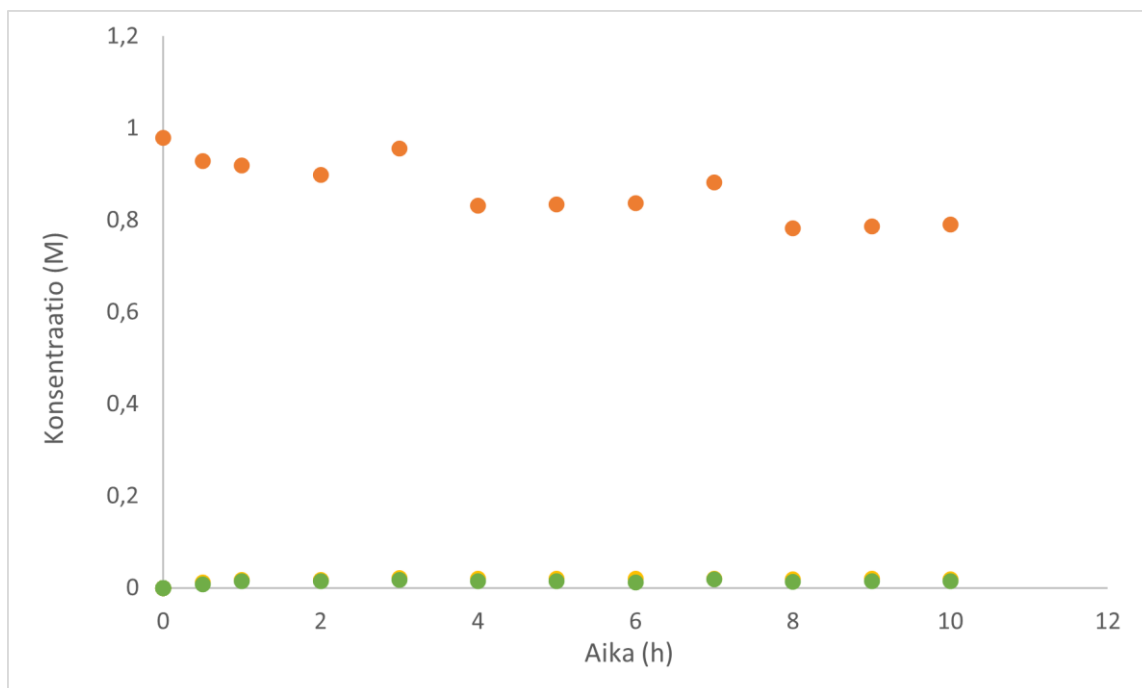
Tutkittavana reaktiona oli seuraava reaktio (kaavio 58):



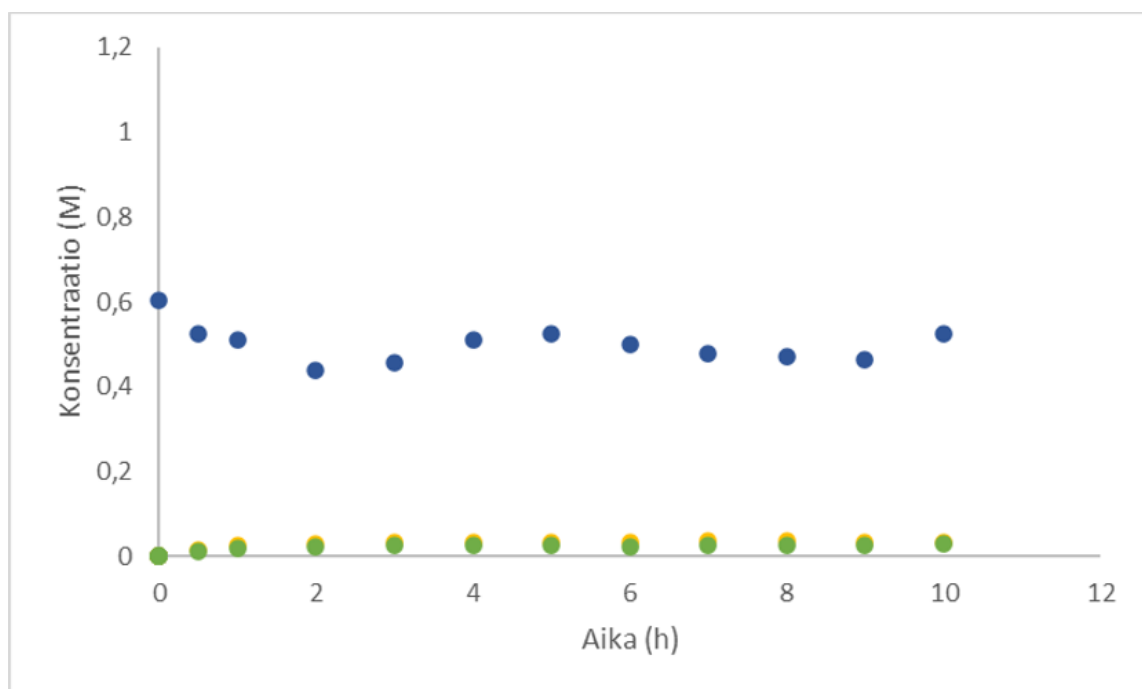
Kaavio 58. Carterin työryhmän muokattu Pfau-d'Angelo reaktio, jonka kineettistä käyttäytymistä seurattiin kaasukromatografialla.

Reaktio tehtiin substraattien suhteen eri konsentraatioissa pitäen konsentraatioero eli VTNA-menetelmän ”excess”-termi vakiona. Korkeamman konsentraation reaktiossa (SE1) substraattia **81** oli 0,979 M, substraattia **86** oli 1,999 M konsentraatioissa reaktioseoksessa. Täten ”excess”-termi oli 1,02 M. Matalemmän konsentraation reaktiossa (SE2) vastaavasti substraattia **81** oli 0,602 M ja substraattia **86** oli 1,622 M konsentraatioissa reaktioseoksessa. Sisäisenä standardina reaktiossa käytettiin tetradekaania ja sen konsentraatio vastasi reaktiossa substraatin **81** konsentraatiota. Pitäen katalyytin konsentraatio vakiona, reaktiosta pystyttiin kaasukromatografialla muodostamaan kuvaajat katalyytin käyttäytymisen tutkimiseksi.

Referenssikromatogrammit ovat liitteinä (Liitteet 1, 2, 3).  $R_t$  (2-metyylisykloheksanoni, **81**, **B**) = 8.37 min,  $R_t$  (Tetradekaani, **IS**) = 25.97 min,  $R_t$  (Tuote 1, **83b**) = 64.93 min ja  $R_t$  (Tuote 2, **83a**) = 66.36 min. Metyyliakrylaatti (**86**) tuli liuottimen mukana ja täten sitä ei voitu tarkasti määrittää tällä menetelmällä. Liittessä 4 on taulukot GC-pinta-aloista, GC-vastekertoimista sekä vastekertoimien avulla lasketut konsentraatiot molemmille reaktioille (SE1 ja SE2). Kromatogrammit ovat liitteissä 5 (SE1) ja 6 (SE2). Reaktiokonsentraatioista voitiin muodostaa kuvaajat konsentraation muutoksesta ajan suhteen. Nämä ovat esitetynä kuvissa 18 ja 19:



Kuva 18. Korkeamman konsentraation reaktion (SE1) komponenttien konsentraatioiden muutos ajan suhteen. ● = lähtöaineen konsentraatio, ● = tuotteen ensimmäisen enantiomeerin konsentraatio ja ● = tuotteen toisen enantiomeerin konsentraatio.  $[\mathbf{81}]_0 = 0,979 \text{ M}$ .

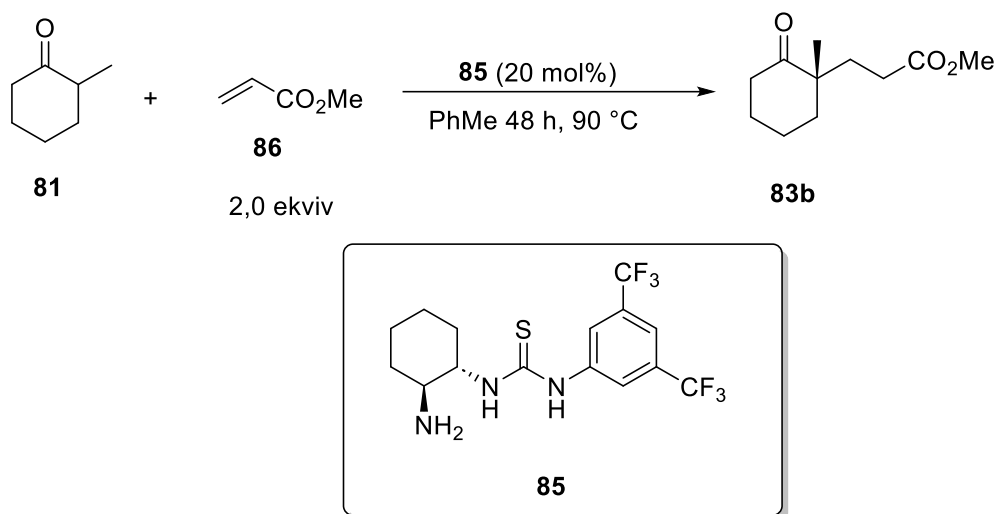


Kuva 19. Matalamman konsentraation reaktion (SE2) komponenttien konsentraatioiden muutos ajan suhteen. ● = lähtöaineen konsentraatio, ● = tuotteen ensimmäisen enantiomeerin konsentraatio ja ● = tuotteen toisen enantiomeerin konsentraatio.  $[\mathbf{81}]_0 = 0,602 \text{ M}$ .



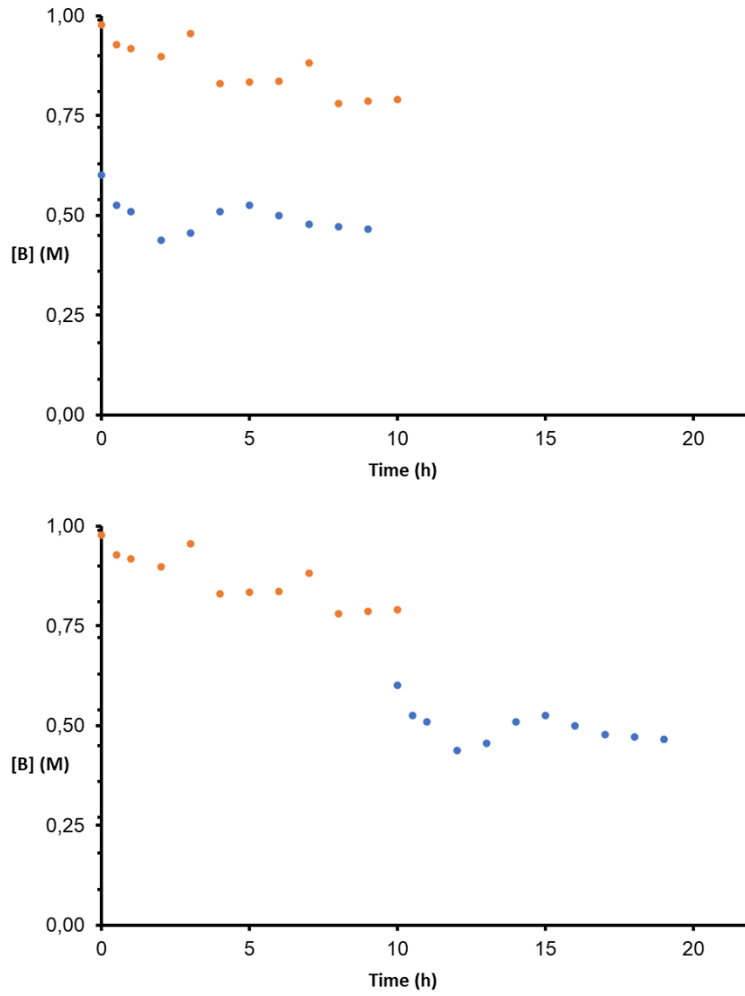
## 8.2. VTNA Same excess -tulokset

VTNA Same excess-kokeet tehtiin reaktiolle (kaavio 59):



Kaavio 59. Carterin työryhmän muokattu Pfau-d'Angelo reaktio, jolle tehtiin VTNA-menetelmän Same excess -koe, millä pyrittiin tutkimaan katalyytin kinetiikkaa reaktiossa.

Luvussa 3.2.1. ja luvussa 3.2.2. käsiteltiin miten RPKA:lla ja VTNA:lla pystyy katalyytin inhibiitiota määrittämään tekemällä tutkittava reaktio kahdessa eri konsentraatiossa siten, että reaktiokomponenttien ”excess” pysyy vakiona. Tämä oli syynä miksi Pfau-d'Angelo tehtiin kahdessa eri konsentraatiossa lähtöaineiden suhteen (SE1 ja SE2) pitäen katalyytin konsentraatio vakiona. Konsentraatioprofiilit (kuva 18 ja kuva 19) voidaan siten asettaa samaan kuvaajaan (kuva 20A). Same excess -kokeen ideana on se, että korkeamman konsentraation reaktion (SE1) reaktiokomponenttien konsentraatio eli [81] pitäisi jollakin ajanhetkellä saavuttaa matalamman konsentraation reaktion lähtökonsentraatio (0,602 M). Täten muuttamalla matalamman konsentraation aika-arvoja datapisteille, voidaan kuvaajaa siirtää ja selvittää missä tämä yhteinen ajanhetki olisi. Kuvassa 20B on esitetty kuvaaja tilanteessa, jossa matalamman konsentraation lähtöä on siirretty 10 tuntia eteenpäin:

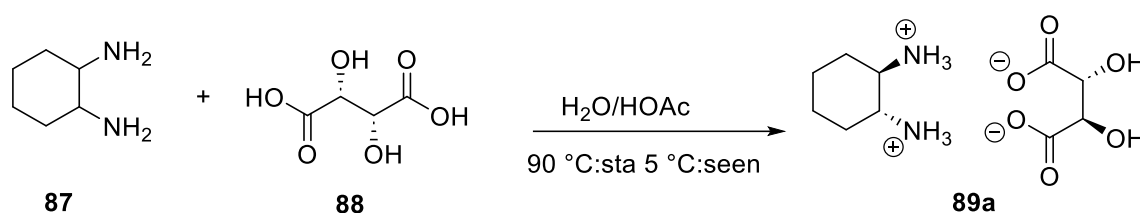


Kuva 20. Pfau-d'Angelon same excess -kokeen kuvaajat. A) Molemmat konsentraatiot samassa kuvaajassa ja B) matalamman konsentraation datapisteitä on siirretty 10 h eteenpäin.  $\mathbf{B} = \mathbf{81} = 2$ -metyylisykloheksanoni. SE1:  $\bullet = [\mathbf{81}]$ ,  $[\mathbf{81}]_0 = 0,979$  M. SE2:  $\bullet = [\mathbf{81}]$ ,  $[\mathbf{81}]_0 = 0,602$  M.

### 8.3. Katalyyttikokeiden tulokset

#### 8.3.1. Synteetit

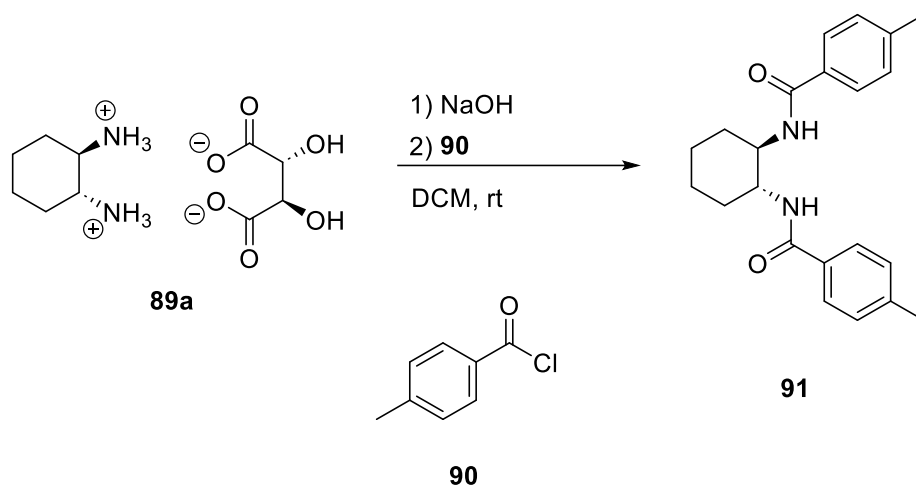
Ensimmäisenä askeleena kohti katalyytin synteesiä Pfau-d'Angelo -reaktiota varten oli valmistaa lähtöainetta (*R,R*)-1,2-diaminosykloheksaania tai (*S,S*)-1,2-diaminosykloheksaania. Tähän valikoitui reseptiksi Jacobsenin ja Larrow'n<sup>150</sup> kiraalinen resoluutio (kaavio 60) ( $\pm$ )-*trans*-1,2-diaminosykloheksaanille:



Kaavio 60. Jacobsenin ja Larrow'n<sup>150</sup> ( $\pm$ )-*trans*-1,2-diaminosykloheksaanin (**87**) kiraalinen resoluutio L-(+)-tartraattihapon (**88**) avulla.

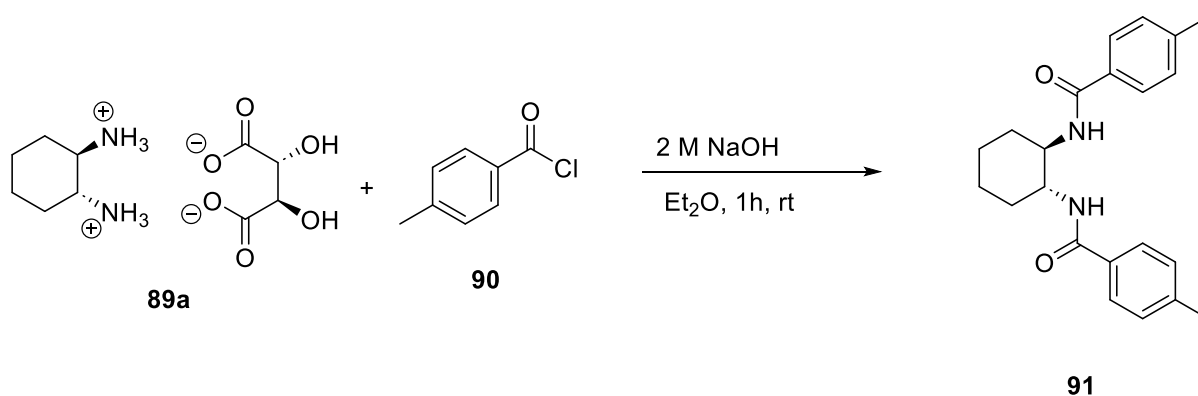
Pääasiallisina syinä tämän reseptin valikoitumiseen oli sen suhteellinen helppous, tarvittavien reagenssien halpuus sekä mahdollinen reaktion skaalautuvuus, sillä Jacobsen ja Larrow olivat reaktion tehneet 100 g mittakaavassa. Reaktiossa diamiini reagoi enantiopuhtaan hapon kanssa muodostaen suolan. Resoluution ideana oli se, että suoloista vain toinen liukenee vesi-etikkahappo liuokseen ja toinen saostuu liuoksesta. Täten suodattamalla faasit, voitaisiin haluttu enantiomeeri saada talteen käyttämällä haluttua tartraattihappoa. Enantiopuhtauden takaamiseksi Jacobsen ja Larrow myös ehdottivat uudelleenkiteytystä. Enantiopuhtauden määrittämiseksi tarkoituksena oli käyttää HPLC-menetelmää ensin vapauttamalla muodostunut tartraattisuola (**89a**) vapaaksi diamiiniksi ja sen jälkeen derivoimalla se bisamidiksi reaktiolla (kaavio 61).

Resoluutio itsessään onnistui ilman suurempia ongelmia. Saantona (*R,R*)-1,2-diaminoykloheksaani monotartraattia oli 2,9 g (44 %), mikä oli reseptin saantoon verrattuna (105–110 g, 80–83 %) keskinkertainen, mutta käytettävä määrä. Huomiona kuitenkin oli, että ensimmäisen suodatuksen jälkeen tuote oli reseptistä poiketen kellertävää kertoen epäpuhtauksista. Loppujen lopuksi saatu tuote uudelleenkiteytettiin, jotta saatiin valkoinen jauhe kuten reseptissä oli mainittu. Enantiopuhtauden määrittämisen kohdalla kuitenkin oli haasteita. Yhtenä seikkana oli se, että käytössä ei ollut reseptissä käytettyä kolon-



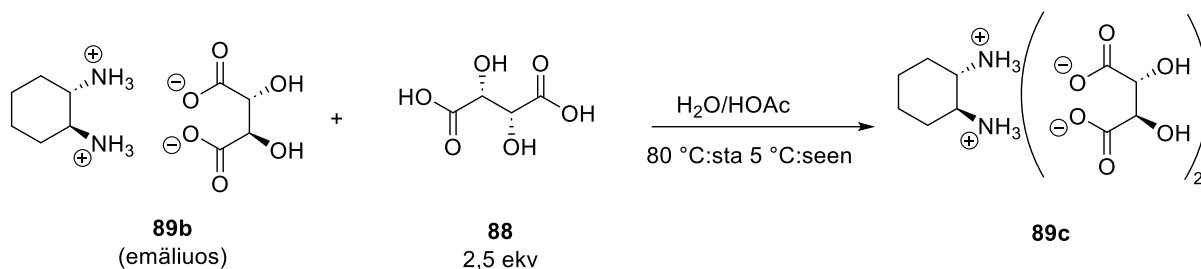
Kaavio 61. Diammoniumsuolan vapautus ja sen derivointi *p*-toluoyylikloridilla (**89**).

nia HPLC:lle ja täten retentioaikojen vertailu oli haastavaa. Myös se, että retentioajat raseemiselle referenssinäytteelle ja resoluution tuotteesta tehdyille näytteelle eivät täsmänneet, teki analyysistä vaikeaa. Varmuuden vuoksi tartraattisuolan derivaatio bisamidiksi tehtiin myös toisella, Walshin *et al.*<sup>151</sup> reseptillä (kaavio 62). Pyrkimyksenä oli tehdä vertailukelpoinen näyte, jotta HPLC-kromatogrammien tulkitseminen helpottuisi. Kuitenkaan tätä ei ehditty tekemään, sillä HPLC-instrumentin tietokoneterminaali meni rikki ja täten analyysiä ei viety täydellisesti loppuun. Käytetty vaihtoehtoinen resepti kuitenkin mahdollisti bisamidin eristämisen ja täten sille voitiin tehdä muita analyysejä esimerkiksi NMR-spektroskopiaa tai sulamispisteen mittausta.



Kaavio 62. Diammoniumsuolan vapautus ja sen derivointi *p*-toluoyylikloridilla käyttäen vaihtoehtoista reseptiä.

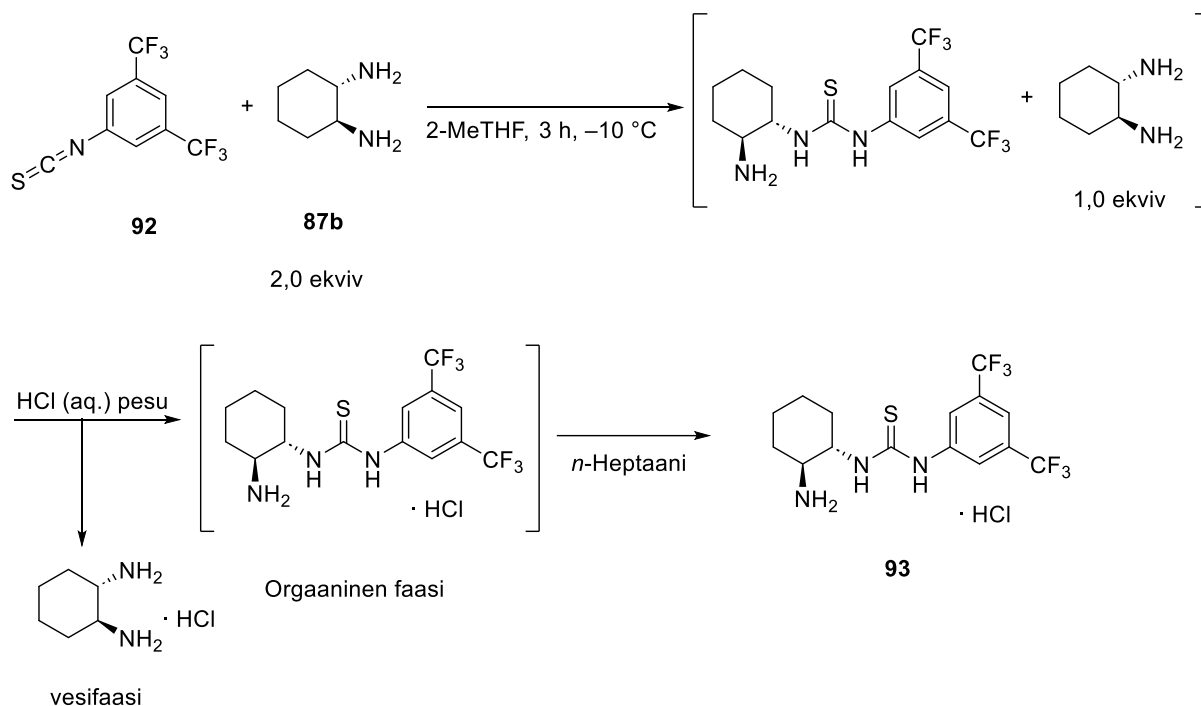
Jacobsenin ja Larrow'n<sup>150</sup> resoluutioresepti viittasi myös itse alkuperäiseen, Galsbølin *et al.*<sup>152</sup> ( $\pm$ )-*trans*-1,2-diaminosykloheksaanin resoluutioon, missä samalla hapolla pystyttiin myös toinen enantiomeereistä saostamaan bistartraattisuolana (**89c**) (kaavio 63).



Kaavio 63. Bistartraattisuolan muodostus kiraalisen resoluution suodatetusta emäliuoksesta.

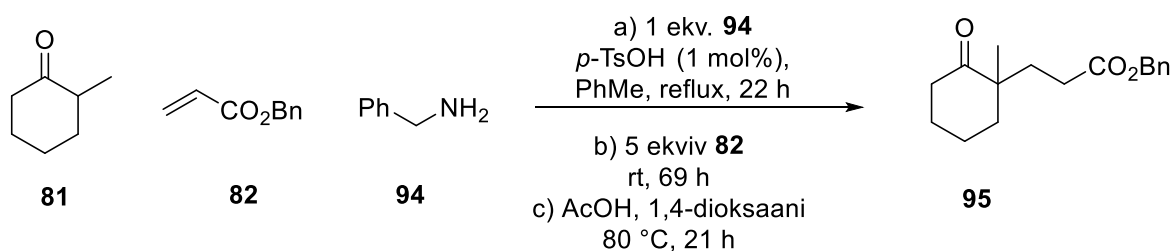
Tämä ei kuitenkaan onnistunut kuten reseptissä vaan lähes kaikissa reaktiovaiheissa oli eriäväsyyksiä raportoituun verrattuna. Suolan piti uudelleenkiteytyä reaktion jäähtyessä, mutta näin ei käynyt vaan liuotin piti haihduttaa pois. Saatu valkoinen, karkea jauhe kuitenkin osottautui NMR-spektroskopian ja sulamispisteen perusteella olevan bistartraattisuola. Pyrkimyksenä oli derivoida bistartraattisuola kuten kaaviossa 61 ja sille mitata HPLC-kromatogrammi. Kuitenkin terminaalin rikkoitumisen johdosta tätä ei kunnolla pystytty tekemään. Samalla myös todettiin, että jos pyrkimyksenä on saada bistartraattisuolassa oleva (*S,S*)-diaminosykloheksaani käyttöön, on järkevämpää käyttää L-(+)-tartraattihapon sijaan D-(–)-tartraattihappoa, kuten Jacobsenin ja Larrow'n<sup>150</sup> reseptissä vaihtoehtona oli.

Kyseistä happoa ei kuitenkaan ollut saatavilla ja koska (*R,R*)-enantiomeerin enantiopuhtauden selvitys ei ollut täydellistä, päädyttiin käyttämään kaupallisesti saatavilla olevaa (*S,S*)-1,2-diaminosykloheksaania katalyytin valmistukseen. Reseptinä toimi Foxin *et. al.*<sup>153</sup> patentti, jossa kyseinen synteesi oli yhtenä vaiheena (kaavio 64). Synteesi tehtiin kahteen kertaan, koska ensimmäisellä kerralla reaktiossa käytettyä kolvia ei kuivattu ensin uunissa ja tämän pääteltiin olevan syynä matalaan (17 %) saantoon. Toisen kerran synteesissä saanto parani (47 %), mutta se oli vieläkin keskinkertainen patentissa raportoituun saantoon (75 %) verrattuna. Tämä luultavimmin johtui myös ilma- ja kosteusherkkien menetelmien huolimattomasta käytöstä tai vaihtoehtoisesti liian nopeasta reagenssien annostelusta reseptiin nähden. Katalyyttisuolaa kuitenkin saatiin useita grammoja, mikä olisi riittänyt jatkokäsittelyyn ja itse katalyytin käyttöön haluttuun reaktioon. Kuitenkin toisella tutkijalla oli määrällisesti enemmän ja sen vapauttaminen vapaaksi amiiniksi oli käytännöllisempää.



Kaavio 64. Pfau-d'Angelo -reaktioon tarvittavan katalyytin synteesi.

Jotta Pfau-d'Angelo -reaktiota pystyttäisiin seuramaan kaasukromatografisesti, oli tarpeen syntetisoida raseeminen referenssituote. Tähän käytettiin modifioitua humilisiini E -projektin<sup>154</sup> Pfau-d'Angelo -reaktiövaihetta (kaavio 65).

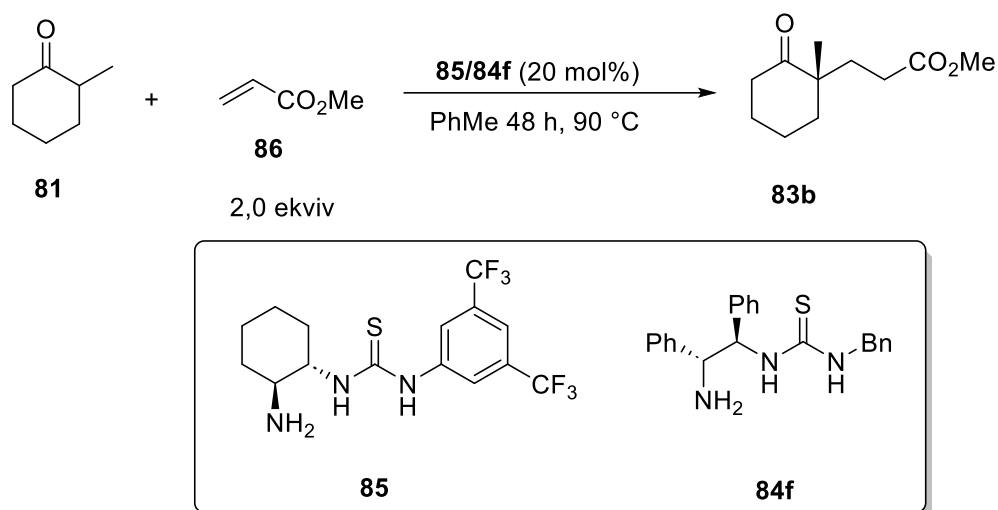


Kaavio 65. Raseemisen referenssinäytteen synteesi.

Itse synteesi onnistui suhteellisen hyvin, mutta NMR-spektristä pystyttiin havaitsemaan, että reaktiossa muodostui hyvin samankaltaista sivutuotetta. Tämän sivutuotteen erottelu nähtiin toisen tutkijan kanssa hankalaksi. Tarkoituksena oli kuitenkin erottelu tehdä, mutta referenssinäytteen GC-mittauksen yhteydessä havaittiin, että tuote ei kaasukromatogrammissa näy valitulla menetelmällä. Menetelmää yritettiin optimoida, mutta tuotetta ei kromatogrammissa havaittu. Tästä päätettiin vaihtaa käytetty bentsyyliakrylaatti (**82**) metyyliakrylaatiksi (**86**) ja tehdä sitä vastaava raseeminen tuote. Aikamäärällisesti tähän ei

kuitenkaan lähdetty vaan itse reaktioeurantaa varten käytettiin toisen tutkijan jo valmistamaa yhdistettä.

Reaktioeuranta tehtiin täten muokatulle Carterin ryhmän<sup>146</sup> katalysoidulle Pfau-d'Angelo reaktiolle (kaavio 66).



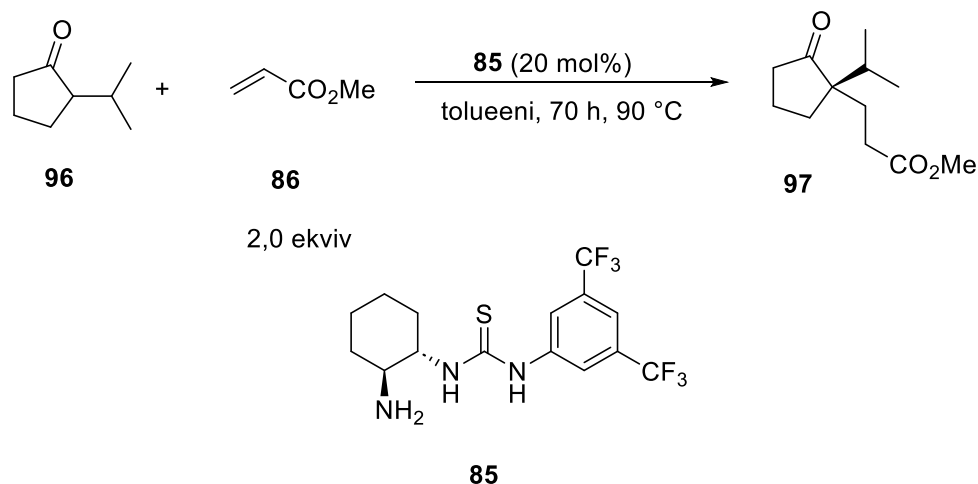
Kaavio 66. Organokatalysoitu Pfau-d'Angelo -reaktio reaktioeurantaa varten.

Carterin ryhmän<sup>146</sup> synteesissä havaittiin, että **85**:tä vastaavat katalyytit tuottivat vain hyvin vähän haluttua tuotetta ja saantoprosentin perusteella pääteltiin, että katalyytti ei käy läpi edes yhtä sykliä. Tämän syyksi epäiltiin katalyytin inhibiitiota, mikä pysyttäisiin määrittämään VTNA-menetelmän avulla. Carterin ryhmän synteesi onnistui katalyytillä **84f** erittäin hyvin ja pyrkimyksenä oli käyttää katalyyttiä myös reaktioeurantaan, jotta sen kineettistä käyttäytymistä voitiin tutkia tarkemmin. Kuitenkin **84f**:ää ei voitu valmistaa ja täten vastaavia reaktioita ei tehty.

