

Filip Ulatowski

Nowe metody badania rozpoznania chiralnego anionów

praca doktorska przedstawiona
Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk

promotor: prof. dr hab. Janusz Jurczak

K-c-119

A-21-6

K-g-152

K-c-123

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.352/13



3000000130067

Warszawa 2013



B. Org. 352/13

Panu Profesorowi Januszowi Jurczakowi
bardzo dziękuję za zaproponowanie ciekawego
tematu pracy, pomoc i opiekę w czasie jej
wykonywania oraz za cenne dyskusje na tematy
związane z pracą i nie tylko.

Dziękuję koleżankom i kolegom z Zespołu za dobrą atmosferę pracy, pomoc i rady.

Szczególnie dziękuję Kajetanowi Dąbrowie i Jarosławowi Grandzie za liczne dyskusje, pomysły oraz krytyczne uwagi.

Bardzo dziękuję mojej Żonie Agacie za wyrozumiałość i ogromną pomoc.

Kochanej Żonie

Wyniki przedstawione w pracy zostały częściowo zaprezentowane na konferencjach:

20th International Conference on Physical Organic Chemistry

Korea, Busan 08.2010

Chiral recognition of carboxylate anions by hybrid pyrrole-aminoacid host molecules

Plakat

IX Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej

Polska, Warszawa 04.2011

Rozpoznanie chiralne anionów karboksylanowych

Plakat

International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry

Wielka Brytania, Brighton, 07.2011

Chiral recognition of carboxylates by receptors containing amino acid moieties

Plakat

Supramolecular Systems in Chemistry and Biology

Francja, Strasbourg 09.2012

Chiral recognition properties of urea amino acid based C2 symmetrical receptors for anions

Plakat

Badania były współfinansowane ze środków projektu: Ventures/2009-4/8 pt. *Rozpoznanie chiralne anionów karboksylanowych o szczególnym znaczeniu biologicznym* realizowanego w ramach programu VENTURES Fundacji na rzecz Nauki Polskiej. Finansowanie z Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach programu Innowacyjna Gospodarka.



Spis treści

1	Założenia i cel pracy	13
2	Część Literaturowa	17
2.1	Wprowadzenie	17
2.2	Rozpoznanie chiralne	20
2.2.1	Modele rozpoznania chiralnego	22
2.3	Metody badania rozpoznania chiralnego	24
2.3.1	Ilościowe miary rozpoznania chiralnego	24
2.3.2	Metody wyznaczania stałych tworzenia kompleksów	29
2.3.2.1	Teoretyczne aspekty miareczkowania	29
2.3.2.2	Kompleksy o stechiometrii 1 : 1	33
2.3.2.3	Układy złożone - metody określania stechiometrii wiązania kompleksów	36
2.3.2.4	Niepewność pomiaru w miareczkowaniu i wielkościach pochodnych	43
2.3.2.5	Metody obliczeniowe	47
2.3.3	Literaturowe przykłady określania selektywności α_T za pomocą miareczkowań w rozpoznaniu chiralnym anionów	47
2.3.3.1	Wprowadzenie	47
2.3.3.2	Jakość danych i liczba punktów	50
2.3.3.3	Metody regresji liniowej	50
2.3.3.4	Komputerowa analiza danych	52
2.3.3.5	Stechiometria tworzonych kompleksów	54
2.3.3.6	Niepewność pomiaru w doniesieniach literaturowych	57
2.3.3.7	Wiarygodne pomiary	57
2.3.4	Metody bezpośredniego określania rozpoznania chiralnego	59
2.3.4.1	Wprowadzenie	59
2.3.4.2	Spektrometria NMR	59
2.3.4.3	Spektrometria mas	63

2.3.4.4	Metody ekstrakcyjne	68
2.3.4.5	Metody chromatograficzne	72
2.3.4.6	Inne metody	74
2.4	Podsumowanie	76
3	Badania własne	79
3.1	Wprowadzenie	79
3.2	Synteza receptorów	82
3.2.1	Receptory z rdzeniem dipirometanowym	82
3.2.2	Receptory z rdzeniem bis-antranilowo-mocznikowym	84
3.2.3	Receptory z rdzeniem <i>o</i> -fenylenodiaminowym	86
3.2.4	Receptory z rdzeniem 1,8-diaminoantracenyowym	88
3.3	Oddziaływanie receptorów z anionami	91
3.3.1	Receptory DEDPM	91
3.3.2	Receptory DAB	93
3.3.3	Receptory DAA	95
3.4	Wyznaczanie jakości rozpoznania chiralnego receptorów za pomocą klasycznej metody miareczkowania	98
3.5	Określanie stosowalności innych metod badania rozpoznania chiralnego	107
3.5.1	Miareczkowania konkurencyjne	107
3.5.1.1	Miareczkowania z użyciem achiralnego receptora odniesienia	107
3.5.1.2	Miareczkowania konkurencyjne bez związków odniesienia .	114
3.5.2	Pomiary ekstrakcyjne	121
3.5.2.1	Metoda enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-ciało stałe (ELSE)	121
3.5.2.2	Metoda enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-ciecz (ELLE) . .	130
3.5.3	Pomiary z użyciem spektrometrii mas	132
3.5.4	Pomiary chromatograficzne	138
3.5.4.1	Chromatografia cienkowarstwowa	139
3.5.4.2	Chromatografia kolumnowa	142
4	Podsumowanie i wnioski	149
5	Część eksperymentalna	153
5.1	Syntezy	153
5.1.1	Uwagi ogólne	153
5.1.2	Receptory DEDPM	154
5.1.3	Syntezy związane z receptorami opartymi na kwasie antranilowym . .	160
5.1.4	Syntezy estrów Boc-zabezpieczonych aminokwasów	162

5.1.5	Synteza receptorów DAA	172
5.1.6	Syntezy związków znakowanych deuterem	183
5.1.7	Syntezy związków do immobilizacji na fazie stacjonarnej i modyfikacje powierzchni faz stacjonarnych	184
5.2	Miareczkowania	187
5.2.1	Procedura przygotowania roztworów i analiza niepewności	187
5.2.2	Miareczkowania UV-Vis	188
5.2.3	Eksperymenty Joba	194
5.3	Miareczkowania konkurencyjne	195
5.3.1	Miareczkowania z receptorem odniesienia	195
5.3.2	Miareczkowanie bez receptora odniesienia	196
5.3.3	Pomiary ELSE i ELLE	196
5.4	Pomiary MS	197
5.5	Fazy stacjonarne	198
5.6	Modelowanie molekularne	199

Wykaz skrótów i oznaczeń użytych w pracy:

Ala	alanina
α	selektywność
β_i	$= \prod_{n=1}^i K_n$ łączona stała trwałości
D_X	$= \frac{[D_X]_{0, \text{faza-a}}}{[D_X]_{0, \text{faza-b}}}$ współczynnik podziału substancji X
DIPEA	diizopropylodimetyloamina
DMAP	4-(N,N-dimetyloamino)pirydyna
DMF	dimetyloformamid
DCM	dichlorometan
DMSO	dimetylosulfotlenek
ΔZ	niepewność wielkości Z
EDCI	1-etylo-3-(3-(N,N-dimetyloamino)propylo)karbodiimid
ee	$= \frac{ n_S - n_R }{n_S + n_R}$, nadmiar enancjomeryczny
ekw.	ekwiwalent
ELLE	enancjoselektywna ekstrakcja ciecz-ciecz
ELSE	enancjoselektywna ekstrakcja ciecz-ciało stałe
ESI	źródło jonów typu <i>elektrosprej</i>
FID	detektor płomieniowo-jonizacyjny w GC
G	cząsteczka gościa
GC	chromatografia gazowa
H	cząsteczka gospodarza
HOBt	1-hydroksybenzotriazol
K	stała trwałości kompleksu
Met	metionina
MK	miareczkowanie konkurencyjne
MS	spektrometria mas
Phe	fenyloalanina
RMSE	$= \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y^{obs} - Y^{obl})^2}{n}}$ - pierwiastek ze średniego odchylenia kwadratowego
RPI	<i>relative peak intensity</i> , względna intensywność pików, parametr MS
TBA	kation tetrabutylamoniowy
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
TMA	kation tetrametyloamoniowy
Tyr	tyrozyna
Val	walina
$x(X)$	ułamek molowy składnika X
Y	wielkość fizyczna mierzona podczas miareczkowania
Y_X	wartość Y dla czystego związku X
$Y_{\Delta HG}$	$= Y_{HG} - Y_H$
[X]	stężenie składnika X
$[X]_0$	całkowite stężenie składnika X we wszystkich jego formach

Rozdział 1

Założenia i cel pracy

W naszym Zespole od wielu lat zajmujemy się chemią supramolekularną – niekowalencyjnymi oddziaływaniami typu receptor - substrat. Początkowo badania obejmowały wiązanie cząsteczek obojętnych i kationów, w ostatnim czasie przedmiotem zainteresowania stały się oddziaływania anionów z elektrycznie obojętnymi receptorami. To drugie zagadnienie jest dużo trudniejsze od wiązania kationów, ze względu na różnorodne kształty anionów, ich silną solwatację i niezdolność do tworzenia wiązań koordynacyjnych. Kompleksowanie anionów realizowane było w Zespole poprzez szereg makrocyclicznych i łańcuchowych receptorów zawierających donory wiązań wodorowych w grupach amidowych, mocznikowych i pirolowych¹⁻⁵. Jeszcze większym wyzwaniem jest badanie procesów wiązania, w których zarówno receptor jak i substrat są chiralne. Szczególnie interesujące są w tych układach różnice w oddziaływaniach enancjomerycznie czystego receptora z enancjomerami gościa.

Rozpoznanie chiralne – rozróżnianie enancjomerycznych substratów przez homochiralny receptor – jest najbardziej subtelnym rodzajem selektywności i wymaga bardzo precyzyjnej organizacji przestrzennej struktury receptora. Proces ten jest jednocześnie powszechnym i fundamentalnym zjawiskiem funkcjonującym w układach biologicznych. Większość cząsteczek występujących w organizmach żywych jest chiralna i w związku z tym selektywne oddziaływanie między nimi mają charakter rozpoznania chiralnego. W szczególności dotyczy to wiązania małych chiralnych cząsteczek przez makromolekularne (głównie białkowe) receptory, które obejmuje m.in. naturalne szlaki komunikacyjne (neurotransmitery i hormony), percepcję zmysłową (np. odmienny zapach enancjomerów), jak również działanie syntetycznych leków. W konsekwencji, podstawowe badania nad zjawiskiem rozpoznania chiralnego są bardzo istotne, nie tylko dla pełnego zrozumienia mechanizmów biochemicznych, ale także z praktycznych powodów, np. dla projektowania nowych leków. Rozpoznanie chiralne jest również ważne dla praktyki analitycznej, jest bowiem podstawą rozróżniania enancjomerów. Zjawiska te dotyczą oddziaływań analitu z chiralną fazą stacjonarną w metodach chromatograficznych, jak również określają zasady działania sensorów kolorymetrycznych, fluorescencyjnych czy elek-



trochemicznych. Preparatywny rozdział enancjomerów na drodze chromatografii, selektywną ekstrakcję do fazy stałej, czy też transport przez syntetyczne membrany bazują na zjawisku rozpoznania chiralnego.

Mimo tak znacznej wagi omawianego problemu, zagadnienia rozpoznania chiralnego są ciągle stosunkowo mało poznane. Przez długi czas postępy tej gałęzi chemii supramolekularnej były hamowane przez niedostateczny rozwój teorii i aparatu pojęciowego; przyczyniały się do tego także praktyczne problemy związane z niedoskonałością narzędzi badawczych. Dopiero ok. 20 lat temu te dwa ograniczenia zostały pokonane i nastąpił rozkwit badań w zakresie rozpoznania chiralnego. Główny nurt tych badań dotyczy syntezy nowych chiralnych receptorów wiążących określonej klasy cząsteczki z uwzględnieniem ich enancjodyskryminacji.

Przewidywanie zdolności syntetycznych receptorów do efektywnego rozpoznania chiralnego jest bardzo trudne i opiera się na kilku elementach, do których zaliczyć trzeba znajomość dotychczasowych doniesień literaturowych, przybliżone modelowanie kompleksów gość-receptor oraz intuicja badacza. Projektowanie receptorów wymaga zwykle podejścia iteracyjnego. Z punktu widzenia badań podstawowych, każdy wynik rozpoznania chiralnego (nawet jego brak) jest bardzo istotny, gdyż wzbogaca wiedzę dotyczącą korelacji struktura–enancjoselektywność. Najprostszym sposobem na wzbogacenie tej wiedzy jest ewaluacja dużych bibliotek receptorów o różnorodnych strukturach. Wiąże się to z koniecznością przeprowadzenia żmudnej syntezy wielu serii homologów i analogów. Z oczywistych powodów, w dziedzinie rozpoznania chiralnego takie podejście jest niesłychanie rzadkie. Zdecydowana większość doniesień literaturowych dotyczy pojedynczych receptorów lub ich małych serii (ok. 3-4), co bardzo utrudnia uogólnienia.

O ile synteza kombinatoryjnych bibliotek receptorów nie jest dzisiaj poważnym problemem, o tyle ewaluacja receptorów pod kątem ich efektywności w rozpoznaniu chiralnym jest znacznie trudniejsza. Podstawowe metody badania rozpoznania chiralnego są bardzo żmudne, podatne na błędy i obarczone dużą niepewnością pomiarową. Natomiast alternatywne metody nie zostały dotąd wiarygodnie zweryfikowane. Zarówno sam teoretyczny aspekt procedur analitycznych, jak również znalezione w literaturze przykłady błędnych analiz, skłoniły mnie do przeprowadzenia bardzo wnikliwej i krytycznej rewizji ilościowych metod badania rozpoznania chiralnego. Szczegółowa analiza teorii i praktyki procedur pomiarowych, którą przedstawię, przekonała mnie, że etap analizy jest największym hamulcem badań w tej dziedzinie. Jest też źródłem poważnych błędów, które powodują, że w chwili obecnej jakakolwiek meta-analiza opublikowanych wyników byłaby bezwartościowa, a nawet wprowadzająca w błąd.

Z powyższych powodów moim głównym celem było opracowanie i wyznaczenie zakresu stosowalności alternatywnych metod badania rozpoznania chiralnego w odniesieniu do chiralnych anionów karboksylanowych. Aby zrealizować to zadanie potrzebowałem grupy testowych receptorów, które służyłyby do krytycznej ewaluacji nowych metod i ich optymalizacji. Grupa

receptorów powinna być wystarczająco liczna i zróżnicowana strukturalnie, dlatego opracowana metoda ich otrzymywania powinna być dogodna w syntezie serii homologów i analogów. Opracowanie takiej metody i przeprowadzenie syntezy rodziny receptorów stanowiło dodatkowy cel mojej pracy, niezbędny do realizacji głównego założenia. Po opracowaniu stosownej, ogólnej metody syntezy planowałem przeprowadzenie dla rodziny tak otrzymanych receptorów korelacji między ich strukturą a zdolnościami do enancjodyskryminacji, co mogłoby w przyszłości posłużyć jako wytyczne do projektowania receptorów o lepszych właściwościach.

Rozdział 2

Część Literaturowa

Chodzi o pewien rodzaj uczciwości naukowej, zasadę naukowego myślenia, która wiąże się z bezwzględną uczciwością – dołożenie wszelkich starań. Jeśli na przykład robicie jakieś doświadczenie, to powinniście opisać wszystko to, co – waszym zdaniem – mogłoby podać je w wątpliwość (nie tylko to, co w nim jest w porządku), inne przyczyny, które mogły dać podobny wynik, rzeczy, które jak się wam wydaje udało się wykluczyć na podstawie innego doświadczenia i na czym to polegało tak, żeby mieć pewność, że ktoś inny też będzie mógł przyznać, że zostały wyeliminowane.

Powinniście podać wszystkie szczegóły, które mogły budzić wątpliwości co do waszej interpretacji, jeśli oczywiście je znacie. Musicie zrobić wszystko, na co was stać.

R. Feynman, z przemówienia na uroczystości rozdania dyplomów, Caltech 1974

2.1 Wprowadzenie

Początek XIX wieku to burzliwy rozwój chemii oraz fizyki. Odkrycie wielu zjawisk z pogranicza tych dziedzin, rozumianego dzisiaj jako chemia fizyczna / fizyka chemiczna, uutorowało drogę do wielu dalszych odkryć.¹ W roku 1827 Wöhler zauważył, że dwa związki chemiczne - kwas cyjanowy i kwas piorunowy mają taki sam skład pierwiastkowy mimo różnych właściwości. Rok później, po kolejnym spostrzeżeniu, że mocznik ma taki sam skład jak cyjanian amonu, Wöhler przeprowadził jego termiczną izomeryzację do mocznika. Ta prosta przemiana podważyła obowiązującą wówczas teorię o sile witalnej i otworzyła drzwi dla rozwoju chemii organicznej rozumianej już nie tylko jako badanie związków naturalnych, ale uwzględniającej

¹Rozdział ten przygotowałem bazując na przeglądzie Flacka⁶ i okolicznościowym eseju Cintasa⁷

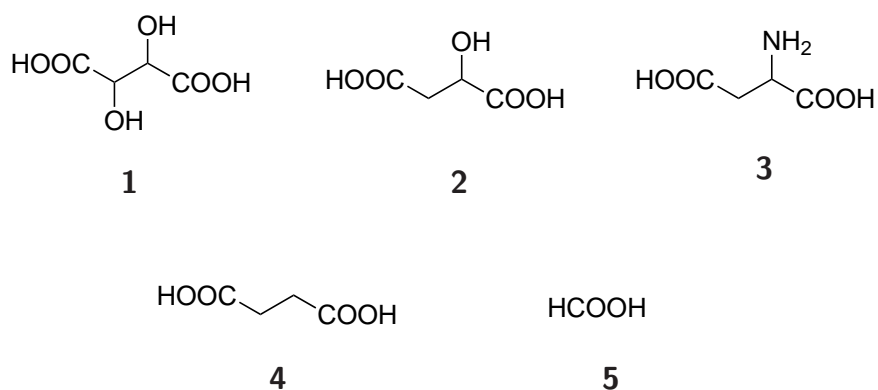
także możliwość projektowania i syntezy nowych związków organicznych. W roku 1830 Berzelius wprowadził pojęcie izomerii jako możliwości istnienia różnych substancji o identycznym składzie.

Wcześniej nastąpił istotny rozwój krytalografii, sposób dokładnego badania i opisywania kryształów (głównie minerałów) podał Haüy w 1809 (siedem klas krytalograficznych, pojęcie komórki elementarnej, jej parametry). W fizyce zaś trwały intensywne badania natury światła - odkryto jego polaryzację. W roku 1812 Biot zauważył, że kryształy kwarcu występują w postaci dwóch form będących odbiciami lustrzanymi, z których każda skręca płaszczyznę polaryzacji światła w przeciwną stronę. Dwa lata później ten sam uczoney odkrył zjawisko skręcania płaszczyzny polaryzacji światła przez roztwory niektórych substancji organicznych pochodzenia naturalnego.

Należy tutaj zaznaczyć, że mimo ugruntowanej już teorii atomowej Daltona i znajomości zjawiska izomerii, struktura materii pozostawała w tamtych latach prawie nieznaną. Nie istniała żadna powszechnie uznawana teoria dotycząca sposobu powiązania atomów w cząsteczce, zwłaszcza przestrzennego ich rozmieszczenia. Jedyną sugestię dotyczącą potencjalnej struktury cząsteczek wysunął Haüy, który stwierdził, że makroskopowy kształt kryształu stanowi odzwierciedlenie podstawowej jednostki budulcowej materii.

Tak z grubsza zarysowują się najważniejsze odkrycia naukowe i stan wiedzy, bezpośrednio poprzedzające przełomową publikację Pasteura,⁸ wielkiego francuskiego uczonego (1848 r.). Pasteur dokonał swoich najistotniejszych odkryć dotyczących chiralności na serii prostych kwasów karboksylowych i ich soli. Należały do nich kwas winowy (1), jabłkowy (2), asparaginy (3), bursztynowy (4) i mrówkowy (5). Trzy pierwsze z wymienionych kwasów są chiralne, dwa pozostałe achiralne. We wspomnianej pierwszej pracy z 1848 r., Pasteur opisuje produkty krystalizacji homochiralnego kwasu winowego (*tartaric* – skręcający płaszczyznę polaryzacji światła) i 12 jego soli oraz produkty krystalizacji sześciu soli racemicznego kwasu winowego (*para-tartaric* – nie skręcający płaszczyzny polaryzacji światła). Racemiczny kwas winowy znany był wówczas jako izomer kwasu winowego (pamiętajmy, że budowa cząsteczkowa pozostawała zupełnie nieznaną).

Bardzo wnikliwa analiza otrzymanych kryształów, rzetelność badawcza oraz spostrzegawczość Pasteura pozwoliły mu zaobserwować, że w przypadku homochiralnego kwasu winowego każda jego sól dawała asymetryczne kryształy, co więcej, za każdym razem obserwował, że wszystkie kryształy miały mniejsze ściany zwrócone w prawo. Bardziej złożona była analiza soli racemicznego kwasu. Spośród sześciu różnych soli, produkty krystalizacji trzech z nich nie nadawały się do badań, w jednym przypadku autor otrzymał kryształy achiralne, zaś dla winianu sodowo-amonowego i sodowo-potasowego uzyskał kryształy chiralne. W dwóch ostatnich przypadkach kryształy *lewe* i *prawe* występowały w porównywalnych ilościach. Kryształy będące swoimi odbiciami lustrzanymi różnią się morfologicznie bardzo nieznacznie, tylko uważna



Rysunek 2.1: Kwasy użyte przez Pasteura w badaniach nad chiralnością

obserwacja małych ścian pod mikroskopem pozwala stwierdzić chiralność kryształu i zakwalifikować go jako *lewy* bądź *prawy*. Ogromnym nakładem pracy Pasteur pogrupował kryształy ze względu na ich chiralność. Wodne roztwory posortowanych kryształów skręcały płaszczyznę polaryzacji światła w przeciwnych kierunkach. Na podstawie tych obserwacji Pasteur wywnioskował, że kwas *para-tartaric* jest w istocie mieszaniną składającą się z równych ilości kwasu winowego (*tartaric*) i związku będącego jego lustrzanym odbiciem. Pasteur tym jednym typem eksperymentu odkrył izomerię optyczną, wyjaśnił skład mieszaniny racemicznej i dokonał pierwszego w historii rozdzielenia racematu na enancjomery. Rezultat osiągnięty przez badacza wydawał się tak nieprawdopodobny, że Pasteur został poproszony przez Biota aby powtórzył eksperyment w jego obecności na odczynnikach dostarczonych i sprawdzonych przez Biota, co oczywiście bez problemu wykonał.

Wynik Pasteura prowokował do stawiania kolejnych pytań i przeprowadzenia dalszych eksperymentów. Badając kryształy wielu innych związków, które można było wydzielić z produktów naturalnych w formie chemicznie i optycznie czystej, stwierdził, że chiralne substancje (skręcające płaszczyznę polaryzacji światła) zawsze dają chiralne kryształy. Jakkolwiek czasami nie był w stanie zaobserwować chiralnej morfologii kryształów, postulował wówczas, że budowa wewnętrzna kryształu jest chiralna.

Znane były wówczas chiralne kryształy powstałe przez krystalizację z roztworów nieczynnych optycznie. W przypadku mrówczanu strontu $(\text{HCOO})_2\text{Sr}$ Pasteur otrzymał *prawe* i *lewe* kryształy, które po rozdzieleniu i rozpuszczeniu dawały roztwory nieczynne optycznie, z czego wywnioskował, że związek jest achiralny, a jedynie ułożenie cząsteczek w kryształ wymusza asymetrię. Co więcej, zauważył, że w przeciwieństwie do racematu, dla mrówczanu strontu stosunek liczby kryształów *prawych* do *lewych* był zmienny i różny od 1:1. W roku 1852 Pasteur zaproponował wyjaśnienie zjawiska powstawania achiralnych kryształów z roztworów racematów. Postulował on powstawanie achiralnych dimerów, na które składa się po jednej cząsteczce każdego z enancjomerów, dimery zaś tworzą achiralny kryształ.

Prace Pasteura są niezwykle, zwłaszcza biorąc pod uwagę fakt, że nie istniała wówczas teo-

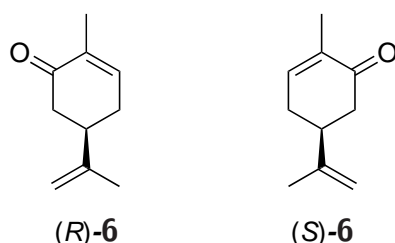
ria budowy cząsteczek. Genialny Francuz odkrył i jednoznacznie udowodnił, że niektóre cząsteczki występują w postaci nienakładalnych na siebie odbić lustrzanych, mimo że zaczynając badania nie wiedział jeszcze, czy cząsteczki są sferyczne, płaskie lub przybierają inne kształty.

Dopiero kilka lat po doniesieniach Pasteura i praktycznie niezależnie od nich, rozwinięta została teoria wiązań chemicznych – stwierdzono czterowiązalność atomów węgla. W 1874 r. Le Bel i van't Hoff zaproponowali tetraedyczne otoczenia atomów węgla, co wyjaśniało obecność izomerów optycznych. Termin chiralność zaproponował lord Kelvin pod koniec XIX wiekuⁱⁱ.

2.2 Rozpoznanie chiralne

Izomeria optyczna została włączona do kanonu wiedzy chemicznej pod koniec XIX wieku. Prawdopodobnie tylko dzięki pewnym zbiegom okoliczności nie pozostała wcale w tyle za innymi rodzajami izomerii. Jest to izomeria wyjątkowo subtelna, dwa enancjomery mają identyczne wszystkie właściwości fizyczne z wyjątkiem zdolności skręcania płaszczyzny polaryzacji światła. Rozdział izomerów optycznych jest bardzo trudny, w przeciwieństwie do izomerów innego rodzaju, które można zwykle rozdzielić przez destylację, destylację z parą wodną, wykorzystując różnice w rozpuszczalności, czy przez chromatografię na achiralnym złożu. Dwa enancjomery reagują czy oddziałują jednakowo tylko z substancjami achiralnymi, natomiast z inną substancją chiralną oddziaływać będą już w odmienny sposób.

Izomeria optyczna jest trudna do zauważenia tylko dla chemików w laboratorium. Natomiast w przyrodzie ożywionej rozróżnianie enancjomerów zachodzi w każdej chwili i dotyczy każdej chiralnej substancji. Organizmy żywe są chiralne i dla każdej chiralnej substancji jej enancjomery mają inny wpływ na organizm. Enancjomery wchodzą w inne szlaki metaboliczne, mają różne powinowactwo do rozmaitych makromolekuł i odmiennie aktywują receptory. Klasycznym przykładem jest tutaj karwon (**6**), którego enancjomery: (*R*)-**6** i (*S*)-**6** odmiennie pobudzają receptory obecne w naszych nosach i pachną odpowiednio miętą i kminkiem.



Rysunek 2.2: Enancjomery karwonu posiadające odmienny zapach

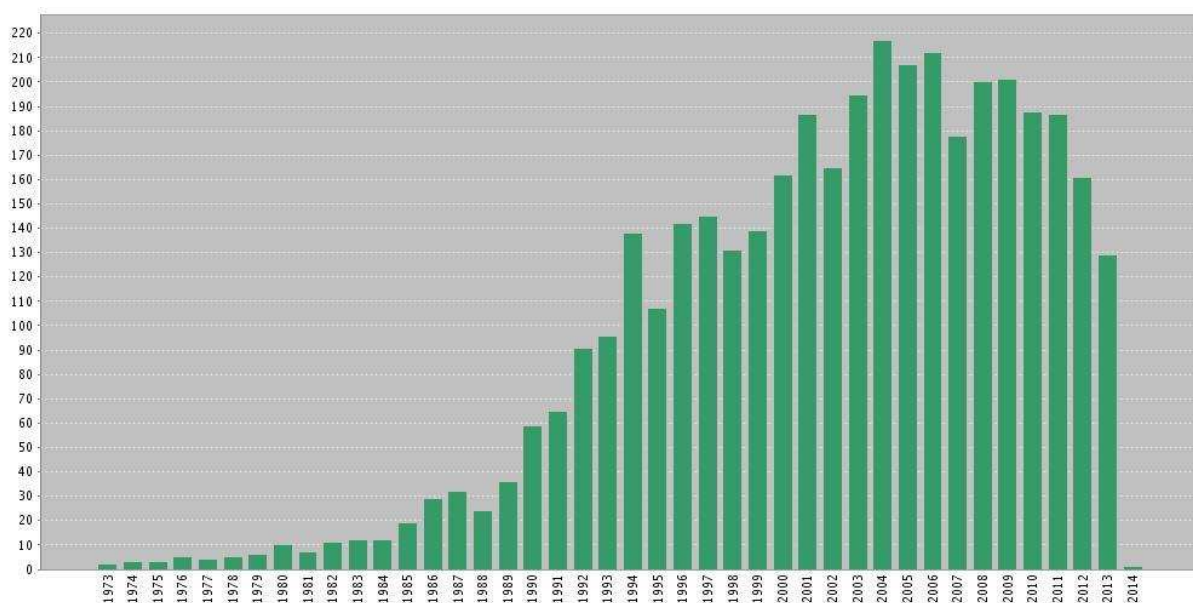
Opisane powyżej rozróżnianie enancjomerów przez organizmy żywe jest praktycznie tożsame z definicją rozpoznania chiralnego. Encyklopedyczna definicja brzmi następująco⁹:

ⁱⁱDokładną analizę pierwszego użycia tego terminu przez lorda Kelvina przedstawia Cintas⁷

Rozpoznanie chiralne – rozróżnianie enancjomerów związku chemicznego. Może być realizowane przez żywy organizm, chiralne cząsteczki, enzymy, receptory leków itp. ⁱⁱⁱ

Jakkolwiek w przyrodzie rozpoznanie chiralne wielu substancji jest perfekcyjne, to realizacja tego zadania przez sztuczne układy (otrzymywane przez badaczy) jest niezwykle trudna. Niemniej istnieje silna motywacja prowadzenia badań w tym kierunku, pochodząca z chęci badania organizmów żywych i odnosząca się do dwóch aspektów tego badania. Po pierwsze, modelowe badania rozpoznania chiralnego z użyciem syntetycznych receptorów dają lepszy wgląd w istotę procesów rozpoznania chiralnego, mającego miejsce w organizmach żywych. Po drugie, większość związków chemicznych w istotach żywych jest chiralna i narzędzia analityczne służące do identyfikacji i wydzielania tych związków muszą posiadać zdolność rozpoznania chiralnego. W pracach dotyczących rozpoznania chiralnego dają się zauważyć oba dwa trendy - chemii czystej i chemii stosowanej - występujące równolegle.

Dziedzina rozpoznania chiralnego w chemii jest stosunkowo młoda. Pierwsza publikacja na ten temat pochodzi z 1973 roku. Cram¹⁰ opisał tam etery koronowe oparte na dwóch jednostkach binaftolu. Początkowo tematyka rozwijała się bardzo powoli i dopiero w latach 90 nastąpił gwałtowny wzrost liczby publikacji, który ustabilizował się od roku 2003 na poziomie ok 400 artykułów rocznie (Wykres 2.1).



Wykres 2.1: Liczba publikacji dotyczących rozpoznania chiralnego w latach 1973-2013. (stan na 01.10.2013 na podstawie zapytania "chiral recognition" w bazie Web of Knowledge)

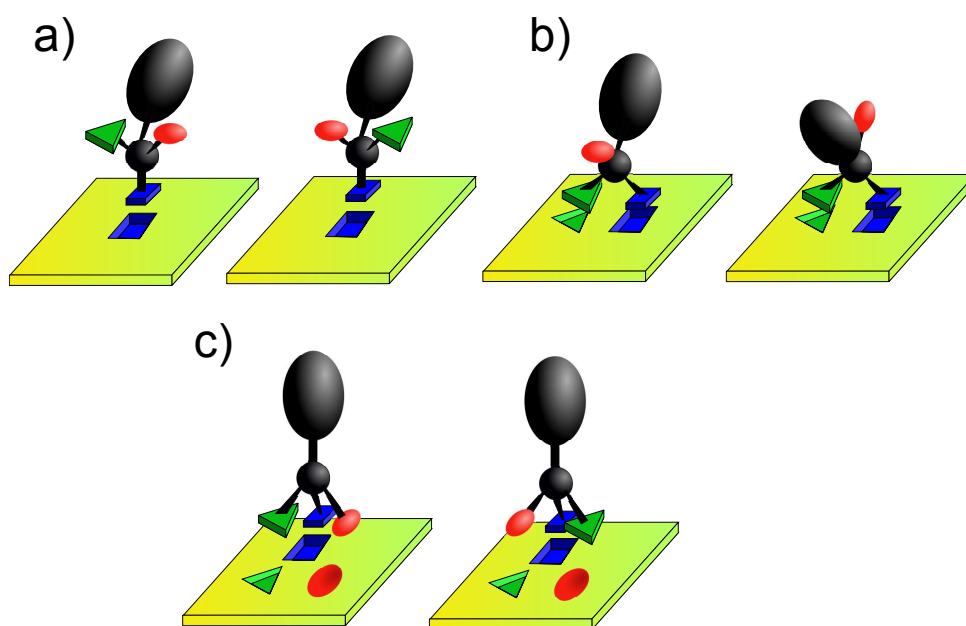
Musiało minąć 125 lat od odkrycia chiralności cząsteczek przez Pasteura do syntezy pierwszego sztucznego receptora wykazującego rozpoznanie chiralne. Opóźnienie to wynikało z kilku przyczyn. Najważniejszą z nich jest fakt, że chemia supramolekularna - chemia oddziaływań

ⁱⁱⁱtłumaczenie własne

receptorów z cząsteczkami gościa - narodziła się w laboratoriach dopiero w 1967 roku za sprawą Pedersena¹¹. Pierwsze badania kompleksów międzycząsteczkowych utrzymywanych przez oddziaływania niekowalencyjne dotyczyły właśnie wiązania kationów przez etery koronowe. Naturalnym rozwinięciem tego tematu było przejście do układów wykazujących rozpoznanie chiralne. Patrząc na rozwój badań z tej perspektywy widać, że badania rozpoznania chiralnego rozpoczęto zaledwie 6 lat po narodzinach chemii supramolekularnej.

2.2.1 Modele rozpoznania chiralnego

W celu zaprojektowania układu zdolnego do efektywnego rozpoznania chiralnego należy stworzyć model oddziaływań między cząsteczkami receptora a gościa, który pozwoli przewidywać i optymalizować jakość rozpoznania chiralnego. Większość modeli powstała w związku z zastosowaniem rozpoznania chiralnego w technikach chromatograficznych i określa różne sposoby oddziaływań cząsteczek analitu z chiralną fazą stacjonarną (ang. *Chiral Stationary Phase* CPS). Jedną z pierwszych analiz ogólnych warunków koniecznych do wystąpienia rozpoznania chiralnego została przeprowadzona w 1987 przez Salema¹². Salem rozważa sposoby oddziaływań dwóch tetraedrycznych cząsteczek, które modelują chiralne układy. Zauważa on, że oddziaływania dwucentrowe i czterocentrowe nie mogą zagwarantować rozpoznania chiralnego, gdyż oba enancjomery wiązane są wówczas jednakowo (2.3a,b). Dopiero wiązanie sześciocentrowe umożliwia rozpoznanie chiralne, gdyż takie wiązanie może zostać zrealizowane tylko przez jeden z enancjomerów (2.3c). Model ten jest prostym przełożeniem funkcjonującego już wcześniej modelu indukcji enancjomerycznej w reakcjach enzymatycznych¹³. Model ten został



Rysunek 2.3: Oddziaływania w rozpoznaniu chiralnym

nazwany modelem trójpunktowym (po trzy punkty oddziaływań w cząsteczce gościa i gospodarza). Uogólnienia powyższego modelu dokonał Pirkle¹⁴:

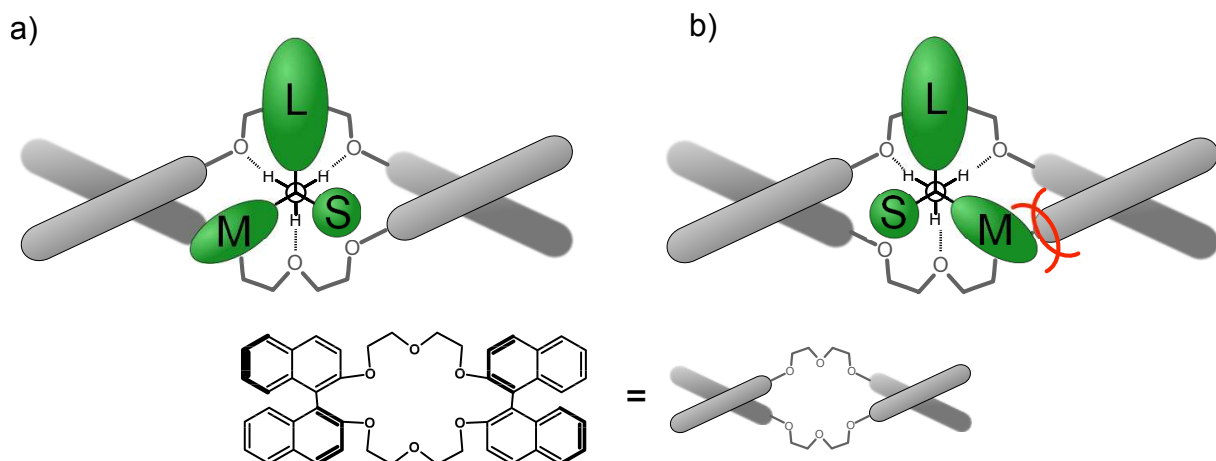
Rozpoznanie chiralne wymaga przynajmniej trzech jednoczesnych oddziaływań między cząsteczką gospodarza i przynajmniej jednym enancjomerem gościa, z których to oddziaływań przynajmniej jedno musi być zależne od stereochemii.^{iv}

Należy tutaj podkreślić, że pod pojęciem „oddziaływanie” rozumiemy nie tylko siły wiążące, ale także odpychające, takie jak zawada steryczna, odpychanie jednoimiennych ładunków, czy dipoli zwróconych do siebie tymi samymi biegunami. Oczywiście, aby wystąpiło wiązanie gościa przez receptor, przynajmniej jedno z tych oddziaływań musi być dla jednego z enancjomerów wiążące. Model ten jest skuteczny w wielu przypadkach, gdy trzeba uzasadnić obserwowaną selektywność lub zaprojektować odpowiedni receptor dla danego gościa, niemniej musi być stosowany z odpowiednią dozą ostrożności. Należy pamiętać o swobodzie konformacyjnej zarówno receptora jak i chiralnego gościa oraz możliwości ich obrotu względem siebie. Oddziaływanie, które makroskopowo obserwujemy, jest zwykle uśrednionym po czasie zestawem różnych składowych, z których modelowe oddziaływanie wcale nie musi być dominujące.

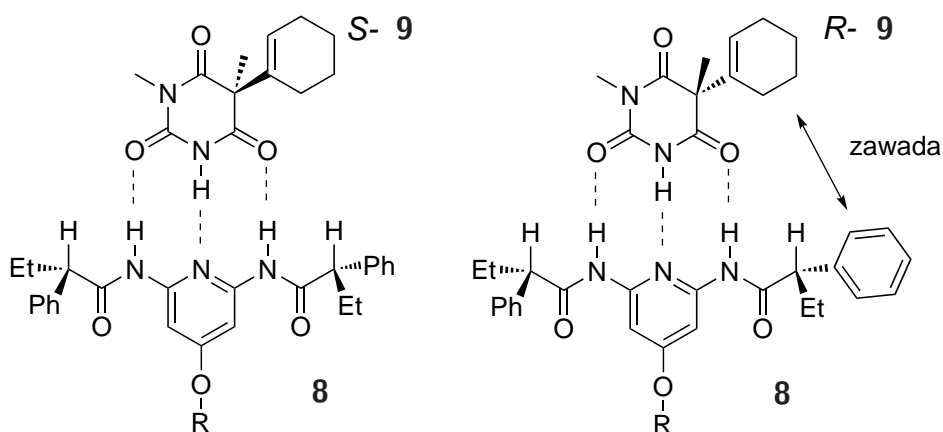
Następujące przykłady ilustrują stosowalność modelu trójpunktowego. Zacząć należy od pierwszej publikacji grupy Crama¹⁵, w której autorzy zaproponowali stereochemiczny model tłumaczący obserwowane selektywności w wiązaniu protonowanych amin. Schemat wiązania kationu przez receptor zakłada związanie grupy NH_3^+ przez fragment eterowy z udziałem trzech dobrze zdefiniowanych wiązań wodorowych (Rys. 2.4). Reszta cząsteczki („ogon”) musi dopasować się do asymetrycznego otoczenia zdefiniowanego przez jednostki binaftyłowe. Ogólna reguła mówi o odpowiednim dopasowaniu trzech podstawników o różnej zawadzie przestrzennej oznaczonych jako *Small*, *Medium* i *Large*. Model ten został nazwany przez autorów modelem trójpunktowym, jednak inaczej rozumieli ten termin niż Salem i Pirkle, gdyż wiązania wodorowe tworzone przez grupę NH_3^+ policzyli jako trzy punkty oddziaływań. Zgodnie z zamysłem Salema i Pirkle’a, wiązanie grupy amoniowej powinniśmy uznać za dwa punkty wiązania (trzecie wiązanie wodorowe nie wnosi niczego do ułożenia cząsteczki), trzecie niezbędne oddziaływanie występuje w przypadku kompleksu mniej korzystnego energetycznie i ma charakter sterycznego odpychania (Rys. 2.4b). Ze względu na to ostatnie oddziaływanie, najlepsze rozdziały obserwowano dla estrów aminokwasów o dużej zawadzie przestrzennej.

Innym przykładem jest CSP oparta na rdzeniu 2,6-diaminopirydyny **8**,¹⁶ która wiąże barbiturany, hydantoiny i pochodne imidu kwasu bursztynowego poprzez układ dwóch donorów i jednego akceptora wiązań wodorowych. W przykładzie z Rys. 2.5 chiralny barbituran **9** tworzy trzy wiązania wodorowe z **8**, dla enancjomeru *R* występuje dodatkowe oddziaływanie - odpychanie steryczne, które powoduje enancjoselektywność.

^{iv}tłumaczenie własne



Rysunek 2.4: Model wiązania chiralnych kationów zaproponowany przez Crama



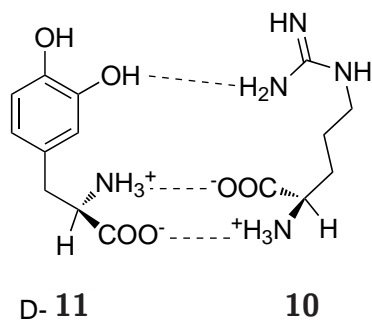
Rysunek 2.5: Model oddziaływań CSP opartej na 2,6-diaminopirydynie **8**

Mimo wielu trafnych przewidywań lub wyjaśnień obserwowanej selektywności, modelowanie takie nie zawsze jest skuteczne, czego przykładem jest faza stacjonarna **10** przygotowana z myślą o rozdziale DOPA (3,4-dihydroksyfenyloalaniny) **11**¹⁷. Zaprojektowany przez autorów model wiązania zakładał wystąpienie dwóch oddziaływań kulombowskich oraz wiązania wodorowego z grupą fenolową (Rys. 2.6). Przestrzenne ułożenie punktów aktywnych na CSP w założeniu umożliwia sześciocentrowe oddziaływanie tylko dla jednego z enancjomerów. Praktyka pokazała, że faza stacjonarna sprawdziła się w rozdzielaniu enancjomerów DOPA, jednak obserwowana selektywność była przeciwna niż przewidywana.

2.3 Metody badania rozpoznania chiralnego

2.3.1 Ilościowe miary rozpoznania chiralnego

Aby móc porównywać jakość rozpoznania chiralnego danej substancji przez różnego rodzaju receptory, przydatne jest wprowadzenie ilościowej miary rozpoznania chiralnego. Definicja



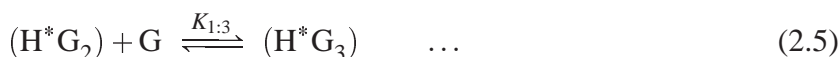
Rysunek 2.6: Sugerowany stereochemiczny model oddziaływań między CSP (**10**) a analitem (DOPA (**11**))

rozpoznania chiralnego – *rozróżnianie enancjomerów związku chemicznego* – (str. 21) bardzo ogólnie określa to zjawisko i miara rozpoznania chiralnego będzie zależała od tego, co rozumiemy pod pojęciem *rozróżnienie*. Jeżeli owo rozróżnianie ma polegać na tworzeniu kompleksów supramolekularnych o różnych stałych trwałości, to jedną z najprostszych i najczęściej stosowanych miar jest stosunek stałych trwałości kompleksów - Rów. (2.1), który będzie określał jako selektywność termodynamiczną (α_T). Stałe trwałości (tworzenia) kompleksów definiujemy wg wzoru 2.2, gdzie G - oznacza cząsteczkę gościa, zaś H* chiralną cząsteczkę gospodarza (ang. *host*). Stała trwałości ma wymiar $[\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} = \text{M}^{-1}]$.

$$\alpha_T = \frac{K_S}{K_R} \quad (2.1)$$

$$K_i = \frac{[\text{H}^* \text{G}_i]}{[\text{H}^*][\text{G}_i]} \quad (2.2)$$

W równaniach 2.1 i 2.2 założono, że cząsteczki gościa i gospodarza oddziałują tworząc kompleksy wyłącznie o stechiometrii 1:1. Kompleks o tak prostej stechiometrii często stanowi jedyny, który powstaje w badanym układzie, jednakże można spotkać receptory tworzące supermolekuły o innych proporcjach składników. Odpowiada to sytuacjom, kiedy jedna molekula gospodarza może kompleksować kilka cząsteczek gościa (Rów. (2.4, 2.5)), lub gdy kilka cząsteczek receptora wiąże się z jedną cząsteczką gościa (Rów. (2.6, 2.7)).

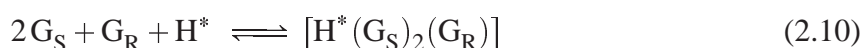


W tak złożonej sytuacji porównywanie stałych trwałości odpowiednich kompleksów jest problematyczne i nie ma ustalonych standardów. Można porównywać stałe trwałości odpowiadające kolejnym stopniom kompleksowania (tj. $K_S^{1:1}$ z $K_R^{1:1}$; $K_S^{2:1}$ z $K_R^{2:1}$; itd.) lub patrzeć na sumaryczne stałe trwałości β^i (Rów. 2.8, $\beta_{i,S}/\beta_{i,R}$). W prostym przypadku, gdy powstają kompleksy HG i HG₂, stosunek $K_S^{1:1}/K_R^{1:1}$ ($= \beta_{1,S}/\beta_{1,R}$) dobrze określa efektywność rozpoznania chiralnego, gdy G jest w niedomiarze, zaś $\beta_{2,S}/\beta_{2,R}$ sprawdza się dla nadmiaru G.

$$\beta_i = \frac{[HG_i]}{[H][G]^i} \quad (2.8)$$

$$\beta_i = \prod_{n=1}^i K_n \quad (2.9)$$

Opisane powyżej stałe trwałości kompleksów o złożonej stechiometrii zakładały, że wiązaniu ulega kilka cząsteczek gościa o tej samej chiralności. W praktyce jednak mogą wystąpić kompleksy, w których wiązane są jednocześnie oba enancjomery gościa (np. Rów. (2.10)), lub takie, w których pozycje wiążące są nierównocenne (Rów. (2.11))



W tak złożonych przypadkach nawet wyznaczenie całego zestawu możliwych stałych trwałości (co wydaje się praktycznie nieosiągalne) nie daje podstaw do obiektywnego porównywania jakości rozpoznania chiralnego dwóch receptorów, gdyż brakuje narzędzi do przeprowadzenia takiej analizy.

Pewnym uproszczeniem powyższych problemów jest miara rozpoznania chiralnego stosowana w chromatografii. Rozdział enancjomerów na chiralnej kolumnie wynika z tworzenia kompleksów kolumna-analit o różnej trwałości dla każdego z enancjomerów. W chromatografii

bezpośrednim wynikiem analizy jest chromatogram, który można następnie poddać analizie numerycznej. Zredukowane współczynniki retencji (k' , Rów. (2.13)) dwóch pików definiują jakość rozdziału tych substancji (w szczególności rozdziału enancjomerów). Współczynnikiem selektywności jest iloraz k'_S/k'_R - Rów. (2.13). Dla odróżnienia od selektywności termodynamicznej, selektywność określona na podstawie chromatogramu nazwę selektywnością chromatograficzną α_C .

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.12)$$

$$\alpha_C = \frac{k'_S}{k'_R} \quad (2.13)$$

t_R – czas retencji, t_M – czas martwy.

Parametr ten można wyznaczyć z każdego chromatogramu, nie wymaga on znajomości stechiometrii tworzonych kompleksów, daje informację o uśrednionej zdolności kompleksowania enancjomerów przez fazę stacjonarną. Współczynnik α_C daje bezpośrednią i prostą informację o jakości rozpoznania chiralnego danej fazy stacjonarnej i jej stosowalności w metodach podziałowych. Jeżeli cząsteczki analitu oddziałują z immobilizowanymi cząsteczkami CSP wg stechiometrii 1:1, to wówczas α_C odpowiada α_T . Trzeba jednak pamiętać, że immobilizacja chiralnych cząsteczek na CSP zmienia ich powinowactwo do tworzenia supermolekuł w porównaniu z oddziaływaniami w roztworze.

Jeżeli pod pojęciem *rozróżnianie* będziemy rozumieli wystąpienie różnego sygnału analitycznego, to miary rozpoznania chiralnego będą kształtować się zupełnie inaczej. Receptory, które określa się mianem sensorów, na skutek kompleksowania enancjomerów gościa, zmieniają swoje właściwości fizykochemiczne w sposób, który może być obserwowany makroskopowo. Odmienne właściwości kompleksów z każdym z enancjomerów wynikają z faktu, że kompleksy te są diastereoizomeryczne. Do najczęściej obserwowanych różnic należą¹⁸:

- różnica w widmie absorpcji UV-Vis (w szczególności różnica barw),
- różnica w widmie fluorescencji (w szczególności różnica intensywności),
- różnica w potencjale redoks,
- różnica w przewodnictwie.

Należy zaznaczyć, że w przypadku sensorów, stałe trwałości kompleksów supramolekularnych mają drugorzędne znaczenie. Częste są sytuacje, w których selektywność termodynamiczna jest równa 1, ale układ ma znakomite właściwości sensoryczne, ze względu na bardzo dużą

różnicę we właściwościach kompleksów. Jakość rozpoznania chiralnego dla sensorów zdefiniowaną wg Rów. (2.14) (określona przez analogię do parametru określanego jako wzmocnienie fluorescencji ef) będę nazywał *selektywnością sensoryczną* (α_S).

$$\alpha_S = \frac{Y_R - Y_0}{Y_S - Y_0} \quad (2.14)$$

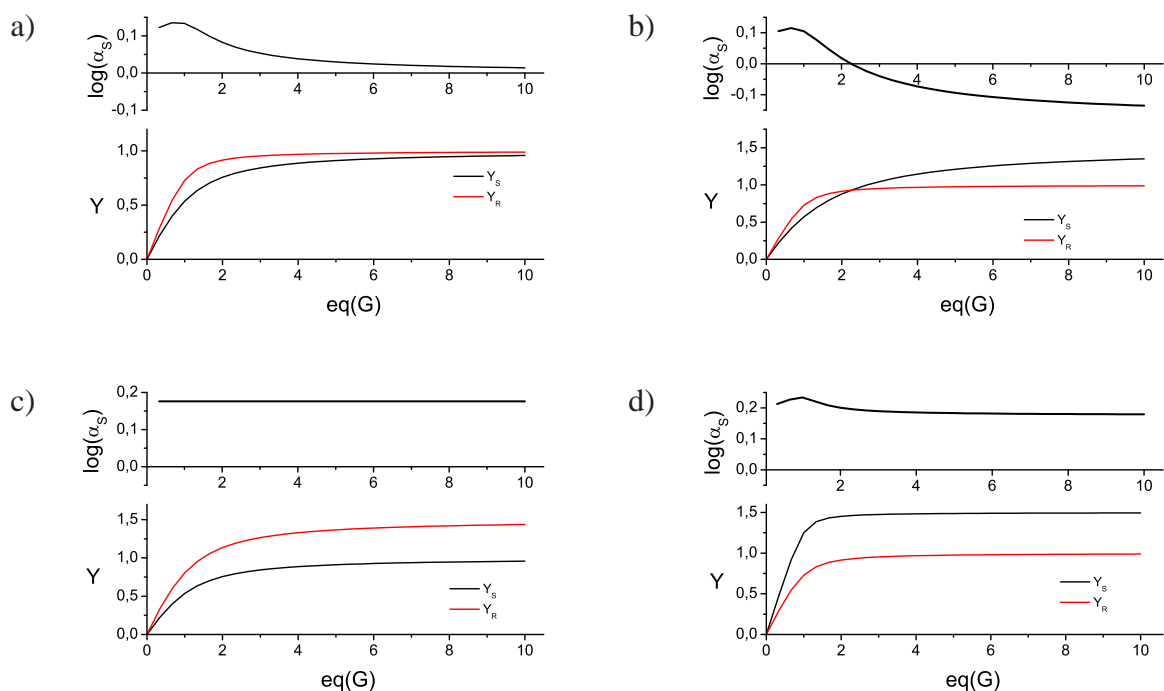
gdzie Y jest sygnałem analitycznym dowolnego rodzaju, Y_0 to sygnał czystego sensora, $Y_{S,R}$ dotyczy sygnału po dodaniu chiralnego gościa. Y^{max} oznacza sygnał analityczny od całkowicie skompleksowanego sensora.

Istotnym problemem w tak sformułowanej definicji rozpoznania chiralnego jest fakt, że wartość α_S zależy od stężeń receptora (sensora) i gościa. Wykresy 2.2a),b) przedstawiają dwie możliwe sytuacje, które są szczególnie trudne do ilościowej interpretacji w kontekście α_S . Pierwszy przypadek (a) dotyczy sytuacji w której $K_R > K_S$, ale kompleksy sensora z każdym z enancjomerów mają bardzo zbliżoną wartość Y^{max} . Oznacza to, że wartość α_S ma swoje maksimum na krzywej, lecz dla dużego stężenia G dąży do $\alpha_S = 1$. Sytuacja (b) zachodzi, gdy $K_R > K_S$, ale to mniej trwały kompleks z enancjomerem S cechuje większa Y_{max} . Prowadzi to do sytuacji, w której selektywność mierzona jako α_S zmienia kierunek (!) razem ze zmianą stężenia analitu. Dopiero dla $[G] \rightarrow \infty$, α_S ulega stabilizacji. Wykres 2.2c) dotyczy sytuacji, w której $K_S \approx K_R$, a kompleksy mają inne cechy fizyczne. Teraz α_S ma stałą wartość, a pomiar zawsze jest jednoznaczny. Ostatni przypadek d) występuje, gdy trwalszy kompleks cechuje jednocześnie większa Y_{max} . W przebiegu $\alpha_S = f(c)$, występuje maksimum, jednak kierunek selektywności jest zachowany i asymptotycznie dąży do wartości Y_R/Y_S .

Jak pokazałem powyżej, taka miara rozpoznania chiralnego nie jest jednoznaczna, gdyż wynik w postaci parametru α_S zależy zazwyczaj od arbitralnie wybranych stężeń sensora i gościa. Pewnym ujednoczeniem byłoby stosowanie α_S w granicy $\lim_{[G] \rightarrow \infty} (\alpha_S)$, jednak nie należy to do obecnej praktyki. Pewnym paradoksem jest fakt, że selektywność sensoryczna daje się najlepiej określić (posiada stałą wartość) dla receptorów, które cechuje brak selektywności termodynamicznej. Parametr α_S pomaga porównać jakość sensorów wykazujących rozpoznanie chiralne i ma bezpośrednie przełożenie na aplikacyjny aspekt badanych układów, jednak ze względu na niejednoznaczność wyników należy stosować go z dużą dozą ostrożności.

Z powyższych rozważań wynika, że jedynie selektywność termodynamiczna (α_T) ma fundamentalny charakter i jest precyzyjnie określoną pochodną dwóch stałych trwałości. Wyznaczenie α_C i α_S może być łatwiejsze niż α_T i parametry te mogą w szczególnych przypadkach dać się łatwo przeliczyć na α_T . W tej pracy jedynie selektywność termodynamiczną będę traktował jako rzeczywistą, podstawową miarę rozpoznania chiralnego.

Niezależnie od przyjętej selektywności, porównywanie jej dla różnych receptorów jest naj-



Wykres 2.2: Teoretyczne zależności sygnału analitycznego (Y) oraz selektywności sensorycznej (α_S) od stężenia enancjomerów gościa dla czterech różnych warunków a) $K_R > K_S$ i $Y_R^{max} \approx Y_S^{max}$, b) $K_R > K_S$ i $Y_R^{max} < Y_S^{max}$, c) $K_R \approx K_S$ i $Y_R^{max} > Y_S^{max}$, d) $K_R > K_S$ i $Y_R^{max} > Y_S^{max}$

dogodniejsze przy posługiwaniu się logarytmem $\log(\alpha)$. Brak selektywności w skali logarytmicznej oznacza zero ($\log(1) = 0$), inne wartości selektywności są rozłożone symetrycznie wobec zera od $-\infty$ do $+\infty$. Przykładowo $\alpha_1 = 1,27$ i $\alpha_2 = 0,784$ odpowiadają tej samej jakości rozpoznania chiralnego, ale przeciwnej selektywności ($\alpha_1 = 1/\alpha_2$), co nie jest od razu widoczne dla liczb w tej postaci. Porównanie logarytmów ułatwia analizę, gdyż dla przeciwnych selektywności otrzymujemy przeciwne wartości logarytmów: $\log(\alpha_1) = 0,1038$ i $\log(\alpha_2) = -0,1038$.

2.3.2 Metody wyznaczania stałych tworzenia kompleksów

2.3.2.1 Teoretyczne aspekty miareczkowania

Aby wyznaczyć stałą trwałości kompleksu supramolekularnego, zdefiniowaną wg Rów. (2.2) lub (2.8), należy określić stężenia kompleksu i substratów w stanie równowagi. Najdogodniejsze do tego celu są metody spektroskopowe, które umożliwiają zwykle wyznaczenie stężeń wszystkich składników bez zaburzania położenia równowagi. Aby zwiększyć pewność pomiaru, stężenia te należy wyznaczyć dla kilku różnych stężeń początkowych substratów – H i G. W praktyce polega to na stopniowym dodawaniu jednego z substratów do roztworu drugiego, czyli na miareczkowaniu. W zależności od zastosowanej metody spektroskopowej sposób prowa-

dzenia pomiaru i ograniczenia metody różnią się między sobą, jednak zasada miareczkowania pozostaje taka sama. Problematyka procesu miareczkowania, jego możliwości i ograniczenia zostały dosyć dokładnie omówione w kilku przeglądach^{19–21} i książkach^{22–24}. Poniżej przedstawię pokrótce najważniejsze aspekty tego procesu poszerzone o własne obserwacje i wnioski dotyczące najistotniejszych problemów i źródeł błędów.

Miareczkowania najczęściej przeprowadza się zachowując stałe stężenie jednego z substratów (na ogół gospodarza - H) i stopniowo zwiększając stężenie gościa (G). W praktyce realizuje się to przez rozpuszczenie G w roztworze H, przy czym stężenie G jest kilkudziesięciokrotnie większe. W ten sposób wprowadzanie kolejnych objętości roztworu G do roztworu H nie zmienia stężenia tego ostatniego. Stałość tego stężenia nie jest warunkiem koniecznym, jednak podejście to upraszcza analizę numeryczną oraz, co ważniejsze, niweluje wpływ ewentualnej agregacji cząsteczek H. Po dodaniu kolejnej porcji roztworu mierzymy sygnał analityczny od tak otrzymanej mieszaniny. W najogólniejszym przypadku sygnał analityczny (oznaczany ogólnie symbolem Y) jest złożeniem sygnałów od wszystkich składników. Zależność tę przedstawiają równania zależne od metody spektroskopowej:

- W spektrometrii UV-Vis sygnał analityczny - absorbancja ($Y = A$) jest sumą absorbancji wszystkich składników:

$$A(\lambda) = l \cdot \epsilon_H(\lambda) \cdot [H] + l \cdot \epsilon_G(\lambda) \cdot [G] + \sum_{n,m} (l \cdot \epsilon_{H_n G_m}(\lambda) \cdot [H_n G_m]),$$

ta sama zależność dotyczy spektrofluorometrii, gdzie mierzy się intensywność fluorescencji ($Y = I_F$);

- W spektroskopii NMR (w sytuacji szybkiej wymiany w skali czasu NMR) przesunięcie chemiczne jądra z cząsteczki H ($Y = \delta$) zależy od ułamków molowych wolnego H i jego kompleksów z G:

$$\delta = \delta_H \cdot x_H + \sum_{n,m} (\delta_{H_n G_m} \cdot x_{H_n G_m})$$

Analogicznie zamiast δ można użyć wyznaczonych współczynników dyfuzji D ^{20,25}.

- W pomiarach kalorymetrycznych określa się ciepło ($Y = \Delta H$) wydzielone po dodaniu kolejnej porcji G²⁶:

$$\Delta H = \sum_{n,m} (\Delta H_{H_n G_m}^0 \cdot \Delta n_{H_n G_m}) + \Delta H_{dil}^0$$

Zazwyczaj niezwiązane cząsteczki gościa nie wnoszą wkładu do sygnału analitycznego i człon $Y_G = 0$. Przebieg sygnału analitycznego w kolejnych punktach miareczkowania czyli

funkcje:

$$Y = f([H]_0, [G]_0), \quad (2.15)$$

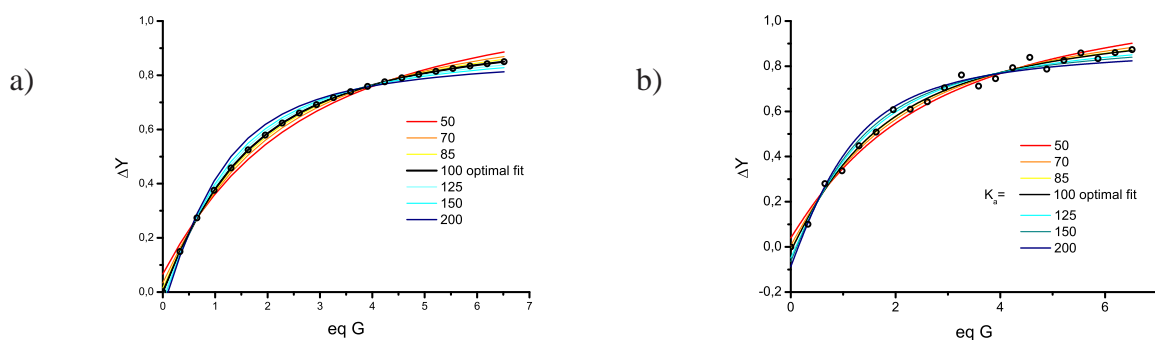
gdzie $[H]_0$ i $[G]_0$ odpowiadają całkowitym stężeniom H i G:

$$[H]_0 = [H] + \sum_{n,m} n[H_n G_m] \quad (2.16)$$

$$[G]_0 = [G] + \sum_{n,m} m[H_n G_m], \quad (2.17)$$

określa się mianem krzywej miareczkowania. Aby z krzywej miareczkowania wyznaczyć interesujące nas stałe trwałości kompleksów, należy numerycznie dopasować teoretyczną krzywą miareczkowania, do tej otrzymanej doświadczalnie. Proces dopasowywania (ang. *fitting*) krzywej teoretycznej polega na iteracyjnym zmienianiu zestawu $K_{(H_n G_m)}$ oraz $Y_{(H_n G_m)}$ określonych dla wszystkich kompleksów, w celu uzyskania jak najmniejszej rozbieżności między krzywą teoretyczną a doświadczalną. Dla k kompleksów mamy $2k$ parametrów, które trzeba ustalić na podstawie krzywej miareczkowania, co oznacza że minimalna liczba punktów miareczkowania wynosi $2k + 1$. W praktyce jednak liczba ta powinna być dużo większa, aby zapewnić większą precyzję pomiarów.

Wyznaczona stała trwałości bardzo silnie zależy od kształtu dopasowanej krzywej teoretycznej. Do przedstawionych na Wykresach 2.3a,b) idealnych zestawów punktów doświadczalnych dopasowano optymalne krzywe teoretyczne oraz krzywe o celowo zawyżonych i zaniżonych wartościach K_a .



Wykres 2.3: Symulowane przebiegi miareczkowania dopasowane krzywymi odpowiadającymi różnym wartościom K_a . a) miareczkowanie idealne - pozbawione błędów, b) do punktów z (a) dodano błąd przypadkowy o rozkładzie normalnym z $\sigma = 0,05$

Jak wynika z Rys.2.3a) niewłaściwe krzywe tylko nieznacznie różnią się od optymalnej. Skrajne krzywe (niebieska i czerwona) odpowiadają stałym różniącym się czterokrotnie, mimo że różnica w ich przebiegu jest niewielka. Dla idealnych punktów doświadczalnych dopasowani

optymalnej krzywej jest trywialne. Jednakże dla danych obarczonych błędem przypadkowym (Rys.2.3b) wybór najlepszego dopasowania nie jest już tak oczywisty. Z tej prostej graficznej analizy wynika, że aby dopasowana krzywa teoretyczna dobrze odpowiadała faktycznemu przebiegowi, niezbędne jest zebranie stosunkowo dużej liczby punktów doświadczalnych o bardzo dobrej jakości (mały błąd przypadkowy). Jeżeli z powodu dużych błędów pomiaru poszczególnych punktów i/lub małej liczby tych punktów nie jest możliwe naprowadzenie teoretycznej krzywej na właściwy kształt przebiegu, to miareczkowanie takie obarczone jest gigantycznym błędem i wyznaczona stała jest bezwartościowa (można jedynie domniemywać jej rząd wielkości). Doświadczenie zdobyte w naszym zespole uczy, że w przypadku miareczkowań pod kontrolą NMR, które są kosztowne i wyjątkowo czasochłonne, 10-15 punktów wystarcza do wiarygodnego wyznaczenia stałej w modelu 1 : 1. Jednakże przy zastosowaniu innych metod – szybszych, tańszych i dających się zautomatyzować – 20 punktów określa minimum, poniżej którego nie powinno się schodzić. Dodatkowo, jeżeli z bliżej nieokreślonych powodów, występują znaczne błędy przypadkowe, liczba punktów powinna zostać zwiększona. Powyższe empiryczne doświadczenie potwierdza numerycznie Tabela 2.1, która przedstawia zależność niepewności wyznaczenia stałej K od liczb i jakości punktów doświadczalnych.

Tabela 2.1: Zależność niepewności wyznaczenia stałej trwałości od liczby punktów miareczkowania i poziomu ich błędów przypadkowych.^a

Błąd ΔY^c	Liczba punktów ^b				
	7	10	15	20	30
1%	12%	7.7%	6.2%	5.2%	4.2%
2%	(25%)	16%	13%	11%	8%
5%	(79%)	(48%)	(36%)	(29%)	22%
10%	(250%)	(128%)	(91%)	(70%)	(50%)

^a Symulowane przebiegi miareczkowania dla modelu wiązania 1 : 1 z dodanym błędem losowym o rozkładzie normalnym poddano dopasowywaniu za pomocą programu WinEqNMR. $K_a = 100$, $[H]_0 = 0.01$, Wartości niepewności przekraczające 25% podane w nawiasach, są silnie niedoszacowane.

^b Symulowane punkty miareczkowania rozłożone równomiernie w zakresie 0-6.5 eq G ($p=0.85$, patrz Wykres 2.6, str. 35). ^c Odchylenie standardowe błędów Y określone jako ułamek ΔY_{max}

W przypadku bardziej złożonych stechiometrii kompleksów przyjmuje się, że potrzebne jest ok 15 punktów na każdy powstający kompleks.

Jeszcze do niedawna nawet przy bardzo prostej stechiometrii kompleksów – 1 : 1, często stosowano różne przybliżenia i przekształcenia zależności $Y = f(K_{a,i}, Y_i)$, które umożliwiały uzyskanie liniowej zależności²¹, mimo że dla modelu 1 : 1 teoretyczna krzywa miareczkowania ma równanie analityczne o umiarkowanym stopniu złożoności. Wprowadzenie każdego przybliżenia zmniejsza precyzję pomiaru, a w dzisiejszej dobie swobodnego dostępu do kompu-

terów o dużej mocy obliczeniowej, stosowanie jakichkolwiek przybliżeń i linearyzacja problemu są zupełnie zbyteczne. Nie ma żadnych powodów, aby nie stosować dzisiaj bezpośredniego dopasowywania krzywej teoretycznej do eksperymentalnej za pomocą któregoś z algorytmów nieliniowych¹⁹.