Reaktioeuranta alunperin tehtiin usean päivän kuluessa, koska reaktioaika reseptissä oli hyvinkin pitkä. Ensimmäinen reaktioeuranta epäonnistui, koska näytteiden valmistuksen yhteydessä tapahtui systemaattinen virhe, joka teki näytteistä käyttökelvottomia. Toisen seurannan kohdalla havaittiin, että reaktiossa tapahtuu jotain kolmen tunnin reaktioajan jälkeen ja tämän tapahtuman vaikutus konsentraatioaikaprofiiliin oli omituinen. Täten reaktioeuranta tehtiin uudestaan kaksi kertaa ensimmäisen kymmenen tunnin aikana reaktiolle. Myös näissä seurannoissa havaittiin konsentraation omituista käyttäytymistä. Kolmannen reaktioeurannan

yhteydessä tehtiin myös toinen seuranta, jossa reaktio tehtiin pienemässä konsentraatioissa reagensseja VTNA:n Same Excess -kokeita varten. Lopulta konsentraatioaikaprofiilien omituisuudet paljastuivat matemaattisiksi virheiksi (Liite 4 yhtälö 53) ja virheiden korjattua profiilit olivat huomattavasti parempia. Näitä profiileja käytettiin katalyytin inhibiition tutkimiseen.

Katalyyttisen Pfau-d'Angelo -reaktion nähtiin olevan myös käytännöllisempi ja edullisempi kuin humilisiin E-projektissa käytetyn stoikiometrisen vaihtoehdon. Viimeisenä työssä kokeiltiin katalyyttiä **85** substraatille **96** eli toistettiin reaktio, jota Verma *et al.*<sup>154</sup> olivat käyttäneet humilisiin E:n rungon synteesissä (kaavio 67). Reaktiossa kuitenkin ei muodostunut kaasukromatografilla havaittavaa tuotetta, minkä todettiin olevan viittena siihen, että katalyytti ei kyseisessä reaktiossa toimi. Pyrkimyksenä oli myös käyttää aikaisemmin mainittua toista katalyyttiä **84f**, mutta koska sitä ei ollut saatavilla, tätä ei tehty.



Kaavio 67. Humilisiin E-projektin Pfau-d'Angelo -reaktio katalyytillä **85**.



### 8.3.2. Tulosten tarkastelu

On päivänselvää, kun Pfau-d'Angelo -reaktion konsentraatioprofiileja (kuva 20) tarkastelee, että reaktiossa tapahtuu jotain, mikä estää sen etenemisen kovinkaan pitkälle. Lähtökohtaisesti same excess -kokeen perusteella ei välttämättä voida osoittaa, että inhibiitiota tapahtuu, koska profiilit eivät kohtaa missään vaiheessa. Tämä kuitenkin oletettavasti johtuu pääasiallisesti liian suuresta konsentraatioerosta kahden reaktion välillä ja jos seuranta toistettaisiin sopivamalla konsentraatioerolla, olisi profiilit paremmin tulkittavissa. Jos reaktiossa olisi inhibiitiota katalyytin suhteen, olisi se myös täydellistä. Tämä siksi, että vaillinaisen inhibiition kohdalla reaktio hidastuisi, mutta tuotetta muodostuisi loppujen lopuksi merkittäviä määriä. Mainitun pienemmän konsentraatioeron omaavan reaktion lisäksi olisi myös oleellista, että same excess -kokeet tehtäisiin vielä kertaalleen siten, että reaktioon lisäittäisiin tunnettu määrä tuotetta. Tällä tavoin voitaisiin määrittää, onko inhibiitiota katalyytin vai tuotteen kohdalla eli inhibiitiota tuote katalyyttiä vai deaktivoituuko katalyytti syklien toistuessa. Reaktion katalyyttiä voisi myös vaihtaa, esimerkiksi Carterin ryhmän tutkimuksessa<sup>146</sup> toimineeseen katalyytiin (**84f**). Kumpakaan näistä ei ehditty kokeellisen osaan käytetyn ajan puiteissa tehdä. Kuitenkin nämä antaisivat laaja-alaisemman näkökulman reaktion mekanismiin ja miksi inhibiitiota tapahtuu reaktiossa.

Inhibiition tutkimuksen avuksi tehtiin myös NMR-koe kaikille reaktiokomponenteille. Jokaista komponenttia otettiin yhden ekivalentin verran ja ne annosteltiin NMR -näyteputkeen ennen kuin ne liuotettiin NMR-liuottimeen ja sekoitettiin. Tästä näytteestä tehtiin mittaus ja uusi näyte otettiin 30 h lämmityksen jälkeen. Spektrejä verrattiin referenssispektreihin ja niistä tehtiin liitteenä olevat kuvat (Liite 7). Spektreistä voidaan huomata, että liuoksessa muodostuu uusi yhdiste, jolla on vinyloginen protoni (6,11 ppm, s, 1H), ja joka oli mahdollisesti enamiini tai enoli. Tätä varten pitäisi vielä tehdä uudet NMR -näytteet, jossa olisi vain katalyytti ja lähtöaine sekä katalyytti ja tuote. Nämä antaisivat osviittaa siihen, kumpi reagensseista reagoi katalyytin kanssa. Tämä olisi yksi jatkotutkimuksen suunta kyseiselle Pfau-d'Angelo -reaktiolle.

Koska tutkimuksen reaktioseuranta tehtiin kaasukromatografialla ja kyseiset mittaukset olivat huomattavan pitkiä, olisi yhtenä vaihtoehtona toistaa tutkimus esimerkiksi NMR-seurannalla. Tällä voitaisiin saada nopeammin ja tarkemmin dataa, mikä voisi edesauttaa inhibiition tutkimista tarkemmin, mutta myös validoida tämän tutkimuksen tulokset. Haasteena NMR-seurannassa on kuitenkin sen hinta. Instrumenttiaika on suhteellisen kallista, kun useat tutkimukset pyrkivät instrumenttia käyttämään. Tämän lisäksi tarvittavat NMR-liuottimet

voivat olla hyvinkin ekonomisesti järjettömiä. Sen lisäksi kyseisen reaktion kohdalla on jo olemassa toimiva katalyytti ja pääasiallisesti inhibiition kohdalla pyrittäisiin katalyyttiä tai substraatteja vaihtamaan, mistä johtuen kallista seurantamenetelmää ei välttämättä ole järkevää soveltaa tutkimukseen tarkemmin.

NMR-seurannan puolesta voidaan esittää se argumentti, että reaktioseurantaa ei voitu toteuttaa alkuperäiselle reaktiolle Carterin tutkimuksessa. Ongelmana oli, että tuotteena oleva bentsyyliakrylaatin ja ketonin muodostama yhdiste ei näkynyt laisinkaan kaasukromatografilla ja jotta reaktiota pystyttiin GC:llä seuraamaan, jouduttiin käyttämään metyyliakrylaattia. Metyyliakrylaatti on myös itsessään haastava GC:llä mittattava yhdiste, sillä sen kiehumispiste on verrattaen matala menetelmässä käytettyyn 100 °C:n lämpötilaan. Bentsyyliakrylaatista saadun tuotteen näkymättömyyden kohdalla tosin voi olla liian lyhyt ajoaika, mutta kyseinen tuote ei näkynyt edes 70 minuutin kuluessa ja täten seurantaa varten näistä mittauksista olisi tulleet hyvin epäkäytännölliset. Seurannassa olleen reaktion kohdallakin oli huomattavia vaikeuksia saada enantiomeerit erottumaan samalla pitäen signaalin intensiteetin tarvittavan korkealla sen havaitsemiseksi. Tämä instrumenttimetodi oli juuri siinä rajoilla. Tosin tässäkin syynä pääasiassa on se, että tuotetta ei muodostu reaktiossa merkittäviä määriä ja täten GC:lle ajettava näyte oli tuotteen suhteen erittäin laimea.

Myös se seikka, että sisäisen standardin retentioaika oli niin paljon pienempi kuin tuotteen vaikuttaa itse tuotteen konsentraatiomäärityksen pätevyyyteen ja tarkkuuteen merkittävästi. Tätä varten olisi hyvä tutkia reaktiota myös toisilla sisäisillä standardeilla, jotta tuotteen näkökulmasta konsentraation määritykset olisivat tarkkoja. Itse seurattuun lähtöaineeseen tämä ei tosin vaikuta. Kuitenkin sisäisen standardin kohdalla havaittiin paljon pinta-alan vaihtelua ja tämä todennäköisesti tekee saadusta datasta epätarkempaa.

Katalyytti ei myöskään toiminut humilisiini E-projektin Pfau-d'Angelo reaktioon sillä GC:llä tutkittuna ei tuotetta muodostunut laisinkaan pitkästä reaktioajasta riippumatta. Mahdollisena syynä voi olla se, että 2-metyylisykloheksanonin (**81**) metyyli substituentti on steerisesti vähemmän estävä kuin 2-isopropyylisyklopentanonin (**96**) vastaava. Carterin tutkimuksessa Pfau-d'Angelo reaktio onnistui useiden eri ketonisubstraattien kanssa. Reaktio tehtiin kuitenkin tutkimuksen perusteella paremalla katalyytillä **84f**. Täten olisi myös mielenkiintoista nähdä ja tutkia, että toimisiko tämä katalyytti Humilisin E:n Pfau-d'Angelo vaiheelle paremmin. Tältä osin voidaan siis todeta, että organokatalyyttinen vaihtoehto kyseiselle vaiheelle ei ole järkevä, kun stoikiometrinen menetelmä tuottaa haluttua yhdistettä tarvittavan hyvin tämän hetkiseen

tutkimukseen. Kuitenkin myöhemmin, jos tarkoituksena olisi esimerkiksi optimoida humilisiini E:n totaalisynteesiä enemmän, voisi tähän organokatalyyttiseen menetelmään paneutua yhtenä vaihtoehtona.

Pyrkimyksenä ja tavoitteena oli myös valmistaa katalyyttiä ensin kiraalisen resoluution tuotteena saadusta tartraattisuolasta. Kuitenkin tähän ei kyetty, sillä tuotteen enantiopuhtauden kanssa tuli vastaan teknisiä ongelmia usein eri tavoin. Esimerkiksi kolonnien ollessa erilaiset kuin kirjallisuudessa, oli vertailukelpoisuuden saaminen datalle hankalaa. Useita kolonneja kokeiltiin, mutta tulokset eivät hirveästi parantuneet tästä. Pääasiallisena seikkana tähän oli se, että raseemisesta lähtöaineesta tehdyn referenssin ja toisesta enantiomeerista tehdyn näytteen kohdalla oli paljon ristiriitaisuutta. Tämän lisäksi itse HPLC -instrumentin tietokoneterminaalin rikkoutuminen oli esteenä viimeisille mittauksille, minkä takia siirryttiin käyttämään kaupallisesti saatavilla olevaa amiinia. Täten olisi siis myös ehkä mielenkiintoista nähdä minkälaista tulosta katalyytin synteesistä saataisiin jos lähtöaineena olisi kaupallisen, enantiopuhtaan tapauksen sijasta tämän resoluution tuote. Resoluution pääasiallisena tuotteena oli *R,R*-konfiguraation amiini ja kaupallinen amiini oli *S,S*-konfiguraatiota, mikä tietenkin vaikuttaa itse katalyytin konfiguraatioon. Täten käytössä olleen katalyytin kohdalla olisi voitu tehdä vertailua enantiomeerien välillä Pfau-d'Angelo reaktioon katalyyttiä sovellettaessa.

Itse katalyytin synteesissä ei ollut yllättäviä haasteita vaan pääasiassa siinä yhteydessä saadut heikko ja keskinkertainen saanto (17 % ja 47 %) kirjallisuuteen<sup>153</sup> verrattuna (75 %) ovat pääasiassa huolellisuuteen liittyviä seikkoja, sekä reaktiohallintaan liittyvää kokemuksen kartuttamista. Pääasiallisena syynä luultavasti oli ilma- ja kosteuserkkien menetelmien käyttö. Tämä vaikutti merkittävästi tehtyjen synteesien väliseen saantojen eroon. Syynä oli, että ensimmäisen synteesin kohdalla ei reaktiokolvia kuivattu uunissa ennen reaktion aloitusta ja täten luultavasti kolvissa oli kosteutta. Tämän lisäksi inertin atmosfäärin saattamisessa kolviin saattoi tapahtua virheitä. Reaktio myös tehtiin eri mittakaavassa ja välineistöllä kuin kirjallisuudessa<sup>153</sup> (teollinen 4 L reaktori vs. laboriokolvi), mikä voi olla vaikuttamassa saantoon. Kiehtovaa olisi nähdä miten synteesin saanto paranisi, kun synteesiä toistettaisiin muutamia kertoja näiden kahden lisäksi. Aikamääreessä pysymisessä johtuen ei tätä kyetty toistamaan vielä kolmatta kertaa vaan reaktio seurattuun reaktioon käytettiin toisen tutkijan tuotetta. Katalyytin synteesissä tuotteena oli suola ja reaktio seuranta varten se piti vapauttaa suolasta amiiniksi, jonka toinen tutkija teki. Suolasta vapauttamisen tekeminen itsenäisesti olisi kiehtovaa ja houkuttelevaa ja se olisi yksi jatkotutkimuksen osa-alueista varmasti.

## 9. Kokeelliset menetelmät

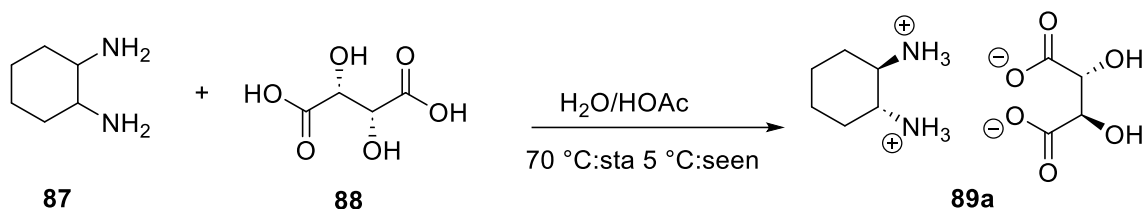
### 9.1. Yleiset menetelmät

Kaikki reaktiot suoritettiin suojaamattomassa atmosfäärissä ellei toisin ole mainittu. Laboratorion lasitavarat olivat uunikuivattuja ja kun tarvetta oli, ilma- ja kosteusherhät reagenssit siirettiin argonin alla ruiskuilla. Liuottimet ja reagenssit olivat kaikki kaupallisia ja niitä käytettiin kuten ne oltiin saatu toimittajilta. Analyytinen TLC tehtiin Merck silikageelilevyille F254 (230–400 mesh) ja ne analysoitiin UV-valon tai väriaineen avulla. Väriaineena toimivat vanliiniliuos (6 g vaniliinia, 100 ml konsentroitua H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3 ml jäätikkahappoa, 250 ml EtOH) tai KMnO<sub>4</sub> liuos (1 g KmnO<sub>4</sub>, 6,7 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1,7 ml 1M NaOH, 100 ml H<sub>2</sub>O). Silikageelikromatografiaan käytettiin flash-kromatografia tekniikkaa CombiFlash Rf 200 instrumentin avulla käyttäen Redisep Gold kolonneja (20–40 µm pyöreä silika, 400–632 mesh). Deaktivoitu silikageeli kromatografiaa varten oli tehty aikaisemmin lisäämällä Et<sub>3</sub>N (~1 paino-%) heksaanien ja silikan sohjoon. Sohjoa sekoitettiin, se suodatettiin ja kuivattiin ilmassa. Kaikki liuottimet olivat HPLC laatusia tai vastaavia jos ei muuten mainita.

<sup>1</sup>H-NMR ja <sup>13</sup>C-NMR spektrit mitattiin CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O ja DMSO-d<sub>6</sub> liuottimissa käyttäen Bruker Avance 500 ja 300 spektrometrejä. Kemialliset siirtymät on ilmoitettu ppm:inä suhteessa CHCl<sub>3</sub> (δ 7,26), H<sub>2</sub>O (δ 4,80) tai DMSO (δ 2,50) <sup>1</sup>H-NMR:n kohdalla. Vastaavasti <sup>13</sup>C-NMR:n kohdalla CDCl<sub>3</sub> (δ 77,16) ja DMSO-d<sub>6</sub> (δ 39,51) toimivat sisäisinä standardeina. Enantiomeerien suhteet (*er*) määritettiin yhdisteille vastaaviin rasemiisiin näytteisiin verratten käyttäen HPLC menetelmää, jossa instrumenttina toimi Waters 501 pumppu, Waters 486 detektori, tai GC menetelmää, jossa instrumenttina oli Agilent Technologies 7820A GC, jossa oli SUPELCO Astec CHIRALDEX B-DM kolonni. Sulamispisteet määritettiin avoimissa kapillaareissa joko Stuart sulamispistelaitteella tai Büchi B-540 sulamispistelaitteella. IR spektrit mitattiin Tensor27 FT-IR spektrometrilla.

## 9.2. Synteetit

### 9.2.1. (*R,R*)-1,2-Diammoniumsykloheksaani monotartraatti<sup>150</sup>

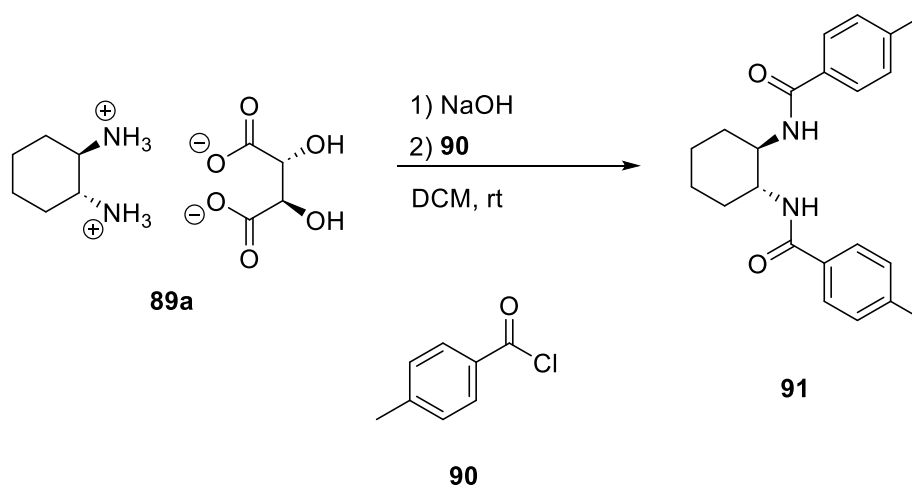


Tyhjään 100 ml dekanterilasiin annosteltiin L-(+)-viinihappoa (**88**) (7,5 g, 50 mmol, 1 ekviv) ja se liuotettiin huoneenlämpötilassa 25 ml ionivaihdettua vettä samalla sekoittaen voimakkaasti. Liuokseen annosteltiin huoneenlämpötilassa raseemista *trans*-1,2-diaminosykloheksaania (**87**) (12,0 ml, 11,4 g, 99,8 mmol, 1 ekviv) hitaasti ruiskulla. Tämä nosti reaktion lämpötilaa aina 55 °C:seen. Liuoksesta tuli keltainen ja samea. Liuoksen annettiin kirkastua ennen kuin siihen lisättiin varovasti ruiskulla 5 ml vedetöntä etikkahappoa (Glacial AcOH), mikä nosti lämpötilan 70 °C:seen. Reaktioon annettiin viilentyä huoneenlämpötilaan kolmen tunnin kuluessa, jonka jälkeen liuosta jäähdytettiin jäähauteella noin 5 °C:seen, missä reaktioon annettiin olla tunnin verran. Liuokseen muodostui saostuma reaktion viilentyessä ja se suodatettiin. Saostumaa pestiin 5 ml kylmää ionivaihdettua vettä sekä 4 x 5 ml MeOH tuottaen kellertävän-valkoisen tahnan. Tahnaa kuivattiin alipaineessa, jonka jälkeen suodatus, pesu ja kuivaus toistettiin tuottaen valkoisen jauheen. Jauhe liuotettiin n. 80 °C ionivaihdettuun veteen ja sen annettiin uudelleenkiteytyä hitaasti liuosta jäähdyttäen. Uudelleen kiteytyksen jälkeen jauheen suodatus, pesu ja kuivaus toistettiin kertaalleen. Saantona oli 2,9 g (44 %) tuotetta. Tuote oli vaalea jauhe.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.67 (liuotin), 4.64 (s, 4H), 4.31 – 4.24 (m, 1H), 3.35 – 3.26 (m, 1H), 2.10 (d, *J* = 12.9 Hz, 1H), 1.76 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 1.51 – 1.41 (m, 1H), 1.31 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H) [Liite 8]. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 73.9, 52.3, 29.5, 22.9 [Liite 9]. IR: 2856, 2461, 2134, 1649, 1582, 1398, 1379, 1307, 1268, 1225, 1158, 1135, 1090, 1053, 995, 924, 834, 805, 709, 603, 565, 513, 445. Sulamispiste: 274–280 °C

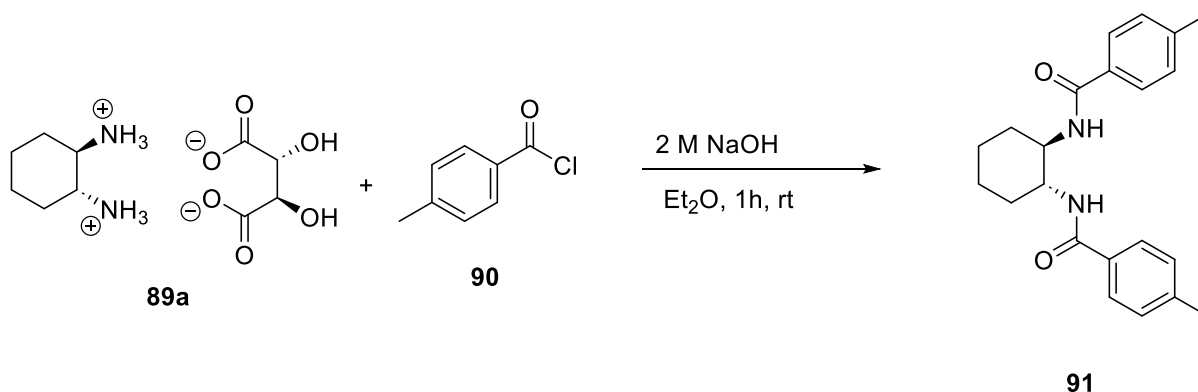
Alkuperäisessä reseptissä<sup>150</sup> ei ollut NMR-spektrejä, mutta verrattaen toiseen artikkeliin<sup>155</sup> spektrit vastaavat kirjallisuuden arvoja. Myös sulamispiste vastaa kirjallisuuden arvoja.<sup>155</sup>

### 9.2.2. *N,N'*-((1*R*, 2*R*)-sykloheksaani-1,2-diiyli)bis(4-metyyli-bentsamidi)<sup>150</sup>



25 mg (0,095 mmol, 1 ekviv) tartraattia (**88a**) siirrettiin tyhjään koeputkeen huoneenlämpötilassa. Koeputkeen lisättiin ruiskuilla 1,5 ml dikloorimetaania (DCM) ja 0,5 ml 4 M NaOH-vesiliuosta. Putkeen muodostui kaksi faasia, ja näitä sekoitettiin voimakkaasti vortekserilla 30 sekuntia. Putkeen, alempaan faasiin lisättiin lasiruiskulla varovasti 50  $\mu$ L (0,378 mmol, 4 ekviv) *p*-toluoyylikloridia (**89**). Faaseja sekoitettiin vielä kertaalleen voimakkaasti vortekserilla 30 sekuntia. Alemmasta orgaanisesta faasista otettiin lasiruiskulla 250  $\mu$ L näyte, joka laimennettiin 10 ml isopropyylialkoholia. Laimennoksesta otettiin 1 ml näyte HPLC vialliin ruiskun ja ruiskusuodattimen avulla. HPLC ajettiin 10  $\mu$ L näyte ja virtausnopeutena oli 1,0 ml/min, eluenttian *n*-heksaani/isopropyylialkoholi (90:10 v/v). Kolonnina HPLC:llä oli Chiralpak-IB. Retentioaika ensimmäiselle enantiomeerille oli 4,0 minuuttia ja toiselle 4,9 minuuttia. Menetelmä toistettiin käyttämällä raseemista lähtöainetta **86** vertailureferenssin valmistamiseksi. HPLC-kromatogrammista *ee*:ksi 84% [Liite 10 ja 11]. Tuloksia on vertailtu kirjallisuuden arvoihin<sup>150,151</sup>.

Reaktio tehtiin myös toisella menetelmällä<sup>151</sup> NMR ja IR-spektrien sekä sulamispisteiden mittaamiseksi.

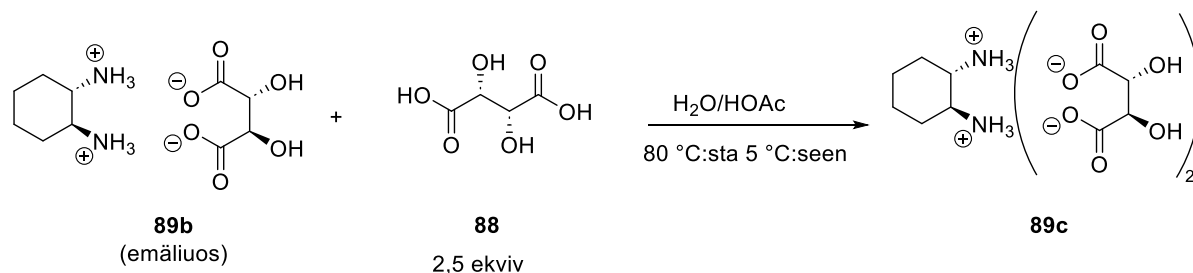


100 mg (0,37 mmol, 1 ekviv) tartraattisuolaa (**88a**) punnittiin tyhjään kolviin. Kolviin lisättiin ruiskuilla Et<sub>2</sub>O:ta (5 ml) ja 2 M NaOH-vesiliuosta (3 ml) huoneenlämpötilassa. Kolviin muodostui kaksi faasia, joista ylempi orgaaninen faasi oli samea. Kolviin lisättiin lasiruiskulla 200 µL (1,51 mmol, 4 ekviv) *p*-toluoyylikloridia (**89**) varovasti. Orgaaniseen faasiin muodostui valkoinen saostuma. Liuoksen faaseja sekoitettiin tunnin ajan magneettisauvalla. Tämän jälkeen kolviin lisättiin ruiskuilla huoneenlämpötilassa 20 ml EtOAc:ta ja 10 ml 1 M NaHSO<sub>4</sub>-vesiliuosta. Muodostunut saostuma liukeni lisäysten jälkeen. Faasit eroteltiin ja orgaaninen faasi haihdutettiin alipaineessa ja kuivattiin loppuun vakuumissa. Tuotteena oli valkoinen jauhe (87 mg, 65 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.98 (dd, *J* = 7.1, 2.6 Hz, 1H), 7.57 (d, *J* = 7.9 Hz, 4H), 7.32 – 7.19 (m, 2H), 7.02 (dd, *J* = 14.7, 6.9 Hz, 6H), 4.03 (s, 2H), 2.41 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.28 (s, 6H), 2.18 (d, *J* = 9.8 Hz, 2H), 1.42 (s, 3H) [Liite 12]. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168.3, 141.7, 131.4, 130.2, 129.1, 127.0, 77.5, 77.0, 76.6, 54.4, 32.4, 24.9, 21.7, 21.4 [Liite 13]. IR: 3304, 2923, 2856, 1627, 1573, 1530, 1504, 1371, 1328, 1303, 1206, 1186, 1157, 1094, 1022, 949, 881, 833, 755, 708, 664, 632, 610, 577, 543, 506, 474, 450, 421. Sulamispiste 245–250 °C.

<sup>1</sup>H NMR-spektri vastaa pääpiirteissään kirjallisuuden arvoja.<sup>151</sup> Sulamispiste oli erilainen kuin kirjallisuudessa.<sup>151</sup>

### 9.2.3. (*S,S*)-1,2-Diammoniumsykloheksaani monotartraatti<sup>150,152</sup>



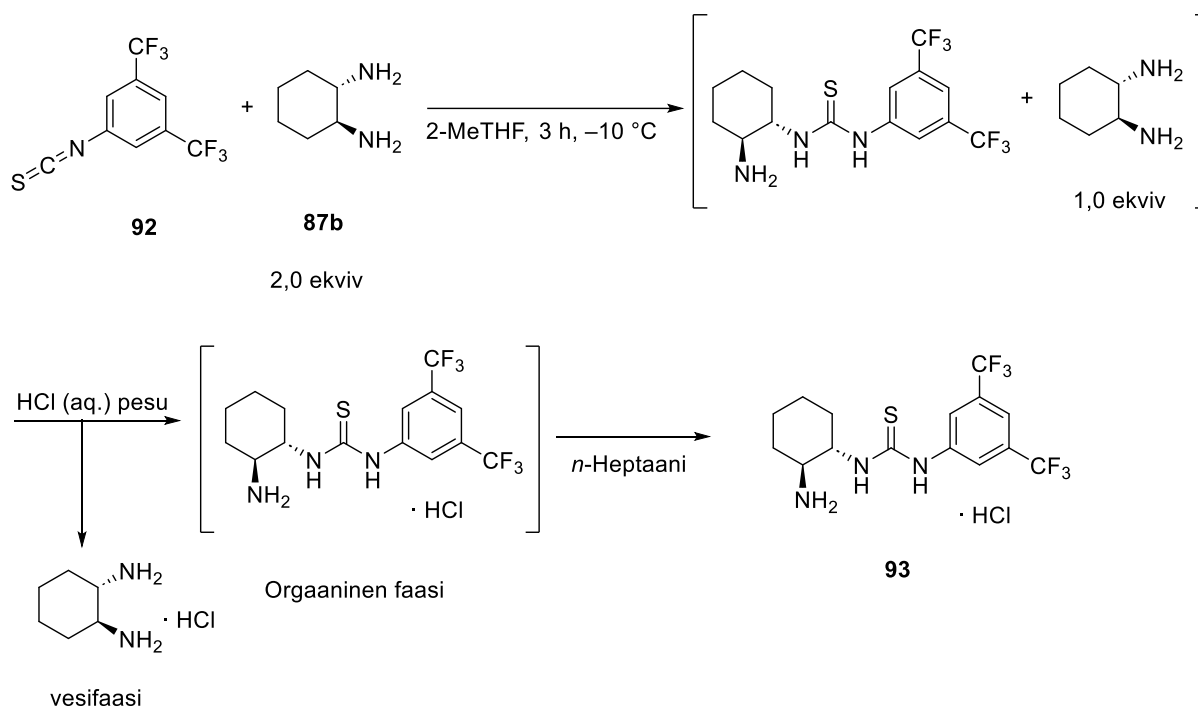
Yhdisteen **89a**:n synteesin (Luku 9.2.1.) pesun yhteydessä saatu emäliuos lämmitettiin kolvissa  $80\text{ }^\circ\text{C}$ :seen ja siihen lisättiin 19,3 g (129 mmol, 2,5 ekviv) (L-(+)-viinihappoa (**88**)). Liuosta sekoitettiin tunti ja sen annettiin jäähtyä huoneenlämpötilaan yön yli. Liuos oli alunperin väriltään oranssin-ruskea, ja yön jälkeen se oli tumman ruskea. Tämän oli tarkoitus olla uudelleenkiteytys, mutta saostumaa ei muodostunut edes jäähauteella jäähdyttäessä. Liuos haihdutettiin alipaineessa kunnes kolviin jäi vaalean ruskea saostuma. Tämä saostuma suodatettiin ja pestiin 50 ml vedellä ja 4 x 50 ml metanolilla. Jäljelle jäänyt valkoinen jauhe kuivattiin loppuun vakuumin alla. Jauhetta saatiin 1,66 g, mutta saantoa ei voitu tästä määrittää.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  4.38 (s, 2H), 3.33 – 3.15 (m, 1H), 2.02 (d,  $J = 12.8$  Hz, 1H), 1.70 (dd,  $J = 21.0, 9.8$  Hz, 1H), 1.39 (p,  $J = 10.4$  Hz, 1H), 1.20 (t,  $J = 10.6$  Hz, 1H) [Liite 14].  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  176.5, 72.9, 52.1, 49.9, 29.3, 25.8, 22.8, 20.2 [Liite 15]. IR: 3540, 3447, 2960, 1716, 1568, 1524, 1449, 1399, 1324, 1286, 1258, 1145, 1131, 1112, 1065, 1048, 1022, 875, 846, 818, 777, 664, 613, 588, 495, 444. Sulamispiste  $143\text{--}160\text{ }^\circ\text{C}$ .

Tuottelle ei löytynyt kirjallisuudesta vastaavia NMR spektrejä tai sulamispistedataa.



### 9.2.4. 1-((1*S*,2*S*)-2-aminosykloheksyyli)-3-(3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli)tiourea hydrokloridi<sup>153</sup>

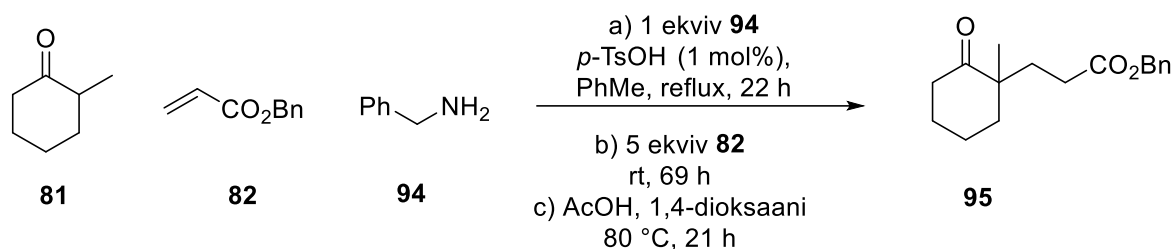


Uunissa kuivattu kaksikaulakolvi viilennettiin huoneenlämpötilaan argonin alla. Kolviin punnittiin 5 g (43,8 mmol, 2,67 ekv) (*S,S*)-*trans*-1,2-diaminosykloheksaania (**87b**) ja se liuotettiin 40 ml:n 2-MeTHF:ää lisäämällä sitä ruiskulla. Liuos jäädytettiin -10 °C lämpötilaan. 3 ml (4,46 g, 16,4 mmol, 1 ekv) 3,5-bis(trifluorometyyli)fenyyli-isotiosyanaattia (**92**) liuotettiin 40 ml 2-MeTHF:ää. Tämä liuos lisättiin pisaroittain kaksikaulakolviin tiputussuppilon avulla noin kahden tunnin ajan. Liuokseen lisättiin 50 ml 6 M HCl-vesiliuosta pisaroittain tiputussuppilon avulla 30 minuutin ajan. Liuoksen annettiin sekoittua vielä 10 minuuttia ennen kuin jäädytys lopettiin ja liuoksen annettiin lämmitä huoneenlämpöön. Muodostuneet kaksi faasia eroiteltiin ja orgaaninen faasi siirrettiin yksikaulakolviin ja se konsentroidtiin alipaineessa, jonka jälkeen liuokseen lisättiin ruiskulla 20 ml 2-MeTHF:ää. Liuos siirrettiin toiseen kaksikaulakolviin ja lämmitettiin 45 °C lämpötilaan ja siihen lisättiin tiputussuppilolla 120 ml *n*-heptaania kolmen tunnin ajan. Lämmitys lopetettiin ja liuos annettiin jäähtyä hitaasti huoneenlämpötilaan, jonka jälkeen sen annettiin olla yön yli. Muodustunut saostuma suodatettiin ja pestiin ensin 40 ml *n*-heptaanin/2-MeTHF:n (3:1 v/v) seoksella, minkä jälkeen saostuma pestiin 40 ml *n*-heptaanilla. Saatu ruskea kiteinen jauhe (2,97 g, 47 %) kuivattiin vakuumin alla.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  10.88 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.30 (s, 4H), 8.08 (s, 3H), 7.69 (s, 2H), 4.30 (d,  $J = 9.9$  Hz, 2H), 3.03 (dt,  $J = 10.9, 5.7$  Hz, 2H), 1.99 (t,  $J = 13.7$  Hz, 4H), 1.67 (d,  $J = 8.9$  Hz, 4H), 1.41 (d,  $J = 12.0$  Hz, 2H), 1.25 (d,  $J = 10.6$  Hz, 6H) [Liite 16].  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO)  $\delta$  181.4, 142.7, 131.2, 130.8, 130.3, 129.9, 125.5, 121.9, 116.3, 55.1, 53.6, 40.8, 40.6, 40.3, 40.0, 39.7, 39.5, 39.2, 30.9, 29.6, 24.3, 23.6 [Liite 17]. IR: 2953, 2868, 1597, 1538, 1505, 1470, 1390, 1347, 1297, 1273, 1216, 1174, 1145, 1108, 1022, 1001, 967, 944, 881, 850, 757, 701, 679, 605, 547, 504, 463, 411. Sulamispiste: 205–210 °C.

$^1\text{H}$  NMR -ja  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrit vastaavat kirjallisuuden spektrejä.<sup>153</sup>

### 9.2.5. Bentsyyli 3-(1-metyyli-2-oksosykloheksyyli)propanoaatti<sup>154</sup>

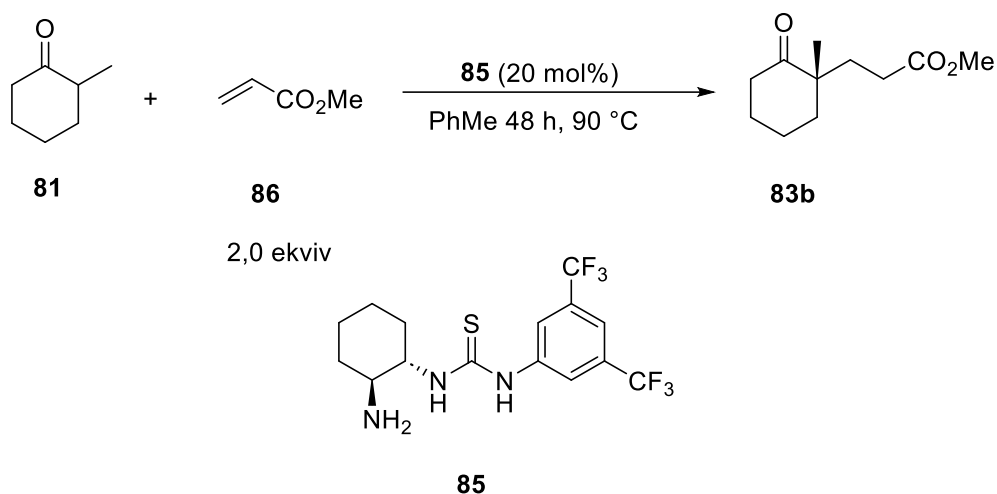


Kolviin lisättiin 20 ml tolueenia liuottimeksi. Kolviin sitten lisättiin huoneenlämmössä ruiskuilla 540  $\mu$ L (4,45 mmol, 1 ekviv) 2-metyylisykloheksanonia (**81**), 490  $\mu$ L (4,48 mmol, 1 ekviv) bentsyyliamiinia (**94**) ja punniten katalyytiksi 8,00 mg (0,046 mmol, 0,01 ekviv) *p*-tolueenisulfonihappoa (*p*-TsOH). Reaktiota refluksoitii Dean-Stark laitteella 21 tuntia, jonka jälkeen liuos seiso huoneenlämpötilassa yhden vuorokauden. Liuotin haihdutettiin alipaineessa, minkä jälkeen kolviin lisättiin ruiskupumpulla 3,4 ml (22,3 mmol, 5 ekviv) bentsyyliakrylaattia (**82**). Reaktiota sekoitettiin huoneenlämpötilassa viikonlopun yli (69 h). Tämän jälkeen kolviin lisättiin huoneenlämmössä ruiskuilla 10 ml 10 % etikkahappoa ja 4 ml 1,4-dioksaania. Reaktiota lämmitettiin 80 °C asteeseen ja sekoitettiin 21 tuntia. Tämän jälkeen liuoksen annettiin jäähtyä huoneenlämpöön ja se uutettiin dietyylieetterillä. Et<sub>2</sub>O faasi pestiin 4 x 10 ml saturoidulla NaHCO<sub>3</sub>-vesiliuoksella, kuivattiin (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), suodatettiin ja konsentroidtiin normaalissa paineessa pyöröhaihduttimella. Tuote puhdistettiin pylväskromatografisesti (silikageelissä, eluenttina oli EtOAc/heksaanit (20:80 v/v)). Tuote oli vaalean keltainen öljy (425 mg, 35 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.40 – 7.25 (m, 11H), 7.22 (s, 3H), 5.08 (d, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.56 (s, 1H), 2.80 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.47 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.42 – 2.11 (m, 5H), 2.11 – 1.95 (m, 2H), 1.86 – 1.66 (m, 7H), 1.32 – 1.19 (m, 5H), 1.05 (s, 3H), 0.92 – 0.81 (m, 3H) [Liite 18]. <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  215.0, 173.4, 172.3, 139.0, 136.0, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 128.3, 128.2, 128.2, 127.1, 77.6, 77.2, 76.8, 66.3, 66.2, 58.3, 49.3, 47.9, 39.2, 38.7, 32.8, 32.5, 29.3, 27.4, 25.5, 22.4, 21.0 [Liite 19]. IR: 2937, 2866, 1732, 1702, 1597, 1538, 1502, 1455, 1386, 1347, 1298, 1271, 1214, 1150, 1023, 1000, 966, 881, 850, 734, 697, 679, 605, 504, 463, 410. *R*<sub>f</sub> = 0.39.

NMR-spektrit vastaavat kirjallisuutta<sup>156</sup>, mutta sisältää epäpuhtauksia.

### 9.2.6. Metyyli (*S*)-3-(1-metyyli-2-oksosykloheksyyli)propanoaatti<sup>146</sup>

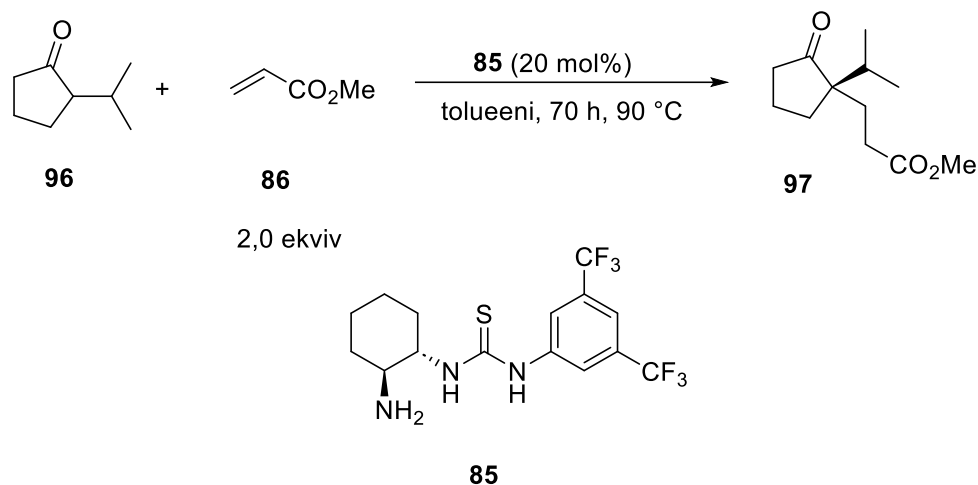


Kolviin huoneenlämpötilassa oli punnittu 958 mg (2,49 mmol) katalyyttiä **85**, joka liuotettiin 2,49 ml tolueenia, josta muodostui 1 M varastoliuos. Varastoliuosta siirettiin 1 ml uunikuivattuun kolviin ja se laimenettiin 5 ml:aan tolueenia muodostaen 0,2 M liuoksen. Tähän liuokseen lisättiin ruiskuilla huoneenlämpötilassa 594  $\mu\text{L}$  (4,89 mmol, 0,979 M, 1 ekviv) 2-metyylisykloheksanonia (**81**), 900  $\mu\text{L}$  (9,99 mmol, 1,999 M, 2 ekviv) metyyliakrylaattia **86** ja 1274  $\mu\text{L}$  (0,979 M) tetradekaania sisäiseksi standardiksi. Liuos oli tässä vaiheessa väriltään oranssi. Liuosta sekoitettiin voimakkaasti vortekserilla ennen kuin siitä otettiin 100  $\mu\text{L}$  näyte. Tämän jälkeen liuosta lämmitettiin 90  $^\circ\text{C}$ :een ja sitä pidettiin tässä lämpötilassa 48 h tai 10 h. Reaktio toistettiin näillä määrillä neljästi. Reaktioista otettiin puolen tunnin tai tunnin välein 100  $\mu\text{L}$  näytteitä.

Reaktio myös tehtiin kerran matalemmissa konsentraatioissa: 0,2 M katalyyttiliuokseen lisättiin ruiskuilla huoneenlämpötilassa 365  $\mu\text{L}$  (3,01 mmol, 0,602 M, 0,62 ekviv) 2-metyylisykloheksanonia (**81**), 730  $\mu\text{L}$  (8,11 mmol, 1,602 M, 2 ekviv) metyyliakrylaattia **86** ja 783  $\mu\text{L}$  (0,602 M) tetradekaania sisäiseksi standardiksi.

Reaktioita seurattiin GC:llä (luku 9.3.) ja GC määrittämänä saantona oli 32 mg (5,8 %). *ee*:ksi GC:llä määritettiin 16 %.

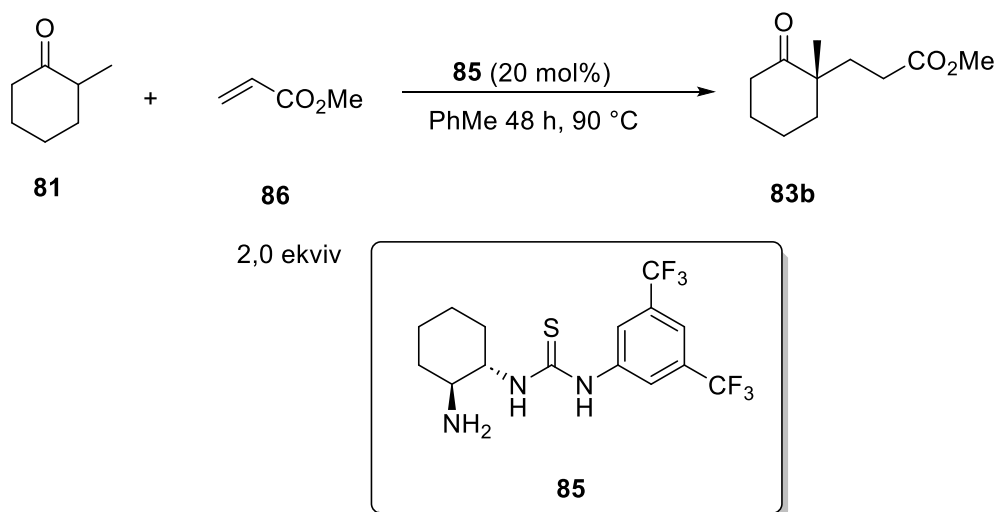
### 9.2.7. Metyyli (*S*)-3-(1-isopropyyli-2-oksosyklopentyli)propanoaatti



0,10 ml katalyytin (**85**) varastoliuosta siirettiin uunikuivattuun vialliin ja se laimenettiin huoneenlämpötilassa 0,5 ml:aan tolueenia. Tähän liuokseen lisättiin ruiskuilla huoneenlämmössä 68 mg (0,539 mmol, 1 ekviv) 2-isopropyylisyklopentanonia (**96**), 90  $\mu\text{L}$  (0,999 mmol, 2 ekviv) metyyliakrylaattia (**86**) ja 137  $\mu\text{L}$  (1 ekviv) tetradekaania sisäseksi standardiksi. Reaktiota lämmitettiin 90  $^\circ\text{C}$ :seen ja sen annettiin sekoittua viikonlopun yli (70 h). Reaktiosta otettiin 100  $\mu\text{L}$  ja ajettiin GC:llä. Kromatogrammia vertailtiin referenssituotteesta tehtiin kromatogrammiin ja tästä nähtiin, että tuotetta ei muodostunut.

### 9.3. Reaktioseuranta

Reaktioseurannassa oli luvun 9.2.6. reaktio eli kaaviossa esitetty yhtälö:



Kolviin huoneenlämpötilassa oli punnittu 958 mg (2,49 mmol) katalyyttiä **85**, joka liuotettiin 2,49 ml tolueenia, josta muodostui 1 M varastoliuos. Varastoliuosta siirettiin 1 ml uunikuivattuun kolviin ja se laimenettiin 5 ml:aan tolueenia muodostaen 0,2 M liuoksen. Tähän liuokseen lisättiin ruiskuilla huoneenlämpötilassa 594  $\mu$ L (4,89 mmol, 0,979 M, 1 ekv) 2-metyylisykloheksanonia (**81**), 900  $\mu$ L (9,99 mmol, 1,999 M, 2 ekv) metyyliakrylaattia **86** ja 1274  $\mu$ L (0,979 M) tetradekaania sisäiseksi standardiksi. Liuos oli tässä vaiheessa väriltään oranssi. Liuosta sekoitettiin voimakkaasti vortekserilla ennen kuin siitä otettiin 100  $\mu$ L näyte. Tämän jälkeen liuosta lämmitettiin 90 °C:een ja sitä pidettiin tässä lämpötilassa 48 h tai 10 h. Reaktio toistettiin näillä määrillä neljästi. Reaktioista otettiin puolen tunnin tai tunnin välein 100  $\mu$ L näytteitä.

Reaktio myös tehtiin kerran matalemmissa konsentraatioissa: 0,2 M katalyytiliuokseen lisättiin ruiskuilla huoneenlämpötilassa 365  $\mu$ L (3,01 mmol, 0,602 M, 0,62 ekv) 2-metyylisykloheksanonia (**81**), 730  $\mu$ L (8,11 mmol, 1,602 M, 2 ekv) metyyliakrylaattia **86** ja 783  $\mu$ L (0,602 M) tetradekaania sisäiseksi standardiksi.

### 9.3.1 Näytteiden valmistus ja mittaus menetelmä

Reaktioseoksesta otettiin 100  $\mu\text{L}$  näyte automaattipipetillä ja se siirrettiin eppendorf-vialliin. Näyte laimennettiin lisäämällä vialliin 900  $\mu\text{L}$   $\text{Et}_2\text{O}$ :ta. Vialliin lisättiin tämän jälkeen 100  $\mu\text{L}$  2 M  $\text{KHSO}_4$ -vesiliuosta reaktion sammutukseksi. Liuosta sekoitettiin voimakkaasti vortekserilla 30 sekuntia. Vialliin lisättiin kuivausainetta ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) kolmen pienen spaattelin verran. Liuos ja kuivausaine sentrifugoitiin (60 s, 1300 RPM) tehden näytteelle mini-uutto. Orgaaninen faasi otettiin varovasti ruiskuun ja siirrettiin GC-vialliin ruiskusuodattimen läpi. Näytteet olivat vaalean kellertäviä. Vialli suljettiin ja tarpeen vaatiessa käärittiin parafilmiin ja vietiin jääkaappiin. Näytteitä otettiin reaktioista 12 kappaletta

Jotta reaktionäytteitä voitiin käsitellä, piti reaktioiden komponenteille sekä sisäielle standardille tehdä referenssinäytteet ja mitata niistä kromatogrammit. Nämä näytteet tehtiin punnitsemalla 6–8 mg yhdistettä GC-vialliin ja liuottaen sen 1 ml  $\text{Et}_2\text{O}$ :a. Näytteet mitattiin isotermisesti 100  $^\circ\text{C}$  lämpötilassa, kantajakaasun virtausnopeutena oli 1,8805 ml/min ja ajon kestona 70 minuuttia. Reaktionäytteet ajettiin samalla menetelmällä.

### 9.4. Koe yhdellä ekvivalentilla katalyyttiä

Reaktiokomponenttien kohdalla havaitun inhibiition tutkimiseksi päädyttiin tekemään NMR-koee, jossa lähtöainetta **81**, tuotteen **83** raseemista seosta sekä katalyyttiä **85** laitettiin näyteputkeen yhden ekvivalentin verran. Määräksi otettiin 100  $\mu\text{mol}$  eli 11,22 mg (12  $\mu\text{l}$ ) substraattia **81**, 19,83 mg tuotteen **83** raseemista seosta ja 38,54 mg katalyyttiä **85**. Seoksesta saatua  $^1\text{H}$  NMR-spektriä verrattiin komponenteille tehtyihin referenssispektreihin. Seosta lämmittettiin vielä öljyhauteessa n. 30 h ennen kuin sille mitattiin uusi spektri. Lämmityksen jälkeen NMR-näytteen väri muuttui ruskeasta punertavaksi. NMR-liuottimen näytteille oli DMSO- $d_6$ . Spektrit ovat liitteessä 7.

## 10. Yhteenveto

Kokeellisessa osassa tehtiin reaktiokineettistä reaktioseuranta halutulle Pfau-d'Angelo reaktiolle. Saatu data myös osoitti osaltaan lähtökohtaisen hypoteesin reaktion hankaluuksista päteviksi. Hypoteesina oli, että reaktiossa tapahtuu inhibiitiota katalyytin kohdalla ja katalyytti jää loukkuun pysäyttäen reaktion hyvin pian. Samalla myös pystyttiin kokeilemaan toimisiko käytetty katalyytti Humilisin E:n totaalisynteesin Pfau-d'Angelo vaiheeseen. Tästä saatiin tulokseksi, että katalyytti ei toimi reaktiossa. Synteeseissä katalyytin valmistamiseksi onnistuttiin kaupallisilla lähtöaineilla. Synteeseissä ei käytetty laboratoriossa valmistettua lähtöainetta, sillä sen enantiopuhtautta ei onnistuttu määrittämään tarpeeksi hyvin. Katalyyttiä itsessään saatiin keskinertaisesti saantona, mutta pieneen mittakaavaan se olisi käynyt erittäin hyvin sinällään. Same excess -kokeet osoittautuivat hyvinkin helpoiksi suunnitella ja toteuttaa käytännössä. Täten VTNA:n käyttö menetelmänä kineettiseen tarkasteluun voidaan nähdä esimerkillisenä.



## 11. Kirjallisuusluettelo

1. Alamillo-Ferrer, C.; Hutchinson, G.; Burés, J. Mechanistic Interpretation of Orders in Catalyst Greater than One. *Nat Rev Chem* **2022**, *7* (1), 26–34.
2. Burés, J. What Is the Order of a Reaction? *Top Catal* **2017**, *60* (8), 631–633.
3. Sunoj, R. B.; Bhaskararao, B. Two Chiral Catalysts in Action: Insights into Cooperativity and Stereoselectivity in Proline and Cinchona-Thiourea Dual Organocatalysis. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 8738–8747.
4. Allen, A. E.; MacMillan, D. W. C. Synergistic Catalysis: A Powerful Synthetic Strategy for New Reaction Development. *Chem. Sci.* **2012**, *3* (3), 633.
5. Shibasaki, M.; Kanai, M.; Matsunaga, S.; Kumagai, N. Recent Progress in Asymmetric Bifunctional Catalysis Using Multimetallic Systems. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42* (8), 1117–1127.
6. Van Santen, R. A.; Niemantsverdriet, J. W. *Chemical Kinetics and Catalysis*; Twigg, M. V., Spencer, M. S., Series Eds.; Fundamental and Applied Catalysis; Springer US: Boston, MA, 1995.
7. Sträter, N.; Lipscomb, W. N.; Klabunde, T.; Krebs, B. Two-Metal Ion Catalysis in Enzymatic Acyl- and Phosphoryl-Transfer Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (18), 2024–2055.
8. Galván, A.; Fañanás, F. J.; Rodríguez, F. Multicomponent and Multicatalytic Reactions – A Synthetic Strategy Inspired by Nature. *Eur J Inorg Chem* **2016**, *2016* (9), 1306–1313.
9. Trautz, M. Das Gesetz der Reaktionsgeschwindigkeit und der Gleichgewichte in Gasen. Bestätigung der Additivität von  $C_v - 3/2R$ . Neue Bestimmung der Integrationskonstanten und der Moleküldurchmesser. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1916**, *96* (1), 1–28.
10. *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book*, 4th ed.; Gold, V., Ed.; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC): Research Triangle Park, NC, 2019.
11. Lewis, W. C. M. XLI.—Studies in Catalysis. Part IX. The Calculation in Absolute Measure of Velocity Constants and Equilibrium Constants in Gaseous Systems. *J. Chem. Soc., Trans.* **1918**, *113* (0), 471–492.
12. Patil, N. T.; Shinde, V. S.; Gajula, B. A One-Pot Catalysis: The Strategic Classification with Some Recent Examples. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (2), 211–224.

13. Chapman, C.; Frost, C. Tandem and Domino Catalytic Strategies for Enantioselective Synthesis. *Synthesis* **2007**, *2007* (1), 1–21.
14. Poli, G.; Giambastiani, G. An Epiisopropodophyllin Aza Analogue via Palladium-Catalyzed Pseudo-Domino Cyclization. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (26), 9456–9459.
15. Wasilke, J.-C.; Obrey, S. J.; Baker, R. T.; Bazan, G. C. Concurrent Tandem Catalysis. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (3), 1001–1020.
16. Lee, J. M.; Na, Y.; Han, H.; Chang, S. Cooperative Multi-Catalyst Systems for One-Pot Organic Transformations. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33* (5), 302.
17. Fogg, D. E.; Dos Santos, E. N. Tandem Catalysis: A Taxonomy and Illustrative Review. *Coordination Chemistry Reviews* **2004**, *248* (21–24), 2365–2379.
18. Huang, Y.; Walji, A. M.; Larsen, C. H.; MacMillan, D. W. C. Enantioselective Organo-Cascade Catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (43), 15051–15053.
19. Chamberlain, B. M.; Cheng, M.; Moore, D. R.; Ovitt, T. M.; Lobkovsky, E. B.; Coates, G. W. Polymerization of Lactide with Zinc and Magnesium  $\beta$ -Diiminate Complexes: Stereocontrol and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (14), 3229–3238.
20. Zhang, Y.; Torker, S.; Sigrist, M.; Bregović, N.; Dydio, P. Binuclear Pd(I)–Pd(I) Catalysis Assisted by Iodide Ligands for Selective Hydroformylation of Alkenes and Alkynes. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142* (42), 18251–18265.
21. Wang, D.; Izawa, Y.; Stahl, S. S. Pd-Catalyzed Aerobic Oxidative Coupling of Arenes: Evidence for Transmetalation between Two Pd(II)-Aryl Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (28), 9914–9917.
22. Dengler, J. E.; Lehenmeier, M. W.; Klaus, S.; Anderson, C. E.; Herdtweck, E.; Rieger, B. A One-Component Iron Catalyst for Cyclic Propylene Carbonate Synthesis. *Eur J Inorg Chem* **2011**, *2011* (3), 336–343.
23. Han, H.; Park, S. B.; Kim, S. K.; Chang, S. Copper–Nitrenoid Formation and Transfer in Catalytic Olefin Aziridination Utilizing Chelating 2-Pyridylsulfonyl Moieties. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (7), 2862–2870.
24. Bartoszewicz, A.; González Miera, G.; Marcos, R.; Norrby, P.-O.; Martín-Matute, B. Mechanistic Studies on the Alkylation of Amines with Alcohols Catalyzed by a Bifunctional Iridium Complex. *ACS Catal.* **2015**, *5* (6), 3704–3716.

25. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th, completely revised and greatly enlarged edition ed.; Wiley-Blackwell: Weinheim, Germany, 2012.
26. Blackmond, D. G. Reaction Progress Kinetic Analysis: A Powerful Methodology for Mechanistic Studies of Complex Catalytic Reactions. *Angew Chem Int Ed* **2005**, *44* (28), 4302–4320.
27. Lineweaver, H.; Burk, D. The Determination of Enzyme Dissociation Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56* (3), 658–666.
28. Mathew, J. S.; Klussmann, M.; Iwamura, H.; Valera, F.; Futran, A.; Emanuelsson, E. A. C.; Blackmond, D. G. Investigations of Pd-Catalyzed ArX Coupling Reactions Informed by Reaction Progress Kinetic Analysis. *J. Org. Chem.* **2006**, *71* (13), 4711–4722.
29. Rosner, T.; Sears, P. J.; Nugent, W. A.; Blackmond, D. G. Kinetic Investigations of Product Inhibition in the Amino Alcohol-Catalyzed Asymmetric Alkylation of Benzaldehyde with Diethylzinc. *Org. Lett.* **2000**, *2* (16), 2511–2513.
30. Blackmond, D. G.; McMillan, C. R.; Ramdeehul, S.; Schorm, A.; Brown, J. M. Origins of Asymmetric Amplification in Autocatalytic Alkylzinc Additions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (41), 10103–10104.
31. Buono, F.; Walsh, P. J.; Blackmond, D. G. Rationalization of Anomalous Nonlinear Effects in the Alkylation of Substituted Benzaldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (46), 13652–13653.
32. Nielsen, L. P. C.; Stevenson, C. P.; Blackmond, D. G.; Jacobsen, E. N. Mechanistic Investigation Leads to a Synthetic Improvement in the Hydrolytic Kinetic Resolution of Terminal Epoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (5), 1360–1362.
33. Burés, J. A Simple Graphical Method to Determine the Order in Catalyst. *Angew Chem Int Ed* **2016**, *55* (6), 2028–2031.
34. Burés, J. Variable Time Normalization Analysis: General Graphical Elucidation of Reaction Orders from Concentration Profiles. *Angew Chem Int Ed* **2016**, *55* (52), 16084–16087.
35. Nielsen, C. D.-T.; Burés, J. Visual Kinetic Analysis. *Chem. Sci.* **2019**, *10* (2), 348–353.
36. Mahy, W.; Plucinski, P.; Jover, J.; Frost, C. G. Ruthenium-Catalyzed *O* - to *S* -Alkyl Migration: A Pseudoreversible Barton–McCombie Pathway. *Angew Chem Int Ed* **2015**, *54* (37), 10944–10948.

37. Cook, A. K.; Sanford, M. S. Mechanism of the Palladium-Catalyzed Arene C–H Acetoxylation: A Comparison of Catalysts and Ligand Effects. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (8), 3109–3118.
38. Avidan-Shlomovich, S.; Ghosh, H.; Szpilman, A. M. Synthetic and Mechanistic Study of the Catalytic Enantioselective Preparation of Primary  $\beta$ -Amino Ketones from Enones and a Fluorinated Gabriel Reagent. *ACS Catal.* **2015**, *5* (1), 336–342.
39. Bartoszewicz, A.; González Miera, G.; Marcos, R.; Norrby, P.-O.; Martín-Matute, B. Mechanistic Studies on the Alkylation of Amines with Alcohols Catalyzed by a Bifunctional Iridium Complex. *ACS Catal.* **2015**, *5* (6), 3704–3716.
40. Ziegler, D. T.; Riesgo, L.; Ikeda, T.; Fujiwara, Y.; Fu, G. C. Biphenyl-Derived Phosphines as Chiral Nucleophilic Catalysts: Enantioselective [4+1] Annulations To Form Functionalized Cyclopentenes. *Angew Chem Int Ed* **2014**, *53* (48), 13183–13187.
41. Jiang, Y.; Li, F.; Zhang, B.; Li, X.; Wang, X.; Huang, F.; Sun, L. Promoting the Activity of Catalysts for the Oxidation of Water with Bridged Dinuclear Ruthenium Complexes. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52* (12), 3398–3401.
42. Zhang, X.; Emge, T. J.; Hultsch, K. C. A Chiral Phenoxyamine Magnesium Catalyst for the Enantioselective Hydroamination/Cyclization of Aminoalkenes and Intermolecular Hydroamination of Vinyl Arenes. *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51* (2), 394–398.
43. Tong, L.; Duan, L.; Xu, Y.; Privalov, T.; Sun, L. Structural Modifications of Mononuclear Ruthenium Complexes: A Combined Experimental and Theoretical Study on the Kinetics of Ruthenium-Catalyzed Water Oxidation. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50* (2), 445–449.
44. Rowley, J. M.; Lobkovsky, E. B.; Coates, G. W. Catalytic Double Carbonylation of Epoxides to Succinic Anhydrides: Catalyst Discovery, Reaction Scope, and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (16), 4948–4960.
45. Chatelet, B.; Joucla, L.; Dutasta, J.-P.; Martinez, A.; Szeto, K. C.; Dufaud, V. Azaphosphatranes as Structurally Tunable Organocatalysts for Carbonate Synthesis from CO<sub>2</sub> and Epoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (14), 5348–5351.
46. Liu, B.; Roisnel, T.; Carpentier, J.; Sarazin, Y. When Bigger Is Better: Intermolecular Hydrofunctionalizations of Activated Alkenes Catalyzed by Heteroleptic Alkaline Earth Complexes. *Angew Chem Int Ed* **2012**, *51* (20), 4943–4946.

47. Guimond, N.; MacDonald, M. J.; Lemieux, V.; Beauchemin, A. M. Catalysis through Temporary Intramolecularity: Mechanistic Investigations on Aldehyde-Catalyzed Cope-Type Hydroamination Lead to the Discovery of a More Efficient Tethering Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (40), 16571–16577.
48. Maegawa, Y.; Ohshima, T.; Hayashi, Y.; Agura, K.; Iwasaki, T.; Mashima, K. Additive Effect of *N*-Heteroaromatics on Transesterification Catalyzed by Tetranuclear Zinc Cluster. *ACS Catal.* **2011**, *1* (10), 1178–1182.
49. Colladon, M.; Scarso, A.; Sgarbossa, P.; Michelin, R. A.; Strukul, G. Regioselectivity and Diastereoselectivity in Pt(II)-Mediated “Green” Catalytic Epoxidation of Terminal Alkenes with Hydrogen Peroxide: Mechanistic Insight into a Peculiar Substrate Selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (24), 7680–7689.
50. Kedia, S. B.; Mitchell, M. B. Reaction Progress Analysis: Powerful Tool for Understanding Suzuki–Miyaura Reaction and Control of Polychlorobiphenyl Impurity. *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13* (3), 420–428.
51. Dydio, P.; Detz, R. J.; Reek, J. N. H. Precise Supramolecular Control of Selectivity in the Rh-Catalyzed Hydroformylation of Terminal and Internal Alkenes. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (29), 10817–10828.
52. Adlington, N. K.; Agnew, L. R.; Campbell, A. D.; Cox, R. J.; Dobson, A.; Barrat, C. F.; Gall, M. A. Y.; Hicks, W.; Howell, G. P.; Jawor-Baczynska, A.; Miller-Potucka, L.; Pilling, M.; Shepherd, K.; Tassone, R.; Taylor, B. A.; Williams, A. Process Design and Optimization in the Pharmaceutical Industry: A Suzuki–Miyaura Procedure for the Synthesis of Savolitinib. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (8), 4735–4747.
53. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Gatto, G. J.; Stryer, L. *Biochemistry*, Ninth edition.; W.H. Freeman/Macmillan Learning: New York, 2019.
54. Cornish-Bowden, A. Why Is Uncompetitive Inhibition so Rare?: A Possible Explanation, with Implications for the Design of Drugs and Pesticides. *FEBS Letters* **1986**, *203* (1), 3–6.
55. Cleland, W. W. The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates or Products: II. Inhibition: Nomenclature and Theory.
56. Cornish-Bowden, A. One Hundred Years of Michaelis–Menten Kinetics. *Perspectives in Science* **2015**, *4*, 3–9.

57. Cornish-Bowden, A. The Origins of Enzyme Kinetics. *FEBS Letters* **2013**, 587 (17), 2725–2730.
58. Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition(I50) of an Enzymatic Reaction.
59. Briggs, G. E.; Haldane, J. B. S. A Note on the Kinetics of Enzyme Action.
60. Helfferich, F. G. Systematic Approach to Elucidation of Multistep Reaction Networks. *J. Phys. Chem.* **1989**, 93 (18), 6676–6681.
61. Michaelis, L.; Menten, M. L. Die Kinetik der Invertingwirkung. *Biochem. Z.* **1913**, 49 (37), 333–369.
62. Johnson, K. A.; Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* **2011**, 50 (39), 8264–8269.
63. Frey, P. A.; Hegeman, A. D. *Enzymatic Reaction Mechanisms*; Oxford University Press: New York, 2020.
64. Hanopolskyi, A. I.; Smaliak, V. A.; Novichkov, A. I.; Semenov, S. N. Autocatalysis: Kinetics, Mechanisms and Design. *ChemSystemsChem* **2021**, 3 (1), e2000026.
65. Plasson, R.; Brandenburg, A.; Jullien, L.; Bersini, H. Autocatalyses. *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115 (28), 8073–8085.
66. King, G. A. M. Autocatalysis. *Chem. Soc. Rev.* **1978**, 7 (2), 297.
67. Wagner, N.; Ashkenasy, G. Symmetry and Order in Systems Chemistry. *The Journal of Chemical Physics* **2009**, 130 (16), 164907.
68. Wagner, N.; Ashkenasy, G. How Catalytic Order Drives the Complexification of Molecular Replication Networks. *Israel Journal of Chemistry* **2015**, 55 (8), 880–890.
69. Morowitz, H. J.; Kostelnik, J. D.; Yang, J.; Cody, G. D. The Origin of Intermediary Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97 (14), 7704–7708.
70. Zubarev, D. Y.; Rappoport, D.; Aspuru-Guzik, A. Uncertainty of Prebiotic Scenarios: The Case of the Non-Enzymatic Reverse Tricarboxylic Acid Cycle. *Sci Rep* **2015**, 5 (1), 8009.
71. Hinshelwood, C. N. On the Chemical Kinetics of Autosynthetic Systems. *J. Chem. Soc.* **1952**, 745.