2.3.2.2 Kompleksy o stechiometrii 1 : 1

Dla układów tworzących jedynie kompleksy o stechiometrii 1 : 1, stanowiące większość przypadków, przeprowadzę bardziej szczegółową analizę procesu miareczkowania. Postać analityczna równania krzywej miareczkowania ma postać:

$$\Delta Y_f = Y_{\Delta HG} \left[\frac{\frac{1}{2}([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a}) - \sqrt{([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a})^2 + 4[G]_0[H]_0}}{[H]_0}} \right] \quad (2.18)$$

$$\Delta Y_c = Y_{\Delta HG} \left[\frac{\frac{1}{2}([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a}) - \sqrt{([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K_a})^2 + 4[G]_0[H]_0}}{[G]_0}} \right] \quad (2.19)$$

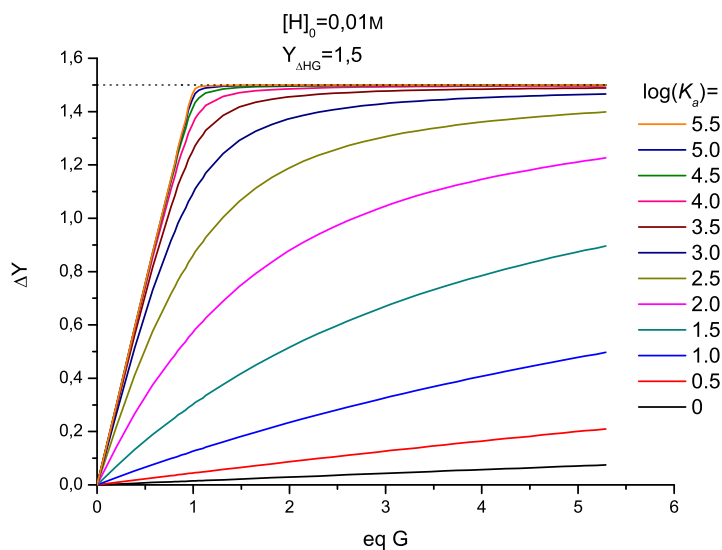
gdzie Y_f i Y_c dotyczą analiz, których sygnał analityczny jest proporcjonalny odpowiednio do ułamka molowego składników (np. NMR) i całkowitego stężenia składników (np. UV-Vis). Inne użyte wielkości zdefiniowane są następująco:

$$\Delta Y = Y - Y([G]_0 = 0) \quad (2.20)$$

$$Y_{\Delta HG} = Y_{HG} - Y([G]_0 = 0) \quad (2.21)$$

Wykresem krzywej miareczkowania w modelu 1 : 1 jest hiperbola (Wykres 2.4). Zaznaczona na rysunku asymptota pozioma odpowiada wartości $Y_{\Delta HG}$, zaś za kształt (stopień zakrzywienia) odpowiada parametr K . Na wykresie przedstawiłem zależność kształtu krzywej miareczkowania od wartości stałej K_a . Gdy stała trwałości jest niska, to zagięcie krzywej w początkowym stadium miareczkowania jest znikome i niezbędne jest dodanie dużej liczby równoważników G. Z drugiej strony, dla bardzo dużych wartości stałych K , krzywa miareczkowania składa się z dwóch niemal prostych fragmentów połączonych niewielką krzywizną w okolicach 1 ekw. Krzywizna ta zależy od K_a i ma bardzo podobny przebieg dla stałych różniących się nawet o rząd wielkości (!) (porównaj $\log(K_a) = 4 - \log(K_a) = 5,5$).

Dla prostego modelu 1 : 1 daje się łatwo określić, jaki zakres stałych trwałości kompleksów można wyznaczyć i jakie porcje G trzeba dodać przy zadanym $[H]_0$. Wprowadza się parametr p określany jako prawdopodobieństwo wiązania. Parametr ten zgodnie z Rów. (2.22) określa



Wykres 2.4: Zależność przebiegu krzywej miareczkowania od wartości stałej tworzenia kompleksu

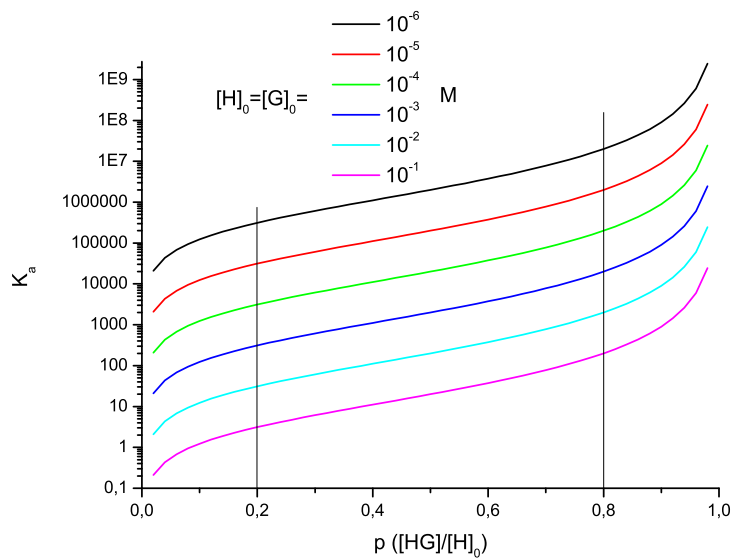
ułamek substratu będącego w niedomiarze, który uległ kompleksowaniu.

$$p = \begin{cases} \frac{[HG]}{[H]_0} & \text{dla } [H]_0 \geq [G]_0 \\ \frac{[HG]}{[G]_0} & \text{dla } [H]_0 < [G]_0 \end{cases} \quad (2.22)$$

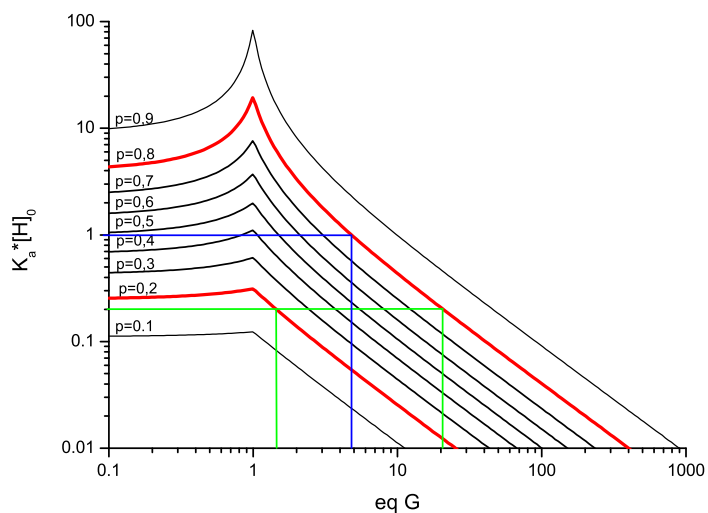
Dla szczególnego punktu miareczkowania, w którym $[H]_0 = [G]_0$ (punkt 1 ekw.), można wykreślić zależność stałej trwałości od p , przy różnych stężeniach substratów (Wyk. 2.5). Oś K_a wykreślona jest w skali logarytmicznej. Z wykresu widać, że dla wszystkich stężeń najmniejsze nachylenie zależności $K_a = f(p)$ występuje w zakresie $p = 0,2$ i $p = 0,8$; poza tym zakresem nachylenie jest znacznie większe. Prawdopodobieństwo wiązania p wyznaczamy z miareczkowania, niepewność tego pomiaru - Δp przekłada się na niepewność wyznaczonej stałej - ΔK_a . Tam, gdzie nachylenie wykresu jest znaczne, nawet niewielka niepewność Δp skutkuje bardzo dużą niepewnością ΔK_a (skala logarytmiczna). Dlatego przyjmuje się, że w miareczkowaniu wartość analityczną mają tylko te punkty dla których $0,2 < p < 0,8$. Co więcej, najlepszą dokładność miareczkowania uzyskuje się, gdy punkty doświadczalne pokrywają cały ów optymalny zakres.

Kolejny Wykres 2.6 pozwala oszacować, jakiego rzędu stałe kompleksowania mogą być wyznaczone przy zadanym stężeniu $[H]_0$ i jaką ilość G trzeba dodać do roztworu aby osiągnąć $p = 0,8$, tj. przeprowadzić miareczkowanie w całym optymalnym zakresie.

Dla różnych wartości iloczynu $K_a \cdot [H]_0$ można odczytać z wykresu, jaka wartość p zostanie osiągnięta przy danej liczbie ekwiwalentów G. Przykładowo, dla $K_a \cdot [H]_0 = 1$ (niebieska linia), aby osiągnąć $p = 0,8$, miareczkowanie należy prowadzić do 5 ekw., zaś $K_a \cdot [H]_0 = 0,2$



Wykres 2.5: Wiarygodny zakres stałych K_a w zależności od stężeń substratów.

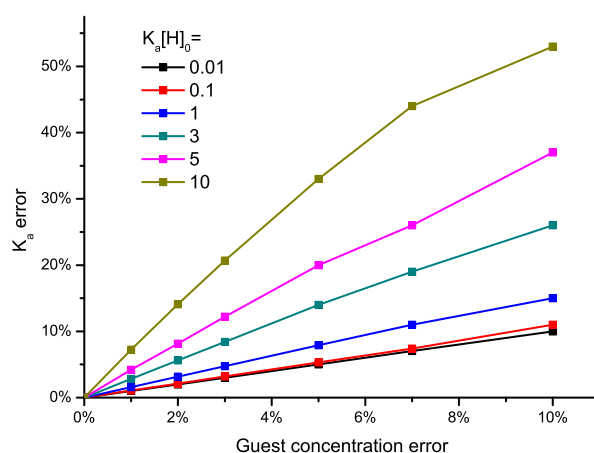


Wykres 2.6: Wyznaczanie optymalnego przedziału punktów miareczkowania na podstawie stężenia $[H]_0$ i przewidywanej stałej.

(zielona linia), optymalny przedział wynosi od 1,5 do 20 ekw. Z wykresu tego wynika wprost, że dla $K_a \cdot [H]_0 > 20$ żaden punkt miareczkowania nie należy do wiarygodnego zakresu; dla $K_a \cdot [H]_0 \approx 10$ jedynie stosunkowo wąski przedział punktów w okolicy 1 ekw. daje optymalne wartości p . Pełen zakres wartości $p = 0,2 - 0,8$ można osiągnąć tylko dla $K_a \cdot [H]_0 < 0,3$. Z jednej strony duże stężenia zwiększają niepewność pomiaru i czynią go bardziej wrażliwym na błędy w przygotowaniu próbek, z drugiej zaś zbyt niskie stężenia wymagają dodania dużej liczby ekwiwalentów G oraz zmniejszają czułość metod pozwalających określić stechiometrię wiązania. Sensownym złotym środkiem wydają się wartości $K_a \cdot [H]_0 = 0,1 - 1$. Zależności te nie są prawdziwe dla kompleksów o innej stechiometrii.

Dla układu, w którym tworzą się tylko kompleksy o stechiometrii 1:1, określiłem wpływ błędu w przygotowywaniu roztworów na wyznaczoną stałą (Wykres 2.7). Dla rozcieńczonych roztworów błąd wyznaczonej stałej jest praktycznie taki sam, jak błąd stężenia jednego z reagentów, jednak dla większych stężeń, niedokładność w stężeniach ma bardzo duży wpływ na wyznaczaną stałą trwałości. Błędy w stężeniach mogą wynikać z:

- różnej czystości substratów – przykładowo jeżeli jeden z substratów ma czystość 99% a drugi 95%, wówczas rzeczywisty stosunek reagentów w roztworze różni się o 4% od zakładanego;
- niedokładności ważenia (w szczególności dla substancji higroskopijnych);
- niedokładności w odmierzaniu porcji rozpuszczalnika.



Wykres 2.7: Zależność błędu wyznaczenia stałej trwałości kompleksu od błędu w stężeniu G

2.3.2.3 Układy złożone - metody określania stechiometrii wiązania kompleksów

Omówione powyżej zależności dotyczą najprostszych kompleksów supramolekularnych o stechiometrii 1 : 1. Metoda miareczkowania zasadniczo pozwala wyznaczać stałe tworzenia kom-

pleksów o bardziej złożonych stechiometriach. Jednakże, dla każdego kompleksu H_nG_m konieczne jest wyznaczenie parametrów $Y_{(\Delta H_n G_m)}$ oraz $K_{(H_n G_m)}$ z krzywej miareczkowania. Jak już pisałem, analiza takich układów wymaga zebrania większej liczby punktów doświadczalnych. Aby wyznaczyć stałe tworzenia kompleksów w tak złożonych układach, parametr $Y_{(\Delta H_n G_m)}$ musi istotnie różnić się dla każdego z kompleksów, w przeciwnym wypadku dopasowanie krzywej jest bardzo utrudnione. W bardziej złożonych modelach kompleksowania liczba parametrów jest tak duża, że krzywą teoretyczną można dopasować do doświadczalnej na wiele sposobów (wiele podobnych minimów lokalnych na drodze optymalizacji). Sytuacja taka uniemożliwia jakąkolwiek ilościową analizę układu.

Wydaje się, że uniwersalnym podejściem byłoby dopasowywanie wszystkich miareczkowań przy użyciu złożonego modelu np. uwzględniającego kompleksy HG , HG_2 , H_2G . Jeżeli któryś z tych kompleksów w rzeczywistości nie powstaje, to dopasowana, odpowiadająca mu stała tworzenia powinna być pomijalnie mała. Doświadczenie pokazuje jednak, że zastosowanie zbyt złożonego modelu do układu, który jest w rzeczywistości prostszy, skutkuje niepowodzeniem procedury udokładniania, lub daje zestaw stałych o gigantycznych niepewnościach. Z drugiej strony, jeżeli do obliczeń przyjmujemy niewłaściwy, zbyt uproszczony model nieuwzględniający wszystkich powstających kompleksów, wówczas wartości liczbowe wyznaczonych stałych nie mają żadnego sensu fizycznego. Problem ten ilustruje Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Stałe trwałości kompleksów (K_a^{fit}) uzyskane przez dopasowywanie układu o stechiometrii $H : G$ wynoszącej $1 : 1 + 1 : 2$ przez prosty model $1 : 1$. Przyjęto $\Delta Y_{1:1} = 1$ i $\Delta Y_{1:2} = 1.5$.

[H] ₀ [M]	$K^{1:1} = 1000 M^{-1}$			
	$K^{1:2} = 10 M^{-1}$	$K^{1:2} = 50 M^{-1}$	$K^{1:2} = 100 M^{-1}$	$K^{1:2} = 250 M^{-1}$
0.0001	906	720	650	656
0.001	877	645	550	503
0.01	594	222	175	147

Tak jak można było się spodziewać, w przypadku prowadzenia miareczkowania przy niskich stężeniach $[H]_0$, przy niewielkiej wartości $K^{1:2}$ (zaledwie 1% wartości $K^{1:1}$), kompleks HG_2 powstaje w bardzo małym procencie i dopasowana wartość stałej (K^{fit}) jest bliska rzeczywistej $K^{1:1}$, jednakże nawet wtedy rozbieżność wynosi ok. 10%. W miarę wzrostu $[H]_0$ czy $K^{1:2}$, rozbieżność między dopasowaną stałą (K^{fit}) a $K^{1:1}$ rośnie bardzo szybko. Dla umiarkowanych wartości $[H]_0$ i $K^{1:2}$ otrzymujemy $K^{fit} \approx 0.5K^{1:1}$, w końcu dla ostatniej wartości w tabeli stałe te różnią się o rząd wielkości. Z powyższej analizy wynika, że uwzględnianie kompleksów o wyższej stechiometrii (jeżeli rzeczywiście występują w układzie) nie jest zabiegiem kosmetycznym, który tylko poprawia jakość wyników. Okazuje się, że dokładna znajomość stechio-

metrii wiązania jest *absolutnie niezbędna*, aby właściwie zinterpretować dane doświadczalne z miareczkowania, w przeciwnym wypadku wyznaczone stałe trwałości nie mają żadnego sensu fizycznego.

Z powyższych powodów wyznaczanie stałych musi zawsze poprzedzać rzetelna analiza stechiometrii tworzonych kompleksów. Struktura receptora – liczba potencjalnych miejsc wiążących – może sugerować obecność jakich kompleksów należy sprawdzić doświadczalnie. Wśród doświadczalnych analiz najbardziej popularna jest metoda zmian ciągłych zwana metodą Joba. Metoda ta polega na pomiarze wartości analitycznej Y dla serii roztworów o $[H]_0 + [G]_0 = const$ z różnymi wartościami ułamka molowego x_H od 0 do 1. Wykresem Joba jest zależność $\Delta Y/x_H = f(x_H)$. Metoda Joba zakłada, że w roztworze powstaje tylko jeden kompleks H_nG_m , wówczas maksymalną wartość $\Delta Y/[H]_0$ otrzymamy w punkcie, w którym $[H]_0:[G]_0$ wynosi $m : n$. Największym problemem w stosowaniu metody Joba jest fakt, że kompleks H_mG_n nigdy nie jest jedynym występującym w roztworze (za wyjątkiem trywialnego przypadku 1 : 1). W rzeczywistości, w roztworze współistnieją wszystkie kompleksy H_xG_y o $x \in (1, \dots, m)$, $y \in (1, \dots, n)$ i wszystkie kompleksy dają wkład do mierzonego Y . Przykładowo, jeżeli w roztworze powstają kompleksy HG i HG_2 to maksimum na wykresie powinno przypadać dla $H : G = 1 : 2$, czyli dla $x_H = \frac{1}{3}$. W rzeczywistości, ze względu na obecność kompleksu o stechiometrii HG , maksimum przypada pomiędzy 0,33 a 0,5. Tabela 2.3 przedstawia przebieg wykresów Joba dla różnych stężeń substratów (c_0) i przy różnych wartościach stałych $K^{1:1}$, $K^{1:2}$.

Jak widać, dla niskich stężeń metoda Joba ma bardzo ograniczone zastosowanie, maksimum wszystkich wykresów leży bardzo blisko $x = 0,5$, co sugeruje stechiometrię 1 : 1. Dopiero dla większych stężeń, maksimum przesuwa się na tyle istotnie, aby wynik był jednoznaczny. Dodatkowym problemem są relacje pomiędzy parametrami Y_{H_nG} powstających kompleksów. Cztery szczególne sytuacje przedstawia Tabela 2.4.

Mimo że symulacja dotyczyła układu o dużej wartości $K^{1:2}$ ($K^{1:2}/K^{1:1} = 0,25$), przy dużym stężeniu, w żadnym z powyższych przypadków wykres Joba nie sugeruje właściwej stechiometrii. W przypadku A parametry Y obu kompleksów są takie same ($Y_{HG} = Y_{HG_2}$), co skutkuje maksimum bardzo bliskim $x(H) = 0,5$. Dla wykresu B Y_{HG_2} jest bliskie wartości dla wolnego receptora, co sprawia, że wykres ma maksimum przesunięte w stronę większych wartości $x(H)$, które sugerują powstawanie kompleksu H_2G zamiast rzeczywistego HG_2 . W trzecim przebiegu zaś, $Y_{HG} = Y_H$, czego następstwem jest maksimum leżące przy $x(H) = 0,29$. Jest to wartość znajdująca się dokładnie pomiędzy 0,33 i 0,25, czyli wartościami, które w klasycznej interpretacji wskazują na kompleksy odpowiednio HG_2 i HG_3 . Ostatecznie, jeżeli $Y_{\Delta HG}$ i $Y_{\Delta HG_2}$ mają przeciwne znaki, wykres Joba ma charakter fali, której ani minimum, ani maksimum nie mogą sugerować odpowiedniej stechiometrii. Wybrany tutaj przekrój konkretnych przypadków dowodzi jeszcze bardziej ograniczonej stosowalności metody Joba. Co ciekawe, dowolne z powyższych przebiegów wykresów Joba mogą wystąpić *jednocześnie* dla różnych długości fali

Tabela 2.3: Kształty krzywych Joba dla różnych stosunków $K^{1:1}$ do $K^{1:2}$ i różnych stężeń

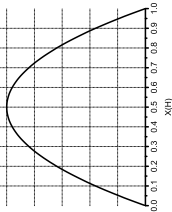
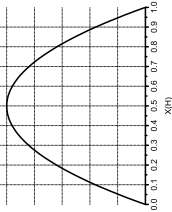
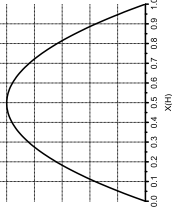
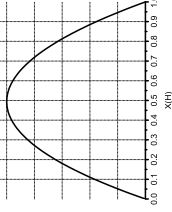
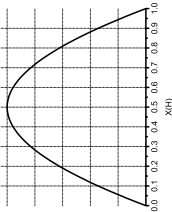
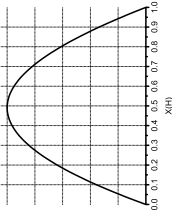
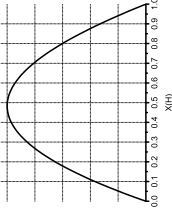
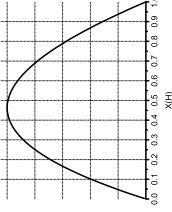
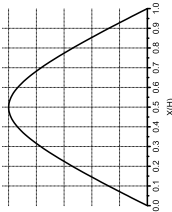
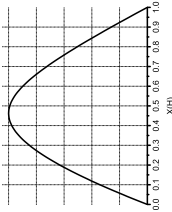
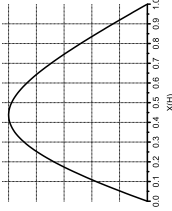
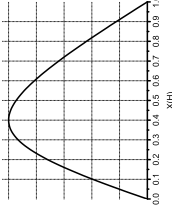
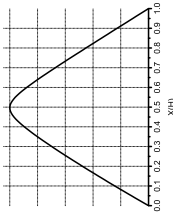
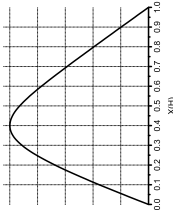
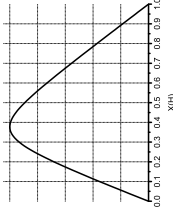
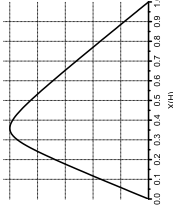
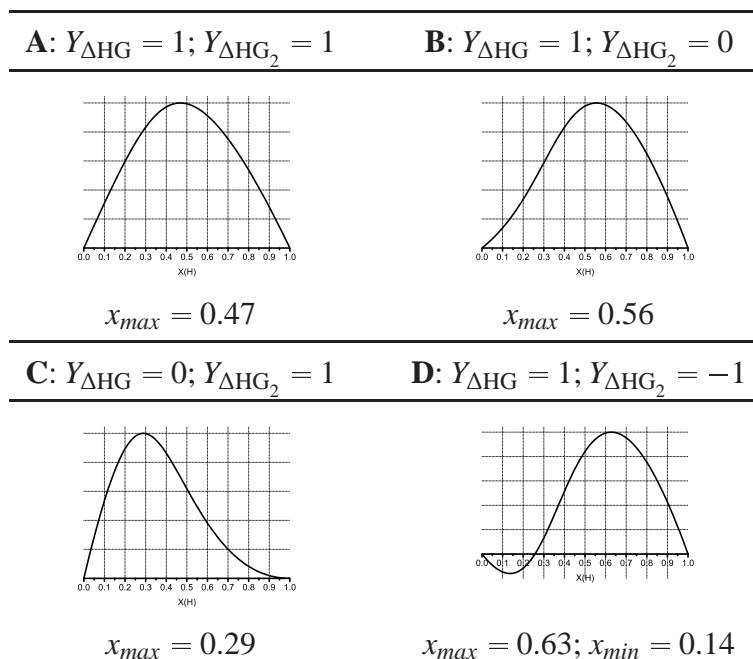
		Stałe trwałości ^a			
		$K^{1:1} = 1000 M^{-1}$	$K^{1:1} = 1000 M^{-1}$	$K^{1:1} = 1000 M^{-1}$	$K^{1:1} = 1000 M^{-1}$
		$K^{1:2} = 0 M^{-1}$	$K^{1:2} = 50 M^{-1}$	$K^{1:2} = 100 M^{-1}$	$K^{1:2} = 250 M^{-1}$
stężenie $[H]_0 + [G]_0$ [M]					
0.0001					$x_{max} = 0.50$
0.001					$x_{max} = 0.50$
0.01					$x_{max} = 0.50$
0.1					$x_{max} = 0.50$

Tabela 2.4: Symulowane przebiegi krzywych Joba dla stechiometrii 1 : 1 + 1 : 2, przy różnych parametrach Y_{H_nG} . Przyjęto $K^{1:1} = 1000 M^{-1}$, $K^{1:2} = 250 M^{-1}$, $[H]_0 = 0,01 M$



lub różnych obserwowanych jąder. Jakkolwiek wykresy z powyższych przykładów nie wskazują właściwej stechiometrii, to jednak wykresy B-D sugerują że nie jest to prosta stechiometria 1 : 1, co zmusza badacza do bardziej wnikliwej analizy i ostrożnej interpretacji wyników.

Ograniczona czułość i wrażliwość na konkretne relacje między wartościami Y_{H_nG} nie oznacza jeszcze, że metoda Joba jest bezużyteczna. Wymaga ona ostrożnej analizy, w szczególności:

- eksperyment trzeba przeprowadzić przy najwyższym osiągalnym stężeniu,
- maksimum leżące poza zakresem $0,45 < x < 0,55$ należy już interpretować jako złożoną stechiometrię wiązania,
- maksimum leżące w pobliżu $x = 0,5$ (dla niskich stężeń) *nie jest* jednoznacznym dowodem na stechiometrię 1:1.

Przedstawiona powyżej ograniczona stosowalność metody Joba wskazuje, że do określania stechiometrii wiązania należy wykorzystać także inne środki.

Różnice pomiędzy eksperymentalną a dopasowaną wartością Y określa się mianem resztek (Y_{err}). Analiza rozkładu resztek jest bardzo prostym w zastosowaniu i czułym narzędziem, które pozwala stwierdzić, czy zastosowany przez nas w procedurze dopasowywania model jest prawidłowy. Wykres $\Delta Y_{err} = f([G]_0)$ daje rozkład resztek. W przypadku dopasowania danych doświadczalnych prawidłowym modelem teoretycznym, resztki mają charakter przypadkowy i powinny być w sposób przypadkowy położone nad i pod osią X . Ich rozkład powinien być normalny. Jeżeli założony model okazuje się nieprawidłowy, punkty na wykresie rozkładu resztek

tworzą sinusoidalne, regularne przebiegi - mają charakter systematyczny. Należy zaznaczyć, że analiza rozkładu resztek nie wymaga prowadzenia dodatkowych eksperymentów, jest to jedynie dodatkowa analiza numeryczna danych otrzymanych podczas miareczkowania. Przykładowe przebiegi krzywych miareczkowania dla układów tworzących kompleksy HG i HG₂ oraz rozkłady resztek przy dopasowaniu danych modelem 1 : 1 przedstawia Tabela 2.5.

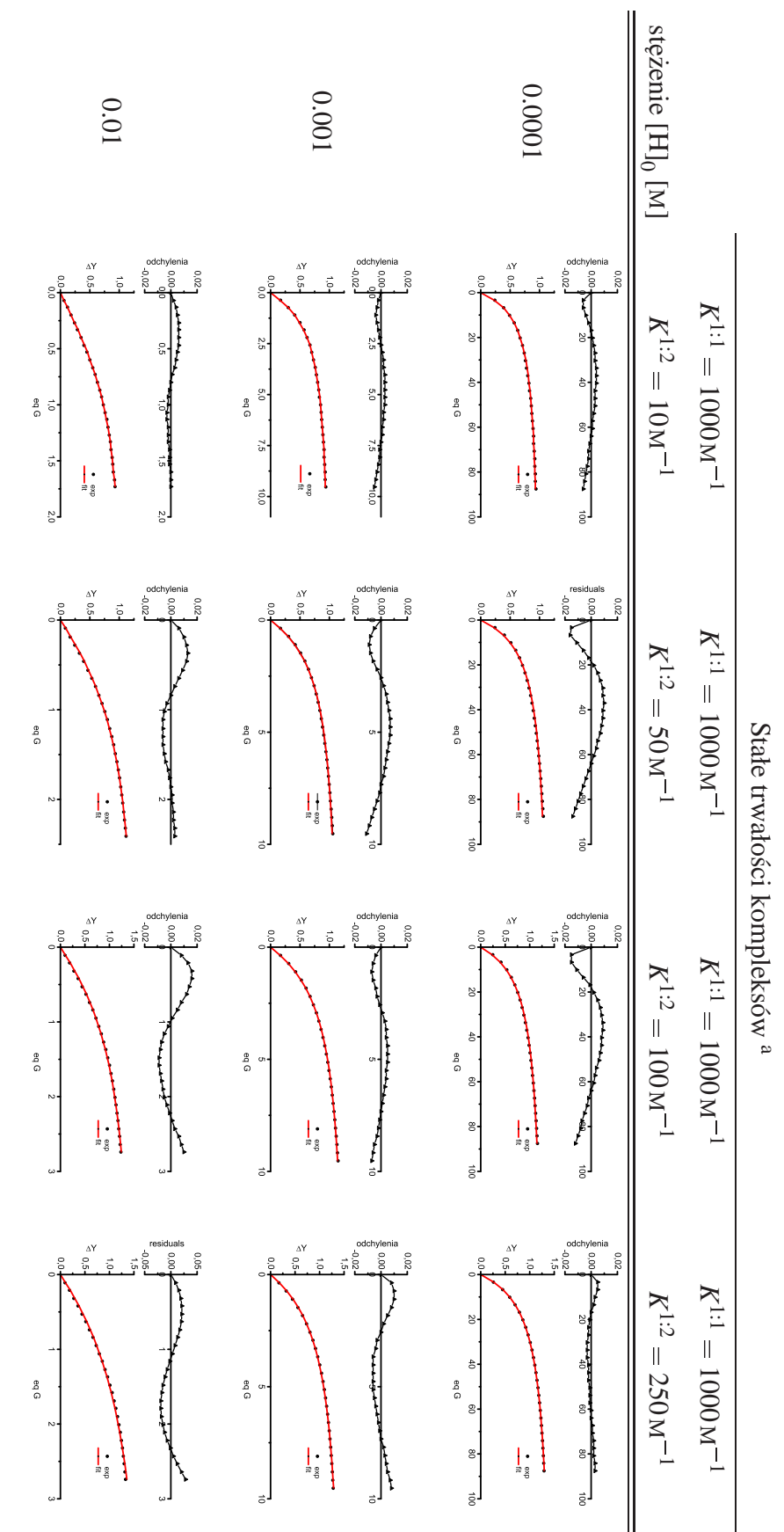
Sinusoidalny charakter rozkładu resztek występuje we wszystkich przypadkach, jednak dla niskich stężeń i małych wartości $K^{1:2}$ amplituda tego rozkładu jest niewielka. Dodatkowe błędy przypadkowe, które zawsze występują podczas pomiaru, mogą dominować nad systematycznym trendem wynikającym z niewłaściwego modelu. Metoda ta nie wskazuje, jaka jest rzeczywista stechiometria powstających kompleksów, pozwala jedynie ocenić, czy zastosowany model jest prawidłowy. Zaskakujący jest fakt, że metoda ta nie jest powszechnie stosowana, mimo że jest bardzo czuła, nie wymaga przeprowadzania dodatkowych pomiarów, analiza numeryczna jest trywialna i często jest realizowana bezpośrednio przez program dopasowujący krzywą teoretyczną.

Kolejna metoda oceniania poprawności użytego modelu wynika wprost z danych przedstawionych w Tabeli 2.2. Miareczkowanie trzeba przeprowadzić przy dwóch, trzech stężeniach $[H]_0$ różniących się przynajmniej dwukrotnie. Jeżeli model został wybrany prawidłowo, to uzyskamy zgodne wyniki, natomiast jeżeli model jest nieprawidłowy, to stałe wyznaczone w poszczególnych pomiarach będą istotnie różnić się między sobą. Ta metoda również nie znalazła szerokiego zastosowania.

Na koniec dywagacji poświęconych możliwościom określania stechiometrii kompleksów trzeba rozpatrzyć przypadek błędu w stężeniu któregoś z reagentów. W takiej sytuacji maksimum na wykresie Joba jest przesunięte, ponadto rozkład resztek czy stężeniowa zależność K mają podobną charakterystykę jak w przypadku zastosowania niewłaściwego modelu. Wydaje się, że przypadkowy błąd stężenia przygotowanego roztworu nie może przekraczać $\pm 10\%$, większa wartość to błędy grube. Przeprowadziłem symulacje dwóch przypadków: A) układ tworzący kompleksy HG i HG₂ o stałych $K^{1:1} = 1000 \text{ M}^{-1}$ i $K^{1:2} = 100 \text{ M}^{-1}$ oraz B) układ HG ze stałą $K^{1:1} = 1000 \text{ M}^{-1}$ i błędem -10% w stężeniu G. Tabela 2.6 przedstawia porównanie tych dwóch sytuacji za pomocą metod pomocnych w określaniu stechiometrii kompleksów.

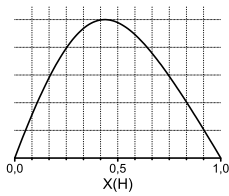
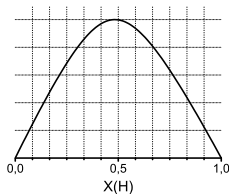
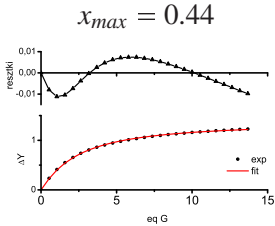
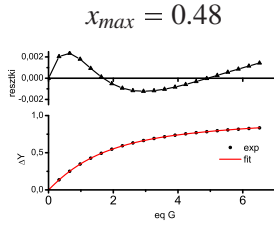
Jakkolwiek wszystkie trzy testy wykazują taki sam kierunek zmian w obu przypadkach, to jednak dla symulacji B zmiany te są bardzo słabe i wydaje się bardzo prawdopodobne, że zarówno przesunięte maksimum na wykresie Joba jak i systematyczny rozkład resztek znajdują się w szumie błędów przypadkowych; podobnie, stężeniowa zależność K jest na poziomie błędu pomiaru. Z powyższej analizy wynika, że nie ma możliwości pomylenia błędnie określonej stechiometrii wiązania z błędem w stężeniach reagentów.

Tabela 2.5: Symulowane przebiegi miareczkowania układu z kompleksami HG i HG₂, dopasowane krzywe wg modelu 1 : 1 i uzyskany rozkład resztek



^a przyjęto $Y_{\text{AHG}} = 1$ i $Y_{\text{AHG}_2} = 1.5$

Tabela 2.6: Porównanie złożonego modelu wiązania (A) i błędu w stężeniu roztworu (B)

Metoda	Model A	Model B
Wykres Joba		
Rozkład resztek		
Zależność od stężenia	$[H]_0 = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \quad K^{fit} = 310 \text{ M}^{-1}$ $[H]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M} \quad K^{fit} = 367 \text{ M}^{-1}$	$[H]_0 = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \quad K^{fit} = 833 \text{ M}^{-1}$ $[H]_0 = 1 \times 10^{-4} \text{ M} \quad K^{fit} = 893 \text{ M}^{-1}$

2.3.2.4 Niepewność pomiaru w miareczkowaniu i wielkościach pochodnych

Jak wynika z powyższego opisu i analizy pewnych czynników, przeprowadzenie rzetelnego miareczkowania i analiza danych, prowadząca do wiarygodnych wyników, są trudnym zadaniem. Aby wynik miareczkowania był możliwie dokładny, należy dołożyć wielu starań, m. in. spełnić poniższe warunki¹⁹:

- gość i gospodarz muszą być wysokiej czystości;
- roztwory muszą być przygotowane z wielką starannością, co dotyczy precyzji zarówno naważek, jak i objętości rozpuszczalnika;
- rozpuszczalniki muszą być także wysokiej czystości, rozpuszczalniki higroskopijne muszą być dokładnie osuszone lub zawartość wody musi być standaryzowana;
- kolejne porcje gościa muszą być podawane z dużą dokładnością;
- stężenie reagentów musi być optymalne dla mierzonej stałej;
- stechiometria powstających kompleksów musi być rzetelnie potwierdzona:
 - eksperyment Joba przy dużych stężeniach, i/lub,
 - analiza rozkładu resztek, i/lub,
 - pomiary przy różnych stężeniach H;
- każde miareczkowanie należy wykonać przynajmniej dwukrotnie.

Trzeba jednak zaznaczyć, że nawet spełnienie wszystkich opisanych warunków nie pozwala wyznaczyć stałej trwałości ze znakomitą precyzją. Stała K_a jest bardzo wrażliwa na błędy w przygotowaniu roztworów i na kształt krzywej miareczkowania - drobna zmiana jej kształtu, wynikająca z błędów przypadkowych, potrafi skutkować znaczną zmianą wyznaczonej wartości K_a .

Pełna analiza niepewności pomiaru jest bardzo złożona, wymaga uwzględnienia niepewności przygotowania naważek i roztworów, niepewności pobranej objętości roztworu H, niepewności dodanych objętości roztworu G oraz niepewności numerycznego procesu dopasowywania krzywej. W praktyce używa się dwóch rodzajów analizy niepewności pomiaru. Pierwsza polega na przeprowadzeniu dopasowywania krzywej teoretycznej za pomocą programu, który, korzystając z odpowiednich narzędzi analizy statystycznej, wyznacza stałą K razem z jej niepewnością. Niepewność wyznaczona przez program wynika tylko z niepewności w samej procedurze dopasowywania, gdyż program przyjmuje, że podane stężenia i wyznaczone wartości analityczne Y nie są obciążone niepewnością pomiarową. Aby prawidłowo oszacować niepewność ΔK , należy niepewność wyznaczoną przez program zwiększyć o oszacowany czynnik uwzględniający inne źródła błędów. Nieuwzględnienie tych czynników uważam za duże zaniedbanie. Druga metoda określenia niepewności wymaga przeprowadzenia kilku (co najmniej trzech) miareczkowań i analizie statystycznej tak otrzymanej serii. Niezbędne jest, aby każde z tych miareczkowań zaczynać od samego początku - tzn. od naważek, przygotowania roztworów, itd.

Doświadczenie wielu lat badań prowadzonych w naszym Zespole w dziedzinie chemii supramolekularnej uczy, że względna niepewność pomiaru K wynosi 5-15%. Zmniejszenie niepewności poniżej 10% jest bardzo trudne, zaś osiągnięcie poziomu <5% wydaje się praktycznie niemożliwe.

Niepewność pomiaru stałych trwałości przekłada się w oczywisty sposób na niepewność wszystkich wielkości będących pochodnymi K . Za miarę rozpoznania chiralnego przyjmujemy miarę termodynamiczną $\alpha_T = \frac{K_S}{K_R}$ (Rów.(2.1), str. 25), niepewność wyznaczenia α_T wynika z niepewności ΔK_S i ΔK_R . Ta oczywista zależność nie znalazła się w *żadnej* ze znanych mi publikacji nt. rozpoznania chiralnego. We wszystkich przypadkach stosunek α_T podawany był bez określania niepewności jego wyznaczenia.

Niepewność pomiaru wielkości będącej funkcją wielu innych wielkości x_i , każdej obciążonej niepewnością Δx_i można wyznaczyć na podstawie wzoru Rów.(2.23)²⁷. Podstawienie Rów.(2.1) do Rów.(2.23) i ciąg przekształceń (2.25-2.29) daje wzór na względną niepewność pomiaru α_T w zależności od względnych niepewności wyznaczenia stałych K Rów.(2.30).

$$\Delta f(x_1, x_2, \dots, x_n) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left[\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)_{\bar{x}} \Delta x_i \right]^2} \quad (2.23)$$

$$\Delta S = \sqrt{\left(\left(\frac{\partial S}{\partial K_S} \right)_{\bar{S}} \Delta K_S \right)^2 + \left(\left(\frac{\partial S}{\partial K_R} \right)_{\bar{S}} \Delta K_R \right)^2} \quad (2.24)$$

$$S = \frac{K_S}{K_R} \quad (2.25)$$

$$\Delta S = \sqrt{\left(\frac{\Delta K_S}{K_R} \right)^2 + \left(\frac{-K_S \Delta K_R}{K_R^2} \right)^2} \quad (2.26)$$

$$\Delta S = \sqrt{\left(\frac{\Delta K_S K_S}{K_R K_S} \right)^2 + \left(\frac{-K_S \Delta K_R}{K_R^2} \right)^2} \quad (2.27)$$

$$\Delta S = \sqrt{\left(S \frac{\Delta K_S}{K_S} \right)^2 + \left(S \frac{\Delta K_R}{K_R} \right)^2} \quad (2.28)$$

$$\frac{\Delta S}{S} = \sqrt{\left(\frac{\Delta K_S}{K_S} \right)^2 + \left(\frac{\Delta K_R}{K_R} \right)^2} \quad (2.29)$$

$$\frac{\Delta S}{S} = \sqrt{2} \frac{\Delta K}{K} \quad (2.30)$$

Z finalnego wzoru wynika, że przy przyjęciu $\Delta K/K = 10\%$ otrzymujemy $\Delta\alpha/\alpha \approx 15\%$, lub $\Delta \log(\alpha) = 0,056$. Błąd tego rzędu należy traktować jako typowy w badaniu rozpoznania chiralnego. Biorąc pod uwagę, że dotychczasowe syntetyczne receptory wykazują selektywność z rzadka tylko przekraczającą 2 ($|\log(\alpha_T)| \approx 0,3$), niepewność ta jest bardzo istotna.

Jakkolwiek wyniki miareczkowania (otrzymane wartości K) nie zależą od zastosowanej metody analitycznej, jednak miareczkowanie pod kontrolą NMR jest szczególnie uprzywilejowane. Z jednej strony jest metodą najbardziej kosztowną i czasochłonną, z drugiej zaś daje najwięcej informacji o procesie wiązania G. Śledzenie systematycznych zmian przesunięć chemicznych sygnałów pochodzących od H pozwala ocenić, w którym miejscu receptora następuje wiązanie G, które protony są zaangażowane w tworzenie wiązań wodorowych, ułatwia określenie zmian konformacyjnych H wywołanych wiązaniem G, itp. Miareczkowanie pod kontrolą NMR pozwala również odróżnić wiązanie anionu przez obojętny elektrycznie receptor od procesu deprotonacji receptora przez ten anion²⁸. Z tego powodu miareczkowanie pod kontrolą NMR zawsze powinno zostać przeprowadzone jako eksperyment kontrolny, nawet w sytuacji, gdy stężenie w tym eksperymencie nie należy do optymalnych. Taki eksperyment kontrolny powinien zostać przeprowadzony przynajmniej dla jednego reprezentanta badanej serii receptorów. Miareczkowania pod kontrolą innych metod spektroskopowych są łatwiejsze do przeprowadzenia, tańsze, szybsze i mogą być prowadzone automatycznie, dlatego metody te są chętnie stosowane, gdy tylko badany układ pozwala na ich użycie (Tabela 2.7).

Tabela 2.7: Zestawienie cech miareczkowania pod kontrolą różnych metod

	NMR	UV-Vis	Fluorymetria	Kalorymetria
Zakres stężeń [M]	$10^{-3} - 10^{-1}$	$10^{-6} - 10^{-3}$	$10^{-8} - 10^{-5}$	$10^{-2} - 10^{-1}$
Zakres stałych K_d [M^{-1}]	$1 - 10^4$	$10 - 10^7$	$10^3 - 10^9$	$1 - 10^3$
Ilość H na jeden pomiar ^a	$10^{-3} - 0,1$ mmol $\sim 0,5 - 50$ mg	$3 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-3}$ mmol $\sim 1,5\mu\text{g} - 1,5$ mg	$3 \cdot 10^{-8} - 3 \cdot 10^{-5}$ mmol $\sim 15\text{ng} - 15\mu\text{g}$	$3 \cdot 0,03 - 0,3$ mmol $\sim 15 - 150$ mg
Czas pomiaru	1 h	20 min	20 min	6 h
Możliwość automatyzacji	Nie	Tak	Tak	Tak
Zalety	dokładna informacja o wiązaniu, metoda uniwersalna	mała ilość związków	mała ilość związków	wyznaczanie ΔF^0 i ΔS^0
Wady	kosztowne rozp. deuterowane, potrzebna duża ilość H i G	nie wszystkie kompleksy dają sygnał	nie wszystkie kompleksy dają sygnał	wymagane duże ΔF^0 , potrzebna duża ilość H i G

^aPrzy masie molowej H ~ 500 g/mol

2.3.2.5 Metody obliczeniowe

Obok opisanych powyżej metod wyznaczania stałych trwałości kompleksów, wiele opisanych w literaturze kompleksów analizowanych jest także teoretycznymi metodami chemii kwantowej. Obliczenia te określane metodą badania *in silico* (przez analogię do *in vivo* czy *in vitro*) prowadzone były na różnych poziomach teorii: od metod półempirycznych do rozbudowanych bazy funkcyjnych na poziomie B3LYP DFT, czy CCSD.

Jednakże wszystkie te obliczenia dotyczyły jedynie receptorów i ich kompleksów w próżni, bez uwzględnienia rozpuszczalnika. Doświadczenie z badania zjawisk chemii supramolekularnej uczy jednak, że zmiana rozpuszczalnika może zmienić stałą trwałości kompleksu nawet o kilka rzędów. Podobnie, selektywności wiązania różnych gości są silnie zależne od użytego rozpuszczalnika. Co więcej, cząsteczki H, G, a zwłaszcza kompleksy, mają znaczną swobodę konformacyjną. Znalezienie minimum energetycznego na superpowierzchni stanów konformacyjnych wymaga niebagatelnej mocy obliczeniowej i nie gwarantuje, że znalezione minimum jest minimum globalnym. Moim zdaniem, nieporównywalnie większa niedokładność obliczeń wynika z nieuwzględnienia cząsteczek rozpuszczalnika i przyjęcia niewłaściwej konformacji, niż z nieodpowiednio dobranej bazy funkcyjnej. Co więcej, poprzez arbitralny dobór konformacji można za pomocą obliczeń udowodnić każdą, nawet błędną, tezę dotyczącą trwałości kompleksów.

2.3.3 Literaturowe przykłady określania selektywności α_T za pomocą miareczkowań w rozpoznaniu chiralnym anionów

2.3.3.1 Wprowadzenie

Opisana powyżej miara rozpoznania chiralnego α_T oraz różne aspekty miareczkowania mają uniwersalny charakter - nie zależą od rodzaju cząsteczek H i G. W mojej pracy doktorskiej ograniczyłem badania tego zjawiska do rozpoznania chiralnego anionów karboksylanowych. Wiązanie anionów przez receptor realizuje się przez odpowiedni układ wiązań wodorowych w receptorach obojętnych elektrycznie, lub na zasadzie oddziaływań kulombowskich między kationowym receptorem a ujemnie naładowanym G. To ostatnie podejście polega na prostej wymianie jonowej, a tworzony kompleks jest po prostu parą jonową. Wydaje się, że wiązanie składników w ramach pary jonowej nie jest dobrze zdefiniowane, co więcej pary jonowej nie powinno się, moim zdaniem, określać mianem kompleksu supramolekularnego. Z powyższych powodów wszystkie receptory na aniony badane w naszym zespole, w szczególności receptory stanowiące przedmiot tej pracy, są elektrycznie obojętne. Również poniższy przegląd przykładów rozpoznania chiralnego anionów dotyczy głównie receptorów elektrycznie obojętnych.

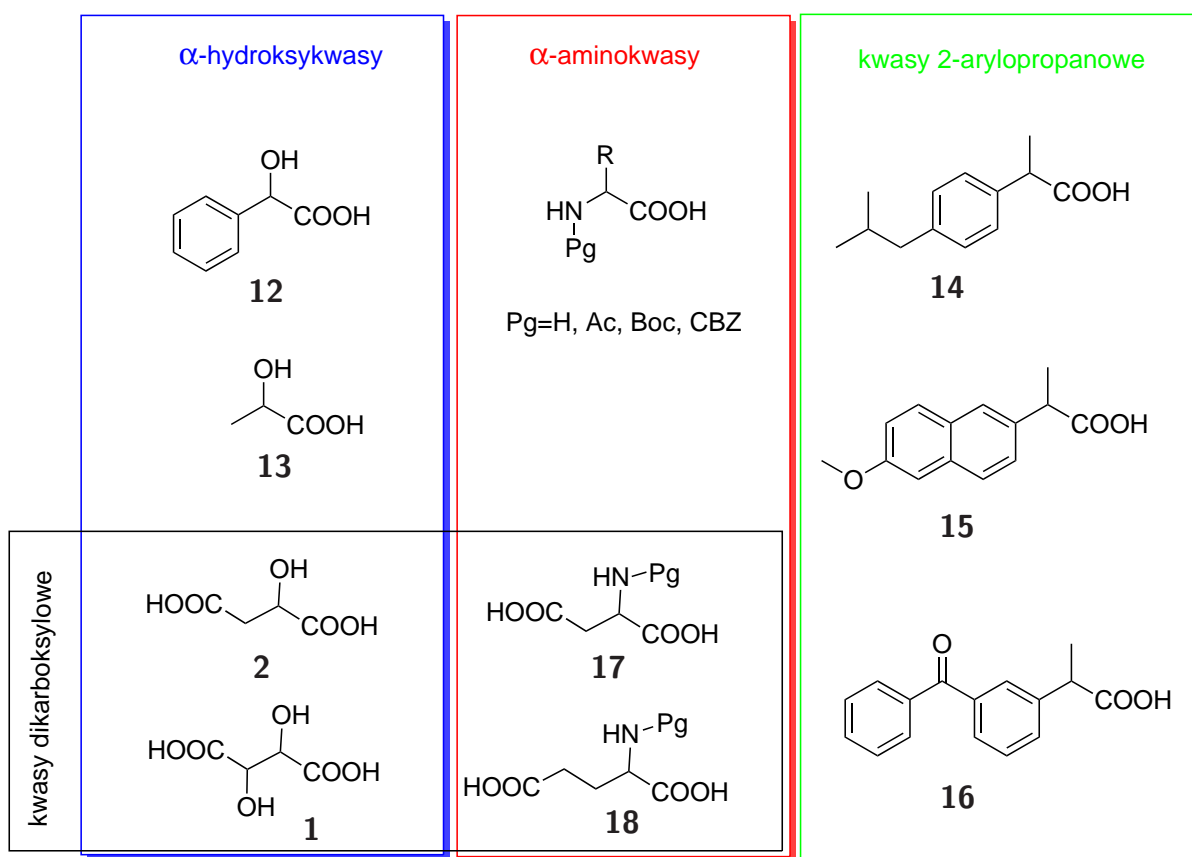
Opisane w literaturze chiralne receptory na aniony, wykazujące właściwości rozpoznania chiralnego, można podzielić ze względu na motyw strukturalny wprowadzający chiralność do

cząsteczki. Do najczęściej stosowanych źródeł chiralności należą:

- naturalne i nienaturalne aminokwasy^{29–43}
- cukry^{44–46}
- sterole^{47–50}
- wicynalne diole i diaminy^{50–58}
- hydroksylowe i aminowe pochodne binaftyli^{57,59–64}

W odróżnieniu od badań nad katalizą asymetryczną, gdzie każdy typ reakcji posiada ugruntowany w literaturze modelowy substrat, w dziedzinie rozpoznania chiralnego anionów nie ma jednoznacznie określonych standardów badanych gości. Najczęściej badane są sole kwasu migdałowego (**12**) i można je uznać za nieformalny modelowy związek. Do innych badanych α -hydroksykwasów należy kwas mlekowy (**13**), popularne są także wolne i N-zabezpieczone α -aminokwasy oraz kwasy 2-arylopropionowe, należące do niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), takie jak: ibuprofen (**14**), naproksen (**15**) i ketoprofen (**16**). Do badania receptorów zdolnych do związania dwóch grup karboksylowych używane były kwasy dikarboksylowe: jabłkowy **2**, winowy (**1**) (oraz ich O-podstwione analogi) oraz aminokwasowe: glutaminowy (**17**) i asparaginowy (**18**). Zestawienie tych typowych gości przedstawia Schemat 2.1.

Do badania rozpoznania chiralnego anionów karboksylanowych, w zdecydowanej większości przypadków, stosowane było miareczkowanie pod kontrolą różnych metod spektroskopowych. Mierzone różnice wartości stałych tworzenia kompleksów z każdym z enancjomerów, K_S i K_R , są zwykle niewielkie, dlatego miareczkowania i analiza danych muszą być przeprowadzane z nadzwyczajną starannością. W przeglądzie doniesień literaturowych nt. rozpoznania chiralnego anionów staram się podkreślić problem jakości i rzetelności przeprowadzonych pomiarów. Niestety, ciągle nie ma ustalonych standardów publikacyjnych dla prac, których elementem jest miareczkowanie. Autorzy sami decydują, jakie dane i w jakiej ilości zamieścić w publikacji lub suplementie. Często spotykałem się z brakiem jakichkolwiek wykresów, czy stabelaryzowanych danych z miareczkowań. Brak takich danych uniemożliwia recenzentowi, a później czytelnikowi, ocenę rzetelności pomiaru. Wydaje się, że umieszczanie tych danych powinno być wymagane przez redakcje, podobnie jak wymaga się załączania widm NMR nowych związków, czy chromatogramów dla produktów wzbogaconych enancjomerycznie. W części publikacji zaprezentowano jedynie kilka wykresów z przebiegami miareczkowań (nie dla wszystkich pomiarów). Jedynie w kilku przypadkach można spotkać się z dobrą praktyką umieszczania wykresów i/lub tabel dla wszystkich przeprowadzonych miareczkowań. W przypadku braku tych danych zmuszony jestem przyjąć prezentowane stałe trwałości, a co za tym



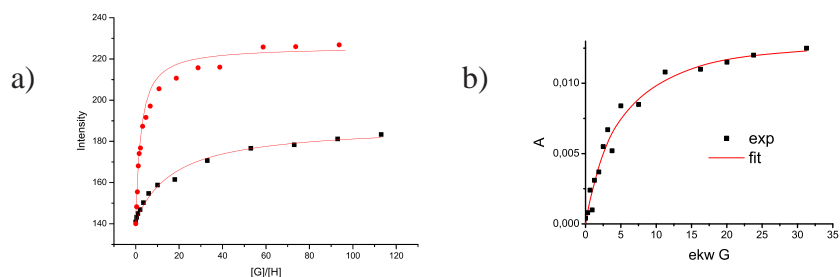
Schemat 2.1: Zestawienie typowych kwasów, których sole są używane w badaniach nad rozpoznaniem chiralnym

idzie enancjoselektywności, z ograniczonym zaufaniem. Poniższy przegląd ma bardzo krytyczny charakter, jednak skala nierzetelności pomiarów publikowanych także w renomowanych czasopismach wymaga takiego właśnie podejścia. Analizując kolejne błędy popełniane przez autorów, uzasadnię, dlaczego większość doniesień literaturowych traktuję jako niepewne, jednakże postaram się pokazać również przykłady rzetelnych prac, z dobrym warsztatem badawczym.

Jakkolwiek dziedzina rozpoznania chiralnego anionów ma już ok 30 lat, doczekała się jedynie jednego artykułu przeglądowego⁶⁵. Mimo że ta gałąź chemii supramolekularnej rozwija się coraz dynamiczniej, od siedmiu lat nie opublikowano żadnego nowego przeglądu. Większość prac cytowanych w przeglądzie Stibora nie załącza danych dot. miareczkowań, dlatego rzetelności opisanych tam pomiarów nie jestem w stanie ocenić. Z tego powodu omówię głównie późniejsze publikacje, które prezentują przynajmniej jeden wykres krzywej miareczkowania. Analizę doniesień literaturowych podzieliłem ze względu na rodzaj znalezionej błędności metodologicznej.

2.3.3.2 Jakość danych i liczba punktów

Jak pokazałem na przykładzie modelowego miareczkowania (patrz Wykres 2.7, str. 31) wyznaczona wartość K zależy bardzo silnie od kształtu krzywej, dlatego potrzebne jest precyzyjne i dosyć gęste próbkowanie przebiegu krzywej. Przykłady literaturowych miareczkowań przedstawione na Rysunku 2.7 pokazują, że warunek ten nie zawsze jest spełniony w praktyce.



Rysunek 2.7: Przykłady miareczkowań o słabej jakości danych a) Cyt. 41, b) Cyt. 51, Wykreślono na podstawie danych z *Supporting Information*

Punkty z miareczkowania (Rys. 2.7a)) cechuje ogromny błąd przypadkowy (możliwe, że również systematyczny) oraz mała liczba punktów doświadczalnych. Autorzy (Huang i wsp.) określili niepewność pomiaru na poziomie 5-8%, co stanowi grube niedoszacowanie błędu. Jak wynika z przytoczonych przeze mnie przykładów, miareczkowanie tej jakości pozwala jedynie oszacować z grubsza rząd wielkości stałej K . Jakikolwiek analizy stosunków dwóch stałych nie mają żadnego sensu. Wyniki miareczkowań o podobnym poziomie błędów przypadkowych opublikowali Pappalardo i wsp.⁶⁶ (Rys. 2.7b)); program HYPERQUAD, którego użyli do wyznaczenia stałych, lepiej oszacował błędy pomiaru (na $\pm 75\%$), jednak autorzy błędnie zinterpretowali wynik podany przez program. Badacze nie tylko nie oszacowali niepewności w stężeniach, które zwiększają niepewność samego dopasowania, ale błąd względny (podany przez program *relative std. dev.*) potraktowano jako bezwzględny, co doprowadziło do rażącego niedoszacowania niepewności pomiaru. Przykładowe błędy popełnione przez autorów i rzeczywistą niepewność pomiarów przedstawia Tabela 2.8. Niepewność wyznaczonych stosunków stałych wynosi ok. 70%, co oznacza, że wyniki są zupełnie bezwartościowe.

2.3.3.3 Metody regresji liniowej

W XXI wieku, przy powszechnej dostępności do komputerów i specjalistycznego oprogramowania do obróbki danych, jak również gotowych, darmowych i komercyjnych programów do analizy miareczkowań, ukazało się kilka publikacji, w których wykorzystano metody regresji liniowej. Sprowadzenie krzywej miareczkowania do problemu liniowego wymaga *zawsze* pewnych założeń i przybliżeń. Przybliżenia te z kolei *zawsze* są źródłem błędu. Przy dzisiejszej dostępności nieliniowych algorytmów, linearyzacja problemu miareczkowania nie ma żadnego uzasadnienia¹⁹. Moje doświadczenia z zastosowaniem liniowej metody Benesi-Hilderbanda

Tabela 2.8: Niepewności miareczkowań autorstwa Pappalardo i wsp.⁶⁶

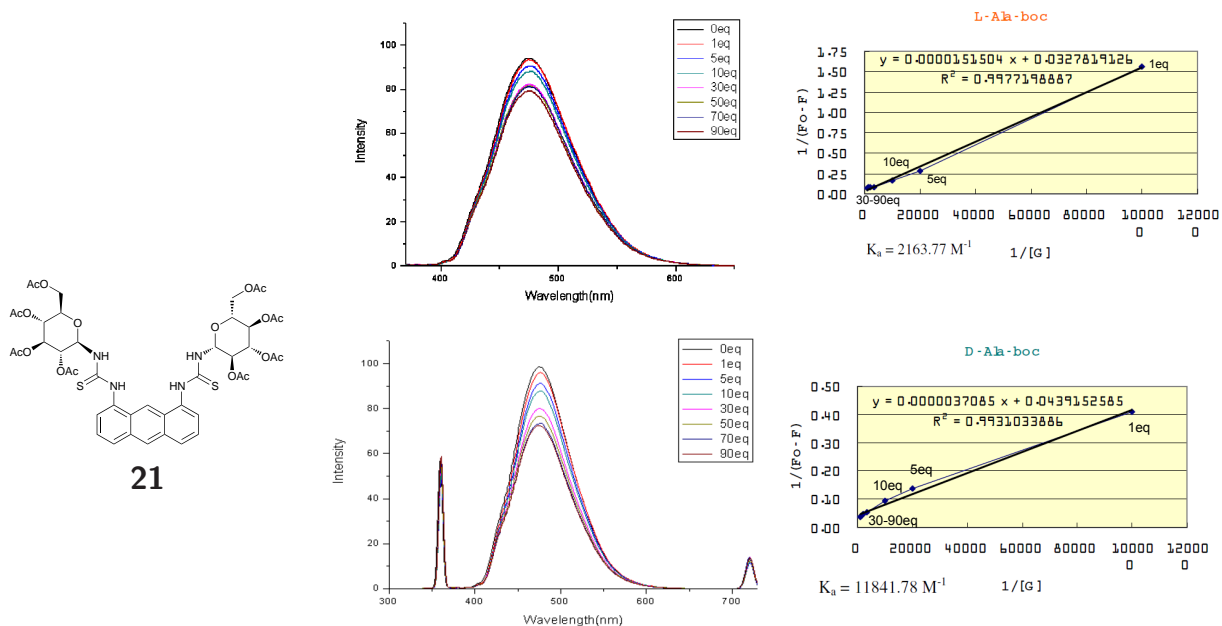
H	G	K_a [M ⁻¹] i Δ wg autorów	Rzeczywiste wartości K_a [M ⁻¹] i Δ	stosunek K_S/K_R or K_D/K_L
19a	(R)-20	$3.49 \pm 0.68 \cdot 10^3$	$3.49 \pm 2.37 \cdot 10^3$	$5.5 \pm 70\%$
19a	(S)-20	$1.94 \pm 0.16 \cdot 10^4$	$1.94 \pm 0.31 \cdot 10^4$	
19a	D-Trp-TBA	$1.27 \pm 0.54 \cdot 10^4$	$1.27 \pm 0.69 \cdot 10^4$	$3.2 \pm 61\%$
19a	L-Trp-TBA	$3.94 \pm 0.28 \cdot 10^3$	$3.94 \pm 1.10 \cdot 10^3$	
19b	D-Ala-TBA	$2.46 \pm 0.20 \cdot 10^3$	$2.46 \pm 0.49 \cdot 10^3$	$0.27 \pm 78\%$
19b	L-Ala-TBA	$9.03 \pm 0.75 \cdot 10^3$	$9.03 \pm 6.77 \cdot 10^3$	

wskazują, że nawet przy prawidłowym zastosowaniu metody (tzn. spełnienie założeń i zasadność przybliżeń) różnice między tą metodą a dopasowaniem nieliniowym są rzędu 5-10%.

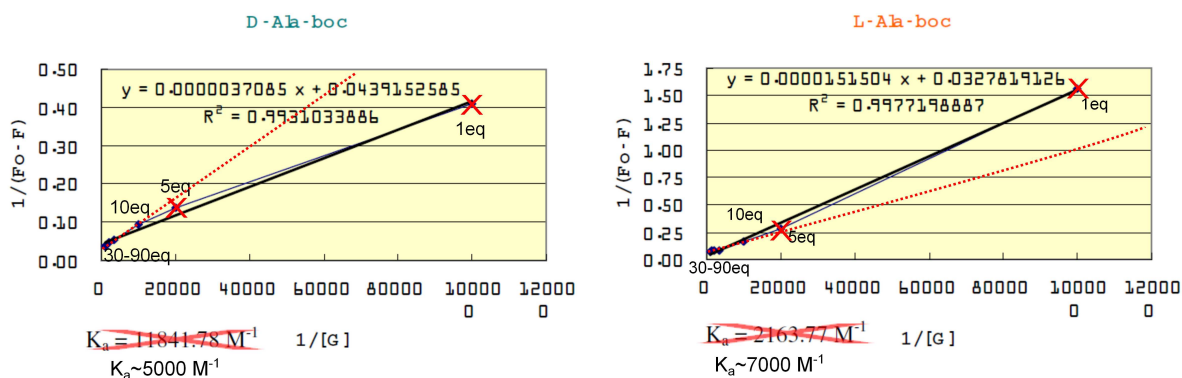
W kilku znalezionych przeze mnie publikacjach metoda Benesi-Hildebranda została użyta prawidłowo, jednak samo jej użycie jest nieuzasadnione, gdyż prowadzi do możliwego do uniknięcia błędu. Publikacja zespołu Kima⁴⁶, dotycząca rozpoznania chiralnego soli N-zabezpieczonych aminokwasów, wymaga uważniejszego spojrzenia. Autorzy miareczkowali receptory oparte na antracenie z przyłączonymi fragmentami cukrowymi poprzez grupy tiomocznikowe (**21**). Miareczkowania prowadzone były w acetonitrylu pod kontrolą fluorymetrii. Analizę danych przeprowadzono metodą Benesi-Hildebranda, przy czym wymagane przybliżenia i warunki zostały spełnione dla wszystkich punktów miareczkowania. Autorzy publikacji zbierali jednak tylko po osiem punktów doświadczalnych na jedno miareczkowanie, a taka liczba punktów bardzo utrudnia wiarygodną analizę numeryczną. Uważne spojrzenie na przebiegi miareczkowań zamieszczone przez autorów w *Supporting Information* prowadzi do bardzo niepokojących wniosków.

Równanie dopasowanej prostej ($y = a \cdot x + b$) determinuje stałą trwałości kompleksu ($K = b/a$). Wyznaczona wartość stałej silnie zależy od nachylenia prostej i jej przecięcia z osią Y . W miareczkowaniach autorów tej pracy dystrybucja punktów na wykresie powoduje, że położenie punktu przy 1 ekw. całkowicie determinuje wyznaczoną stałą trwałości (Rys. 2.8). Dla takiego rozkładu punktów doświadczalnych dopasowywanie regresji liniowej sprowadza się do połączenia punktu 1 ekw. z grupą punktów 30-90 ekw. Zarówno położenie punktu 5 ekw., jak również trend grupy 10-90 ekw. nie ma żadnego znaczenia w takim dopasowaniu. Odrzucenie punktów przy 1 i 5 ekw., ze względu na zbyt duży wpływ ich błędów na wyznaczoną stałą, prowadzi do zupełnie innych wartości K (Rys. 2.9). Alternatywne (bardziej adekwatne) dopasowania istotnie zmniejszają postulowane przez autorów enancjoselektywności (α_T), a nawet sugerują przeciwny kierunek selektywności.

Jak wynika z Rys. 2.8 podniesienie lub obniżenie punktu 1 ekw. powoduje odpowiednio za-



Rysunek 2.8: Wykresy miareczkowań z publikacji Kima



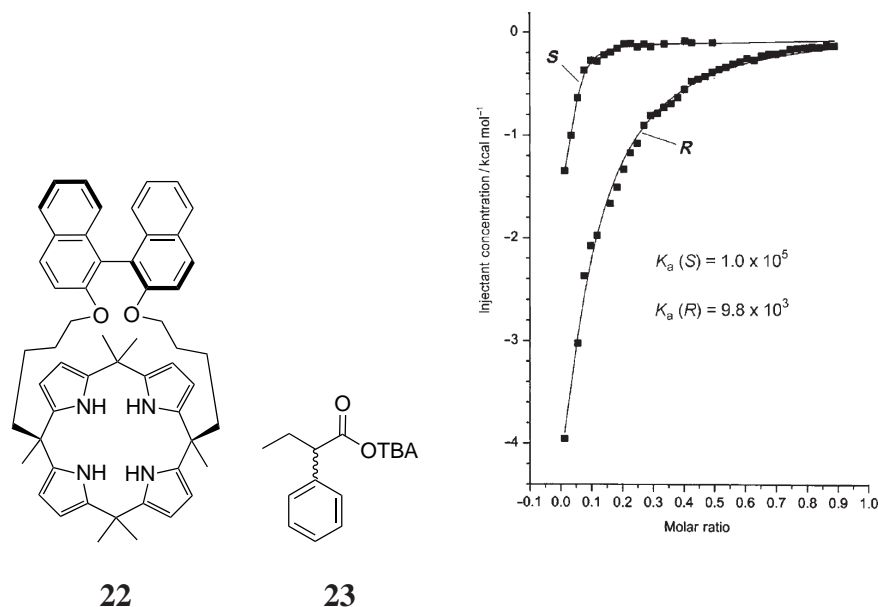
Rysunek 2.9: Alternatywna analiza danych miareczkowań pomijające niepewne dane dla punktów przy 1 i 5 ekw.

niżenie lub zawyżenie wyznaczonej K . W pomiarach Kima i wsp. dla wszystkich miareczkowań z udziałem aminokwasów szeregu D, punkt 1 ekw. leżał poniżej trendu pozostałych punktów, zaś dla szeregu L leżał powyżej. Jest bardzo mało prawdopodobne, aby taka regularność, przejawiająca się łącznie w 12 parach miareczkowań, była następstwem błędów przypadkowych. Regularność ta wskazuje raczej na zonglowanie wynikami, w celu otrzymania spójnych i doniosłych wyników. Przedstawione przez autorów wartości stałych oraz selektywności wydają się dalekie od obiektywizmu.