72. Semenov, S. N.; Kraft, L. J.; Ainla, A.; Zhao, M.; Baghbanzadeh, M.; Campbell, V. E.; Kang, K.; Fox, J. M.; Whitesides, G. M. Autocatalytic, Bistable, Oscillatory Networks of Biologically Relevant Organic Reactions. *Nature* **2016**, *537* (7622), 656–660.
73. Semenov, S. N.; Belding, L.; Cafferty, B. J.; Mousavi, M. P. S.; Finogenova, A. M.; Cruz, R. S.; Skorb, E. V.; Whitesides, G. M. Autocatalytic Cycles in a Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (32), 10221–10232.
74. Burnett, M. G. The Mechanism of the Formaldehyde Clock Reaction: Methylene Glycol Dehydration. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59* (2), 160.
75. Skorb, E. V.; Semenov, S. N. Mathematical Analysis of a Prototypical Autocatalytic Reaction Network. *Life* **2019**, *9* (2), 42.
76. Zielinski, W. S.; Orgel, L. E. Autocatalytic Synthesis of a Tetranucleotide Analogue. *Nature* **1987**, *327* (6120), 346–347.
77. Szathmáry, E. The Origin of Replicators and Reproducers. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2006**, *361* (1474), 1761–1776.
78. Von Kiedrowski, G. A Self-Replicating Hexadeoxynucleotide. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25* (10), 932–935.
79. Sievers, D.; Von Kiedrowski, G. Self-Replication of Complementary Nucleotide-Based Oligomers. *Nature* **1994**, *369* (6477), 221–224.
80. Lifson, S.; Lifson, H. A Model of Prebiotic Replication: Survival of the Fittest versus Extinction of the Unfittest. *Journal of Theoretical Biology* **1999**, *199* (4), 425–433.
81. Aris, R.; Gray, P.; Scott, S. K. Modelling Cubic Autocatalysis by Successive Bimolecular Steps. *Chemical Engineering Science* **1988**, *43* (2), 207–211.
82. Epstein, I. R.; Epstein, I. R.; Pojman, J. A.; Pojman, J. A. *An Introduction to Nonlinear Chemical Dynamics: Oscillations, Waves, Patterns, and Chaos*; Topics in physical chemistry; Oxford University Press: New York, 1998.
83. Perloff, J. M. *Microeconomics: Theory and Applications with Calculus*, Fourth edition.; Pearson: Boston, 2017.
84. Kacser, H.; Burns, J. A.; Kacser, H.; Fell, D. A. The Control of Flux. *Biochemical Society Transactions* **1995**, *23* (2), 341–366.

85. Heinrich, R.; Rapoport, T. A. A Linear Steady-State Treatment of Enzymatic Chains. General Properties, Control and Effector Strength. *Eur J Biochem* **1974**, *42* (1), 89–95.
86. Sauro, H. M. *Enzyme Kinetics for Systems Biology*, First edition.; Ambrosius Publishing: Lexington, KY, 2012.
87. Yoshimitsu, T.; Kuboyama, Y.; Nishiguchi, S.; Nakajima, M.; Sugiura, M. *O* - Monoacyltartaric Acid/(Thio)Urea Cooperative Organocatalysis for Enantioselective Conjugate Addition of Boronic Acid. *Org. Lett.* **2020**, *22* (10), 3780–3784.
88. Sugiura, M.; Tokudomi, M.; Nakajima, M. Enantioselective Conjugate Addition of Boronic Acids to Enones Catalyzed by *O*-Monoacyltartaric Acids. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (41), 7799.
89. Fan, Y.; Kass, S. R. Electrostatically Enhanced Thioureas. *Org. Lett.* **2016**, *18* (2), 188–191.
90. Jensen, K. H.; Sigman, M. S. Evaluation of Catalyst Acidity and Substrate Electronic Effects in a Hydrogen Bond-Catalyzed Enantioselective Reaction. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (21), 7194–7201.
91. Li, X.; Deng, H.; Zhang, B.; Li, J.; Zhang, L.; Luo, S.; Cheng, J. Physical Organic Study of Structure–Activity–Enantioselectivity Relationships in Asymmetric Bifunctional Thiourea Catalysis: Hints for the Design of New Organocatalysts. *Chemistry A European J* **2010**, *16* (2), 450–455.
92. Jensen, K. H.; Sigman, M. S. Systematically Probing the Effect of Catalyst Acidity in a Hydrogen-Bond-Catalyzed Enantioselective Reaction. *Angew Chem Int Ed* **2007**, *46* (25), 4748–4750.
93. Fan, Y.; Kass, S. R. Enantioselective Friedel–Crafts Alkylation between Nitroalkenes and Indoles Catalyzed by Charge Activated Thiourea Organocatalysts. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (24), 13288–13296.
94. Fan, Y.; Payne, C.; Kass, S. R. Quantification of Catalytic Activity for Electrostatically Enhanced Thioureas via Reaction Kinetics and UV–Vis Spectroscopic Measurement. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (18), 10855–10863.
95. Gimeno, M. C.; Herrera, R. P. Hydrogen Bonding Networks in Chiral Thiourea Organocatalysts: Evidence on the Importance of the Aminoindanol Moiety. *Crystal Growth & Design* **2016**, *16* (9), 5091–5099.



96. Kazakov, O. I.; Kiesewetter, M. K. Cocatalyst Binding Effects in Organocatalytic Ring-Opening Polymerization of L -Lactide. *Macromolecules* **2015**, *48* (17), 6121–6126.
97. Spink, S. S.; Kazakov, O. I.; Kiesewetter, E. T.; Kiesewetter, M. K. Rate Accelerated Organocatalytic Ring-Opening Polymerization of L -Lactide via the Application of a Bis(Thiourea) H-Bond Donating Cocatalyst. *Macromolecules* **2015**, *48* (17), 6127–6131.
98. Hammer, N.; Leth, L. A.; Stiller, J.; Jensen, M. E.; Jørgensen, K. A. Oxadendralenes in Asymmetric Organocatalysis for the Construction of Tetrahydroisochromenes. *Chem. Sci.* **2016**, *7* (6), 3649–3657.
99. Smajlagic, I.; Carlson, B.; Dudding, T. Brønsted Acid Organocatalyzed Three-Component Hydroamidation Reactions of Vinyl Ethers. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (5), 4171–4181.
100. Maeda, S.; Komagawa, S.; Uchiyama, M.; Morokuma, K. Finding Reaction Pathways for Multicomponent Reactions: The Passerini Reaction Is a Four-Component Reaction. *Angew Chem Int Ed* **2011**, *50* (3), 644–649.
101. Saya, J. M.; Berabez, R.; Broersen, P.; Schuringa, I.; Kruithof, A.; Orru, R. V. A.; Ruijter, E. Hexafluoroisopropanol as the Acid Component in the Passerini Reaction: One-Pot Access to  $\beta$ -Amino Alcohols. *Org. Lett.* **2018**, *20* (13), 3988–3991.
102. Zhang, J.; Lin, S.-X.; Cheng, D.-J.; Liu, X.-Y.; Tan, B. Phosphoric Acid-Catalyzed Asymmetric Classic Passerini Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137* (44), 14039–14042.
103. Ramozzi, R.; Morokuma, K. Revisiting the Passerini Reaction Mechanism: Existence of the Nitrilium, Organocatalysis of Its Formation, and Solvent Effect. *J. Org. Chem.* **2015**, *80* (11), 5652–5657.
104. De Koning, M. C.; Joosen, M. J. A.; Worek, F.; Nachon, F.; Van Grol, M.; Klaassen, S. D.; Alkema, D. P. W.; Wille, T.; De Bruijn, H. M. Application of the Ugi Multicomponent Reaction in the Synthesis of Reactivators of Nerve Agent Inhibited Acetylcholinesterase. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (22), 9376–9392.
105. Chéron, N.; Ramozzi, R.; Kaïm, L. E.; Grimaud, L.; Fleurat-Lessard, P. Challenging 50 Years of Established Views on Ugi Reaction: A Theoretical Approach. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (3), 1361–1366.
106. DiRocco, D. A.; Ji, Y.; Sherer, E. C.; Klapars, A.; Reibarkh, M.; Dropinski, J.; Mathew, R.; Maligres, P.; Hyde, A. M.; Limanto, J.; Brunskill, A.; Ruck, R. T.; Campeau, L.-C.; Davies,

I. W. A Multifunctional Catalyst That Stereoselectively Assembles Prodrugs. *Science* **2017**, 356 (6336), 426–430.

107. Cahard, D.; McGuigan, C.; Balzarini, J. Aryloxy Phosphoramidate Triesters as Pro-Tides. *mrmc* **2004**, 4 (4).

108. Sofia, M. J.; Bao, D.; Chang, W.; Du, J.; Nagarathnam, D.; Rachakonda, S.; Reddy, P. G.; Ross, B. S.; Wang, P.; Zhang, H.-R.; Bansal, S.; Espiritu, C.; Keilman, M.; Lam, A. M.; Steuer, H. M. M.; Niu, C.; Otto, M. J.; Furman, P. A. Discovery of a  $\beta$ -D-2'-Deoxy-2'- $\alpha$ -Fluoro-2'- $\beta$ -C-Methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (19), 7202–7218.

109. Dutartre, M.; Bayardon, J.; Jugé, S. Applications and Stereoselective Syntheses of P-Chirogenic Phosphorus Compounds. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45 (20), 5771–5794.

110. Steinreiber, J.; Faber, K.; Griengl, H. De-racemization of Enantiomers versus De-epimerization of Diastereomers—Classification of Dynamic Kinetic Asymmetric Transformations (DYKAT). *Chemistry A European J* **2008**, 14 (27), 8060–8072.

111. Farnham, W. B.; Lewis, R. A.; Murray, R. K.; Mislow, K. Lithium Aluminum Hydride Induced Stereomutation of Secondary Phosphine Oxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92 (19), 5808–5809.

112. Pertusati, F.; McGuigan, C. Diastereoselective Synthesis of P-Chirogenic Phosphoramidate Prodrugs of Nucleoside Analogues (ProTides) via Copper Catalysed Reaction. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (38), 8070–8073.

113. Liu, S.; Zhang, Z.; Xie, F.; Butt, N. A.; Sun, L.; Zhang, W. First Catalytic Enantioselective Synthesis of P-Stereogenic Phosphoramides via Kinetic Resolution Promoted by a Chiral Bicyclic Imidazole Nucleophilic Catalyst. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, 23 (5), 329–332.

114. Ryan, M.; Liu, T.; Dahlquist, F. W.; Griffith, O. H. A Catalytic Diad Involved in Substrate-Assisted Catalysis: NMR Study of Hydrogen Bonding and Dynamics at the Active Site of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C. *Biochemistry* **2001**, 40 (32), 9743–9750.

115. Weintraub, P. M.; Tiernan, P. L.; Huffman, J. C. Heterocycles. **10**. A Facile Synthesis of 7-hydroxy-6,7-dihydro-5H-pyrrolo[1,2-a]imidazole. *Journal of Heterocyclic Chem* **1987**, 24 (3), 561–563.

116. Zhang, Z.; Xie, F.; Jia, J.; Zhang, W. Chiral Bicycle Imidazole Nucleophilic Catalysts: Rational Design, Facile Synthesis, and Successful Application in Asymmetric Steglich Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (45), 15939–15941.
117. Xu, S.; Held, I.; Kempf, B.; Mayr, H.; Steglich, W.; Zipse, H. The DMAP-Catalyzed Acetylation of Alcohols—A Mechanistic Study (DMAP=4-(Dimethylamino)Pyridine). *Chemistry A European J* **2005**, *11* (16), 4751–4757.
118. Konsler, R. G.; Karl, J.; Jacobsen, E. N. Cooperative Asymmetric Catalysis with Dimeric Salen Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (41), 10780–10781.
119. Denmark, S. E.; Ghosh, S. K. The First Catalytic, Diastereoselective, and Enantioselective Crossed-Aldol Reactions of Aldehydes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (24), 4759–4762.
120. Mulryan, D.; White, A. J. P.; Crimmin, M. R. Organocatalyzed Fluoride Metathesis. *Org. Lett.* **2020**, *22* (23), 9351–9355.
121. Morgan, P. J.; Hanson-Heine, M. W. D.; Thomas, H. P.; Saunders, G. C.; Marr, A. C.; Licence, P. C–F Bond Activation of a Perfluorinated Ligand Leading to Nucleophilic Fluorination of an Organic Electrophile. *Organometallics* **2020**, *39* (11), 2116–2124.
122. Arisawa, M.; Igarashi, Y.; Kobayashi, H.; Yamada, T.; Bando, K.; Ichikawa, T.; Yamaguchi, M. Equilibrium Shift in the Rhodium-Catalyzed Acyl Transfer Reactions. *Tetrahedron* **2011**, *67* (40), 7846–7859.
123. Arisawa, M.; Yamada, T.; Yamaguchi, M. Rhodium-Catalyzed Interconversion between Acid Fluorides and Thioesters Controlled Using Heteroatom Acceptors. *Tetrahedron Letters* **2010**, *51* (47), 6090–6092.
124. Murray, C. B.; Sandford, G.; Korn, S. R.; Yufit, D. S.; Howard, J. A. K. New Fluoride Ion Reagent from Pentafluoropyridine. *Journal of Fluorine Chemistry* **2005**.
125. Schmidt, A.; Mordhorst, T.; Namyslo, J. C.; Telle, W. Hetarenium Salts from Pentafluoropyridine. Syntheses, Spectroscopic Properties, and Applications. *Journal of Heterocyclic Chem* **2007**, *44* (3), 679–684.
126. Larionov, E.; Mahesh, M.; Spivey, A. C.; Wei, Y.; Zipse, H. Theoretical Prediction of Selectivity in Kinetic Resolution of Secondary Alcohols Catalyzed by Chiral DMAP Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (22), 9390–9399.

127. Xu, H.; Zuend, S. J.; Woll, M. G.; Tao, Y.; Jacobsen, E. N. Asymmetric Cooperative Catalysis of Strong Brønsted Acid–Promoted Reactions Using Chiral Ureas. *Science* **2010**, *327* (5968), 986–990.
128. Iwabuchi, Y.; Nakatani, M.; Yokoyama, N.; Hatakeyama, S. Chiral Amine-Catalyzed Asymmetric Baylis – Hillman Reaction: A Reliable Route to Highly Enantiomerically Enriched ( $\alpha$ -Methylene- $\beta$ -Hydroxy)Esters. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (43), 10219–10220.
129. *Catalytic Asymmetric Synthesis*, 3. ed.; Ojima, I., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, 2010.
130. List, B. Enamine Catalysis Is a Powerful Strategy for the Catalytic Generation and Use of Carbanion Equivalents. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (8), 548–557.
131. Notz, W.; Tanaka, F.; Barbas, C. F. Enamine-Based Organocatalysis with Proline and Diamines: The Development of Direct Catalytic Asymmetric Aldol, Mannich, Michael, and Diels–Alder Reactions. *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37* (8), 580–591.
132. List, B.; Lerner, R. A.; Barbas, C. F. Proline-Catalyzed Direct Asymmetric Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (10), 2395–2396.
133. Bahmanyar, S.; Houk, K. N.; Martin, H. J.; List, B. Quantum Mechanical Predictions of the Stereoselectivities of Proline-Catalyzed Asymmetric Intermolecular Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (9), 2475–2479.
134. Bahmanyar, S.; Houk, K. N. The Origin of Stereoselectivity in Proline-Catalyzed Intramolecular Aldol Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (51), 12911–12912.
135. Okino, T.; Hoashi, Y.; Furukawa, T.; Xu, X.; Takemoto, Y. Enantio- and Diastereoselective Michael Reaction of 1,3-Dicarbonyl Compounds to Nitroolefins Catalyzed by a Bifunctional Thiourea. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 119–125.
136. Okino, T.; Hoashi, Y.; Takemoto, Y. Enantioselective Michael Reaction of Malonates to Nitroolefins Catalyzed by Bifunctional Organocatalysts. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (42), 12672–12673.
137. Enders, D.; Grossmann, A.; Huang, H.; Raabe, G. Dual Secondary Amine/N-Heterocyclic Carbene Catalysis in the Asymmetric Michael/Cross-Benzoin Cascade Reaction of  $\beta$ -Oxo Sulfones with Enals. *Eur J Org Chem* **2011**, *2011* (23), 4298–4301.
138. Jacobsen, C. B.; Jensen, K. L.; Udmark, J.; Jørgensen, K. A. Organocatalytic Iminium Ion/Carbene Reaction Cascade for the Formation of Optically Active 2,4-Disubstituted Cyclopentenones. *Org. Lett.* **2011**, *13* (18), 4790–4793.

139. Kim, B.; Kim, Y.; Lee, S. Y. Stereoselective Michael Additions of Arylacetic Acid Derivatives by Asymmetric Organocatalysis. *Synlett* **2022**, *33* (07), 609–616.
140. Harijan, R. K.; Zoi, I.; Antoniou, D.; Schwartz, S. D.; Schramm, V. L. Catalytic-Site Design for Inverse Heavy-Enzyme Isotope Effects in Human Purine Nucleoside Phosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2017**, *114* (25), 6456–6461.
141. Herschlag, D.; Natarajan, A. Fundamental Challenges in Mechanistic Enzymology: Progress toward Understanding the Rate Enhancements of Enzymes. *Biochemistry* **2013**, *52* (12), 2050–2067.
142. Kamerlin, S. C. L.; Warshel, A. At the Dawn of the 21st Century: Is Dynamics the Missing Link for Understanding Enzyme Catalysis? *Proteins* **2010**, *78* (6), 1339–1375.
143. Kiss, G.; Çelebi-Ölçüm, N.; Moretti, R.; Baker, D.; Houk, K. N. Computational Enzyme Design. *Angew Chem Int Ed* **2013**, *52* (22), 5700–5725.
144. Schramm, V. L.; Schwartz, S. D. Promoting Vibrations and the Function of Enzymes. Emerging Theoretical and Experimental Convergence. *Biochemistry* **2018**, *57* (24), 3299–3308.
145. Wang, Q.; Chen, K.; Jiang, H.; Chen, C.; Xiong, C.; Chen, M.; Xu, J.; Gao, X.; Xu, S.; Zhou, H.; Wu, Y. Cell-Inspired Design of Cascade Catalysis System by 3D Spatially Separated Active Sites. *Nat Commun* **2023**, *14* (1), 5338.
146. Kang, J. Y.; Johnston, R. C.; Snyder, K. M.; Cheong, P. H.-Y.; Carter, R. G. Construction of Stereogenic  $\alpha,\alpha$ -Disubstituted Cycloalkanones via 1° Amine Thiourea Dual Catalysis: Experimental Scope and Computational Analyses. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (9), 3629–3637.
147. d'Angelo, J.; Desmaële, D.; Dumas, F.; Guingant, A. The Asymmetric Michael Addition Reactions Using Chiral Imines. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3* (4), 459–505.
148. Pfau, M.; Jabin, I.; Revial, G. Michael Reaction of Functionalized Chiral Cyclanone Imines. Enantioselective Synthesis of C<sub>2</sub>-Symmetric Cis-(1R,6R)-1,6-Dimethyl Bicyclo[4.4.0]Decane-3,8- Dione.
149. Pfau, M.; Tomas, A.; Lim, S.; Revial, G. Diastereoselectivity in the Michael-Type Addition of Imines Reacting as Their Secondary Enamine Tautomers. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (5), 1143–1147.
150. Jacobsen, E. N.; Larrow, J. F. (R,R)-N,N'-BIS(3,5-DI-Tert-BUTYLSALICYLIDENE)-1,2-CYCLOHEXANEDIAMINO MANGANESE(III) CHLORIDE, A HIGHLY ENANTIOSELECTIVE EPOXIDATION CATALYST. *Org. Synth.* **1998**, *75*, 1.

151. Walsh, P. J.; Smith, D. K.; Castello, C. Resolution of Trans-Cyclohexane-1,2-Diamine and Determination of the Enantiopurity Using Chiral Solid-Phase HPLC Techniques and Polarimetry. *J. Chem. Educ.* **1998**, *75* (11), 1459.
152. Galsbøl, F.; Steenbøl, P.; Sørensen, B. S.; Swahn, C.-G.; Pilotti, Å. The Preparation, Separation, and Characterization of the Le13- and Ob3-Isomers of Tris(Trans-1,2-Cyclohexanediamine)Rhodium(III) Complexes. *Acta Chem. Scand.* **1972**, *26*, 3605–3611.
153. Fox, R., J.; Guerrero, C., A.; Dummeldinger, M.; Skliar, D.; Patel, H.; Tan, Y.; George, D. T.; McKenna, S.; Joe, C.; Smith, M. J. Process For Preparing Carbamoyloxymethyl Triazole Cyclohexyl Acid Compounds. WO 2020/214545 A1, October 22, 2020.
154. Verma, P.; Pallerla, R. R.; Rolig, A.; Pihko, P. M. Humilisin E: Strategy for the Synthesis and Access to the Functionalized Bicyclic Core. *J. Org. Chem.* **2024**, *89* (10), 6987–6990.
155. Stead, D.; O'Brien, P.; Sanderson, A. A New Sparteine Surrogate for Asymmetric Deprotonation of *N*-Boc Pyrrolidine. *Org. Lett.* **2008**, *10* (7), 1409–1412.
156. Kang, J. Y.; Carter, R. G. Primary Amine, Thiourea-Based Dual Catalysis Motif for Synthesis of Stereogenic, All-Carbon Quaternary Center-Containing Cycloalkanones. *Org. Lett.* **2012**, *14* (12), 3178–3181.

## 12. Liitteet

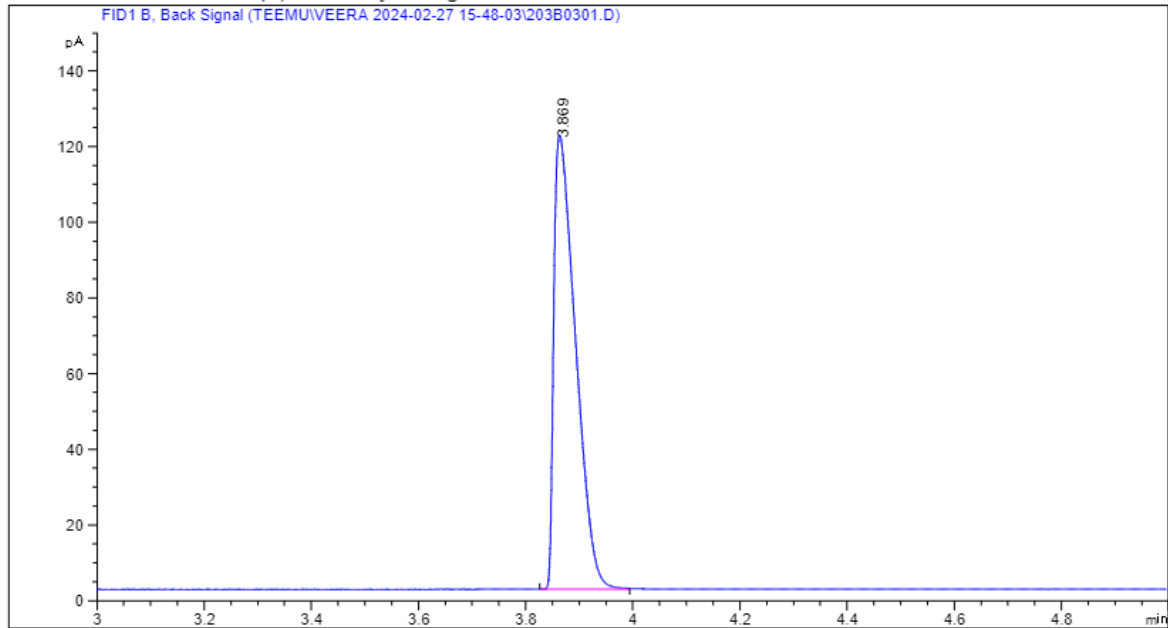
- LIITE 1: 2-Metyylisykloheksanonin referenssi kromatogrammi
- LIITE 2: Tetradekaanin kromatogrammi (sisäinen standardi)
- LIITE 3: Raseemisen tuotteen referenssi kromatogrammi
- LIITE 4: GC-kromatogrammi taulukot ja yhtälöt
- LIITE 5: Pfau-d'Angelo -reaktion korkeamman konsentraation kromatogrammit 0 – 10 h
- LIITE 6: Pfau-d'Angelo -reaktion matalemmän konsnetraation kromatogrammit 0 – 10 h
- LIITE 7: Yhden ekvivivalentin NMR-kokeen  $^1\text{H}$  NMR-spektrit
- LIITE 8: *R,R*-Tartraattisuolan  $^1\text{H}$  NMR-spektri
- LIITE 9: *R,R*-Tartraattisuolan  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri
- LIITE 10: *R,R*-Tartraattisuolan bisamidi derivaatan HPLC-kromatogrammi
- LIITE 11: Lähtöaineesta valmistetun raseemisen bisamidin referenssi HPLC-kromatogrammi
- LIITE 12: Bisamidin  $^1\text{H}$  NMR-spektri
- LIITE 13: Bisamidin  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri
- LIITE 14: *S,S*-bistartraattisuolan  $^1\text{H}$  NMR-spektri
- LIITE 15: *S,S*-bistartraattisuolan  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri
- LIITE 16: Katalyytin suolahapon  $^1\text{H}$  NMR-spektri
- LIITE 17: Katalyytin suolahapon  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri
- LIITE 18: Pfau-d'Angelo -reaktion raseemisen referenssin  $^1\text{H}$  NMR-spektri
- LIITE 19: Pfau-d'Angelo -reaktion raseemisen referenssin  $^{13}\text{C}$  NMR-spektri
- LIITE 20: Taulukko kuvaotsikoista
- LIITE 21: Taulukko kaaviotsikoista

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\203B0301.D  
 Sample Name: 2-Mecychexanone

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 203
Injection Date  : 2/27/2024 6:15:11 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 2/29/2024 8:36:02 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.869	BB	0.0460	336.95099	118.43371	1.000e2

```
Totals :                      336.95099  118.43371
```

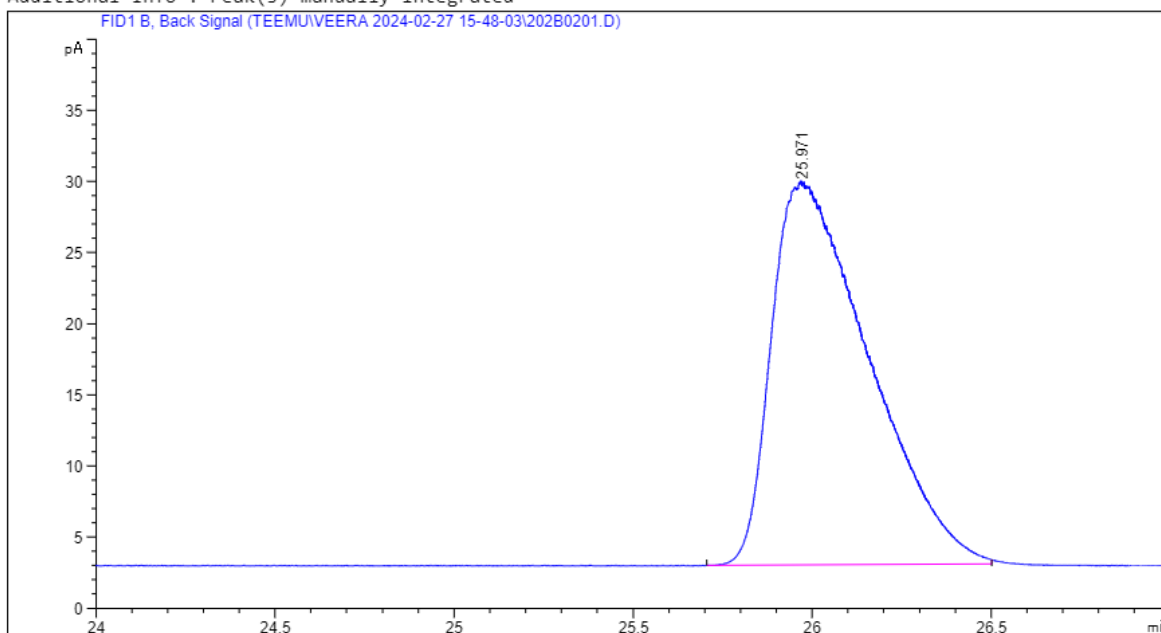


Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\202B0201.D  
 Sample Name: TET IS

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 202
Injection Date  : 2/27/2024 5:03:49 PM      Inj       :    1
                                                Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\TEEMU 100C 70MIN INL250
                  SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 2/29/2024 8:34:31 AM by VEERA
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
  
```



```

=====
                          Area Percent Report
=====
  
```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	25.971	BB	0.2657	507.71552	26.81945	1.000e2

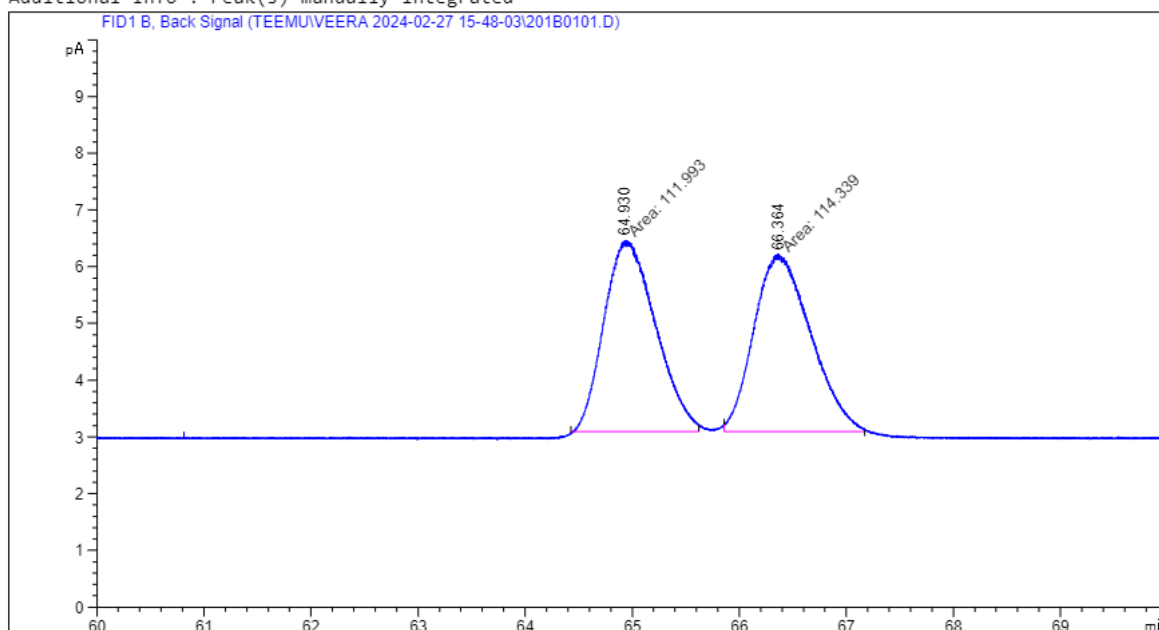
```
Totals :                      507.71552  26.81945
```

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\201B0101.D  
 Sample Name: Racemic Reference

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 201
Injection Date  : 2/27/2024 3:52:28 PM       Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-02-27 15-48-03\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 2/29/2024 8:33:01 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
  
```



=====  
 Area Percent Report  
 =====

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	64.930	MM	0.5538	111.99254	3.37043	49.48163
2	66.364	MM	0.6135	114.33901	3.10644	50.51837
Totals :				226.33155	6.47687	

## LIITE 4

Taulukossa 1 on listattuna GC:llä seuratun Pfau-d'Angelo reaktion SE1 pinta-alat. Reaktion kromatogrammit liitteessä 5. Vastaavasti taulukossa 2 on reaktion SE2 pinta-alat ja liitteessä 6 on reaktion kromatogrammit.

Taulukko 1. Korkeamman konsentraation Pfau-d'Angelo -reaktion GC:llä mitatut pinta-alat.

Aika (h)	B	Tuote 1	IS	Tuote 2
0	197,5871	0	468,2247	0
0,5	158,436	6,04054	395,6787	4,45136
1	239,3131	14,49449	604,4237	11,53957
2	156,8183	9,19292	404,9297	8,23372
3	164,3982	11,68717	399,1625	9,49204
4	210,8914	15,64309	588,4037	11,68309
5	198,686	15,09847	552,3619	11,28071
6	241,1317	17,42737	668,1454	11,34038
7	184,9053	12,77048	486,2479	12,77048
8	267,5057	20,32662	793,7978	13,88794
9	273,6237	21,35972	807,2744	16,42477
10	282,7387	21,45629	830,176	15,84611

Taulukko 2. Matalamman konsentraation Pfau-d'Angelo -reaktion GC:llä mitatut pinta-alat

Aika (h)	B	Tuote 1	IS	Tuote 2
0	189,9947	0	478,9048	0
0,5	157,8826	9,93072	455,8906	7,73568
1	219,1544	21,14357	653,3327	17,65099
2	163,2217	22,35242	566,7987	17,9488
3	144,423	20,37816	479,8774	17,14464
4	120,9996	15,97395	360,4519	12,8834
5	99,56271	13,0543	287,95	10,45836
6	97,09785	13,04474	295,2354	9,46336
7	103,097	16,5177	327,089	11,94678
8	145,441	22,64934	468,4464	16,45193
9	112,1469	16,02924	366,0395	12,61058
10	98,15952	12,99939	284,731	10,72083

Jotta datasta saatiin määritettyä komponenttien konsentraatiot, on käytettävä seuraavia yhtälöitä (yhtälöt 50–52) määrittämään vastekerroin (response factor, RF) ja suhteellinen vastekerroin (relative response factor RRF). **B** on reaktiokomponentti, tässä tapauksessa 2-metyylisykloheksanoni **86** tai tuote **96** ja **IS** on sisäinen standardi (tetradekaani):

$$RF_B = \frac{B:n\ signalin\ pinta\ ala}{[B]}$$

$$RF_{IS} = \frac{IS:n\ signalin\ pinta-ala}{[IS]} \quad 51$$

$$RRF_B = \frac{RF_B}{RF_{IS}} \quad 52$$

Pinta-alat **B**:lle ja **IS**:lle määritettiin ensimmäisestä, 0 h GC-näytteestä, missä oli tunnettu konsentraatio reaktiokomponentteja. Tuotteelle vastaava tehtiin referenssinäytteestä. Tällä tavalla saatiin kunkin yhdisteen signaalin pinta-alan verrannollisuus yhdisteen konsentraatioon. Tästä on laskettu RF ja RRF arvot taulukkoon 3:

Taulukko 3. Vastekertoimien laskut reaktiokomponenteille Pfau-d'Angelo reaktioon.

Compound	Area	c(M)	RF (M)	RRF (M)
2-Metyylisykloheksanoni ( <b>B</b> )	197,58711	0,09786	2019,079	0,421992
Tuote 1	111,92540	0,01775	6305,656	1,317896
Tetradekaani ( <b>IS</b> )	468,22473	0,09786	4784,639	1
Tuote 2	114,30901	0,01775	6439,944	1,345963

Mittauskromatogrammit on esitetty liitteissä ([Liite 5] ja [Liite 6]). Tuote 1 (**T1**) ja Tuote 2 (**T2**) ovat **96**:n eri enantiomeerit. Jotta reaktionäytteiden kromatogrammeista voidaan määrittää konsentraatiot, voidaan käyttää yhtälöitä 50–52 muodostamaan yhtälö (yhtälö 53):

$$[B] = PA_B \times \frac{[IS]}{PA_{IS}} \times RRF_B^{-1}, \quad 53$$

missä PA = pinta-ala. Vaihtamalla **B**:n arvot tuotteiden arvoiksi, voidaan myös niiden konsentraatiot laskea. Käyttämällä yhtälöä 53 voidaan taulukoiduista pinta-aloista laskea ensin näytteiden konsentraatiot. Näistä voidaan laskea reaktioiden konsentraatiot kertomalla saadut luvut 10, mikä oli näytteiden laimennuskerroin. Tästä muodostettiin taulukot 4 ja 5:

Taulukko 4. Korkeamman konsentraation Pfau-d'Angelo -reaktion komponenttien konsentraatiot eri ajanhetkillä.

GC-näytekonsentraatiot				Reaktiokonsentraatiot			
Aika (h)	[B] (M)	[T1] (M)	[T2] (M)	Aika (h)	[B] (M)	[T1] (M)	[T2] (M)
0	0,097862	0	0	0	0,978622	0	0
0,5	0,092859	0,001134	0,000818	0,5	0,928585	0,011336	0,008179
1	0,09182	0,001781	0,001388	1	0,918197	0,017807	0,013881
2	0,089811	0,001686	0,001478	2	0,898106	0,016858	0,014784
3	0,095512	0,002174	0,001729	3	0,95512	0,021741	0,017289
4	0,083118	0,001974	0,001444	4	0,831178	0,019741	0,014436
5	0,083417	0,00203	0,001485	5	0,834169	0,020297	0,014849
6	0,083694	0,001937	0,001234	6	0,836939	0,019368	0,01234
7	0,088187	0,00195	0,00191	7	0,881865	0,019502	0,019095
8	0,078151	0,001901	0,001272	8	0,781509	0,019014	0,01272
9	0,078604	0,001965	0,001479	9	0,786037	0,019647	0,014793
10	0,078982	0,001919	0,001388	10	0,789815	0,019191	0,013878

Taulukko 5. Matalamman konsentraation Pfau-d'Angelo -reaktion komponenttien konsentraatiot eri ajanhetkillä.

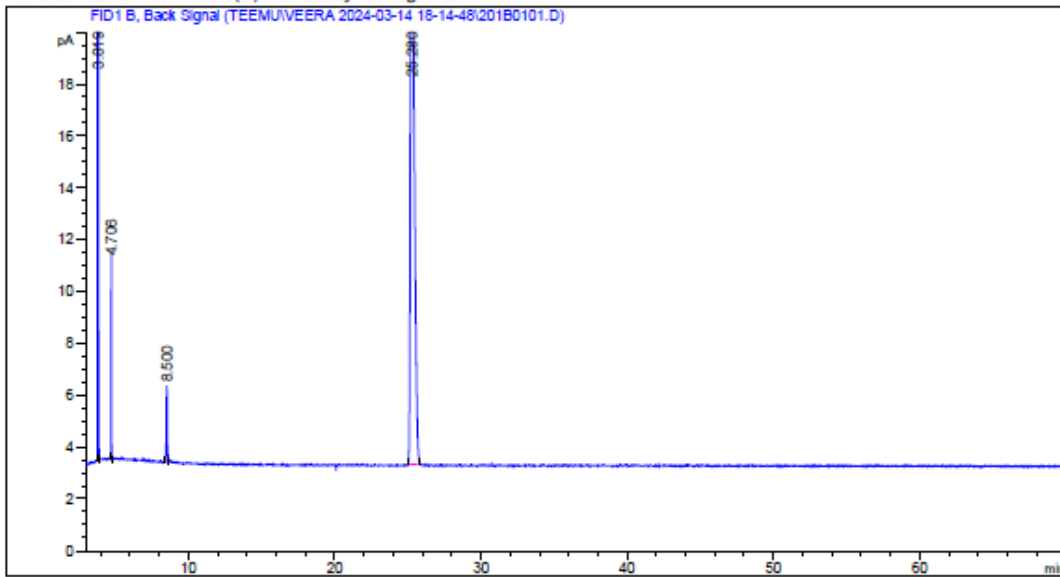
GC-näytekonsentraatiot				Reaktiokonsentraatiot			
Aika (h)	[B] (M)	[T1] (M)	[T2] (M)	Aika (h)	[B] (M)	[T1] (M)	[T2] (M)
0	0,0602	0	0	0	0,601997	0	0
0,5	0,050025	0,001575	0,001201	0,5	0,50025	0,015749	0,012012
1	0,069439	0,003353	0,002741	1	0,694389	0,033531	0,027409
2	0,051717	0,003545	0,002787	2	0,517167	0,035448	0,027871
3	0,04576	0,003232	0,002662	3	0,457603	0,032317	0,026622
4	0,038339	0,002533	0,002001	4	0,383386	0,025333	0,020005
5	0,031546	0,00207	0,001624	5	0,315464	0,020703	0,01624
6	0,030765	0,002069	0,001469	6	0,307654	0,020687	0,014695
7	0,032666	0,00262	0,001855	7	0,326662	0,026195	0,018551
8	0,046083	0,003592	0,002555	8	0,460829	0,035919	0,025547
9	0,035534	0,002542	0,001958	9	0,355337	0,02542	0,019582
10	0,031102	0,002062	0,001665	10	0,311018	0,020615	0,016647

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\20180101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-0h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 201
Injection Date  : 3/14/2024 6:19:09 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 3/18/2024 8:48:31 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info     : 100C, 70 min runtime
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.819	BB	0.0444	197.58711	73.01678	28.14374
2	4.706	BB	0.0445	20.88534	7.68431	2.97485
3	8.500	BB	0.0805	15.36708	2.92442	2.18884
4	25.280	BB	0.2496	468.22473	26.25979	66.69258

Instrument 1 3/18/2024 8:48:35 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\20180101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-0h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
Totals :				702.06426	109.88530	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\202B0201.D

Sample Name: TJN-1-006-SE1-0,5h-4

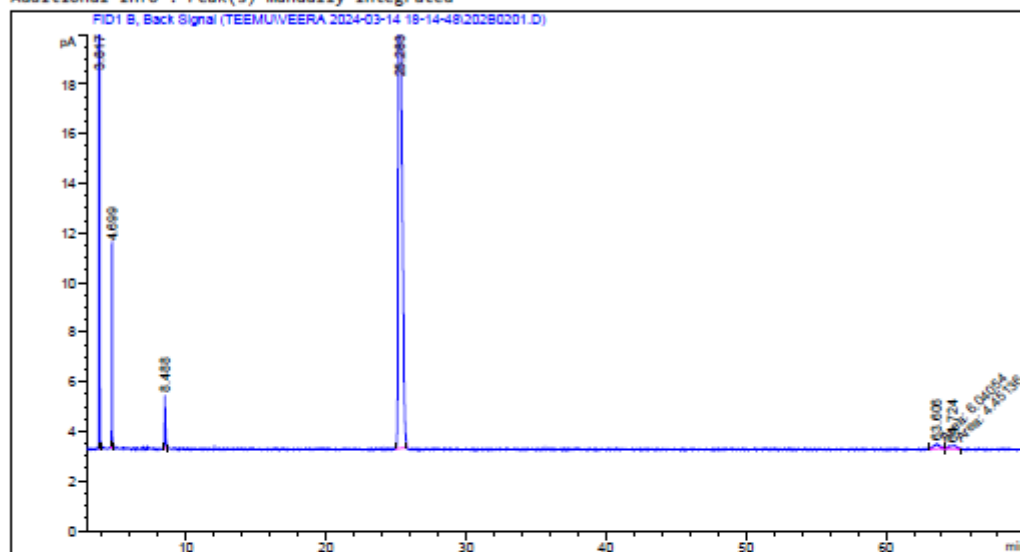
```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 202
Injection Date  : 3/14/2024 7:30:31 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:49:36 AM by VEERA
                (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
=====

```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.817	BB	0.0364	158.43596	68.92016	26.50369
2	4.699	BB	0.0410	22.00412	8.16790	3.68092
3	8.488	BB	0.0809	11.17758	2.11352	1.86982
4	25.283	BB	0.2606	395.67865	23.10232	66.19044

Instrument 1 3/18/2024 8:49:40 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\202B0201.D

Sample Name: TJN-1-006-SE1-0,5h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	63.606	MM	0.5153	6.04054	1.95373e-1	1.01048
6	64.724	MM	0.5327	4.45136	1.39263e-1	0.74464

Totals : 597.78820 102.63854

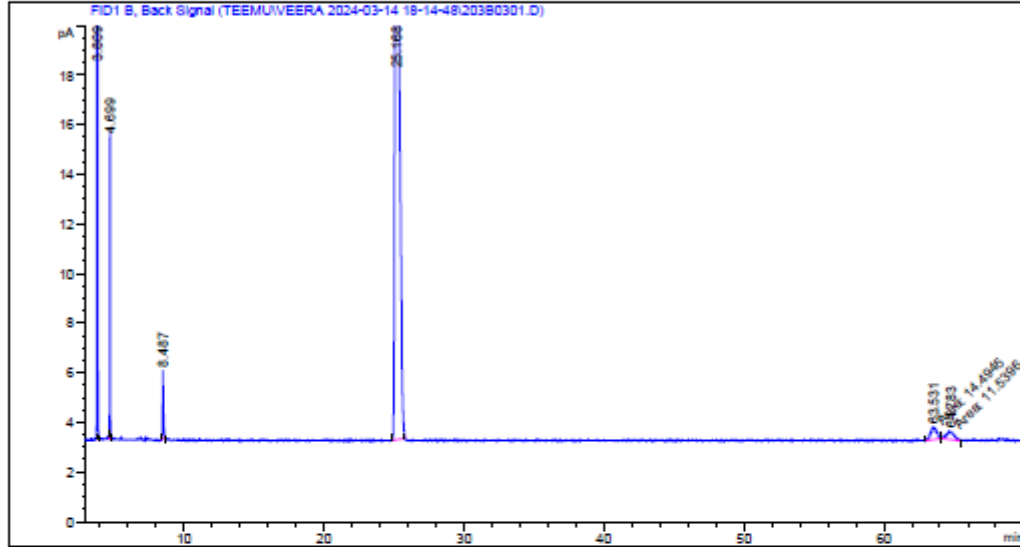
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\203B0301.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-1h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                               Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1                         Location  : Vial 203
Injection Date  : 3/14/2024 8:41:51 PM              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:49:36 AM by VEERA
                (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.809	BB	0.0453	239.31314	85.95983	23.98875
2	4.699	BB	0.0418	33.58213	12.16883	3.36627
3	8.487	BB	0.0814	14.68702	2.75498	1.47223
4	25.168	BB	0.2750	683.98956	35.15361	68.56310

Instrument 1 3/18/2024 8:50:37 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\203B0301.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-1h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	63.531	MM	0.5139	14.49449	4.70113e-1	1.45293
6	64.783	MM	0.6190	11.53957	3.10708e-1	1.15673

Totals : 997.60592 136.81806



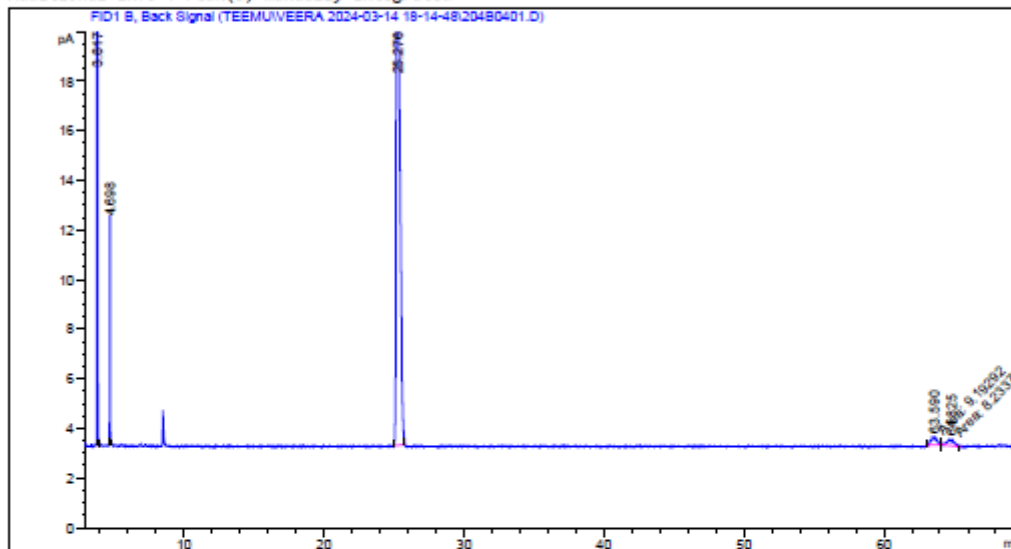
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\204B0401.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-2h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 204
Injection Date  : 3/14/2024 9:53:16 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:51:15 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.817	BB	0.0368	156.81827	67.18652	25.94771
2	4.698	BB	0.0421	25.18813	9.04946	4.16772
3	25.276	BB	0.2462	404.92969	23.45828	67.00110
4	63.590	MM	0.4729	9.19292	3.23967e-1	1.52109

Instrument 1 3/18/2024 8:51:18 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\204B0401.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-2h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.825	MM	0.6040	8.23372	2.27203e-1	1.36238

Totals : 604.36272 100.24542

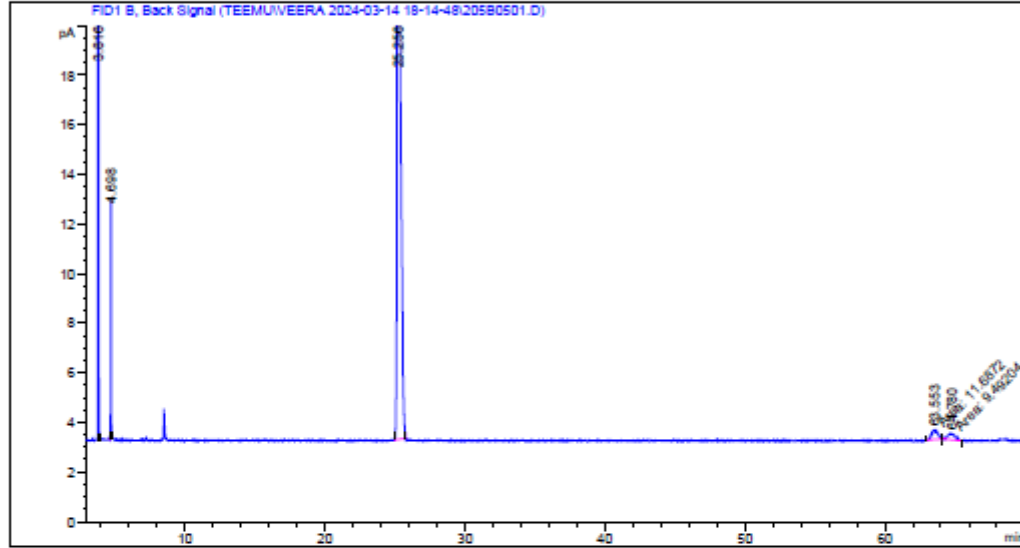
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\205B0501.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-3h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 205
Injection Date  : 3/14/2024 11:04:39 PM    Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:52:07 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.816	BB	0.0375	164.39818	68.75590	25.20285
2	4.698	BB	0.0423	26.30947	9.37504	4.03334
3	25.256	BB	0.2590	440.41299	25.11324	67.51695
4	63.553	MM	0.5113	11.68717	3.80959e-1	1.79169

Instrument 1 3/18/2024 8:52:12 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\205B0501.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-3h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.780	MM	0.6118	9.49204	2.58570e-1	1.45516

Totals : 652.29985 103.88371





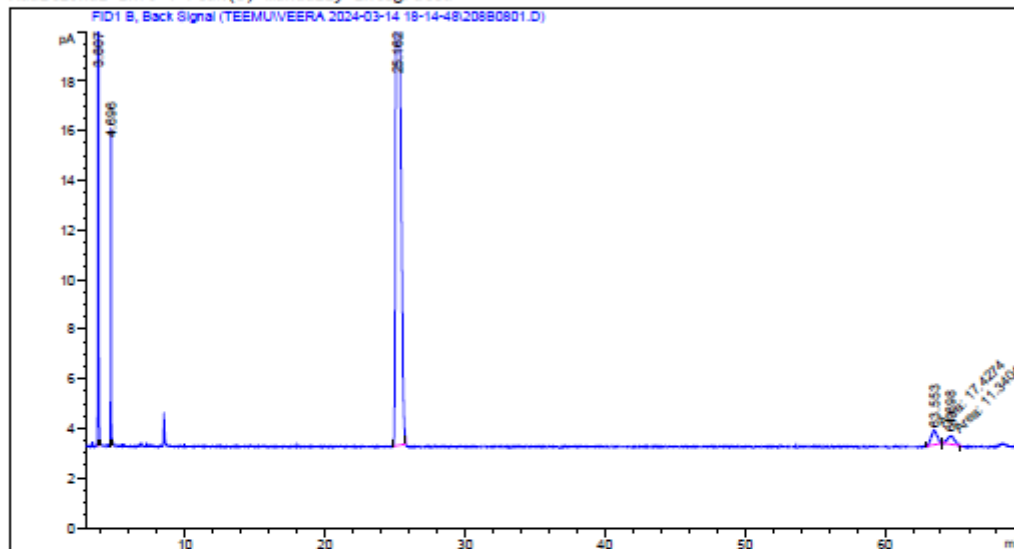
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\208B0801.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-6h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                               Seq. Line :    8
Acq. Instrument : Instrument 1                         Location  : Vial 208
Injection Date  : 3/15/2024 2:38:51 AM              Inj       :    1
                                                    Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:54:47 AM by VEERA
                (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.807	BB	0.0428	241.13173	93.83405	24.76754
2	4.696	BB	0.0466	35.53463	12.28338	3.64989
3	25.162	BB	0.2699	668.14539	33.67786	68.62772
4	63.553	MM	0.5062	17.42737	5.73780e-1	1.79003

Instrument 1 3/18/2024 8:54:50 AM VEERA

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\208B0801.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-6h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.698	MM	0.5600	11.34038	3.37520e-1	1.16481

Totals : 973.57950 140.70659

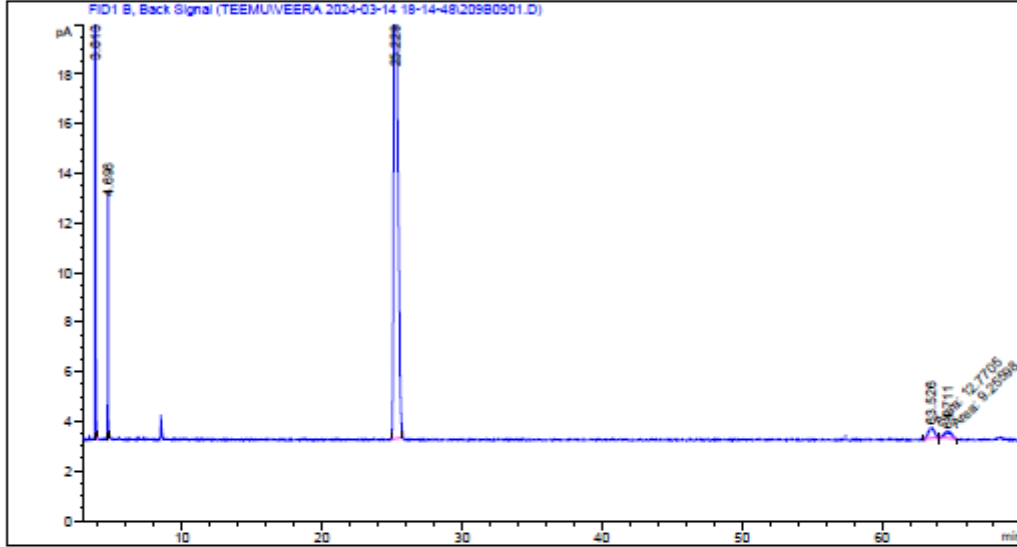
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\209B0901.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-7h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    9
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 209
Injection Date  : 3/15/2024 3:50:14 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:55:41 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.813	BB	0.0397	184.90532	71.65767	25.64048
2	4.696	BB	0.0467	27.96648	9.61786	3.87806
3	25.229	BB	0.2500	486.24786	26.01655	67.42709
4	63.526	MM	0.4999	12.77048	4.25779e-1	1.77086

Instrument 1 3/18/2024 8:56:12 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\209B0901.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-7h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.711	MM	0.5913	9.25598	2.60875e-1	1.28351

Totals : 721.14613 107.97873

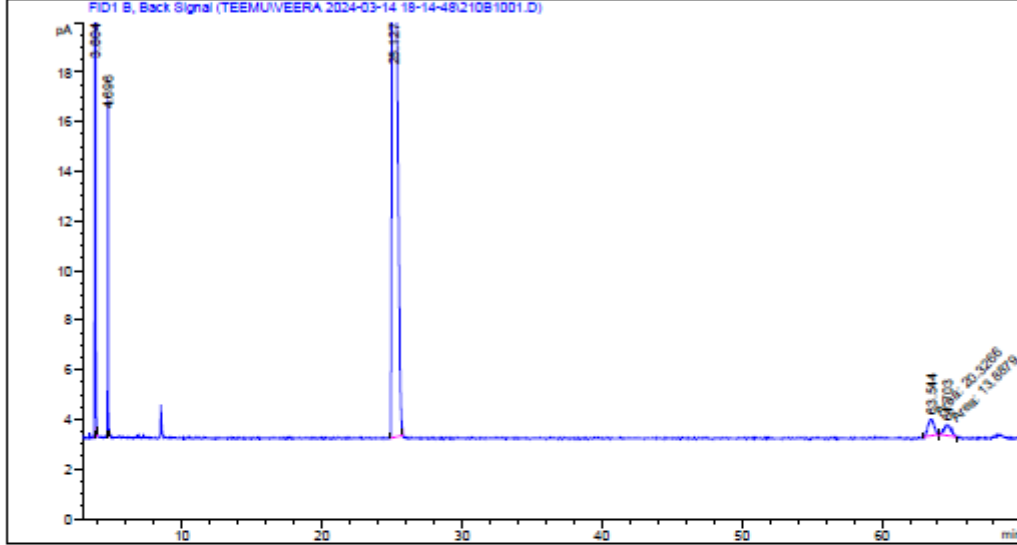
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\210B1001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-8h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   10
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 210
Injection Date  : 3/15/2024 5:01:37 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                  SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 3/18/2024 8:57:02 AM by VEERA
                  (modified after loading)
Method Info     : 100C, 70 min runtime
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.804	BB	0.0414	267.50568	98.08483	23.59370
2	4.696	BB	0.0470	38.28332	13.06256	3.37655
3	25.127	BB	0.2834	793.79779	37.79561	70.01207
4	63.544	MM	0.4927	20.32662	6.87662e-1	1.79278

Instrument 1 3/18/2024 8:57:08 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\210B1001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-8h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.703	MM	0.5784	13.88794	4.00158e-1	1.22490

Totals : 1133.80134 150.03083

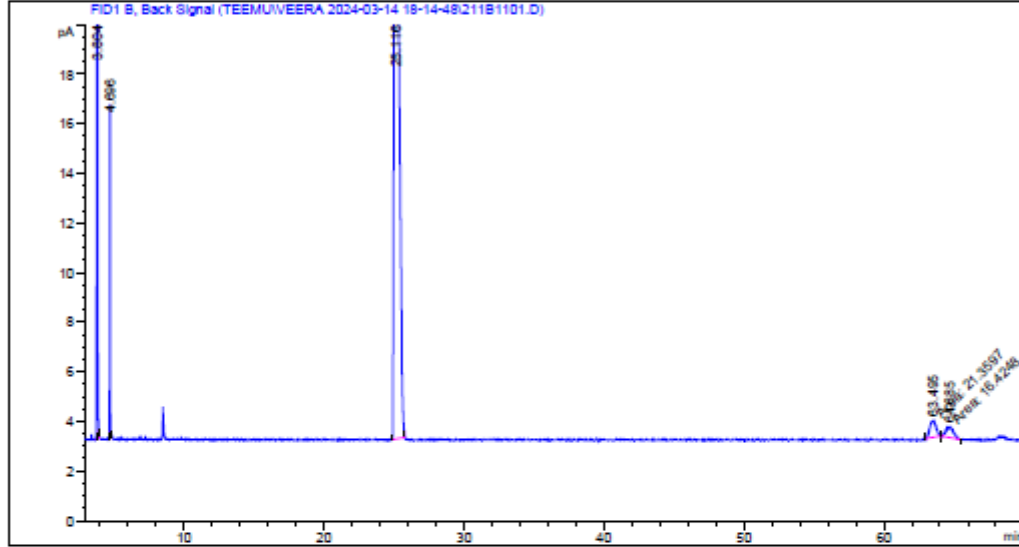
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\211B1101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-9h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   11
Acq. Instrument : Instrument 1              Location  : Vial 211
Injection Date  : 3/15/2024 6:12:58 AM     Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 3/18/2024 8:57:59 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info    : 100C, 70 min runtime
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.804	BB	0.0419	273.62366	98.73539	23.64513
2	4.696	BB	0.0474	38.52706	12.98515	3.32931
3	25.116	BB	0.3035	807.27435	38.30716	69.76043
4	63.495	MM	0.5082	21.35972	7.00451e-1	1.84580

Instrument 1 3/18/2024 8:58:02 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\211B1101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-9h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.685	MM	0.6251	16.42477	4.37903e-1	1.41934

Totals : 1157.20956 151.16606



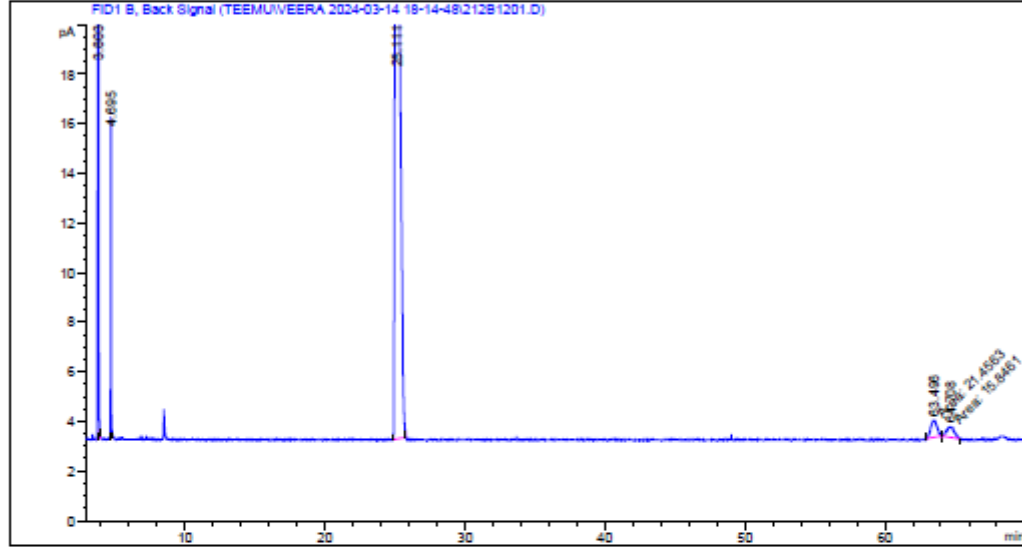
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\212B1201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-10h-4

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line : 12
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 212
Injection Date  : 3/15/2024 7:24:16 AM      Inj       : 1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100C 70MIN INL250 SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 3/18/2024 8:59:15 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Method Info     : 100C, 70 min runtime
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.803	BB	0.0428	282.73865	99.48483	23.81127
2	4.695	BB	0.0476	37.19837	12.46845	3.13272
3	25.111	BB	0.2947	830.17603	39.26212	69.91454
4	63.496	MM	0.5112	21.45629	6.99477e-1	1.80697

Instrument 1 3/18/2024 8:59:17 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-14 18-14-48\212B1201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE1-10h-4

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
5	64.708	MM	0.5994	15.84611	4.40616e-1	1.33450

Totals : 1187.41544 152.35548

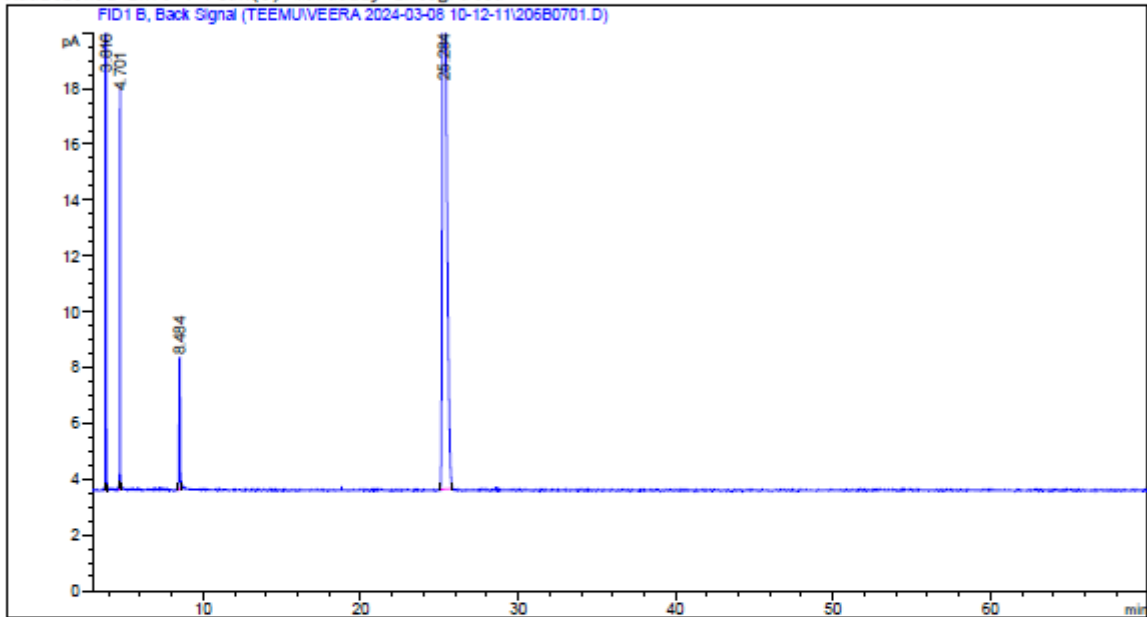
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\206B0701.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-0h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    7
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 206
Injection Date  : 3/8/2024 4:27:28 PM        Inj       :    1
                                                Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                  SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 3/11/2024 9:17:29 AM by VEERA
                  (modified after loading)

Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.816	BB	0.0358	189.99471	84.65945	26.14475
2	4.701	BB	0.0382	34.63927	14.12017	4.76663
3	8.484	BB	0.0774	23.16424	4.64285	3.18758
4	25.284	BB	0.2555	478.90482	27.78040	65.90103

Totals :                    726.70304 131.20286

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\207B0901.D

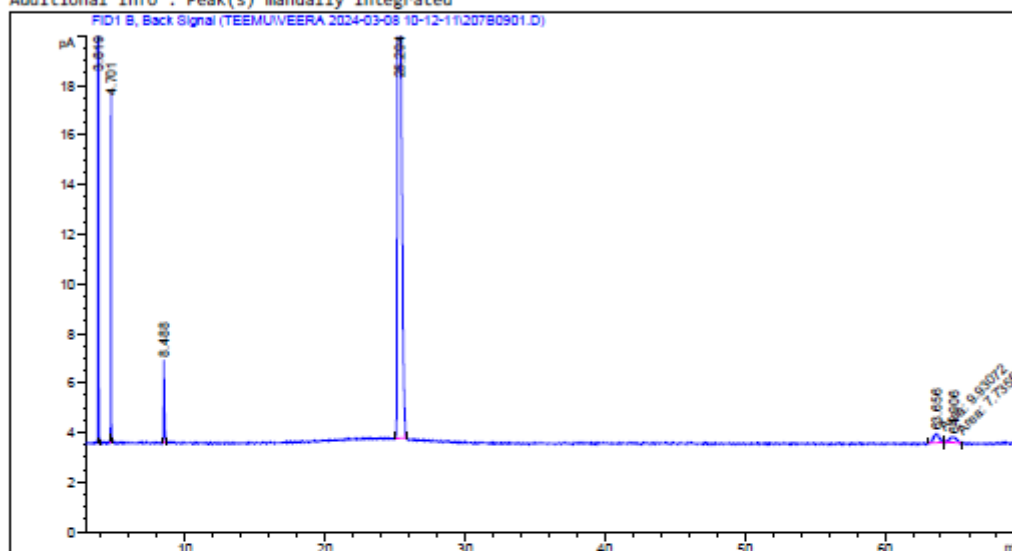
Sample Name: TJN-1-006-SE2-0,5h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    9
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 207
Injection Date  : 3/8/2024 6:50:13 PM        Inj       :    1
                                                Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 9:20:02 AM by VEERA
                (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.819	BB	0.0415	157.88257	64.07572	23.08219
2	4.701	BB	0.0399	35.87265	13.79414	5.24453
3	8.488	BB	0.0782	16.68953	3.29942	2.43998
4	25.294	BB	0.2569	455.89059	26.26063	66.65050
5	63.656	MM	0.4931	9.93072	3.35689e-1	1.45186
6	64.906	MM	0.5387	7.73568	2.39335e-1	1.13094

Instrument 1 3/11/2024 9:20:19 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\207B0901.D

Sample Name: TJN-1-006-SE2-0,5h

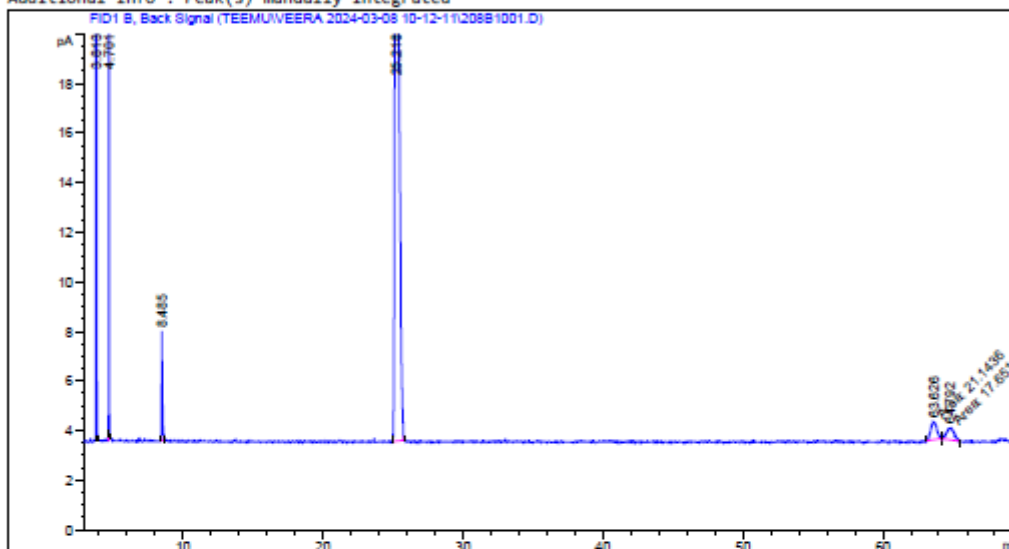
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
----- ----- ----- ----- ----- ----- -----						
Totals :				684.00174	108.00494	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\208B1001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-1h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   10
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 208
Injection Date  : 3/8/2024 8:01:36 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 9:21:17 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.813	BB	0.0391	219.15436	86.64509	22.17334
2	4.701	BB	0.0402	54.54264	20.80497	5.51845
3	8.485	BB	0.0791	22.54454	4.39149	2.28099
4	25.218	BB	0.2632	653.33270	34.39509	66.10212
5	63.626	MM	0.4807	21.14357	7.33152e-1	2.13924
6	64.792	MM	0.6016	17.65099	4.88973e-1	1.78587