2.3.3.4 Komputerowa analiza danych

Pomimo starannego przeprowadzenia pomiarów, przy zachowaniu wszystkich wymaganych warunków, błędne wyniki można uzyskać na skutek nieumiejętnego posługiwania się progra-

mem komputerowym. Receptor **22** poddano kalorymetrycznemu miareczkowaniu enancjomerami soli TBA kwasu 2-fenyllobutanowego (**23**) w acetonitrylu⁶⁰. Na wykresach miareczkowania, przedstawionych na Rysunku 2.10, zwraca uwagę fakt, że obie krzywe osiągają plateau zanim zostanie dodany 1 ekw. G. Co więcej, każdy z enancjomerów G powoduje wysycenie receptora przy innych proporcjach H:G. Autorzy jednak mając do dyspozycji przytoczone dane, postulują model wiązania 1 : 1.



Rysunek 2.10: Struktura receptora **22** i wykresy jego miareczkowania enancjomerami **23**

Wyjaśnienie tego niespodziewanego zachowania jest stosunkowo proste, otóż programy używane do analizy danych z miareczkowania kalorymetrycznego uwzględniają dodatkowy czynnik r , który wprowadza poprawkę na rzeczywiste stężenie H w roztworze.

$$[H]_0 = r \cdot [H]_0^{\text{teor}} \quad (2.31)$$

Parametr ten jest niezbędny w badaniach biologicznych wiązania G przez białka, gdyż rzeczywiste stężenie białka jest zawsze nieznanne. Parametr r jest udokładniany w procesie dopasowywania krzywej teoretycznej. Wydaje się, że autorzy błędnie wprowadzili do programu stężenia któregoś z reagentów i program odpowiednio do tego dopasował wartość r . Jednakże dla każdego z dwu miareczkowań dopasowana została inna wartość r , co spowodowało uzyskanie dwóch tak znacznie różniących się stałych trwałości K . Otrzymany przez autorów stosunek $K_S/K_R \approx 10$ jest najprawdopodobniej artefaktem powstałym w wyniku błędu w obsłudze programu. Na podstawie zamieszczonych w publikacji wykresów nie można określić rzeczywistych stałych i ich stosunków, jednak wydaje się, że enancjoselektywność jest zdecydowanie mniejsza od deklarowanej.

Pragnę jeszcze zwrócić uwagę na fakt, że w celu racjonalizacji doniosłych wyników enancjoselektywności postulowanych w powyższej publikacji, jak również w pracy Kima, autorzy przeprowadzili złożone obliczenia kwantowomechaniczne. Wyniki tych obliczeń – modele stereochemiczne wiązania enancjomerów – potwierdzały postulowaną przez autorów enancjoselektywność, mimo że została ona określona nierzetelnie. Pokazuje to dobitnie jak można manipulować odpowiednim doбором konformacji H, G i ich wzajemnym położeniem, jak również bazą funkcyjną, aby uzyskać pożądany wynik obliczeń potwierdzający założoną tezę.

2.3.3.5 Stechiometria tworzonych kompleksów

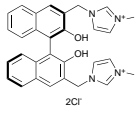
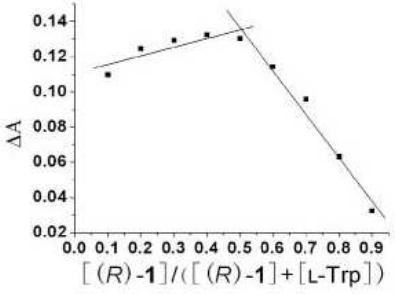
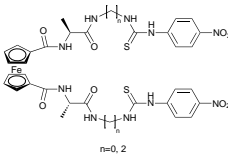
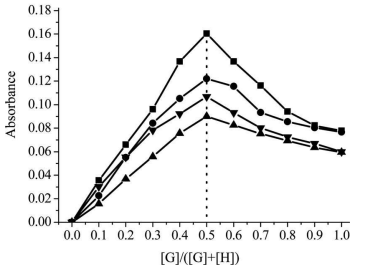
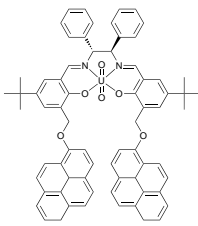
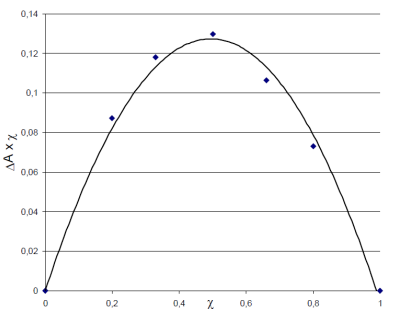
Jak pokazałem w Tabeli 2.2, obecność kompleksów o wyższej stechiometrii ma ogromny wpływ na wyznaczoną stałą kompleksowania, jeżeli te złożone kompleksy nie zostaną uwzględnione w analizie danych. Dlatego przed przeprowadzeniem jakiegokolwiek miareczkowania powinna zostać możliwie wiarygodnie określona stechiometria kompleksów. Przegląd literatury pokazuje jednak, że problem ten jest powszechnie spłypany. Wielu pracom nie towarzyszy żadna z akceptowalnych metod określania stechiometrii, natomiast w pozostałych posługiwano się jedynie wykresami Joba, które cechuje ograniczona czułość.

W publikacjach nt. rozpoznania chiralnego anionów znalazłem zaledwie kilka wykresów Joba, z których trzy chcę tutaj przytoczyć (Tabela 2.9). W tych trzech przykładach autorzy wydedukowali na podstawie wykresu, że w roztworze powstają jedynie kompleksy 1 : 1.

Wykres z poz. 1. jednoznacznie wskazuje na powstawanie kompleksów HG_2 (maksimum przesunięte do $x = 0,40$). Graficzna interpretacja tego wykresu jest niewłaściwa, gdyż tylko położenie maksimum funkcji wskazuje na stechiometrię kompleksów. Posiłkowanie się stycznymi i interpretacja ich przecięcia jest bezcelowa i, jak widać, prowadzi do błędów. Wykres z poz. 2. oparty jest na danych z nieprawidłowo przeprowadzonego eksperymentu, lub jest następstwem błędnej "obróbki" danych, gdyż wartości wykresu Joba dla $x = 0$ i $x = 1$ zawsze wynoszą 0. Ostatni z przytoczonych wykresów zawiera zaledwie pięć punktów (punkty dla $x = 0$ i $x = 1$ są nieinformatywne), co bardzo utrudnia analizę przebiegu krzywej. Jednak przedstawione dane jednoznacznie wskazują na asymetrię wykresu: lokują maksimum w okolicach $x = 0,4$, tym samym sugerują obecność kompleksów HG_2 .

W wielu publikacjach spotkałem się ze stwierdzeniem, że dobre dopasowanie krzywej teoretycznej do punktów doświadczalnych (mierzone np. jako $R^2 > 0,99$) dowodzi słuszności modelu. Stwierdzenie takie jest jedynie częściowo słuszne. Po pierwsze, nie można ustalić, jaka wartość R^2 świadczy jeszcze o zgodności modelu, a jaka sugeruje już nieprawidłowość. Po drugie, wysoka wartość R^2 dla danego modelu wcale nie musi oznaczać, że nie można uzyskać jeszcze lepszego dopasowania w innym modelu. Skutecznym narzędziem oceny poprawności modelu jest analiza rozkładu resztek, opisana w poprzednim rozdziale. Jak pokażę w następnym akapicie, w pracach, w których dobre R^2 sugerowało prosty model 1 : 1, systematyczny rozkład

Tabela 2.9: Przykłady błędów w wykresach Joba

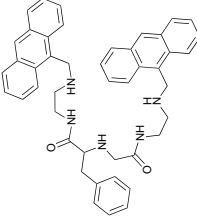
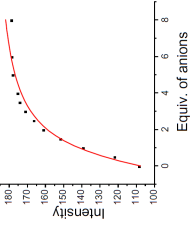
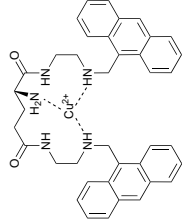
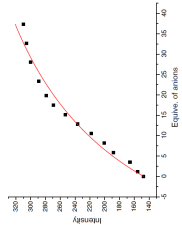
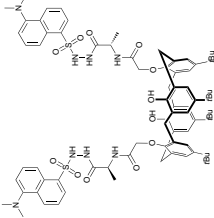
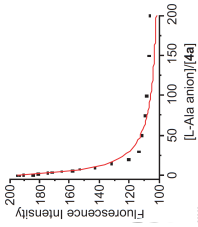
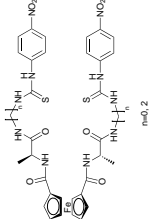
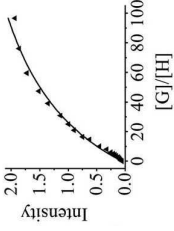
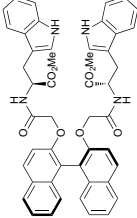
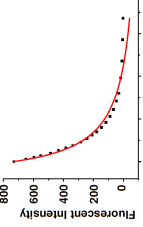
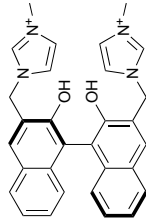
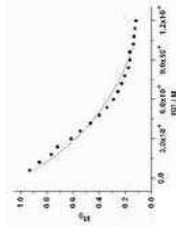
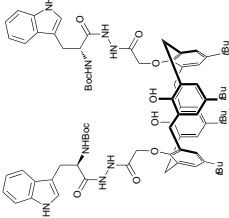
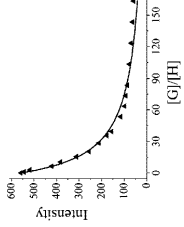
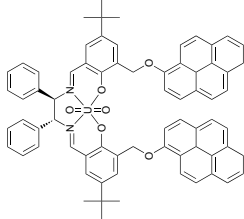
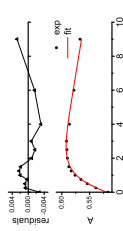
lp	H	G	Wykres Joba	Cyt.
1		tryptofan		63
24		Ac-Asp-OTBA		43
25		H-Phe-OTBA		52
26				

błędów wskazuje jednak na złożony model kompleksowania.

Na podstawie publikowanych wykresów krzywych miareczkowania i dopasowanych krzywych teoretycznych można określić rzetelność pomiaru nie tylko w kategorii odpowiedniej jakości danych i właściwych stężeń. Analiza rozkładu resztek umożliwia często określenie prawidłowości zastosowanego modelu – Tabela 2.10

We wszystkich przytoczonych w Tabeli przypadkach rozkład resztek ma charakter systematyczny i stwierdzenie tego faktu nie wymaga żadnych analiz numerycznych, niedopasowanie jest widoczne gołym okiem. Autorzy powyższych wykresów dopasowywali dane doświadczalne modelem wiązania 1 : 1, jednak sinusoidalny rozkład błędów sugeruje powstawanie kompleksów o wyższej stechiometrii. Warto zauważyć, że receptory **28** i **31** (poz. 5 i 7) są dwudodatnimi kationami więc wiązanie dwóch jednujemnych anionów jest dla nich naturalne. Receptory **27**, **29**, **30**, **32**, **25** (poz. 1-4, 6) zbudowane są z dwóch ramion wyposażonych w donory

Tabela 2.10: Przykłady regularnych rozkładów błędów w opublikowanych miareczkowaniach

Ip	H	G	Wykres miareczkowania	Cyt.	Ip	H	G	Wykres miareczkowania	Cyt.
1		(S)-migdalalan		?	5		(S)-migdalalan		67
2		L-Ala		?	6		N-Ac-L-Asp		43
3		D-dibenzoilowinian		59	7a		L-Leu		61
4		(R)-migdalalan		38	8b		L-Phe		52

^a Wykres przedrukowany z *Supporting Information*, ^b Wykres przygotowany na podstawie tabelarycznych danych z *Supporting Information*

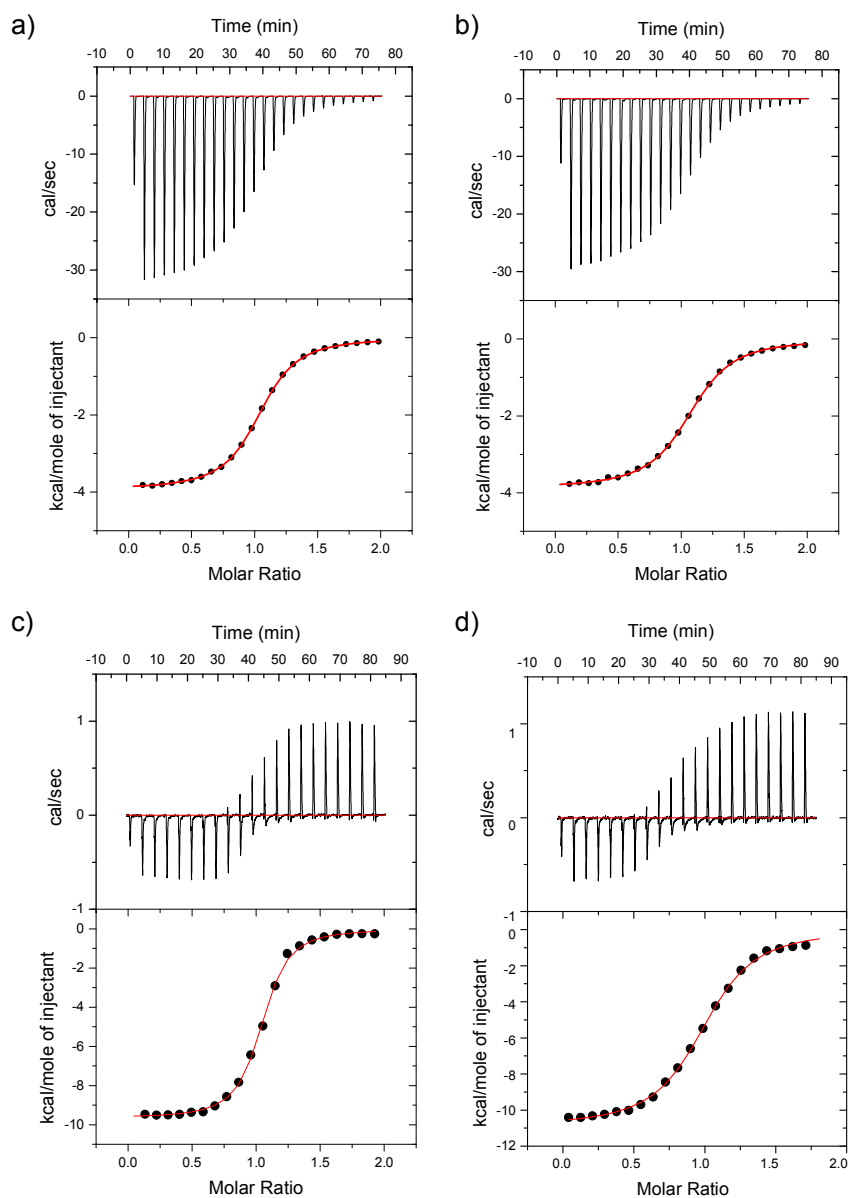
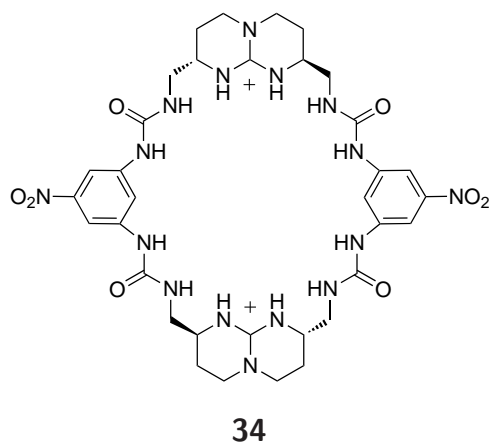
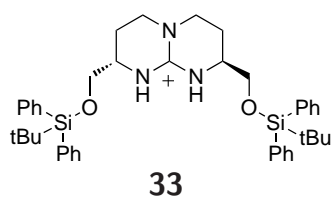
wiązań wodorowych, które mogą wiązać po jednym anionie niezależnie od siebie. Ostatecznie wykresy Joba dla receptorów **25** i **26** (poz. 6 i 8) również sugerują obecność kompleksów HG₂. Przy nieprawidłowo dobranym modelu kompleksowania wyznaczone przez autorów stałe trwałości i ich stosunki – enancjoselektywności są błędne. Zaskakujący jest fakt, że ani autorzy, ani recenzenci nie zwrócili uwagi na rażące (bo widoczne gołym okiem) niedopasowanie krzywych teoretycznych. Opublikowane wartości numeryczne i wysokie w kilku przypadkach enancjoselektywności są w rzeczywistości bezwartościowe.

2.3.3.6 Niepewność pomiaru w doniesieniach literaturowych

W większości publikacji dotyczących rozpoznania chiralnego anionów, autorzy uwzględniają niepewność wyznaczenia stałych tworzenia kompleksów. Część prac uwzględnia ogólną niepewność oszacowaną dla wszystkich pomiarów na poziomie 10-15%, inne podają niepewność każdego wyniku K , określoną przez program dopasowujący krzywą miareczkowania. W tym drugim podejściu wydaje się, że autorzy nie uwzględniają dodatkowych czynników (niepewność stężeń, objętości titranta, itp.), zatem te wartości niepewności są zaniżone. W żadnej ze znanych mi publikacji niepewność wyznaczenia stałych trwałości kompleksów nie została uwzględniona w określaniu niepewności innych wielkości będących pochodnymi stałych K . W szczególności ostatni zarzut dotyczy podawania stosunku K_S/K_R bez przedziału ufności. Uważam to za duży błąd, gdyż wynik pomiaru ma pełną wartość dopiero wtedy, gdy wartości liczbowej towarzyszy niepewność jej określenia.

2.3.3.7 Wiarygodne pomiary

Do oceny wiarygodności podanych w publikacji stałych trwałości kompleksów, niezbędna jest analiza danych uzyskanych przez autorów podczas miareczkowania. Najdogodniejszą dla czytelnika formą prezentacji wyników jest wykres przedstawiający punkty miareczkowania z dopasowaną krzywą. W przypadku braku takich danych ocena rzetelności nie jest możliwa. Przedstawione powyżej liczne błędy w procedurach analitycznych, każą mi podchodzić z dużą rezerwą do opublikowanych wyników, które nie zostały udokumentowane odpowiednim wykresem. W dziedzinie rozpoznania chiralnego anionów znalazłem *tylko jedną* serię publikacji^{68,69}, które prezentują wykresy wszystkich miareczkowań i wszystkie pomiary wydają się przeprowadzone prawidłowo. Grupa Schmidchena opisuje w tych pracach wiązanie karboksylanów przez kationowy receptor **33** i dikarboksylanów przez makrocykliczny receptor **34**. Procesy kompleksowania autorzy badali za pomocą miareczkowania kalometrycznego. Rys. 2.11 przedstawia wykresy miareczkowań załączone przez autorów w *Supporting Information*. Jakość zebranych danych oraz ich dopasowanie nie budzi żadnych zastrzeżeń.



Rysunek 2.11: Wyniki miareczkowania kalymetrycznego receptora **33** a) (*S*)-migdalanem i b) (*R*)-migdalanem oraz receptora **34** c) L-winianem i d) D-winianem tetraetyloamoniowym.

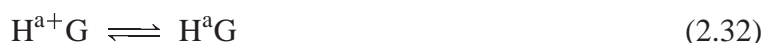
2.3.4 Metody bezpośredniego określania rozpoznania chiralnego

2.3.4.1 Wprowadzenie

Opisane powyżej metody wyznaczania α_T wymagają przeprowadzenia dwóch bardzo precyzyjnych pomiarów K_S i K_R . Do badania rozpoznania chiralnego dużo bardziej dogodne byłyby metody wyznaczające ten stosunek wprost. α_T można wyznaczyć bezpośrednio jedynie w takim eksperymencie, w którym *jednocześnie* uczestniczą oba enancjomery G lub H. W mieszaninie takiej trzeba określić w stanie równowagi stosunek stężeń wolnych składników: $[G_S]/[G_R]$ lub $[H_S]/[H_R]$ lub stosunek stężenia kompleksów: $[H^*G_S]/[H^*G_R]$. Grupę takich metod określam jako konkurencyjne, gdyż podczas eksperymentu enancjomery jednego z reagentów rywalizują o możliwość związania drugiego reagenta. Przeprowadzenie pomiaru któregoś z powyższych stosunków bez naruszania stanu równowagi nie jest łatwym zadaniem analitycznym. Jak do tej pory, opisano jednak kilka przypadków udanych prób zastosowania takich metod.

2.3.4.2 Spektrometria NMR

Prosta metoda określania stosunku stałych tworzenia kompleksów o stechiometrii 1 : 1 dla dwóch różnych receptorów i jednego gościa została opisana przez Whitlocka⁷⁰. Aby możliwe było zastosowanie tej metody niezbędne jest aby istniały dające się niezależnie śledzić sygnały NMR każdego z receptorów, które ulegają przesunięciu na skutek kompleksowania. Receptory konkurują o cząsteczkę G w myśl równań:



$$K_a = \frac{[H^aG]}{[H^a] \cdot [G]} \quad (2.34)$$

$$K_b = \frac{[H^bG]}{[H^b] \cdot [G]} \quad (2.35)$$

Podzielenie stronami równań (2.34) i (2.35) da wyrażenie na stosunek stałych:

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{\frac{[H^aG]}{[H^a]}}{\frac{[H^bG]}{[H^b]}} \quad (2.36)$$

co wyrażone ułamkami molowymi^v (przy uwzględnieniu, że $x(H) = 1 - x(HG)$) wygląda

^vułamek molowy nie odnosi się w tym wypadku do całej mieszaniny, ale jest określony jako: $x(HG) = \frac{[HG]}{[H]_0}$

następująco:

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{x(\text{H}^a\text{G})}{1-x(\text{H}^a\text{G})} \quad (2.37)$$

W warunkach szybkiej wymiany w NMR ułamek molowy formy skompleksowanej można wyrazić równaniem:

$$x_{\text{HG}} = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{H}}}{\delta_{\text{HG}} - \delta_{\text{H}}} = \frac{\Delta\delta_{\text{obs}}}{\Delta\delta_{\text{max}}} \quad (2.38)$$

Po podstawieniu do Rów. (2.37) i uporządkowaniu daje Rów. (2.40):

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{\frac{\Delta\delta_{\text{obs}}^a/\Delta\delta_{\text{max}}^a}{1-\Delta\delta_{\text{obs}}^a/\Delta\delta_{\text{max}}^a}}{\frac{\Delta\delta_{\text{obs}}^b/\Delta\delta_{\text{max}}^b}{1-\Delta\delta_{\text{obs}}^b/\Delta\delta_{\text{max}}^b}} \quad (2.39)$$

$$\frac{K_a}{K_b} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}^b/\Delta\delta_{\text{obs}}^b - 1}{\Delta\delta_{\text{max}}^a/\Delta\delta_{\text{obs}}^a - 1} \quad (2.40)$$

W szczególnym przypadku, jeżeli H_a i H_b są enancjomerami, to stosunek K_a/K_b jest po prostu selektywnością α_T . Metoda ta ma pewne ograniczenia. W składniku użytym jako mieszanina enancjomerów musi istnieć taki atom, że każdy z enancjomerów doznaje oddmiennej zmiany przesunięcia chemicznego ($\Delta\delta$) pod wpływem homochiralnego gościa. Istotne jest także, że oba enancjomery muszą doświadczać zmiany przesunięcia chemicznego (sytuacja, w której $\Delta\delta_{\text{max}} = 0$ uniemożliwia wyznaczenie α_T). Najważniejsze zalety tej metody wynikają z faktu, że α_T można uzyskać w wyniku jednego eksperymentu, a nie porównania dwóch pomiarów. Co więcej, jak wynika z Rów. (2.40), do wyznaczenia selektywności nie jest potrzebna znajomość stężenia żadnego z reagentów. Nawet składnik użyty jako mieszanina enancjomerów może być użyty w dowolnych i nieokreślonych proporcjach (niekoniecznie racemat 1 : 1).

Pewne trudności w zastosowaniu tej metody, jak również oszacowanie niepewności pomiaru, omówię w rozdziale 3.5.1.1 (str. 107) na podstawie własnych doświadczeń w jej stosowaniu.

Pierwszy literaturowy przykład zastosowania tej metody stawia ją w bardzo niekorzystnym świetle⁷⁰. W pracy tej określano stosunek stałej trwałości dla makrocyclicznych receptorów (35-38) nie będących enancjomerami. Autorzy wyznaczyli stałą trwałości jednego kompleksu a następnie stosunki stałych dla innych receptorów za pomocą powyższej metody konkurencyjnej. Wyniki metody konkurencyjnej porównali ostatecznie z wynikami uzyskanymi przez zwykłe miareczkowanie. Zestawienie tych wyników przedstawia Tabela 2.11.

Rozbieżności w wynikach uzyskanych przez autorów za pomocą obu metod są ogromne.

Tabela 2.11: Zestawienie wyników uzyskanych metodą konkurencyjną (K^{rel}) z wynikami bezpośrednich miareczkowań (K^{titr}). Cząsteczką gościa był *p*-nitrofenol.

lp	Cząsteczka H	K^{titr}	K^{rel}
1	35	6000	- ^a
2	36	14000	22800
3	37	24000	96000
4	38	9800	15600

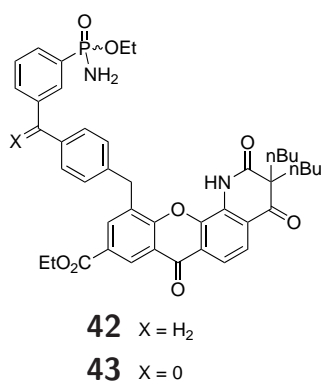
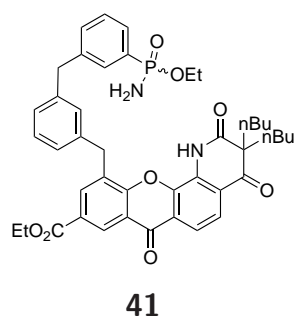
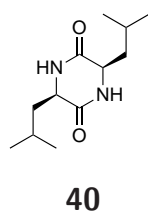
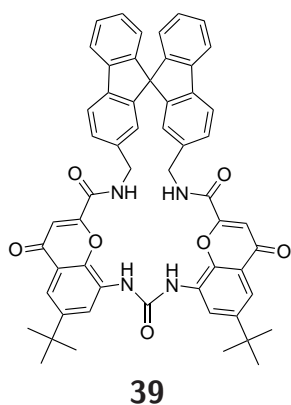
^a receptor i pomiar odniesienia dla pozostałych wartości

Trzeba jednak zaznaczyć, że miareczkowania były prowadzone przy stężeniach NMR (0,01 M) zatem iloczyn $K \cdot [H]_0 > 100$, wartości K uzyskane metodą klasyczną są bardzo wątpliwe.

W kontekście rozpoznania chiralnego anionów metoda konkurencyjna została zastosowana przez grupę Morána⁷¹. Badali oni właściwości receptora **39**, w którym chiralność osiową wprowadzili poprzez jednostkę spirobifluorenu. Jako anionowych gości użyli soli TBA kwasów: migdałowego, N-CBZ-leucyny i naproksenu. Stosunek stałych K_S/K_R wyznaczyli w eksperymencie NMR za pomocą powyższej metody kompetytywnej, przy użyciu racemicznej mieszaniny receptora i homochiralnej soli TBA. Wg autorów, sygnały pochodzące od enancjomerów receptora ulegały rozszczepieniu pod wpływem każdego z homochiralnych anionów. Dla naproksenu i CBZ-leucyny stwierdzono ($\alpha = 1$), dla migdałanu zaś selektywność wynosiła 14. Klasyczna analiza selektywności na podstawie dwóch miareczkowań przy użyciu enancjometrycznie czystych reagentów dała podobną wartość selektywności ($\alpha = 16$), jednakże w tym wypadku stałe trwałości wydają się zbyt wysokie aby ich wyznaczenie mogło być wiarygodne ($K_1 = 2,8 \cdot 10^4$, $K_2 = 1,7 \cdot 10^3$). Brak załączonych widm i wykresów nie pozwala ocenić rzetelności pomiaru. Zastanawiający jest fakt uzyskania tak znakomitej selektywności dla jednego anionu (migdałanu) przy jednoczesnym braku jakiegokolwiek selektywności dla pozostałych. Zaproponowany przez autorów model stereochemiczny tłumaczący obserwowane przesunięcia sygnałów w NMR ($\Delta\delta$) nie wyjaśnia różnic w enancjoselektywnościach migdałanu i naproksenu.

Ten sam zespół opublikował, niemal równocześnie, bardzo podobną pracę dotyczącą rozpoznania chiralnego diketopiperazyny (**40**) przez receptory zbudowane na rdzeniu ksantenu (**41-43**)⁷². Receptor ten posiada centrum stereogeniczne na atomie fosforu. Zastosowanie metody konkurencyjnej Whitlocka dało stosunek stałych równy 6,3, zaś porównanie dwóch bezpośrednich miareczkowań wartość 6,0 ($K_1 = 3600$; $K_2 = 600$). Dwa inne receptory dały metodą Whitlocka $\alpha = 2,2$ i $\alpha = 2,7$, co wg autorów jest selektywnością wysoce niezadowolającą i dla tych receptorów nie przeprowadzono miareczkowań klasycznych. W pracy tej wgląd w krzywe miareczkowań również nie jest dostępny.

Metoda konkurencyjna była stosowana w kilku innych pracach zespołu Morána dotyczą-

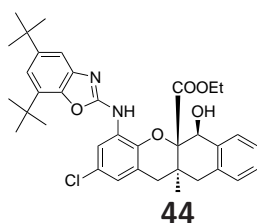


cych rozpoznania chiralnego kwasów karboksylowych. Pewne wątpliwości może budzić stosowanie jej w przypadku, gdy autorzy wykazali silną dimeryzację cząsteczek receptora⁷³, lub dla receptorów zdolnych do tworzenia kompleksów o wyższej stechiometrii⁷⁴.

Dobłą zgodność miareczkowań konkurencyjnych i klasycznych przedstawił Morán⁷⁵ dla receptora opartego na benzoksantenie (**44**), wiążącego w chloroformie kwasy karboksylowe (Tabela 2.12)

Tabela 2.12: Porównanie selektywności uzyskanych za pomocą klasycznego miareczkowania z wynikami miareczkowań konkurencyjnych (α_{MK})

Kwas	$K_{(+)\text{H}}$	$K_{(-)\text{H}}$	$\alpha = K_{(+)\text{H}}/K_{(-)\text{H}}$	α_{MK}
Etoksykarbonylo-L-leucyna	$1,0 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	7,4	7,4
Etoksykarbonylo-L-Prolina	$1,1 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	13,6	14
Etoksykarbonylo-L-Alanina	$2,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	8,3	8,5
Cbz-L-Leucyna	$2,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	7,5	7,7
Boc-L-Leucyna	$7,2 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$	2,6	2,7



2.3.4.3 Spektrometria mas

Spektrometria mas (MS) umożliwia jednoczesną analizę wielu składników badanej próbki, pod warunkiem, że składniki te dają się zjonizować. Wynikiem eksperymentu jest funkcja intensywności sygnału od stosunku m/z (masa/ladunek). Przy użyciu „miękkich technik jonizacji”, takich jak *elektrosprej* (ESI), *fast atom bombardment* (FAB), czy *matrix assisted laser desorption and ionisation* (MALDI), źródło jonów nie powoduje rozpadu kompleksów supramolekularnych i możliwa jest obserwacja jonów pochodzących od tych supermolekuł. Jak zwraca uwagę Schalley⁷⁶, spektrometria mas bada jony w fazie gazowej, która diametralnie różni się od roztworu – fazy skondensowanej. Schalley zauważa, że energie oddziaływań pomiędzy H i G są porównywalne z energiami oddziaływań z cząsteczkami rozpuszczalnika, energia natomiast solwatacji często przekracza energię wiązania HG. „Obdarcie” kompleksu z otaczających go i stabilizujących cząsteczek rozpuszczalnika bardzo istotnie wpływa na jego trwałość, strukturę i właściwości. Jakkolwiek badania kompleksów supramolekularnych za pomocą MS są bardzo ciekawe i dostępna jest szeroka paleta różnych pomiarów uwzględniających badania trwałości i reaktywności supermolekuł, badania te dotyczą adduktów w fazie gazowej i nie powinny być wprost przekładane na właściwości kompleksów w roztworach. Poważnym ograniczeniem MS w pomiarach ilościowych jest skrajnie różna zdolność do jonizacji poszczególnych składników próbki^{77,78}. Rozkład intensywności, będący wynikiem pomiaru w spektrometrii mas, zazwyczaj w żaden sposób nie odzwierciedla rzeczywistych ilościowych stosunków pomiędzy składnikami analitu. Co więcej, rozkład intensywności będzie zależał od użytej metody jonizacji, czy rozmaitych parametrów regulujących pracę źródła jonów. W praktyce przyjmuje się przybliżoną regułę, że dopiero ok. siedmiokrotna (!) różnica w intensywności dwóch sygnałów wskazuje, że dany składnik występuje w przewodzie.

Z powyższych rozważań wynika, że próba zastosowania MS do ilościowych badań stanu równowagi istniejącego w roztworze wymaga szczególnej ostrożności – racjonalnie zaplanowanego eksperymentu, który uwzględni wszystkie możliwe źródła błędów oraz szeroko zakrojonej walidacji metody eksperymentalnej - poprzez porównanie z wynikami uzyskanymi inną metodą analityczną.

W przypadku analizy rozpoznania chiralnego problem różnej jonizowalności staje się mniej istotny, gdyż jonizowalności par enancjomerów G_S i G_R lub H_S i H_R są identyczne. Można się również spodziewać, że jonizowalności kompleksów H^*G_S i H^*G_R , będących diastereoizomerami, będą zbliżone. Istotnym problemem jest fakt, że pary enancjomerów i diastereoizomerów posiadają identyczne masy, toteż nie są rozróżniane przez spektrometr mas. Aby rozróżnienie izomerów było możliwe, niezbędne jest znakowanie izotopowe jednego z enancjomerów H lub G. Przy braku znakowania, niezbędne jest przeprowadzenie dwóch pomiarów dla mieszanin zawierających przeciwne enancjomery.

Badania rozpoznania chiralnego za pomocą (MS) można realizować na kilka sposobów⁷⁹:

1. Wariant bez dodatku wzorca

W celu zrealizowania analizy ilościowej przeprowadza się dwa pomiary dla mieszanin: $H^* + G_R$ i $H^* + G_S$, przy zachowaniu identycznych warunków w obu pomiarach: stężenia reagentów, temperatura, ustawienia aparatu. Intensywności sygnałów pochodzących od kompleksów uzyskane w obu pomiarach porównuje się, a ich stosunek (RPI - *relative peak intensity*) określa jakość rozpoznania chiralnego. RPI można skorelować z selektywnością termodynamiczną α_T w myśl równania (2.41).

$$\alpha_T = \frac{K_S}{K_R} = \frac{\frac{[HG_S]}{[H] \cdot [G_S]}}{\frac{[HG_R]}{[H] \cdot [G_R]}} = \frac{[HG_S]_a}{[HG_R]_b} \cdot \frac{[H]_b}{[H]_a} \cdot \frac{[G_R]_b}{[G_S]_a} = RPI \cdot \frac{[H]_b}{[H]_a} \cdot \frac{[G_R]_b}{[G_S]_a} \quad (2.41)$$

$$\alpha_T \approx RPI \quad (2.42)$$

Dolne indeksy a i b w równaniu (2.41) i następnych odnoszą się do stężeń w odpowiednio pierwszym i drugim pomiarze. Przybliżenie wg równania (2.42) jest spełnione wówczas, gdy jonizowalności kompleksów są jednakowe i gdy stężenia wolnego receptora i wolnego gościa są zbliżone w obu pomiarach: $[H]_a \approx [H]_b$ i $[G_S]_a \approx [G_R]_b$. Przy bardzo niskich stężeniach używanych w pomiarach MS stopień skompleksowania jest bardzo niski^{vi}, ostatnie dwa warunki są spełnione dla $[H]_{0,a} = [H]_{0,b}$ i $[G_S]_{0,a} = [G_R]_{0,b}$.

2. Wariant z dodatkiem wzorca

Do mieszanin $H^* + G_R$ i $H^* + G_S$ dodaje się dodatkowo achiralny receptor odniesienia (H_{ref}), który wiąże enancjomery G z taką samą stałą K_{ref} . Intensywność sygnału badanego kompleksu $I(H^*G_{S/R})$ odnosi się do intensywności kompleksu z receptorem odniesienia $I(H_{ref}G_{S/R})$ i dopiero stosunki tych intensywności, uzyskane w obu pomiarach, odnosi się do siebie jako miara rozpoznania chiralnego. Jak wynika z równań (2.43-2.45) dodatek wzorca istotnie ogranicza błędy wynikające z niedokładności w stężeniach przygotowanych roztworów czy warunków pracy spektrometru.

$$RPI_a = k \frac{[HG_S]_a}{[H_{ref}G_S]_a} = k \frac{K_S[H]_a[G_S]_a}{K_{ref}[H_{ref}]_a[G_S]_a} = k \frac{K_S}{K_{ref}} \frac{[H]_a}{[H_{ref}]_a} \quad (2.43)$$

$$RPI_b = k \frac{[HG_R]_b}{[H_{ref}G_R]_b} = k \frac{K_R[H]_b[G_R]_b}{K_{ref}[H_{ref}]_b[G_R]_b} = k \frac{K_R}{K_{ref}} \frac{[H]_b}{[H_{ref}]_b} \quad (2.44)$$

$$\frac{RPI_a}{RPI_b} = \frac{\frac{K_S}{K_{ref}} \frac{[H]_a}{[H_{ref}]_a}}{\frac{K_R}{K_{ref}} \frac{[H]_b}{[H_{ref}]_b}} \approx \frac{K_S}{K_R} = \alpha_T \quad (2.45)$$

3. Wariant z zastosowaniem znakowania izotopowego

^{vi}Typowe stężenia to $10 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, nawet przy dużej stałej trwałości $K = 10^5$ dla mieszaniny 1:1 stopień skompleksowania wynosi poniżej 10%

Przeprowadzenie analizy wymaga przygotowania pseudoracemicznej mieszaniny G - jeden z enancjomerów musi być znakowany izotopowo - dzięki temu enancjomery są różnialne przez spektrometr mas. Pomiar MS przeprowadza się dla mieszaniny H i pseudoracematu G. Ze względu na niski stopień skompleksowania, użycie niewielkiego nadmiaru G gwarantuje, że w stanie równowagi $[G_S] \approx [G_R]$. Jeden pomiar MS i wyznaczony RPI powinien bezpośrednio przekładać się na α_T , przy założeniu jednakowych jonizowalności diastereoizomerycznych kompleksów HG_S i HG_R .

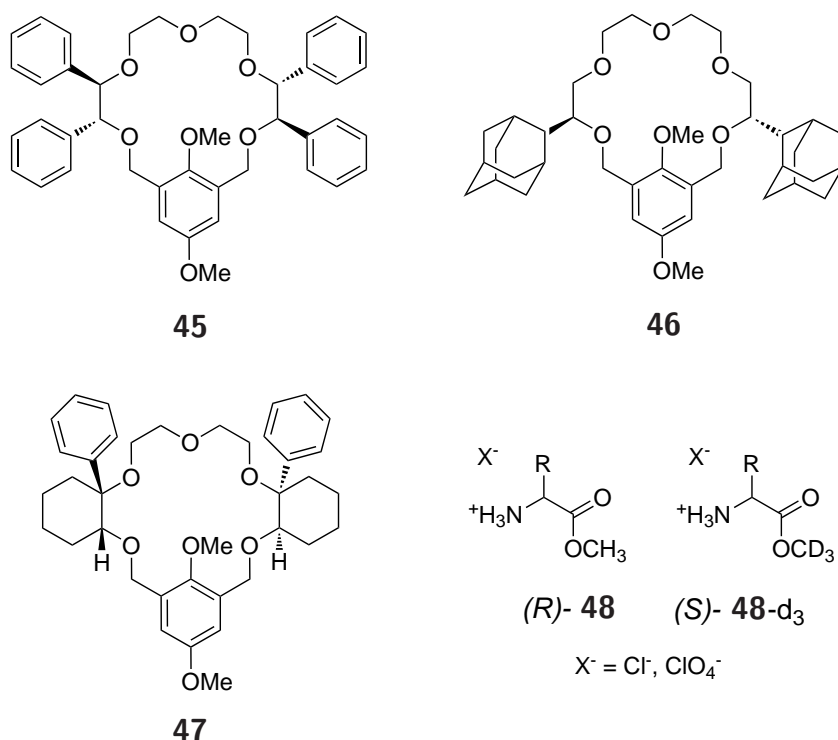
$$\alpha_T = \frac{K_S}{K_R} = \frac{\frac{[HG_S]}{[H] \cdot [G_S]}}{\frac{[HG_R]}{[H] \cdot [G_R]}} = \frac{[HG_S]}{[HG_R]} \frac{[G_R]}{[G_S]} \approx RPI \quad (2.46)$$

Znakomitą zaletą tej metody jest kompensacja wszystkich możliwych błędów w stężeniach substancji poprzez zastosowanie pojedynczego pomiaru o charakterze konkurencyjnym. Jedynymi potencjalnymi źródłami błędu w tej metodzie są różnice w jonizowalności kompleksów HG_S i HG_R oraz efekt izotopowy. Ten ostatni można wykluczyć, lub określić jego wielkość poprzez eksperyment krzyżowy z enancjomerami H. Wadą tego wariantu jest konieczność znakowania izotopowego czystej optycznie substancji, co może stanowić poważne wyzwanie syntetyczne.

Metody te były wykorzystane przez grupę Sawady do badania rozpoznania chiralnego kationów amoniowych przez chiralne etery koronowe.

Taką strategię zastosowano w doniesieniu literaturowym⁸⁰ dotyczącym rozpoznania chiralnego kationów amoniowych - soli estrów naturalnych aminokwasów. Receptorami były etery koronowe (np. **45-47**) o symetrii C_2 , otrzymane przez cyklizację z wykorzystaniem odpowiednich chiralnych dioli. Jako cząsteczki gości służyły estry metylowe aminokwasów w postaci soli chlorkowych lub chloranowych (VII). Estry aminokwasów szeregu *S* zostały zestryfikowane deuterowanym metanolem (*S-48-d*₃). Poprzez zmieszanie równych ilości **R-48** i *S-48-d*₃ Sawada *et al.* otrzymali mieszaninę pseudoracemiczną z enancjomerami *S* znakowanymi izotopowo.

Do pseudoracemicznej mieszaniny G (w chloroformie lub mieszaninie chloroform metanol 9:1) dodawano następnie chiralne makrocykle (H) i tak przygotowany roztwór poddano analizie MS z jonizacją FAB. Widmo masowe zawierało m.in. sygnały pochodzące od kompleksów HG_R i HG_{S-d_3} . Stosunek intensywności tych sygnałów I_R/I_{S-d_3} został zaproponowany jako potencjalna miara ilościowa rozpoznania chiralnego. Eksperymenty spektrometrii mas przeprowadzono dla 13 różnych receptorów z 11 kationami amoniowymi. Dla achiralnego receptora odniesienia - 18-korony-6 (**49**) selektywności otrzymane ze wszystkimi kationami wynosiły $1 \pm 0,02$. Dla chiralnych receptorów stosunek intensywności z wybranymi kationami osiągał wartość nawet do 5,44 (receptor **47**, kation - ester metylowy etyloglicyny), jednak dla większo-



Rysunek 2.12: Wybrane chiralne etery koronowe oraz estry aminokwasów użyte w badaniach z wykorzystaniem spektrometrii mas

ści zbadanych par wynosił on od 0,5 do 2 ($\log(I_R/I_{S-d3}) \in (-0,3; 0,3)$). Za pomocą pomiarów MS grupa Sawady wyznaczyła 58 wartości selektywności, jednakże tylko trzy z nich porównała z wynikami selektywności uzyskanymi za pomocą miareczkowań (Tabela 2.13). Pewne wątpliwości budzi możliwość wiarygodnego wyznaczenia stałych trwałości równych 1,0 i 2,0, brak załączonych krzywych miareczkowania nie pozwala ocenić rzetelności wykonania pomiarów.

Tabela 2.13: Porównanie selektywności wyznaczonych na podstawie miareczkowania z wynikami spektrometrii mas

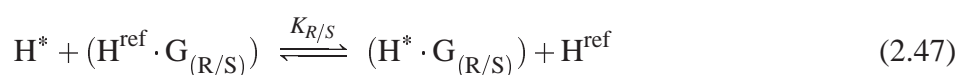
H	G	NMR			MS
		K_S	K_R	$\frac{K_S}{K_R}$	$\frac{I_R}{I_{S-d3}}$
45	ClO_4NH_3 -Met-OMe	2,0	1,0	2,0	2,0
46	ClO_4NH_3 -Phg-OMe	150	120	1,3	1,6
47	$CINH_3$ -Met-OMe	78,6	15,9	4,9	5,4

Na podstawie zgodności trzech wyników autorzy pracy orzekli, że zaproponowana przez nich metoda analityczna odzwierciedla równowagę występującą w roztworze. Uważam, że wyciąganie tak daleko posuniętych wniosków na podstawie tak nielicznej próby jest nieuzasadnione. Trzeba też zwrócić uwagę, że autorzy zastosowali jako metodę jonizacji FAB. W metodzie tej jonizacja związków następuje w matrycy, którą w tym przypadku był alkohol ni-

trobenzylowy (NBA). Mieszanina H i G była przygotowana przez zmieszanie roztworu H w chloroformie (5 μL), roztworu G w metanolu (5 μL) i matrycy (NBA, 30 μl). Po odparowaniu lotnych rozpuszczalników, otrzymano roztwór reagentów w NBA i równowaga odwracalnych reakcji kompleksowania ustalona była dla takiego otoczenia chemicznego. Eksperyment MS oceniał zatem enancjoselektywność receptorów w NBA, zaś miareczkowania prowadzone były w chloroformie-d lub mieszaninie $\text{CDCl}_3 : \text{CD}_3\text{OD}$ 10 : 1. Otrzymanie zgodnych wyników między MS a miareczkowaniem mimo różnych rozpuszczalników w obu eksperymentach wydaje się kwestią przypadku.

W kolejnej publikacji Sawada i wsp.⁸¹ opisali analogiczne eksperymenty przy użyciu tych samych makrocycli i znakowanych izotopowo amin, źródło jonów zostało zmienione na elektrosprej (ESI). Różnica pomiędzy pomiarami z użyciem różnych technik jonizacji okazała się bardzo istotna dla uzyskanych wyników. Dla wszystkich par substratów w metodzie ESI, wyznaczona enancjoselektywność była mniejsza niż w metodzie FAB. Najbardziej istotny okazał się spadek enancjoselektywności receptora **47** z solą Met-OMe. Większość wyników *IRIS* zmierzonych metodą ESI-MS znajduje się na granicy błędu doświadczalnego ($IRIS = 0,95 - 1,05$, $\log(IRIS) \in (-0,022; +0,022)$). Autorzy powołując się na omówione wcześniej trzy przypadki zgodności pomiarów FAB-MS z wynikami miareczkowań uważają, że pomiary FAB odzwierciedlają rzeczywiste właściwości receptorów i doszukują się potencjalnych źródeł błędów w metodzie ESI. Trzeba zauważyć, że pomiary ESI prowadzone były w mieszaninie, która zdecydowanie bardziej odpowiada rozpuszczalnikom użytym w miareczkowaniach.

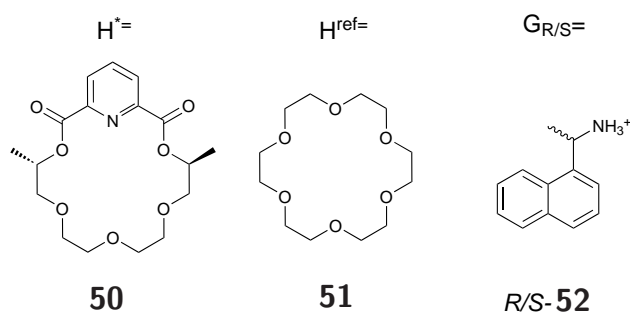
Na koniec omawiania metod MS, chciałbym zwrócić uwagę na znakomite metodologicznie publikacje,^{82,83} w których wyznaczone enancjoselektywności nie budzą żadnych zastrzeżeń. Grupa Deardena prowadziła pomiary przy użyciu spektrometru mas z analizatorem FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*). Analizator ten umożliwia nieograniczone w czasie utrzymywanie jonów i poddawanie ich reakcjom. Badacze przeprowadzili w komorze analizatora następujące reakcje wymiany (2.48)



$$K_{\text{S/R}} = \frac{p(\text{H}^* \cdot \text{G}_{(\text{R/S})}) \cdot p(\text{H}^{\text{ref}})}{p(\text{H}^{\text{ref}} \cdot \text{G}_{(\text{R/S})}) \cdot p(\text{H}^*)} \quad (2.48)$$

$$K_{\text{S/R}} = RPI \frac{p(\text{H}^{\text{ref}})}{p(\text{H}^*)} \quad (2.49)$$

Reakcje te przebiegały w fazie gazowej pod bardzo niskim ciśnieniem ($\sim 5 \times 10^{-7}$ torr). Równowaga reakcji ustalała się w ciągu ok. 1 min, co przejawiało się stałym stosunkiem intensywności sygnałów $\text{H}^* \cdot \text{G}$ i $\text{H}^{\text{ref}} \cdot \text{G}$. Stosunek ten, wraz z określonym stosunkiem ciśnień re-



Rysunek 2.13: Chiralny receptor, achiralny receptor odniesienia i chiralna amina użyta do badań w fazie gazowej przez Deardena.

agentów w komorze, pozwala wyznaczyć stałą równowagi reakcji. Z kolei zestawienie dwóch stałych równowagi określonych dla każdego z enancjomerów pozwala określić enancjoselektywność receptora względem danego gościa (zgodnie z Rów. (2.45)). Dla zestawu związków z Rys. 2.13 uzyskano selektywność:

$$\alpha = \frac{K_S}{K_R} = \frac{568 \pm 65}{130 \pm 15} = 4,37 \pm 0,70 \quad (2.50)$$

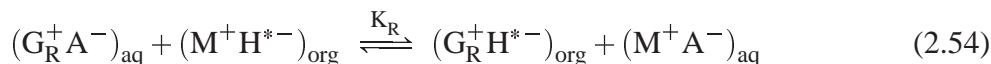
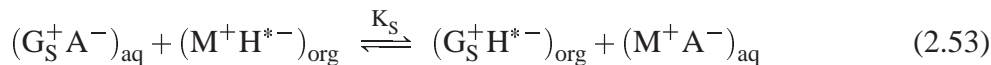
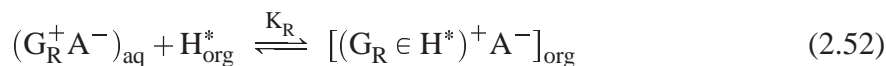
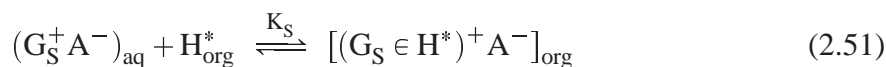
Ze względu na fakt, że reakcje wymiany odbywały się w fazie gazowej, zarówno rodzaj źródła jonów, ew. rozpuszczalniki i matryce nie mają żadnego wpływu na pomiar. Tak wyznaczone enancjoselektywności dotyczą wyłącznie fazy gazowej, dlatego nie można odnosić ich bezpośrednio do pomiarów w roztworach. Z drugiej strony określenie selektywności w fazie gazowej można porównać z wynikami obliczeń kwantowomechanicznych, jak również ich zestawienie z selektywnościami w roztworach pozwala określić bezpośrednio wpływ solwatacji na trwałość diastereoizomerycznych kompleksów.

2.3.4.4 Metody ekstrakcyjne

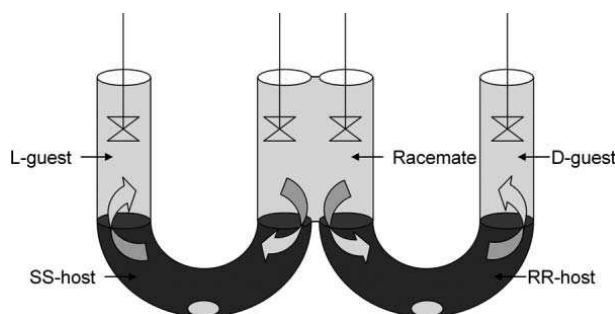
Metoda ekstrakcyjna była historycznie pierwszą zastosowaną do określania jakości rozpoznania chiralnego w pierwszej z prac Crama¹⁰. Enancjoselektywna ekstrakcja ciecz-ciecz (*Enantioselective Liquid-Liquid Extraction* - ELLE) opiera się na zastosowaniu dwóch niemieszających się rozpuszczalników. W jednym z nich (zazwyczaj w wodzie) znajduje się racemiczny roztwór G, w drugim (organicznym) homochiralny H*. Obecność H* powoduje, że enancjomery G są ekstrahowane do fazy org. z różnymi wydajnościami i w stanie równowagi faza organiczna jest wzbogacona w jeden z enancjomerów.

Aby metoda ta działała sprawnie, konieczne jest, aby G posiadał ograniczoną rozpuszczalność w fazie org., co w praktyce ogranicza dobór G do substancji jonowych - kationów ammoniowych lub fosfoniowych i organicznych anionów - karboksylanów, sulfonów, itp. Receptor obecny w fazie org. wiąże jon i czyni go na tyle lipofilowym, że możliwa jest ekstrakcja do fazy org. (np. etery koronowe Crama), lub receptor jest lipofilową chiralną solą a ekstrakcja zwią-

zana jest z jednoczesną reakcją podwójnej wymiany (metatezy). Oba procesy na przykładzie ekstrakcji chiralnego kationu przedstawiają Rów. (2.51-2.54).



Metoda ekstrakcyjna jest bardzo intensywnie rozwijana⁸⁴, ze względu na jej znakomity potencjał aplikacyjny do wielkoskalowego rozdziału racematu. Metodę podziałową można stosować sekwencyjnie do osiągnięcia wyższych czystości enancjomerycznych. Użyteczną metodą jest także jednoczesna ekstrakcja danego roztworu wodnego roztworami obu enancjomerów H Rys. (2.14)⁸⁵.



Rysunek 2.14: Schemat jednoczesnej ekstrakcji roztworu racematu dwoma roztworami zawierającymi przeciwne enancjomery receptora

Analiza rozpoznania chiralnego w metodzie ekstrakcyjnej sprowadza się do określenia całkowitych stężeń G_S i G_R w fazie organicznej i/lub wodnej. Na tej podstawie określa się dystrybucję - D_i (2.55) każdego z enancjomerów i następnie selektywność operacyjną receptora α_{op} (2.56).

$$D_i = \frac{[i]_{org}}{[i]_{aq}} \quad [i] - \text{stężenie wszystkich form} \quad (2.55)$$

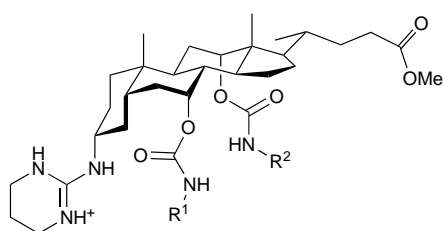
$$\alpha_{op} = \frac{D_S}{D_R} \quad (2.56)$$

Selektywność intrystyczna zdefiniowana jest stosunkiem stałych z Rów. (2.51-2.54):

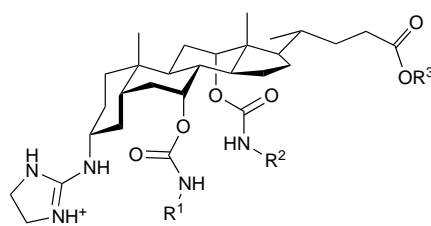
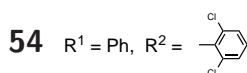
$$\alpha_{int} = \frac{K_S}{K_R} \quad (2.57)$$

jest tożsama z przyjętą definicją α_T

Żadna ze znanych prac nie prezentuje głębszej teoretycznej analizy procesu enancjoselektywnej ekstrakcji, ani nie porównuje tej metody z klasyczną metodą miareczkowania. W zdecydowanej większości badana była ekstrakcja kationów amoniowych. Przykładów ekstrakcji chiralnych anionów jest znacznie mniej. Grupa Davisa^{86,87} badała właściwości kationowych receptorów opartych na kwasie cholowym, z ugrupowaniem guanidynowym przyłączonym w pozycji 3 α , na pierścieniu D motywu sterolu. Obecność dodatkowych aksjalnych grup hydroksylowych w pozycjach 7 i 12 pozwoliła na łatwą syntetycznie modyfikację receptorów. Otrzymano w ten sposób m.in. receptory **53-56**.



53 R¹ = R² = *p*-(CF₃)C₆H₄



55 R¹ = R² = *p*-(CF₃)C₆H₄, R³ = Me

56 R¹ = R² = *p*-(CF₃)C₆H₄, R³ = *n*-C₂₀H₂₂

Badanie ELLE przeprowadzono dla naturalnych α -aminokwasów z grupą aminową zabezpieczoną grupą acetylową i dla naproksenu (**15**). Eksperymenty prowadzono w układzie woda (bufor fosforanowy pH=7,4) – chloroform. W tych warunkach kwasy były całkowicie zdysocjowane, zaś guanidynowy receptor był protonowany. Ekstrakcja polegała zatem na reakcji metatezy zgodnie z Rów. (2.53). Stosunek enancjomerów ekstrahowanych do fazy organicznej autorzy określili na podstawie stosunku intensywności odpowiednich sygnałów w ¹H NMR, pochodzących od diastereoizomerycznych kompleksów (soli (H^{*})⁺ · (G_{S/R})⁻). Wybrane wyniki przedstawia Tabela 2.14.

Wybrane receptory wykazują znakomite właściwości enancjoselektywnej ekstrakcji, większość wartości α_{op} przekracza 7. Jedyne dla niezabezpieczonych i N-Boc zabezpieczonych aminokwasów obserwowano niższe wartości selektywności (poz 8 i 10). Naproksen ekstrahowany był z najniższą selektywnością wynoszącą 1,5 (poz 11.)

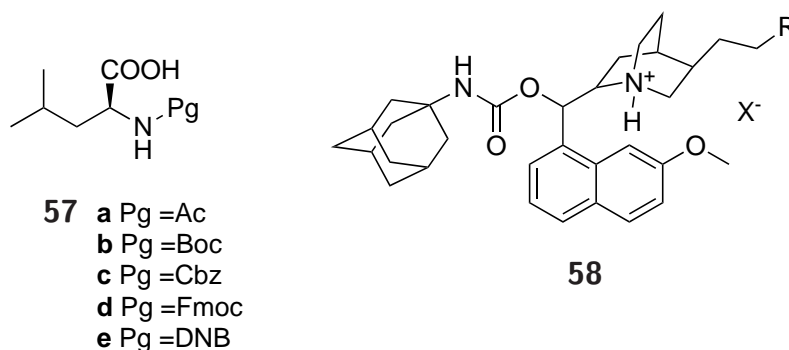
Receptor **56** z lipofilowym łańcuchem w grupie estrowej był używany w eksperymentach transportu AcPheO⁻ przez U-rurkę, jak również w modelowej przemysłowej aparaturze wykorzystującej „*hollow fiber membrane contactors*”. W pomiarach transportu przez warstwę chloroformu, *ee* aminokwasu w fazie odbierającej, w początkowej fazie eksperymentu, wynosiło 70%, co jest zgodnie z *ee* uzyskanym w prostym pomiarze ekstrakcyjnym (*ee* \approx 82%). Zmiana rozpuszczalnika na mieszaninę *n*-oktanol:heksan (2,5:97,5, v/v), który może pracować w przemysłowej instalacji, spowodowała spadek *ee* w fazie odbierającej do 30%.

Tabela 2.14: Wyniki ELLE dla receptorów **53-55**.

lp	receptor	anion	$\alpha_{op}(L:D)$
1		AcAlaO ⁻	10:1
2		AcValO ⁻	9:1
3	53	AcPheO ⁻	9:1
4		AcTrpO ⁻	9:1
5		AcMetO ⁻	9:1
6		AcAlaO ⁻	6:1
7		AcValO ⁻	9:1
8	54	BocValO ⁻	1:1
9		AcPheO ⁻	9:1
10		NH ₂ PheO ⁻	2:1 ^a
11		Naproksen	1,5:1 ^{a,b}
12		AcAlaO ⁻	10:1
13	55	AcValO ⁻	7:1
14		AcPheO ⁻	10:1

^a bufor boranowy pH=9, ^b S/R.

W innej pracy⁸⁸ dotyczącej ekstrakcji N-zabezpieczonej leucyny (**57**) przez pochodną chininy **58**, autorzy pokazują ogromny wpływ rodzaju zabezpieczenia na selektywność ekstrakcji. *ee* aminokwasu w fazie organicznej zmienia się od 0, dla grup Ac (**57a**), Boc (**57b**), czy Cbz (**57c**), poprzez *ee* = 20% dla Fmoc (**57c**), kończąc na 92% dla zabezpieczenia DNB (**57c**). Selektowność ekstrakcji jest wrażliwa na pH fazy wodnej oraz rodzaj fazy organicznej.



Przy tak znakomitych wartościach enancjoselekcji, szczególnie brakuje mi w tych doniesieniach literaturowych porównania wyników ELLE z enancjoselektywnością wyznaczoną za pomocą klasycznych metod miareczkowania.

Abstrahując od procedur analitycznych i potencjalnych błędów przy określaniu α_{op} czy α_{int} , pewne wątpliwości budzi brak jednoznacznych dowodów na to, czy między mieszanymi fazami na pewno ustala się stan równowagi. W przypadku eksperymentów dotyczących transportu przez warstwę rozpuszczalnika organicznego jest oczywiste, że skład roztworu odbierającego ekstrahowane substancje zależy od szybkości ekstrakcji i re-ekstrakcji danej substancji do i z fazy organicznej. Duże wartości enancjoselektywności wcale nie muszą wynikać z termodynamicznej selektywności receptora (α_T), wynikają raczej z różnic w labilności kompleksów i łatwości ich przechodzenia przez granicę faz. Zatem w eksperymentach tych za selektywność odpowiada kinetyka (ΔG^\ddagger), a nie stan równowagi (ΔG^0). Z podobną sytuacją możemy mieć do czynienia w prostych pomiarach ekstrakcyjnych. W pierwszych pracach Crama¹⁰ wiele pomiarów prowadzonych było w temperaturze od -25 do 0C. Obniżona temperatura spowalnia ustalanie stanu równowagi i jednocześnie faworyzuje reakcje szybsze, co może przekładać się na większą selektywność. Nie jest moim zamiarem dewaluowanie wszystkich dotychczasowych wyników, stwierdzam tylko, że z powodu braku jednoznacznego potwierdzenia uzyskanych selektywności innymi metodami, można doszukiwać się innych przyczyn występowania wzbogacenia enancjomerycznego niż $\Delta\Delta G^0$.

2.3.4.5 Metody chromatograficzne

Znakomitą zaletą metod chromatograficznych jest amplifikacja niewielkich różnic w powinowactwie, osiągnięta dzięki zwielokrotnieniu aktów podziałowych (wiele półek teoretycznych). Nawet tak niewielka selektywność jak $\alpha = 1,02$ może dać całkowitą separację sygnałów w kapilarnej chromatografii gazowej, gdzie liczba półek teoretycznych przekracza 10^5 . Analogicznie w wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), przy ok 5000 półek, w pełni zadowalająca jest selektywność $\alpha = 1,1$. Metoda ta może zatem potencjalnie służyć do określania nawet niewielkich wartości selektywności. Dodatkową jej zaletą jest konkurencyjny charakter analizy, obie rozdzielane substancje (w szczególności enancjomery) jednocześnie trafiają na kolumnę i oddziałują z fazą stacjonarną w tych samych warunkach. Konkurencyjny charakter pozwala uniknąć wszystkich możliwych błędów związanych z koniecznością przeprowadzenia dwóch osobnych eksperymentów. Istotnym problemem w zastosowaniu metod chromatograficznych do omawianych tu badań jest konieczność immobilizacji homochiralnego składnika na fazie stacjonarnej oraz dostępność drugiego składnika w postaci obu enancjomerów.

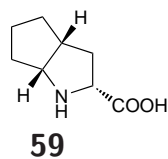
W latach 80' w Zespole prof. Jurczaka rozdział chiralnych substancji za pomocą HPLC udało się przeprowadzić modyfikując nie fazę stacjonarną a ruchomą. Dodatek β -cyklodekstryny do eluenta zaowocował rozdziałem enancjomerycznym kwasu migdałowego na achiralnej kolumnie HPLC C-18^{89,90}.

Innym podejściem pozwalającym wykorzystać zalety chromatografii bez konieczności żmudnego przygotowywania CSP jest niekwalencyjne pokrycie – impregnowanie achiralnej fazy

stacjonarnej chiralnym modyfikatorem. Efekt ten najłatwiej uzyskać dla chromatografii cienkowarstwowej (TLC), impregnację można przeprowadzić poprzez zanurzenie płytki w roztworze modyfikatora lub poprzez rozpuszczenie porcji modyfikatora w zawieszynie fazy stacjonarnej przed pokryciem płytki. Impregnacja na potrzeby rozdzielania enancjomerów była wykorzystywana wielokrotnie dla różnych rodzajów substancji⁹¹⁻⁹⁵, przykłady podaje w Tabeli 2.15.

Tabela 2.15: Przykłady zastosowania impregnowanych płytek TLC do rozdzielania enancjomerów

lp	modyfikator	analit	cyt.
1	erytromycyna	naturalne aminokwasy	93
2	L-arginina	ibuprofen	94
3	L-lizyna	<i>beta</i> -blokery: propanolol, metoprolol	95
4	59	naturalne aminokwasy	92
5	L-seryna	ketoprofen, tiaprofen	91



W kontekście rozpoznania chiralnych anionów, metoda impregnowanego TLC została użyta w cytowanej już pracy Morána⁷¹. Autorzy otrzymali receptor **39** w postaci racemicznej. Za pomocą konkurencyjnej metody miareczkowania NMR określili jego enancjoselektywność względem migdalanu TMA ($\alpha_T = 14$ w DMSO i 15 w acetonie). Następnie pokazali, że analityczna krzemionkowa płytka TLC zaimpregnowana 1% roztworem migdalanu TMA pozwalała rozdzielić enancjomery receptora **39**. Uzyskano bardzo dobry rozdział: $R_{f,1} = 0,07$ i $R_{f,2} = 0,16$, który pozostaje w zgodzie z dobrą enancjoselektywnością receptora, mimo że do elucji użyto innych rozpuszczalników tzn chloroform : octan etylu 8:2. Porównanie współczynnika retencji receptora na nieimpregnowanej płytce $R_f = 0,49$ wskazuje na silne wiązanie związku **60** przez modyfikator - utworzony bardzo polarny kompleks jest zatrzymywany na fazie stacjonarnej. Ostatecznie autorzy wykorzystali znakomite właściwości podziałowe impregnowanych płytek i przeprowadzili rozdział receptora **39** na preparatywnej impregnowanej płytce wydzielając oba enancjomery.

W drugiej z cytowanych już prac Morána⁷², badacze zastosowali analogiczną procedurę dla trzech receptorów **41-43** wiążących diketopiperazynę (**40**). Analityczne krzemionkowe płyt-

ki TLC impregnowane 1% roztworem homochiralnej diketopiperazyny pozwoliły rozdzielić enancjomery wszystkich trzech receptorów. Wyniki analiz chromatograficznych z tych dwóch publikacji przedstawia Tabela 2.16.