Instrument 1 3/11/2024 9:21:20 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\208B1001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-1h

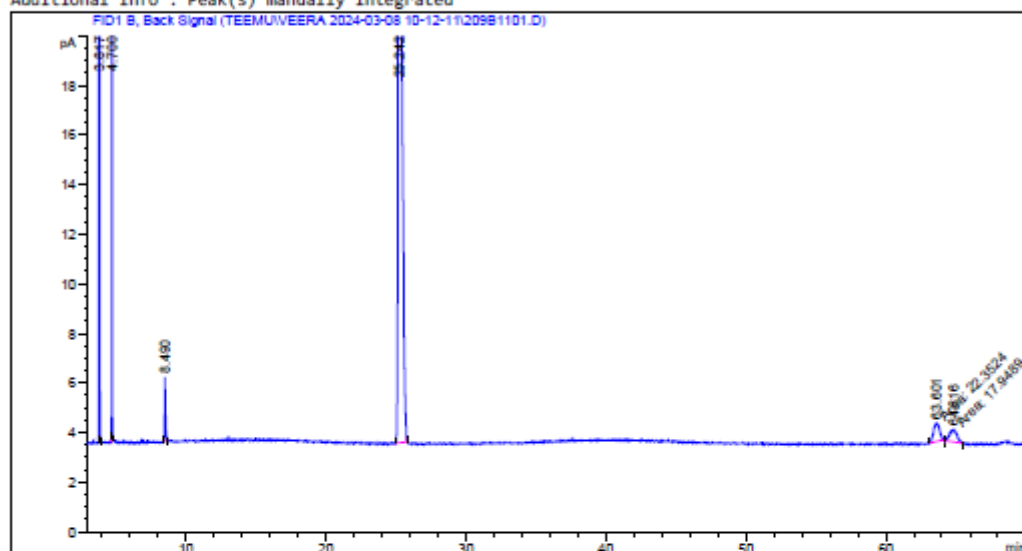
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
Totals :				988.36880	147.45876	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\209B1101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-2h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   11
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 209
Injection Date  : 3/8/2024 9:12:58 PM        Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 9:22:05 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.817	BB	0.0353	163.22174	74.11305	19.64676
2	4.700	BB	0.0405	47.04005	17.74911	5.66214
3	8.490	BB	0.0801	13.42038	2.57126	1.61539
4	25.242	BB	0.2474	566.79865	31.16428	68.22470
5	63.601	MM	0.4901	22.35242	7.60114e-1	2.69053
6	64.816	MM	0.6034	17.94888	4.95748e-1	2.16048

Instrument 1 3/11/2024 9:22:08 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\209B1101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-2h

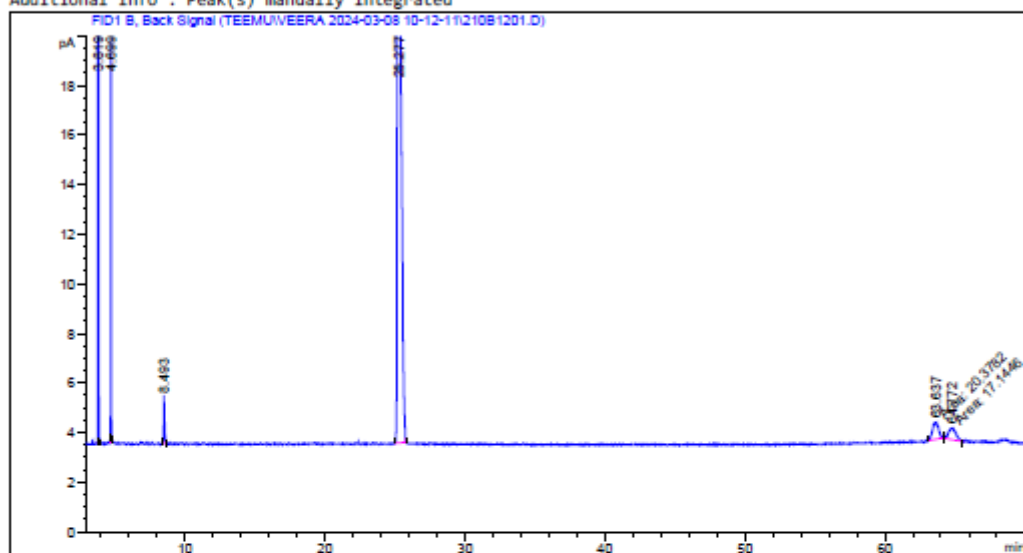
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
Totals :						
				830.78212	126.85355	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\210B1201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-3h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   12
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 210
Injection Date  : 3/8/2024 10:24:27 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 9:22:58 AM by VEERA
                                           (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
  
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.819	BB	0.0413	144.42300	59.19501	20.19614
2	4.699	BB	0.0409	43.19242	16.10510	6.04004
3	8.493	BB	0.0811	10.08630	1.90007	1.41047
4	25.277	BB	0.2541	479.87735	27.15948	67.10615
5	63.637	MM	0.4977	20.37816	6.82397e-1	2.84969
6	64.772	MM	0.6117	17.14464	4.67136e-1	2.39751

Instrument 1 3/11/2024 9:23:15 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\210B1201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-3h

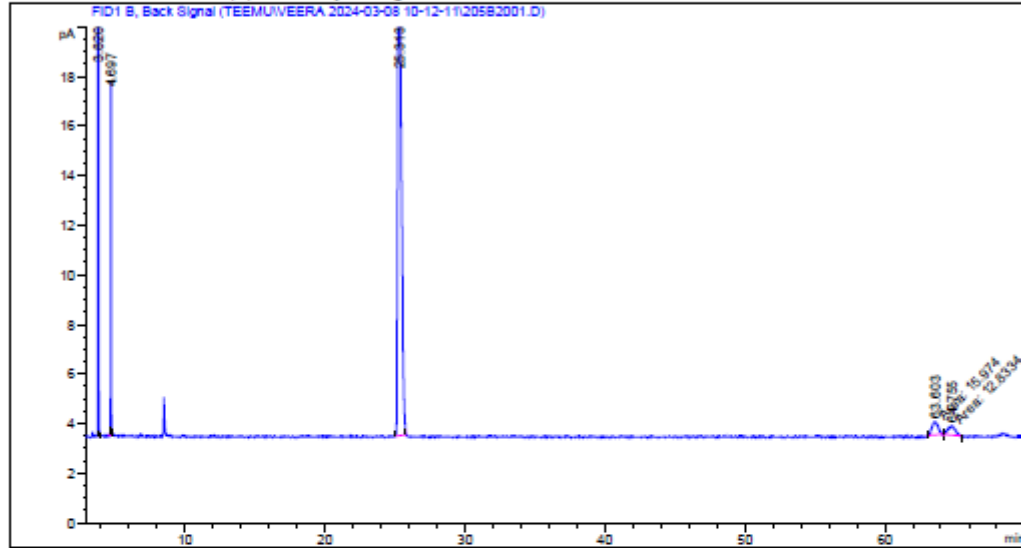
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
Totals :				715.10188	105.50920	

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\205B2001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-4h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :   20
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 205
Injection Date  : 3/9/2024 7:55:22 AM       Inj       :    1
                                                Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 9:29:41 AM by VEERA
                (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.820	BB	0.0374	120.99962	50.72906	22.04546
2	4.697	BB	0.0421	38.60527	13.85343	7.03367
3	25.313	BB	0.2485	360.45193	21.31352	65.67234
4	63.603	MM	0.5006	15.97395	5.23510e-1	2.91037
5	64.755	MM	0.6000	12.83340	3.51779e-1	2.33817

Instrument 1 3/11/2024 9:29:46 AM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-08 10-12-11\205B2001.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-4h

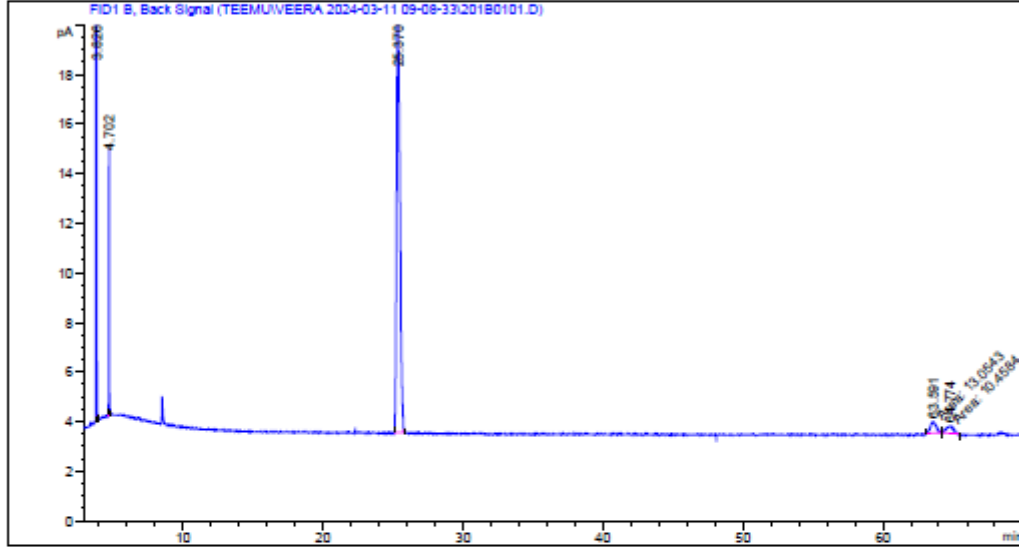
Totals : 548.86417 86.77130

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\201B0101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-5h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    1
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 201
Injection Date  : 3/11/2024 9:13:06 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                : SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 4:35:14 PM by VEERA
                : (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.826	BB	0.0345	99.56271	46.65501	22.60909
2	4.702	BB	0.0452	29.34046	10.56092	6.66275
3	25.370	BB	0.2407	287.95001	17.72640	65.38882
4	63.591	MM	0.4935	13.05430	4.40896e-1	2.96442
5	64.774	MM	0.5965	10.45836	2.92200e-1	2.37493

Instrument 1 3/11/2024 4:35:23 PM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\201B0101.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-5h

Totals : 440.36584 75.67541

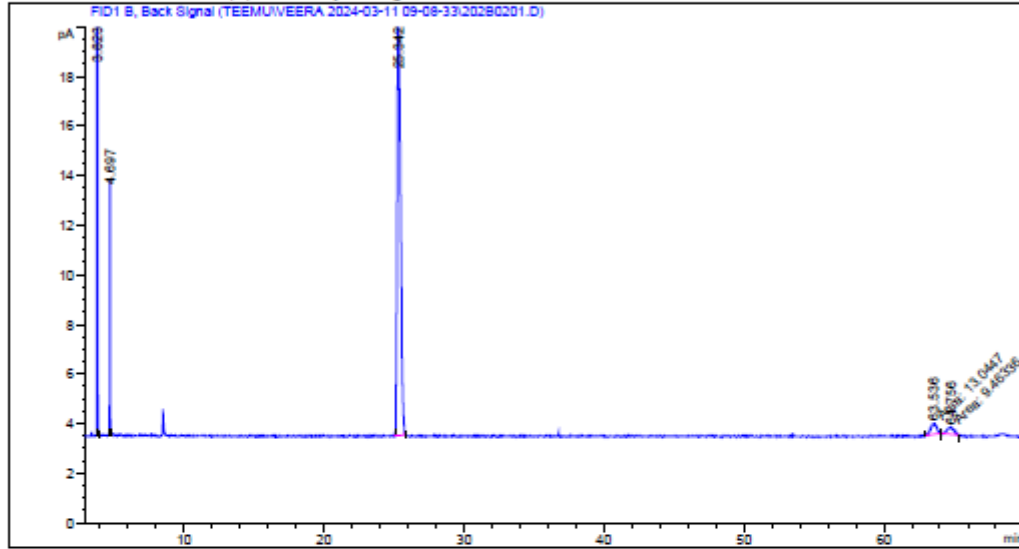


Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\202B0201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-6h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    2
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 202
Injection Date  : 3/11/2024 10:24:26 AM      Inj       :    1
                                                Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                  SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 3/11/2024 4:36:13 PM by VEERA
                  (modified after loading)
Additional Info  : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.823	BB	0.0354	97.09785	43.95016	21.92397
2	4.697	BB	0.0456	28.04305	9.98153	6.33191
3	25.342	BB	0.2427	295.23535	17.98318	66.66195
4	63.536	MM	0.4912	13.04474	4.42585e-1	2.94541
5	64.756	MM	0.5727	9.46336	2.75402e-1	2.13676

Instrument 1 3/11/2024 4:36:29 PM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\202B0201.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-6h

Totals : 442.88436 72.63285

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\203B0301.D

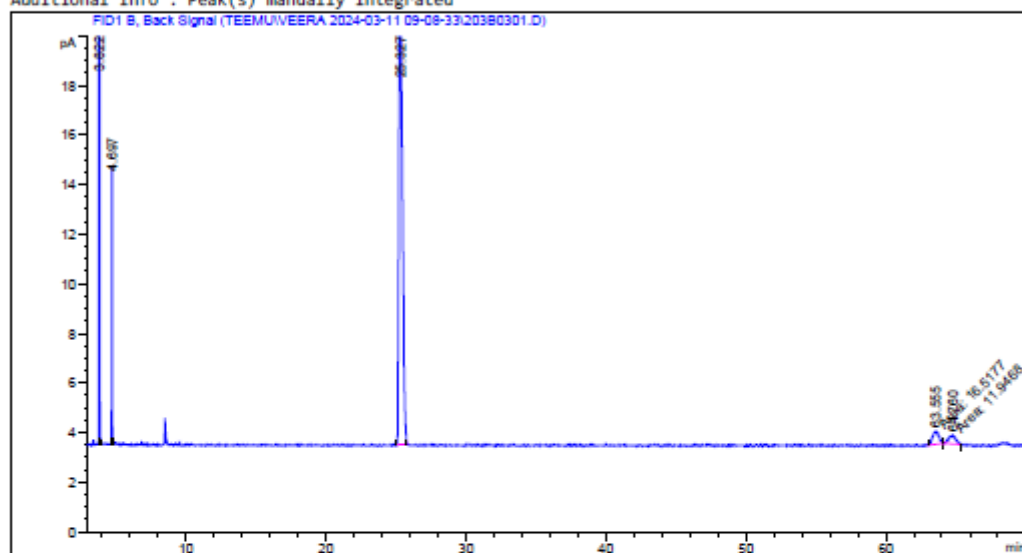
Sample Name: TJN-1-006-SE2-7h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    3
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 203
Injection Date  : 3/11/2024 11:35:49 AM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 4:37:16 PM by VEERA
                (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====

```



```

=====
                          Area Percent Report
=====

```

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.822	BB	0.0362	103.09702	45.14001	21.06265
2	4.697	BB	0.0460	30.82788	10.84104	6.29811
3	25.327	BB	0.2602	327.08850	19.44881	66.82396
4	63.555	MM	0.5229	16.51770	5.26496e-1	3.37456
5	64.760	MM	0.6012	11.94678	3.31198e-1	2.44072

Instrument 1 3/11/2024 4:37:28 PM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\203B0301.D

Sample Name: TJN-1-006-SE2-7h

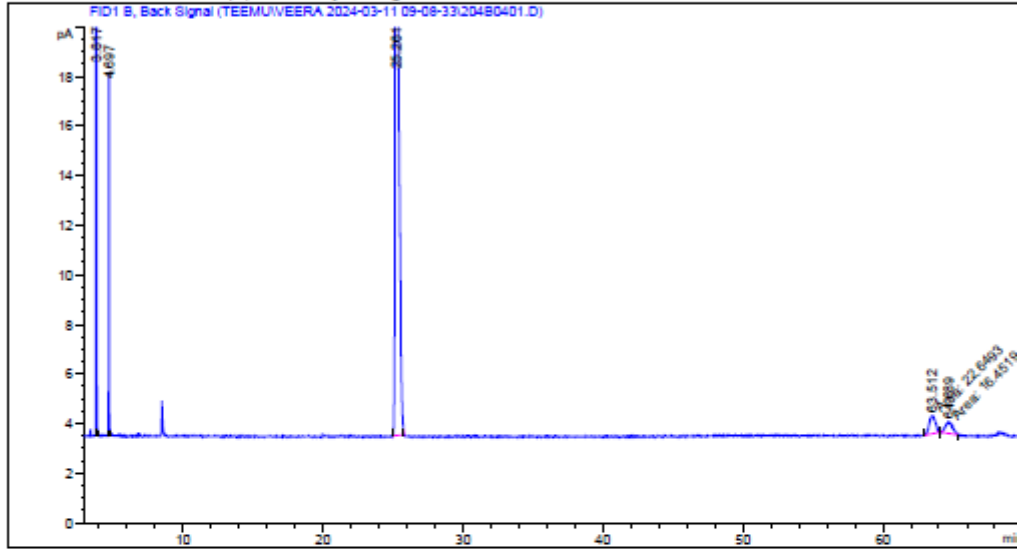
```
Totals :                      489.47788  76.28756
```

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\204B0401.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-8h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 204
Injection Date  : 3/11/2024 12:47:11 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                : SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 4:38:14 PM by VEERA
                : (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.817	BB	0.0359	145.44099	64.45731	20.97401
2	4.697	BB	0.0460	40.44575	14.20585	5.83267
3	25.261	BB	0.2717	468.44644	25.90917	67.55454
4	63.512	MM	0.5100	22.64934	7.40237e-1	3.26626
5	64.689	MM	0.6148	16.45193	4.46012e-1	2.37253

Instrument 1 3/11/2024 4:38:26 PM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\204B0401.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-8h

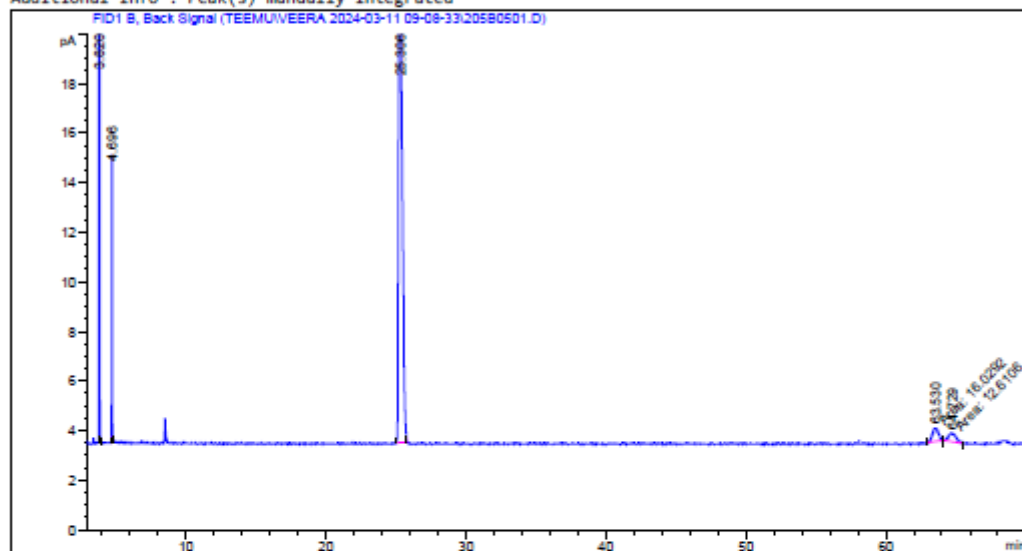
Totals : 693.43445 105.75858

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\205B0501.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-9h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    5
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 205
Injection Date  : 3/11/2024 1:58:33 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method     : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                  SPLIT50 B-DM.M
Last changed    : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed    : 3/11/2024 4:39:10 PM by VEERA
                  (modified after loading)
Additional Info : Peak(s) manually integrated
=====
  
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.820	BB	0.0372	112.14690	47.40990	20.81102
2	4.696	BB	0.0462	32.05615	11.19324	5.94864
3	25.306	BB	0.2570	366.03949	21.41737	67.92568
4	63.530	MM	0.4830	16.02924	5.53135e-1	2.97453
5	64.729	MM	0.6043	12.61058	3.47829e-1	2.34014

Instrument 1 3/11/2024 4:39:12 PM VEERA

Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\205B0501.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-9h

Totals : 538.88236 80.92147

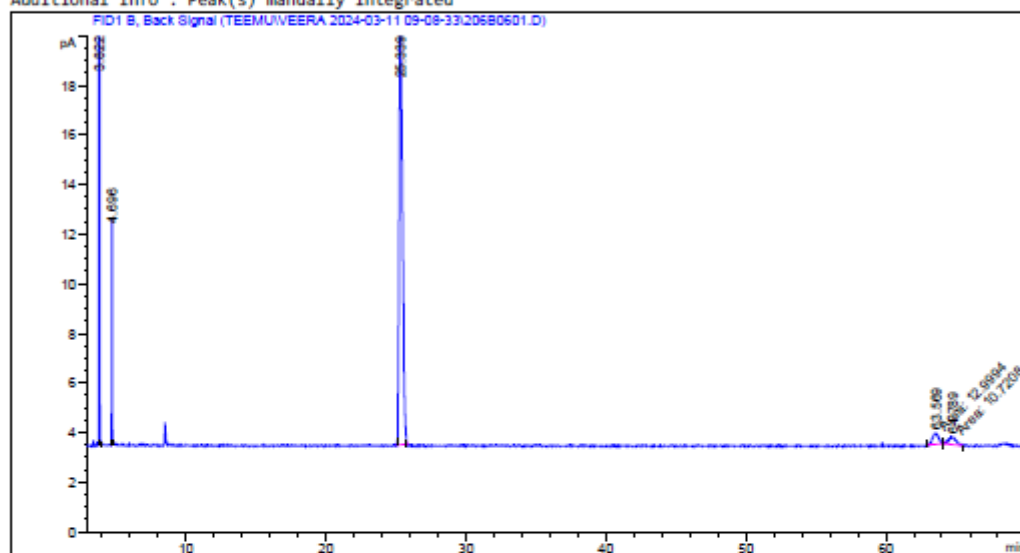
Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\206B0601.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-10h

```

=====
Acq. Operator   : TEEMU                      Seq. Line :    6
Acq. Instrument : Instrument 1                Location  : Vial 206
Injection Date  : 3/11/2024 3:09:56 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: 0.2 µl

Acq. Method    : C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\TEEMU 100C 70MIN INL250
                                           SPLIT50 B-DM.M
Last changed   : 2/27/2024 12:28:24 PM by VEERA
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TEEMU 100-110C 70M7 INL250 SPLIT100 B-DM.M
Last changed   : 3/11/2024 4:40:00 PM by VEERA
                                           (modified after loading)
  
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      :      Signal
Multiplier:    :      1.0000
Dilution:      :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: FID1 B, Back Signal

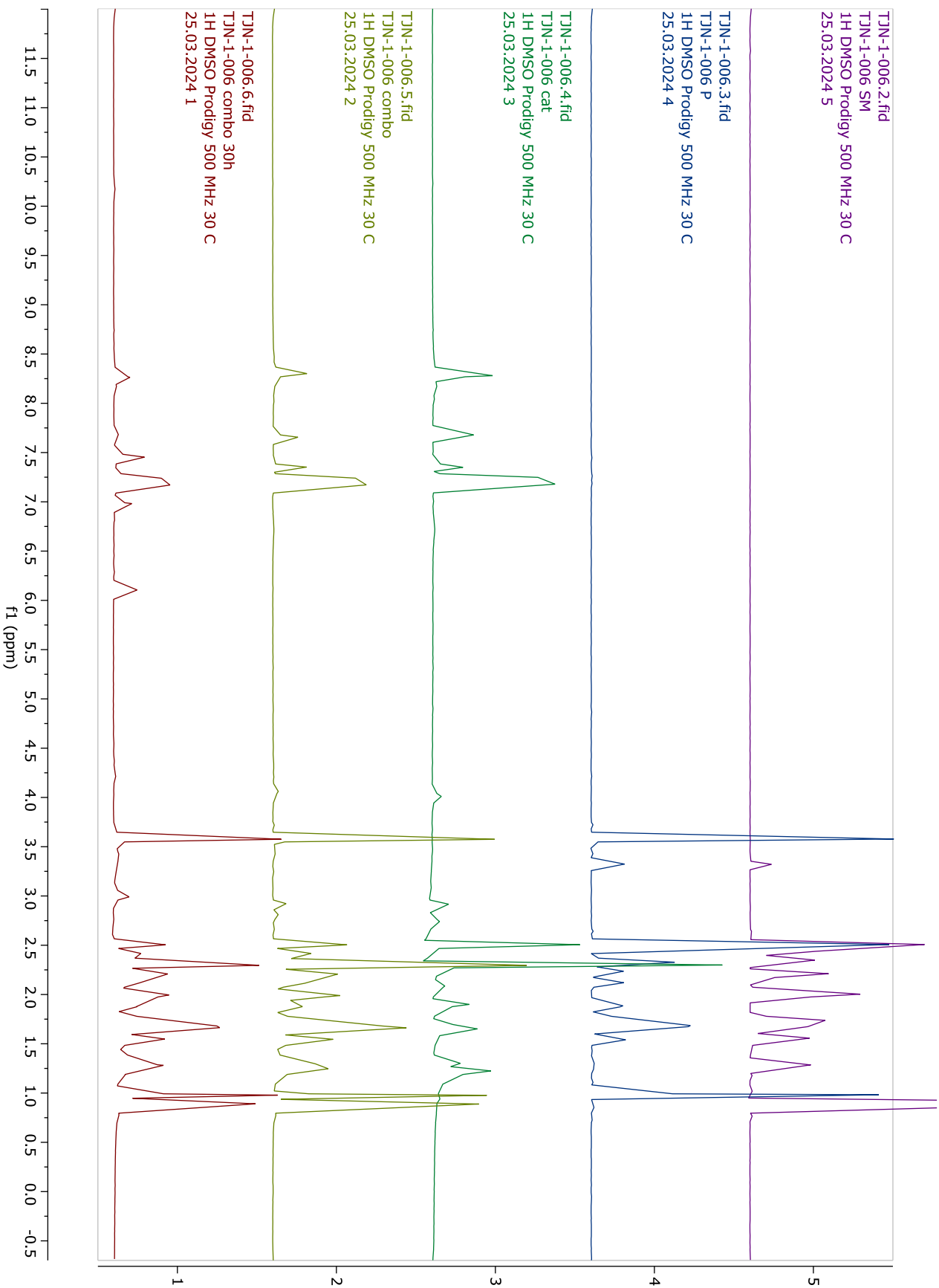
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [pA*s]	Height [pA]	Area %
1	3.822	BB	0.0362	98.15952	43.08714	22.71973
2	4.696	BB	0.0466	25.43450	8.79214	5.88700
3	25.339	BB	0.2459	284.73099	17.35062	65.90305
4	63.569	MM	0.4897	12.99939	4.42461e-1	3.00880
5	64.789	MM	0.6253	10.72083	2.85731e-1	2.48141

Instrument 1 3/11/2024 4:40:04 PM VEERA

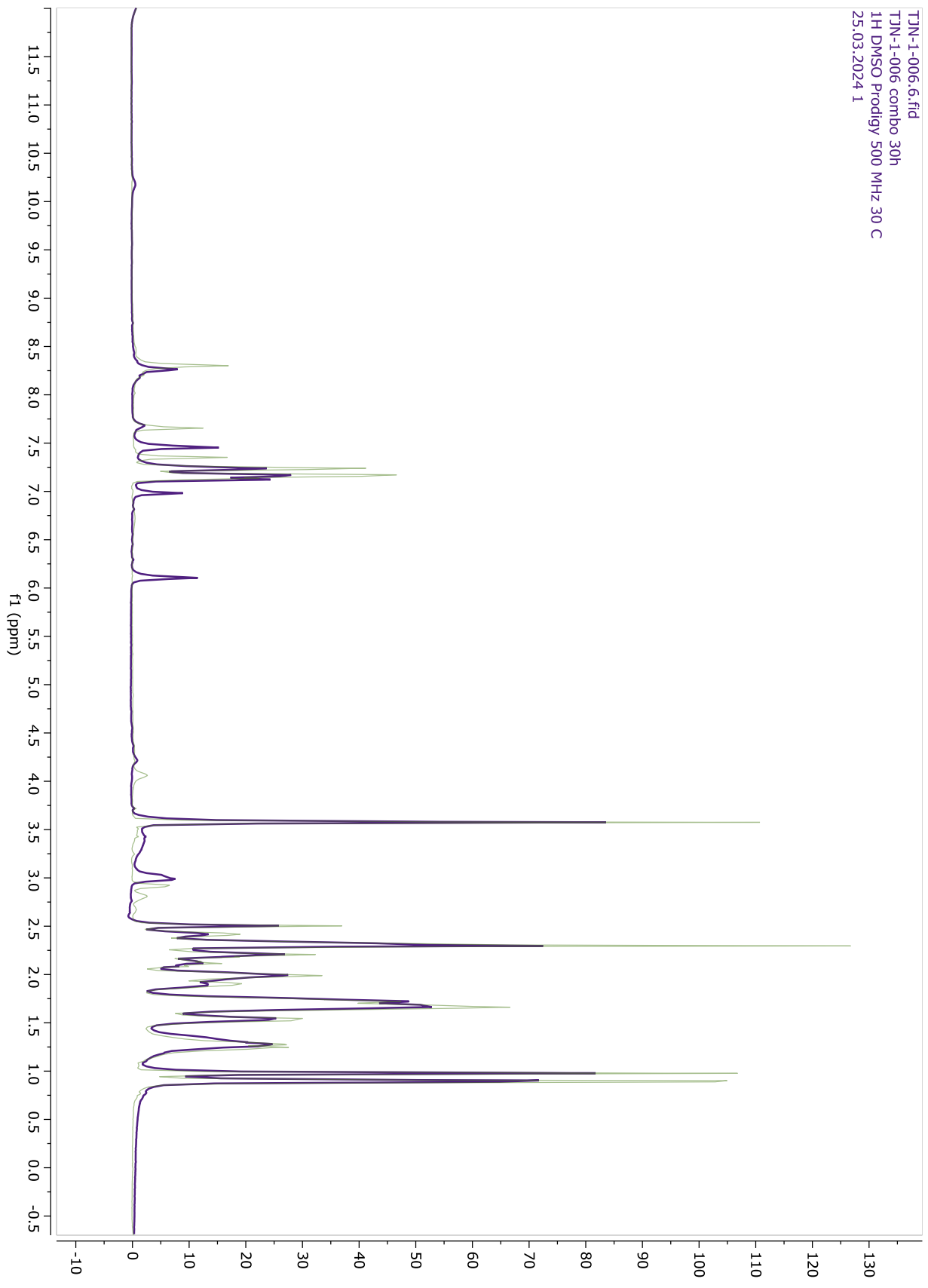
Page 1 of 2

Data File C:\CHEM32\1\DATA\TEEMU\VEERA 2024-03-11 09-08-33\206B0601.D  
 Sample Name: TJN-1-006-SE2-10h

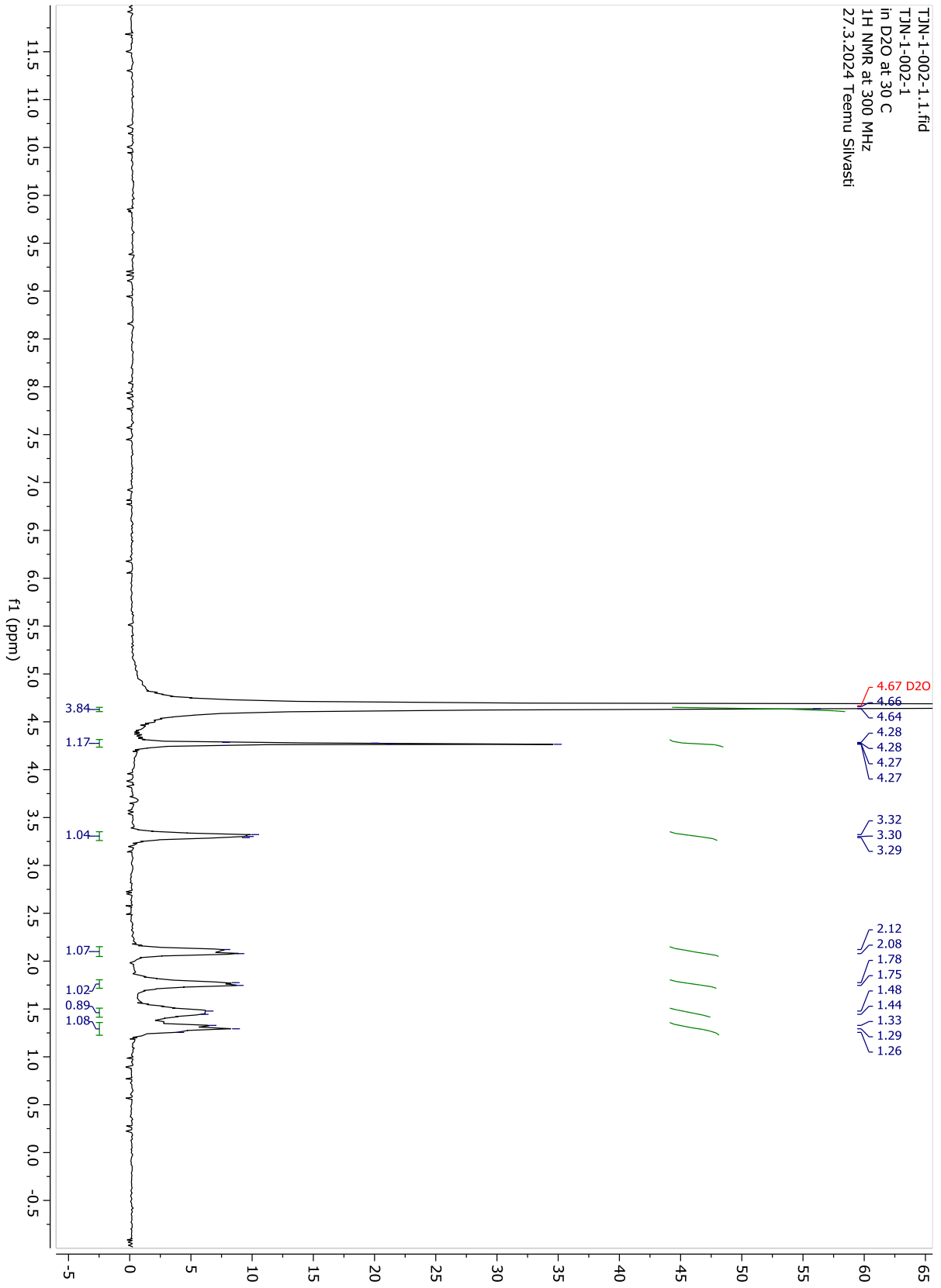
Totals : 432.04522 69.95808



TJN-1-006.6.fid  
TJN-1-006 combo 30h  
1H DMSO Prodigy 500 MHz 30 C  
25.03.2024 1