Tabela 2.16: Zestawienie pomiarów TLC w grupie Morána

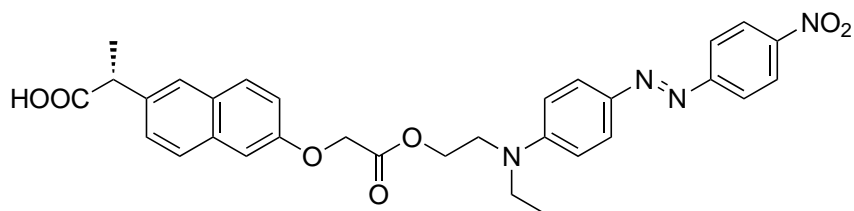
Receptor	Modyfikator	α NMR	$R_{f,1}$	$R_{f,2}$
60	Migdałan TMA	14	0,07	0,16
41	40	2,2	0,41	0,45
42	40	2,7	0,42	0,50
43	40	6,3	0,31	0,52

2.3.4.6 Inne metody

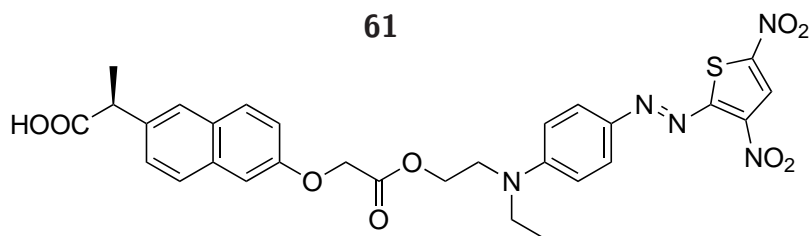
W zespole Davisa⁴⁸ zaproponowano bardzo ciekawą konkurencyjną metodę analizy rozpoznania chiralnego, szczególnie użyteczną do analizy złożonych bibliotek kombinatoryjnych anionów. Autorzy przygotowali pseudoracemiczne mieszaniny chiralnych karboksylanów - modyfikowanego naproksenu (**61** i **62**) i modyfikowanej tyrozyny (**63** i **64**), w których każdy z pseudoenancjomerów znakowany był w łańcuchu bocznym innym chromoforem. Dzięki temu zabiegowi analogi (*R*)-naproksenu i (*R*)-tyrozyny były czerwone, zaś ich pseudoenancjomery miary barwę niebieską.

Receptory użyte w badaniach (**65**) oparte były na kwasie cholowym, którego alifatyczny koniec został użyty do związania z żywicą używaną do syntez na nośniku stałym. Grupy hydroksylowe kwasu cholowego, zostały przekształcone w aminowe, a następnie grupę aminową z pozycji 7 przekształcono w grupę mocznikową. Wykorzystując typowe procedury syntezy na nośniku stałym autorzy dobudowali do pozostałych dwóch grup aminowych (w pozycjach 3 i 12) dwuaminokwasowe fragmenty. Do syntezy użyto 12 różnych naturalnych α -aminokwasów, dzięki kombinatoryjnemu podejściu, w każdej pozycji AA₁-AA₄ może znajdować się dowolny z 12 aminokwasów, co oznacza, że autorzy otrzymali bibliotekę złożoną z $12^4 = 20736$ związków, przy czym każde z ziaren żywicy pokryte jest tylko jednym z wariantów receptora.

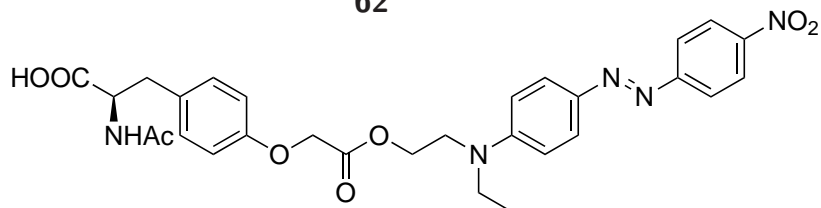
W kolejnym kroku autorzy umieścili immobilizowaną bibliotekę receptorów w pseudoracemicznych roztworach **61+62** lub **63+64**, w mieszaninie CHCl₃ : *t*-BuOH 10:1. Zgodnie z założeniami, na skutek wiązania anionów przez immobilizowany receptor, ziarna żywicy zabarwiały się. Autorzy wykazali, że wiązanie anionów jest odwracalne w użytym rozpuszczalniku. Ziarna o zdecydowanie niebieskim, lub zdecydowanie czerwonym kolorze powinny wskazywać na wysoką enancjoselektywność procesu wiązania. Dla mieszaniny anionów opartych na naproksenie obserwowano słabe wiązanie anionów (słabe wybarwienie ziaren) i jednocześnie



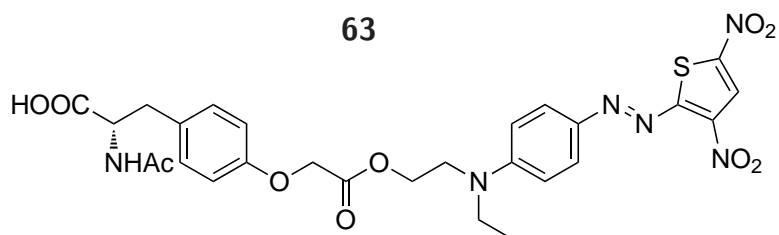
61



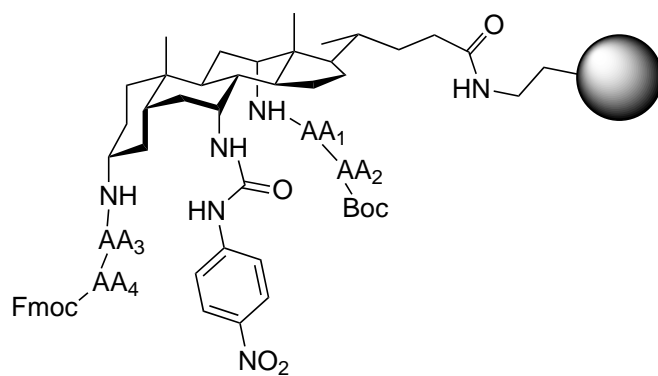
62



63



64



65

znikomą enancjoselektywność. Dla drugiej mieszaniny anionów, opartej na tyrozynie, wiązanie anionu było silne i zdecydowana większość ziaren przyjmowała zabarwienie niebieskie, świadczące o znacznej enancjoselektywności. Aby możliwe było zróżnicowanie enancjoselektywności tych ziaren, które były czysto niebieskie, kolejne pomiary przeprowadzono dla nich z

mieszaninami pseudoenancjomerów bogatszymi w słabiej wiązany anion (**63** : **64** = 5 : 1). W mieszaninie o tak niekorzystnym stosunku tylko niektóre z ziaren przyjmowały barwę niebieską. Te ziarna zostały wyselekcjonowane pod mikroskopem i autorzy planują wykorzystać je do dalszych badań.

Koncepcja łatwego rozróżniania nośników z immobilizowanymi receptorami wydaje się bardzo zachęcająca. Niepokojący może być jedynie fakt, że grupa chromoforowa nie jest całkowicie obojętna z supramoleuklarnego punktu widzenia, gdyż zawiera grupę aminową będącą dobrym akceptorem wiązań wodorowych i polarne grupy nitrowe. Te fragmenty cząsteczki mogą także brać udział w kompleksowaniu i zmieniać powinowactwo modyfikowanego gościa do receptorów. Co więcej, sama żywica może niezależnie od części receptorowej wiązać preferencyjnie którąś z cząsteczek gościa. Autorzy publikacji, świadomi tych problemów, zaproponowali aby w końcowym etapie ewaluacji receptorów, przeprowadzić eksperyment krzyżowy - tzn. użyć mieszaniny anionów, w której odpowiednie chromofory są przyłączone do przeciwnych enancjomerów. Wówczas zmiana barwy ziarna z niebieskiej na czerwoną świadczyłaby o tym, że mechanizm rozpoznania gościa dotyczy tylko fragmentu karboksylowego. Tego eksperymentu autorzy jednak nie przeprowadzili. Praca ta nie doczekała się jak na razie kontynuacji. Nie zostały określone sekwencje aminokwasowe receptorów o najlepszym rozpoznaniu, ani nie przeprowadzono, dla porównania, pomiarów enancjoselektywności innymi metodami.

2.4 Podsumowanie

Spojrzenie na dziedzinę rozpoznania chiralnego z dzisiejszej perspektywy skłania do pewnej refleksji. Praktycznie codziennie ukazują się nowe publikacje dotyczące nowych chiralnych katalizatorów do syntezy asymetrycznej. Katalizatory te cechuje obecnie znakomita enancjoselektywność, nadmiary enancjomeryczne (*ee*) produktów, wynoszące >90%, są już niemal standardem. Trzeba sobie uzmysłwić, że *ee* = 90% odpowiada stosunek enancjomerów 95:5, czyli szybkość tworzenia jednego z nich jest praktycznie 20 razy większa niż drugiego. Dla *ee* wynoszących 95%, czy 99%, stosunki szybkości reakcji wynoszą odpowiednio 40 i 200(!). Są to doprawdy ogromne wartości, które są, jak do tej pory, zupełnie nieosiągalne w rozpoznaniu chiralnym, realizowanym przez syntetyczne receptory. Na tak dużą dysproporcję w jakości wyników składają się, moim zdaniem, dwa czynniki.

Po pierwsze, w przypadku katalizy asymetrycznej różnicuje się szybkość tworzenia enancjomerów (kinetyka), a w przypadku rozpoznania chiralnego trwałość kompleksów (termodynamika). Inaczej mówiąc kataliza, asymetryczna dotyczy entalpii swobodnej aktywacji (ΔG^\ddagger), zaś rozpoznanie chiralne entalpii swobodnej tworzenia supermolekuł (ΔG^0) (Rys.). Osiągnięty wynik - stosunek stałych szybkości reakcji (*k*), lub stosunek stałych tworzenia kompleksów (*K*)

wykazują taką samą – eksponencjalną zależność od odpowiednich entalpii swobodnych:

$$k \sim \exp\left(\frac{-\Delta G^\ddagger}{k_B T}\right) \quad (2.58)$$

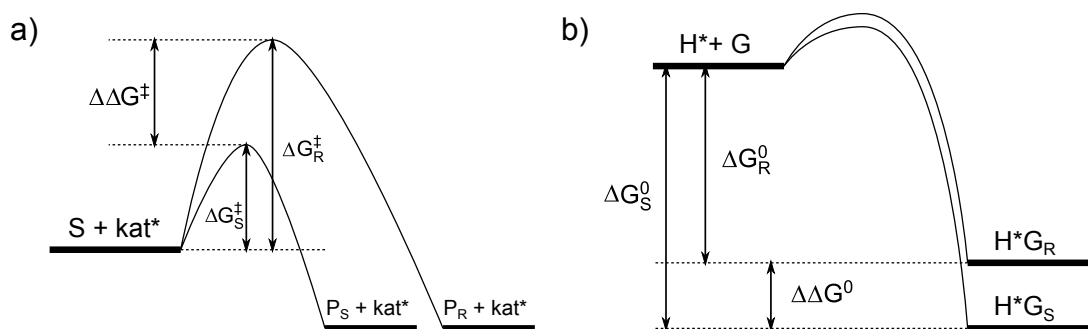
$$\frac{k_1}{k_2} = \exp\left(-\Delta G_1^\ddagger + \Delta G_2^\ddagger\right) \quad (2.59)$$

$$\frac{k_1}{k_2} = \exp\left(\Delta\Delta G^\ddagger\right) \quad (2.60)$$

$$K = \exp\left(\frac{-\Delta G^0}{k_B T}\right) \quad (2.61)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \exp\left(-\Delta G_1^0 + \Delta G_2^0\right) \quad (2.62)$$

$$\frac{K_1}{K_2} = \exp\left(\Delta\Delta G^0\right) \quad (2.63)$$



Rysunek 2.15: Porównanie czynników decydujących o katalizie asymetrycznej (a) i rozpoznaniu chiralnym (b)

Z dotychczasowych doniesień literaturowych wydaje się, że różnicowanie entalpii aktywacji (ΔG^\ddagger) jest łatwiejsze, niż różnicowanie entalpii swobodnej tworzenia kompleksów (ΔG^0).

Drugim czynnikiem mającym wpływ na tak słabe rozwinięcie gałęzi rozpoznania chiralnego jest duża trudność analizy nowych receptorów pod kątem ich enancjoselektywności. W przypadku katalizy asymetrycznej ocena katalizatora polega na przeprowadzeniu reakcji z modelowymi substratami i określeniu wydajności produktu oraz jego nadmiaru enancjomerycznego. Do określenia wydajności wymagane jest jedynie wydzielenie czystego produktu, a *ee* określa się metodami chromatograficznymi (HPLC lub GC). W dobie autosamplery instalowanych przy chromatografach, czy nawet kompletnych robotów nastawiających i przerabiających testowe reakcje, sam proces ewaluacji katalizatorów jest stosunkowo prosty, szybki i przede wszystkim jednoznaczny. Rozpoznanie chiralne nie cieszy się taką „łatwością obsługi”, co bardzo utrudnia postępy w tej dziedzinie.

Jak pokazałem w tym rozdziale, klasyczna metoda analizy rozpoznania chiralnego - metoda dwóch równoległych miareczkowań jest bardzo żmudna, pracochłonna i obciążona znaczną niepewnością. Miareczkowania są wrażliwe na różnego rodzaju błędy - szereg przykładów z lite-

ratury pokazuje niewłaściwie przeprowadzone miareczkowania, które prowadzą do fałszywych wyników. Z drugiej strony dla potencjalnych alternatywnych metod - konkurencyjnych czy chromatograficznych nie została wiarygodnie potwierdzona zgodność wyników z klasycznie wyznaczonymi selektywnościami. Dopóki któraś z tych metod nie zostanie pozytywnie zweryfikowana na dużej próbie receptorów i gości, lub dopóki nie zostanie opracowana nowa, szybka i wiarygodna metoda, dopóty nie będzie możliwe prowadzenie badań nad rozpoznaniem chiralnym anionów na dużą skalę z kombinatoryjnym podejściem. Wobec braku prostych reguł sugerujących preferowaną strukturę receptora tylko kombinatoryjne podejście polegające na systematycznej wariacji struktur receptorów i przeprowadzenie korelacji struktura-selektywność mogą zaowocować dobrym zrozumieniem dziedziny rozpoznania chiralnego anionów i pomóc w projektowaniu wysoce enancjoselektywnych receptorów na aniony.

Rozdział 3

Badania własne

Wodorosty wyrzucane są na zawietrzną stronę wyspy, a nie na podwietrzną. Jeżeli ze skalnego pagórka rzucić kawałek deski pod wiatr, nie wróci na brzeg, tylko popłynie dookoła wyspy w niedużej odległości od plaży. Jeżeli trzymać deskę na tle horyzontu, wydaje się, że horyzont tworzy część łuku, a nie linię prostą. Przy brzydkiej pogodzie woda wznosi się, lecz czasem zachowuje się wręcz przeciwnie. Co siódma fala jest olbrzymia, ale nieraz jest to dziewiąta, a czasem nie ma w tym żadnej reguły.

A te szerokie grzywy białej piany pojawiające się przed burzą skąd się biorą i dokąd pędzą? I dlaczego? Tatuś Muminka starał się znaleźć odpowiedź na wszystkie te pytania i na wiele innych, ale szło mu to bardzo ciężko. Poczł się zmęczony i niezdolny do myślenia naukowego(...).

I znów naszała go owa przyprawiająca o zawrót głowy myśl, że morze nie podlega w ogóle żadnym prawom. Starał się szybko tę myśl od siebie odsunąć. Chciał zrozumieć. Chciał rozwiązać zagadkę morza, żeby móc je lubić, a równocześnie zachować poszanowanie dla samego siebie!

T. Jansson „Tatuś Muminka i morze” tłum. T. Chłapowska

3.1 Wprowadzenie

Jak wykazałem w Części Literaturowej, ilościowe określanie rozpoznania chiralnego nowo otrzymanych receptorów jest trudne, czasochłonne, kosztowne i charakteryzuje się ograniczoną precyzją. Dlatego moim celem było opracowanie i wyznaczenie zakresu stosowalności alternatywnych metod badania rozpoznania chiralnego w odniesieniu do chiralnych anionów karboksylanowych. Aby ocenić zakres stosowalności i stopień uniwersalności proponowanych przeze mnie metod potrzebowiałem dużej grupy receptorów na aniony o zróżnicowanej budowie, które

cechować powinien różny stopień enancjoselektywności. Zadanie to mogłoby zostać zrealizowane w dosyć prosty sposób, poprzez użycie całej gamy literaturowych receptorów o szerokim wachlarzu struktur i znakomitych (przynajmniej wg ich autorów) właściwościach rozpoznania chiralnego. Jednakże, jak wykazałem w poprzednim rozdziale, większość doniesień literaturowych cechuje na ogół słaby warsztat badawczy, a prezentowane w publikacjach wyniki są często wątpliwe. Wobec powyższego, wykorzystanie w mojej pracy literaturowych receptorów nadal wymagałoby ode mnie wyznaczenia dla nich stałych tworzenia kompleksów z modelowymi chiralnymi anionami przy użyciu klasycznych metod miareczkowania. Z tego powodu korzyść z zastosowania związków znanych z literatury byłaby znikoma.

W tej sytuacji oczywistym rozwiązaniem było zaprojektowanie i otrzymanie własnej kolekcji chiralnych receptorów na aniony. Optymalne receptory do moich podstawowych studiów nad nowymi metodami badania rozpoznania chiralnego anionów powinny spełniać następujące wymagania:

1. być łatwo osiągalne syntetycznie,
2. dawać się łatwo oczyszczać do >95% czystości,
3. być rozpuszczalne w szeregu typowych rozpuszczalników,
4. wiązać anion wg modelu 1 : 1, wiązanie powinno być obserwowalne nawet w konkurencyjnych rozpuszczalnikach,
5. proces tworzenia kompleksów supramolekularnych powinien dawać się łatwo śledzić za pomocą metod spektroskopowych w optymalnym zakresie stężeń dla danej wartości K_d .

Dodatkowo, receptory w ramach serii użytej do ewaluacji danej metody powinny cechować się zróżnicowaną enancjoselektywnością - od słabej, przez umiarkowaną, do znacznej. Szeroki rozkład wartości α_T pozwoli określić zakres stosowalności alternatywnych metod analizy.

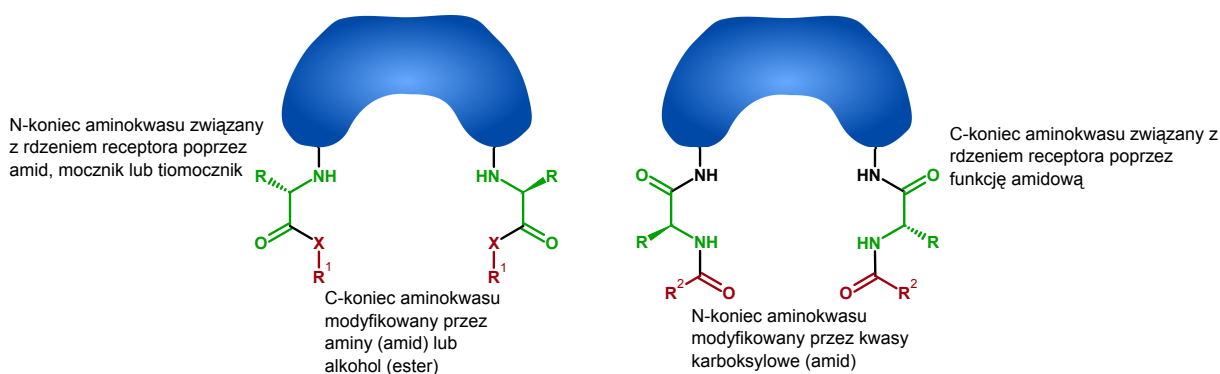
Jako źródła chiralności w moich receptorach zdecydowałem się wykorzystać naturalne L- α -aminokwasy, które mają szereg zalet jako bloki budulcowe do syntezy receptorów na aniony:

- są łatwo dostępne,
- ich łańcuchy boczne różnią się wielkością, kształtem, polarnością oraz zdolnościami tworzenia wiązań wodorowych,
- zarówno C- jak i N-końce są łatwo funkcjonalizowalne przez użycie różnorodnych odczynników,

- grupa karboksylowa może z łatwością zostać przekształcona w grupę amidową, natomiast grupa aminowa może zostać użyta do konstrukcji grupy amidowej, mocznikowej lub tiomocznikowej, istotnych ze względu na funkcję wiązania anionów.

Tak więc, duża różnorodność naturalnych aminokwasów, jak również ogromne możliwości modyfikacji ich C- i N-końców sprawiają, że związki te są bardzo dogodnie do syntezy bibliotek receptorów.

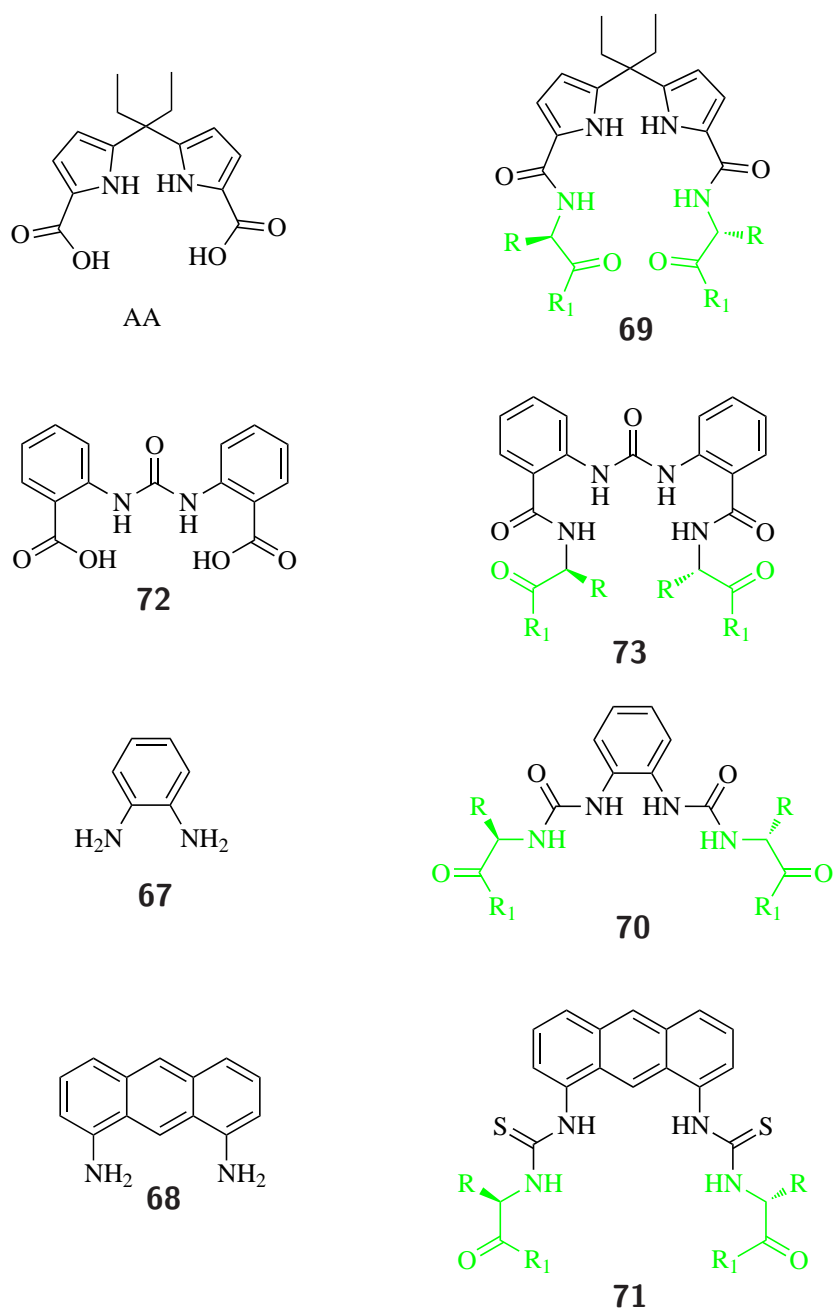
W mojej strategii syntezy receptorów postanowiłem połączyć fragmenty aminokwasowe z różnego rodzaju rdzeniami poprzez funkcję amidową, mocznikową lub tiomocznikową, co pokazałem na Schemacie 3.1.



Schemat 3.1: Ogólny schemat budowy receptorów z możliwością modyfikacji peryferiów

Rdzeń receptora ma zapewniać wiązanie zdysocjowanej grupy karboksylowej gościa, zaś aminokwasowe „ogony” zapewniają chiralne otoczenie kompleksowanego anionu. W pracy tej stosuję wyłącznie receptory elektrycznie obojętne, zatem wiązanie anionu wymaga odpowiednio zorganizowanych przestrzennie donorów wiązania wodorowego, które znajdują się we fragmencie rdzenia oraz w grupie łączącej rdzeń z aminokwasem. Jako prekursorzy rdzenia wybrałem dipirometan **66** z łącznikiem karboksylowym oraz *o*-fenylenodiaminę (**67**) i 1,8-diaminoantracen (**68**) z łącznikiem aminowym. Prekursorzy te, po dołączeniu fragmentów aminokwasowych, dają odpowiednie receptory **69**, **70** oraz **71** (Rys. 3.1).

Zastosowane przeze mnie prekursorzy to układy o symetrii C_{2h} , zatem cząsteczki receptorów dekorowane aminokwasami posiadają symetrię C_2 . Realizacja trójpunktowego modelu wiązania wg Pirkle’a (str. 22) polegać ma na związaniu dwóch atomów tlenu grupy karboksylowej przez rdzeń cząsteczki oraz dodatkowych, stereochemicznie zależnych oddziaływaniach typu zawady przestrzennej lub wiązania wodorowego, zapewnionych przez aminokwasowe ogony.



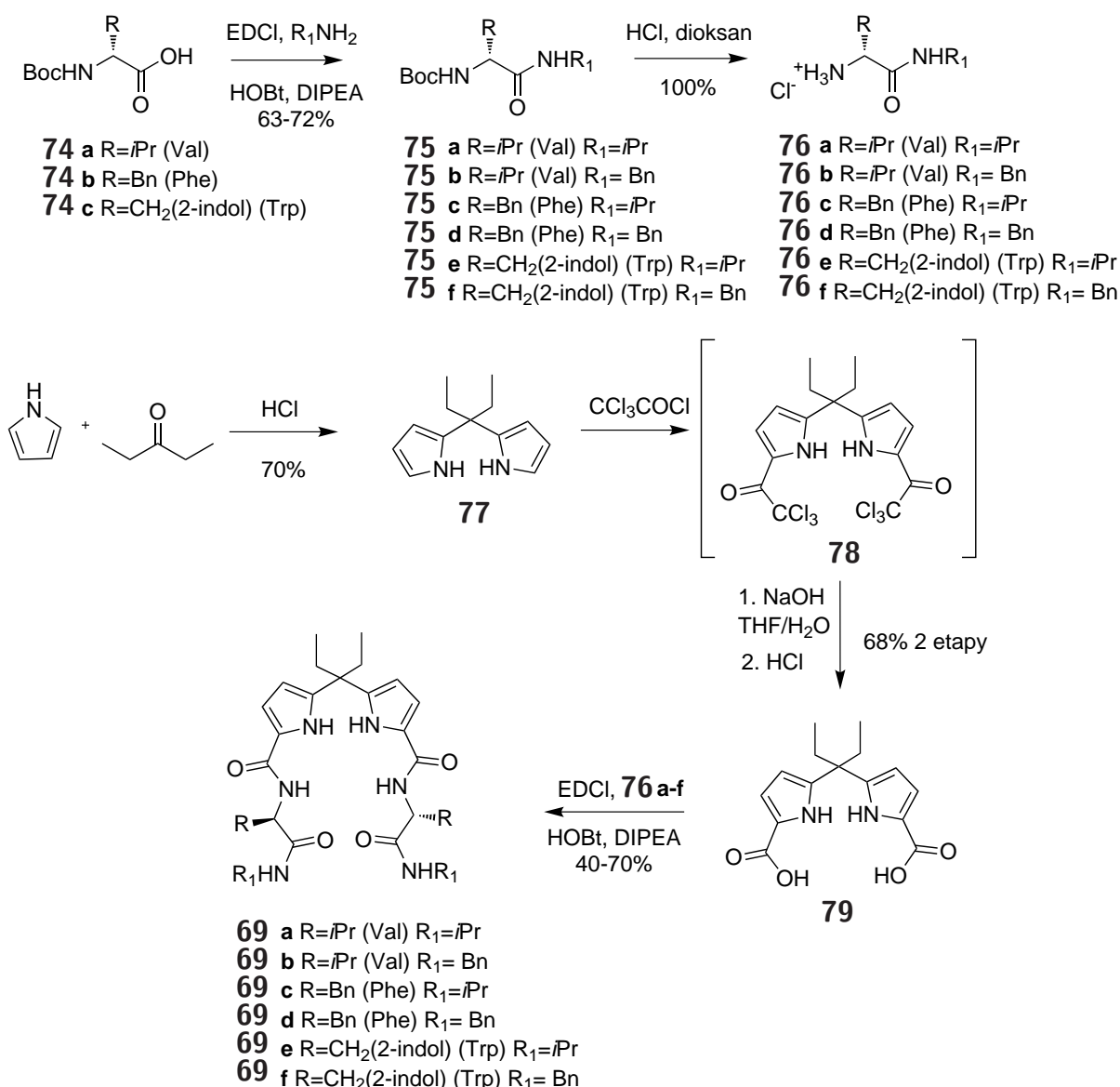
Rysunek 3.1: Cząsteczki rdzenia i odpowiadające im struktury chiralnych receptorów

3.2 Synteza receptorów

3.2.1 Receptory z rdzeniem dipirometanowym

W celu nadania pracy waloru innowacyjności, zdecydowałem się opracować nowy rdzeń, na którym oparte miały być moje receptory. Mój wybór padł na wykorzystanie jednostki pirolowej, która jest bardzo dogodnym i szeroko stosowanym fragmentem budulcowym⁹⁶, ze względu na swoje znakomite właściwości donora wiązania wodorowego. Pirol jest bardziej kwaśny niż typowy amid⁹⁷, a również jego parametry Abrahama⁹⁸ również wskazują, że jest lepszym

donorem wiązania wodorowego niż amid³. Co więcej, sztywna struktura pierścieniowa pomaga właściwie preorganizować strukturę receptora. Ze względu na dogodność syntezy i stabilność w warunkach tlenowych opracowałem receptor oparty na motywie dipirometanu **69**. Mostkowy metylenowy atom węgla, w którym atomy wodoru zastąpione są podstawnikami alkilowymi jest odporny na utlenianie, natomiast grupy karboksylowe w pozycjach 5,5', które następnie miały zostać przekształcone w grupy amidowe, daje się łatwo wprowadzić na drodze substytucji elektrofilowej. Etylowe podstawniki na grupie metylenowej zostały wybrane ze względu na szczególną łatwość syntezy tego konkretnego homologu. Otrzymywanie receptorów typu **69** przedstawia Schemat 3.2.



Schemat 3.2: Synteza chiralnych receptorów opartych na jednostce dipirometanu **69**

Naturalne L-aminokwasy – walina, fenyloalanina i tryptofan – zostały wybrane do syntezy ze względu na różny charakter ich łańcuchów bocznych. Zawierają one odpowiednio: rozgałę-

ziony łańcuch alkilowy (R=*i*Pr dla Val), fragment aromatyczny (R=Bn dla Phe) oraz dodatkowy donor wiązania wodorowego (heterocykliczne NH dla Trp).

Boc-Zabezpieczone aminokwasy poddano reakcji sprzęgania z dwiema pierwszorzędowymi aminami – izopropylaminą i benzyloaminą (posiadającymi odpowiednio alifatyczny i aromatyczny podstawnik) prowadzącej do amidów **75a-f**. Związki te, w wyniku reakcji odbezpieczenia grupy aminowej za pomocą 4M HCl w dioksanie, dały amidy **76a-f** z ilościową wydajnością.

Prekursor rdzenia receptora otrzymałem na drodze reakcji pirolu z pentan-3-onem w rozcieńczonym kwasie solnym. Częściowa rozpuszczalność substratów w wodzie w temp. 100 °C pozwoliła prowadzić reakcję (z tym konkretnym ketonem) bez konieczności użycia znacznych nadmiarów pirolu; reakcja zachodzi z bardzo dobrymi wydajnościami, a produkt **77** nie wymaga oczyszczania chromatograficznego. Związek ten poddałem reakcji substytucji elektrofilowej z chlorkiem kwasu trichlorooctowego, otrzymując bisketon **78**, który poddałem bez wydzielania hydrolizie w dwufazowym układzie THF/NaOH_(aq) w 40 °C. Po zakwaszeniu otrzymałem dikwas **79** wydajnością 68% po dwóch etapach. Sprzęganie dikwasu **79** z odbezpieczonymi aminokwasami **76a-f** przeprowadziłem przy użyciu odczynnika sprzęgającego - EDCl, znanego z chemii peptydów. Finalne receptory **69a-f** otrzymałem z zadowalającymi wydajnościami (od umiarkowanymi do dobrych).

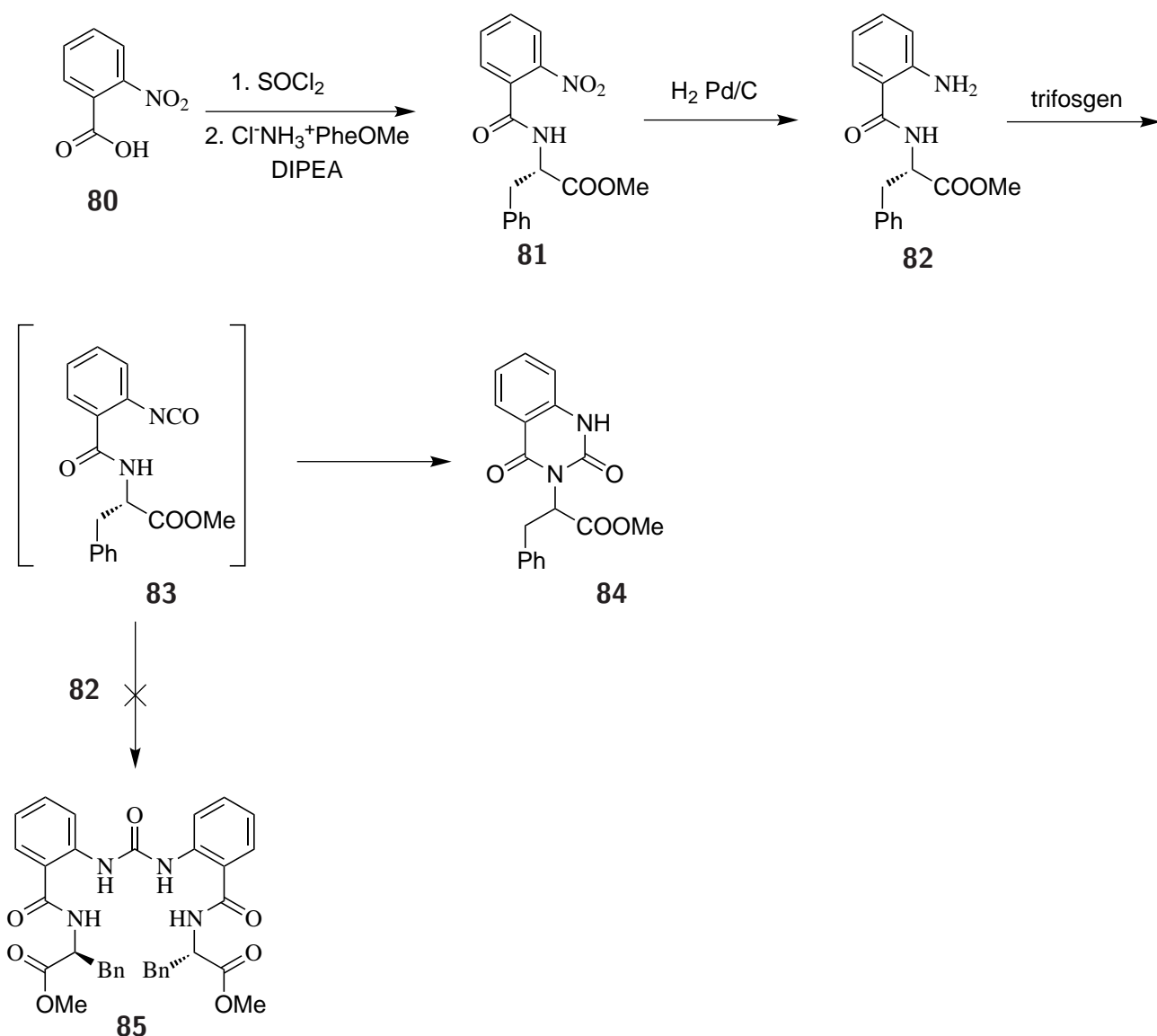
Dla związków z ugrupowaniem –COCCl₃, karboanion CCl₃⁻ jest na tyle dobrą grupą odchodzącą, że znane są przykłady bezpośredniej syntezy amidów z ketonów trichlorometylowych. Próba zastosowanie tej reakcji w moim przypadku, tj. bezpośredniego przereagowania **78** z **76** zakończyła się niepowodzeniem. Keton **78** reagował jedynie z niezabezpieczoną fenyloalaniną, w obecności trietyloaminy, jednak stopień przereagowania był niewielki (20%).

Receptory tej serii będę dalej nazywał w skrócie DEDPM.

3.2.2 Receptory z rdzeniem bis-antranilowo-mocznikowym

Innym autorskim rdzeniem, na którym planowałem zbudować chiralny receptor, był mocznik bisantranilowy **72**. Wiązanie anionu miało być zapewnione przez cztery donory wiązań wodorowych - dwa z ugrupowania mocznikowego i dwa z grup amidowych. Receptory o tym planie budowy starałem się otrzymać wg Schematu 3.3.

Kwas 2-nitrobenzoesowy przekształciłem w chlorek kwasowy, który przereagowałem z estryem metylowym fenyloalaniny w obecności diizopropyluetyloaminy (DIPEA) do amidu **81**. Związek ten poddałem redukcji wodorem na katalizatorze palladowym, co prowadziło do aminy **82**. Aminę tę, w reakcji z trifosgenem, przekształciłem się w izocyjanyan **83**, który, jak się okazało, ulegał wewnątrzcząsteczkowemu zamknięciu pierścienia sześcioczłonowego –**84**. Ze względu na nietrwałość izocyjanyanu synteza receptora **85** tą ścieżką nie była możliwa. Analiza doniesień literaturowych wskazuje, że zaproponowana ścieżka syntetyczna jest możliwa tylko dla związków, w których atom azotu grupy amidowej jest związany z podstawnikiem o dużej

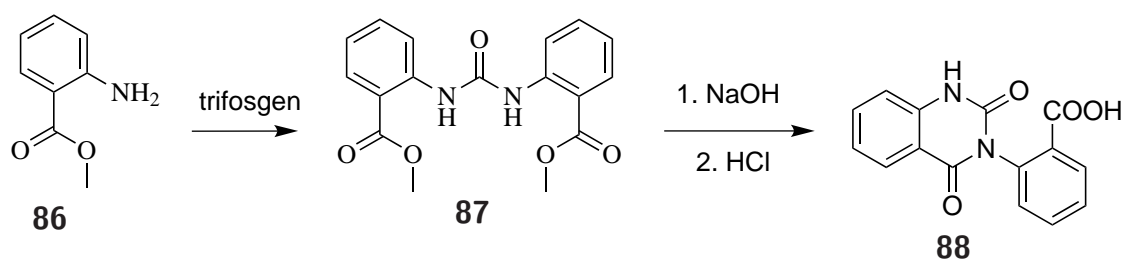


Schemat 3.3: Próba otrzymania chiralnych receptorów z rdzeniem **72**

zawadzie przestrzennej⁹⁹, która uniemożliwia wewnątrzcząsteczkową reakcję.

Z analizy literaturowej wynikało także, że alternatywna metoda syntezy (Schemat 3.4) również nie doprowadzi do oczekiwanego produktu. Synteza prekursora **72** z estru metylowego kwasu antranilowego (**86**) nie jest możliwa, gdyż w ostatnim etapie hydrolizy estru **87** zachodzi wewnątrzcząsteczkowa reakcja substytucji prowadząca do **88**¹⁰⁰.

Synteza docelowego związku **85** byłaby prawdopodobnie możliwa poprzez zabezpieczenie amidowego atomu azotu w związku **81** i odbezpieczenie go po przeprowadzeniu cząsteczki w oczekiwany mocznik. Jednakże złożoność syntezy, w połączeniu z koniecznością wprowadzenia fragmentów aminokwasowych na wczesnym etapie, czyni potencjalne receptory serii MBA niekorzystne z punktu widzenia syntezy biblioteki kombinatoryjnej.



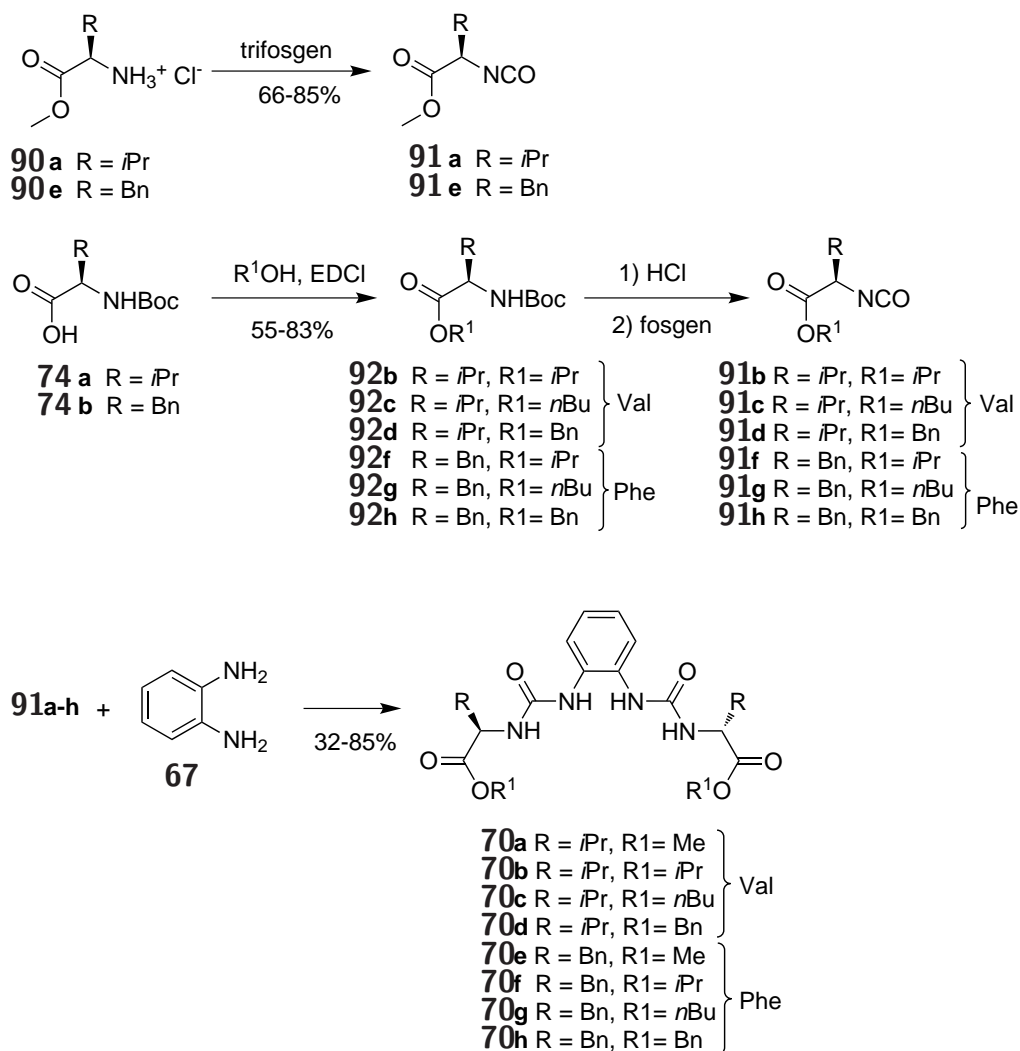
Schemat 3.4: Wewnętrzcząsteczkowa reakcja substytucji uniemożliwiająca otrzymywanie prekursora **72**

3.2.3 Receptory z rdzeniem *o*-fenylenodiaminowym

Achiralne receptory z rdzeniem *o*-fenylenodiaminy efektywnie wiążące m.in. aniony chlorkowy i benzoesowy, zostały opisane przez Gale'a¹⁰¹. Prosta modyfikacja literaturowej syntezy pozwoliła mi uzyskać rodzinę chiralnych receptorów typu **70**, w których jednostka rdzenia jest modyfikowana estrami aminokwasów.

W celu otrzymania związków serii **70** konieczne było przekształcenie fragmentów aminokwasowych w odpowiednie izocyjaniany i przereagowanie ich z *o*-fenylenodiaminą. W syntezie całej rodziny receptorów, z tym samym rdzeniem, dużo bardziej dogodne byłoby jednorazowe przekształcenie diaminy **67** w odpowiedni diizocyjaniian i przereagowanie go z serią estrów aminokwasów. Jednakże **67** w reakcji z fosgenem (lub jego odpowiednikami) daje cykliczny mocznik **89**.

Izocyjaniany z estrów aminokwasów otrzymywałem na dwa sposoby, zależnie od typu estru (Schemat 3.5). Handlowo dostępne estry metylowe waliny i fenyloalaniny **90a,b** poddałem reakcji z trifosgenem we wrzącym toluenie. Izocyjaniany **91a,e** oczyściłem przez destylację pod zmniejszonym ciśnieniem. Niedostępne handlowo estry aminokwasów otrzymałem z Boc-zabezpieczonych aminokwasów **74a,b**, które przereagowałem z alkoholami: izopropylowym, *n*-butylowym i benzylovym w obecności EDCl i katalitycznej ilości DMAP¹⁰³. Grupę aminową estrów **92b-d,f-h** odbezpieczałem przy użyciu 4M HCl w dioksanie i wolne aminy przereagowywałem z fosgenem w celu otrzymania izocyjaniianów **91b-d,f-h**¹⁰⁴, które używałem bez oczyszczania. Izocyjaniany **91a-h** w reakcji *o*-fenylenodiaminą dały receptory **70a-h**, które oczyszczałem chromatograficznie oraz przez krystalizację. Gdy reakcję prowadziłem w dichlorometanie, to po ok 3h pojawiał się galaretowaty osad, który ulegał rozpuszczeniu w miarę postępu reakcji. Osadem musiał być związek pośredni, w którym tylko jedna z grup aminowych została przekształcona w mocznik; bis-mocznik cechuje bowiem lepsza rozpuszczalność. Wydajności reakcji w dichlorometanie były słabe w przypadku prowadzenia reakcji przez 16 h. Zmiana rozpuszczalnika na DMF zapobiegała powstawaniu osadu, reakcja była zakończona po ok. 2h, a wydajności wzrosły do 32-85%. Każdorazowo lepszą wydajność otrzymałem w reakcjach z oczyszczonymi izocyjaniianami **91a,e**.

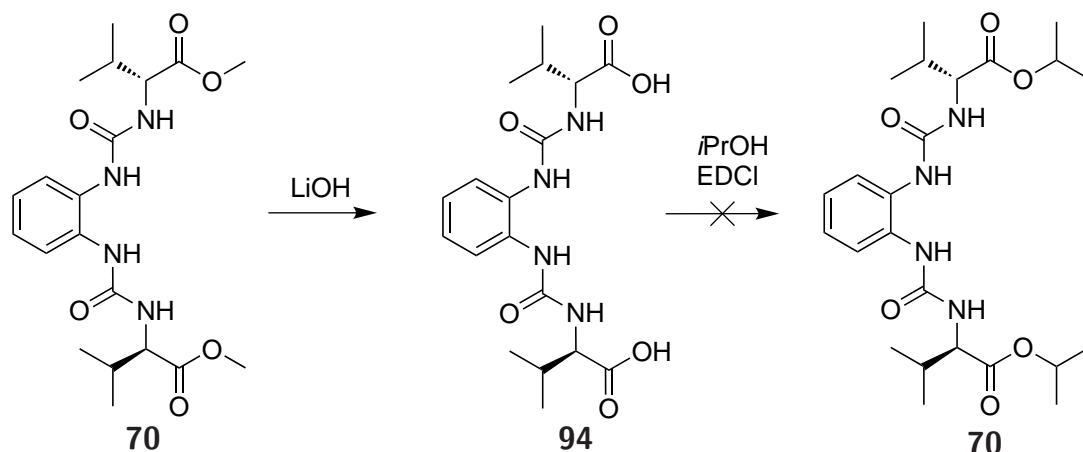


Schemat 3.5: Synteza chiralnych receptorów opartych na *o*-diaminobenzenie

Podjąłem także próbę przeprowadzenia syntezy receptorów typu **70** wg ścieżki, która byłaby bardziej dogodna do otrzymywania bibliotek receptorów. Ester **70e** poddałem hydrolizie wodorotlenkiem litu prowadzącej do odpowiedniego dikwasu **93**, który następnie próbowałem zestyfikować alkoholem izopropylowym przy użyciu EDCI, jednakże nie otrzymałem oczekiwanego estru **70f** (Schemat 3.6).

W celu ustalenia czystości enancjomerycznej receptorów **70** przeprowadziłem dodatkowo syntezę dwóch receptorów D-**70e** i D-**70f** będących enancjomerami odpowiednich receptorów **70e** i **70f**. Receptory szeregu D otrzymałem wg dwóch ścieżek opisanych powyżej wykorzystując D-fenylalaninę jako substrat. Mieszaniny racemiczne D,L-**70e** i D,L-**70f** uzyskałem przez zmieszanie równych ilości enancjomerów i rozdzieliłem je za pomocą HPLC (kolumna Chiralpak AD-H). Dysponując metodą rozdziału enancjomerów określiłem czystość enancjomeryczną **70e,f**, która wynosiła >99% ee.

Receptory omówione powyżej będę dalej nazywał w skrócie DAB.

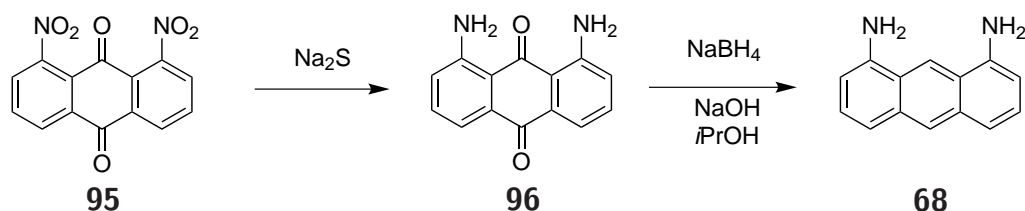


Schemat 3.6: Nieudana alternatywna ścieżka syntezy receptorów typu **70**

3.2.4 Receptory z rdzeniem 1,8-diaminoantracenyowym

Motyw strukturalny 1,8-diaminoantracenu pojawił się w kontekście chemii supramolekularnej anionów początkowo w achiralnych receptorach¹⁰⁵, dopiero później został użyty jako rdzeń układów chiralnych⁴⁶. Podobnie jak w poprzednim przypadku prosta modyfikacja tych ostatnich pozwoliła mi otrzymać rodzinę receptorów **71**.

Prekursor rdzenia otrzymałem zgodnie z procedurą literaturową (Schemat 3.7). 1,8-Dinitroantrachinon (**95**) zredukowałem do diaminy **96**, którą następnie potraktowałem borowodorkiem sodu w środowisku zasadowym otrzymując 1,8-diaminoantracenu (**68**).

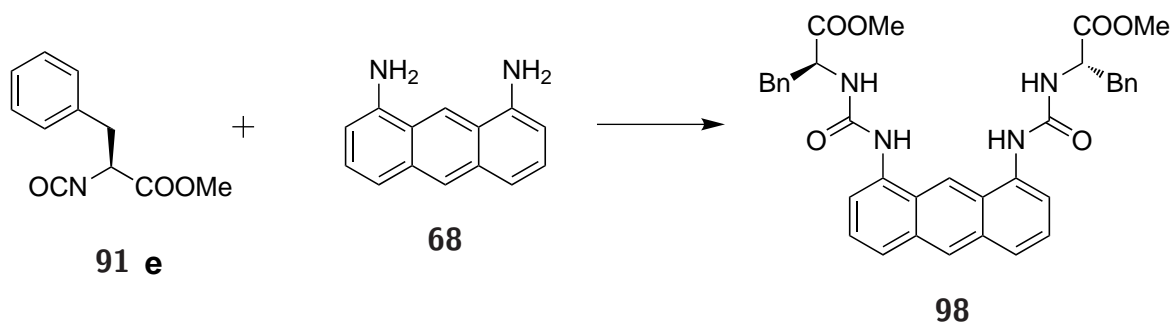


Schemat 3.7: Synteza prekursora rdzenia **68**

Diaminę **68** przereagowałem z izocyjanianem otrzymanym z estru metylowego fenylalaniny, po chromatograficznym oczyszczeniu surowego produktu, wydzieliłem receptor **98** z wydajnością 75%. Związek ten wykazywał dużą tendencję do żelowania w dichlorometanie, acetonie i acetonitrylu. Ze względu na ograniczoną rozpuszczalność receptora, zdecydowałem się zamienić grupę mocznikową na tiomocznikową.

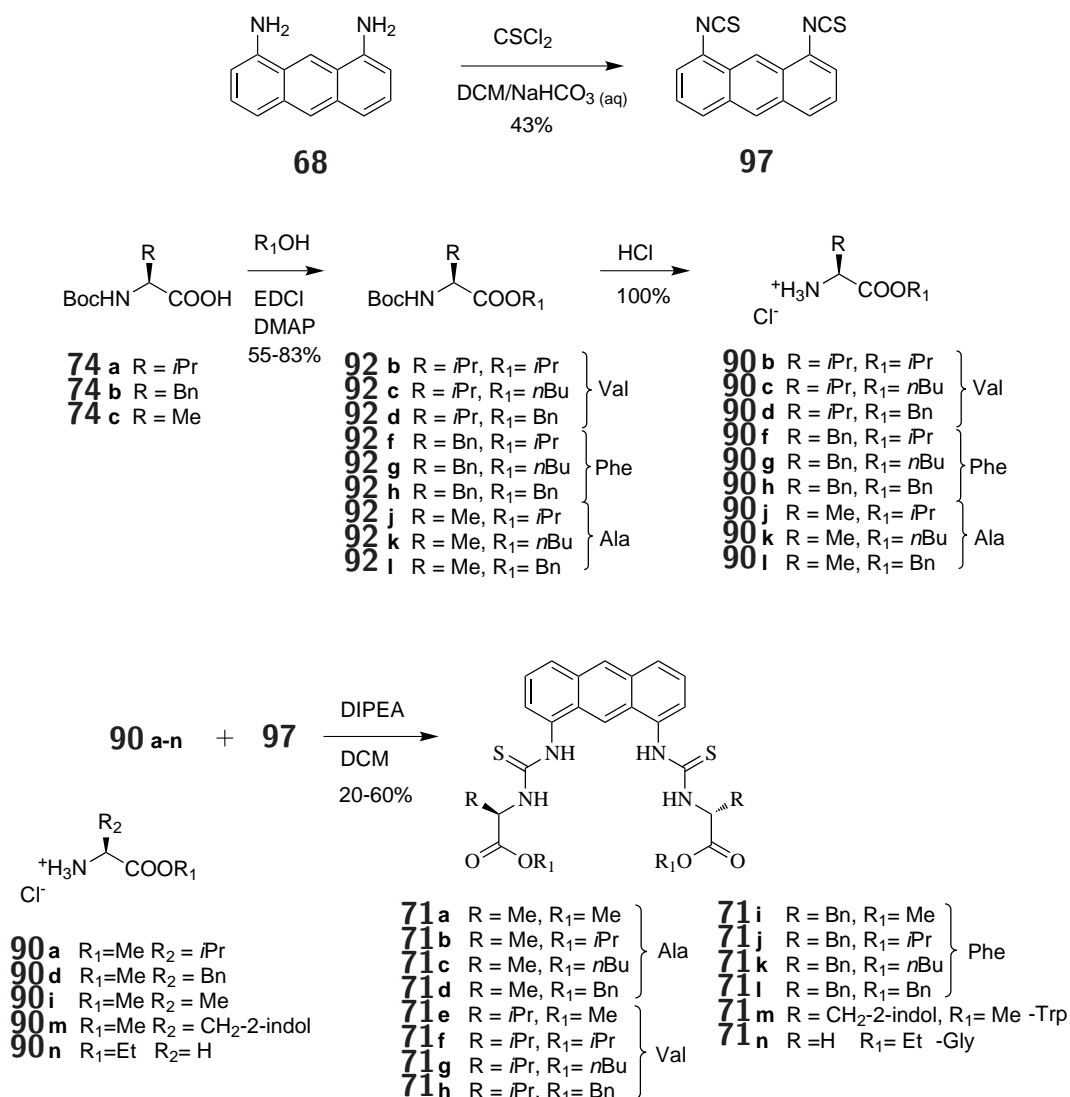
Bazując na literaturowej metodzie, diaminę **68** poddałem reakcji z tiofosgenem, a otrzymany diizotiocyanian **97** oczyściłem przez krystalizację z dichloroetanu z wydajnością 40-55%. Literaturowa procedura zakładająca chromatograficzne oczyszczenie produktu dawała wydajność na poziomie 20%.

Tiomocznikowe otrzymałem na drodze reakcji izotiocyanianu **97** z estrami aminokwasów



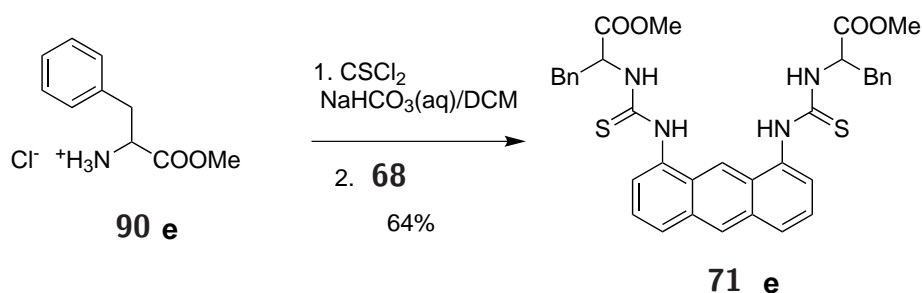
Schemat 3.8: Otrzymywanie mocznikowego receptora **98**

(**90a-n**), wśród które pięć jest handlowo dostępnych (estry metylowe **90a,e,i,m**, oraz etylowy **90n**). Pozostałe otrzymałem otrzymałem wg procedury pokazanej na Schemacie 3.9. Receptory **71a-n** oczyściłem chromatograficznie i poprzez krystalizację. Wydajność ostatniej reakcji była niska (10-30%), co skłoniło mnie do sprawdzenia alternatywnych metod syntezy.



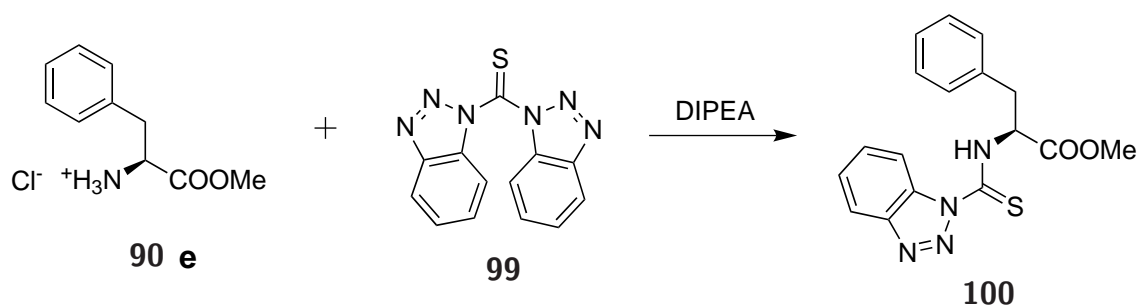
Schemat 3.9: Synteza receptorów serii **71**

Jedną z alternatywnych możliwości otrzymywania receptorów **71** jest reakcję diaminy **68** z izotiocyanianami - pochodnymi aminokwasów (Schemat 3.10). Ta ścieżka syntezy zapewniła zwiększenie wydajności do ok. 60%, była natomiast niekorzystna z punktu widzenia syntezy kombinatoryjnej, ponieważ wymagałaby otrzymywania odpowiednich izotiocyanianów z każdego estru aminokwasu. Dodatkowo, metoda ta reakcji istotnie zwiększyłoby ekspozycje eksperymentatora na toksyczny tiofosgen o wyjątkowo nieprzyjemnym zapachu.



Schemat 3.10: Alternatywna metoda syntezy tiomocznikowych receptorów **71**

W celu poprawy wydajności sprawdziłem także możliwość zastosowania analogu tiofosgenu - bis(benzotriazolo)metanotyonu **99**. Analog ten w reakcji z estrem metylowym fenyloalaniny (**90e**) dawał mieszaninę zawierającą m.in. oczekiwany produkt **100**, nieprzereagowaną aminę i benzotriazol. Stopień konwersji aminy, określony na podstawie widma ^1H NMR mieszaniny, ocenilem na 35%. Wyzdolenie produktu wymagałoby oczyszczania chromatograficznego, co w połączeniu z niską wydajnością zdyskwalifikowało tę metodę jako alternatywę do opracowanej pierwotnie ścieżki.



Schemat 3.11: Otrzymywanie analogu izotiocyanianu z użyciem **99**

Na potrzeby dalszych pomiarów przeprowadziłem dodatkowo syntezę ośmiu receptorów serii D. Receptory D-**71e-I** otrzymałem powtarzając ścieżkę syntetyczną przy użyciu odpowiednio D-waliny i D-fenyloalaniny.

Receptory tej serii będę dalej nazywał w skrócie DAA.

3.3 Oddziaływanie receptorów z anionami

Podczas opracowywania metod syntezy receptorów typu **69**, **70** i **71** wykazałem, że wymagania 1-3 (str. 80) tj. łatwość syntezy, oczyszczania i dobra rozpuszczalność są dla nich spełnione. Analiza kolejnych dwóch warunków – jakości oddziaływania z anionami i możliwości śledzenia tych oddziaływań – wymagała przeprowadzenia pomiarów trwałości kompleksów tych receptorów z modelowymi anionami.

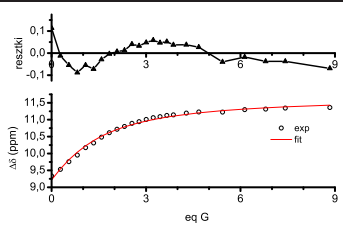
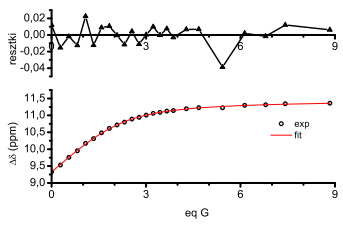
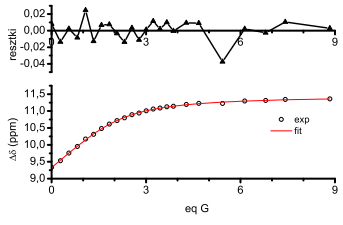
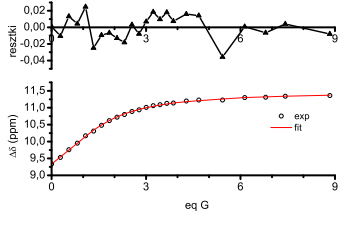
Jako modelowe chiralne aniony do badań wybrałem anion kwasu migdałowego (Man), który jest nieoficjalnym modelowym związkiem w badaniach nad rozpoznanem chiralnym anionów, oraz anion N-acetylofenyloalaniny (AcPhe) jako reprezentanta grupy naturalnych aminokwasów.

3.3.1 Receptory DEDPM

Pierwsze miareczkowanie receptora serii **69** migdałanem TBA w DMSO- d_6 , pod kontrolą 1H NMR, wykazało niemal zupełny brak oddziaływań receptor-anion nawet po dodaniu 10 ekw. gościa (G). Następne miareczkowanie przeprowadzone w $CDCl_3$ pozwoliło zaobserwować wiązanie anionu; kształt krzywej miareczkowania wskazywał na optymalną wartość iloczynu $K_a \cdot [H]_0$. Próby numerycznego dopasowania krzywej teoretycznej za pomocą programu WinE-qNMR skutkowały za każdym razem silnie sinusoidalnym rozkładem resztek (Tabela 3.1A). Jeżeli dane doświadczalne dopasowywałem modelem $HG + HG_2$, wówczas resztki przyjęły rozkład losowy a parametr określający jakość dopasowania - RMSE (*root of mean square error* - pierwiastek ze średniej kwadratów odchyień) znacząco się obniżył. Stechiometrię 1 : 1 + 1 : 2 potwierdziłem wykresem Joba. Podczas dalszej analizy danych zaobserwowałem, że dopasowana para wartości $K^{1:1}$ i $K^{1:2}$ bardzo silnie zależy od wprowadzonych do programu startowych wartości stałych. Uznałem, że te trudności w analizie numerycznej wynikają ze zbyt małej liczby punktów miareczkowania oraz z niewłaściwej ich dystrybucji. Miareczkowanie powtórzyłem zbierając 24 pkt. w szerokim zakresie. Nawet dla takiego zestawu danych w procesie dopasowywania krzywej teoretycznej, procedura zatrzymała się w trzech różnych minimach lokalnych w zależności od startowego zestawu oszacowanych stałych. Dwa minima praktycznie nie różniły się parametrami oceniającymi jakość dopasowania, trzecie natomiast cechowało nieznacznie większe RMSE. Trzy przebiegi dopasowanych krzywych, wraz z resztkami i parametrami dopasowania, przedstawia Tabela 3.1B-D.

Dopasowania B) i C) cechują niższe wartości RMSE a pary wartości $K^{1:1}$ i β_2 są zbliżone w tych dwóch przypadkach. Dopasowanie D) ma diametralnie różne wartości stałych trwałości, $K^{1:1}$ różni się w porównaniu z dopasowaniami B) i C) o 5 rzędów wielkości. Dla wszystkich dopasowań stałe obarczone są ogromną niepewnością ich wyznaczenia. W dopasowaniu B) otrzymałem wartości odpowiadające przedziałowi $K^{1:1} \in (129; 372)$, zaś dla do-

Tabela 3.1: Różne dopasowania przebiegu miareczkowania receptora **69a** (*S*)-migdałanem TBA w CDCl_3

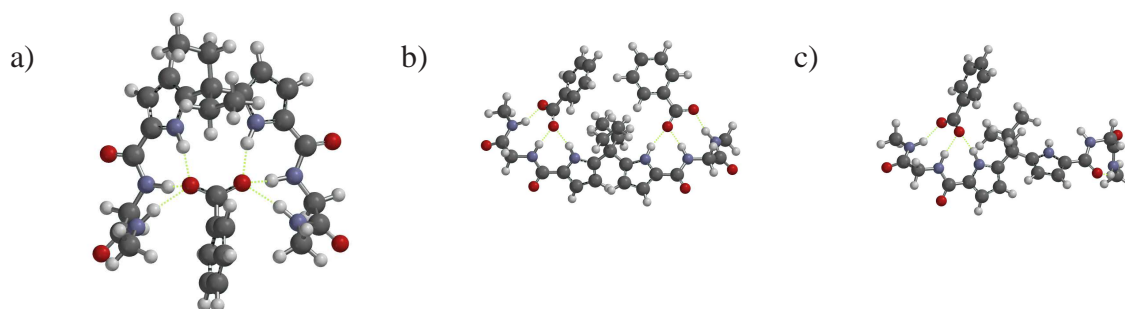
	Dopasowanie danych	RMSE	$\log(K^{1:1})$	$\log(\beta_2)$
A ^a		0,0496	$5,9 \pm 5,6$	-
B		0,0123	$2,34 \pm 0,23$	$4,26 \pm 0,21$
C		0,0120	$2,54 \pm 0,28$	$4,48 \pm 0,27$
D		0,0144	$7,4 \pm 2,3$	$9,3 \pm 2,3$

^a dopasowanie modelem 1 : 1

pasowania C) $K^{1:1} \in (182; 660)$. Dla dopasowania D) niepewność obejmuje 4 rzędy wielkości ($\Delta \log(K) = 2,6$), zatem wyznaczona wartość liczbową jest bezwartościowa. Przeprowadzone miareczkowanie pozwala jedynie określić rząd wielkości stałych $K^{1:1}$ i $K^{1:2}$, co oznacza brak możliwości określenia rozpoznania chiralnego dla badanych receptorów. Powyższa trudność analityczna w połączeniu z niskim powinowactwem receptorów serii DEDPM do modelowego migdałanu TBA zdyskwalifikowały tę serię do dalszych badań.

Projektując receptory oparte na dipirometanie, zakładałem tworzenie kompleksu o stechiometrii 1 : 1, którego przybliżoną strukturę przedstawia Rys. 3.2a). Proste modelowanie molekularne sugerowało, że w optymalnej konformacji receptor może tworzyć z anionem sześć wiązań wodorowych. Dla kompleksu 1 : 2 wymodelowałem strukturę z Rys. 3.2b), w której każda z podjednostek pirol-aminokwas-amid wiąże niezależnie po jednym anionie. Niska wartość sta-

łej $K^{1:1}$ przemawia na niekorzyść konformacji kompleksu z Rys. 3.2a). Stosunek stałych dla dopasowania C) wynosi $K^{1:1}/K^{1:2} \approx 4$, co jest wartością typową dla receptorów posiadających dwa zupełnie niezależne miejsca wiążące (brak dodatnich i ujemnych efektów allosterycznych). Te dwie obserwacje przemawiają za strukturą kompleksu HG przedstawioną na Rys. 3.2c), wiązanie anionu realizowane jest przez trzy wiązania wodorowe, a dwie grupy etylowe stanowią znaczną zawadę przestrzenną. Obserwacja ta wskazuje, że dla receptorów o dużej swobodzie konformacyjnej struktura powstającego kompleksu może być sprzeczna z intuicją i trudna do przewidzenia.



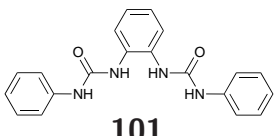
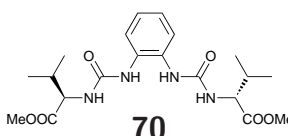
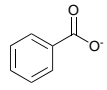
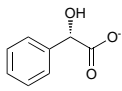
Rysunek 3.2: Struktury modelowego receptora typu **69** z jedną lub dwiema cząsteczkami anionu (modelowy benzoesan) zoptymalizowane na poziomie AM6

3.3.2 Receptory DAB

Mając na uwadze przedstawione powyżej niepowodzenia w opracowywaniu własnej platformy dla receptorów, zdecydowałem się zastosować platformę znaną z doniesień literaturowych, która zapewniałaby łatwą syntezę receptorów, ich duże powinowactwo do karboksylanów i, poprzez odpowiednią budowę i układ donorów wiązań wodorowych, wykluczałaby powstawanie kompleksów o wyższych stechiometriach. Jako jedną z najprostszych platform wybrałem przebadany w zespole Gale'a¹⁰⁶ receptor oparty na dwóch grupach mocznikowych będący pochodną 1,2-diaminobenzenu. Mimo prostej budowy, receptor ten wykazuje duże powinowactwo do karboksylanów. Podana w publikacji stała trwałości kompleksu receptora **101** z benzoesanem TBA wynosi 1300 M^{-1} (DMSO- d_6 , 298 K). Na podstawie miareczkowania w tych samych warunkach wyznaczyłem stałą trwałości dla kompleksu **70a** z (*S*)-migdałanem TBA, $K = 29 \text{ M}^{-1}$. Zmniejszenie stałej trwałości o prawie dwa rzędy wielkości, spowodowane zmianą łańcuchów bocznych w receptorze oraz zmianą G na inny anion karboksylanowy, wzbudziło moje zainteresowanie. Przeprowadziłem dodatkowe miareczkowania w celu wyznaczania stałych trwałości kompleksów **101** z migdałanem oraz **70a** z benzoesanem. Wyniki te przedstawia Tabela 3.2.

Jak wynika z analizy powyższej Tabeli, w przypadku benzoesanu, zamiana podstawników w ramionach receptora z aromatycznych na alifatyczne, o trochę większych wymaganiach sterycznych, praktycznie nie powoduje zmiany stałej trwałości. Zamiana benzoesanu na migdałan

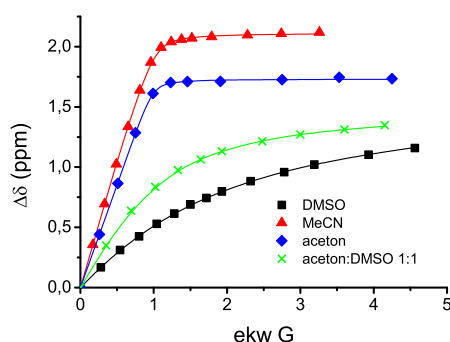
Tabela 3.2: Porównanie powinowactwa chiralnego i achiralnego receptora do achiralnego benzoianu i chiralnego migdalanu TBA^a.

Anion	Receptor	
	 101	 70
	1300 ^b	1130
	152	29

^aStałe trwałości [M^{-1}] wyznaczone za pomocą miareczkowania 1H NMR w $DMSO-d_6 + 0.5\% H_2O$ ^bCyt. 106

dla achiralnego receptora **101** spowodowała prawie 9-krotny spadek wartości K . Zmniejszenie trwałości kompleksu wynika moim zdaniem głównie z różnic w gęstości elektronowej w grupie karboksylowej obu anionów. Względy steryczne wydają się odgrywać drugorzędą rolę. Inaczej przedstawia się zamiana receptora z **101** na **70a** dla kompleksów z migdalanem. 5-krotny spadek wartości K dla tego anionu musi wynikać z konieczności pokonania zawady przestrzennej, która dopiero dla pary **70a**-migdalan staje się istotna.

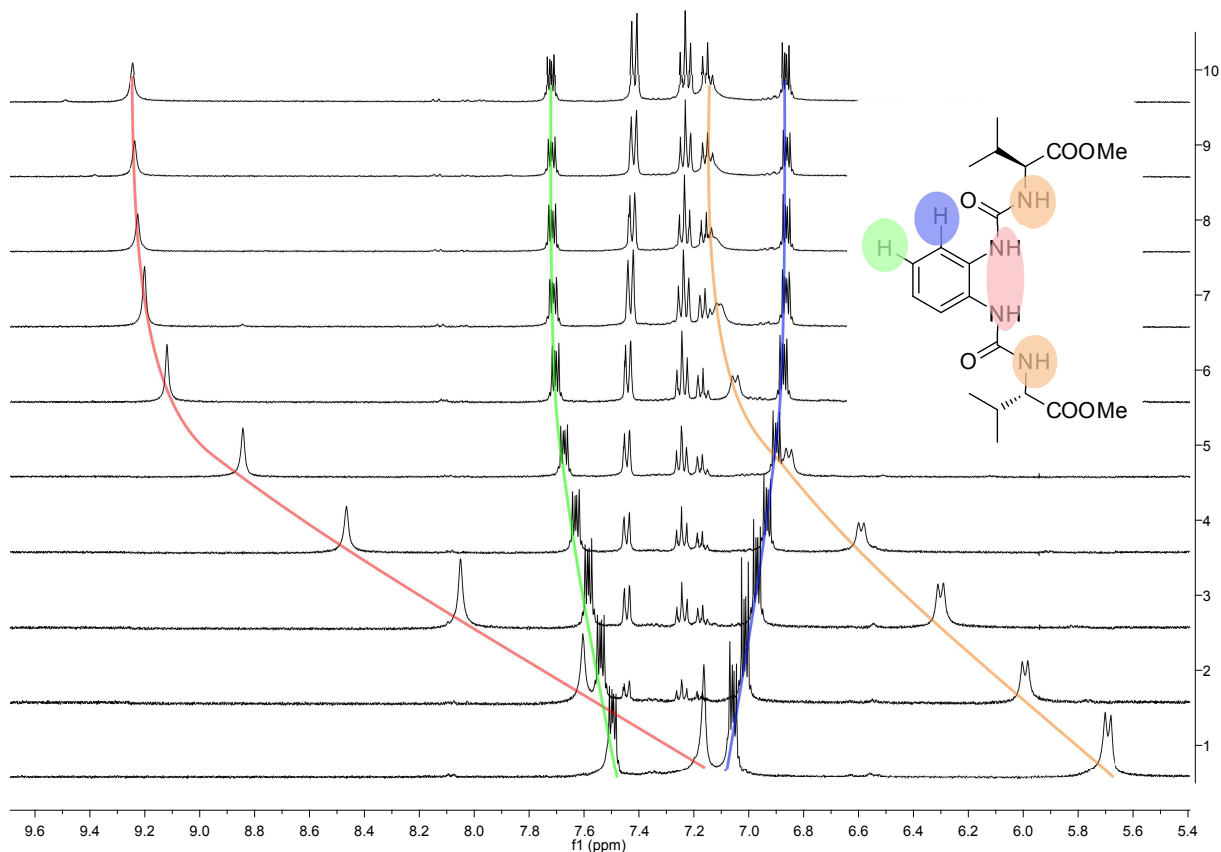
Ze względu na małą wartość stałej trwałości w DMSO, zdecydowałem przeprowadzić dodatkowe miareczkowania w innych rozpuszczalnikach. Przetestowałem mieszaninę DMSO : aceton 1 : 1, acetonitryl oraz aceton, otrzymując stałe K odpowiednio 188, ~ 7000 i $>10000M^{-1}$ (Wykres 3.1). We wszystkich testowanych rozpuszczalnikach, zarówno krzywe Joba, jak również stochastyczne rozkłady resztek po dopasowaniu danych, wskazują jednoznacznie na prostą stechiometrię kompleksu 1 : 1.



Wykres 3.1: Porównanie miareczkowań **70a** (*S*)-migdalanem TBA w różnych rozpuszczalnikach. Przebiegi miareczkowań dotyczą zmian przesunięć chemicznych ($\Delta\delta$) wewnętrznych protonów mocznikowych.

Podczas miareczkowania oba sygnały protonów grupy mocznikowej uległy zgodnemu przesunięciu w dół pola. Aromatyczne protony grupy diaminobenzenu ulegały przeciwnym przesunięciu w dół pola.

nięciom (Rys. 3.3). Sygnały protonów 3 i 6 przesunęły się w dół pola, natomiast sygnały protonów 4 i 5 w górę pola. Różnice te spowodowane są efektami indukcyjnymi i mezomerycznymi. Kompleksowanie anionu powoduje przenoszenie gęstości elektronowej z grup mocznikowych do pierścienia. Gęstość ta jest najbardziej efektywnie przenoszona w pozycje 4 i 5 pierścienia.

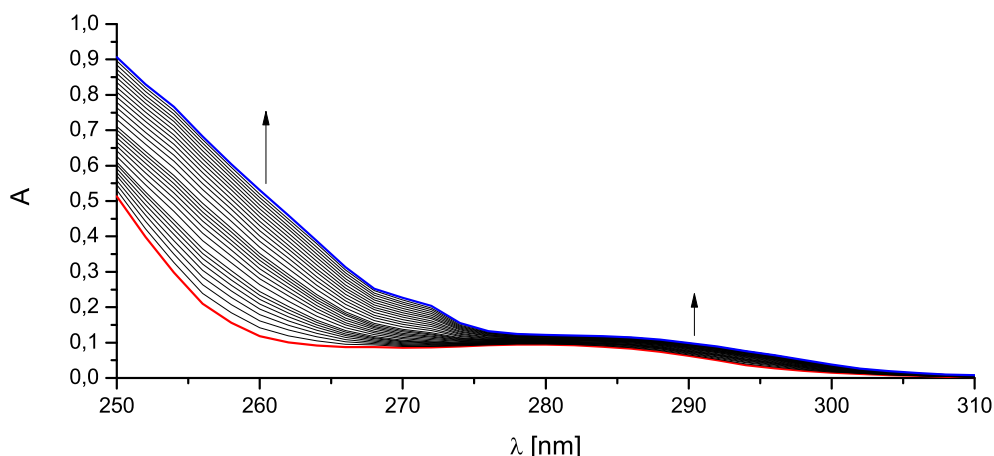


Rysunek 3.3: Miareczkowanie receptora **70a** (*S*)-migdałanem TBA w acetonitrylu- d_3 pod kontrolą ^1H NMR

Dalsze miareczkowania zdecydowałem się prowadzić pod kontrolą spektrometrii UV-Vis. Do tego celu szczególnie nadaje się acetonitryl, który cechuje duża transmitancja w szerokim zakresie widma (> 210 nm). Wartość stałej trwałości kompleksów w acetonitrylu wskazuje, że pomiary przy stężeniu $\sim 1 \times 10^{-5}$ M będą znajdowały się w optymalnym zakresie wartości $K \cdot [\text{H}]_0$ (str. 35). Z powyższych powodów wybrałem acetonitryl jako rozpuszczalnik do prowadzenia dalszych miareczkowań określających rozpoznanie chiralne. Podczas miareczkowania śledziłem zmiany w paśmie absorpcji grupy mocznikowej (Wykres 3.2).

3.3.3 Receptory DAA

Dla modelowego receptora serii DAA (**71i**) przeprowadziłem miareczkowania migdałanem TBA pod kontrolą ^1H NMR w DMSO- d_6 oraz acetonitrylu- d_3 . Stała trwałości w DMSO wynosiła 64, zaś w MeCN >10000 . Oba sygnały pochodzące od ugrupowań tiomocznikowych

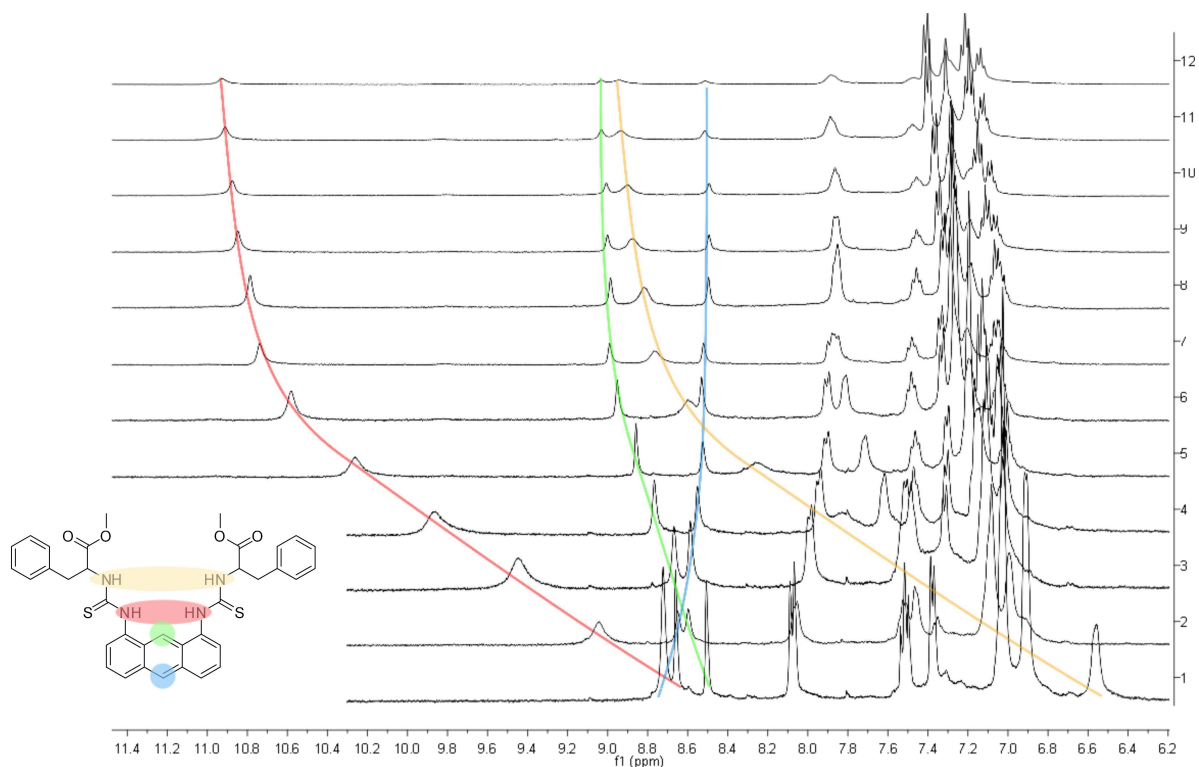


Wykres 3.2: Typowy przebieg miareczkowania receptorów serii DAB migdalanem TBA pod kontrolą spektrometrii UV-Vis

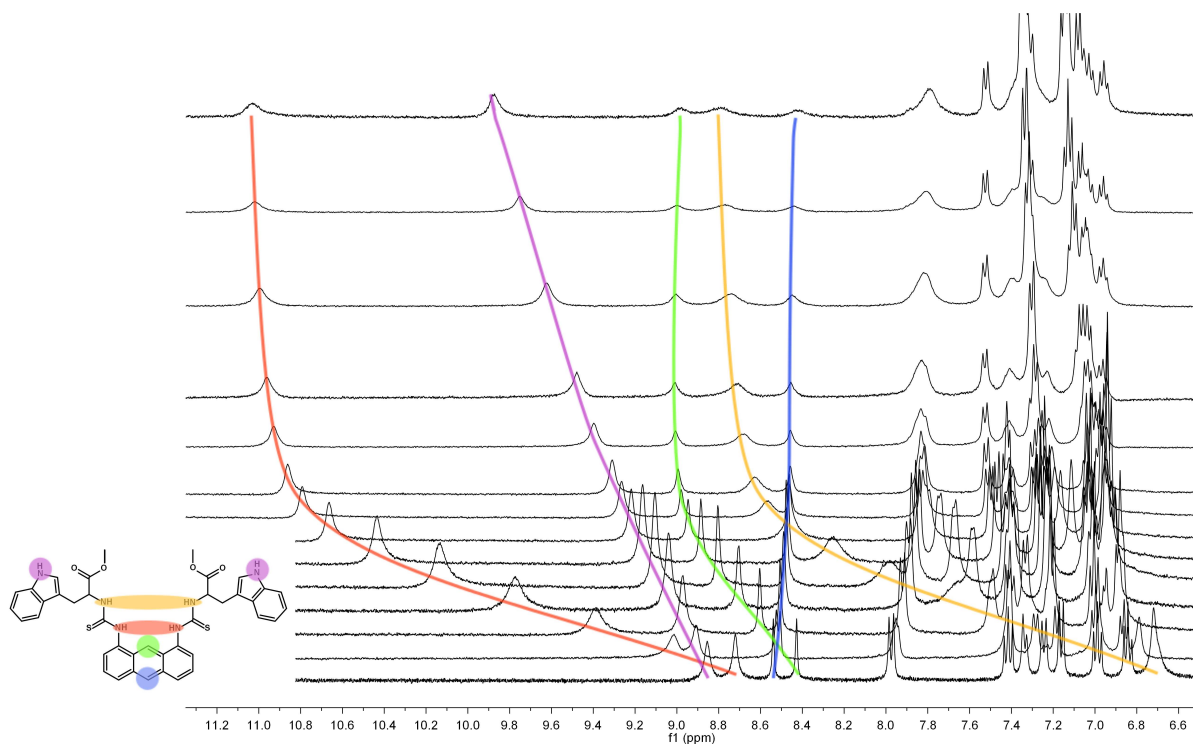
ulegają przesunięciu w dół pola w miarę wzrostu stężenia G. Podobnie zachowuje się aromatyczny proton w pozycji 9, który uczestniczy w wiązaniu anionu. Proton w pozycji 10 układu antracenu ulega przeciwnemu przesunięciu – w górę pola, co spowodowane jest zwiększeniem gęstości elektronowej w tej pozycji na skutek związania anionu (Rys. 3.4). Zarówno wykres Joba, jak i rozkład resztek po dopasowaniu modelem 1 : 1, wskazują na prostą stechiometrię tworzonych kompleksów.

Konieczne było jednak sprawdzenie receptora z ugrupowaniem tryptofanu w łańcuchu bocznym (**70m**). Uważałem, że istnieje uzasadnione podejrzenie, że indolowe grupy NH, stanowiące dodatkowe donory wiązań wodorowych, mogą zaburzyć prostą stechiometrię wiązania anionu. Wykres Joba dla tego receptora z migdalanem wskazuje na stechiometrię 1 : 1, jednakże uważana analiza resztek i przebiegu miareczkowania sugeruje bardziej złożony model. Interesujące jest zachowanie sygnałów indolowych protonów NH. W zakresie 0-1 ekw. anionu sygnały te ulegają przesunięciu, jednak nie dążą do plateau. Po przekroczeniu 1 ekw. G sygnały protonów indolowych nadal przesuwały się w dół pola, co świadczy o następczym akcie wiązania anionu. Dodatkowe donory wiązania wodorowego, które w założeniu miały pomóc w realizacji rozpoznania chiralnego, powodują istotną komplikację oddziaływań receptor-anion i w konsekwencji utrudniają analizy. Jakkolwiek receptor z tryptofanem może wykazywać dobre właściwości rozpoznania chiralnego, musiałem wykluczyć go z badanej serii, gdyż uzyskane dla niego wyniki nie byłyby dostatecznie wiarygodne, aby posłużyć do określenia stosowalności alternatywnych metod badania rozpoznania chiralnego.

Do śledzenia procesu wiązania anionów przez receptory serii DAA można zastosować spektroskopię emisyjną, gdyż receptory te wykazują niebieską fluorescencję ($\lambda_{em}^{max} =$, $\lambda_{exc} =$), która ulega osłabieniu na skutek wiązania anionu (Rys. 3.6a). Efekt ten nie jest bardzo silny, gdyż receptor w pełni skompleksowany wykazuje fluorescencję o intensywności równej ok. 1/2 wartości początkowej, niemniej osłabienie emisji może być widoczne gołym okiem, jak pokazuje

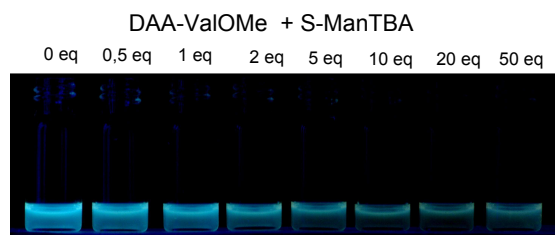


Rysunek 3.4: Przebieg miareczkowania receptora **71i** (*S*)-migdalanem TBA w acetonitrylu- d_3 pod kontrolą ^1H NMR



Rysunek 3.5: Przebieg miareczkowania receptora **71m** (*S*)-migdalanem TBA. Protony indolowe nie osiągną plateau po przekroczeniu 1 ekw G, ale ulegają silniejszemu przesunięciu.

Rys. 3.6.



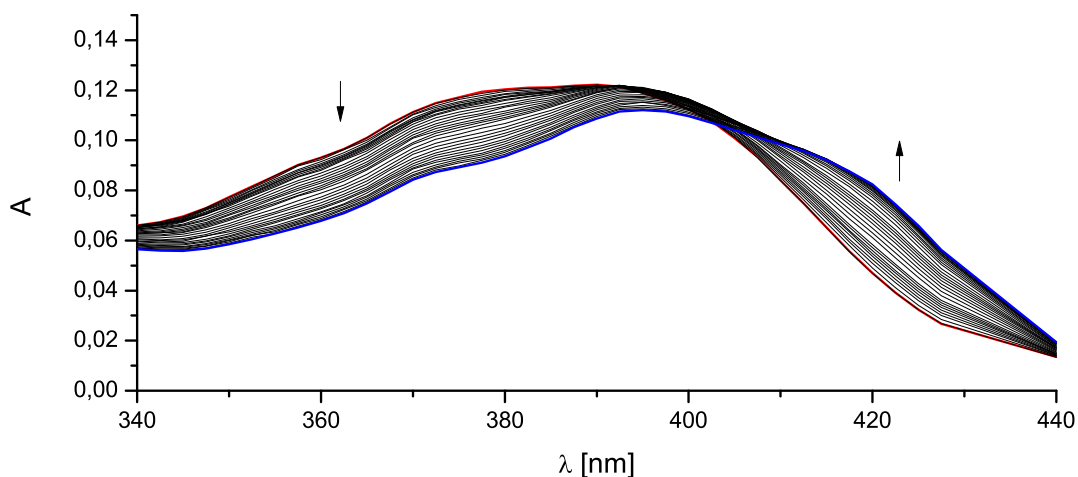
Rysunek 3.6: Osłabienie intensywności fluorescencji spowodowane wiązaniem anionu przez receptor ($\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$)

Żaden ze sprawdzonych przeze mnie receptorów serii DAA nie wykazywał dobrych właściwości sensorycznych, gdyż kompleksy z każdym z enancjomerów, zarówno migdalanu TBA jak i N-Ac-PheOTBA, posiadają takie same wartości Y_{HG} (patrz. str 28). Część miareczkowań prowadziłem pod kontrolą spektrofotometryczną, jednak dla kilku receptorów obserwowałem nietypowy przebieg miareczkowania z trudnymi do wytłumaczenia maksimami w początkowej fazie. Jak wynika z analizy TLC, receptory wykazujące nietypowe przebiegi były zanieczyszczone bardzo niewielkimi ilościami związku wykazującego bardzo silną żółtą fluorescencję. Zanieczyszczenia te musiały stanowić <2% mieszaniny, gdyż były zupełnie niewidoczne na widmie NMR. Widmo emisji tych zanieczyszczeń musiało nakładać się na widmo emisji receptorów. Sama obecność dodatkowej emisji nie stanowiłaby problemu przy miareczkowaniu (stały poziom tła), jednak związki te musiały również oddziaływać z anionem, co przejawiało się zmianą ich właściwości emisyjnych. Obserwowany przebieg miareczkowania był zatem superpozycją zmieniających się widm emisyjnych od dwóch składników, stężenie jednego z nich nie było znane. Oczywiście miareczkowanie takie nie nadawało się do analiz ilościowych.

O ile właściwości emisyjne (w szczególności wydajność kwantowa fluorescencji) mogą się bardzo silnie różnić nawet dla dwóch związków o zbliżonej strukturze, tak ich właściwości absorpcyjne zwykle pozostają podobne i zanieczyszczenie o bardzo małej zawartości powinno mieć znikomy wpływ na obserwowane widmo absorpcji. Z tego powodu dalsze miareczkowania receptorów DAA prowadziłem pod kontrolą spektroskopii UV-Vis. Obserwowałem zmiany absorpcji w obrębie pasma odpowiadającego chromoforowi grupy tiomocznikowej. Typowe zmiany przedstawia Wykres 3.3.

3.4 Wyznaczanie jakości rozpoznania chiralnego receptorów za pomocą klasycznej metody miareczkowania

Po przeprowadzeniu wstępnych pomiarów pod kontrolą spektrometrii NMR i po ustaleniu stechiometrii powstających kompleksów przystąpiłem do wyznaczenia stałych trwałości komplek-



Wykres 3.3: Typowy przebieg miareczkowania receptorów serii DAA migdalanem TBA pod kontrolą spektrometrii UV-Vis

sów receptorów z każdym z enancjomerów modelowych karboksylanów. Miareczkowania zdecydowałem się prowadzić pod kontrolą spektrometrii UV-Vis. W rutynowym stosowaniu miareczkowanie tego typu ma wiele zalet, część z nich została przedstawiona w Tabeli 2.7 (str. 46). W kontekście moich badań największymi zaletami były:

1. zmniejszenie niepewności stężeń przygotowanych roztworów H i G,
2. zmniejszenie niepewności dopasowywania poprzez jednoczesną analizę wszystkich długości fali (program HyperSpec),
3. praca na niskich stężeniach poprawiająca precyzję i dokładność pomiaru (optymalna wartość iloczynu $K_a \cdot [H]_0$),
4. możliwość automatyzacji pomiaru.

ad. 1) Pełną analizę potencjalnych źródeł błędów grubych oraz oszacowanie niepewności stężeń przygotowanych roztworów przeprowadziłem w Rozdziale 5.2.1 str. 187. Porównałem tam też procedury przygotowywania roztworów do miareczkowań NMR i UV-Vis. Dzięki użyciu kolb jednomiarowych mogę osiągnąć znacznie lepszą precyzję stężeń przygotowanych roztworów. Niskie stężenia gwarantują, że gęstość roztworu jest praktycznie taka sama jak gęstość rozpuszczalnika, zatem objętość roztworu H w kuwecie mogłem określić z wysoką dokładnością na podstawie ważenia. Dodatkowo, pompa strzykawkowa dozująca porcje titranta zapewnia zdecydowanie lepszą precyzję niż ręczne dodawanie roztworu - jedynym stałym źródłem błędu jest tutaj dokładność średnicy tłoka użytej strzykawki.

ad. 2) Program HyperSpec traktuje dane z miareczkowania jako macierz, której elementem $A_{i,j}$ jest wartość absorbancji dla stężeń $[H]_0$ i $[G]_0$ w i -tym punkcie miareczkowania dla długości fali λ_j . Program dla każdej długości fali dopasowuje osobne $\epsilon_H(\lambda)$, $\epsilon_G(\lambda)$ i $\epsilon_{HG}(\lambda)$. Zaś dla

wszystkich rejestrowanych λ optymalizuje jedną, globalną wartość K . Takie podejście znacznie poprawia dokładność i precyzję dopasowania. Na podstawie analizy statystycznej czterokrotnie powtórnego miareczkowania **70a** z (*S*)-migdałanem TBA oszacowałem niepewność wszystkich pomiarów na $\pm 6\%$.

ad. 3) Nie wymaga komentarza.

ad. 4) 20 receptorów, dwie pary G, przy dwukrotnym powtórzeniu każdego pomiaru dało 160 miareczkowań. Automatyzacja procesu pozwala przeprowadzić ok. trzy miareczkowania na godzinę, przy czym w trakcie trwania analizy można przygotowywać kolejne naważki, roztwory i napełniać kuwety.¹

Wyniki uzyskane na podstawie miareczkowań przedstawiają Tabele 3.3 i 3.4. Na podstawie wyników widać wyraźnie, że anion N-acetylofenyloalaniny jest wiązany znacznie silniej niż migdałan. Stosunek stałych K_{AcPhe}/K_{Man} wynosi średnio 8,6 (rozrzut 7,3-9,6; $\sigma = 0,9$) dla receptorów serii DAB i 11,2 (8,7-13,4; $\sigma = 1,5$) dla serii DAA. Różnice w stałych trwałości kompleksów dla tych anionów wynikają zapewne głównie z różnic w gęstości elektronowej grupy karboksylanowej. Dodatkowym czynnikiem może być tworzenie wiązań wodorowych z udziałem amidowej grupy NH anionu AcPhe i grup estrowych receptora, jednak nie posiadam dowodów na poparcie tej tezy.

Tabela 3.3: Wyznaczone wartości stałych trwałości kompleksów K [M^{-1}] receptorów serii DAB z chiralnymi karboksylanami (MeCN, 298K). $\Delta K = \pm 6\%$, $\Delta\alpha = \pm 8,5\%$

Receptor	Man			AcPhe		
	(<i>S</i>)-Man	(<i>R</i>)-Man	α (<i>S</i> / <i>R</i>)	D-AcPhe	L-AcPhe	α (D/L)
a ValOMe	$1,23 \times 10^4$	$1,19 \times 10^4$	1,03	$7,20 \times 10^4$	$7,24 \times 10^4$	0,99
b ValOiPr	$7,17 \times 10^3$	$7,24 \times 10^3$	0,99	$8,09 \times 10^4$	$8,81 \times 10^4$	0,92
c ValOnBu	$8,50 \times 10^3$	$8,29 \times 10^3$	1,03	$9,40 \times 10^4$	$1,04 \times 10^5$	0,90
d ValOBn	$1,00 \times 10^4$	$1,05 \times 10^4$	0,95	$6,97 \times 10^4$	$6,66 \times 10^4$	1,05
e PheOMe	$9,56 \times 10^3$	$9,45 \times 10^3$	1,01	$6,50 \times 10^4$	$5,70 \times 10^4$	1,14
f PheOiPr	$6,99 \times 10^3$	$7,54 \times 10^3$	0,93	$7,17 \times 10^4$	$6,32 \times 10^4$	1,13
g PheOnBu	$7,48 \times 10^3$	$8,19 \times 10^3$	0,91	$8,20 \times 10^4$	$7,20 \times 10^4$	1,14
h PheOBn	$8,60 \times 10^3$	$9,09 \times 10^3$	0,95	$7,08 \times 10^4$	$6,94 \times 10^4$	1,02

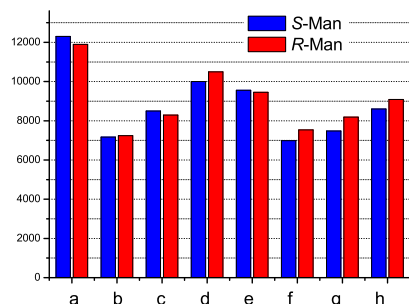
Graficzna prezentacja tych wyników miareczkowań – Wykres 3.4 – pozwala zauważyć pewne zależności między stałymi trwałości kompleksów a podstawnikami R^1 i R^2 w receptorach obu serii (Schemat 3.12).

¹Dla porównania jedno miareczkowanie NMR trwa ok 45-70 min, zaś przygotowanie naważek i roztworów to kolejne ok. 20 min/próbkę.

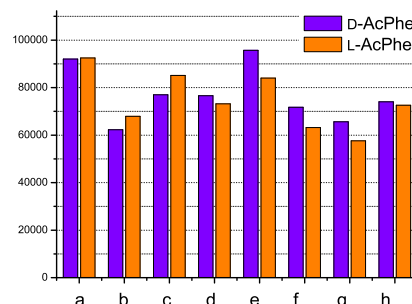
Tabela 3.4: Wyznaczone wartości stałych trwałości kompleksów K [M^{-1}] receptorów serii DAA z chiralnymi karboksylanami (MeCN, 298K). $\Delta K = \pm 6\%$, $\Delta\alpha = \pm 8,5\%$

Receptor	Man			AcPhe		
	(<i>S</i>)-Man	(<i>R</i>)-Man	α (<i>S</i> / <i>R</i>)	D-AcPhe	L-AcPhe	α (D/L)
a AlaOMe	$1,27 \times 10^4$	$1,40 \times 10^4$	0,91	$1,54 \times 10^5$	$1,68 \times 10^5$	0,92
b AlaOiPr	$1,01 \times 10^4$	$1,21 \times 10^4$	0,83	$1,22 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$	0,99
c AlaOnBu	$1,37 \times 10^4$	$1,51 \times 10^4$	0,91	$1,31 \times 10^5$	$1,43 \times 10^5$	0,92
d AlaOBn	$1,14 \times 10^4$	$1,31 \times 10^4$	0,87	$1,35 \times 10^5$	$1,50 \times 10^5$	0,90
e ValOMe	$3,81 \times 10^4$	$4,61 \times 10^4$	0,83	$3,69 \times 10^5$	$3,65 \times 10^5$	1,01
f ValOiPr	$2,48 \times 10^4$	$3,11 \times 10^4$	0,80	$2,67 \times 10^5$	$2,65 \times 10^5$	1,01
g ValOnBu	$2,88 \times 10^4$	$3,24 \times 10^4$	0,89	$3,74 \times 10^5$	$3,24 \times 10^5$	1,15
h ValOBn	$3,07 \times 10^4$	$3,84 \times 10^4$	0,80	$4,20 \times 10^5$	$4,29 \times 10^5$	0,98
i PheOMe	$6,52 \times 10^3$	$8,22 \times 10^3$	0,79	$9,32 \times 10^4$	$1,01 \times 10^5$	0,92
j PheOiPr	$6,28 \times 10^3$	$6,01 \times 10^3$	1,04	$8,53 \times 10^4$	$8,37 \times 10^4$	1,02
k PheOnBu	$5,94 \times 10^3$	$6,32 \times 10^3$	0,99	$5,97 \times 10^4$	$5,74 \times 10^4$	1,04
l PheOBn	$8,16 \times 10^3$	$8,79 \times 10^3$	0,93	$1,17 \times 10^5$	$1,14 \times 10^5$	1,03

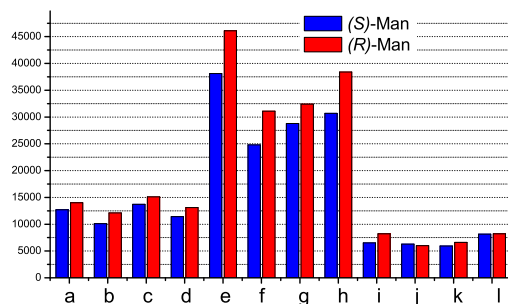
a)



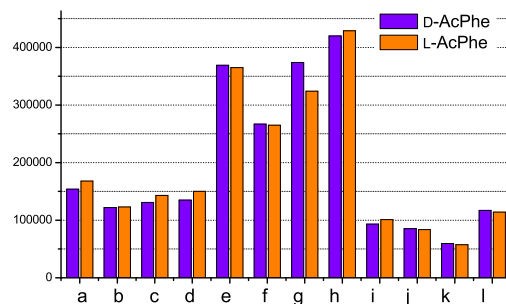
b)



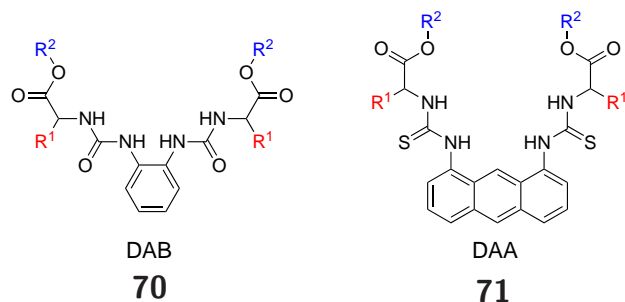
c)



d)

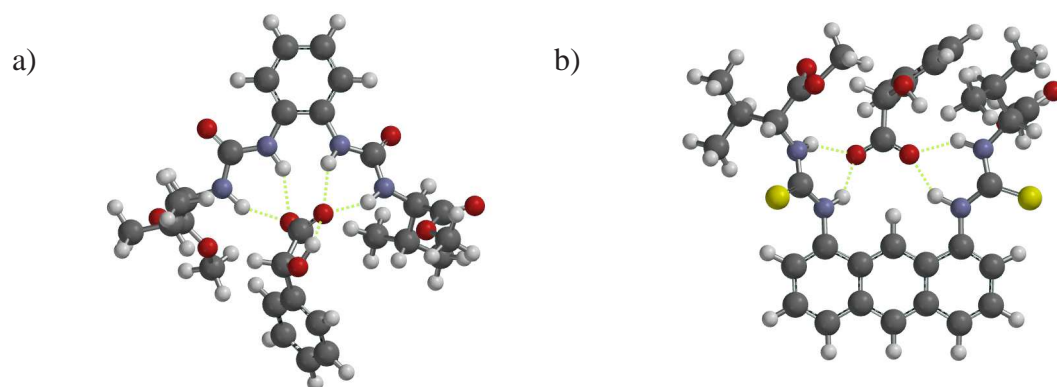


Wykres 3.4: Stałe trwałości kompleksów a) receptorów DAB z Man, b) receptorów DAB z AcPhe, c) receptorów DAA z Man, d) receptorów DAA z AcPhe



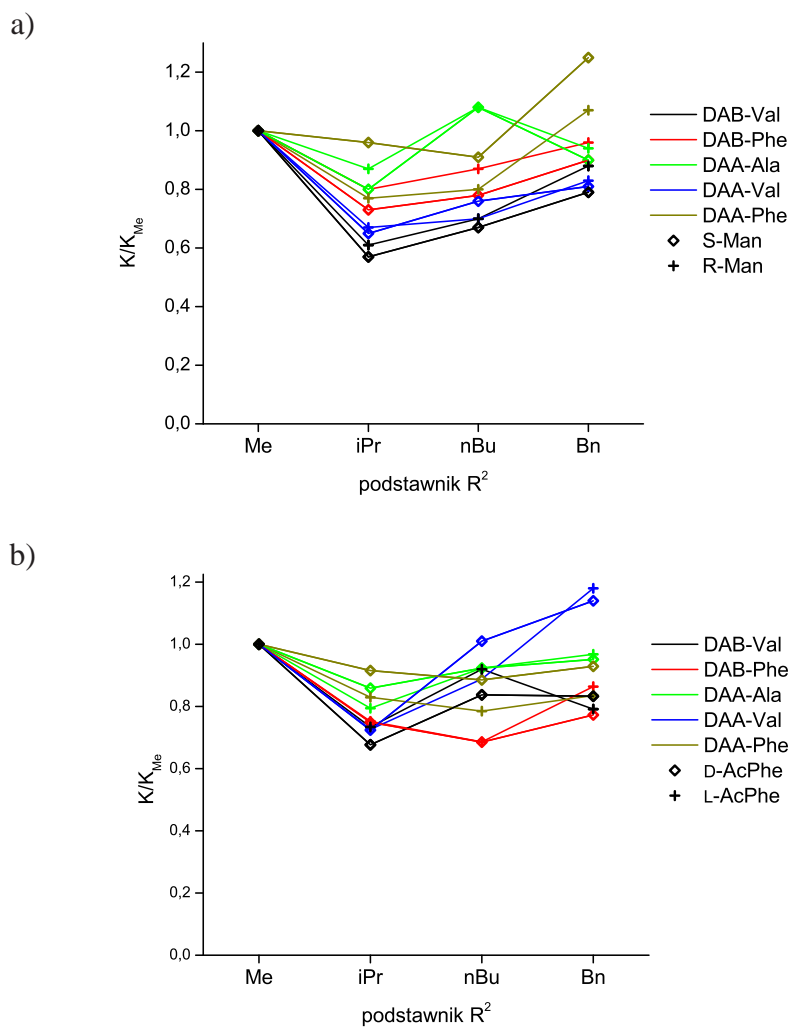
Schemat 3.12: Oznaczenia podstawników w receptorach serii DAB i DAA

Pierwszą jest korelacja stałej K z terminalnym podstawnikiem w grupie estrowej (R^2) w ramach tego samego rdzenia i tego samego aminokwasu (R^1). Dla każdej czwórki receptorów z tym samym rdzeniem i podstawnikiem R^1 przeskalowałem stałe tworzenia kompleksów z danym anionem odnosząc je do K dla receptora z $R^2=Me$: $K' = K/K_{Me}$. Dla obu enancjomerów migdałanu (Wykres 3.5a) ze wszystkimi „czwórkami” receptorów uzyskałem podobny rozkład stałych K' , które rosły w szereguⁱⁱ: $i\text{-Pr} < n\text{-Bu} < \text{Bn} < \text{Me}$. Dla miareczkowań enancjomerami AcPhe otrzymałem mniej spójną zależność (Wykres 3.5b) jednak, w granicach błędów pomiaru, przebiegi te są zgodne z zależnościami określonymi dla migdałanu. Wydaje się, że wpływ tych podstawników powinien mieć charakter czysto steryczny, dlatego podjąłem próbę skorelowania $\log(K')$ z parametrami sterycznymi Tafta^{107–109}. Pewnym utrudnieniem przeprowadzenia takiej korelacji jest fakt, że parametry te dość istotnie różnią się w kilku doniesieniach literaturowych^{110,111}. Do analizy wykorzystałem wartości z oryginalnej pracy Tafta. Zestawienie moich wyników z parametrami E_S (Wykres 3.6) wskazuje na brak korelacji, co świadczy o bardziej złożonym wpływie podstawników R^2 na stałe trwałości. Dostyc zaskakujący jest fakt wystąpienia takiej samej zależności – jakościowej i ilościowej – dla receptorów obu serii, mimo istotnych różnic w usytuowaniu grup R^2 względem wiązanego anionu (Rys 3.7).

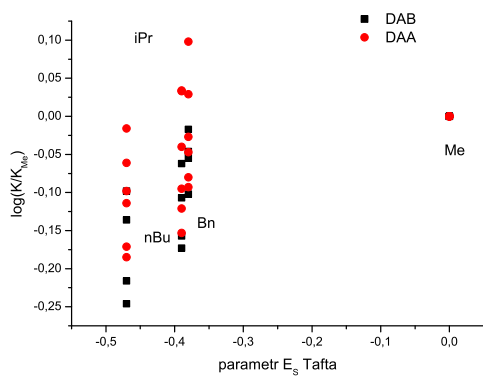


Rysunek 3.7: Poglądowe struktury kompleksów a) **70a** i b) **71a** z (*S*)-migdałanem

ⁱⁱwyniki dla receptorów **71c** i **71l** nie należą do powyższego szeregu, co może wynikać z błędów doświadczalnych

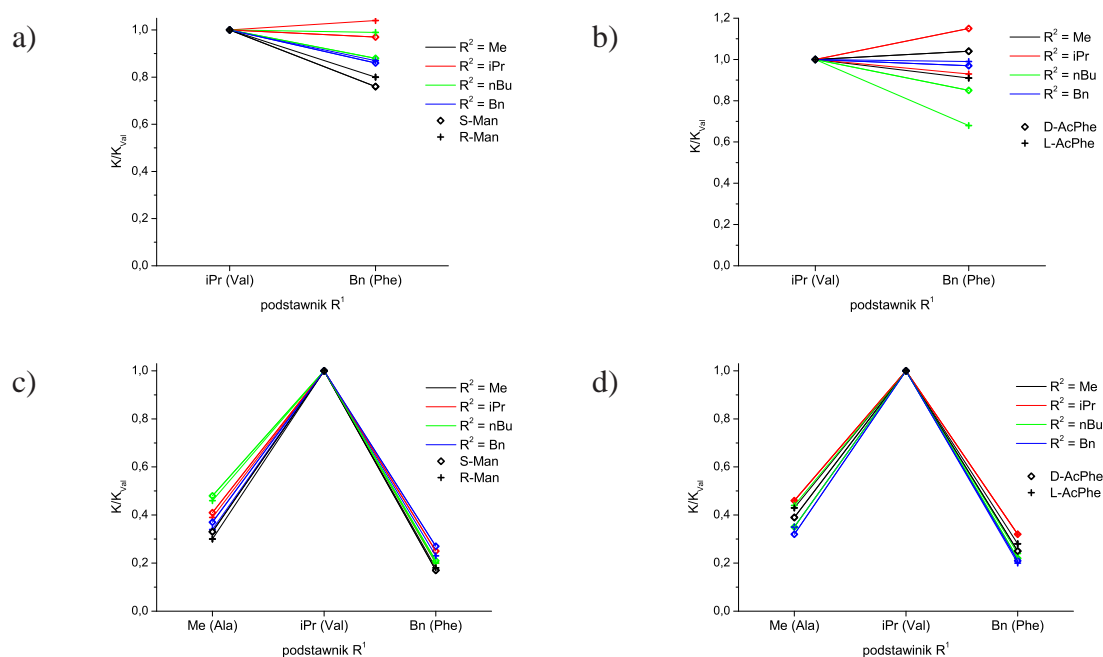


Wykres 3.5: Zależność $K' = K/K_{Me}$ dla receptorów serii DAB i DAA z a) Man, b) AcPhe



Wykres 3.6: Zależność $\log(K') = \log(K/K_{Me})$ od parametrów Tafta E_s dla receptorów serii DAB i DAA

Druga analiza dotyczy zależności stałych trwałości kompleksów od podstawnika R^1 przy tym samym podstawniku R^2 . Dla obu serii receptorów DAB i DAA, stałe K przeskalowałem do wartości dla receptorów z $R^1=i\text{-Pr}$: $K'' = K/K_{Val}$. Receptory serii DAB oparte na fenyloalaninie ($R^1=Bn$) wiążą enancjomery migdalanu ze stałą wynoszącą średnio 0,90 wartości dla analogicznych receptorów z fragmentem waliny ($R^1=i\text{-Pr}$) (rozzrzt 0,76-1,04; $\sigma = 0,11$) (Wykres 3.7a). Dla enancjomerów AcPhe otrzymałem średni stosunek $K_{Phe}/K_{Val} = 0,94$ (rozzrzt 0,68-1,15; $\sigma = 0,15$) (Wykres 3.7b), pozostające w zgodzie z wynikiem dla Man. Analogiczna analiza dla receptorów serii DAA wskazuje na większą wrażliwość stałych kompleksowania na charakter podstawnika R^1 . Dla migdalanu otrzymałem następujące uśrednione wartości stosunków stałych: $K_{Ala}/K_{Val} = 0,39$ (0,30-0,48; $\sigma = 0,064$) i $K_{Phe}/K_{Val} = 0,21$ (0,17-0,27; $\sigma = 0,035$) (Wykres 3.7c), które okazały się ponownie zgodne z wynikami dla AcPhe: $K_{Ala}/K_{Val} = 0,40$ (0,32-0,46; $\sigma = 0,055$) i $K_{Phe}/K_{Val} = 0,25$ (0,20-0,32; $\sigma = 0,035$) (Wykres 3.7d).



Wykres 3.7: Zależność $K'' = K/K_{Val}$ od podstawnika R^1 dla: a) receptorów DAB z Man, b) receptorów DAB z AcPhe, c) receptorów DAA z Man, d) receptorów DAA z AcPhe.

Wy tłumaczenie powyżej przedstawionych zależności trwałości kompleksów od rodzaju podstawników R^1 nie jest możliwe poprzez proste odwołanie się do ich sterycznych parametrów. W obu seriach receptory z $R^1=i\text{-Pr}$, a zatem z największą zawadą wykazywały najwyższe powinowactwo do obu testowanych anionów. O ile dla serii DAB, wpływ podstawnika na stałe K był stosunkowo niewielki, to dla serii DAA, stałe dla $R^1=Me, i\text{-Pr}, Bn$ pozostają w przybliżonych stosunkach 8 : 20 : 5. Wydaje się mało prawdopodobne, aby podstawniki te miały istotny wpływ

na gęstość elektronową na atomach wodoru grupy tiomocznikowej, które są odpowiedzialne za wiązanie anionu. Bardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem jest silna preorganizacja struktury receptora do wiązania anionów, dla $R^1=i\text{-Pr}$, która zwiększa (lub czyni mniej ujemną) entropię wiązania (ΔS). Określenie ΔH i ΔS reakcji kompleksowania dla trzech podstawników R^1 pozwoliłoby ustosunkować się do tej hipotezy.

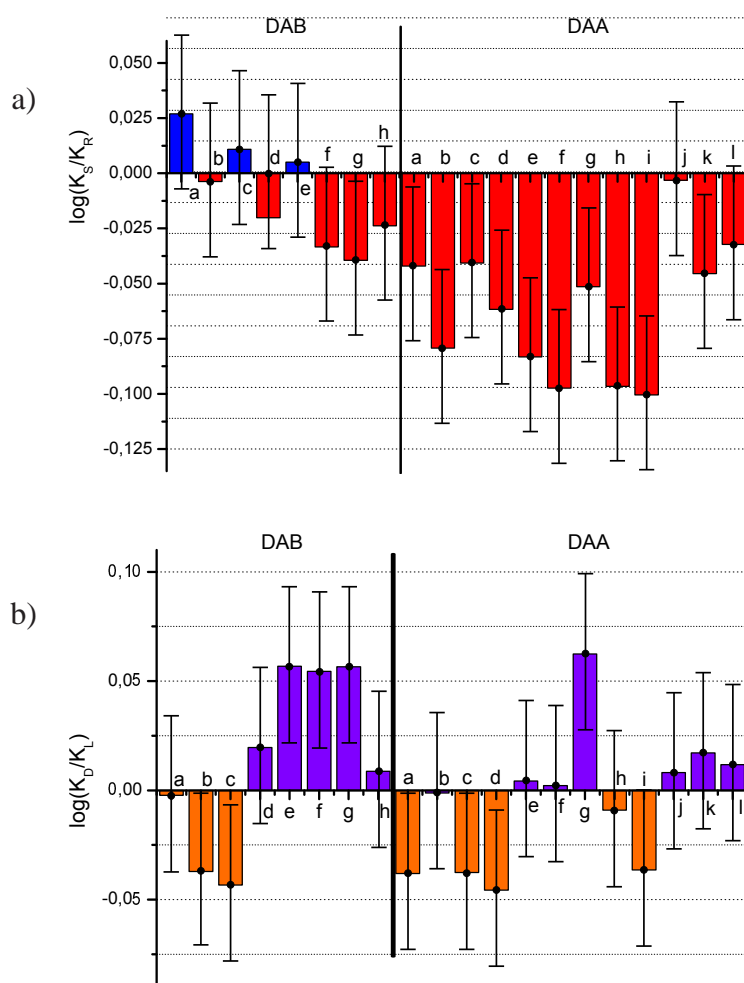
Wyznaczone enancjoselektywności przedstawione w Tabelach 3.3 i 3.4 przedstawiłem graficznie jako $\log(\alpha)$ na Wykresie 3.8, na którym uwzględniłem także oszacowaną niepewność tych wielkości ($\Delta\alpha/\alpha$) = 8,5% co odpowiada $\Delta\log(\alpha) = 0,035$. Wyniki, dla których wyznaczona selektywność nie przekracza niepewności, należy traktować z ograniczonym zaufaniem, natomiast tam, gdzie selektywność jest większa od niepewności, występowanie enancjoselektywności jak i jej kierunek są pewne.

Dla migdalanów receptory obu serii dają spójny obraz selektywności. Receptory **70a-e, h** wykazują znikomą selektywność nie przekraczającą poziomu niepewności, pozostałe 13 receptorów (tj. **70f,g** oraz wszystkie receptory DAA) cechuje selektywność przekraczająca niepewność, o zgodnym kierunku w stronę (*R*)-migdalanu. Najlepszą selektywność, wynoszącą 0,79, określiłem dla receptora **71i** (DAA-PheOMe). Dobrą selektywnością cechuje się cała czwórka receptorów DAA oparta na walinie (**71e-h**). Receptory serii DAA zdecydowanie lepiej sprawdziły się w rozpoznaniu chiralnym anionów kwasu migdałowego niż seria DAB. Rozkład selektywności ma charakter stochastyczny, nie udało mi się znaleźć uniwersalnego podstawnika R^1 ani R^2 , którego zastosowanie w receptorze zapewniłoby dobrą selektywność. Tylko optymalne zestrojenie tych dwóch podstawników, którego nie da się zawnoczyć, może skutkować dobrymi właściwościami rozpoznania chiralnego.

Dla AcPhe rozkład selektywności ma zupełnie stochastyczny charakter, nie występuje żadna tendencja dotycząca kierunku enancjoselektywności. Jedynie połowa (10/20) przebadanych receptorów wiąże enancjomery tego gościa z selektywnością przekraczającą niepewność pomiaru. Receptory **70b,c** oraz **71a,c,d,i** wiążą silniej anion L-AcPhe, receptory **70e,f,g** i **71g** wykazują zaś selektywność w kierunku enancjomeru D. Najwyższą uzyskaną przeze mnie wartość selektywności to 1,15 dla **71g**. Ten zestaw wyników jeszcze silniej wskazuje na nieprzewidywalny charakter rozpoznania chiralnego i potrzebę optymalnego dopasowania wszystkich elementów cząsteczki receptora.

Porównanie Wykresów 3.8a) i b) wskazuje, że dla moich receptorów nie istnieje korelacja między selektywnościami obserwowanymi dla różnych chiralnych anionów. Receptory serii DAB, które wykazywały brak selektywności dla Man, cechuje dobra selektywność dla AcPhe. Podobnie kilka z receptorów serii DAA, które nie różnicują enancjomerów AcPhe, sprawdzają się dla Man. Siedem z moich receptorów (**70f,g, 71a,c,d,g,i**) cechuje selektywność przekraczająca poziom niepewności dla obu anionów.

Otrzymane przeze mnie receptory wykazują rozpoznanie chiralne na słabym poziomie rzę-



Wykres 3.8: Zestawienie wyznaczonych enancjoselektywności z a) migdalanem, b) anionem N-acetylofenyloalaniny; słupki błędów odpowiadają niepewności $\pm 8,5\%$

du $\alpha = 1,15 - 1,20$. Ze względu na duży błąd wyznaczania selektywności ($\pm 8,5\%$), większość wyników tylko nieznacznie przekracza poziom niepewności pomiarowej. Z jednej strony taka grupa danych utrudnia porównywanie różnych metod, ze względu na istotny udział błędu pomiaru, z drugiej jednak, potwierdzenie stosowalności innych metod na podstawie tak małych selektywności dowodzić będzie dużej czułości i dokładności tych metod.

Aby wypełnić wynikami Tabele 3.3 i 3.4 musiałem:

- przeprowadzić syntezę 20 receptorów,
- dokładnie je oczyścić,
- określić stechiometrię powstających kompleksów,
- oszacować rząd wielkości stałych trwałości kompleksów,
- przygotować ok. 50 precyzyjnych naważek,
- przygotować ok. 100 roztworów w kolbach miarowych,

- przeprowadzić 160 miareczkowań,
- opracować numerycznie wyniki pomiarów w celu uzyskania wartości K .

Powyższa lista ma na celu pokazanie, jak żmudne i pracochłonne jest badanie rozpoznania chiralnego klasyczną metodą dwóch miareczkowań. Trzeba też zaznaczyć, że dopiero po starannym wykonaniu tych procedur uzyskuje się macierz wyników, która, w niekorzystnym przypadku, może oznaczać brak lub znikomą selektywność dla wszystkich badanych receptorów. Z tego powodu, opracowanie metody pozwalającej ominąć lub uprościć przynajmniej jeden z powyższych etapów jest bardzo wskazane.

3.5 Określanie stosowalności innych metod badania rozpoznania chiralnego

3.5.1 Miareczkowania konkurencyjne

3.5.1.1 Miareczkowania z użyciem achiralnego receptora odniesienia

Metodę miareczkowania konkurencyjnego pod kontrolą NMR i literaturowe przykłady jej zastosowania przedstawiłem w rozdziale 2.3.4.2 (str. 59). Zdecydowałem się sprawdzić możliwość zastosowania tej metody do określania rozpoznania chiralnego, określając jej dokładność i precyzję. W pierwszym wariantcie prowadziłem dwa miareczkowania konkurencyjne, osobno dla każdego z enancjomerów gościa, które dodawałem do mieszaniny badanego chiralnego receptora i achiralnego receptora odniesienia. Na podstawie tych pomiarów planowałem otrzymać dwie wartości stosunków stałych, które podzielone przez siebie dają selektywność termodynamiczną α_T (Rów. (3.3)).

$$\alpha_S = \frac{K_S}{K_{ref}} \quad (3.1)$$

$$\alpha_R = \frac{K_R}{K_{ref}} \quad (3.2)$$

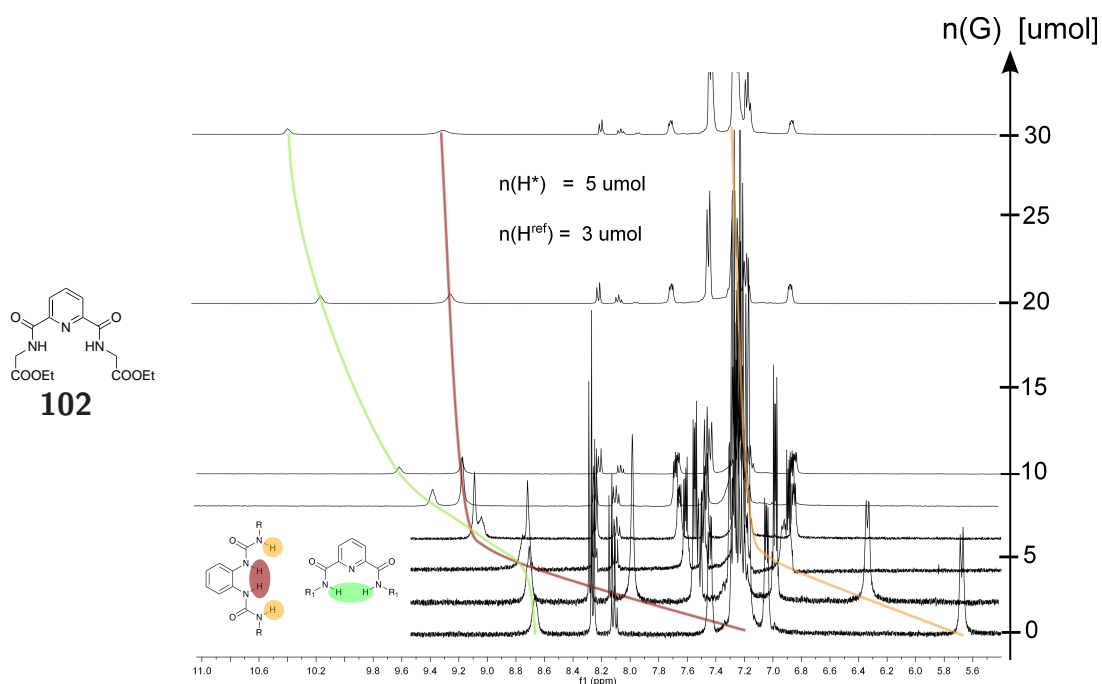
$$\frac{\alpha_S}{\alpha_R} = \frac{\frac{K_S}{K_{ref}}}{\frac{K_R}{K_{ref}}} = \frac{K_S}{K_R} = \alpha_T \quad (3.3)$$

Metoda ta wymaga dwóch niezależnych pomiarów, których zestawienie daje dopiero poszukiwaną wartość selektywności – podobnie jak przy klasycznym miareczkowaniu. Jednakże wynik miareczkowania konkurencyjnego jest niezależny od stężeń reagentów i precyzji w odmierzeniu objętości roztworów. Wykonując te pomiary określałem jedynie stosunek stałych (relacje między nimi) a nie bezwzględne ich wartości, dlatego pomiar ten jest niewrażliwy na większość źródeł błędów, które są istotne w klasycznym miareczkowaniu. Jedynym źródłem

błędu w miareczkowaniu konkurencyjnym jest dokładność wyznaczenia przesunięć chemicznych a w szczególności przesunięć maksymalnych $\Delta\delta^{max}$. Analiza Rów. (2.40) (str. 60) pod kątem oszacowania niepewności pomiaru na podstawie niepewności wyznaczenia δ i δ_{max} pokazuje, że optymalny zakres punktów pomiarowych jest taki, że stopień skompleksowania każdego z receptorów w mieszaninie leży w zakresie 10-90%:

$$\left(\frac{[H^*G]}{[H^*]_0}\right) \in (0,1;0,9) \wedge \left(\frac{[H^{ref}G]}{[H^{ref}]_0}\right) \in (0,1;0,9) \quad (3.4)$$

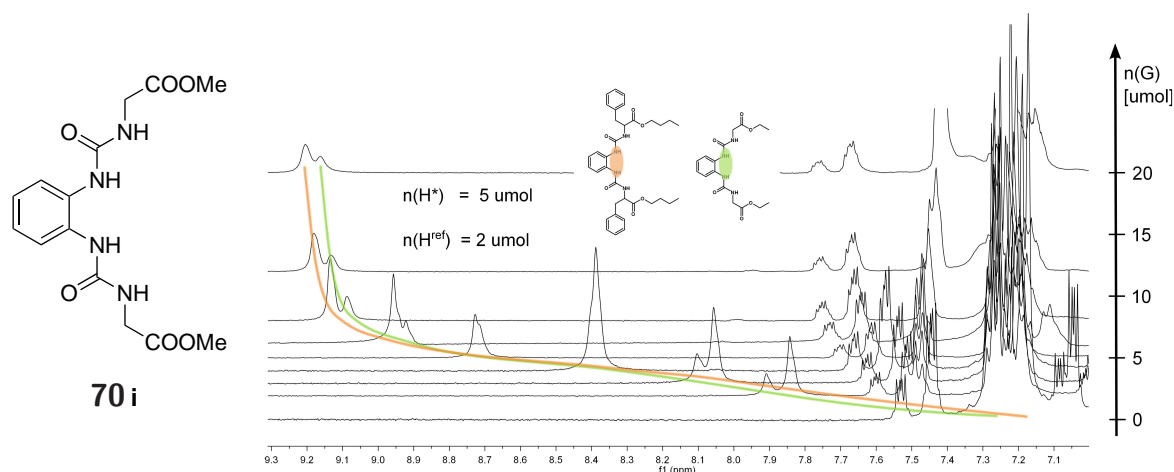
Na potrzeby przeprowadzenia miareczkowań konkurencyjnych przeprowadziłem syntezę receptora odniesienia **102**. Zdecydowałem się wykorzystać ester etylowy glicyny jako łańcuch boczny ze względu na dobrą rozpuszczalność tak funkcjonalizowanych receptorów. W miareczkowaniu konkurencyjnym z receptorem serii DAB (**70i**) okazało się, że różnica w powinowactwie obu receptorów jest zbyt duża i żaden z pomiarowych punktów nie spełnia warunku (3.4). W początkowej fazie miareczkowania kompleksowaniu ulega praktycznie wyłącznie receptor **70i**, dopiero po jego nasyceniu następuje wiązanie anionu przez receptor odniesienia **102** – Rys. 3.8. W żadnym z punktów nie jest spełniony warunek dotyczący stopnia skompleksowania.



Rysunek 3.8: Przebieg miareczkowania konkurencyjnego dla mieszaniny **70e** i **102**. Anion – (S)-migdałan TBA. (MeCN-d₃, 298K)

Zdecydowałem się zmienić receptor odniesienia na achiralny receptor serii DAB, mając na uwadze fakt, że receptory o analogicznej budowie powinny wiązać anion z porównywalną stałą *K*. Wykorzystując procedurę ze Schematu 3.5, z użyciem fosgeny, otrzymałem receptor **70i** oparty na estrze etylowym glicyny. Zgodnie z oczekiwaniami, stałe trwałości kompleksów

tego receptora zmięszaniem były bardzo zbliżone do stałych dla chiralnych analogów. Dodatkowo dla większości punktów pomiarowych, sygnały pochodzące od wewnętrznych protonów mocznikowych badanych receptorów i receptora odniesienia nie nakładały się i możliwe było wyznaczenie względnej stałej trwałości. Miareczkowania prowadziłem w CD₃CN, typowy przebieg miareczkowania przedstawia Rys. 3.9.



Rysunek 3.9: Przebieg miareczkowania konkurencyjnego dla mieszaniny **70e** i **70i**. Anionem był (*S*)-migdalan TBA. (MeCN-d₃, 298K)

Aby przypisanie sygnałów pochodzących od chiralnego i achiralnego receptora było w każdym punkcie pomiarowym jednoznaczne, zastosowałem dwukrotnie mniejsze stężenie receptora odniesienia w porównaniu z badanym receptorem. W osobnych eksperymentach (miareczkowaniach) wyznaczyłem maksymalne przesunięcie sygnałów H^{ref} (δ_{ref}^{max}) dla migdalanu oraz dla N-AcPhe. W pierwszych eksperymentach konkurencyjnych miareczkowanie prowadziłem aż do dodania ok. dwukrotnego nadmiaru G względem sumy receptorów. Założyłem, że dla dużych wartości stałych trwałości, przy takim nadmiarze G, receptor jest całkowicie wysycony anionem i obserwowana δ_H odpowiada δ_H^{max} . Jednakże, przy przyjęciu takiej wartości, obliczone stosunki stałych $\alpha = K/K_{ref}$ różniły dla kolejnych punktów doświadczalnych ze zachowaniem trendu. Niespójność wyników wskazywała jednoznacznie, że przyjęta wartość δ_H^{max} nie jest prawidłowa. Obiektywne wyznaczenie δ_H^{max} wymagałoby przeprowadzenia klasycznego miareczkowania dla każdej pary receptor-anion, co przekreślałoby wartość tej metody. Okazało się, że skuteczną metodą znalezienia prawidłowej wartości δ_H^{max} jest numeryczne nieliniowe dopasowanie tej wielkości ze względu na minimalizację sumy: $\sum_i \frac{(\tilde{\alpha} - \alpha_i)^2}{\tilde{\alpha}^2}$. Suma ta jest miarą rozbieżności w wartościach α pomiędzy kolejnymi punktami doświadczalnymi, jej minimalizacja zapewnia najlepszą zgodność wyników. Podejście to owocowało bardzo zbliżonymi wartościami α , różnice miały rozkład stochastyczny, bez wyraźnego trendu. Dopasowane wartości δ_H^{max} znajdowały się każdorazowo w oczekiwanym przedziale – stanowiły jedynie korektę wartości wyznaczonej dla punktu 2 ekw.

Muszę tutaj zaznaczyć, że żadna ze znanych mi prac opisująca wyniki miareczkowań kon-

kurencyjnych nie podnosiła powyższego problemu zależności α od punktów doświadczalnych przy niewłaściwej wartości $\delta_{\text{H}}^{\text{max}}$. W pierwszej pracy Whitlocka⁷⁰ stałe trwałości kompleksów były bardzo wysokie ($> 10000 \text{ M}^{-1}$) i można przypuszczać, że pełne wysycenie receptora było osiągnięte po dodaniu kilku równoważników G. Natomiast receptor badany w grupie Morána⁷¹ wiąże cząsteczki G ze znacznie mniejszymi stałymi ($600, 3600 \text{ M}^{-1}$) i bezpośrednie wyznaczenie $\delta_{\text{H}}^{\text{max}}$ musiało być bardziej skomplikowane. Autorzy nie opisują zastosowanego przez nich sposobu wyznaczenia tej wielkości.

Miareczkowania konkurencyjne przeprowadziłem dla pełnych serii DAB i DAA z enancjomerami zarówno migdalanu TBA jak i N-AcPheOTBA. Za wiarygodne uznawałem tylko te pomiary, dla których mogłem określić położenia sygnałów dla przynajmniej pięciu punktów. Za wartość α przyjmowałem średnią wartość dla wszystkich punktów. Niepewność każdego pomiaru z osobna oszacowałem jako $2 \cdot \sigma$ – podwojone odchylenie standardowe wyników ze wszystkich punktów danego miareczkowania. Po wyznaczeniu stałych trwałości kompleksów z receptorem odniesienia **70i** (za pomocą miareczkowania UV-Vis, $K_{\text{Man}}^{\text{ref}} = 7,94 \times 10^4$; $K_{\text{AcPhe}}^{\text{ref}} = 6,60 \times 10^5$) przeliczyłem stałe trwałości dla chiralnych receptorów z względnych na bezwzględne. Uzyskane wyniki przedstawiają Tabele 3.5 i 3.6. Niepewności pomiarowe zdecydowanej większości stałych są mniejsze niż w przypadku klasycznego miareczkowania, tym samym selektywności także są określone w węższym przedziale.