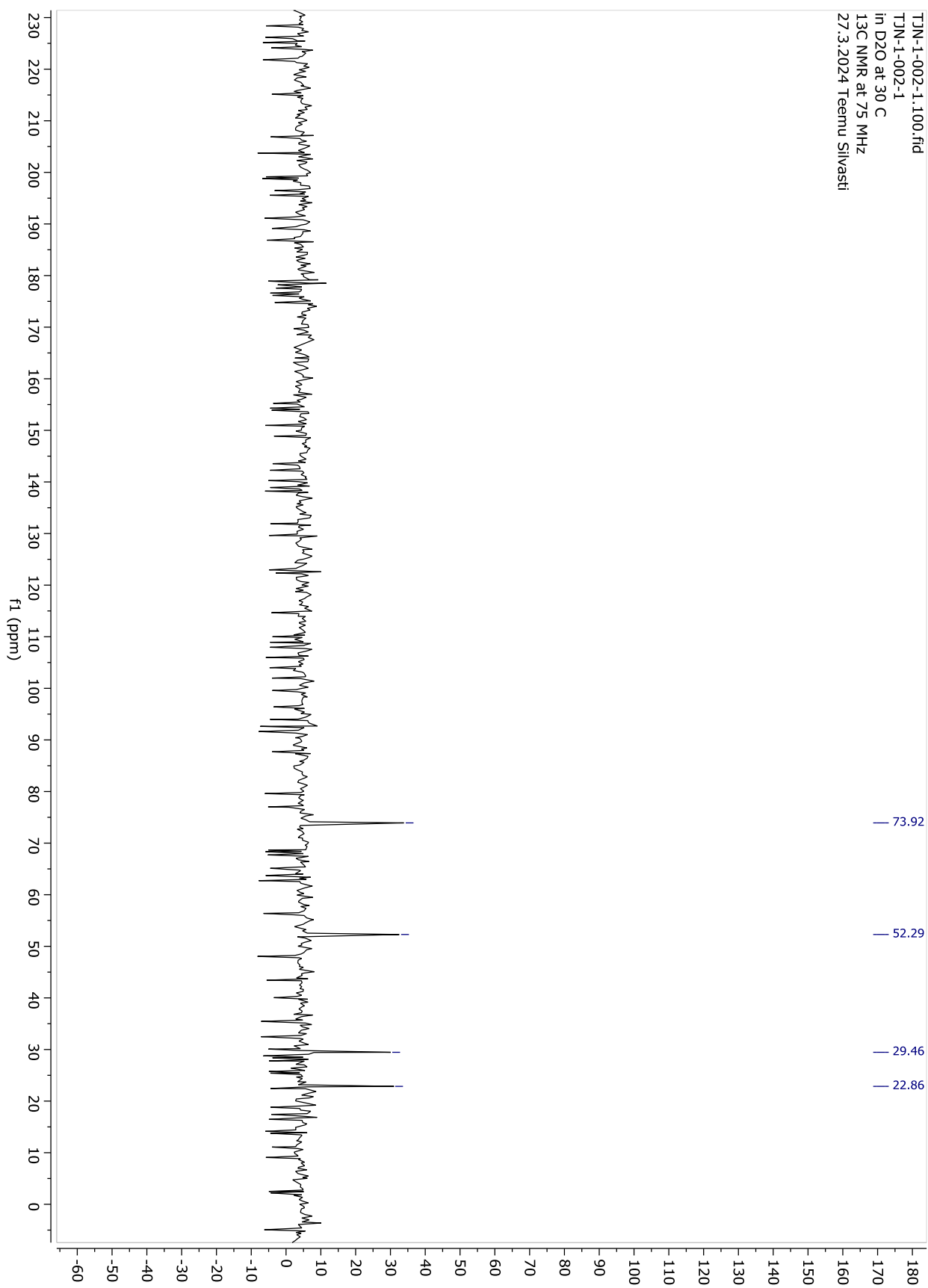


## LIITE 8





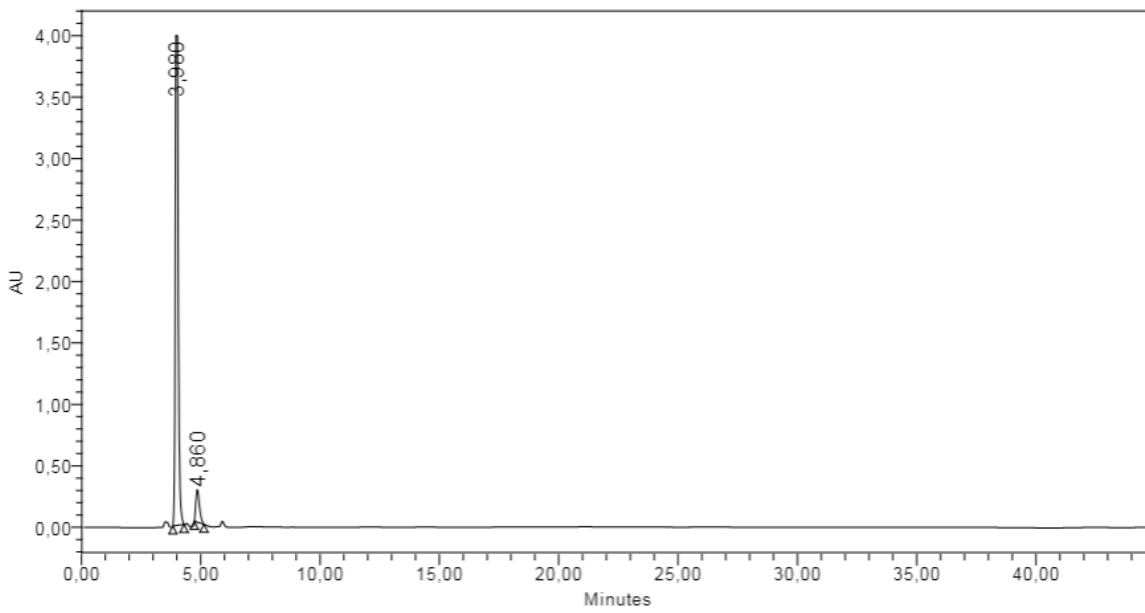
## LIITE 9





Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	TJN-002-5	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	93	Acq. Method Set:	Hex90IPA10_AB_1ml_254210
Injection #:	1	Processing Method:	
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 2
Run Time:	120,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	18.12.2023 14:30:39 EET		
Date Processed:	18.12.2023 15:20:09 EET		

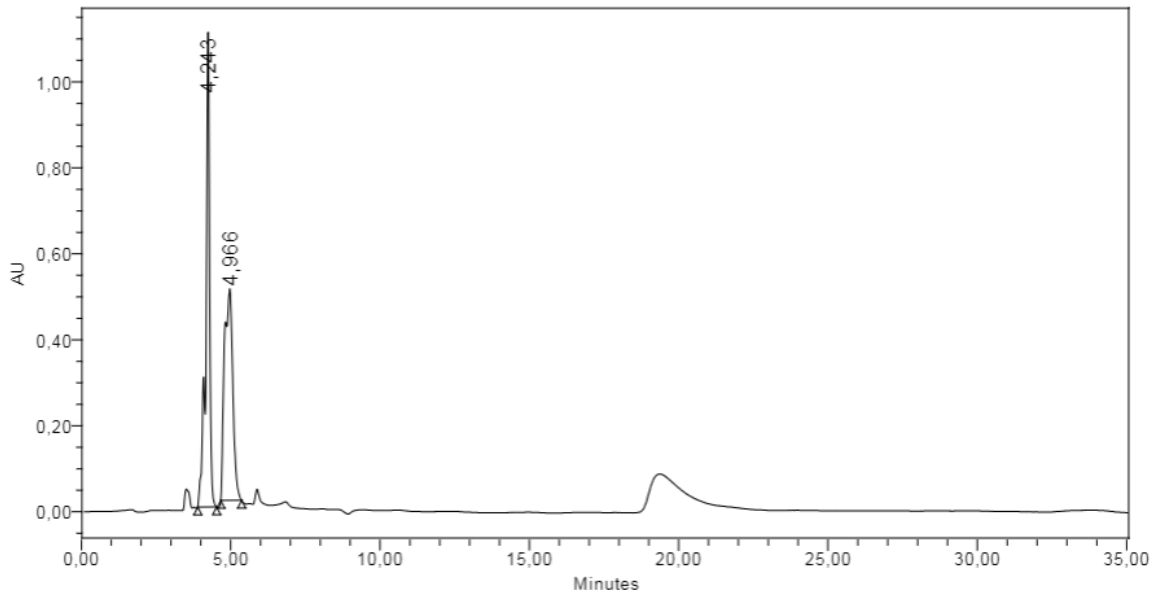


	RT	Area	% Area	Height
1	3,980	34633887	92,53	4253264
2	4,860	2795504	7,47	260845



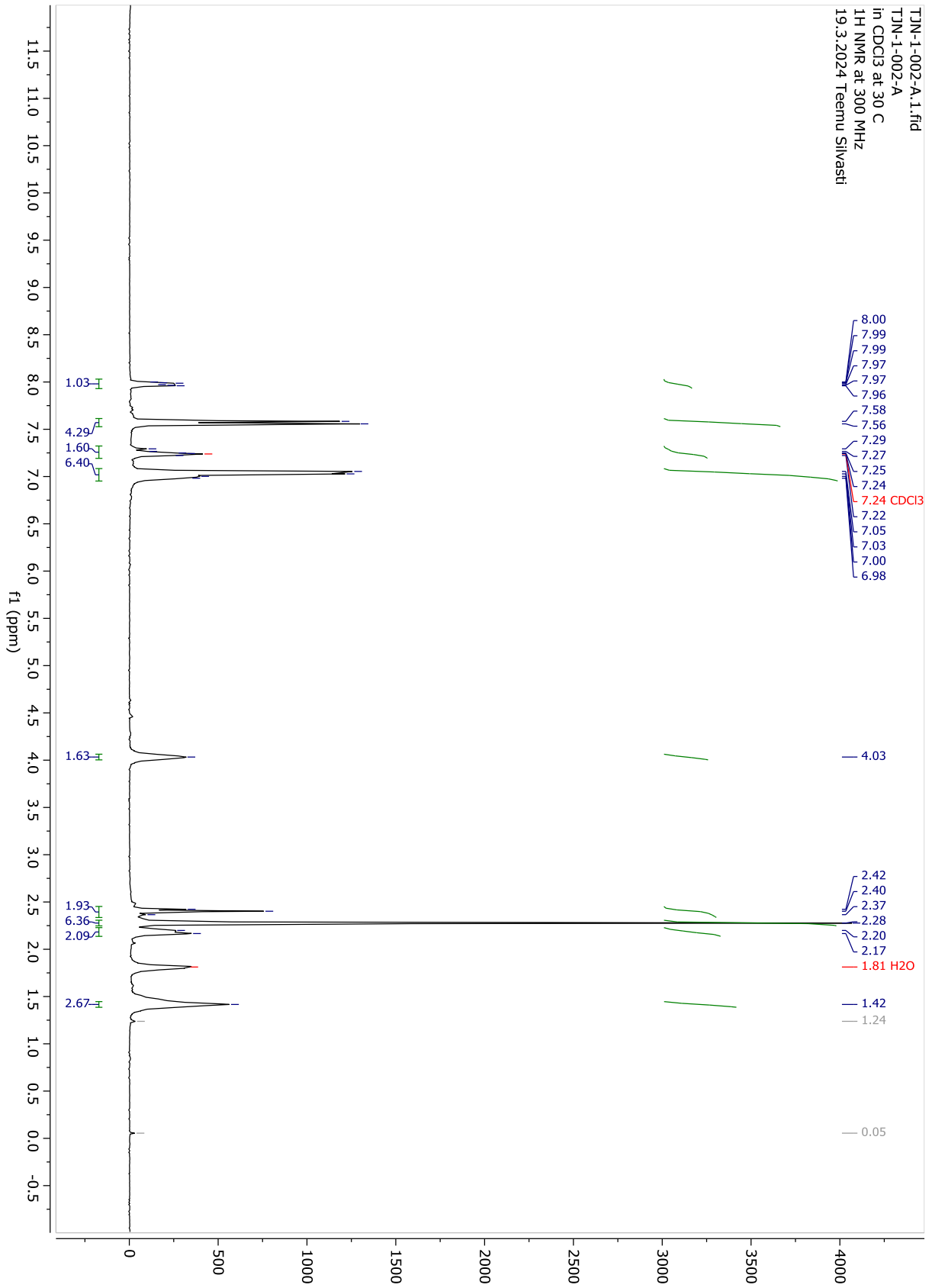
Default Individual Report

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	TJN-002-R3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	
Vial:	89	Acq. Method Set:	Hex90IPA10_AB_1ml_254210
Injection #:	1	Processing Method:	
Injection Volume:	10,00 ul	Channel Name:	2487Channel 2
Run Time:	120,0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	
Date Acquired:	18.12.2023 13:51:49 EET		
Date Processed:	18.12.2023 15:17:12 EET		