Wartości stałych trwałości kompleksów dla obu metod zestawilem na Wykresie 3.9. Zarówno dla migdalanu jak i dla soli N-acetylofenyloalaniny zaobserwowałem znakomitą zgodność pomiędzy prezentowanymi metodami. Korelacja danych za pomocą regresji liniowej dała współczynniki kierunkowe a nieznacznie tylko odbiegające od 1, a rozbieżność jest następstwem błędu w wyznaczeniu absolutnych stałych trwałości dla kompleksów z receptorem odniesienia **70i**.

Dużo ważniejsze jest porównanie enancjoselektywności określonych za pomocą obu metod. Korelację tych wyników przedstawiłem na Wykresach 3.10a,b). Zgodność wyników jest dobra, przy uwzględnieniu niepewności pomiarowej wszystkie punkty znajdują się na prostej $y=x$, zaś współczynniki korelacji R^2 wynoszą dla Man i AcPhe odpowiednio 72 i 70%. Dodatkowe porównanie wyników parami przedstawiają Wykresy 3.10c,d).

Po obliczeniu względnych różnic między wartościami K wyznaczonymi dwiema metodami:

$$\Delta = \sqrt{\frac{(K_{\text{MK}} - K_{\text{MUV}})^2}{\overline{K}^2}} \quad (3.5)$$

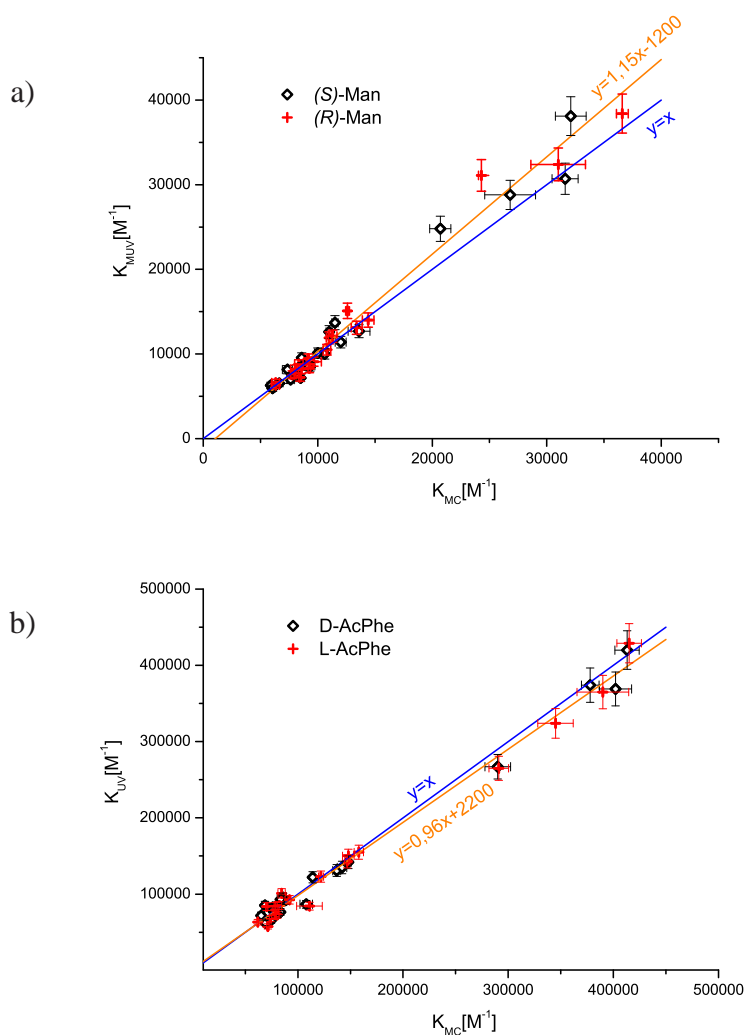
uśredniłem wyniki dla wszystkich par anion-receptor i otrzymałem średnie odchylenie wynoszące 8%, co pozostaje w zgodzie z oszacowanymi niepewnościami pomiaru dla obu metod. Analogiczna analiza średnich różnic w wyznaczonych selektywnościach α daje mniejszą wartość – ok. 4%.

Tabela 3.5: Wyniki miareczkowań konkurencyjnych: stałe trwałości kompleksów ($K [M^{-1}]$) oraz selektywności (α) dla receptorów serii DAB i DAA z Man

Receptor		$K (S)$ -Man	K -(R)-Man	α	
70	a	ValOMe	$1,10 \times 10^4 \pm 2,50\%$	$1,10 \times 10^4 \pm 2,3\%$	$1,00 \pm 3,4\%$
	b	ValOiPr	$8,51 \times 10^3 \pm 1,50\%$	$8,45 \times 10^3 \pm 1,2\%$	$1,01 \pm 1,9\%$
	c	ValOnBu	$9,32 \times 10^3 \pm 1,80\%$	$9,27 \times 10^3 \pm 1,3\%$	$1,00 \pm 2,2\%$
	d	ValOBn	$1,06 \times 10^4 \pm 2,00\%$	$1,08 \times 10^4 \pm 3,1\%$	$0,98 \pm 3,7\%$
	e	PheOMe	$8,60 \times 10^3 \pm 1,00\%$	$9,16 \times 10^3 \pm 1,0\%$	$0,94 \pm 1,4\%$
	f	PheOiPr	$7,63 \times 10^3 \pm 4,00\%$	$7,78 \times 10^3 \pm 2,0\%$	$0,98 \pm 4,5\%$
	g	PheOnBu	$8,07 \times 10^3 \pm 1,60\%$	$8,57 \times 10^3 \pm 3,1\%$	$0,94 \pm 3,5\%$
	h	PheOBn	$9,17 \times 10^3 \pm 6,30\%$	$9,66 \times 10^3 \pm 6,7\%$	$0,95 \pm 9,2\%$
71	a	AlaOMe	$1,36 \times 10^4 \pm 7,00\%$	$1,44 \times 10^4 \pm 3,5\%$	$0,94 \pm 7,8\%$
	b	AlaOiPr	$1,00 \times 10^4 \pm 2,90\%$	$1,13 \times 10^4 \pm 3,3\%$	$0,89 \pm 4,4\%$
	c	AlaOnBu	$1,15 \times 10^4 \pm 2,40\%$	$1,26 \times 10^4 \pm 1,3\%$	$0,92 \pm 2,7\%$
	d	AlaOBn	$1,20 \times 10^4 \pm 4,00\%$	$1,34 \times 10^4 \pm 3,5\%$	$0,89 \pm 5,3\%$
	e	ValOMe	$3,21 \times 10^4 \pm 4,20\%$	$3,82 \times 10^4 \pm 1,7\%$	$0,84 \pm 4,5\%$
	f	ValOiPr	$2,07 \times 10^4 \pm 4,50\%$	$2,43 \times 10^4 \pm 1,1\%$	$0,85 \pm 4,7\%$
	g	ValOnBu	$2,68 \times 10^4 \pm 8,30\%$	$3,10 \times 10^4 \pm 7,7\%$	$0,86 \pm 11,3\%$
	h	ValOBn	$3,16 \times 10^4 \pm 3,60\%$	$3,66 \times 10^4 \pm 1,4\%$	$0,86 \pm 3,9\%$
	i	PheOMe	$6,64 \times 10^3 \pm 5,50\%$	$8,11 \times 10^3 \pm 5,9\%$	$0,82 \pm 8,1\%$
	j	PheOiPr	$5,90 \times 10^3 \pm 3,80\%$	$6,32 \times 10^3 \pm 5,4\%$	$0,93 \pm 6,6\%$
	k	PheOnBu	$6,06 \times 10^3 \pm 3,40\%$	$6,32 \times 10^3 \pm 5,4\%$	$0,96 \pm 6,4\%$
	l	PheOBn	$7,36 \times 10^3 \pm 6,00\%$	$8,35 \times 10^3 \pm 4,5\%$	$0,88 \pm 7,5\%$

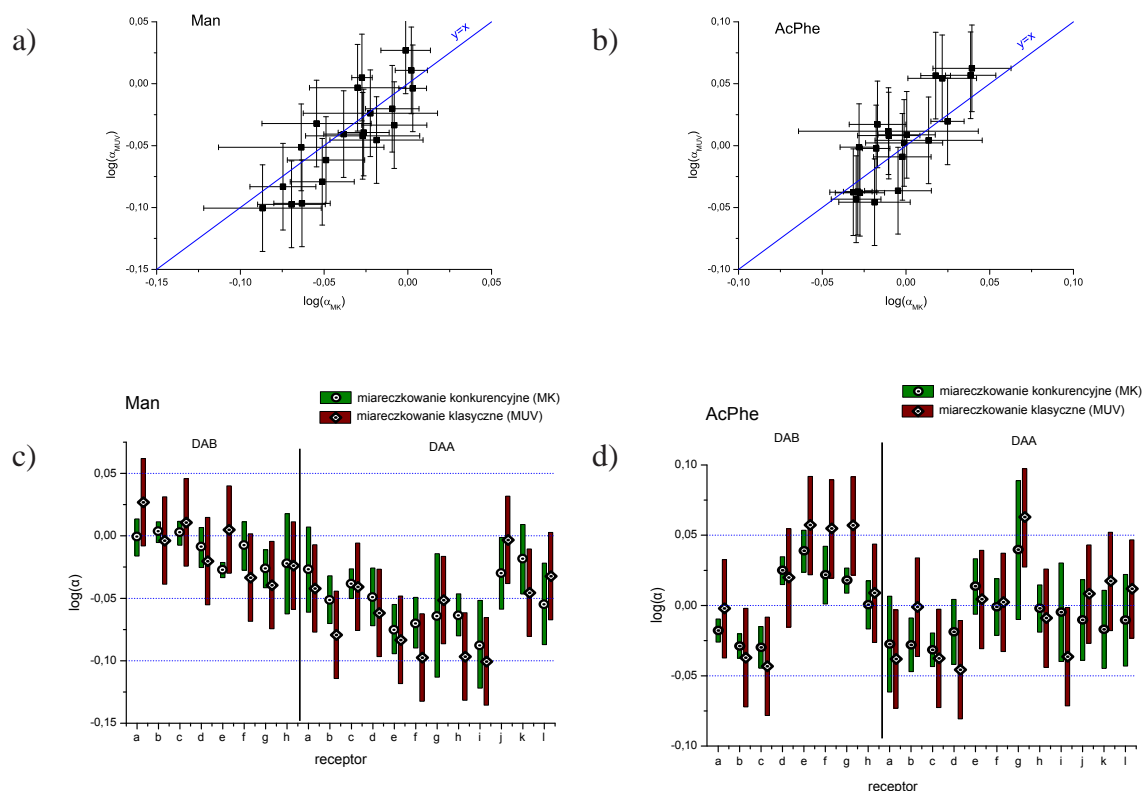
Tabela 3.6: Wyniki miareczkowań konkurencyjnych: stałe trwałości kompleksów (K [M^{-1}]) oraz selektywności (α) dla receptorów serii DAB i DAA z AcPhe

Receptor		K -D-AcPhe	K -L-AcPhe	α	
70	a	ValOMe	$8,84 \times 10^4 \pm 1,0\%$	$9,21 \times 10^4 \pm 1,6\%$	$0,96 \pm 1,9\%$
	b	ValOiPr	$6,92 \times 10^4 \pm 1,5\%$	$7,40 \times 10^4 \pm 1,3\%$	$0,94 \pm 2,0\%$
	c	ValOnBu	$7,70 \times 10^4 \pm 2,3\%$	$8,25 \times 10^4 \pm 2,5\%$	$0,93 \pm 3,4\%$
	d	ValOBn	$8,33 \times 10^4 \pm 2,0\%$	$7,87 \times 10^4 \pm 1,1\%$	$1,06 \pm 2,3\%$
	e	PheOMe	$8,55 \times 10^4 \pm 3,3\%$	$7,82 \times 10^4 \pm 1,0\%$	$1,09 \pm 3,4\%$
	f	PheOiPr	$6,52 \times 10^4 \pm 4,6\%$	$6,20 \times 10^4 \pm 1,0\%$	$1,05 \pm 4,7\%$
	g	PheOnBu	$7,45 \times 10^4 \pm 1,5\%$	$7,15 \times 10^4 \pm 1,4\%$	$1,04 \pm 2,1\%$
	h	PheOBn	$8,05 \times 10^4 \pm 3,4\%$	$8,04 \times 10^4 \pm 2,0\%$	$1,00 \pm 3,9\%$
71	a	AlaOMe	$1,48 \times 10^5 \pm 1,9\%$	$1,58 \times 10^5 \pm 2,8\%$	$0,94 \pm 3,4\%$
	b	AlaOiPr	$1,14 \times 10^5 \pm 1,7\%$	$1,22 \times 10^5 \pm 2,0\%$	$0,94 \pm 2,6\%$
	c	AlaOnBu	$1,37 \times 10^5 \pm 2,8\%$	$1,47 \times 10^5 \pm 1,6\%$	$0,93 \pm 3,2\%$
	d	AlaOBn	$1,42 \times 10^5 \pm 3,2\%$	$1,48 \times 10^5 \pm 3,7\%$	$0,96 \pm 4,9\%$
	e	ValOMe	$4,02 \times 10^5 \pm 3,8\%$	$3,90 \times 10^5 \pm 6,3\%$	$1,03 \pm 7,4\%$
	f	ValOiPr	$2,90 \times 10^5 \pm 4,2\%$	$2,91 \times 10^5 \pm 3,2\%$	$1,00 \pm 5,3\%$
	g	ValOnBu	$3,78 \times 10^5 \pm 2,2\%$	$3,45 \times 10^5 \pm 4,9\%$	$1,10 \pm 5,4\%$
	I	ValOBn	$4,13 \times 10^5 \pm 2,8\%$	$4,15 \times 10^5 \pm 2,8\%$	$1,00 \pm 4,0\%$
	j	PheOMe	$8,36 \times 10^4 \pm 1,8\%$	$8,45 \times 10^4 \pm 4,2\%$	$0,99 \pm 4,6\%$
	k	PheOiPr	$6,88 \times 10^4 \pm 4,0\%$	$7,04 \times 10^4 \pm 1,5\%$	$0,98 \pm 4,3\%$
	l	PheOnBu	$7,61 \times 10^4 \pm 1,7\%$	$7,91 \times 10^4 \pm 3,5\%$	$0,96 \pm 3,9\%$
	m	PheOBn	$1,08 \times 10^5 \pm 5,5\%$	$1,11 \times 10^5 \pm 11\%$	$0,98 \pm 12\%$



Wykres 3.9: Korelacje między wartościami stałych trwałości kompleksów wyznaczonymi za pomocą klasycznych miareczkowań (K_{MUV}) i miareczkowań konkurencyjnych z receptorem odniesienia (K_{MK}). Pomarańczowa prosta wyznacza dopasowaną regresję liniową korelującą zestawy danych. a) Wyniki dla migdalanu, b) wyniki dla AcPhe.

Dobra zgodność wyników, w szczególności enancjoselektywności, między metodami pozwala uznać miareczkowanie konkurencyjne z achiralnym receptorem odniesienia, wraz z przedstawioną metodą analizy danych, za wiarygodną metodę ilościowego badania rozpoznania chiralnego. Co więcej, istotnie mniejsza niepewność otrzymanych wyników skłania mnie do tego, aby w dalszych analizach innych metod, za wartości odniesienia uważać powyższe wyniki uzyskane metodą miareczkowania konkurencyjnego. Zgodność wyników między metodami jest na tyle duża, że analiza zależności K i α od struktury receptorów przedstawiona w poprzednim rozdziale zachowuje aktualność.



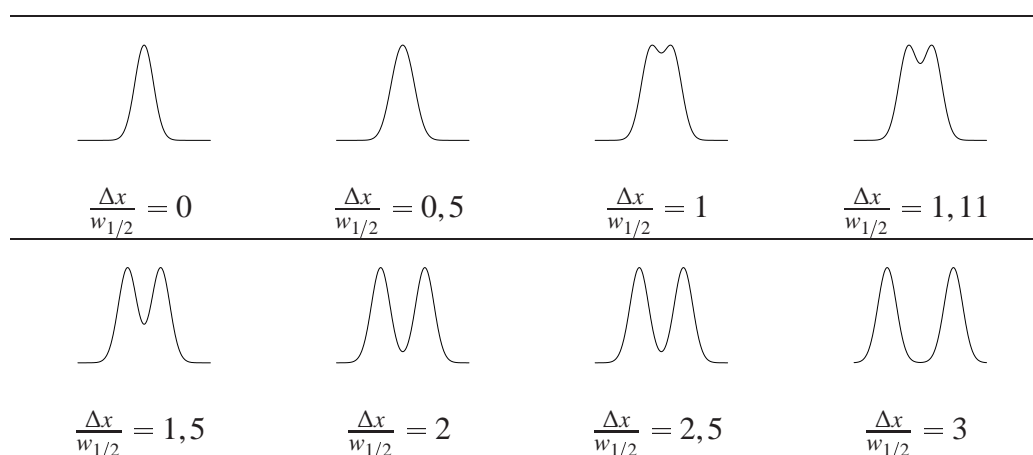
Wykres 3.10: Korelacja między wynikami selektywności wyznaczonymi za pomocą klasycznych miareczkowań UV-Vis (α_{MUV}) i miareczkowaniami konkurencyjnymi z receptorem odniesienia (α_{MK}). Wykresy a), b) - korelacja między wartościami $\log \alpha$ odpowiednio dla Man i AcPhe; wykresy c), d) porównanie parami wartości $\log \alpha$ z dwóch metod, odpowiednio dla Man i AcPhe. Kolorowe słupki odpowiadają niepewności pomiarowej.

3.5.1.2 Miareczkowania konkurencyjne bez związków odniesienia

Największą potencjalną zaletą miareczkowań konkurencyjnych jest możliwość bezpośredniego wyznaczenia enancjoselektywności, jeżeli eksperyment przeprowadzi się miareczkując mieszaninę enancjomerów receptora homochiralnym G, lub miareczkując mieszaninę enancjomerów G homochiralnym H. W przypadku moich receptorów uzyskanie mieszanin racemicznych wymagałoby zastosowania w syntezie racemicznych aminokwasów. Otrzymałbym wówczas mieszaninę receptorów (*S,S*), (*R,R*) i (*S,R*)-*meso*, która wymagałaby rozdzielenia diastereoizomerów. Alternatywą byłaby osobna synteza receptorów z wykorzystaniem D-aminokwasów i następnie zmieszanie enancjomerów. Oba podejścia wymagają dodatkowej pracy syntetycznej przy otrzymywaniu receptorów. Z tych powodów bardziej uniwersalną i łatwiejszą metodą analizy byłoby zastosowanie handlowo dostępnych racemicznych anionów do pomiarów z homochiralnymi receptorami. Pomiar taki polega na dodawaniu porcji receptora do mieszaniny anionów – ze względu na odwrócenie ról H i G procedura taka nazywana jest miareczkowaniem odwrotnym.

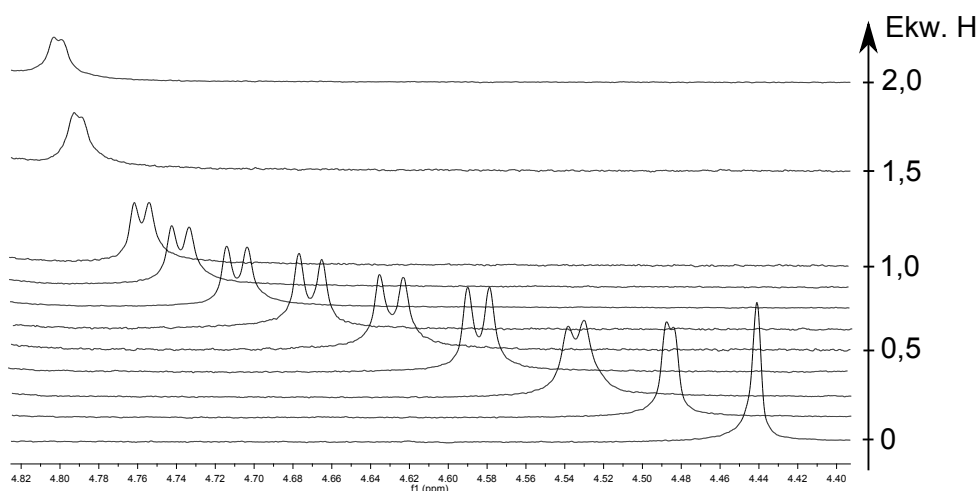
Aby analiza miareczkowania konkurencyjnego była możliwa niezbędne jest, aby po dodaniu kolejnych porcji receptora dało się określić położenia sygnałów pochodzących od enancjomerów anionu. Dla migdalanu najlepszy do śledzenia jest sygnał od protonu na atomie węgla C_α . Położenie tego protonu w sąsiedztwie grupy karboksylowej zapewnia zmianę jego przesunięcia na skutek kompleksowania anionu; dodatkowo sygnał jest singletem, co ułatwia dokładne określanie jego położenia. Warunek rozsunienia sygnałów nie zawsze jest spełniony. Rozsuniecie sygnałów, nawet jeżeli wystąpiło, może być niewidoczne, jeżeli nie jest spełnione kryterium Rayleigha¹¹², co wynika z nakładania się sygnałów o rozkładzie Gaussa. Przyjmuje się, że piki są rozróżnialne, jeżeli wartość funkcji pomiędzy dwoma pikami maleje przynajmniej do wartości 0,81 wysokości pików. Warunek ten jest osiągnięty, gdy rozsuniecie pików wynosi 1,11 ich szerokości połówkowej ($w_{1/2}$) – Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Zależność sygnału pochodzącego od dwóch nakładających się pików o rozkładzie Gaussa w zależności od stosunku rozsunienia pików (Δx) do ich szerokości połówkowych ($w_{1/2}$)



Spośród przebadanych receptorów serii DAB i DAA, tylko dwa z nich (**70e,f**) powodowały rozsuniecie sygnałów migdalanu w MeCN- d_3 na spektrometrze 400MHz. Przebieg jednego z udanych pomiarów przedstawia Rys. 3.10.

Do wyznaczenia stosunku stałych K_S/K_R konieczna jest znajomość $\Delta\delta^{max}$ dla obu diastereoizomerycznych kompleksów. Pewną i obiektywną metodą wyznaczenia tych wartości byłyby miareczkowania absolutne (tj. bez dodatku wzorca) dla każdej pary H-G, jednakże taki nakład pracy oznaczałby praktyczny brak korzyści z pomiarów konkurencyjnych. Zdecydowałem zatem spróbować rozwiązać ten problem numerycznie. W pierwszym podejściu sprawdziłem możliwość jednoczesnego nieliniowego dopasowywania $\Delta\delta_{HG_S}^{max}$ i $\Delta\delta_{HG_R}^{max}$ ze względu na minimalizację $\sum_i \frac{(\bar{\alpha} - \alpha_i)^2}{\bar{\alpha}^2}$, analogicznie do analizy miareczkowań z achiralnym receptorem odniesienia. Jednoczesne dopasowanie obu przesunięć maksymalnych dawało absurdalne minima, w których obie $\Delta\delta^{max}$ były bliskie 0 i wystąpił brak selektywności ($\alpha = 1$). Alternatywnym podejściem było prowadzenie miareczkowania odwrotnego aż do dodania 2 ekw. H i przyję-



Rysunek 3.10: Typowy przebieg odwrotnego miareczkowania konkurencyjnego - sygnały od enancjomerów Man ulegają przesunięciu i rozszczepieniu w miarę dodawania receptora **70e**

cie przesunięć uzyskanych w ostatnim punkcie za bliskie $\Delta\delta_{max}$. Tak wyznaczone maksymalne przesunięcia dawały dobrą zgodność wartości α dla wszystkich punktów o niewielkim trendzie. Numeryczne dopasowanie tylko jednej wartości $\Delta\delta_{max}$ (dla jednego z kompleksów) przy zachowaniu niezmięnionej drugiej skutkowało znakomitą zgodnością wyników we wszystkich punktach. Aby ocenić potencjalny błąd wynikający z powyższej procedury, w której przesunięcie dla punktu 2 ekw. traktowałem jako przybliżenie $\Delta\delta_{max}$ przeprowadziłem symulację przedstawioną w Tabeli 3.8. Hipotetyczne zestawy danych dla trzech różnych selektywności o $\Delta\delta_1^{max} = 1$ dopasowywałem przyjmując arbitralnie inne wartości $\Delta\delta_1^{max}$ w zakresie 0,9-1,1. Jak wynika z przeprowadzonej analizy dla dużej selektywności ($\alpha = 0,5$) błąd w określeniu $\Delta\delta_1^{max}$ na poziomie 10% przekłada się na zaledwie 5% błąd w wyznaczonej selektywności. Jeżeli zaś α wynosi 0,9, wówczas błąd spowodowany niedoszacowaniem lub przeszacowaniem $\Delta\delta_1^{max}$ nie przekracza 1%. Wynika z tego, że zaproponowana metoda analizy danych nie powoduje żadnych dodatkowych błędów.

Dla obu pomiarów otrzymałem selektywności nieznacznie zaniżone w porównaniu z dotychczasowymi wynikami, jednak zgodne przy uwzględnieniu niepewności pomiarowych:

receptor	miareczkowanie bez wzorca	miareczkowanie ze wzorcem
70e	$\alpha = 0,968 \pm 1,8\%$	$0,94 \pm 1,4\%$
70g	$\alpha = 0,983 \pm 2,7\%$	$0,94 \pm 3,5\%$

Wyniki zaledwie dwóch pomiarów nie mogą służyć do rzetelnego określenia dokładności i precyzji metody.

Dla większości moich receptorów przeprowadzenie analizy nie było możliwe, gdyż rozsuwanie sygnałów na spektrometrze 400 MHz było zbyt małe aby określić położenia obu pików.

Tabela 3.8: Analiza wrażliwości wyniku miareczkowania konkurencyjnego na dokładność wyznaczenia δ_{max} .^a

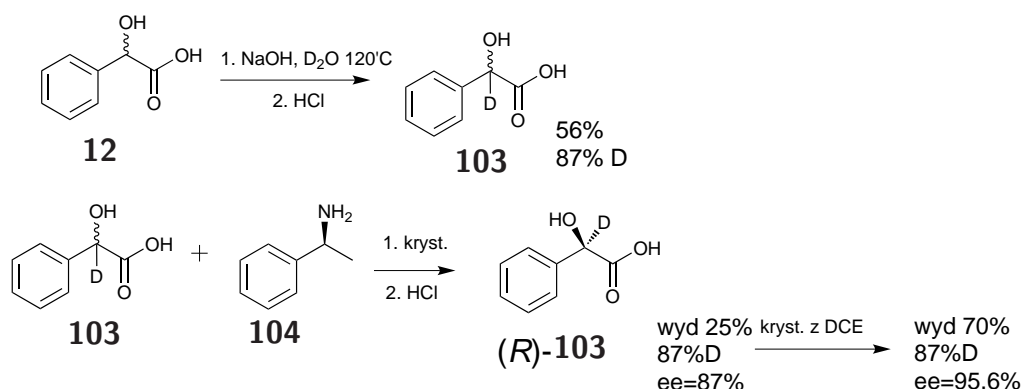
$\alpha = 0,50$									
przyjęta $\Delta\delta_1^{max}$	0,900	0,925	0,950	0,975	1,000	1,025	1,050	1,075	1,100
dopasowana $\Delta\delta_2^{max}$	1,042	1,057	1,072	1,086	1,100	1,113	1,127	1,140	1,152
α	0,526	0,520	0,513	0,506	0,500	0,494	0,488	0,482	0,476
błąd w α	5,2%	3,9%	2,6%	1,2%	0,0%	-1,2%	-2,4%	-3,6%	-4,8%
$\alpha = 0,75$									
przyjęta $\Delta\delta_1^{max}$	0,900	0,925	0,950	0,98	1,000	1,025	1,050	1,075	1,100
dopasowana $\Delta\delta_2^{max}$	1,015	1,037	1,058	1,079	1,100	1,121	1,141	1,160	1,180
α	0,769	0,764	0,760	0,755	0,750	0,745	0,741	0,736	0,732
błąd w α	2,5%	1,9%	1,3%	0,7%	0,0%	-0,7%	-1,2%	-1,8%	-2,4%
$\alpha = 0,90$									
przyjęta $\Delta\delta_1^{max}$	0,900	0,925	0,950	0,98	1,000	1,025	1,050	1,075	1,100
dopasowana $\Delta\delta_2^{max}$	1,000	1,025	1,050	1,075	1,100	1,125	1,149	1,174	1,198
α	0,909	0,907	0,905	0,902	0,900	0,898	0,896	0,893	0,891
błąd w α	1,0%	0,8%	0,5%	0,2%	0,0%	-0,3%	-0,5%	-0,8%	-1,0%

^a Przyjąłem wartości $\Delta\delta_1^{max} = 1$; $\Delta\delta_2^{max} = 1,1$

Zdecydowałem się opracować uniwersalną metodę analizy, która nie wymaga spełnienia kryterium Rayleigha i pozwala przeprowadzić miareczkowanie konkurencyjne nawet wtedy, gdy sygnały nie są zadowalająco rozdzielone. Do realizacji tego celu zaplanowałem zastosowanie pseudoracemicznej mieszaniny migdałanów, w której jeden z enancjomerów byłby selektywnie deuterowany w pozycji α . Taka mieszanina pozwoliłaby prowadzić niezależne pomiary przesunięć chemicznych (δ) każdego z enancjomerów – jednego na kanale ^1H , a drugiego na kanale ^2H NMR.

W celu realizacji powyższej koncepcji przeprowadziłem syntezę selektywnie deuterowanego migdałanu **103**, którego enancjomery następnie rozdzieliłem poprzez krystalizację z (*S*)-1-fenyletyloaminą (*S*)-PEA, (*S*)-**104**) – Schemat 3.13. Atom deuteru w pozycji α kwasu migdałowego można wprowadzić na kilka sposobów: poprzez redukcję kwasu fenyloglioksalowego borodeuterkiem cynku¹¹³, czy glinodeuterkiem sodu¹¹⁴ poprzez reakcję kwasu migdałowego z 3 równoważnikami LDA - utworzenie enolu i jego reakcję z D_2O ¹¹⁵, lub poprzez ogrzewanie kwasu migdałowego w roztworze NaOH w D_2O ¹¹⁶. Zdecydowałem się zastosować ostatni wariant syntezy. Racemiczny roztwór migdałanu sodu ogrzewałem w naczyniu Schlenka w 5% NaOH w D_2O przez 12 h. Po zakwaszeniu i krystalizacji z chloroformu uzyskałem kwas migdałowy o stopniu zdeuterowania 87% (określony na podstawie NMR) z wydajnością 50%. Kwas zmieszałem z równomolową ilością (*S*)-PEA w etanolu. Wytrąconą sól krystalizowałem dwukrotnie z etanolu. Nadmiar enancjomeryczny określałem za pomocą GC. Po dwóch krysta-

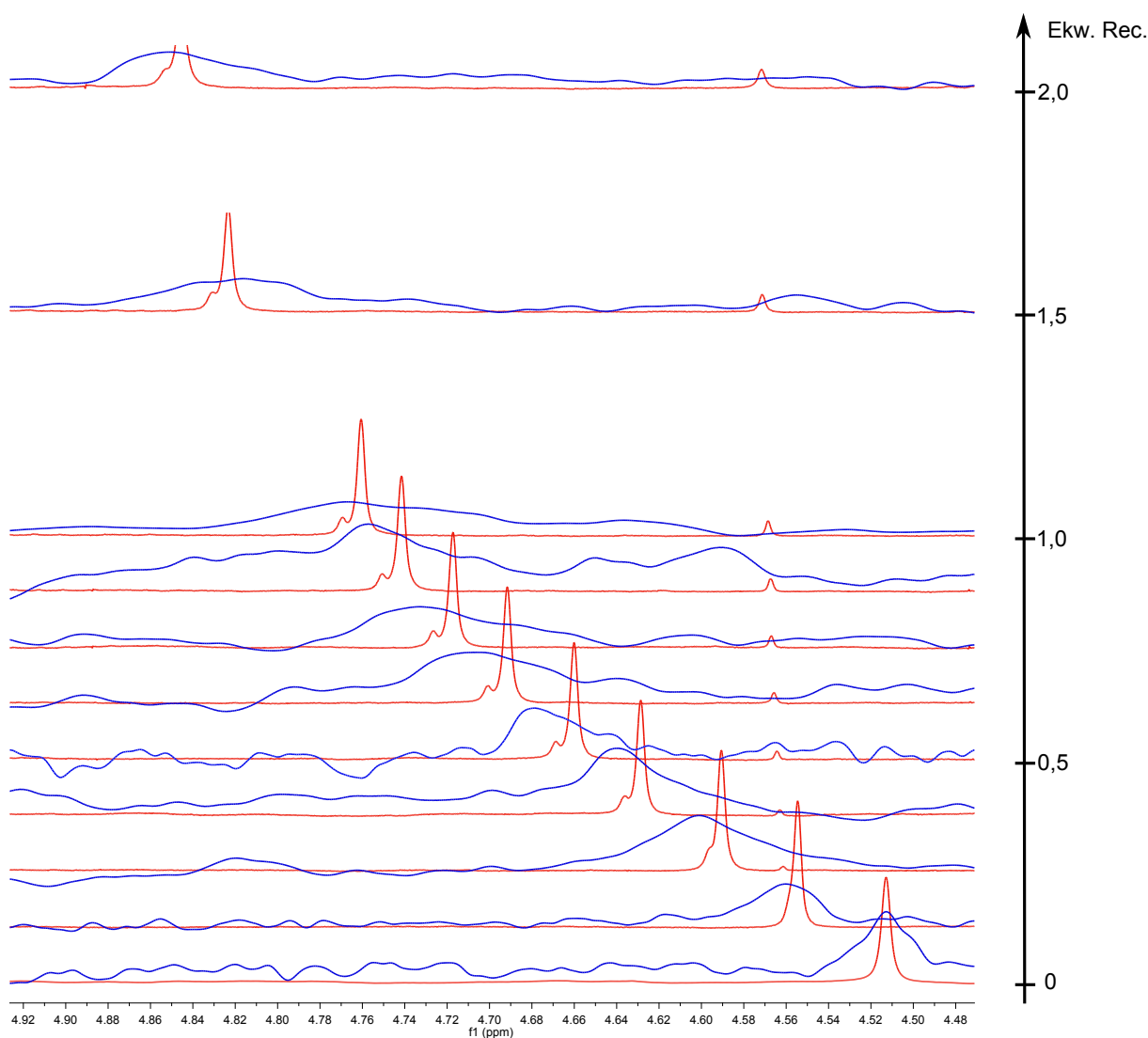
lizacjach otrzymałem kwas o ee=87% z wydajnością 25%. Ostatecznie, po oddzieleniu aminy, przeprowadziłem krystalizację kwasu z dichloroetanu, uzyskując kwas (*R*)-**103** z całkowitą wydajnością 9,5%, ee=95,6% i stopniem deuteracji równym 87%.



Schemat 3.13: Znakowanie deuterem i rozdział enancjomerów kwasu migdałowego **103**

Miareczkowania odwrotne z selektywnie deuterowanym pseudoracematem prowadziłem pod kontrolą NMR na spektrometrze 600MHz w acetonitrylu. Wykonanie pomiarów widm ^1H i ^2H na jednej próbce wiązało się z szeregiem problemów. Sygnał deuteru obserwowany był na kanale *lock'u*, co oznaczało konieczność wyłączenia systemu *lock* na czas pomiaru, a to skutkowało niestabilnością pola magnetycznego w czasie i poszerzeniem sygnałów. Zastosowanie rozpuszczalnika deuterowanego spowodowało, że na widmie ^2H obok ogromnego sygnału rozpuszczalnika pojawiał się bardzo słaby sygnał od migdałanu, o bardzo niskim stosunku sygnału do szumu (S/N). Przedłużona akwizycja nie mogła poprawić stosunku S/N, gdyż jednocześnie, ze względu na niestabilność pola, szerokość sygnału rosła wraz z czasem pomiaru. Częściowo problem niskiej czułości udało się rozwiązać, gdy zastosowałem jako rozpuszczalnik mieszaninę $\text{CH}_3\text{CN} + \text{CD}_3\text{CN}$ (1:1 v/v). Sygnał rozpuszczalnika na widmie protonowym był bardzo intensywny, ale nadal umożliwiał obserwację sygnału migdałanu, jednocześnie poprawiała się jakość sygnału na kanale deuterowym. Aby ułatwić wyznaczenie $\Delta\delta$, do mieszaniny wprowadziłem po 5 μL CHCl_3 i CDCl_3 , których sygnały na jednym i drugim kanale traktowałem jako sygnały odniesienia. Podczas miareczkowania sygnały ulegały poszerzeniu, co spowodowało, że dla dalszych punktów miareczkowania określenie położenia sygnałów na widmie ^2H było bardzo trudne i obarczone dużą niepewnością. Przebieg pomiaru dla receptora **71d** przedstawia Rys. 3.11.

Stopień zdeuterowania (*R*)-migdałanu wynosił 89%, co oznacza, że w mieszaninie obecne jest 11% protowanego związku. W trakcie eksperymentu okazało się, że sygnały od enancjomerów migdałanu, które na aparacie 400MHz nakładały się na siebie bez możliwości rozróżnienia, na aparacie 600MHz są w większości punktów miareczkowania dobrze rozdzielone. Widoczny jest sygnał reszkowy od protowanego (*R*)-migdałanu, który począwszy od czwartego punktu miareczkowania jest oddzielony od większego sygnału (*S*)-migdałanu. Okazało się zatem, że do



Rysunek 3.11: Przebieg miareczkowania konkurencyjnego dla receptora **71d** z pseudoracematem migdałanu TBA. Kolor czerwony – kanał ^1H , kolor niebieski – kanał ^2H

przeprowadzenia miareczkowania konkurencyjnego wystarczyło w tym wypadku zwiększenie częstotliwości podstawowej spektrometru NMR.

Sygnaly od (*S*)-migdałanu odczytałem wprost z widma protonowego. Położenia sygnalów od (*R*)-migdałanu uzyskałem na dwa sposoby. W pierwszym użyłem przesunięć sygnalów (*R*)-migdałanu z kanału deuterowego. Mając na uwadze fakt, że dla częściowo nakładających się pików o znacznie różniące się intensywności, odczytane wprost z widma przesunięcia są zafałszowane, przeprowadziłem dekonwolucję dwóch sygnalów z kanału protonowegoⁱⁱⁱ, a uzyskane wyniki stanowiły drugi zestaw danych. Wyniki dwóch analizy przedstawia Tabela 3.9.

Analogiczne miareczkowanie przeprowadziłem dla receptora **71e**. W tym przypadku sygnaly protonowe od enancjomerów migdałanu także uległy rozdzielению na aparacie o wyższej częstotliwości. Ponownie przeprowadziłem osobne analizy numeryczne z wykorzystaniem dwóch

ⁱⁱⁱwykorzystałem narzędzie dostępne w programie MestReNova 6.0.4

Tabela 3.9: Wyniki miareczkowania konkurencyjnego z wykorzystaniem pseudoracematu migdalanu

ekw. Rec.	(S)-Man	(R)-Man		$\Delta\delta(^1\text{H})$ dekonw.	α
	$\Delta\delta(^1\text{H})$	$\Delta\delta(^2\text{H})$	α		
0,000	4,513	4,513		4,513	
0,146	4,555	4,560	0,919	-	
0,283	4,591	4,601	0,898	-	
0,413	4,629	4,640	0,923	4,637	0,927
0,536	4,660	4,679	0,858	4,669	0,927
0,652	4,692	4,708	0,902	4,701	0,928
0,763	4,717	4,733	0,908	4,727	0,929
0,868	4,742	4,758	0,910	4,751	0,928
0,968	4,761	4,767	4,770	0,926	
$\Delta\delta^{max}$	4,845	4,858		4,851	
		$\bar{\alpha}$	0,903		0,927
		$2\sigma/\bar{\alpha}$	4,8%		0,19%

zestawów danych. Wyniki z tych dwóch miareczkowań zestawione z wynikiem miareczkowania ze wzorcem przedstawia Tabela 3.10. Analizy danych z kanału deuterowego dały stosunkowo największe niepewności pomiaru, związane głównie z trudnością w określeniu położenia pików. Wyniki obu analiz są w ramach błędu doświadczalnego zgodne z poprzednimi wynikami uzyskanymi z zastosowaniem receptora odniesienia.

Tabela 3.10: Porównanie wyników miareczkowania konkurencyjnego z mieszaniną pseuracemiczną z wynikami miareczkowania z receptorem odniesienia

receptor	selektywność α		
	H-D	H-H dekonw.	miar. z H^{ref}
71d	$0,903 \pm 4,8\%$	$0,927 \pm 0,2\%$	$0,893 \pm 5,3\%$
71e	$0,821 \pm 12\%$	$0,855 \pm 0,5\%$	$0,842 \pm 4,5\%$

Dwa opisane wyżej doświadczenia dowodzą, że miareczkowanie konkurencyjne obserwowane na dwóch kanałach protonowym i deuterowym jest możliwe do przeprowadzenia, a otrzymane wyniki są zgodne z uzyskanymi innymi metodami. Dodatkowymi wnioskami z przeprowadzonych eksperymentów są sugestie dotyczące technicznych aspektów prowadzenia pomiarów w przyszłości. Mieszanina 1:1 rozpuszczalnika deuterowanego i niedeuterowanego pozwoliła mierzyć interesujące sygnały protonowe obok bardzo silnego sygnału rozpuszczalnika, jednak na kanale ^2H przy znacznym poszerzeniu piku, sygnał nadal cechował niekorzystny stosunek S/N. Lepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie mieszaniny rozpuszczalników o znacz-

nej przewodze rozpuszczalnika niedeuterowanego, np. 9:1. Pewna ilość rozpuszczalnika deuterowanego potrzebna jest do prawidłowego działania systemu *lock* podczas akwizycji na kanale protonowym. Pomiar widma protonowego można zrealizować z presaturacją sygnału rozpuszczalnika i obserwacja sygnałów anionu (leżących daleko od sygnału rozpuszczalnika) nie nastęczałaby problemu. Presaturacji sygnału rozpuszczalnika nie można przeprowadzić na kanale ^2H . Zmniejszenie zawartości rozpuszczalnika deuterowanego automatycznie poprawiłoby jakość obserwowanego widma deuterowego i umożliwiłoby bardziej precyzyjne wyznaczanie położenia sygnałów. W toku eksperymentów okazało się, że dla badanych receptorów obserwacja przesunięć chemicznych na dwóch kanałach nie była konieczna, gdyż w dostatecznie silnym polu magnetycznym możliwe było rozróżnienie obu singletowych sygnałów na kanale protonowym. W przypadku innych anionów, w szczególności anionów naturalnych α -aminokwasów i kwasów 2-arylopropanowych (np. **14-16**), sygnały pochodzące od $\text{C}_\alpha - \text{H}$ mają charakter multipletów. Obserwacja ich rozsunęcia podczas miareczkowania jest trudniejsza i wydaje się, że dla tych związków zastosowanie mojej metody znakowania izotopowego byłoby zasadne i umożliwiłoby przeprowadzenie miareczkowania konkurencyjnego. Wprowadzenie deuteru na stereogenicznym atomie węgla α -aminokwasów jest łatwo osiągalne syntetycznie, a rozdział enancjomerów tychże związków możliwy jest na wiele sposobów.

3.5.2 Pomiary ekstrakcyjne

3.5.2.1 Metoda enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-ciało stałe (ELSE)

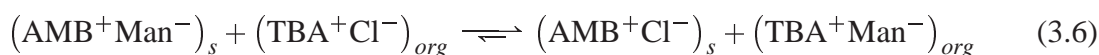
Jak pokazałem w Rozdziale 2.3.4.4, eksperymenty ekstrakcyjne mogą zapewnić bezpośredni, konkurencyjny pomiar enancjoselektywności receptora. Brak doniesień literaturowych, w których wyniki tych doświadczeń były jakkolwiek skorelowane z enancjoselektywnościami wyznaczonymi klasycznymi metodami miareczkowania, skłonił mnie do przeprowadzenia takiego porównania na mojej grupie receptorów.

Aby porównanie wyników klasycznych miareczkowań i pomiarów ekstrakcyjnych było bardziej wiarygodne, pomiary powinny być prowadzone w tym samym rozpuszczalniku. Typowe rozpuszczalniki niemieszające się z wodą, stosowane w eksperymentach ekstrakcji ciecz-ciecz: toluen, dichlorometan, chloroform, octan etylu nie należą do preferowanych rozpuszczalników używanych w badaniach nad receptorami na aniony. Najczęstszym problemem jest ograniczona rozpuszczalność receptorów w wymienionych rozpuszczalnikach. Z kolei typowe dla chemii supramolekularnej anionów rozpuszczalniki: DMSO, aceton, acetonitryl, metanol mieszają się z wodą i nie jest możliwe zastosowanie ich w eksperymentach ekstrakcji ciecz-ciecz (ELLE). Zdecydowałem się zaproponować zmianę w prowadzeniu eksperymentów ekstrakcyjnych. Zamiast fazy wodnej jako źródło racematu zastosowałem fazę stałą - żywicę jonowymienną Amberlite-400, pomiar polegał na enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-ciało stałe

(*enantioselective liquid-solid extraction* - ELSE). Żywica ta posiada wbudowane w polimer grupy beznylotrimetyloamoniowe, w prowadzonych przeze mnie pomiarach przeciwjonem był badany racemiczny karboksylan.

W handlowo dostępnej żywicy z przeciwjonem chlorkowym (**Amb-Cl**) zamieniłem przeciwjon na anion hydroksylowy (**Amb-OH**). Żywice z do badań ekstrakcyjnych otrzymałem mieszając **Amb-OH** z roztworem odpowiedniego racemicznego kwasu.

We wstępnych badaniach z użyciem żywicy z racemicznym migdalanem (**Amb-Man**) pokazałem, że mieszanie żywicy z roztworem chlorku TBA w różnych rozpuszczalnikach organicznych (aceton, acetonitryl, dichlorometan, DMF, DMSO) prowadzi do reakcji wymiany chlorek-migdalan. Co więcej, wykazałem, że czysty optycznie (*S*)-migdalan TBA w acetonitrylu mieszany z **Amb-Man** (20-krotny nadmiar migdalanu na żywicy) daje po 3 godzinach mieszaninę racemiczną (*ee* < 5%) w fazie organicznej. Pierwszy etap eksperymentu (na przykładzie migdalanu) przedstawia równanie:



$$K_D = \frac{[AMB^+Cl^-]_s \cdot [TBA^+Man^-]_{org}}{[AMB^+Man^-]_s \cdot [TBA^+Cl^-]_{org}} \quad (3.7)$$

Żywica wykazuje silniejsze powinowactwo do anionów chlorkowych niż do karboksylanów¹¹⁷, dlatego równowaga jest przesunięta silnie w prawo. Stała równowagi tej reakcji (współczynnik podziału) jest taka sama dla obu enancjomerów. Aniony kwasu migdałowego wprowadzone na tej drodze do fazy organicznej ulegały następnie skompleksowaniu przez receptor. Ze względu na odmienne powinowactwo receptora (H^*) do enancjomerów anionu, były one skompleksowane w różnym stopniu zgodnie z równaniami:

$$K_S = \frac{[H^*Man_S]_{org}}{[H^*]_{org} \cdot [Man_S]_{org}} \quad (3.8)$$

$$K_R = \frac{[H^*Man_R]_{org}}{[H^*]_{org} \cdot [Man_R]_{org}} \quad (3.9)$$

Całkowite stężenie każdego z enancjomerów w fazie organicznej określa Rów.(3.12)

$$[Man_{S/R}]_{0,org} = [Man_{S/R}]_{org} + [H^*Man_{S/R}]_{org} \quad (3.10)$$

$$[Man_{S/R}]_{0,org} = [Man_{S/R}]_{org} + K_{S/R} \cdot [H^*] \cdot [Man_{S/R}]_{org} \quad (3.11)$$

$$[Man_{S/R}]_{0,org} = [Man_{S/R}]_{org} \cdot (1 + K_{S/R} \cdot [H^*]) \quad (3.12)$$

Po uwzględnieniu Rów. (3.7), selektywność operacyjna wynosi:

$$\alpha_{op} = \frac{[\text{Man}_S]_{0,org}}{[\text{Man}_R]_{0,org}} = \frac{\frac{K_D [\text{AMB}^+ \text{Man}_S^-]_s [\text{TBA}^+ \text{Cl}^-]_{org}}{[\text{AMB}^+ \text{Cl}^-]_s} \cdot (1 + K_S \cdot [\text{H}^*])}{\frac{K_D [\text{AMB}^+ \text{Man}_R^-]_s [\text{TBA}^+ \text{Cl}^-]_{org}}{[\text{AMB}^+ \text{Cl}^-]_s} \cdot (1 + K_R \cdot [\text{H}^*])} \quad (3.13)$$

$$\alpha_{op} = \frac{[\text{AMB}^+ \text{Man}_S^-]_s \cdot (1 + K_S \cdot [\text{H}^*])}{[\text{AMB}^+ \text{Man}_R^-]_s \cdot (1 + K_R \cdot [\text{H}^*])} \quad (3.14)$$

Przy zapewnieniu dużego nadmiaru migdalanu w fazie wodnej można przyjąć, że przez cały czas znajduje się w niej racemat, co dodatkowo upraszcza równanie:

$$\alpha_{op} = \frac{1 + K_S \cdot [\text{H}^*]}{1 + K_R \cdot [\text{H}^*]} \quad (3.15)$$

Ostatecznie jeżeli spełniony będzie warunek $K_{S/R} \cdot [\text{H}^*] \gg 1$, wówczas selektywność operacyjna będzie równa selektywności intrystycznej:

$$\alpha_{op} = \frac{1 + K_S \cdot [\text{H}^*]}{1 + K_R \cdot [\text{H}^*]} \approx \frac{K_S}{K_R} = \alpha_{int} \quad (3.16)$$

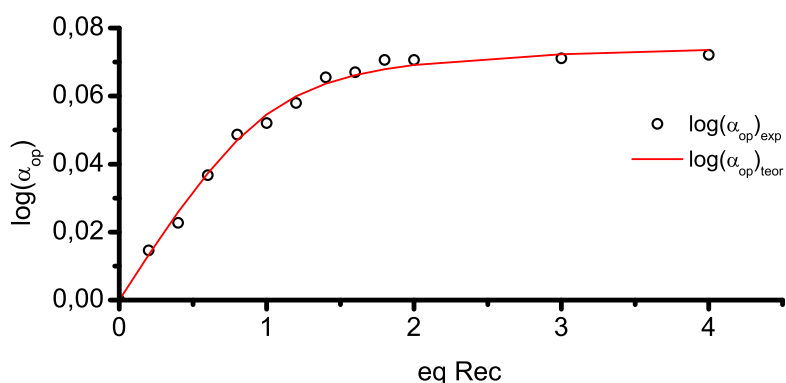
Pomiary enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-faza stała (ELSE) przeprowadziłem dla serii DAB i DAA w acetonitrylu, przy użyciu dwukrotnego nadmiaru receptora i 10-krotnego nadmiaru anionu na żywicy **Amb-Man** względem chlorku TBA ($0,01 \text{ mol dm}^{-3}$). Po trzech godzinach mieszania roztworu w acetonitrylu z fazą stałą, roztwór przesączałem przez krótką warstwę Celitu i migdalan przekształciłem w ester izopropylowy¹¹⁸. Analizę względnej zawartości enancjomerów za pomocą GC-FID na kolumnie Chirasil-Dex-CB.

Dla receptora, który w eksperymencie wykazywał najlepszą enancjoselektywność - **70e** przeprowadziłem dodatkowe pomiary mające potwierdzić prawidłowość zależności zawartych w Rów. (3.15). W serii pomiarów zachowywałem stałą objętość rozpuszczalnika, stężenie TBACl i masę **Amb-Man**, systematycznie zmieniałem natomiast stężenie receptora. Wyprowadziłem równanie na stężenie wolnego H:

$$[\text{H}]^2 + \left(\frac{2\alpha_T}{\bar{K} (\alpha_T^2 + 1)} - [\text{H}]_0 + [\text{G}]_0 \right) [\text{H}] - \frac{2[\text{H}]_0 \alpha_T}{\bar{K} (\alpha_T^2 + 1)} = 0 \quad (3.17)$$

gdzie $\bar{K} = \sqrt{K_S \cdot K_R}$ oznacza średnią geometryczną stałych K_S i K_R , zaś $[\text{G}]_0$ odnosi się do sumy enancjomerów G. Połączenie równania (3.17) z (3.15) dało zależność $\alpha_{op} = f(\alpha_{int}, [\text{H}]_0, [\text{G}]_0)$, którą porównałem z opisaną powyższej testową serią pomiarów – Wykres 3.11

Jak wynika z wykresu, występuje znakomita zgodność między teoretycznym przebiegiem a wynikami doświadczalnymi, co potwierdza słuszność rozumowania przedstawionego we wzorach (3.7-3.15) dla pomiarów ELSE. Przy stężeniach dobranych w doświadczeniu i przy stosun-



Wykres 3.11: Wyniki selektywności operacyjnej wyznaczone doświadczalnie i teoretycznie dla zmieniających się wartości $[H]_0$. Wartości równoważników receptora odnoszą się do początkowego stężenia TBACl

kowo wysokich wartościach stałych trwałości kompleksów na krzywej $\alpha_{op} = f(\alpha_{int}, [H]_0, [G]_0)$ występuje plateau, które rozpoczyna się przy ok 1,5 ekw. H. Oznacza to, że wynik pomiaru praktycznie nie zależy od ilości receptora, jeżeli $[H]_0 > 1,5[TBACl]_0$ i wynik ten odpowiada α_{int} . W praktyce gwarantuje to niezależność wyniku od dokładności przygotowania naważki receptora – wystarczy, że naważka będzie nie mniejsza niż wartość odpowiadająca 1,5 n_{TBACl} . Oznacza to także, że możliwe jest prowadzenie pomiarów z użyciem receptorów nie spełniających wysokich wymagań odnośnie czystości, pod warunkiem, że zanieczyszczenia nie są bardziej efektywne od receptora w wiązaniu gościa.

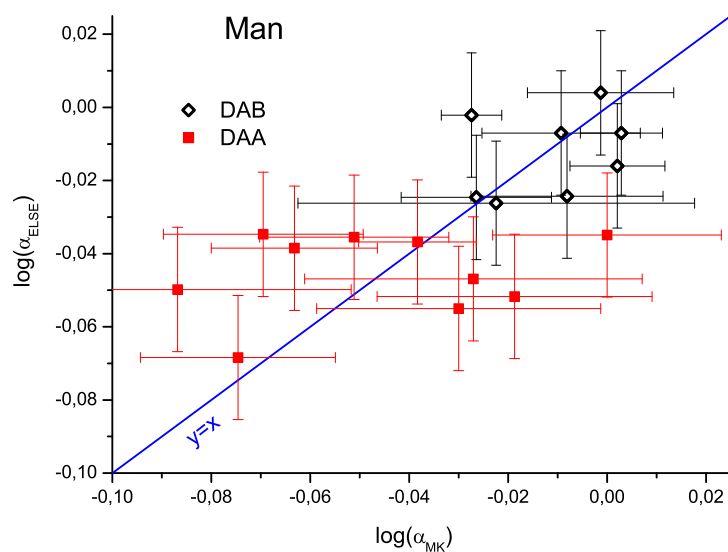
Przeprowadziłem dodatkowe pomiary z użyciem obu enancjomerów receptorów **71e** i **71i**, dla obu par otrzymałem dokładnie przeciwne selektywności. Wynik ten wyklucza niepożądaną możliwość, że obserwowana selektywność jest następstwem artefaktów w procesie derywatywacji i analizy.

Na podstawie czterokrotnie powtórzonej analizy z receptorem **71e**, oszacowałem niepewność pomiaru na ok. $\pm 3\%$. Wyniki ELSE i MK zestawiałem w Tabeli 3.11, a korelację tych metod przedstawia Wykres 3.12. Uzyskałem dobrą zgodność między obydwoma metodami. Z dokładnością do niepewności pomiarowych, wszystkie punkty leżą na prostej $y = x$, czyli pomiary ekstrakcyjne odtworzyły wyniki miareczkowań.

Następnie, w analogiczny sposób jak dla kwasu migdałowego, przygotowałem porcje żywnicy Amberlite z pięcioma N-acetylowanymi aminokwasami: **Amb-AcAla**, **Amb-AcVal**, **Amb-AcLeu**, **Amb-AcMet** i **Amb-AcPhe**. Dla receptorów **70a** i **71e** przeprowadziłem pomiary ELSE z wykorzystaniem tych żywic. Po dwóch godzinach mieszania, przesączeniu i przemyciu Celitu acetonitrylem przeprowadziłem ich derywatyzację do estrów izopropylowych. Reakcje prowadziłem z użyciem jodku izopropylu w $80\text{ }^\circ\text{C}$ ¹¹⁹. Oryginalna metoda otrzymywania estrów izopropylowych zakłada użycie kwasu karboksylowego i CsCO_3 (3 ekw.) w acetonitrylu. Jednakże w przesączu po ELSE, kwasy występują od razu w postaci zdeprotonowanej – jako sole

Tabela 3.11: Zestawienie wyników eksperymentów ELSE i MK dla migdałanu

Receptor 71	α_{ELSE}	α_{MK}	Receptor 70	α_{ELSE}	α_{MK}
a	0,98	1	a	0,9	0,94
b	0,96	1,01	b	0,92	0,89
c	0,93	1	c	0,92	0,92
d	0,96	0,98	d	0,92	0,89
e	0,97	0,94	e	0,85	0,84
f	0,92	0,98	f	0,92	0,85
g	1	0,94	g	0,92	0,86
h	0,91	0,95	h	0,9	0,86
			i	0,89	0,82
			j	0,88	0,93
			k	0,89	0,96
			l	0,9	0,88

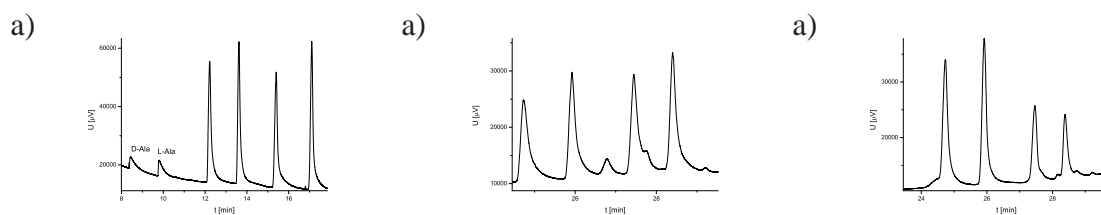


Wykres 3.12: Korelacja między wynikami ELSE a MK dla Man

TBA, dlatego nie dodawałem zasady. Modelowa reakcja z L-AcPheOTBA wykazała, że w tych warunkach racemizacja następuje w znikomym stopniu (<1%). Proporcje enancjomerów ekstrahowanych aminokwasów określiłem za pomocą GC-FID z kolumną Chirasil-Val (Agilent).

Następnie przygotowałem mieszaninę 5 żywic zawierających różne aminokwasy (**Amb-MixAA**) w równych ilościach masowych. Opracowałem metodę GC *jednoczesnego* rozdzielenia pięciu par enancjomerów: alaniny, waliny, leucyny, metioniny i fenyloalaniny^{iv}. Kolejne pomiary dla receptorów **70a** i **71e** przeprowadziłem z mieszaniną **Amb-MixAA**, stosunki enancjomerów określiłem w pojedynczej analizie GC. Wyniki uzyskane w osobnych pomiarach dla każdego z aminokwasów były zgodne z wynikami pomiarów dla mieszaniny. Jedynie dla alaniny niska czułość detektora FID w połączeniu z dużą szerokością sygnałów bardzo utrudnia precyzyjne całkowanie chromatogramu i wszystkie wyniki uzyskane dla tego anionu były niepewne (Rys.3.12a).

Pomiary z mieszaniną **Amb-MixAA** przeprowadziłem następnie dla pozostałych receptorów DAB i DAA. W wielu przypadkach ilościowa analiza chromatogramów była utrudniona. W części analiz dodatkowe piki pochodzące od produktów rozpadu receptora, lub jego śladowych zanieczyszczeń nakładały się na piki pochodzące od aminokwasów. W części przypadków możliwa była numeryczna dekonwolucja tych sygnałów i analiza uzyskanych selektywności (Rys. 3.12b), jednak konieczność przeprowadzenia operacji na chromatogramie zawsze zmniejsza precyzję pomiaru. Ostatecznie dla niektórych pików, dodatkowe sygnały nieznanego pochodzenia nakładały się z pikami aminokwasów w sposób całkowicie uniemożliwiający analizę (Rys. 3.12c). Wyniki uzyskane dla receptorów serii DAB i DAA z **Amb-MixAA** przedstawia Tabela 3.12.



Rysunek 3.12: Problemy analityczne dla pomiarów z **Amb-MixAA**: a) słaba intensywność dla AcAla, b) nakładanie sygnałów wymagające dekonwolucji, c) nakładanie sygnałów uniemożliwiające analizę ilościową

Korelację między wynikami ELSE dla fenyloalaniny a wynikami miareczkowań przedstawia Wykres 3.13c. Dla większości wyników istnieje dobra zgodność między dwiema metodami, jednak sześć punktów bardzo silnie odbiega od zależności liniowej. Najprawdopodobniej w punktach tych odczyt stosunku enancjomerów AcPhe z chromatogramu był zafałszowany z

^{iv}Nie udało mi się opracować rozdzielania dla tryptofanu, sygnałów od tego aminokwasów nie obserwowałem nawet po wygrzewaniu kolumny w 200°C. Dla proliny nie uzyskałem rozdzielania. Innych aminokwasów nie używałem.

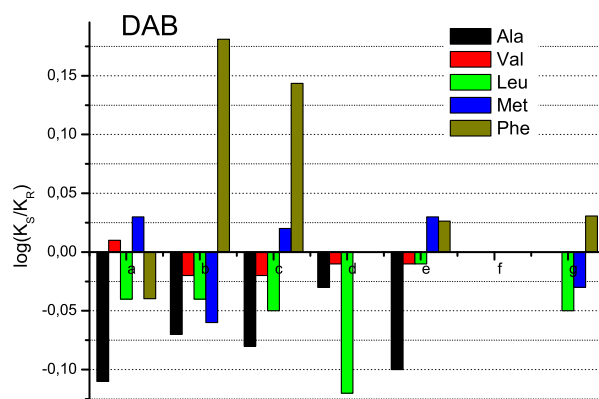
Tabela 3.12: Zestawienie wyników selektywności dla anionów aminokwasów ($\log(\alpha)$) w pomiarach ELSE

Receptor	Anion					
	Ala	Val	Leu	Met	Phe	
70	a	-0,106	0,005	-0,043	0,031	-0,040
	b	-0,069	-0,016 ^a	-0,044	-0,057	0,181
	c	-0,078	-0,016	-0,047	0,016	0,144
	d	-0,031	-0,012	-0,121 ^a	_b	_b
	e	-0,099	-0,006 ^a	-0,008	0,035	0,026
	f	_b	_b	_b	_b	_b
	g	_b	0,001	-0,049	-0,031	0,031
	h	-0,045	-0,010	-0,030	-0,038	0,077
71	a	-0,0573	-0,0223	-0,0421	-0,0055	-0,0083
	b	-0,0725	-0,0337	-0,0635	-0,0396	0,0260
	c	-0,0751	0,0009	-0,0704	-0,0189	-0,0440
	d	-0,2121	-0,0392 ^a	-0,0534	-0,0128	-0,0392
	e	-0,0267	0,0082	0,0425	-0,0054	0,0284 ^a
	f	-0,0343	_b	-0,1022	0,0088	-0,0085 ^a
	g	-0,0359	-0,0183	-0,0279 ^a	-0,0123	0,1423
	h	-0,1432	_b	_b	_b	_b
	i	-0,0719	-0,0209 ^a	-0,0157	_b	-0,0176
	j	-0,0707	-0,0438	-0,0505	-0,0519	-0,0177
	k	-0,1080	-0,0481	-0,0604	-0,0190	_b
	l	_b	_b	-0,0349	-0,0328	-0,1133

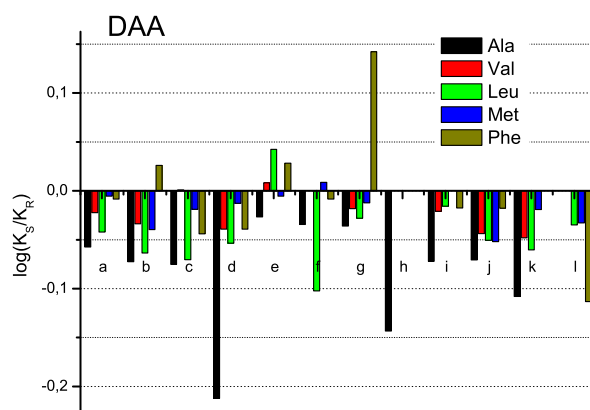
^a wynik po uwzględnieniu dekonwolucji

^b Nałożenie sygnałów uniemożliwiające analizę numeryczną.

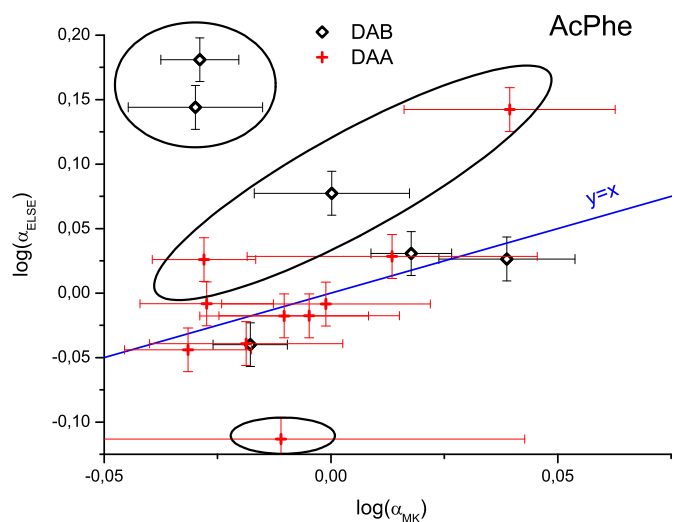
a)



b)



c)



Wykres 3.13: Wyniki pomiarów ELSE z **Amb-MixAA** dla receptorów serii a) DAB, b) DAA, oraz c) korelacja wyników ELSE z MK dla AcPhe

powodu nakładania sygnałów od pochodnej fenyloalaniny z dodatkowymi pikami nieznanego pochodzenia.

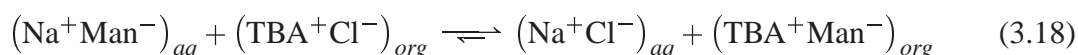
Jak wykazałem, metoda ELSE daje wiarygodne wyniki enancjoselektywności. Opracowana dla migdałanu procedura przeprowadzenia eksperymentu ekstrakcyjnego, derywatywacji i analizy chromatograficznej jest równorzędną, pod względem jakości wyników, alternatywą dla miareczkowań klasycznych czy konkurencyjnych. Aby metoda ta była równie wartościowa dla anionów - N-acetylowych pochodnych aminokwasów, niezbędna jest jeszcze optymalizacja procedury derywatywacji i analizy chromatograficznej.

Pomiary ekstrakcyjne są znacznie łatwiejsze do przeprowadzenia, i szybsze w porównaniu z miareczkowaniami klasycznymi lub konkurencyjnymi. Konkurencyjny charakter pomiarów ELSE zapewnia większą precyzję pomiaru, jak wykazałem, dokładność stężeń nie wpływa na uzyskany wynik. Metoda ta szczególnie nadaje się do badania całych serii receptorów, gdyż etap ekstrakcji i derywatywacji można prowadzić jednocześnie dla wielu próbek. Do dopracowania szczegółów eksperymentalnych byłem w stanie przeprowadzić etap ekstrakcji oraz derywatywacji dla wszystkich 20 receptorów w ciągu ok. ośmiu godzin, analiza chromatograficzna zajmowała kolejne ok. 5 godzin dla migdałanu lub 10 godzin dla mieszaniny aminokwasów. Oznacza to, że w ciągu dwóch dni możliwa jest ocena jakości rozpoznania chiralnego dla 20 receptorów. Zastosowanie autosamplera pozwoliłoby skrócić ten czas do jednej doby, nawet przy większej liczbie receptorów. Jak pokazałem dla eksperymentów z mieszaniną żywic **Amb-MixAA**, możliwe jest przeprowadzenie równoczesnej analizy dla kilku anionów, ograniczeniem w doborze liczby i rodzaju anionów jest tylko metoda analityczna. Mimo pojawiających się fałszywych wyników, wynikających z błędów w analizie GC, metodę ELSE można z powodzeniem stosować jako badanie przesiewowe bibliotek receptorów. Najlepsze z uzyskanych wyników (jak również wyniki wątpliwe) powinny zostać potwierdzone za pomocą któregoś z wariantów miareczkowania konkurencyjnego.

Dzięki opracowaniu metody ELSE i wykazaniu jej skuteczności, udało mi się sprowadzić laboratoryjną procedurę badania rozpoznania chiralnego do praktycznie tych samych procedur, które używane są w badaniach nad reakcjami enancjoselektywnymi. Jak zasugerowałem w Rozdziale 2.4 (str. 76) znacznie większy postęp w dziedzinie stereokontrolowanej syntezy w porównaniu z dziedziną rozpoznania chiralnego jest następstwem faktu, że metodologia oceny nowych katalizatorów, czy procedur syntetycznych jest łatwiejsza, szybsza i bardziej wiarygodna niż metodologia badań jakości rozpoznania chiralnego. Dzięki metodzie ELSE badania and enancjoselektywnymi receptorami mogą być równie dogodne jak badania nad enancjoselektywnymi katalizatorami. Uważam, że dzięki tej metodzie analizy, wąskim gardłem procesu badania rozpoznania chiralnego nie będzie już etap ewaluacji receptorów, ale etap ich syntezy.

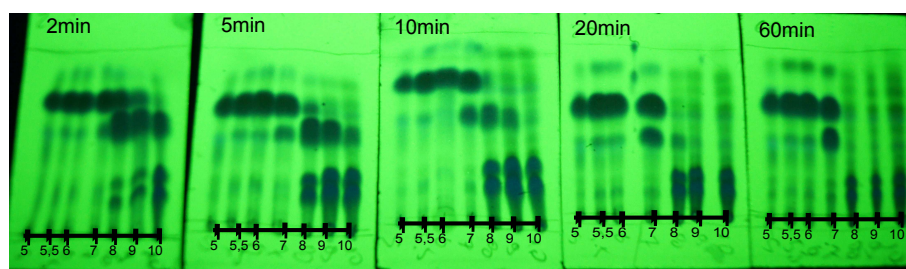
3.5.2.2 Metoda enancjoselektywnej ekstrakcji ciecz-ciecz (ELLE)

Kolejną metodą, którą postanowiłem sprawdzić w badaniach rozpoznania chiralnego anionów były pomiary ekstrakcji ciecz-ciecz – ELLE, której wyniki postanowiłem porównać z jej analogiem – ELSE. W pierwszych eksperymentach ELLE używałem racemicznego roztworu migdalanu sodu w wodzie i roztworu receptora w dichlorometanie (DCM). Receptory serii DAB i DAA są elektrycznie obojętne, zatem ekstrakcja polegająca na metatezie (Rów. (2.53), str. 69) jest niemożliwa. Wydawało się także mało prawdopodobne aby receptor, wiążąc anion, zapewnił lipofilowość pary jonowej wystarczającą do jej ekstrakcji. Eksperyment jednoznacznie wykazał, że ilość migdalanu ekstrahowana w takim pomiarze jest poniżej progu detekcji. Aby umożliwić ekstrakcję anionu do fazy organicznej, wprowadziłem chlorek TBA. Ze względu na dużą lipofilowość migdalanu i dużą hydrofilowość anionu chlorkowego równowaga reakcji wymiany (3.18) przesunięta była praktycznie całkowicie w prawo.



Wszystkie równania i zależności przedstawione dla eksperymentów ELSE dotyczą także pomiarów ELLE. Podczas początkowych eksperymentów ELLE z receptorami DAA obserwowałem szybką zmianę barwy fazy organicznej, świadczącą o reakcji z udziałem receptora. Biorąc pod uwagę fakt, że w receptorach DAA występuje ugrupowanie tiomocznikowe podatne na hydrolizę, zdecydowałem się zbadać wpływ pH fazy wodnej na stabilność receptora w pomiarach ELLE. Przygotowałem serię roztworów migdalanu sodu w buforze fosforanowym o pH = 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10. Roztwory te mieszałem z roztworami receptora **71e** w DCM. Skład fazy organicznej określałem za pomocą TLC. W przypadkach, gdy do mieszaniny nie dodałem chlorku TBA, receptor nie ulegał zmianie w czasie, niezależnie od wartości pH fazy wodnej. Jednakże po dodaniu chlorku TBA, receptor ulegał reakcji w mieszaninach, w których pH fazy wodnej przekraczało 6 (Rys. 3.13). Rozkład receptora był tym szybszy, im większa była wartość pH. Dla pH=10 całkowity zanik receptora nastąpił przed upływem dwóch minut, w pH=8 rozkład trwał ok 20 min, a dla pH=7 był powolny, lecz zauważalny w skali 60 minut. Dopiero dla pH=6 można było przyjąć, że receptor jest stabilny w warunkach eksperymentu. Z powyższych pomiarów wynika, że chlorek TBA działał w warunkach pomiaru jako efektywny katalizator przeniesienia międzyfazowego, gdzie przenoszonym anionem obok migdalanu był anion hydroksylowy, który powodował hydrolizę tiomocznika do mocznika. Dla receptorów serii DAB nie zaobserwowałem reaktywności tego rodzaju.

W dalszych pomiarach używałem wodny roztwór racemicznego migdalanu sodu o pH=6 i stężeniu 0,2 M oraz roztwór dichlorometanowy TBACl z receptorem o stężeniach odpowiednio 5 mM i 2,5 mM. Po rozwarstwieniu faz, pobierałem porcję fazy organicznej i prowadziłem derywatyzację i analizę tak jak dla pomiarów ELSE. Przed przystąpieniem do badania serii

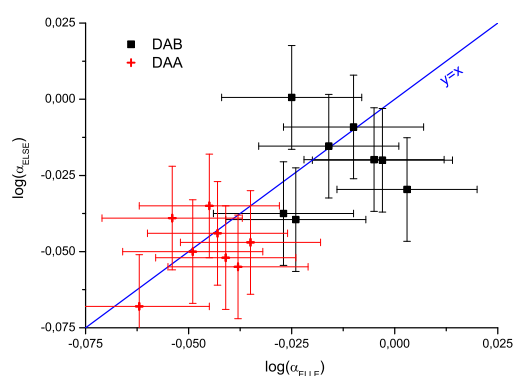


Rysunek 3.13: Płytki TLC przedstawiające szybkość rozkładu receptora **71e** w eksperymentach ELLE o różnych wartościach pH fazy wodnej

receptotów, przeprowadziłem eksperymenty kontrolne:

- w pomiarze bez TBACI ilość migdalanu w fazie organicznej była poniżej progu detekcji,
- mieszanie (*S*)-migdalanu TBA w fazie organicznej z dużym nadmiarem racematu w fazie wodnej prowadziło po 2h do racematu w fazie organicznej,
- zastosowanie przeciwnego enancjomeru receptora powodowało odwrócenie selektywności.

Stosunki enancjomerów migdalanów, otrzymane w eksperymentach ELLE, zestawione z wynikami ELSE przedstawia Tabela 3.13. Niepewność pomiaru oszacowałem, podobnie jak dla ELSE, na $\pm 4\%$. Korelację między omawianymi metodami pomiarowymi przedstawia Wykres 3.14. Umiarkowana zaledwie zgodność obu zestawów wyników dowodzi, że zmiana rozpuszczalnika ma wpływ na enancjoselektywność receptorów. Wszelkie porównania jakości rozpoznania chiralnego lub alternatywnych metody analizy powinny dotyczyć pomiarów w tym samym rozpuszczalniku.



Wykres 3.14: Graficzna korelacja między wynikami ELLE i ELSE

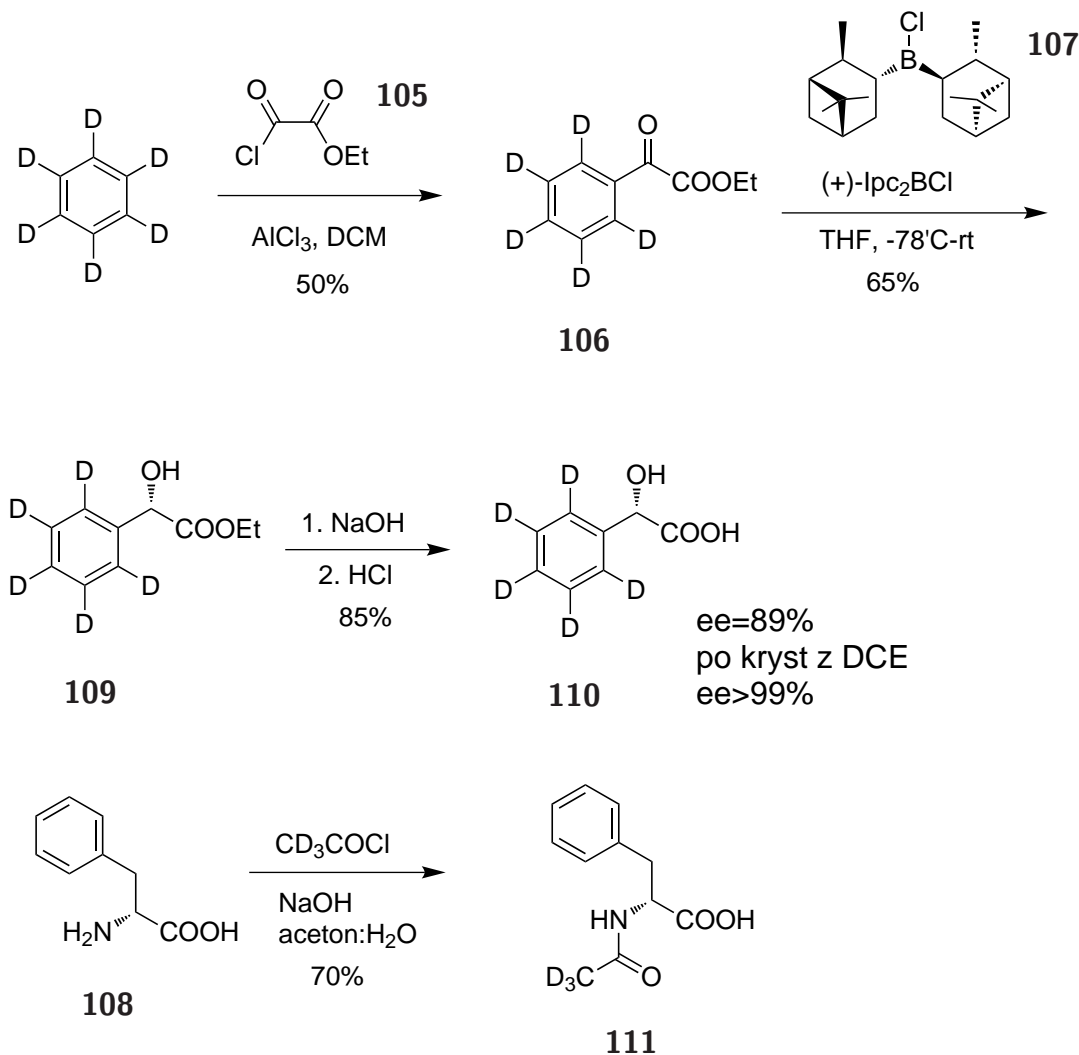
Tabela 3.13: Wyniki pomiarów ELLE zestawione z wynikami ELSE, niepewność obu pomiarów oszacowałem na $\pm 4\%$

Receptor	α		
	ELLE	ELSE	
70	a	0,98	0,98
	b	0,99	0,95
	c	1,01	0,93
	d	0,99	0,96
	e	0,96	0,97
	f	0,94	0,92
	g	0,94	1,00
	h	0,95	0,91
71	e	0,87	0,85
	f	0,90	0,92
	g	0,88	0,92
	h	0,92	0,90
	i	0,83	0,89
	j	0,92	0,88
	k	0,91	0,89
	l	0,90	0,90

3.5.3 Pomiary z użyciem spektrometrii mas

Kolejną metodą określania enancjoselektywności receptorów, którą zdecydowałem się przetestować na moich receptorach była metoda spektrometrii mas ze znakowaniem izotopowym. Metoda ta nigdy do tej pory nie została zastosowana w odniesieniu do rozpoznania chiralnego anionów. Sytuacja, w której *wszystkie* wyniki spektrometrii mas zostałyby odniesione do wyników klasycznych miareczkowań, czy innych metod, nie ma precedensu w literaturze. Eksperymenty przeprowadziłem metodą ESI-MS w sposób analogiczny do pomiarów Sawady⁸¹. Na potrzeby analizy przeprowadziłem syntezę znakowanych izotopowo anionów (Schemat 3.14). Ze względu na istotny udział mas M+1 i M+2 w rozkładzie izotopowym receptorów, wskazane było, aby pseudoenancjomery różniły się masą przynajmniej o 3 Da. Z tego powodu nie mogłem zastosować w tych pomiarach przygotowanego uprzednio (*R*)-**103**, który zawiera tylko jeden atom deuteru. Syntezę znakowanego migdałanu rozpocząłem od benzenu-d₆, na którym przeprowadziłem reakcję Friedla-Craftsa z chloroszczawianem etylu **105**¹²⁰. Otrzymany ester

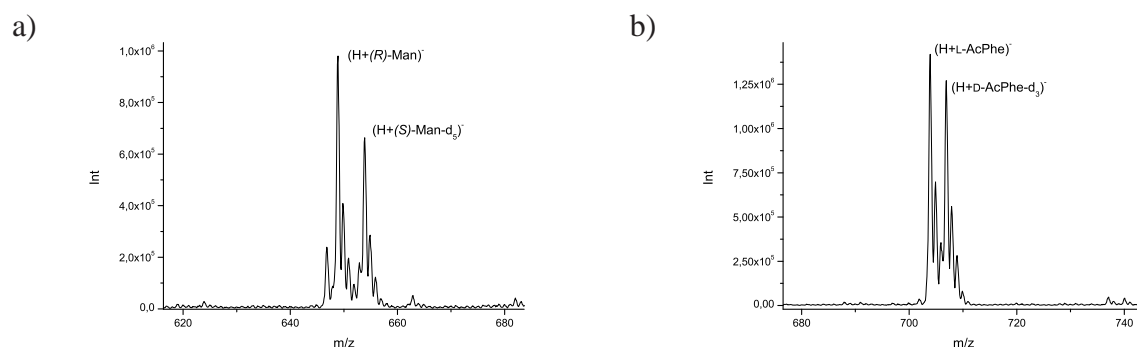
kwasy fenyloglioksalowego **106** poddałem enancjoselektywnej redukcji chiralnym chlorkiem boru **107**¹²¹, do odpowiedniego estru kwasu migdałowego. Związek ten udało mi się oczyścić dopiero po hydrolizie do wolnego kwasu (*S*)-**Man-d₅**). Nadmiar enancjomeryczny kwasu wynosił *ee*=92%, jednak po krystalizacji z dichloroetanu otrzymałem produkt o czystości *ee*>99%. Drugi ze znakowanych anionów otrzymałem w wyniku bezpośredniego acetylowania *D*-fenyloalaniiny **108** deuterowanym chlorkiem acetylu.



Schemat 3.14: Synteza czystych optycznie, znakowanych izotopowo kwasów karboksylowych - (*S*)-**Man-d₅** i *D*-**AcPhe-d₃**

Mieszanie równomolowych ilości znakowanych i nieznakowanych kwasów (mieszanie pseudoracemiczną) przekształciłem w sól TBA poprzez dodanie stechiometrycznej ilości mianowanego roztworu wodorotlenku TBA w metanolu. Następnie przygotowałem roztwory w acetonitrylu o stężeniu receptora $2,5 \times 10^{-6}$ M i stężeniu pseudoracemicznego G $2,5 \times 10^{-5}$ M. W roztworze powstawały kompleksy H·(*R*)-Man i H·(*S*)-Man-d₅ oraz H·L-AcPhe i H·D-AcPhe-d₃. Masy kompleksów różniły się odpowiednio o 5 i o 3 jednostki m/z. Tak przygotowane roztwory były wprowadzane bezpośrednio do aparatu za pomocą pompy strzykawkowej. Do ana-

lizi użyłem spektrometru mas typu potrójny kwadrupol (Q3) z jonizacją ESI (praca w trybie jonów ujemnych). Stosunki sygnałów ustalane były za pomocą procedury *Multiton* z czasem uśredniania wynoszącym >1min. We wszystkich pomiarach wykorzystywałem te same roztwory pseudaracematów ManOTBA i AcPheOTBA. Przykładowy fragment widma MS, zawierający sygnały od obu kompleksów, przedstawia Wykres 3.15.



Wykres 3.15: Fragment widma MS przedstawiający sygnały od dwóch pseudodiastereoizomerycznych kompleksów a) z Man, b) z AcPhe

Pierwsze pomiary przeprowadziłem dla czystych pseudoracemicznych soli oraz ich mieszanin z achiralnymi receptorami **70i**, **101** i **71n**. Pomiary te miały na celu wyznaczenie rzeczywistych stosunków stężeń jonów (S)-Man-d₅ i (R)-Man oraz D-AcPhe-d₃ i L-AcPhe. Dla mieszanin równomolowych ilości pseudoenancjomerycznych kwasów, stosunki sygnałów I_{S-d5}/I_R i I_{D-d3}/I_L powinny być równe jedności, jednak pewne odchylenia mogą wynikać z niedokładności naważek i obniżonego stopnia deuterowania. Określenie kontrolnych wartości stosunków sygnałów (RPI^0) jest niezbędne do analizy enancjoselektywności receptorów, której miarą może być dopiero stosunek:

$$\alpha_{MS} = \frac{RPI(H^*)}{RPI^0} \quad (3.19)$$

Tabela 3.14 przedstawia Wyniki wstępnych pomiarów, które pokazują, że określenie kontrolnej wartości RPI^0 nie jest jednoznaczne. Rezultaty dla poszczególnych receptorów są powtarzalne (poz. 2 i 3, 5 i 6) oraz niezależne od stężenia (poz 5, 7 i 8), jednakże występują zauważalne rozbieżności w wartościach RPI pomiędzy poszczególnymi achiralnymi receptorami a także dla pomiaru bez receptora. Kolejne analizy prowadziłem dla chiralnych receptorów, porównałem wartości RPI uzyskane dla obu enancjomerów H (Tabela 3.15). Wyniki selektywności dla enancjomerów powinny być dokładnie przeciwne i ich iloczyn powinien wynosić 1 (Rów.(3.20)). Jeżeli iloczyn jest różny od jedności może to oznaczać nieprawidłowe wyznaczenie kontrolnej wartości RPI^0 . Jak wynika z Rów.(3.21 i 3.22), wartość RPI^0 można obliczyć jako średnią geometryczną z dwóch wartości RPI dla enancjomerów receptorów.

Tabela 3.14: Zestawienie wartości RPI dla pomiarów bez receptora i z achiralnymi receptorami^a

lp	Receptor	RPI	
		Man	AcPhe
1	bez receptora ^b	0,78	1,31
2	70i	0,53	1,41
3	70i ^c	0,64	1,38
4	101	0,59	1,43
5	71n	0,77	1,03
6	71n ^c	0,71	1,06
7	71n ^d	0,76	1,02
8	71n ^e	0,76	1,03

^astężenie receptora $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, stężenie anionu $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ^bstężenie anionu $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ^cpomiar powtórzony innego dnia, ^dstężenie receptora $3,75 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, ^estężenie receptora $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$.

$$\alpha(\text{H}_S) \cdot \alpha(\text{H}_R) = 1 \quad (3.20)$$

$$\frac{RPI(\text{H}_S)}{RPI^0} \cdot \frac{RPI(\text{H}_R)}{RPI^0} = 1 \quad (3.21)$$

$$RPI^0 = \sqrt{RPI(\text{H}_S) \cdot RPI(\text{H}_R)} \quad (3.22)$$

Dane z Tabeli 3.15 cechuje rozrzut w wartościach RPI^0 pomiędzy różnymi parami enancjomerów na poziomie ok $\pm 15\%$ dla Man i ok $\pm 10\%$ dla AcPhe. Bazując na wynikach z Tabel 3.14 i 3.15 nie mogłem jednoznacznie wyznaczyć wartości RPI^0 , rozrzut wyników uznałem za zbyt duży aby celowe było ich uśrednianie.

Mimo braku określonego wiarygodnie RPI^0 , przeprowadziłem pomiary z pseudoracemicznymi mieszaninami soli TBA dla większości moich receptorów. Gdyby istniała korelacja między RPI a wynikami miareczkowania (α_{MK}), wówczas zestawienie tych wyników w postaci logarytmicznej pozwoliłoby na obserwację tej korelacji między wynikami, mimo błędnie wyznaczonej wartości RPI^0 . Zgodnie z Rów. (3.23), RPI^0 można wyznaczyć na podstawie regresji liniowej wyników. Parametr b równania liniowego $y = ax + b$ jest tożsamy z $\log(RPI^0)$.

$$\log(\alpha_{MS}) = \log\left(\frac{RPI}{RPI^0}\right) = \log(RPI) - \log(RPI^0) \quad (3.23)$$

Następnym krokiem było sprawdzenie, czy dla moich danych istnieje opisana powyżej kore-

Tabela 3.15: Pomiary RPI dla par enancjomerycznych receptorów i obliczone średnie geometryczne (\overline{RPI})

Receptor	Man		AcPhe	
	RPI	\overline{RPI}	RPI	\overline{RPI}
L-70e	0,47	0,57	0,95	1,05
D-70e	0,68		1,16	
L-71e	1,00	0,63	1,19	1,21
D-71e	0,66		1,24	
L-71e ^a	0,95	0,66	1,08	1,15
D-71e ^a	0,92		1,10	
L-71j	0,65	0,67	1,03	1,00
D-71j	0,69		0,97	

^a pomiar powtórzony innego dnia

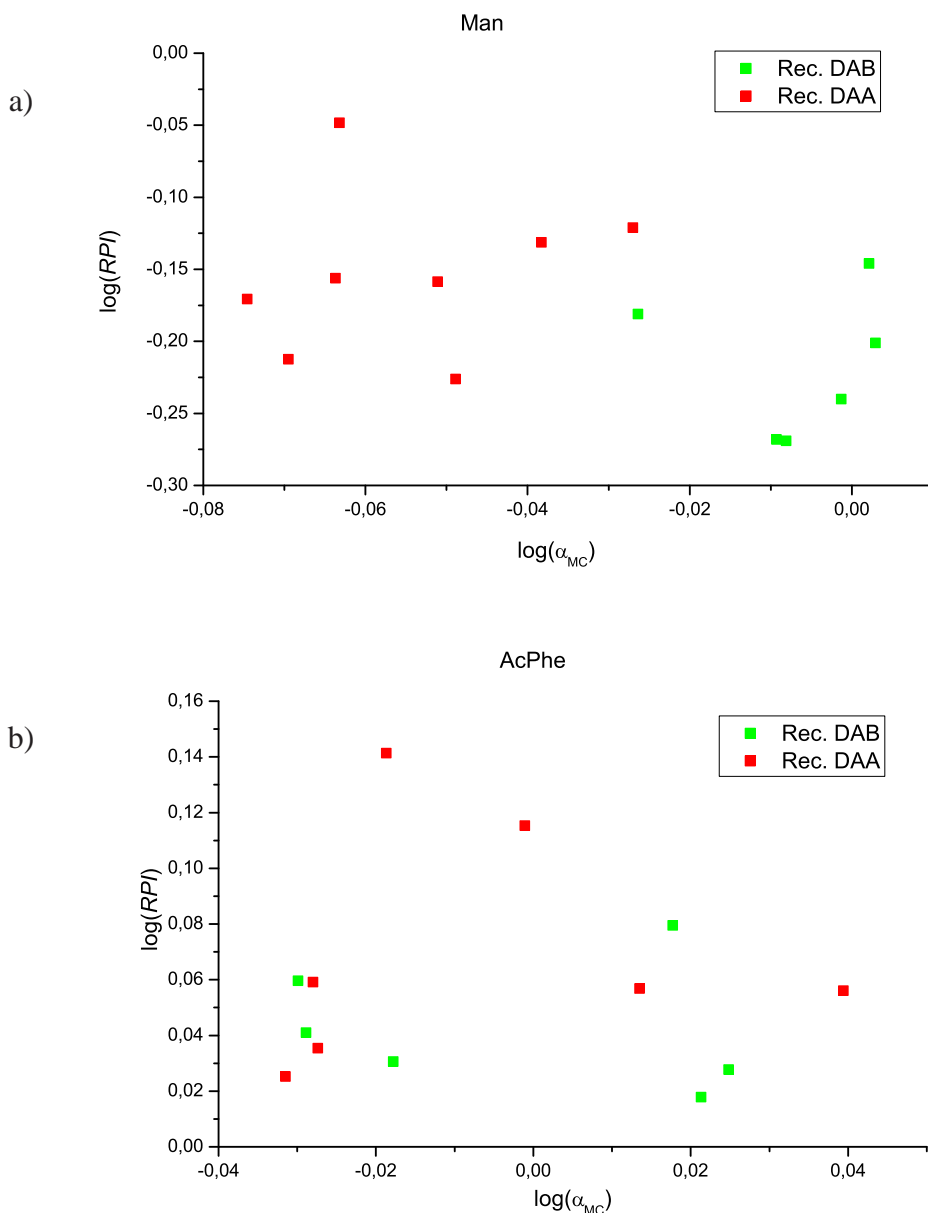
lacja. Zestawienie wyników przedstawia Wykres 3.16. Zarówno dla migdalanu, jak i dla AcPhe nie zaobserwowałem żadnej korelacji, rozkład wyników wydaje się zupełnie stochastyczny, co uniemożliwiło wyznaczenie RPI^0 . Brak korelacji na tym wykresie nie jest jeszcze ostatecznym dowodem nieskuteczności metody MS do analizy ilościowej rozpoznania chiralnego anionów.

Wyjaśnienia wymagają zaobserwowane różnice w wartościach RPI dla kompleksów różnych achiralnych receptorów, które dodatkowo różniły się od RPI dla czystych soli. W problem ten wpisują się także wyniki uzyskane dla enancjomerycznych par receptorów, dla których nie został spełniony warunek (3.20). Jedynym racjonalnym wytłumaczeniem tych zjawisk jest wystąpienie silnego efektu izotopowego, który miał inny wpływ na kompleksy każdego z receptorów. Wystąpienie tego efektu może także tłumaczyć brak korelacji na Wykresie 3.16, każdy z receptorów wymaga w takim przypadku przeskalowania przez inną $RPI^0(H^*)$, określoną z osobna dla każdego receptora.

Analiza enancjoselektywności w takim przypadku jest bardzo utrudniona, ale jest nadal możliwa, pod warunkiem że znane są wartości RPI dla kompleksów z obydwoma enancjomerycznymi receptorami. Zauważmy, że stosunek RPI dla każdego z enancjomerów receptora równy jest kwadratowi selektywności:

$$\frac{RPI_S}{RPI_R} = \frac{\frac{RPI_S}{RPI^0}}{\frac{RPI_R}{RPI^0}} = \frac{\alpha_S}{\alpha_R} = (\alpha_S)^2 \quad (3.24)$$

co wynika z faktu, że $\alpha_S = 1/\alpha_R$. Zatem enancjoselektywność można wyznaczyć jako pierwia-



Wykres 3.16: Zestawienie selektywności uzyskanych z pomocą miareczkowania konkurencyjnego ($\log(\alpha_{MC})$) i wyników pomiarów MS ($\log(RPI)$). a) Anion – migdałan; b) Anion – AcPhe

stek ze stosunku RPI :

$$\alpha_{MS} = \sqrt{\frac{RPI_S}{RPI_R}} \quad (3.25)$$

Powyzszą metode analizy danych zastosowałem do wyników pomiarów przeprowadzonych na parach enancjomerów, a rezultaty zestawione z wynikami miareczkowań przedstawia Tabela 3.16. Dla tej metody analizy danych również nie występuje korelacja z dotychczas otrzymanymi wynikami selektywności. Dopiero przeprowadzenie tego zestawienia dowodzi nieskuteczności metody MS jako narzędzia do ilościowej analizy rozpoznania chiralnego anionów.

Tabela 3.16: Wartości selektywności obliczone wg Rów.(3.25) i ich porównanie z wynikami miareczkowań

Receptor	Man			AcPhe		
	RPI	α_{MS}	α_{MC}	RPI	α_{MS}	α_{MC}
L-70e	0,47	0,83	0,98	0,95	0,90	1,05
D-70e	0,68			1,16		
L-71e	0,60	0,95	0,84	1,19	0,98	1,03
D-71e	0,66			1,24		
L-71e	0,68	1,02	0,84	1,14	0,99	1,03
D-71e	0,65			1,17		
L-71j	0,65	0,97	0,93	1,03	1,03	0,98
D-71j	0,69			0,97		

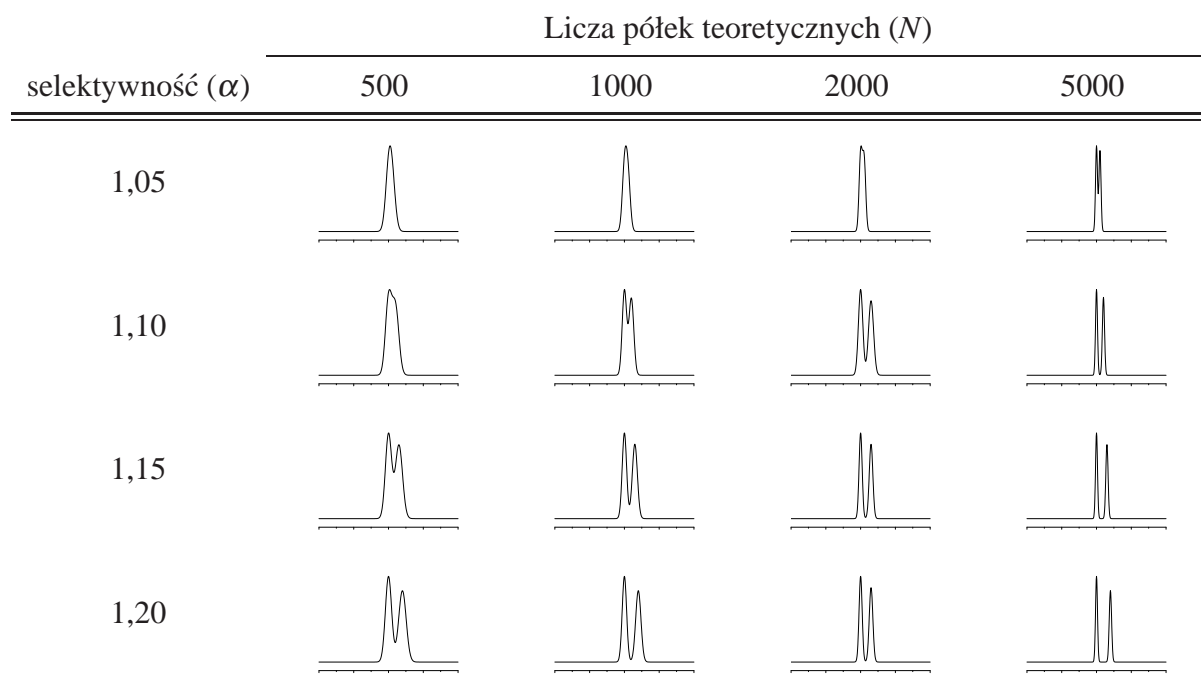
Brak korelacji między wynikami miareczkowania i pomiarów spektrometrii mas można tłumaczyć dosyć oczywistym faktem, że warunki w źródle jonów ESI nie odzwierciedlają warunków panujących w roztworze⁷⁶. Gdy przystępowałem to testowania metody MS, miałem świadomość, że wystąpienie dobrej korelacji z wynikami miareczkowania oznaczające, że stosunki kompleksów w roztworze są zachowane w źródle jonów, byłoby następstwem szczęśliwego zbiegu okoliczności. Podczas jonizacji za pomocą *elektrospreju*, po nebulizacji roztworu, następuje odparowywanie rozpuszczalnika połączone z *eksplozją kulombowską*, które diametralnie zmieniają stężenia reagentów. Równowagi związane z wiązaniem anionów przez badane receptory są szybkie w skali czasu NMR, zatem badany układ nadąża z dostosowywaniem się do nowych warunków. Aniony są bardzo silnie solwatowane (silniej niż kationy⁹⁶), dlatego tworzenie kompleksów jest szczególnie wrażliwe na procesy związane z odparowywaniem rozpuszczalnika i desorpcją jonów. Przyjęte założenie, że diastereoizomeryczne kompleksy homochiralnych receptorów z enancjomerami anionów będą wykazywały dostateczne podobieństwo podczas jonizacji nie było spełnione w przeprowadzonych pomiarach.

3.5.4 Pomiary chromatograficzne

W rozdziale 2.3.4.5 wskazałem na chromatografię jako metodę, której zaletą jest amplifikacja nawet nieznacznych selektywności do poziomu, na którym są łatwo mierzalne. W typowych analitycznych zastosowaniach chromatografii, piki muszą być całkowicie rozdzielone. Przy wykorzystaniu chromatografii do badań nad rozpoznaniem chiralnym, całkowity rozdział pików nie jest konieczny do określenia selektywności α_C (Rów.(2.13)), wystarczy aby piki były rozróżnialne (kryterium Rayleigha). Przeprowadziłem symulacje przebiegu chromatogramu w

zależności od selektywności i liczby póltek teoretycznych (Tabela 3.17)¹²².

Tabela 3.17: Symulacje chromatogramów racematów przy różnych wartościach selektywności (α) i liczby póltek teoretycznych (N)



Z symulacji wynika, że nawet dla rozdzielców chromatograficznych o słabej sprawności (500 póltek) selektywność $\alpha \geq 1,15$ pozwala na obserwację dwóch maksimów. Rozdziel o sprawności 1000 póltek pozwala rozsunąć maksima pików o selektywności 1,10, ostatecznie dla 5000 póltek można przypisać położenia sygnałom o $\alpha = 1,05$. Sprawność typowej kolumny HPLC o długości 15cm wynosi 10000-20000. Najlepsze z moich receptorów wykazywały selektywność względem migdalanu na poziomie 1,10-1,15. Uznałem, że przygotowanie kolumny chromatograficznej z immobilizowanym chiralnym anionem jako fazą stacjonarną o sprawności na poziomie 500-1000 póltek powinno być osiągalne i analiza przynajmniej najlepszych receptorów powinna być możliwa.

3.5.4.1 Chromatografia cienkowarstwowa

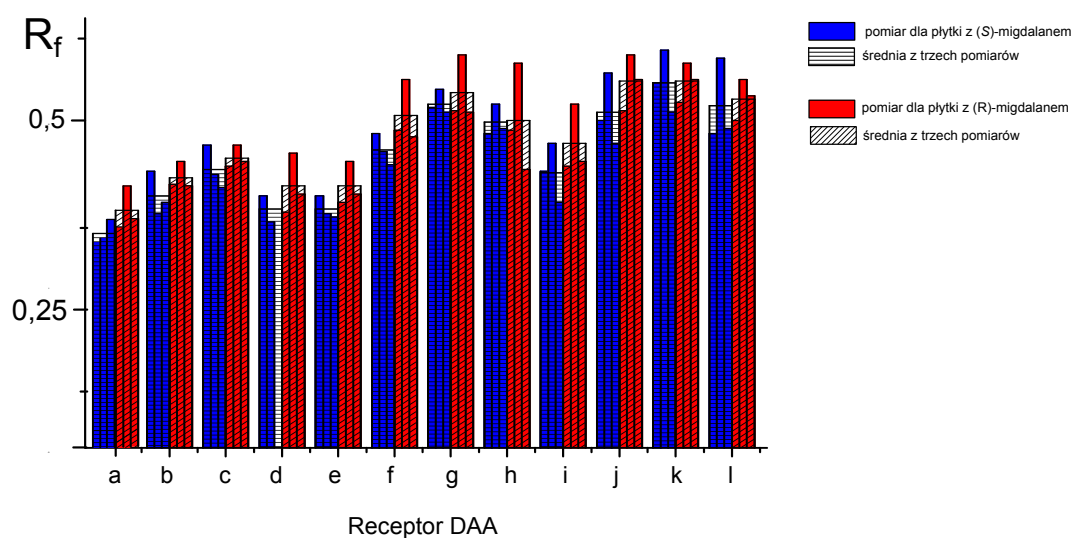
Bazując na przytoczonych już w Rozdziale 2.3.4.5 pracach Morána^{71,72} zdecydowałem się przeprowadzić pomiary chromatograficzne na płytkach TLC impregnowanych solami badanych chiralnych anionów. W pierwszych eksperymentach planowałem wyznaczyć współczynniki retencji moich homochiralnych receptorów na płytkach impregnowanych (*S*-) i (*R*-)enancjomerami anionów. Następnie chciałem sprawdzić, czy relacje między wyznaczonymi R_f^S i R_f^R można skorelować z wyznaczonymi klasycznie enancjoselektywnościami receptorów.

Najłatwiejszą metodą modyfikacji fazy stacjonarnej przez impregnację jest zanurzanie handlowych płytek TLC w roztworze modyfikatora i ich płytek. W moich badaniach zanurzałem

analityczne płytki z żelom krzemionkowym w 1, 2, i 5% roztworze odpowiedniego migdalanu TBA w metanolu, następnie suszyłem pod próżnią. Pokrycie płytek migdalanem, którego pasmo absorpcji obejmuje na $\lambda = 256\text{ nm}$ praktycznie uniemożliwiło analizę płytek z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego. Nadal możliwa była detekcja receptorów serii DAA za pomocą lampy $\lambda = 355\text{ nm}$, dzięki luminescencyjnym właściwościom tych receptorów. Co więcej, jak określiłem na podstawie klasycznych miareczkowań, receptory DAA wykazywały lepsze rozpoznanie chiralne migdalanu od receptorów serii DAB. To skłoniło mnie do ograniczenia grupy testowej receptorów do serii DAA.

Pomiary na tak impregnowanych płytkach cechowała ogromna niepewność wyników dla tak samo przygotowanych płytek. Nie pomogło także standaryzowanie współczynników retencji w oparciu o achiralny receptor odniesienia (**71n**).

W celu osiągnięcia powtarzalnych i miarodajnych wyników zdecydowałem się samodzielnie przygotowywać płytki TLC, a proces modyfikacji fazy stacjonarnej przeprowadzić przed pokryciem płytki warstwą żelu. Żel krzemionkowy zawieszałem w wodno-metanolowym roztworze migdalanu TMA. Po rozprowadzeniu warstwy żelu, płytki zostawiałem do wyschnięcia na powietrzu a następnie standaryzowałem przez suszenie w $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 2h. Podwyższona temperatura w procesie suszenia stwarzała ryzyko reakcji eliminacji w kationie TBA, dlatego do tego celu wykorzystałem sól TMA. Zastosowana procedura pozwalała otrzymać złożę zawierające równomiernie rozłożoną, ściśle określoną ilość chiralnego modyfikatora. Analizy serii DAA na tak przygotowanych płytkach cechowała lepsza powtarzalność, jednak różnice pomiędzy poszczególnymi pomiarami były ciągle zbyt duże by móc wiarygodnie określić enancjoselektywność któregośkolwiek z receptorów. Rozrzut wyników uzyskany dla płytek zawierających 0,5 mmol ManOTMA na 1 g żelu przedstawia Wykres 3.17.

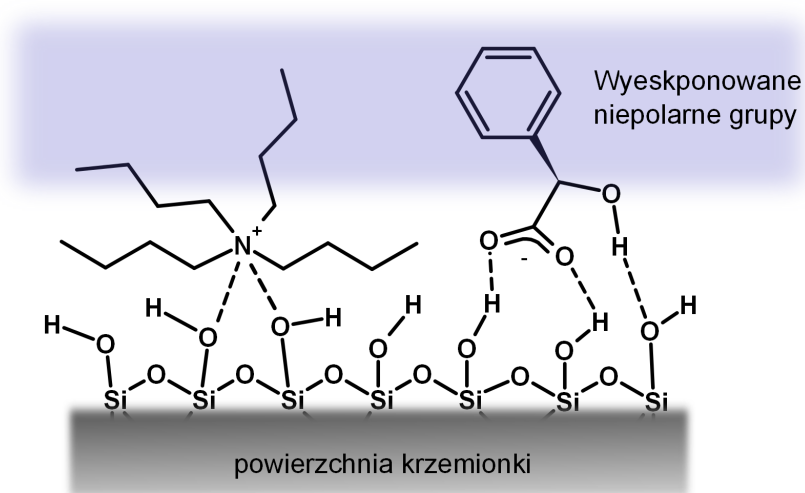


Wykres 3.17: Wyniki pomiarów prowadzonych na płytkach TLC impregnowanych enancjomerami migdalanu TMA

Eksperymenty prowadzone z homochiralnym receptorem na dwóch płytkach impregnowa-

nych enancjomerami gościa okazały się nieskuteczne ze względu na zbyt duży rozrzut wyników pomiędzy poszczególnymi pomiarami. Zdecydowałem się zmienić sposób prowadzenia pomiarów tak aby miał charakter konkurencyjny. W tym celu przeprowadziłem syntezę enancjomerycznych receptorów D-71e-k wykorzystując aminokwasy szeregu D. Na płytkach rozwijałem obok siebie enancjomeryczne pary receptorów. Do pomiarów wykorzystałem zarówno handlowe płytki impregnowane przez zanurzenie jak i płytki samodzielnie powlekanie. W żadnym z przypadków nie zaobserwowałem różnic w współczynnikach retencji między enancjomerami.

Niezależnie od powyższych niepowodzeń zaobserwowałem różnice we współczynnikach retencji wszystkich receptorów dla płytek niemodyfikowanych i modyfikowanych różnymi ilościami chiralnej soli. Współczynniki retencji dla handlowych i samodzielnie przygotowanych płytek rosły wraz ze wzrostem ilości modyfikatora. Oznacza to, że modyfikacja fazy stacjonarnej powodowała osłabienie wiązania receptorów. Wydaje się, że receptory na aniony powinny silniej oddziaływać z migdalanem TBA niż z powierzchnią żelu krzemionkowego, zatem pokrycie żelu chiralnym modyfikatorem powinno zmniejszyć R_f . Obserwacje przeczą temu założeniu. Najprawdopodobniej migdalan użyty do impregnacji płytki jest bardzo silnie wiązany grupą karboksylową przez grupy siloksyłowe krzemionki, a kation (TBA lub TMA) oddziałuje na zasadzie jon-dipol. Przyjęcie takiej orientacji modyfikatora na żelu tłumaczy obserwowane osłabienie retencji. Modyfikator blokuje dostęp do powierzchni krzemionki, eksponując przy tym swój niepolarny fragment, zatem nie wnosi nowych oddziaływań wiążących (Rys. 3.14).



Rysunek 3.14: Schemat ułożenia chiralnego modyfikatora na powierzchni żelu krzemionkowego i oddziaływania zapewniające wiązanie modyfikatora

Dodatkowym potwierdzeniem powyższego modelu może być eksperyment, w którym handlową płytkę TLC impregnowałem w 20% roztworze migdalanu TBA w metanolu. Po wysuszeniu, na płytce rozwijałem receptory serii DAA w typowym układzie rozpuszczalników, zaobserwowałem jednak R_f bliski 1 dla wszystkich receptorów.

Moje obserwacje pozostają w sprzeczności z doniesieniami Morána⁷¹, który stwierdził, że

impregnacja płytek migdalanem TMA istotnie zmniejsza R_f receptora **39** z 0,49 dla niemoodyfikowanej płytki do 0,07 i 0,16 (dla dwóch enancjomerów receptora). Autorzy nie opisali sposobu impregnowania fazy stacjonarnej, co utrudnia porównywanie wyników naszych eksperymentów. Tak istotne różnice w wynikach naszych pomiarów mogą być następstwem faktu, że receptor **39** ma dużo większe powinowactwo do anionów (K w DMSO $\sim 10^4$) niż moje receptory serii DAA. Można przypuszczać, że receptor **39** skuteczniej konkuruje z krzemionką o wiązanie anionu, a utworzone kompleksy są silnie zatrzymywane na powierzchni żelu.

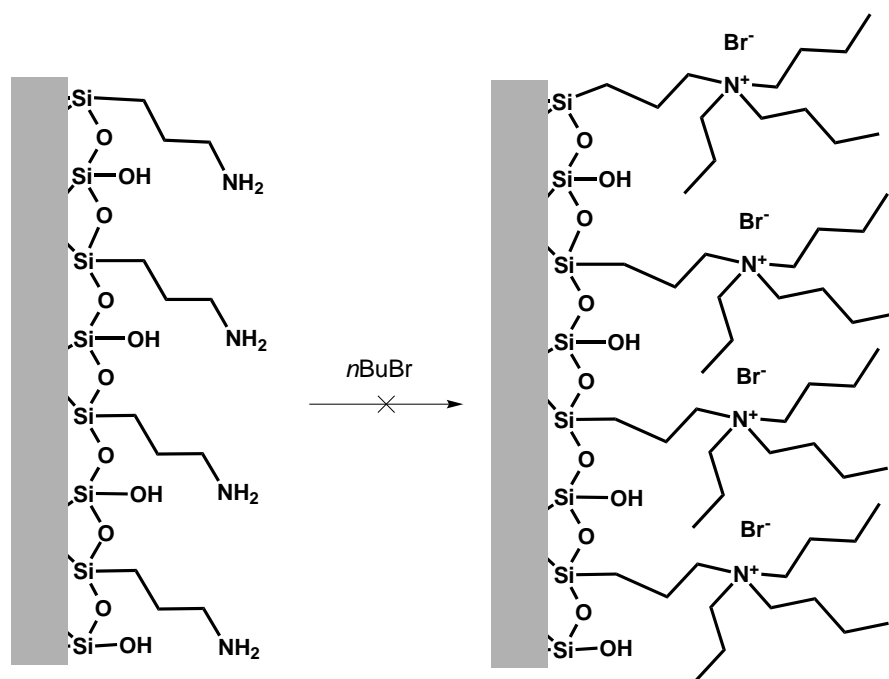
3.5.4.2 Chromatografia kolumnowa

Kierując się sugestiami z poprzedniego rozdziału zdecydowałem się zmienić podejście i zastosować do badań nad rozpoznanie chiralnym fazy stacjonarnej z chiralnymi solami związanymi kowalencyjnie. Sole mogą być związane z fazą stacjonarną na trzy sposoby – poprzez część kationową, anionową lub przez obie.

Pierwszą CSP spreparowałem z wykorzystaniem żywicy jonowymiennej Amberlite-400. W żywicy z przeciwjonem hydroksylowym **Amb-OH**, przygotowanej uprzednio do badań ELSE (Rozdział 3.5.2.1), zamieniłem przeciwjon na (*S*)-migdalan, poprzez reakcję żywicy z kwasem (*S*)-migdalowym. Tak przygotowaną żywicę (**CSP-1**) po przemyciu metanolem i wysuszeniu roztarłem w moździerzu na drobny proszek i wypełniłem nią „na sucho” obudowę kolumny do HPLC o wymiarach 10 cm x 4,6 mm ID. Tak przygotowaną kolumnę podłączyłem do zestawu chromatograficznego HPLC z detektorem DAD i przeprowadziłem analizy dla obu enancjomerów receptora **71e**. Kolumnę słabe oddziaływanie z receptorem, jakkolwiek retencję zaobserwowałem dopiero, gdy jako eluent zastosowałem mieszaninę dichlorometan : heksan 1 : 1. Otrzymane na chromatogramie piki były bardzo szerokie, odpowiadały słabej sprawności kolumny (~ 70 pól teoretycznych). Analiza pojedynczych enancjomerów jak i racematu receptora na tej kolumnie za każdym razem dawała identyczny chromatogram bez możliwości wskazania osobnych pików dla każdego z enancjomerów.

Użyta w poprzednim doświadczeniu żywica jest gęsto usieciowana, co mogło utrudniać dostęp receptora do anionu i oddziaływanie z nim. Dodatkowo, immobilizowane grupy kationowe są typu benzylotrimetyloamoniowego, które w porównaniu z TBA tworzą znacznie silniejszą parę jonową z anionem, co także osłabia oddziaływanie anion-receptor. Aby rozwiązać dwa powyższe problemy zdecydowałem się przygotować fazę stacjonarną zawierającą kationowe grupy typu TBA immobilizowane na krzemionce. W pierwszej próbie wykorzystałem handlowo dostępny żel krzemionkowy modyfikowany grupami 1-aminopropylowymi (**112**). W reakcji z bromkiem butylu (**113**) w obecności K_2CO_3 w DMF próbowałem przekształcić I° grupy aminowe w IV° sole amoniowe (Schemat 3.15).

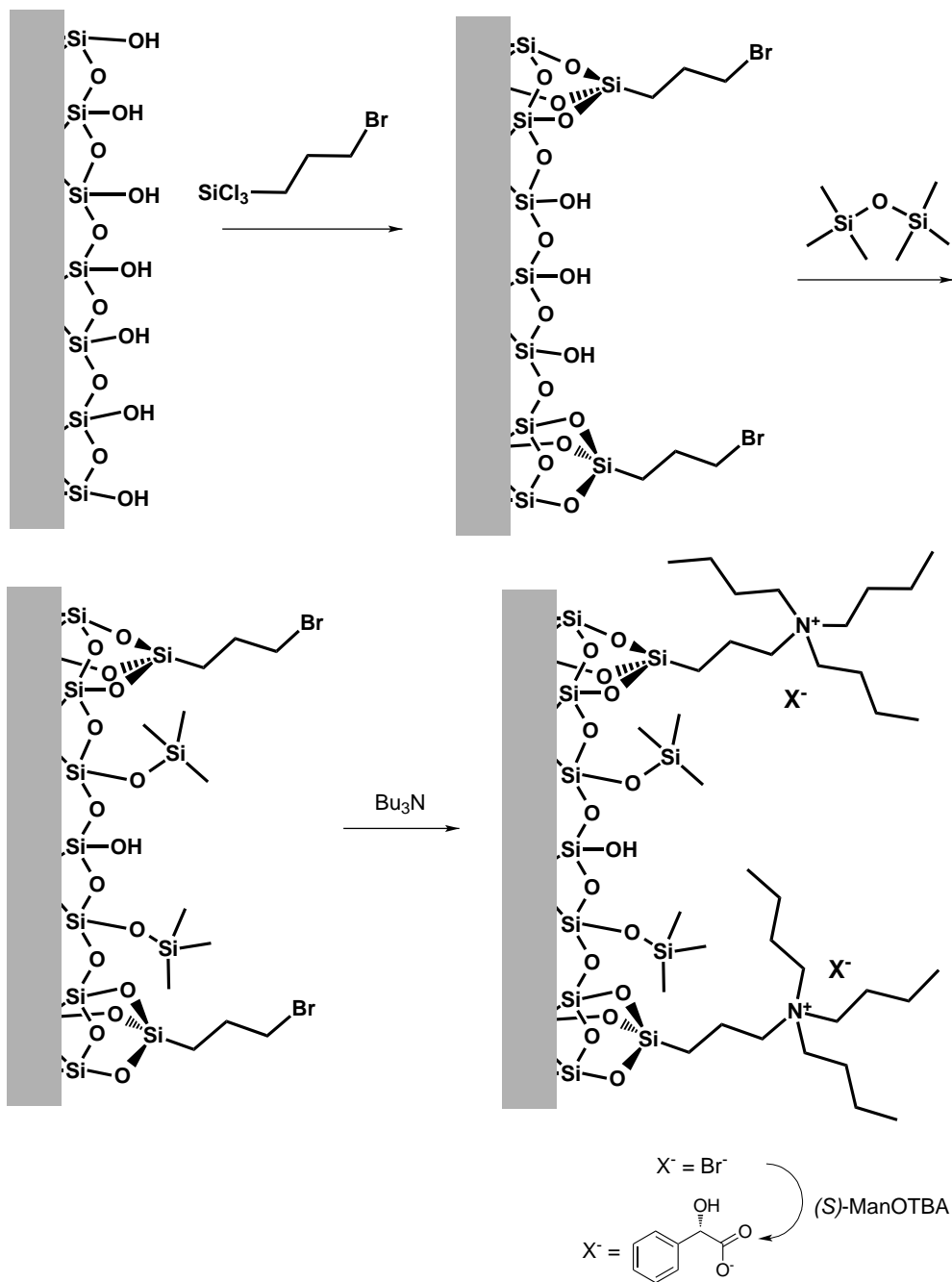
Po czterech dniach prowadzenia reakcji w 80 °C określiłem postęp reakcji na podstawie analizy spaleninowej. Stopień przereagowania grup aminowych wyniósł ok. 15%. Uznałem, że



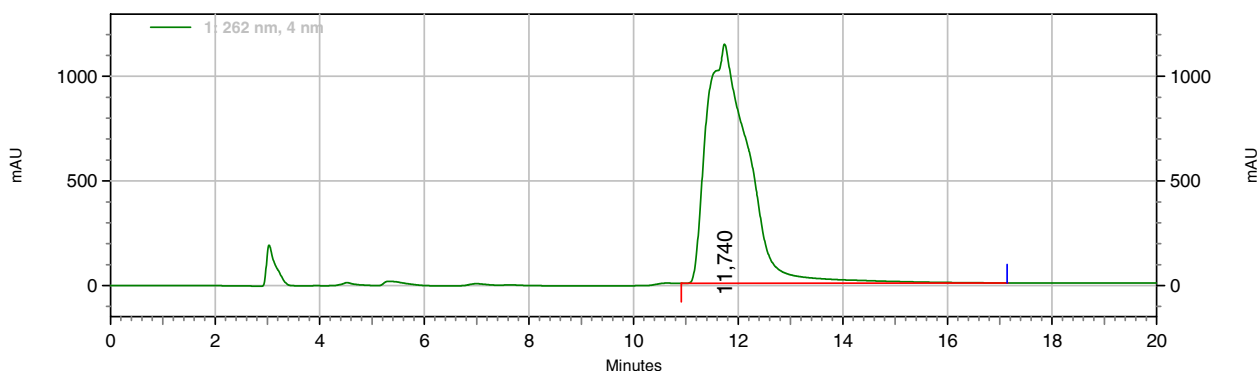
Schemat 3.15: Planowana modyfikacja fazy stacjonarnej typu -NH₂

gęste pokrycie powierzchni krzemionki utrudnia postęp reakcji i zarzuciłem dalsze próby funkcjonalizacji tej fazy stacjonarnej.

W celu otrzymania kolejnej CSP (Schemat 3.16), przeprowadziłem modyfikację żelu krzemionkowego (Watsil, spherical, 5 μm , 300 m^2/g) za pomocą 3-bromopropylotrichlorosilanu (**114**)¹²³. Na podstawie analizy spaleniowej określiłem obsadzenie powierzchni żelu na 1 cząsteczka na 10 nm^3 . W celu eliminacji oddziaływań receptorów z grupami siloksyłowymi z powierzchni krzemionki, które zwiększają retencję bez wpływu na enancjoselektywność, przeprowadziłem reakcję z heksametylodisilanem (HMDS, **115**). Następnie żel przereagowałem we wrzącym acetonitrylu z tributylloaminą (**116**). Analiza spaleniowa żelu po 16 h reakcji wskazywała na podstawienie atomów bromu w >90%. Tak przygotowaną fazę stacjonarną umieściłem w obudowie kolumny HPLC (20 cm, 4,6 mm ID) zawiesiwszy ją w cykloheksanie. Następnie przez kolumnę przepuszczałem w powolnym przepływie roztwór (*S*)-migdałanu TBA w acetonitrylu, w celu zamiany anionów bromkowych na migdałanowe (**CSP-2**). Łącznie przez kolumnę przepuściłem 100-krotny nadmiar migdałanu w stosunku do liczby moli anionów bromkowych. Na tak przygotowanej kolumnie, po podłączeniu do zestawu HPLC przeprowadziłem analizy enancjomerów receptora **71e**. Retencja związku przez tę kolumnę była zauważalnie silniejsza, chromatografię prowadziłem w układzie 5% MeCN w DCM, zaś piki były lepszej jakości (l. półek ~ 1000) w porównaniu z **CSP-1**, jednak nadal cechowała je znaczna szerokość połówkowa i niesymetryczny kształt (Rys 3.15). Piki uzyskane dla enancjomerów receptora jak i dla mieszaniny racemicznej cechował identyczny czas retencji, zgodny z dokładnością do 0,005 min, co wskazywało na brak selektywności ($\alpha_C = 1$).



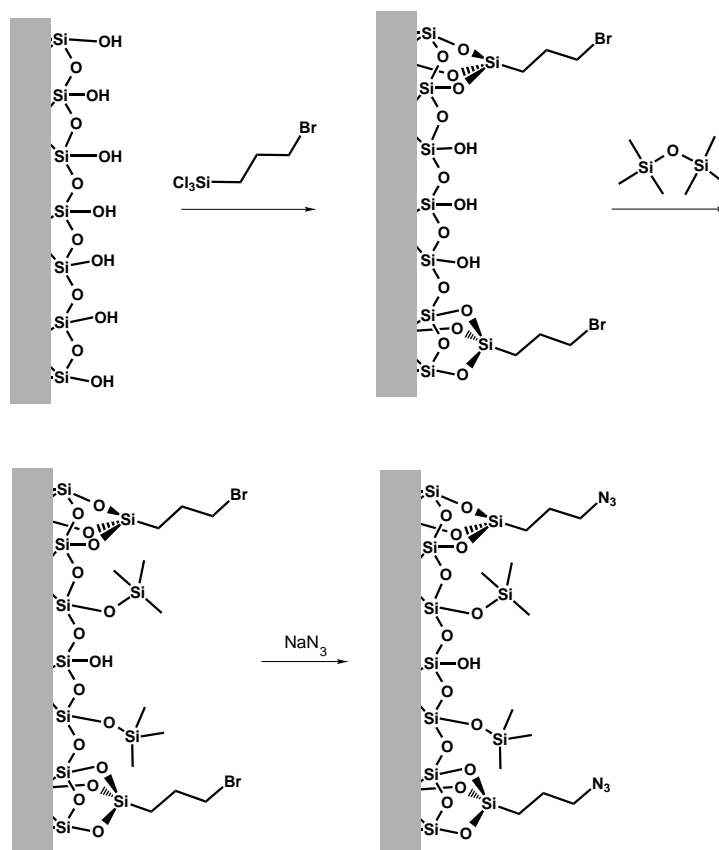
Schemat 3.16: Schemat modyfikacji żelu krzemionkowego prowadzących do **CSP-2**



Rysunek 3.15: Kształt pików od receptora **71e** na kolumnie **CSP-2**

Po dwóch niepowodzeniach z CSP z immobilizowanymi kationami zdecydowałem się otrzymać fazy stacjonarne z kowalencyjnie związaną częścią anionową. Zaplanowałem metodę funkcjonalizacji żelu krzemionkowego i kwasów karboksylowych, która pozwoliłaby immobilizować kwasy karboksylowe za pomocą dipolarnej cykloaddycji Huisgena (metoda „click”). Powierzchnię fazy stacjonarnej zmodyfikowałem wg Schematu 3.17. Żel krzemionkowy (Watsil, spherical, 5 μm , 300 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) przereagowałem z 3-bromopropylotrichlorosilanem (**114**), otrzymując obsadzenie XXX. Następnie grupy siloksyłowe związałem za pomocą HMDS (**115**), a atomy bromu podstawilem grupą azydkową. Ciąg reakcji potwierdzały analizy spaleniove, a obecność grup azydkowych potwierdza obecność pasma 2125 cm^{-1} w widmie IR¹²⁴. Do tak sfunkcjonalizowanej powierzchni planowałem przyłączyć kwas karboksylowy zawierający terminalną grupę alkinową. Jako model kwasu migdałowego zdecydowałem się zastosować pochodną kwasu 4-hydroksymigdałowego (**117**); podobnie modelem N-acetylofenyloalaniny była modyfikowana N-acetylotyrozyna (**118**). Syntezę obu związków przeprowadziłem wg ścieżek przedstawionych na Schemacie 3.18. W reakcji fenolu z chloroszczawianem etylu otrzymałem ester etylowy kwasu 4-hydroksyfenyloglioksalowego (**119**). Niezbędne było chromatograficzne oddzielenie powstającego w reakcji izomeru *orto*. Ester **119** poddałem alkilowaniu bromkiem propargilu (**120**) do eteru **121**. Enancjoselektywną redukcję grupy ketonowej przeprowadziłem przy użyciu chiralnego chlorku boru **107** (tak jak dla związku **109**). Po hydrolizie estru otrzymałem oczekiwany kwas **117** o 87% *ee*. Drugi z kwasów otrzymałem wychodząc z L-tyrozyny (**122**), której grupę karboksylową przekształciłem w ester metylowy, a grupę aminową zacetylowałem. Zabezpieczony aminokwas **123** zalkilowałem bromkiem propargilu do **124**, po czym odbezpieczyłem grupę karboksylową, co dało oczekiwany kwas **118**, którego czystość enancjomeryczna wynosiła *ee*=97%.

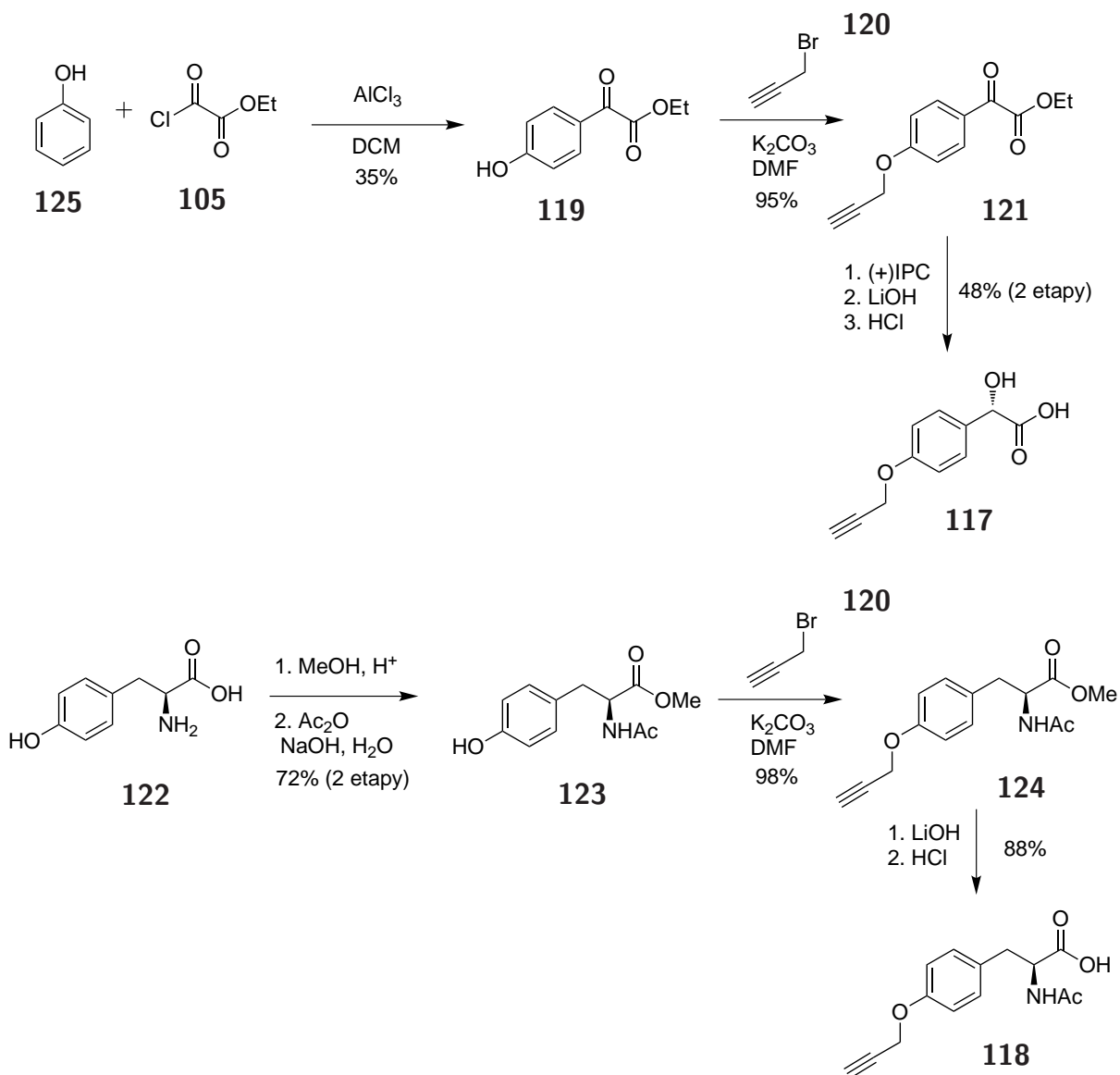
Oba kwasy – **117** i **118** – ulegały modelowej reakcji z azydkiem n-oktylu (**126**), katalizowanej układem CuSO_4 + askorbinian sodu w DMF. Z analizy widma NMR mieszaniny po reakcyjnej wynikał 100% stopień przereagowania i brak produktów ubocznych. Jednakże gdy próbowałem przeprowadzić analogiczną reakcję pomiędzy kwasem **117** lub **118** a krzemion-



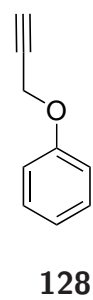
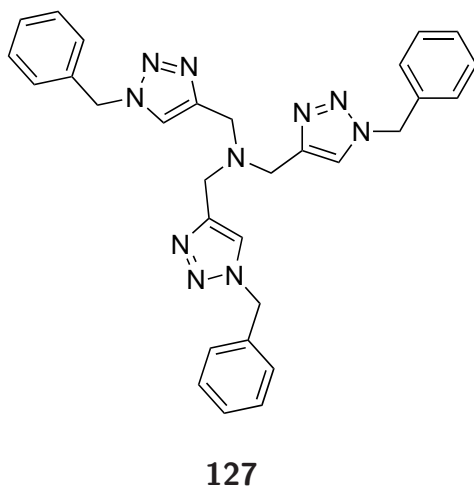
Schemat 3.17: Schemat modyfikacji krzemionki wprowadzających grupy azydkowe

ką z grupami azydkowymi reakcja nie zachodziła, co stwierdzałem na podstawie braku zmian w wynikach analizy spaleniwowej oraz po obecności pasma 2010 cm^{-1} w widmie IR. Nie pomogła zmiana katalizatora na szczególnie reaktywny kompleks miedzi (I) z ligandem **127**¹²⁵ – nie obserwowałem zmian składu fazy stacjonarnej. Zdecydowałem się sprawdzić możliwość przeprowadzenia reakcji *click* fazy stacjonarnej z modelowym azydkiem **128**, jednak i w tym przypadku bez rezultatu. Wobec powyższych niepowodzeń zarzuciłem syntezę tak zaprojektowanej fazy stacjonarnej.

Udało mi się otrzymać tylko dwie CSP do chromatografii kolumnowej, obie zawierające immobilizowany fragment kationowy. Pierwsza z nich, oparta na żywicy jonowymiennej Amberlite, wykazywała bardzo słabą retencję receptorów i znikomą sprawność, przekładającą się na bardzo szerokie piki. Drugą CSP, otrzymaną przez modyfikację żelu krzemionkowego, cechuje silniejsza retencja i lepsza sprawność, jednak piki miały asymetryczny, nie-gaussowski kształt. Kolumna ta nie rozdzieliała enancjomerów testowanych receptorów. Nie udało mi się także otrzymać CSP z immobilizowaną częścią anionową wg zaplanowanego schematu.



Schemat 3.18: Synteza chiralnych kwasów zawierających terminalne grupy alkinowe



Rozdział 4

Podsumowanie i wnioski

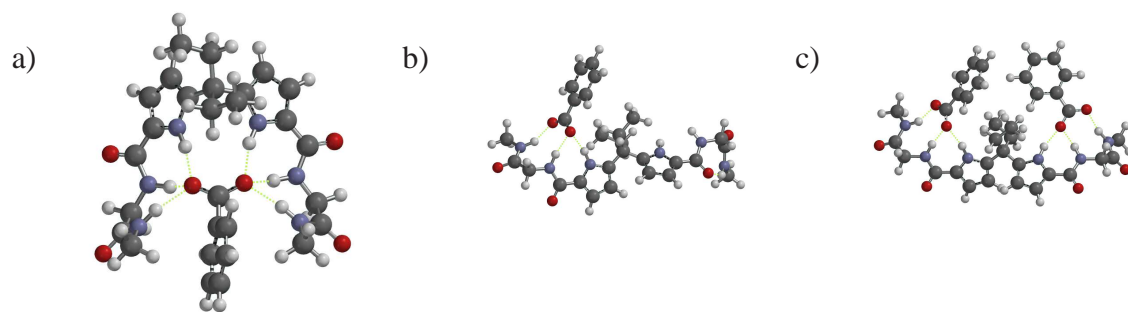
Na wstępie przypomnę tutaj podstawowe cele, które postawiłem sobie przed przystąpieniem do realizacji pracy doktorskiej:

- otrzymanie rodziny chiralnych receptorów na aniony o zróżnicowanej strukturze,
- opracowanie, ewaluacja i optymalizacja alternatywnych metod ilościowego badania rozpoznania chiralnego,
- przeprowadzenie korelacji między strukturą receptora a zdolnością do enancjodyskryminacji cząsteczek gościa.