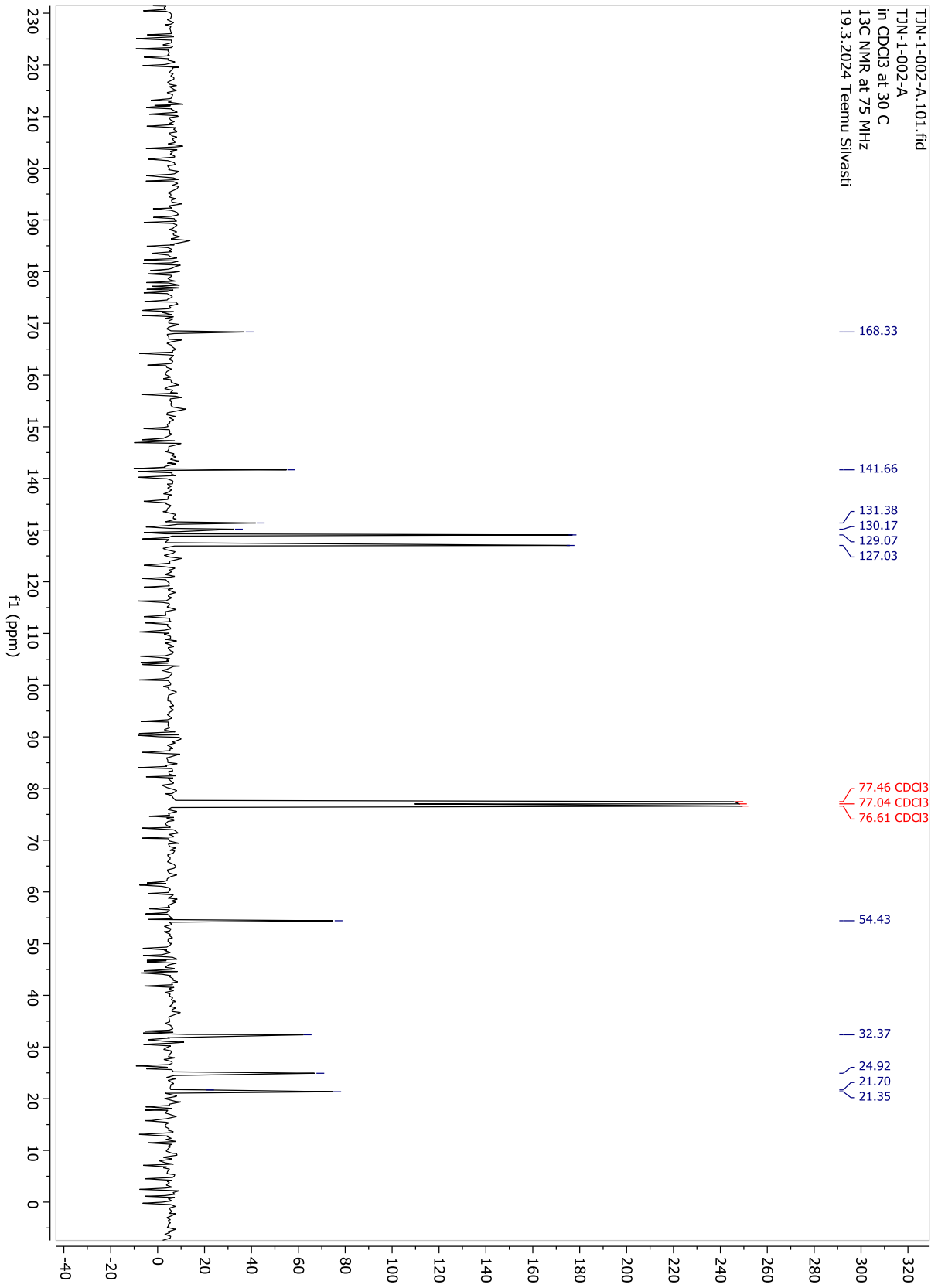


	RT	Area	% Area	Height
1	4,243	9795439	50,59	1109369
2	4,966	9566591	49,41	491019

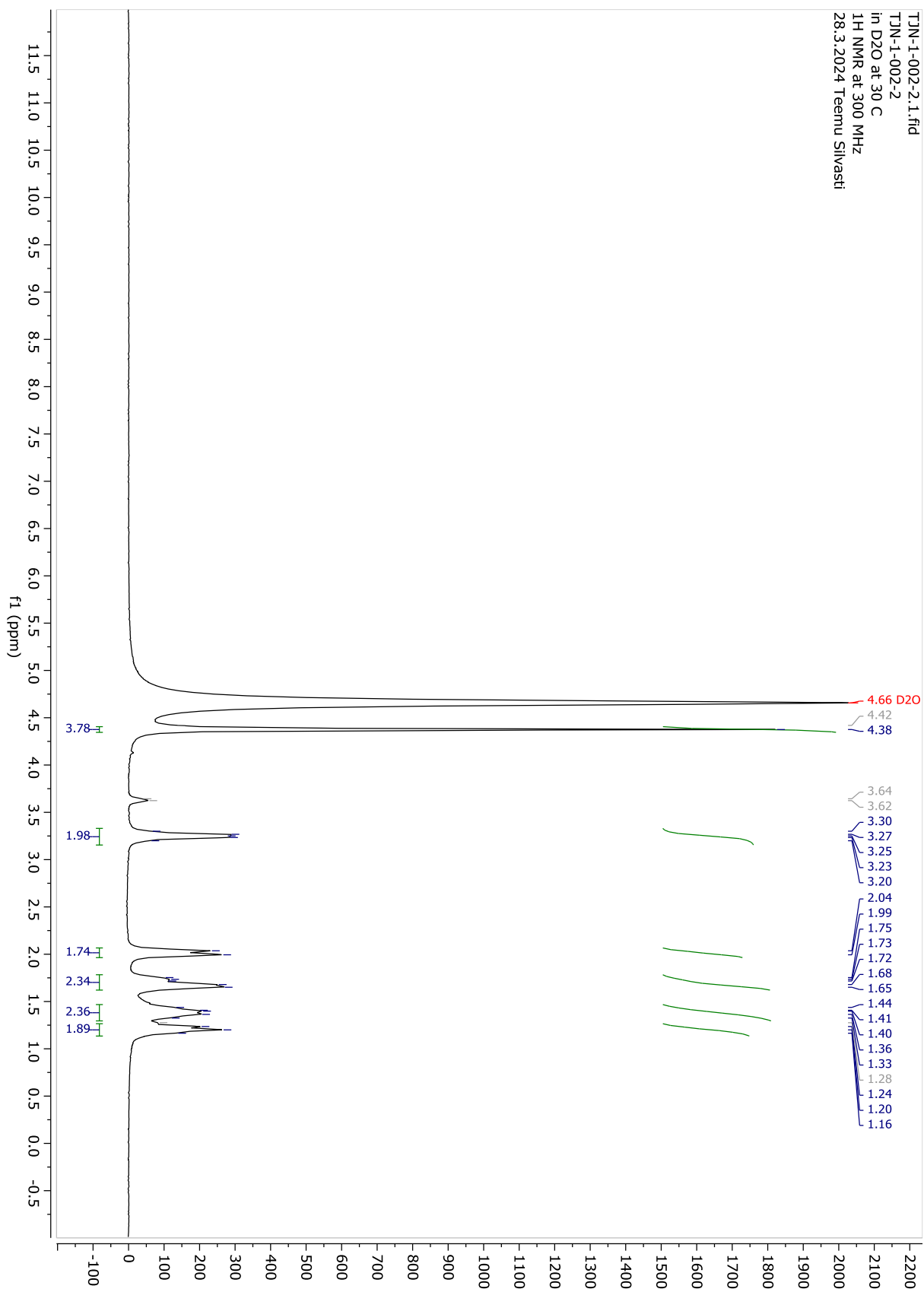
## LIITE 12



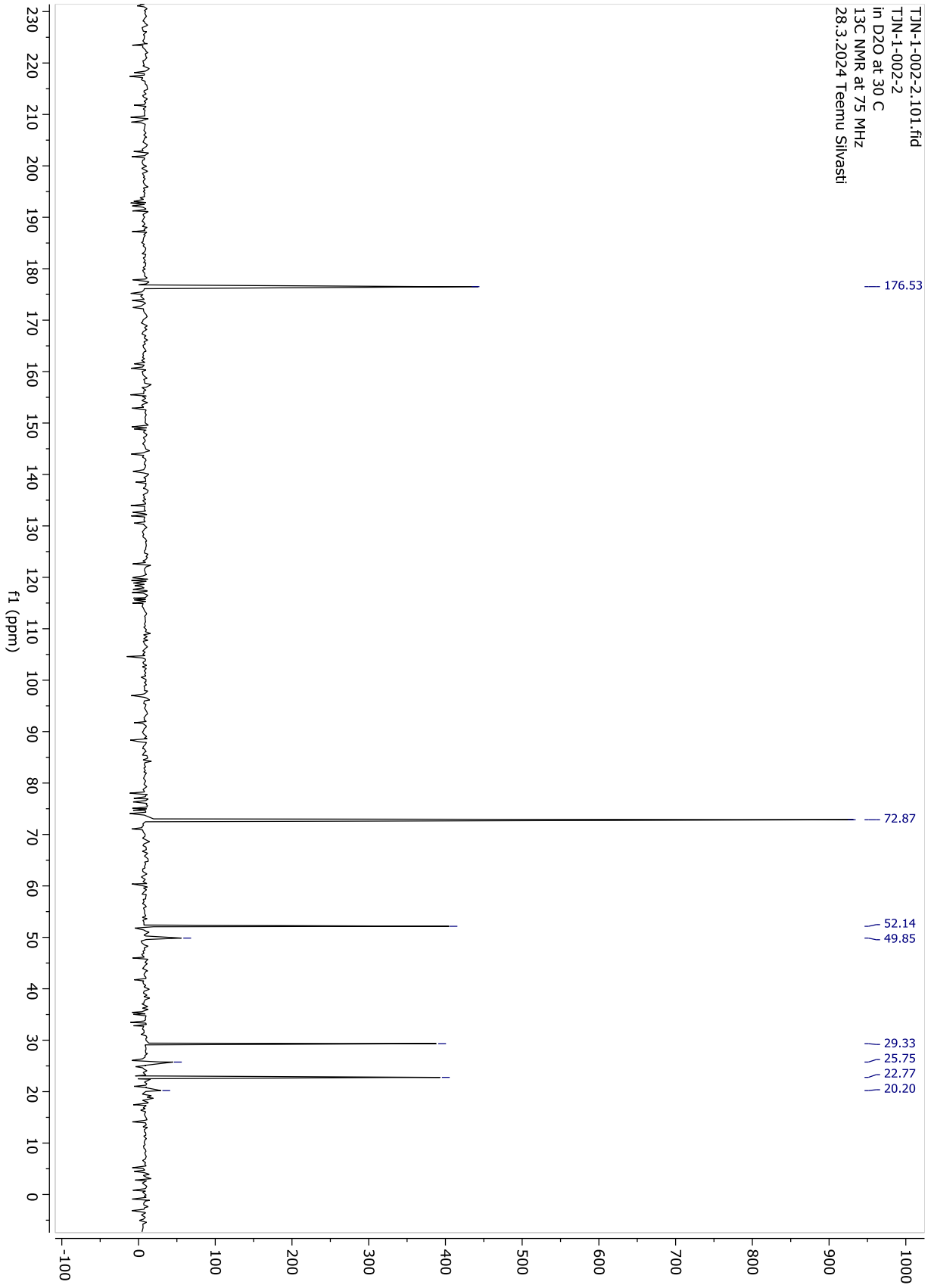
## LIITE 13



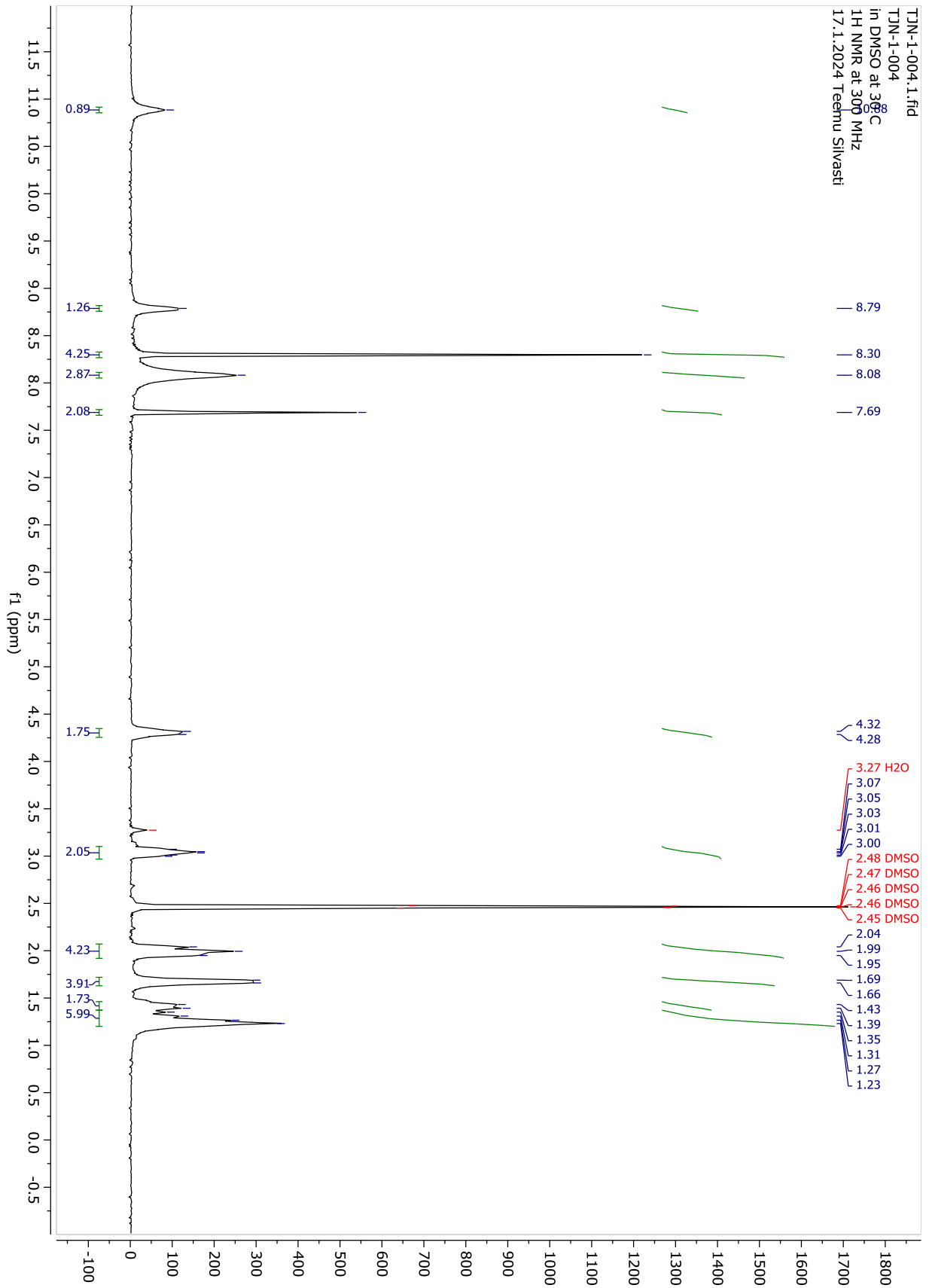
## LIITE 14



## LIITE 15

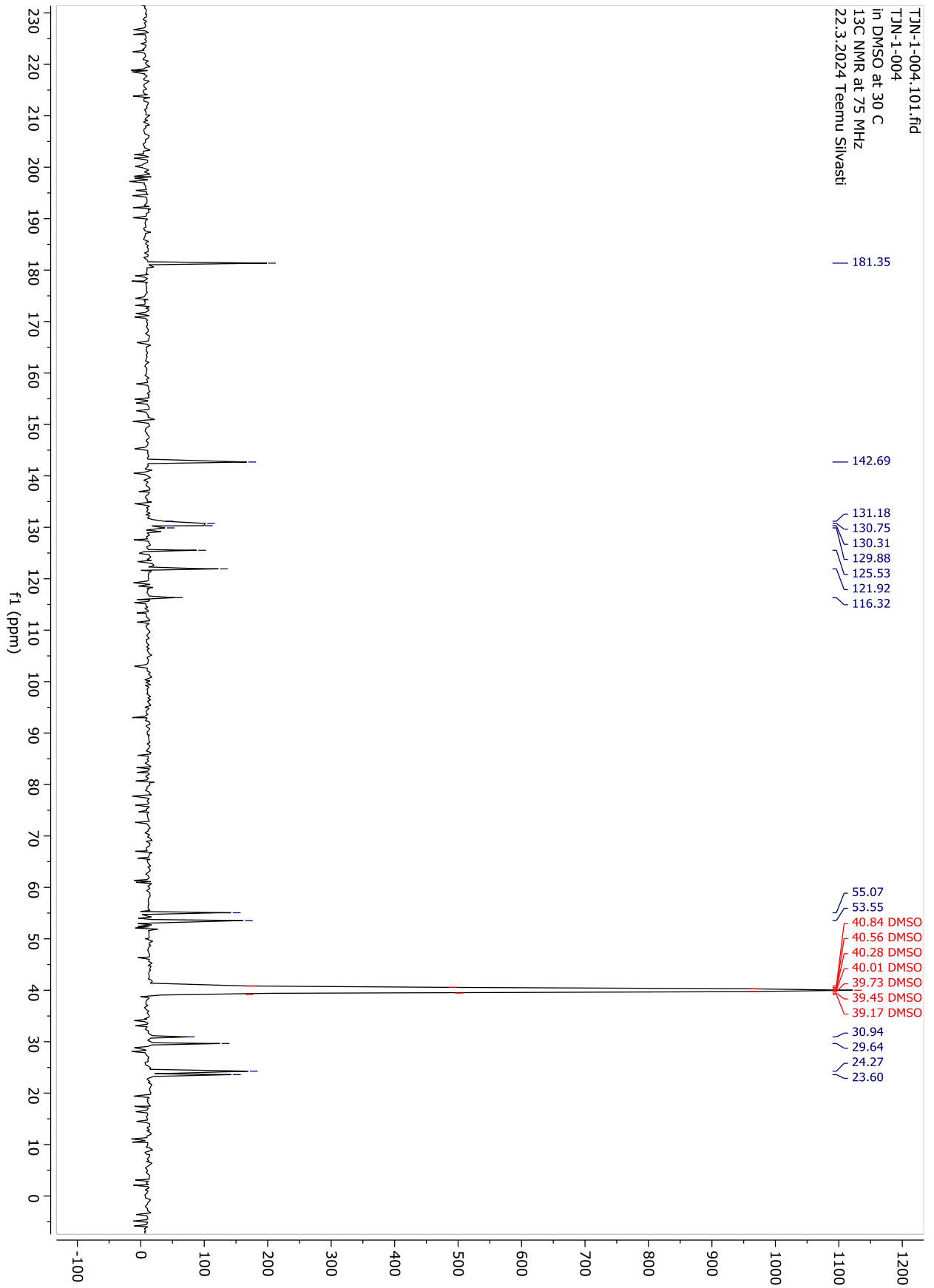


## LIITE 16

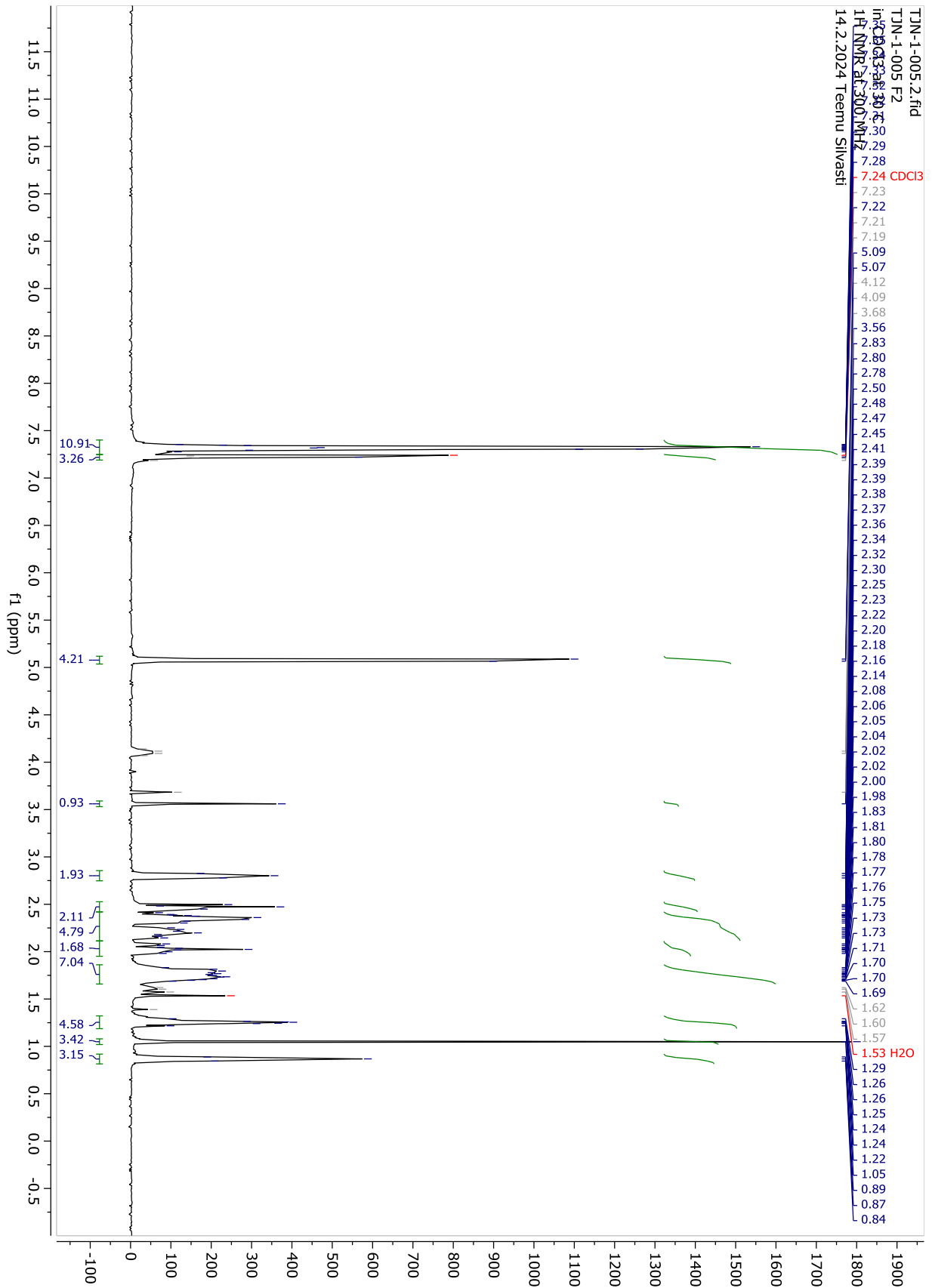




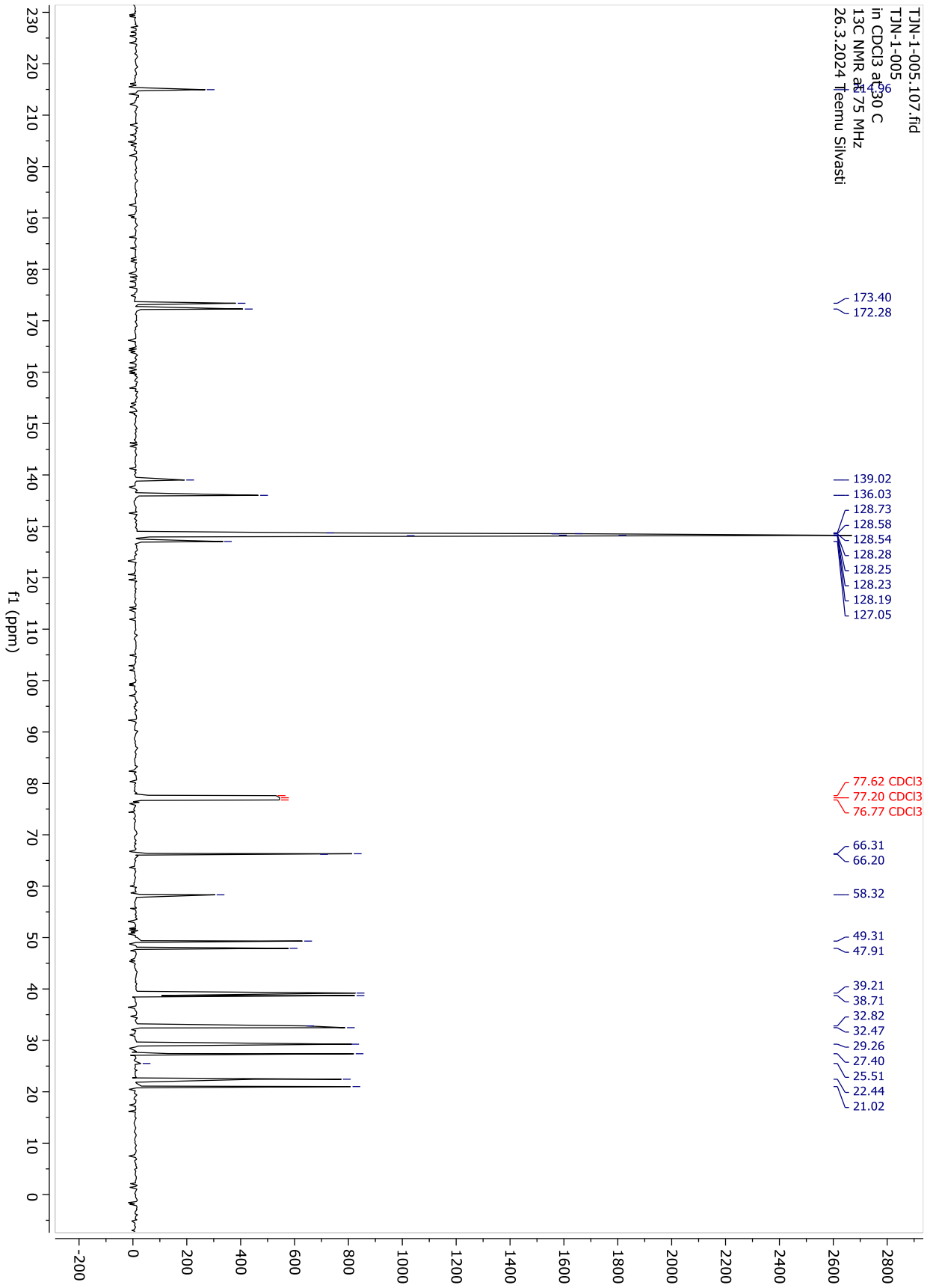
## LIITE 17



## LIITE 18



## LIITE 19



- KUVA 1. MACMILLANIN JA ALLENIN KATALYTTISTEN SYSTEEMINEN LUOKITUS, KUN KÄYTÖSSÄ ON KAKSI KATALYTTIÄ. A) BIFUNKTIONAALINEN KATALYYSI, B) KAKSOISAKTIVAATIOKATALYYSI, C) KASKADIKATALYYSI JA D) SYNERGISTINEN KATALYYSI.<sup>4</sup> 7
- KUVA 2. MICHAELIS-MENTEN SYSTEEMIN AIKANORMALISOIDUT KONSENTRAATIOPROFIILIT. MIELIVALTAAN EKSPONENTTI (1 TAI 2) MUUTTA KUVAAJIEN PEITTOA.  $\circ$  1 MOL%,  $\diamond$  3 MOL%.<sup>33</sup> 22
- KUVA 3. MICHAELIS-MENTEN SYSTEEMIN AIKANORMALISOIDUT KONSENTRAATIOPROFIILIT. MIELIVALTAAN EKSPONENTTI (1 TAI 2) MUUTTA KUVAAJIEN PEITTOA.  $\circ$  1 MOL%,  $\diamond$  3 MOL%. EKSPONENTIN OLLESSA 1, KUVAAJAT PEITTÄVÄT TOISIAAN JA NÄIN KATALYTTIN OIKEAKSI KERTALUVUKSI SAADAAN 1.<sup>33</sup> 23
- KUVA 4. VTNA:N KÄYTTÖÄ REAKTIOKOMPONENTTIEN KERTALUKUJEN TUTKIMISESSA. ENSIMMÄINEN RIVI ON SUBSTRAATILLE **S<sub>i</sub>**, TOINEN RIVI SUBSTRAATILLE **S<sub>ii</sub>**, KOLMAS RIVI KATALYTTILLE **KAT**. ENSIMMÄINEN PYSTYRIVI EKSPONENTTI  $A = 0$ , TOINEN PYSTYRIVI  $A = 0,5$ .<sup>34</sup> 26
- KUVA 5. VTNA:N KÄYTTÖÄ REAKTIOKOMPONENTTIEN KERTALUKUJEN TUTKIMISESSA. ENSIMMÄINEN RIVI ON SUBSTRAATILLE **S<sub>i</sub>**, TOINEN RIVI SUBSTRAATILLE **S<sub>ii</sub>**, KOLMAS RIVI KATALYTTILLE **KAT**. ENSIMMÄINEN PYSTYRIVI EKSPONENTTI  $A = 1$ , TOINEN PYSTYRIVI  $A = 2$ .<sup>34</sup> 27
- KUVA 6. BRIGGS-HALDANE OLETUKSESTA TEHTY KUVAAJA. X-AKSELI ON AIKA  $T$  SEKUNTEINA JA Y-AKSELI ON KONSENTRAATIO. 35
- KUVA 7. ESITASAPAINO OLETUKSESTA TEHTY KUVAAJA. HUOMIONA, ETTÄ SUBSTRAATIN **S** KONSENTRAATIO ON PALJON SUUREMPI KUIN KATALYTTIN TAI SEN MUODOSTAMAN KOMPLEKSIIN JA SE EI NÄY KUVAAJASSA. X-AKSELI ON AIKA  $T$  SEKUNTEINA JA Y-AKSELI ON KONSENTRAATIO. 36
- KUVA 8. SATURAATIOKINETIIKKA KUVAAJANA. X-AKSELINA ON SUBSTRAATIN **S** KONSENTRAATIO JA Y-AKSELINA REAKTIONOPEUS. KUVAAJA NÄYTTÄÄ REAKTIONOPEUDEN MUUTTUVAN ENSIMMÄISEN KERTALUVUN KINETIIKASTA NOLLANEN KERTALUVUN KINETIIKKAAN, KUN SUBSTRAATIN KONSENTRAATIO KASVAA TARPEEKSI. 38
- KUVA 9. FUNKTIOJOUKON (YHTÄLÖT 32 – 34) KUVAAJAT. VIHREÄ ON PARABOLISEN KASVUN KUVAAJA (YHTÄLÖ 32), ORANSSI ON EKSPONENTIAALISTA KASVUN KUVAAJA (YHTÄLÖ 33) JA SININEN ON HYPERBOLISEN KASVUN KUVAAJA (YHTÄLÖ 34).<sup>64</sup> X-AKSELINA ON AIKA  $T$  JA Y-AKSELINA ON AUTOKATALYTTIN **T<sub>A</sub>**:N KONSENTRAATIO. 40
- KUVA 10. YHTÄLÖN 40 KUVAAJA, KUN  $W_0 = 1000$ ,  $k = 0,001$  JA  $T_{A0} = 1$ . X-AKSELINA ON AIKA  $T$  JA Y-AKSELINA ON AUTOKATALYTTIN **T<sub>A</sub>**:N KONSENTRAATIO. KUVAAJA ON JAETTU ERI VAIHEISIIN VÄREILLÄ KERTOEN, KUINKA KONSENTRAATION MUUTOS AJAN SUHTEEN MUUTTUU REAKTION EDETESSÄ. 41
- KUVA 11. KUVAAJAT KAAVIOSSA 16 OLEVILLE SIMULOIDUILLE REAKTOILLE ERI REAKTIONOPEUKSILLA. SIMULAATION PARAMETRIT OLIVAT:  $[S_0] = 100$  MM,  $[T_{A0}] = 0$ ,  $k_1 = 0,0001$  MM<sup>-1</sup> S<sup>-1</sup> JA  $k_2 = 0,0025$  S<sup>-1</sup> (VIHREÄ, A),  $k_2 = 0,0005$  S<sup>-1</sup> (SININEN, B) SEKÄ  $k_2 = 0,00005$  S<sup>-1</sup> (ORANSSI, C).<sup>64</sup> X-AKSELINA ON AIKA  $T$  JA Y-AKSELINA AUTOKATALYTTIN **T<sub>A</sub>** KONSENTRAATIO. 45
- KUVA 12. SUGIURAN RYHMÄN EHDOTTAMAT VAIHTOEHDOT, MITEN KOKATALYTTI **4A** TAI **4B** AKTIVOIVAT MAT-KATALYTTIÄ **3**.<sup>87</sup> 52
- KUVA 13. A) PMDETA:N KOORDINOITUMINEN KATALYTTIIN **16**, B) TACN:N KOORDINOITUMINEN KATALYTTIIN **16**.<sup>96</sup> 62
- KUVA 14. KIESEWETTERIN RYHMÄN BIS(TIOUREA) -KATALYTTI.<sup>97</sup> 62
- KUVA 15. ENAMIININ HYÖKKÄYS VINYLOGISEEN IMINIUM-IONIIN SEN TAKAPUOLELTA JØRGENSENIN RYHMÄN KASKADIREAKTION ENSIMMÄISESSÄ SYKLISSÄ.<sup>98</sup> 68
- KUVA 16. JACOBSENIN RYHMÄN GEOMETRISESTI JA ENERGEETTISESTI MINIMOITU, ENERGIALTAAN MATALIN SIIRTYMÄTILA SYKLOADDITIOILLE, MIKÄ ON LASKETTU B3LYP/6-31G(d) DFT TASOLLA. SIDOSPITUUDET OVAT ÅNGSTROMEINA. AR = 3,5-(CF<sub>3</sub>)C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>.<sup>127</sup> 97
- KUVA 17. CARTERIN RYHMÄN TUTKIMIA TIOUREA-AMIINI KATALYTTIEN PFAU-D'ANGELO REAKTIOON, JOISTA SININEN ON PARHAITEN TOIMINUT KATALYTTI JA **84C** ON MIELENKIINTOISEN HEIKOSTI TOIMINUT KATALYTTI. **85** ON TUTKIELMASSA VALMISTETTU KATALYTTI, MIKÄ ON SUHTEELLISEN LÄHELLÄ PUNAISELLA MERKITTYÄ YHDISTEITÄ FUNKTIONAALISUUDELTAAN. 119
- KUVA 18. KORKEAMMAN KONSENTRAATION REAKTION (SE1) KOMPONENTTIEN KONSENTRAATIOIDEN MUUTOS AJAN SUHTEEN. ● = LÄHTÖAINEEN KONSENTRAATIO, ● = TUOTTEEN ENSIMMÄISEN ENANTIOMEERIN KONSENTRAATIO JA ● = TUOTTEEN TOISEN ENANTIOMEERIN KONSENTRAATIO.  $[81]_0 = 0,979$  M. 121
- KUVA 19. MATALAMMAN KONSENTRAATION REAKTION (SE2) KOMPONENTTIEN KONSENTRAATIOIDEN MUUTOS AJAN SUHTEEN. ● = LÄHTÖAINEEN KONSENTRAATIO, ● = TUOTTEEN ENSIMMÄISEN ENANTIOMEERIN KONSENTRAATIO JA ● = TUOTTEEN TOISEN ENANTIOMEERIN KONSENTRAATIO.  $[81]_0 = 0,602$  M. 121
- KUVA 20. PFAU-D'ANGELON SAME EXCESS -KOKEEN KUVAAJAT. A) MOLEMMAT KONSENTRAATIOT SAMASSA KUVAAJASSA JA B) MATALAMMAN KONSENTRAATION DATAPISTEITÄ ON SIIRRETTY 10 H ETEENPÄIN. **B = 81 = 2-METYYLISYKLOHEKSANONI**. SE1: ● = **[81]**,  $[81]_0 = 0,979$  M. SE2: ● = **[81]**,  $[81]_0 = 0,602$  M. 123

KAAVIO 1. YKSINKERTAISTETUT KATALYTTISET SYKLIT A) YHDELLÄ KATALYTTILLÄ JA B) KATALYTTIN DIMEERIKOMPLEKSILLA.	1
KAAVIO 2. MACMILLANIN JA ALLENIN KONSEPTI SYNERGISTISELLE KATALYYSILLE. <sup>4</sup>	5
KAAVIO 3. BURÉSIN <i>ET AL.</i> <sup>1</sup> ESIMERKIT KAKSOISKATALYTTISISTÄ SYKLEISTÄ. A) KIERROSTA ERILLISESSÄ VAIHEESSA TAPAHTUVA DIMERISAATIO <sup>1,19</sup> , B) KAHDEN VAPAAN KATALYTTIN DIMERISAATIO <sup>1,20</sup> , C) YKSI KATALYTTI JA SEN MUODOSTAVA KATALYISOIVA VÄLITUOTE <sup>1,24</sup> , D) KATALYTTI-SUBSTRAATTI KOMPLEKSI REAGOI TOISEN VASTAAVAN KOMPLEKSIIN KANSSA <sup>1,21</sup> , E) KATALYTTI-SUBSTRAATTI KOMPLEKSI AKTIVOITUU UUDESTAAN KATALYTTIN TOIMESTA <sup>1,22</sup> JA F) KAHDEN SUBSTRAATIN REAKTIO, MISSÄ SUBSTRAATEISTA MUODOSTUVAT KOMPLEKSI REAGOIVAT KESKENÄÄN SYNERGISTISESTI <sup>1,23</sup> . <b>KAT</b> = KATALYTTI, <b>S</b> = SUBSTRAATTI, <b>T</b> = TUOTE JA <b>VT</b> = VÄLITUOTE.	9
KAAVIO 4. A) SUNOJIN JA BHASKARARAON REAKTIO JA B) REAKTION ESITETTY MEKANISMI. <sup>3</sup>	12
KAAVIO 5. YKSINKERTAINEN MEKANISMI KAHDEN SUBSTRAATIN KATALYYSIREAKTIOLLE.	15
KAAVIO 6. BLACKMONDIN ESITTÄMÄ VUOKAAVIO RPKA:N KÄYTTÖÖN REAKTIOKINETIIKAN TUTKIMISEEN KAHDEN SUBSTRAATIN REAKTIOSSA. <sup>26</sup> VIHREÄ = KOE, MUSTA = KUVAAJIEN MUODOSTUS, PURPPURA = KYSYMYS DATAN SOPIMISESTA KUVAAJAAN JA SININEN = JOHTOPÄÄTÖS.	20
KAAVIO 7. BURÉSIN ARTIKKELIN ESIMERKIT KATALYTTIN INHIBIITIOSTA A) TÄYDELLISESTI JA B) VAILLINEAISESTI. <sup>1,52</sup> <b>I</b> = INHIBIITTORI.	30
KAAVIO 8. ENTSYIMIN TOIMINTAA JA INHIBIITIOYTYYPEJÄ. A) ENTSYIMIN NORMAALI MEKANISMI, B) KILPAILEVA INHIBIITIO, C) ALLOSTEERINEN KILPAILEVA INHIBIITIO, D) KILPAILEMATON INHIBIITIO JA E) EI-KILPAILEVA INHIBIITIO.	32
KAAVIO 9. MICHAELIS-MENTEN SYKLI, MISSÄ MUKANA ON INHIBIITTORI <b>I</b> .	32
KAAVIO 10. A) "SATTUMANVARAINEN BI BI KINETIIKAN" KATALYTTIN KIERTO JA B) "JÄRJESTÄYTYNYT BI BI KINETIIKAN" KATALYTTIN KIERTO.	33
KAAVIO 11. ESIMERKKI REAKTIO, MISSÄ VOI MUODOSTUA NOPEUSVAKIOIDEN MUKAAN ESITASAPAINO TAI VAKAA TILA [ <b>VT</b> ]:N SUHTEEN. <b>S</b> = LÄHTÖAINE(ET), <b>VT</b> = VÄLITUOTE JA <b>T</b> = TUOTE.	34
KAAVIO 12. MICHAELIS-MENTEN –KINETIIKKA Noudattava katalyyttinen reaktio. <b>S</b> = SUBSTRAATTI, <b>T</b> = TUOTE JA <b>KAT</b> = KATALYTTI/ENTSYIMI.	37
KAAVIO 13. KAKSI SIMULOITUA AUTOKATALYTTISTÄ REAKTIOTA.	40
KAAVIO 14. A) ESIMERKKEJÄ AUTOKATALYTTISISTÄ REAKTIOISTA, JOISSA REAKTIONOPEUDELLA ON EKSPONENTIAALINEN KASVU JA B) ESIMERKIT A) PARABOLISESTA KASVUSTA JA B) HYPERBOLISESTA KASVUSTA REAKTIONOPEUDELLA. PUNAISET OVAT KATALYTTISESTI AKTIIVISIA YHDISTEITÄ, PURPPURAT EI-AKTIIVISIA JA SINISET OVAT SUBSTRAATTEJA. <b>T<sub>D</sub></b> PARABOLISESSA SYSTEEMISSÄ ON USEIN <b>T<sub>A</sub></b> :N DIMEERI. <sup>64</sup>	43
KAAVIO 15. ESIMERKKI KERTOMALLISESTA KASVUSTA. <sup>64</sup>	44
KAAVIO 16. YKSINKERTAINEN AUTOKATALYTTINEN REAKTIO JA SEN EI-KATALYTTINEN REAKTIOPOLKU. <sup>64</sup>	45
KAAVIO 17. A) SUGIURAN RYHMÄN TUTKIMA KONJUGAATTIADDITIO REAKTIO BOROONIHAPON <b>1</b> JA KETONIN <b>2</b> VÄLILLÄ. B) PÄÄKATALYTTINÄ TOIMIVA <b>MAT 3</b> JA SEN JOHDANNAISET. C) KOKATALYTTINÄ TOIMIVAT (TIO)UREAT <b>4</b> . <sup>87</sup>	50
KAAVIO 18. SUGIURAN RYHMÄN ESITTÄMÄ MEKANISMI <b>3</b> :N JA <b>4</b> :N KATALYSOIMALLE KONJUGAATTIADDITIOREAKTIOLLE. <sup>87</sup>	52
KAAVIO 19. SUGIURAN TUTKIMUKSEN KONJUGAATTIADDITIOREAKTIO <b>MAT</b> MONOARYYLIESTERIN <b>10</b> KATALYSOIMANA. [ <b>4b</b> ] = 0, 3 TAI 6 MOL%. <b>AD</b> = ADAMANTYYLI. <sup>87</sup>	53
KAAVIO 20. A) FANIN JA KASSIN FRIEDEL–CRAFTS-REAKTION REAKTIOYHTÄLÖ JA -OLOSUHTEET JA B) KÄYTTÖSSÄ OLLEET KIRAALISET KATALYTTIT. <sup>89</sup>	55
KAAVIO 21. MEKANISMI FANIN JA KASSIN FRIEDEL–CRAFTS REAKTIOLLE, KUN KATALYTTINÄ ON <b>13a</b> . <sup>89</sup>	57
KAAVIO 22. A) KAZAKOVIN JA KIESEWETTERIN KÄYTTÄMÄ TIOUREAKATALYTTI, B) REAKTIOSSA MAHDOLLISET KÄYTETTÄVÄT ALKYLIAMIINIEMÄKSET, C) ALKYLIAMIINIIN JA KATALYTTIN <b>16</b> SITOUTUMISVAKIO JA D) RENKAANAVAUSPOLYMERISAATIO SEKÄ HAVAITTU REAKTIONOPEUS. <sup>96</sup>	59
KAAVIO 23. KAZAKOVIN JA KIESEWETTERIN ESITTÄMÄ REAKTIOPOLKU ROP-REAKTIOLLE JA SIINÄ ESIINTYVÄT MAHDOLLISET SIIRTYMÄTILAT. <sup>96</sup>	60
KAAVIO 24. KIESEWETTERIN RYHMÄN ESITYS BIS(TIOUREA) -KATALYTTIN <b>17</b> MEKANISMIVAIHTOEHDOSTA ROP-REAKTIOLLE, MIKÄ TOIMII TODISTEENA TOISEN KERTALUVUN OLETUKSELLE KATALYTTIN <b>16</b> KOHDALLA. <sup>97</sup>	63
KAAVIO 25. KIESEWETTERIN RYHMÄN LASKENNALLISESTI MÄÄRITELLYT SYMMETRIAT BIS(TIOUREA) -KATALYTTILLE <b>17</b> . <sup>97</sup>	64
KAAVIO 26. A) DENDRAALENIEN RAKENNE, B) YLEISLUONTOINEN VISIO REAKTIOSEKVIENSISTÄ, C) JØRGENSENIN RYHMÄN REAKTIOYHTÄLÖ. <sup>98</sup>	66
KAAVIO 27. KATALYTTIEN KIERTO JØRGENSENIN RYHMÄN KASKADIREAKTIOSSA. SYKLI <b>1</b> ON OLETETTAVASTI TOISTA KERTALUKUA KATALYTTIN <b>19a</b> SUHTEEN. <sup>98</sup>	67
KAAVIO 28. DUDGINGIN RYHMÄN VISIO REAKTIOSTA, A) RETROSYNTEETTINEN LÄHESTYMINEN AMIDIASYLIANIONI -JA KARBENIUM SYNTHONEIHIN. B) SYNTEETTISESTI KIINNOSTAVA $\alpha$ -OXYGENOITU AMIDI JA C) REAKTIOYHTÄLÖ JA OLOSUHTEET. <sup>99</sup>	70

KAAVIO 29. DUDDINGIN RYHMÄN DEUTERIUM LEIMATUT KOKEET, A) KSIE EFEKTIN TUTKIMINEN JA B) KOKEELLINEN INDIKAATIO, KATALYTTIN OSALLISTUMISESTA REAKTIOON. <sup>99</sup>	72
KAAVIO 30. DUDDINGIN RYHMÄN ESITTÄMÄ MAHDOLLINEN MEKANISMI JA KATALYTTIN KIERTO KINEETTISTEN KOKEIDEN POHJALTA. <sup>99</sup>	73
KAAVIO 31. DUDDINGIN RYHMÄN ESITTÄMÄ VAPAAN ENERGIAN PROFILII VINYYLIEETTERIN HYDROAMIDAATIOON CSA:N AVULLA. <sup>99</sup>	74
KAAVIO 32. DIROCCON RYHMÄN ESITTÄMÄ SYNTEENTTINEN STRATEGIA JA KONSEPTI FOSFORI–HAPPI SIDOKSEN MUODOSTAMISELLE. A) LÄHETYSMITAPOJA PROTIDE -YHDITEIDEN SYNTEESIIN. LG = LÄHTEVÄ RYHMÄ, B = EMÄS. B) PENTAVALENTTI SIIRTYMÄTILA P–O SIDOKSEN MUODOSTUKSELLE FOSFATIDYLIINOSITOLI-SPEEIFISESSÄ FOSFOLIPAASI C:SSÄ. <sup>106</sup> SIIRTYMÄTILAN EHDOTTAJANA ON RYAN ET AL. <sup>114</sup>	77
KAAVIO 33. DIROCCON RYHMÄN REAKTIOYHTÄLÖ SEKÄ KÄYTETYT KATALYTTIT. <sup>106</sup>	78
KAAVIO 34. DIROCCON RYHMÄN ESITTÄMÄ MEKANISMI <b>34</b> :N SYNTEESILLE. U = URASIILI (URACIL). <sup>106</sup>	79
KAAVIO 35. DIROCCON TUTKIMUKSEN REAKTIOYHTÄLÖ JA -OLOSUHTEET SEKÄ LINKKERÖIDYT KATALYTTIT. <sup>106</sup>	81
KAAVIO 36. A) CRIMMININ RYHMÄN FLUORIDIMETATEESIN POHJA SANDFORDIN RYHMÄN JA SCHMIDTIN RYHMÄN TUTKIMUKSIIN NOJATEN, B) CRIMMININ TUTKIMUKSEN KATALYTTISEN METATEESIN LUONNOSTELMA JA C) CRIMMININ TUTKIMUKSEN FLUORIDIMETATEESIN REAKTIO-OLOSUHTEET. <sup>120</sup>	84
KAAVIO 37. A) KATALYTTISEN KOMPETENSSIN VAHVISTAMISEEN CRIMMININ RYHMÄN TEHDYT STOIKIOMETRISET REAKTIOT JA B) FLUORIDIMETATEESIN EHDOTETTU MEKANISMI. <sup>120</sup>	86
KAAVIO 38. MACMILLANIN RYHMÄN HAVAINNOLLISTUS KASKADIKATALYYSILLE. A) IMIDATSOLIDONIT JA NIIDEN KATALYTTISET OMINAISUUDET JA B) KASKADIKATALYYSI: OMINAISUUKSIEN YHDISTÄMINEN. <sup>18</sup>	89
KAAVIO 39. MACMILLANIN ARTIKKELIN ESITTÄMÄ MEKANISMI KASKADIKATALYYSILLE <b>44</b> :STA TOIMIESSA KATALYTTINÄ. <sup>18</sup>	90
KAAVIO 40. A) JACOBSENIN RYHMÄN ESITTÄMÄ REAKTIOYHTÄLÖ JA -OLOSUHTEET POVAROV-REAKTIOLE JA B) KÄYTETYT KIRAALISET TIOUREAKATALYTTIT. <sup>127</sup>	92
KAAVIO 41. JACOBSENIN RYHMÄN REAKTION LAAJUUS KAHDELLA ERI NUKLEOFIILILLÄ ( <b>55</b> JA <b>56</b> ) JA USEILLA ERI <i>N</i> -ARYYLI-IMIINEILLÄ <b>20</b> . <sup>127</sup>	92
KAAVIO 42. JACOBSENIN RYHMÄN PROTIOIINIUMTRIFLAATTISUOLAN KOMPLEKSI <b>50A-HOTf</b> JA AKIRAALISEN UREAN <b>59</b> KANSSAN MUODOSTUVA KOMPLEKSI <b>50A-HOTf-59</b> . <sup>127</sup>	93
KAAVIO 43. JACOBSENIN TUTKIMUKSEN GEOMETRINEN TULKINTA JA ENERGIA MINIMOIDUT RAKENTEET <b>50A-HOTf-52A</b> :LLE, MITKÄ ON LASKETTU KÄYTTÄEN B3LYP/6-31G(D) DFT-TASOA. AR = 3,5-(CF <sub>3</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> . <sup>127</sup>	94
KAAVIO 44. JACOBSENIN RYHMÄN KINEETTISTEN PARAMETRIEN KAAVIO POVAROVIN REAKTIOSSA RASEEMISELLE JA ENANTIOSELEKTIIVISELLE VAIHTOEHDOLLE, KUN <b>50A</b> JA <b>51</b> ON KOKATALYSOITU <b>52A</b> :N JA HOTf:N AVULLA. <sup>127</sup>	95
KAAVIO 45. A) JACOBSENIN RYHMÄN ESITYS POVAROVIN REAKTION MEKANISMILLE SEKÄ MAHDOLLISET REAKTIONOPEUDEN MÄÄRÄÄVÄT VAIHEET, Z = EWG TAI EDG. B) KINEETTISEN ISOTOOPPIEFEKTIN KOE KYSEISELLE REAKTIOLE. <sup>127</sup>	96
KAAVIO 46. KATALYTTIEN <b>53</b> JA <b>52A</b> KIERTO JACOBSENIN RYHMÄN POVAROV-REAKTIOSSA IMIINIIN <b>50A</b> JA 3,5-DIHYDROFURAANIN <b>51</b> VÄLILLÄ. A <sub>2</sub> = ENSIMMÄINEN KATALYYSI, B <sub>2</sub> = TOINEN KATALYYSI, C <sub>2</sub> = SYKLOADDITIO, D <sub>2</sub> = UUELLEEN AROMATISOITUMINEN. <sup>98</sup>	98
KAAVIO 47. <i>ISO</i> -KUPREIDIINIIN <b>63</b> KATALYSOIMAA BAYLIS-HILLMAN REAKTIO. <sup>128</sup>	99
KAAVIO 48. HATAKEYAMAN RYHMÄN ESITTÄMÄ MEKANISMI REAKTIOLE (KAAVIO 47). <sup>128</sup>	99
KAAVIO 49. LISTIN TUTKIMUKSEN REAKTIO ALDEHYDIN <b>61</b> JA ASETONIN <b>66</b> VÄLILLÄ PROLIINIIN <b>67</b> KATALYSOIMANA. <sup>130–132</sup>	101
KAAVIO 50. LISTIN RYHMÄN ESITTÄMÄ MEKANISMI REAKTIOLE (KAAVIO 49). <sup>130–132</sup>	101
KAAVIO 51. TAKEMOTON TUTKIMUKSEN A) REAKTIO JA SEN OLOSUHTEET JA B) HEIDÄN ESITTÄMÄ MEKANISMI. <sup>135,136</sup>	103
KAAVIO 52. ENDERSIN RYHMÄN MICHAEL/RISTIBENTSOIINI-SEKVIVENSISREAKTIO. <sup>137</sup>	105
KAAVIO 53. A) JØRGENSENIN RYHMÄN VARIATIO ENDERSIN TUTKIMUKSEN SEKVIVENSISKATALYYSILLE. B) MEKANISMI SEKVIVENSIN TOISEN OSAN NHC-KATALYYSILLE. <sup>138</sup>	106
KAAVIO 54. MACMILLANIN JA ALLENIN KONSEPTI SYNERGISTISELLE KATALYYSILLE. <sup>4</sup>	108
KAAVIO 55. A) LEEN RYHMÄN REAKTIOYHTÄLÖ JA OLOSUHTEET, B) REAKTIOLE EHDOTETTU MEKANISMI JA C) PERUSTELUT STEREOKEMIALLE <i>ANTI</i> -SELEKTIIVISIIN MICHAEL-ADDITIOIHIN. <sup>139</sup>	110
KAAVIO 56. LEEN RYHMÄN REAKTIO-OLOSUHTEET SELEKTIIVISILLE MICHAEL-ADDITIOILLE. <sup>139</sup>	111
KAAVIO 57. CARTERIN RYHMÄN PFAU-D'ANGELO REAKTIO.	118
KAAVIO 58. CARTERIN TYÖRYHMÄN MUOKATTU PFAU-D'ANGELO REAKTIO, JONKA KINEETTISTÄ KÄYTTÄYTYMISTÄ SEURATTIIN KAASUKROMATOGRAFIALLA.	120
KAAVIO 59. CARTERIN TYÖRYHMÄN MUOKATTU PFAU-D'ANGELO REAKTIO, JOLLE TEHTIIN VTNA-MENETELMÄN SAME EXCESS -KOE, MILLÄ PYRITTIIN TUTKIMAAN KATALYTTIN KINETIIKKAA REAKTIOSSA.	122
KAAVIO 60. JACOBSENIN JA LARROW'N <sup>150</sup> ( $\pm$ )- <i>TRANS</i> -1,2-DIAMINOSYKLOHEKSAANIN ( <b>87</b> ) KIRAALINEN RESOLUUTIO L-(+)-TARTRAATTIHAPON ( <b>88</b> ) AVULLA.	124
KAAVIO 61. DIAMMONIUMSUOLAN VAPAUTUS JA SEN DERIVOINTI <i>P</i> -TOLUOYLIKLOORIDILLA ( <b>89</b> ).	125
KAAVIO 62. DIAMMONIUMSUOLAN VAPAUTUS JA SEN DERIVOINTI <i>P</i> -TOLUOYLIKLOORIDILLA KÄYTTÄEN VAIHTOEHTOISTA RESEPTIÄ.	125
KAAVIO 63. BISTARTRAATTISUOLAN MUODOSTUS KIRAALISEN RESOLUUTION SUODATETUSTA EMÄLIUOKSESTA.	126

KAAVIO 64. PFAU-D'ANGELO -REAKTIOON TARVITTAVAN KATALYTTIN SYNTEESI.	127
KAAVIO 65. RASEEMISEN REFERENSSINÄYTTEEN SYNTEESI.	127
KAAVIO 66. ORGANOKATALYISOITU PFAU-D'ANGELO -REAKTIO REAKTIOSEURANTAA VARTEN.	128
KAAVIO 67. HUMILISIINI E-PROJEKTIN PFAU-D'ANGELO -REAKTIO KATALYTTILLÄ <b>85</b> .	129