Cele te zostały w pełni zrealizowane, a najważniejsze wnioski płynące z mojej rozprawy przedstawiam poniżej.

Otrzymałem trzy serie chiralnych receptorów o symetrii C_2 opartych na rdzeniach dipirometanu (DEDPM - **69**), *o*-diaminobenzenu (DAB - **70**) i 1,8-diaminoantracenu (DAA - **71**). Dla receptorów serii DEDPM okazało się, że wiązanie anionu nie następuje, jak początkowo zakładałem, poprzez kooperatywne działanie sześciu donorów wiązania wodorowego (Rys. 4.1a), ale poprzez pojedyncze ramię receptora składające się z pirołu, aminokwasu i terminalnego amidu (Rys. 4.1b). Drugie ramię jest zdolne do wiązania kolejnego anionu (Rys. 4.1c). Nieoczekiwany, złożony model kompleksowania uniemożliwił wiarygodne określenie selektywności tych receptorów za pomocą klasycznego miareczkowania, co wyłączyło je z testowania innych metod analizy.

W opracowanych procedurach syntezy receptorów opartych na rdzeniu *o*-fenylenodiaminy i 1,8-diaminoantracenu wykorzystałem z powodzeniem estry naturalnych α -aminokwasów. Wykazałem, że otrzymywanie Boc-zabezpieczonych estrów aminokwasów jest łatwe do przeprowadzenia i w większości przypadków nie wymaga oczyszczania chromatograficznego. Odbezpieczenie przebiega ilościowo, a surowy produkt mogłem od razu wykorzystać do syntezy moczników i tiomoczników. Pokażna liczba różnorodnych strukturalnie, naturalnych i nienaturalnych aminokwasów jest dostępna handlowo, podobnie jak ogromna liczba alkoholi, którymi



Rysunek 4.1: Modele kompleksów receptora serii DEDPM z benzoesanem

można modyfikować ich C-końce. Dostępność substratów, w połączeniu z łatwością kolejnych etapów syntezy, sprawia, że estry aminokwasów są doskonałymi kandydatami do przygotowywania bibliotek receptorów o różnych diaminowych rdzeniach^{4,126}.

Wykazałem, że mocznikowe receptory serii DAB i tiomocznikowe receptory DAA wiążą karboksylany wg stechiometrii 1 : 1, a stałe trwałości są wystarczająco duże. Proces kompleksowania mogłem śledzić za pomocą spektroskopii ¹H NMR lub UV-Vis. Dzięki spełnieniu tych warunków, mogłem wykorzystać receptory DAB i DAA jako receptory testowe do dalszych badań. Za pomocą miareczkowania pod kontrolą UV-Vis mogłem określić stałe trwałości kompleksów z enancjomerami migdalanu i N-acetylofenyloalaniny. Zoptymalizowałem procedurę przygotowania roztworów i prowadzenia pomiaru, co pozwoliło mi zmniejszyć niepewność wyznaczania stałych trwałości kompleksów do 6%.

Wstępne badania przeprowadzone dla receptorów serii DAB pokazały, że wiązanie chiralnych anionów przez chiralne receptory zachodzi ze znacznie niższymi stałymi trwałości kompleksów, w porównaniu z typowymi achiralnymi substratami wykorzystywanymi w badaniach rozpoznania molekularnego. Stosunek stałych trwałości dla par: **70a**-migdalan i **129**-benzoesan wnosił ok. 1:80. Tak istotne obniżenie stałych kompleksowania wskazuje, że należy do badań nad rozpoznaniem chiralnym używać receptorów o szczególnie silnym powinowactwie do cząsteczek gościa; w przypadku mniej efektywnych receptorów, wiązanie może być zbyt słabe aby dawało się obserwować.

Wyznaczone metodą klasyczną enancjoselektywności moich receptorów mieściły się w zakresie $\alpha=1,0-1,25$ dla migdalanu i $1,0-1,15$ dla N-acetylofenyloalaniny. Niestety, próby korelacji selektywność – struktura, dla grupy 20 receptorów zakończyły się niepowodzeniem. Nie znalazłem żadnego podstawnika, którego zastosowanie zwiększałoby szansę na dobrą selektywność. W mojej rodzinie receptorów tylko optymalne dopasowanie rdzenia i obu podstawników, które nie dawało się przewidzieć, zapewniało dobre właściwości rozpoznania chiralnego.

W kolejnych pomiarach wykazałem, że miareczkowania konkurencyjne, z użyciem achiralnego receptora odniesienia, przeprowadzone pod kontrolą ¹H NMR, znakomicie odtworzyły wyznaczone wcześniej selektywności. Wykazałem, że w pomiarach tych nie występuje żaden

błąd systematyczny, a wyprowadzone równania i zależności sprawdzają się w praktyce. Metoda ta daje wyniki o dużo mniejszej niepewności niż miareczkowanie klasyczne, mimo że nie wymaga jakiegokolwiek precyzji w przygotowywaniu roztworów. Niewrażliwość wyniku na błędy w nawązkach, rozcieńczeniach i objętościach dozowanych porcji jest zdecydowaną zaletą tej metody, którą stawiam wyżej niż miareczkowania klasyczne. Wadą metody jest konieczność znalezienia achiralnego receptora odniesienia, który wykazuje zbliżone do badanego receptora powinowactwo do anionu.

Zastosowanie podobnej metody konkurencyjnego miareczkowania, wykorzystującej racemiczną mieszaninę karboksylanu, nie było możliwe dla moich receptorów, ponieważ nie powodowały one wystarczającego rozsunęcia sygnałów pochodzących od enancjomerów anionu. Aby pokonać te ograniczenia opracowałem wariant miareczkowania konkurencyjnego, który nie jest zależny od stopnia rozsunęcia sygnałów, przez co posiada bardziej uniwersalny charakter. Mój wariant wykorzystuje pseudoracemat gościa, w którym jeden z enancjomerów jest znakowany deuterem, co pozwala obserwować sygnały pochodzące od enancjomerów na różnych kanałach, dzięki czemu warunek dostatecznego ich rozsunęcia nie jest wymagany. Stwierdziłem, że synteza znakowanego deuterem czystego optycznie migdałanu nie następuje trudności, a następnie udowodniłem skuteczność tej metody w badaniach rozpoznania chiralnego. Jej zaletą jest uniwersalny charakter i możliwość wyznaczenia selektywności α na podstawie jednego miareczkowania. Wskazałem również trudności natury techniczno-pomiarowej, które napotkałem i zaproponowałem sposoby minimalizacji ich wpływu na wyniki pomiaru.

Opracowałem jedną, w pełni autorską metodę, polegającą na enancjoselektywnej ekstrakcji ciała stałe–ciecz (ELSE). Wykorzystuje ona racemat anionu związany na kationowej żywicy jonowymiennej. Pokazałem, że pomiary ELSE można prowadzić w większości rozpuszczalników używanych w chemii supramolekularnej anionów, podczas gdy znana i często stosowana ekstrakcja ciecz–ciecz (ELLE) jest ograniczona do rozpuszczalników nie mieszających się z wodą. W serii wstępnych pomiarów wykazałem odwracalność procesu ekstrakcji, co oznacza termodynamiczną kontrolę składu faz. Udowodniłem również brak wpływu stężenia receptora w fazie organicznej na wynik pomiaru (przy odpowiednim nadmiarze receptora). Następnie wykazałem istnienie dobrej zgodności wyników ELSE z wynikami miareczkowań konkurencyjnych. Pokazałem również, że możliwy jest eksperyment ELSE, w którym jednocześnie ekstrahowanych jest kilka par enancjomerów. Zastosowanie odpowiedniej metody analitycznej pozwoliło wyznaczać enancjoselektywność receptora względem pięciu N-acetylowych pochodnych aminokwasów w jednym eksperymencie. Metoda ta rokuje duże nadzieje na zastosowanie w badaniach przesiewowych receptorów.

Testowana przeze mnie metoda badania rozpoznania chiralnego anionów za pomocą spektrometrii mas wymagała znakowania izotopowego jednego z enancjomerów gościa. Przeprowadziłem syntezę znakowanych deuterem (*S*)-**Man-d₅** (**110**) i *D*-**AcPhe-d₃** (**111**), które po zmie-

szaniu z ich nieznakowanymi enancjomerami dały używane w pomiarach mieszaniny pseudora-cemiczne. Wstępne badania tej metody z użyciem achiralnych receptorów oraz par enancjome-rów receptorów wskazywały na brak spójności wyników. Pomiarzy przeprowadzone dla testo-nych receptorów wykazały brak korelacji z wynikami miareczkowań. Metoda ta nie sprawdziła się w badaniach rozpoznania chiralnego.

Podjęte przeze mnie próby zastosowania metod chromatograficznych do badania enancjo-selektywności receptorów zakończyły się niepowodzeniem. Zarówno chromatografia cienko-warstwowa z krzemionką impregnowaną solą TBA homochiralnego karboksylanu, jak również chromatografia kolumnowa z immobilizowanymi na fazie stacjonarnej grupami kationowymi i homochiralnym karboksylanem jako przeciwjonem, nie zaowocowały zróżnicowaniem enan-cjomerów receptorów.

Jestem przekonany, że na podstawie uzyskanych wyników, mogę zaproponować nowy, dwu-etapowy schemat ewaluacji bibliotek receptorów. W moim schemacie, pierwszy etap – badanie przesiewowe – realizowany jest przy użyciu metody ELSE. W drugim etapie, najlepsze wyni-ki powinny zostać potwierdzone przez któryś z opisanych powyżej wariantów miareczkowania konkurencyjnego. Oba etapy nie wymagają precyzyjnych naważek i rozcieńczeń, oraz mogą być przeprowadzone dla receptorów, które nie spełniają wyśrubowanych warunków czystości. Takie dwuetapowe podejście zapewnia, z jednej strony szybkość, z drugiej wiarygodną, ewaluację bibliotek, gdyż eliminuje ewentualne artefakty występujące w metodzie ELSE.

Zaproponowane i sprawdzone przeze mnie metody nie wyczerpują wszystkich możliwości badania rozpoznania chiralnego anionów. Na opracowanie oczekują nadal metody wymagające jeszcze mniejszego nakładu pracy, lub nie wymagające złożonej aparatury - np. proste testy paskowe czy kolorymetryczne.

Rozdział 5

Część eksperymentalna

5.1 Syntezy

5.1.1 Uwagi ogólne

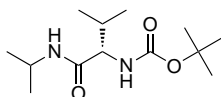
Wszystkie rozpuszczalniki używane do syntezy były czystości cz.d.a. Rozpuszczalniki osuszone przez standardowe procedury były używane tylko w tych syntezach, gdzie to zaznaczyłem. Reakcje prowadzone były w atmosferze gazu obojętnego tylko w tych procedurach, gdzie to zaznaczyłem. Reakcje monitorowałem za pomocą TLC (Silicagel 60, Merck), wizualizacje związków na płytkach uzyskiwałem za pomocą wskaźnika fluorescencyjnego na żelu, lub za pomocą wywoływacza cerowo-molibdenowego. Chromatografię preparatywną prowadziłem na żelu krzemionkowym (Silicagel 60, 230-400 mesh), zwykle używałem 40-krotny nadmiar żelu względem masy rozdzielanej mieszaniny; dla finalnych receptorów używałem ok 100-krotny nadmiar żelu. Pomiary NMR prowadzone były na aparatach Varian200, Varian400, Bruker500 i Varian 600 MHz. W opisie widm NMR używam następujących skrótów dotyczących multipletowości sygnałów s- singlet, d - dublet, t- tryplet, t_D - tryplet o równej intensywności (sprzężenie z jądrem 2H), q - kwartet, quint - kwintet, sext - sekstet, sept - septet, m - multiplet nie dający się zanalizować, bs - szeroki sygnał. Przypisania sygnałów 1HNMR podałem tylko dla receptorów, dla pozostałych związków o znacznie prostszej strukturze przypisania sygnałów są oczywiste. Pomiary widm masowych wysokiej rozdzielczości prowadzone były na aparacie z jonizacją ESI i analizatorem TOF. Analiza elementarna (An. spal.) prowadzona była na aparacie Perkin-Elmer typ 240. Temperatury topnienia wyznaczyłem za pomocą aparatu EZ-Melt i nie były korygowane. Skręcalności właściwe (O. R.) enancjomerycznie czystych związków wyznaczyłem na polarymetrze Jasco 2000, a wartości podaję w jednostce: $^{\circ} \text{cm}^3 \text{dm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

5.1.2 Receptory DEDPM

Otrzymywanie amidów z N-Boc zabezpieczonych aminokwasów

W kolbie okrągłodennej umieściłem pod argonem suchy dichlorometan (50 mL), Boc-zabezpieczony aminokwas (5 mmol) i odpowiednią I° aminę (7,5 mmol), schodziłem do 0 °C, po czym dodałem EDCI (1,16 g, 6 mmol), HOBt (0,92 g, 6 mmol) i DIPEA (2,05 mL, 12 mmol). Następnie usunąłem łaźnię chłodzącą, roztwór mieszałem pod argonem w t.pok. przez 12-16h. Roztwór zatężyłem do ok. 1/4 objętości, dodałem octan etylu (50 mL), fazę organiczną przemyłem 10% NaHCO₃ (2x50 mL), 10% NaHSO₄ (2x50 mL) i solanką ((20 mL). Fazę organiczną wysuszyłem nad Na₂SO₄, przesączyłem i zatężyłem. Otrzymane amidy używałem bez dalszego oczyszczania.

BocValNHiPr 75a

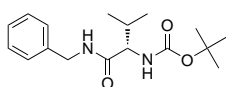


Białe kryształy, wyd.: 65%, t.t. 169-170°C

¹HNMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 5,83 (1H, bs); 5,11 (1H, bs); 4,05 (1H, oct, *J* = 6,7); 3,78 (1H, dd, *J* = 6,5; 8,5, C_αH); 2,01-2,12 (1H, m, C_βH); 1,43 (9H, s); 1,142 (3H, d, *J* = 6,6Hz); 1,138 (3H, d, *J* = 6,8); 0,93 (3H, d, *J*=6,5Hz); 0,90 (3H, d, *J*=6,5Hz)

¹³CNMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.1; 158.4; 80.7; 59.1; 43.6; 30.5; 28.4; 22.6; 19.0

BocValNHBn 75b

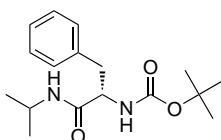


Biały proszek, wyd: 72%, t.t. 115-117°C (lit 117)¹²⁷

¹HNMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7,22-7,32 (5H, m); 6,37 (1H, bs); 5,05 (1H, bs); 4,44 (1H, dd, *J*=5,7; 14,8Hz, Bn); 4,40 (1H, dd, *J*= 5,5; 14,8Hz, Bn); 3,89 (1H, dd, *J*=6,3; 8,5Hz, C_αH); 2,10-2,18 (1H, m, C_βH); 1,40 (9H, s); 0,94 (3H, d, *J*=6,7Hz), 0,90 (3H, d, *J* = 6,7Hz)

¹³CNMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.8; 158.4; 139.7; 128.4; 127.6; 126.9; 80.7; 58.4; 42.9; 30.5; 28.4; 19.0

BocPheNHiPr 75c

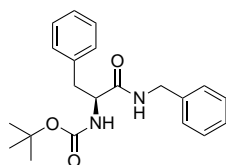


Biały proszek, wyd: 63%, t.t. 107-109°C (lit. 102-104)¹²⁸

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7,17-7,29 (5H, m); 5,40 (1H, bs); 5,14 (1H, bs); 4,19 (1H, bs); 3,95 (1H, bs); 3,07 (1H, dd, *J*=5,8; 13,3); 2,95 (1H, dd, *J*=8,0; 13,3Hz); 1,40 (9H, s); 1,02 (3H, d, *J*= 6,6Hz), 0,93 (3H, d, *J*=6,6Hz)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 172.8; 158.3; 137.6; 129.4; 129.1; 127.2; 80.7; 56.2; 43.6; 38.5; 28.4; 22.6.

BocPheNHBn 75d

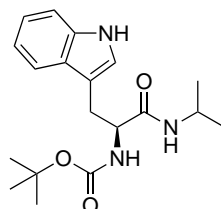


Biały proszek, wyd: 60%, t.t. 134-135°C (lit. 127)¹²⁷

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 7,15-7,27 (10H, m); 6,21 (1H, bs); 5,11 (1H, bs); 4,29-4,38 (4H, m, 2xBn); 3,05 (1H, m, C_αH), 1,39 (9H, s)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.0; 158.3; 139.7; 137.6; 129.4; 129.1; 128.4; 127.6; 127.2; 126.9; 80.7; 55.5; 42.9; 38.5; 28.4.

BocTrpNH*i*Pr 75e

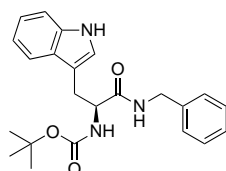


Biały proszek, wyd: 64%, t.t. 114-116°C

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8,23 (1H, bs); 7,66 (1H, d, *J*=7,8Hz); 7,34 (1H, d, *J*=8,3Hz); 7,18 (1H, dd, *J*=7,0; 8,3Hz); 7,11 (1H, dd, *J*=7,0; 7,8Hz); 5,45 (1H, bs); 5,23 (1H, bs); 4,35 (1H, bs); 3,91 (1H, bs); 3,29 (1H, dd, *J*=7,5; 10,8Hz); 3,11 3,3 (1H, dd, *J*=7,5; 10,8Hz); 1,42 (9H, s), 0,94 (3H, d, *J*=6,5Hz); 0,81 (3H, d, *J*=6,5Hz)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.9; 158.3; 136.5; 128.3; 124.4; 121.7; 120.1; 119.5; 111.6; 108.5; 80.7; 55.1; 43.6; 31.5; 28.4; 22.6

BocTrpNHBn 75f



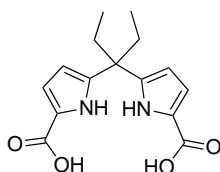
Biały proszek, wyd: 70%, t.t. 134-135°C (lit. 136)¹²⁹

¹HNMR (600 MHz, CDCl₃) δ: 8,10 (1H, bs); 7,66 (1H, d, *J*=8,4Hz); 7,35 (1H, d, *J*=7,8Hz); 7,18-7,23 (4H, m, 1H_{ind}+3H_{Bn}); 7,11 (1H, dd, *J*=7,0; 7,8Hz); 6,94-7,01 (2H, m); 6,03 (1H, bs); 5,19 (1H, bs); 4,46 (1H, bs, C_βH); 4,26 (2H, m, C_αH+C_βH); 3,34 (1H, dd, *J*= 4,6; 14,3Hz); 3,18 (1H, dd, *J*= 7,5; 14,3Hz); 1,41 (9H, s)

¹³CNMR (126 MHz, CDCl₃) δ 173.9; 158.3; 139.7; 136.5; 128.4; 128.3; 127.6; 126.9; 124.4; 121.7; 120.1; 119.5; 111.6; 108.5; 80.7; 54.2; 42.9; 31.5; 28.4

Dipirometan **77** otrzymałem wg. przepisu literaturowego¹³⁰.

Kwas pentano-3,3-dyilbis(1H-pirol-2-karboksylowy), **79**



Pierwszy etap reakcji prowadziłem w atmosferze argonu. Do roztworu dipirometanu **77** (5,05 g, 25 mmol) w suchym THF (100 mL) w 40 °C wkraplałem przez 30 min roztwór chlorku kwasu trichlorooctowego (8,7 mL, 75 mmol) w THF (30 mL). Po 4h w 40 °C dodałem 10% wodny roztwór NaOH (80mL, ~ 0,2 mol) i temp. 40 °C utrzymywałem jeszcze przez 2h przy intensywnym mieszaniu. Po ostudzeniu mieszaniny do t.pok. dodałem wodę (100 mL), fazę wodną przemyłem dichlorometanem (2x50 mL), następnie fazę wodną zatężyłem do usunięcia resztek THF-u i zakwasiłem stężonym kwasem solnym do pH~ 3. Wydzielone brunatne kryształy odsączyłem na lejku ze spiekim i wysuszyłem w eksykatorze próżniowym. Brązowy proszek, wyd:4,96g (68%, 2 etapy), t.t. 180°C (rozkład)

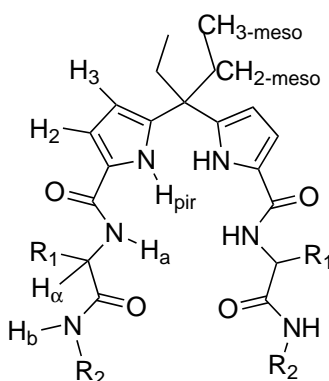
¹HNMR (200 MHz, aceton-d₆) δ: 10,40 (2H, bs); 6,86 (2H, dd, *J*= 2,4; 3,8Hz); 6,19 (2H, dd, *J*=2,4; 3,8Hz); 2,29 (4H, q, *J*= 7,2Hz), 0,80 (6H, t, *J*=7,2Hz)

¹³CNMR (50 MHz, aceton-d₆) δ 162,3; 143,1; 122,2; 115,9; 108,6; 44,1; 27,8; 7,9

An. spal. Obliczono dla C₁₅H₁₈N₂O₄: C-62,06; H-6,25; N-9,65
znaleziono: C-62,07; H-6,22; N-9,56

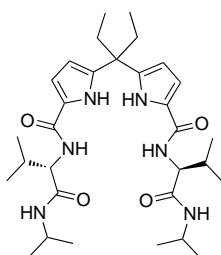
Otrzymywanie receptorów DEDPM 69 - procedura ogólna Boc zabezpieczony aminokwas (4 mmol) rozpuściłem w 4 M HCl w dioksanie (5 mL) i mieszałem przez 2h. Podczas reakcji wyręcał się produkt w postaci białego proszku. Mieszaninę zatężyłem na wyparce. Do wysuszonego chlorowodoru aminokwasu dodałem suchy dichlorometan (50 mL), DIPEA (2 mL, 12 mmol) oraz dikwas **79** (387 mg, 1,33 mmol). Po ochłodzeniu pod argonem do 0 °C dodałem EDCl (580 mg, 3 mmol) i HOBt (459 mg, 3 mmol). Mieszaninę doprowadziłem do t.pok. i mieszałem pod argonem przez 12h. Następnie dodałem octan etylu (100 mL), fazę organiczną przemyłem 10% NaHSO₄ (2x50 mL), 10% NaHCO₃ (2x50 mL) i solanką (30 mL). Fazę

organiczną wysuszyłem nad $MgSO_4$ i zateżyłem na wyparce. Receptory oczyszczałem chromatograficznie w układzie aceton:DCM 2:5 (v/v).



Rysunek 5.1: Schemat numeracji protonów w receptorach DEDPM

DEDPM-ValNHIPr, 69a



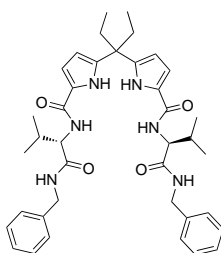
Biały proszek, wyd: 45% t.t. 172-175°C

1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ : 10,86 (2H, s, H_{pir}); 7,90 (2H, d, $J=7,5$ Hz; NH_b); 7,74 (2H, d, $J=9,0$ Hz; NH_a); 6,75 (2H, dd, $J=2,4$; 3,6Hz; H_2), 5,89 (2H, dd, $J=2,7$; 3,6Hz; H_3); 4,21 (2H, t, $J=8,4$ Hz; H_α); 3,83 (2H, oct, $J=6,8$ Hz); 2,03-2,27 (4H, m, CH_{2-meso}); 1,94-2,00 (2H, m, R_1); 1,04 (6H, d, $J=6,8$ Hz); 1,03 (6H, d, $J=6,8$ Hz); 0,84-0,88 (12H, m, R_1); 0,65 (6H, t, $J=7,4$ Hz; CH_{3-meso})

^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ 170,2; 160,0; 140,7; 128,2; 127,2; 125,36; 111,3; 106,6; 57,8; 42,8; 40,2; 30,6; 26,8; 22,4; 22,2; 19,2; 18,9; 8,2

HRMS Obliczono dla $C_{31}H_{50}N_6O_4 + Na$: 593,37858
znaleziono: 593,38061

DEDPM-ValNHBn, 69b



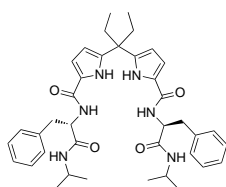
Biały proszek, wyd: 40% t.t. 194-196°C

¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,90 (2H, s, H_{pir}); 8,52 (2H, t, J=6,0Hz; NH_b); 7,80 (2H, d, J=8,7Hz; NH_a); 7,19-7,31 (10H, m, R₂); 6,78 (2H, dd, J=2,7; 3,6Hz; H₂); 5,91 (2H, dd, J=2,7; 3,6Hz; H₃); 4,32 (2H, t, J=8,4Hz; H_α); 4,28 (4H, d, J=6,0Hz, R₂); 2,01-2,18 (6H, m, CH₂-meso+R₁); 0,875 (6H, d, J=6,6Hz, R₁); 0,865 (6H, d, J=6,9Hz, R₁); 0,66 (6H, t, J=7,2Hz; CH₃-meso)

¹³CNMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 171,4; 160,2; 140,7; 139,4; 128,2; 127,2; 126,7; 125,3; 111,3; 106,6; 58,1; 42,8; 42,0; 30,3; 26,7; 19,4; 18,8; 8,2

HRMS Obliczono dla C₃₉H₅₀N₆O₄ + Na: 689,37858
znaleziono: 689,37964

DEDPM-PheNHiPr, 69c



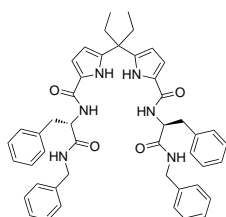
Biały proszek, wyd: 55% t.t. 153-155°C

¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,78 (2H, s, H_{pir}); 8,00 (2H, d, J=8,4Hz; NH_b); 7,85 (2H, d, J=7,7Hz; NH_a); 7,27 (4H, d, J=7,2Hz, R₁); 7,22 (4H, t, J=7,2Hz, R₁); 7,13 (2H, t, J=7,2Hz, R₁); 6,69 (2H, dd, J=2,6; 3,3Hz; H₂); 5,87 (2H, dd, J=2,8; 3,3Hz; H₃); 4,58 (2H, dt, J=5,4; 9,2Hz; H_α); 3,77-3,86 (2H, m, R₂); 2,96 (2H, dd, J= 5,4; 13,6Hz, R₁); 2,88 (2H, dd, J= 5,4; 13,6Hz, R₁); 2,01-2,15 (4H, m, CH₂-meso), 1,04(6H, d, J=6,4Hz, R₂); 0,96 (6H, d, J=6,4Hz, R₂); 0,63 (6H, t, J=7,2Hz; CH₃-meso)

¹³CNMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 170,4; 160,1; 140,6; 138,2; 129,1; 127,9; 126,1; 125,3; 111,0; 106,4; 54,1; 45,6; 40,3; 37,9; 26,5; 22,25; 22,20; 8,1

HRMS Obliczono dla C₃₉H₅₀N₆O₄ + Na: 689,37858
znaleziono: 689,37987

DEDPM-PheNHBn, 69d



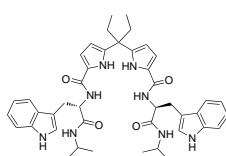
Biały proszek, wyd: 62% t.t. 126-128°C

¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,83 (2H, s, H_{pir}); 8,53 (2H, t, J=5,7Hz; NH_b); 8,10 (2H, d, J=8,1Hz; NH_a); 7-11-7,31 (20H, m, R₁+R₂); 6,70 (2H, dd, J=2,7; 3,0Hz; H₂); 5,87 (2H, dd, J=2,7; 3,0Hz; H₃); 4,67 (2H, ddd, J=4,5; 5,1; 10,2Hz; H_α); 4,23-4,32 (4H, m, R₂); 3,08 (2H, dd, J=4,5; 13,5Hz, R₁); 2,93 (2H, dd, J=10,2; 13,5Hz, R₁); 2,03-2,14 (4H, m, CH₂-meso); 0,63 (6H, t, J=7,2Hz; CH₃-meso).

¹³CNMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 171,6; 160,3; 140,7; 139,3; 138,4; 129,1; 128,1; 128,0; 127,1; 126,6; 126,1; 125,2; 110,9; 106,3; 54,4; 42,5; 42,0; 40,0; 37,5; 26,3; 8,1.

HRMS Obliczono dla C₄₇H₅₀N₆O₄ + Na: 785,37858
znaleziono: 758,37941

DEDPM-TrpNHPr, 69e



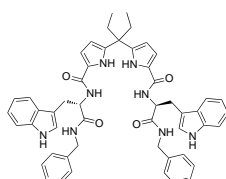
Biały proszek, wyd: 70% t.t. 159-162°C

¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,80 (2H, s, H_{pir}); 10,73 (2H, s, R₁); 7,92 (2H, d, J=8,4Hz; NH_b); 7,85 (2H, d, J=7,8Hz; NH_a); 7,64 (2H, d, J=7,9Hz, R₁); 7,28 (2H, d, J=8,2Hz, R₁); 7,14 (2H, d, J=2,1Hz, R₁); 7,03 (2H, t, J=8,2Hz, R₁); 6,95 (2H, t, J=7,9Hz, R₁); 6,68 (2H, dd, J=2,6; 3,4Hz; H₂); 5,86 (2H, dd, J=2,6; 3,4Hz; H₃); 4,61 (2H, ddd, J=5,2; 7,8; 9,1Hz, ; H_α); 3,79-3,87 (2H, m, R₂); 3,10 (2H, dd, J=5,2; 14,3Hz, R₁); 3,01 (2H, dd, J=9,1; 14,3Hz, R₁); 2,01-2,14 (4H, m, CH₂-meso); 1,03 (6H, d, J=6,5Hz, R₂); 0,95 (6H, d, J=6,5Hz, R₂); 0,62 (6H, t, J=7,3Hz; CH₃-meso).

¹³CNMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 170,8; 160,1; 140,6; 135,9; 127,3; 123,6; 120,7; 118,5; 118,1; 111,16; 110,92; 110,4; 106,4; 53,4; 42,7; 40,35; 40,04; 28,1; 26,5; 22,27; 22,22; 8,1.

HRMS Obliczono dla C₄₃H₅₂N₈O₄ + Na: 767,40037
znaleziono: 767,40345

DEDPM-TrpNHBn, 69f



Biały proszek, wyd: 55% t.t. 169-171°C

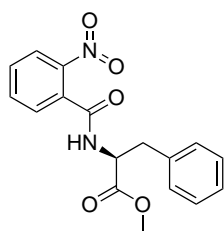
¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 10,84 (2H, s, H_{pir}); 10,75 (2H, s, R₁); 8,52 (2H, t, J=5,9Hz; NH_b); 8,01 (2H, d, J=8,0Hz; NH_a); 7,66 (2H, d, J=8,0Hz, R₁); 7,30 (2H, d, J=8,3Hz, R₁); 7,23-7,26 (4H, m, R₁+R₂); 7,13-7,20 (8H, m, R₂); 7,03 (2H, t, J=8,3Hz, R₁); 6,96 (2H, t, J=8,0Hz, R₁); 6,70 (2H, dd, J=2,3; 3,3Hz; H₂); 5,87 (2H, dd, J=2,3; 3,3Hz; H₃); 4,70 (2H, ddd, J=5,2; 8,0; 9,4Hz; H_α); 4,23-4,31 (4H, m, R₂); 3,21 (2H, dd, J=5,2; 14,6Hz, R₁); 3,05 (2H, dd, J=9,4; 14,6Hz, R₁); 2,03-2,15 (4H, m, CH_{2-meso}); 0,63 (6H, t, J=7,3Hz; CH_{3-meso}).

¹³CNMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 171,9; 160,3; 140,7; 139,3; 136,0; 128,1; 127,2; 126,9; 126,5; 125,3; 123,6; 120,8; 118,5; 118,1; 111,2; 110,9; 110,5; 106,4; 53,7; 42,6; 42,0; 40,0; 27,8; 26,3; 8,1.

HRMS Obliczono dla C₅₁H₅₂N₈O₄ + Na: 863,40037
znaleziono: 863,40212

5.1.3 Syntezy związane z receptorami opartymi na kwasie antranilowym

Ester metylowy 2-nitrobenzoilo-L-fenylalaniny, 81



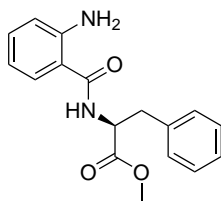
Chlorek kwasu 2-nitrobenzoesowego (757 mg, 3,5 mmol) rozpuściłem w suchym dichlorometanie (50 mL) i umieściłem w zaargonowanej kolbie. Roztwór schłodziłem do 0°C, dodałem DIPEA (1,13 mL, 8,75 mmol) oraz chlorowodorek estru metylowego L-fenylalaniny (770 mg, 4,2 mmol); mieszaninę doprowadziłem do t.pok. i mieszałem przez 2h. Następnie dodałem octan etylu (100 mL), fazę organiczną przemyłem 10% NaHSO₄ (2x50 mL), 10% NaHCO₃ (2x50 mL) i solanką (30 mL). Fazę organiczną wysuszyłem nad MgSO₄ i zateżyłem na wyparce, a produkt wysuszyłem pod wysoką próżnią. Otrzymałem 1,05g (90%) produktu w postaci żółtego oleju, który wykryształizował w kolbie, t.t. 93-96°C

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 8,04 (1H, dd, J=1,2; 8,0Hz); 7,64 (1H, td, J=1,2; 7,6Hz); 7,57(1H, td, J=1,6; 7,6Hz); 7,41 (1H, dd, J=1,6; 7,6Hz); 7,14-7,34 (5H, m); 6,36 (1H, d, J=7,6Hz); 5,13 (1H, dd, J=5,2; 7,6Hz); 3,77 (3H, s); 3,44-3,48 (2H, m)

¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171,5; 165,4; 146,6; 135,5; 133,6; 132,3; 130,7; 129,4; 128,62; 128,57; 127,2; 124,6; 53,5; 52,5; 37,7

An. spal. Obliczono dla C₁₇H₁₆N₂O₅: C-62,19; H-4,91; N-8,53
znaleziono: C-62,01; H-4,94; N-8,56

Ester metylowy 2-aminobeznoilo-L-fenylalaniny, 82



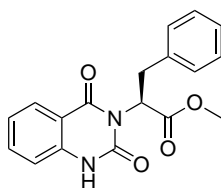
Ester **81** (950 mg, 2,9 mmol) rozpuściłem w octanie etylu (50 mL) w kolbie dwuszyjnej o obj. 250 mL, dodałem 10% pallad na węglu (50 mg), kolbę napełniłem wodorem przez dwukrotne wypróżnienie-napełnienie. Reakcję prowadziłem przez 6h z intensywnym mieszaniem przy nadciśnieniu wodoru z balonu. Następnie roztwór przesączyłem przez Celit®, który przemyłem procją rozpuszczalnika (20 mL), przesącz zatężyłem, otrzymałem 844mg szarych kryształów (98%), t.t. 117-118°C.

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,00-7,20 (7H, m); 6,59-6,66 (2H, m); 6,50 (1H, d, *J*=3,2Hz, NH); 5,22 (2H, bs, NH₂); 5,03 (1H, m,); 3,75 (3H, s); 3,18-3,27 (2H, m)

¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172,1; 168,6; 148,8; 135,9; 132,6; 129,3; 128,6; 127,3; 127,1; 117,2; 116,6; 115,2; 53,2; 52,3; 37,9.

An. spal. Obliczono dla C₁₇H₁₈N₂O₃: C-68,44; H-6,08; N-9,39
znaleziono: C-68,37; 6,15; 9,31

(2S)-2-(2,4-diokso-1,4-dihydrochinazolin-3(2H)-ylo)-3-fenylpropionian metylu, 84



Aminę **82** (289 mg, 1,0 mmol) zawisiłem w toluenie (15 mL), dodałem trifosgen (46 mg, 0,16 mmol), reakcję prowadziłem w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną, której wylot za pomocą węża silikonowego skierowałem na powierzchnię wody w eksykatorze. Po 16h reakcji, mieszaninę ochłodziłem do t.pok. i odsączyłem osad, który wysuszyłem w eksykatorze próżniowym. Otrzymałem 130 mg produktu w postaci białego proszku o t.t. 82-84°C.

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 10,36 (1H, s); 8,04 (1H, d, *J*=8,0Hz); 7,61 (1H, dd, *J*=1,6; 7,2Hz); 7,00-7,24 (7H, m); 5,88 (1H, dd, *J*=5,6; 9,6Hz); 3,75 (3H, s); 3,65 (1H, dd, *J*=5,6; 14,0Hz); 3,47 (1H, dd, *J*=9,6; 14,0Hz).

¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169,9; 161,7; 151,6; 138,4; 137,1; 129,1; 128,5; 128,3; 126,6; 123,5; 115,1; 144,1; 54,7; 52,6; 34,7.

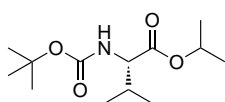
An. spal. Obliczono dla C₁₈H₁₆N₂O₄: C-66,66; H-4,97; N-8,64
znaleziono: C-66,24; H-5,12; N-8,38

5.1.4 Syntezy estrów Boc-zabezpieczonych aminokwasów

Otrzymywanie estrów procedura ogólna

Reakcję prowadziłem w atmosferze argonu. Boc zabezpieczony aminokwas (20 mmol) i odpowiedni alkohol (30 mmol) rozpuściłem w suchym DCM (50 mL), zaargonowałem i schłodziłem do 0°C. Następnie dodałem EDCL (22 mmol, 4,25 g) i DMAP (2 mmol, 244 mg). Roztwór doprowadziłem do t.pok. i mieszałem pod argonem przez noc. Mieszaninę zatężyłem na wyparce do ok 1/3 objętości, dodałem octan etylu (50 mL). Fazę organiczną przemyłem 10% NaHSO₄ (2x50 mL), 10% NaHCO₃ (2x50 mL) i solanką (30 mL), następnie wysuszyłem nad MgSO₄. Roztwór zatężyłem na wyparce. Estry lotnych alkoholi suszyłem pod próżnią, a estry benzylo- we oczyszczałem chromatograficznie (eluent heksan:octan etylu 8:2-7:3).

Boc-L-ValOiPr, 92b



Bezbarwny olej. Wyd: 3,84g (74%)

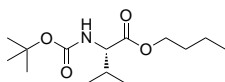
¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,06 (1H, d, *J* = 8,0 Hz); 4,91 (1H, sept, *J* = 6,4 Hz); 3,84 - 3,63 (1H, m); 2,13 - 1,83 (1H, m); 1,39 (9H, s); 1,19 (3H, d, *J* = 6,3 Hz); 1,17 (3H, d, *J* = 6,2 Hz); 0,87 (6H, d, *J* = 6,7 Hz)

¹³CNMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 171,4, 155,7, 78,1, 67,5, 59,5, 29,5, 28,2, 21,6, 21,5, 18,9, 18,3

HRMS Obliczono dla C₁₃H₂₅NO₄ + Na⁺: 282,16758
znaleziono: 282,16777

O.R. [α_D^{20}] = -34,8 (c=1,2, MeOH)

Boc-L-ValOnBu, 92c



Bezbarwny olej. Wyd: 4,04g (74%)

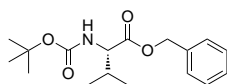
¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,11 (1H, d, *J* = 8,2 Hz); 4,11 - 3,97 (2H, m); 3,81 (1H, dd, *J* = 8,2, 6,7 Hz); 2,00 (1H, oct, *J* = 6,7 Hz); 1,63 - 1,45 (2H, m); 1,38 (9H, s); 1,38 - 1,28 (2H, m); 0,95 - 0,79 (9H, m)

¹³CNMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 172,0; 155,7; 78,1; 63,8; 59,5; 30,2; 29,5; 28,2; 19,0; 18,6; 18,4; 13,5

HRMS Obliczono dla C₁₄H₂₇NO₄ + Na⁺: 296,18323
znaleziono: 296,18332

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -29,2$ (c=1,82, MeOH)

Boc-L-ValOBn, 92d



Bezbarwny olej, Wyd: 2,82g (43%)

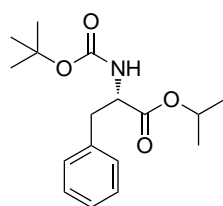
¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 7,40 - 7,29 (5H, m); 7,21 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); 5,16 (1H, d, $J = 12,5$ Hz); 5,09 (1H, d, $J = 12,5$ Hz); 3,88 (1H, dd, $J = 8,0, 6,7$ Hz); 2,02 (1H, oct, $J = 6,8$ Hz); 1,38 (9H, s); 0,86 (3H, d, $J = 6,8$ Hz); 0,85 (3H, d, $J = 6,8$ Hz)

¹³CNMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 171,9; 155,8; 142,5; 136,0; 128,3; 128,0; 127,9; 127,6; 126,6; 126,4; 78,2; 65,7; 62,9; 59,5; 29,6; 28,2; 19,0; 18,4

HRMS Obliczono dla C₁₇H₂₅NO₄ + Na⁺: 330,16758
znaleziono: 330,16895

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -31,8$ (c=1,1, MeOH) (Lit.¹³¹: -29,7)

Boc-L-PheOiPr, 92f



Bezbarwny olej, Wyd: 2,92g (64%)

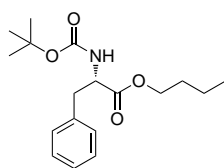
¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.80 - 7.04 (6H, m), 4.86 (1H, sept, $J = 6.2$ Hz), 4.08 (1H, ddd, $J = 9.3, 8.1, 5.8$ Hz), 2.95 (1H, dd, $J = 13.7, 5.6$ Hz), 2.86 (1H, dd, $J = 13.5, 9.8$ Hz), 1.34 (9H, s), 1.17 (3H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.08 (3H, d, $J = 6.2$ Hz)

¹³CNMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 171.5, 155.3, 137.6, 129.1, 128.1, 126.4, 78.2, 67.8, 55.5, 36.4, 28.1, 21.5, 21.3

HRMS Obliczono dla C₁₇H₂₅NO₄ + Na⁺: 330.16758
znaleziono: 330.16722

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -5.14$ (c=1.1, MeOH)

Boc-L-PheOnBu, 92g



Bezbarwny olej, Wyd: 4,04g (63%)

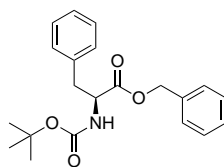
¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.37 - 7.16 (6H, m), 4.15 (1H, ddd, *J* = 9.5, 8.5, 5.6 Hz), 4.08 - 3.93 (2H, m), 2.97 (1H, dd, *J* = 13.7, 5.6 Hz), 2.87 (1H, dd, *J* = 13.7, 9.5 Hz), 1.54 - 1.39 (2H, m), 1.32 (9H, s), 1.31 - 1.17 (2H, m), 0.85 (3H, t, *J* = 7.4 Hz)

¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.1, 155.3, 137.6, 129.0, 128.1, 126.4, 78.2, 64.0, 55.3, 36.5, 30.1, 28.1, 18.5, 13.5

HRMS Obliczono dla C₁₈H₂₇NO₄ + Na: 344.18323
znaleziono: 344.18309

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -7.55$ (c=1.46, MeOH)

Boc-L-PheOBn, 92h



Białe kryształy, Wyd: 3,96g (56%), t.t. 64-65°C Lit.¹³² 62-63°C

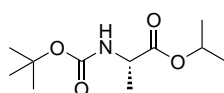
¹HNMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.54 - 7.01 (11H, m), 5.10 (2H, s), 4.22 (1H, ddd, *J* = 9.8, 8.1, 5.5 Hz), 3.01 (1H, dd, *J* = 13.7, 5.4 Hz), 2.90 (1H, dd, *J* = 13.7, 9.9 Hz), 1.32 (9H, s)

¹³CNMR (151 MHz, DMSO-d₆) δ 172.0, 155.4, 137.5, 135.8, 129.1, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 126.4, 78.3, 65.9, 55.4, 36.3, 28.1

HRMS Obliczono dla C₂₁H₂₅NO₄ + Na: 378.16758
znaleziono: 378.16725

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -11,6$ (c=1.06, MeOH) (Lit.¹³¹: -10)

Boc-L-AlaOiPr, 92j



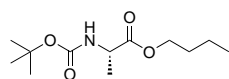
Bezbarwny olej, Wyd: 3,23g (70%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,22 (1H, d, *J* = 7,2 Hz); 4,87 (1H, sept, *J* = 6,3 Hz); 3,90 (1H, p, *J* = 7,3 Hz); 1,37 (s, 9H); 1,24 – 1,12 (m, 9H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 172,6; 155,3; 78,0; 67,6; 49,2; 28,2; 21,6; 21,5; 16,7

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -31,0$ (c=1, MeOH)

Boc-L-AlaOnBu, 92k



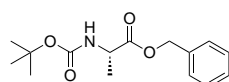
Bezbarwny olej. Wyd: 4,02g (82%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7,25 (1H, d, *J* = 7,3 Hz); 4,12 – 3,92 (m, 3H); 1,59 – 1,48 (m, 2H); 1,44 – 1,28 (m, 11H); 1,22 (3H, d, *J* = 7,3 Hz); 0,87 (3H, t, *J* = 7,4 Hz)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 173,2; 155,3; 78,1; 63,9; 49,1; 30,2; 28,2; 18,6; 16,8; 13,5

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -35,7$ (c=1,09, MeOH), (Lit.² : -41)

Boc-L-AlaOBn, 92l



Bezbarwny olej. Wyd: 2,95g (53%)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.40 – 7.30 (m, 1H); 5.15 (1H, d, *J* = 12.7 Hz); 5.08 (1H, d, *J* = 12.7 Hz); 4.07 (1H, quint, *J* = 7.3 Hz); 1.37 (s, 2H); 1.26 (1H, d, *J* = 7.5 Hz)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 173.0; 155.3; 136.1; 128.4; 128.0; 127.7; 78.2; 65.8; 49.2; 28.2; 16.8

O.R. $[\alpha_D^{20}] = 33,6$ (c=1,26, MeOH)

Synteza receptorów 70a,e

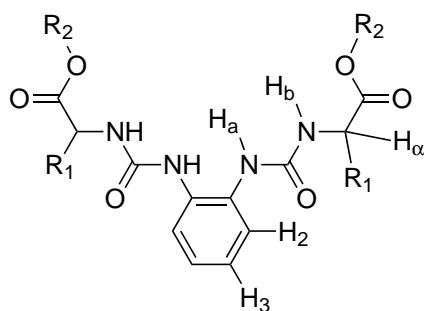
UWAGA! Wszystkie procedury związane z użyciem fosgenu i trifosgenu powinny być prowadzone pod sprawnym wyciągiem z zachowaniem szczególnej ostrożności. Wyparka powinna być wyposażona w pompkę wodną i umyta po użyciu roztworem amoniaku.

Chlorowodorek estru metylowego aminokwasu (10 mmol) zawisiłem w toluenie (50 mL), dodałem trifosgen (0,66 g, 6,6 mmol) i ogrzałem do wrzenia. Reakcję prowadziłem pod chłodnicą zwrotną przez 3h. Na wylot chłodnicy poprzez nasadkę kątową nałożyłem wąż silikonowy, którego koniec doprowadziłem nad powierzchnię wody w krystalnicy aby pochłaniać wydzie-

lający się w reakcji chlorowodor. Po zakończeniu reakcji, toluen odparowałem na wyparce, a otrzymany olej destylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem (89°C / 4 torr dla Val i 115°C / 4 torr dla Phe). Otrzymane izocyjaniiny (wyd.: 66% dla waliny i 85% dla fenyloalaniny) rozpuściłem w DMF (50 mL) i dodałem *o*-fenylenodiaminę (216 mg, 2,0 mmol dla waliny i 270 mg, 2,5 mmol dla fenyloalaniny), roztwór mieszałem w t.pok. przez 3h. Następnie roztwór zatężyłem, dodałem octanu etylu (50 mL), fazę organiczną przemyłem wodą (3x50 mL), wysuszyłem nad MgSO₄ i zatężyłem na wyparce. Otrzymany surowy produkt oczyściłem chromatograficznie w układzie: 5-10% aceton w DCM, a następnie przekryształizowałem z układu aceton-woda. Produkt suszyłem w eksykatorze próżniowym.

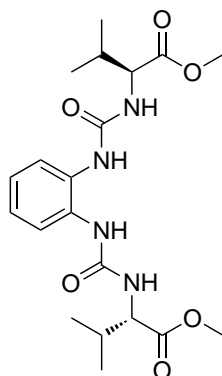
Synteza receptorów 70b-d,f-i, metoda ogólna

Odpowiedni Boc-zabezpieczony ester aminokwasu (**92**) (6 mmol) rozpuściłem w 4 M HCl w dioksanie (5 mL) i mieszałem przez ok 3h. Dla niektórych substratów obserwowałem wytrącanie białego osadu. Mieszaninę zatężyłem na wyparce, następnie zawiesiłem w DCM w kolbie 100 mL, schłodziłem do 0°C, dodałem 10% NaHCO₃ (20 mL) i intensywnie mieszałem utrzymując temp. 0°C. Po całkowitym rozpuszczeniu aminokwasu, zatrzymałem mieszanie, odczekałem, aż fazy się oddzielią i dodałem roztwór fosgenu w toluenie (1,93 M, 6 mL, 11,6 mmol), po czym wznowiłem intensywnie mieszanie. Po 10 min w 10, rozdzieliłem fazy w rozdzielaczu, fazę wodną ekstrahowałem DCM (10 mL), połączone fazy organiczne wysuszyłem nad MgSO₄ i zatężyłem na wyparce. Surowy isocyjaniin rozpuściłem w DMF (20 mL) dodałem *o*-fenylenodiaminę (162 mg, 1,5 mmol) i mieszałem w t.pok. przez 3h. Następnie roztwór zatężyłem, dodałem octanu etylu (50 mL), fazę organiczną przemyłem wodą (3x50 mL), wysuszyłem nad MgSO₄ i zatężyłem na wyparce. Otrzymany surowy produkt oczyściłem chromatograficznie w układzie: 5-10% aceton w DCM, a następnie przekryształizowałem z układu aceton-woda. Produkt suszyłem w eksykatorze próżniowym.



Rysunek 5.1: Schemat numeracji protonów w receptorach DAB

DAB-ValOMe, 70a



Biały proszek wyd: 896 mg (85%) t.t. 152-155°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.92 (2H, s, H_a), 7.51 (2H, dd, *J* = 5.9, 3.6 Hz, H₂), 6.97 (2H, dd, *J* = 6.0, 3.5 Hz, H₃), 6.91 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H_b), 4.17 (2H, dd, *J* = 8.2, 5.6 Hz, H_α), 3.66 (6H, s, R₂), 2.05 (2H, oct, *J* = 7.0 Hz, R₁), 0.92 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, R₁), 0.90 (6H, d, *J* = 7.0 Hz, R₁)

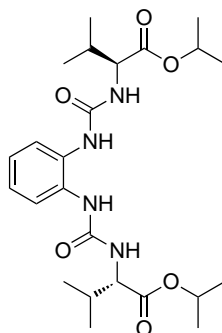
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.8, 155.7, 131.1, 123.3, 123.2, 57.9, 51.6, 30.5, 19.0, 18.0

HRMS Obliczono dla C₂₀H₃₀N₄O₆ + Na: 445.205207
znaleziono: 445.20521

An. spal. Obliczono dla C₂₀H₃₀N₄O₆: C-56,86; H-7,16; N-13,23
znaleziono: C-56,75; H-7,06; N-13,21

O.R. [α_D^{20}] = -2,77 (c=0.5, MeCN)

DAB-ValOiPr, 70b



Biały proszek wyd: 411 mg (43%) t.t. 120-123°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.96 (2H, s, H_a), 7.57 - 7.44 (2H, m, H₂), 6.99 - 6.93 (2H, m, H₃), 6.84 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H_b), 4.95 (2H, sept, *J* = 6.3 Hz, R₂), 4.11 (2H, dd, *J* = 8.4, 5.3 Hz, H_α), 2.05 (2H, oct, *J* = 6.8 Hz, R₁), 1.25 - 1.19 (12H, m, R₂), 0.93 (6H, s, *J* = 6.8 Hz, R₁), 0.90 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, R₁)

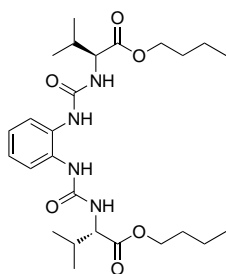
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 171.7, 155.7, 131.1, 123.25, 123.21, 67.8, 57.9, 30.5, 21.6, 21.6, 18.9, 17.9

HRMS Obliczono dla C₂₄H₃₈N₄O₆ + Na: 501.26836
znaleziono: 501.26922

An. spal. Obliczono dla C₂₄H₃₈N₄O₆: C-60,23; H-8,00; N-11,71
znaleziono: C-59,93; H-7,98; N-11,56

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -9.11$ (c=0.5, MeCN)

DAB-ValOnBu, 70c



Biały proszek wyd: 405 mg (40%) t.t. 134-136°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.93 (2H, s, H_a), 7.51 (2H, dd, *J* = 5.7, 3.6 Hz, H₂), 6.97 (2H, dd, *J* = 5.8, 3.6 Hz, H₃), 6.87 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H_b), 4.29 - 3.91 (6H, m, H_α+R₂), 2.05 (2H, oct, *J* = 6.3 Hz, R₁), 1.69 - 1.46 (4H, m, R₂), 1.47 - 1.25 (4H, m, R₂), 1.02 - 0.79 (18H, m, R₁+R₂)

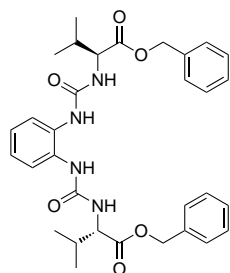
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.3, 155.7, 131.1, 123.3, 123.25, 64.0, 57.9, 30.5, 30.2, 19.0, 18.6, 18.0, 13.5

HRMS Obliczono dla C₂₆H₄₂N₄O₆ + Na: 529.29966
znaleziono: 529.30038

An. spal. Obliczono dla C₂₆H₄₂N₄O₆: C-61,64; H-8,36; N-11,06
znaleziono: 61,65; H-8,25; N-10,78

O.R. $[\alpha_D^{20}] = 1.62$ (c=0.5, MeCN)

DAB-ValBn, 70d



Biały proszek wyd: 367 mg (32%) t.t. 150-152°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.97 (2H, s, H_a), 7.50 (2H, dd, J = 5.9, 3.6 Hz, H₂), 7.44 - 7.30 (10H, m, R₂), 6.97 (2H, dd, J = 6.0, 3.6 Hz, H₃), 6.93 (2H, d, J = 8.3 Hz, H_b), 5.19 (2H, d, J = 12.4 Hz, R₂), 5.13 (2H, d, J = 12.4 Hz, R₂), 4.21 (2H, dd, J = 8.3, 5.4 Hz, H_α), 2.07 (2H, oct, J = 6.8 Hz, R₁), 0.91 (6H, d, J = 6.8 Hz, R₁), 0.88 (6H, d, J = 6.8 Hz, R₁)

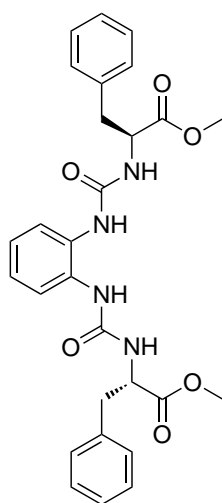
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.2, 155.8, 135.9, 131.1, 128.4, 128.1, 128.1, 123.3, 123.2, 109.5, 65.9, 58.0, 30.4, 19.0, 17.9

HRMS Obliczono dla C₃₂H₃₈N₄O₆ + Na: 597.26835
znaleziono: 597.26448

An. spal. Obliczono dla C₃₂H₃₈N₄O₆: C-66,88; H-6,67; N-9,75
znaleziono: C-67,27; H-6,81; N-9,10

O.R. [α_D²⁰] = 2.00 (c=0.45, MeCN)

DAB-PheOMe, 70e



Biały proszek wyd: 985 mg (76%) t.t. 141,143°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.98 (2H, s, H_a), 7.47 - 7.40 (2H, m, H₂), 7.32 - 7.18 (10H, m, R₁), 6.99 - 6.94 (2H, m, H₃), 6.92 (2H, d, J = 7.8 Hz, H_b), 4.51 (2H, ddd, J = 13.6, 7.6, 5.7 Hz, H_α), 3.62 (6H, s, R₂), 3.04 (2H, dd, J = 13.8, 5.8 Hz, R₁), 2.97 (2H, dd, J = 13.6, 7.6 Hz, R₁)

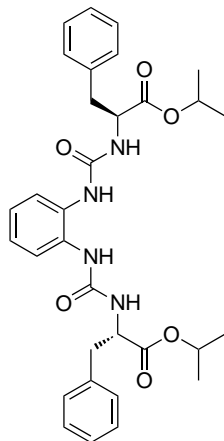
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.6; 155.3; 136.9; 131.0; 129.2; 128.3; 126.6; 123.4; 123.4; 54.2; 51.8; 37.5.

HRMS Obliczono dla C₂₈H₃₀N₄O₆ + Na: 541.20576
znaleziono: 541,21088

An. spal. Obliczono dla C₂₈H₃₀N₄O₆: C-64,85; H-5,83; N-10,8
znaleziono: C-64,65; H-6,02; N-10,12

O.R. $[\alpha_D^{20}] = 7.24$ (c=0.45, MeCN)

DAB-PheOiPr, 70f



Biały proszek wyd: 436 mg (38%) t.t. 115-118°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 7.99 (2H, s, H_a), 7.45 (2H, dd, $J = 5.8, 3.6$ Hz, H₂), 7.29 (4H, t, $J = 7.3$ Hz, R₁), 7.26 - 7.19 (6H, m, R₁), 6.96 (2H, dd, $J = 5.8, 3.6$ Hz, H₃), 6.89 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H_b), 4.85 (2H, sept, $J = 6.2$ Hz, R₂), 4.45 (2H, dt, $J = 7.7, 6.8$ Hz, H _{α}), 2.98-2.99 (4H, s, R₁), 1.16 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, R₂), 1.08 (6H, d, $J = 6.2$ Hz, R₂)

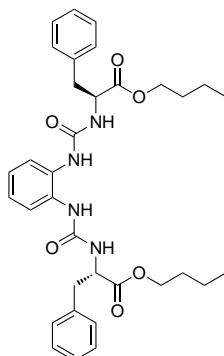
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 171.6, 155.3, 136.8, 131.1, 129.3, 128.2, 126.6, 123.4, 123.3, 109.5, 68.0, 54.3, 37.7, 21.6, 21.4

HRMS Obliczono dla C₃₂H₃₈N₄O₆ + Na: 597.26836
znaleziono: 597.26923

An. spal. Obliczono dla C₃₂H₃₈N₄O₆: C-66,88; H-6,67; N-9,75
znaleziono: C-66,76; H-6,63; N-9,55

O.R. $[\alpha_D^{20}] = 16.3$ (c=0.5, MeCN)

DAB-PheOnBu, 70g



Biały proszek wyd: 481 mg (40%) t.t. 123-126°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 7.99 (2H, s, H_a), 7.48 - 7.41 (2H, m, H₂), 7.29 (4H, t, *J* = 7.4 Hz, R₁), 7.25 - 7.19 (6H, m, R₁) 7.01 - 6.94 (2H, m, H₃), 6.91 (2H, d, *J* = 7.8 Hz, H_b), 4.40-4.50 (2H, m, H_α), 4.05 - 3.97 (4H, m, R₂), 3.03 - 2.95 (4H, m, R₁), 1.51 - 1.44 (4H, m, R₂), 1.29 - 1.18 (4H, m, R₂), 0.85 (6H, t, *J* = 7.4 Hz, R₂)

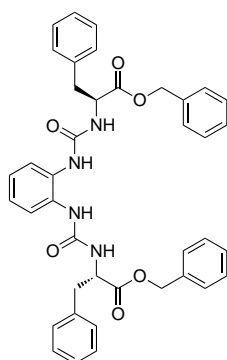
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.2; 155.3; 136.8; 131.1; 129.2; 128.3; 126.6; 123.4; 123.3; 64.1; 54.3; 37.7; 30.1; 18.5; 13.5

HRMS Obliczono dla C₃₄H₄₂N₄O₆ + Na: 625,29966
znaleziono: 625,30061

An. spal. Obliczono dla C₃₄H₄₂N₄O₆: C-67,75; H-7,02, N-9,30
znaleziono: C-68,10; H-7,19; N-9,00

O.R. [α_D²⁰] = 3.97 (c=0.5, MeCN)

DAB-PheOBn, 70h



Biały proszek wyd: 442 mg (33%) t.t. 142-144°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.00 (2H, s, H_a), 7.47 - 7.12 (22H, m, H₂+H₃+R₁+R₂), 7.00 - 6.90 (4H, m, H_b+R₂), 5.10 (4H, s, R₂), 4.56 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H_α), 3.09 - 2.94 (4H, m, R₁)

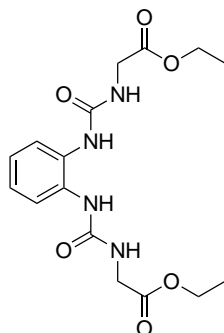
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 172.0; 155.4; 136.7; 135.7; 131.1; 129.2; 128.4; 128.3; 128.1; 128.0; 126.6; 123.42; 123.38; 66.0; 54.3; 37.5.

HRMS Obliczono dla C₄₀H₃₈N₄O₆ + Na: 693.26835
znaleziono: 693.26955

An. spal. Obliczono dla C₄₀H₃₈N₄O₆: C-71,63; H-5,71; N-8,35
znaleziono: C-71,46; H-5,81; N-8,12

O.R. [α_D²⁰] = -2.03 (c=0.5, MeCN)

DAB-GlyOEt, 70i



Otrzymałem wykorzystując ogólną metodę z fosgenem. Jako substrat użyłem chlorowodorek estru etylowego glicyny. Otrzymałem produkt w postaci szarych kryształów, wyd: 357 mg (65%) t.t. 146-147°C

¹HNMR (400 MHz, CD₃CN) δ : 7.57 (s, 2H, H_a); 7.35 - 7.33 (m, 2H); 7.11 - 7.03 (m, 2H, H₃); 5.85 (2H, t, $J = 5.5$ Hz, H_b); 4.14 (4H, q, $J = 7.1$ Hz, R₂); 3.86 (4H, d, $J = 5.9$ Hz, H _{α}); 1.22 (6H, t, $J = 7.1$ Hz, R₂)

¹³CNMR (100 MHz, CD₃CN) δ 170.5; 156.9; 130.8; 126.8; 119.7; 61.2; 43.5; 14.7

An. spal. Obliczono dla C₁₆H₂₂N₄O₆: C-52,45; H-6,05; N-15,29
znaleziono: C-52,32; H-6,25; N-14,76

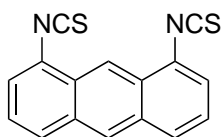
5.1.5 Synteza receptorów DAA

1,8-Diaminoantracen **68** otrzymałem zgodnie z przepisem literaturowym⁴⁶.

Ze względu na podatność 1,8-diaminoantracenu i 1,8-diizotiocyjaniatoantracenu na utlenianie tlenem z powietrza do dalszych etapów syntezy używałem odtlenowanego dichlorometanu. Rozpuszczalnik schładzałem do -78°C i poddawałem trzykrotnie cyklowi: wysoka próżnia 5 min, argon 2 min. Następnie doprowadziłem do t.pom pod argonem. Rozpuszczalnik przenosiłem strzykawką, a reakcje z jego użyciem prowadziłem pod argonem. Tiomocznikowe receptory (**71**) były bardziej stabilne, jednak pozostawianie ich w roztworze w otwartych naczyniach skutkowało po kilkunastu godzinach zauważalnym utlenieniem.

UWAGA!!! Wszystkie procedury związane z użyciem tiofosgeny powinny być prowadzone pod sprawnym wyciągiem z zachowaniem szczególnej ostrożności. Jednorazowa strzykawka użyta do pobrania rozpuszczalnika powinna być zaraz po użyciu wypłukana roztworem amoniaku. Wyparka powinna być wyposażona w pompkę wodną i umyta po użyciu roztworem amoniaku.

1,8-diizotiocyjaniatoantracen 97



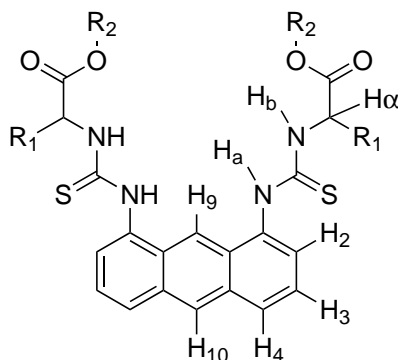
1,8-Diaminoantracen (4,16 g, 20 mmol) rozpuściłem w odtlenowanym dichlorometanie (50 mL), dodałem wodnego 10% roztworu NaHCO_3 (50 mL). Po zatrzymaniu mieszania do fazy organicznej wprowadziłem strzykawką tiosfogen (3,46 mL, 80 mmol), następnie fazy intensywnie mieszałem przez 30 min w t.pok. Dodałem odtlenowany DCM (150 mL) i rozdzieliłem fazy. Warstwę wodną ekstrahowałem DCM (50 mL). Połączone fazy organiczne suszyłem nad MgSO_4 , zatężyłem. Surowy produkt krystalizowałem z chloroformu otrzymując złocisto-brązowe płatki, 2,51 g (43%).

$^1\text{HNMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 8.61 (s, 1H); 8.39 (s, 1H); 7.88 (3H, d, $J = 7.7$ Hz); 7.46 – 7.34 (m, 5H)

An. spal. Obliczono dla $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{N}_2\text{S}_2$: C-65,73; H-2,76; N-9,58; S-21,93
znaleziono: C-62,53; H-2,79; N-9,13; S-19,29

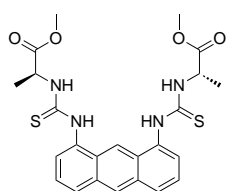
Synteza receptorów DAA 71a-m produra ogólna

Do reakcji użyłem handlowo dostępnych chlorowodorków estrów metylowych i etylowych aminokwasów **92a,e,i,m,n**. Pozostałe chlorowodorki otrzymałem przez odbezpieczenie Boc-zabezpieczonych estrów **74b-d,f-h,j-l** wg. procedury opisanej dla syntezy receptorów DAB (str. 166). Chlorowodorek estru aminokwasu (3 mmol), DIPEA (0,85 mL, 5 mmol) oraz 1,8-diizotiocyjaniatoantracen **97** (292 mg, 1 mmol) rozpuściłem w zaargonowanej kolbie w odtlenowanym DCM (30 mL). Reakcję prowadziłem przez ok 2h., po tym czasie mieszaninę naniósłem bezpośrednio na kolumnę chromatograficzną (~ 40 g żelu), elucję prowadziłem początkowo DCM (30 mL) następnie 2-4% acetonem w DCM. Frakcje zawierające produkt (świecący na płycie TLC na niebiesko przy wzbudzeniu światłem o $\lambda=354$ nm) odparowałem. Rozpuściłem w minimalnej ilości DCM i wytrąciłem hexanem żółty osad, który odsączyłem na lejku ze spiekem. Produkt suszyłem w eksykatorze próżniowym.



Rysunek 5.2: Schemat numeracji protonów w receptorach DAA

DAA-AlaOMe 71a



Żółty proszek, 174 mg (35%), t.t. 164-165°C

¹HNMR (MHz, DMSO-d₆) δ: 9.90 (s, 2H, H_a); 8.67 (1H, s, *J* = 5.1 Hz, H₁₀); 8.66 (s, 1H); 8.10 (2H, d, *J* = 7.3 Hz, H₂); 8.02 (2H, d, *J* = 8.4 Hz, H₄); 7.60 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H_b); 7.58 – 7.51 (m, 2H, H₃); 5.03 (2H, p, *J* = 7.3 Hz, H_{alpha}); 3.67 (s, 6H, R₂); 1.39 (6H, d, *J* = 7.3 Hz, R₁).

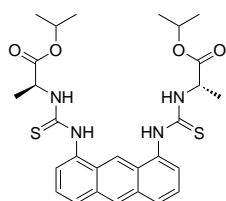
¹³CNMR (MHz, DMSO-d₆) δ 182.0; 173.0; 134.8; 132.0; 127.8; 127.0; 126.4; 125.4; 123.8; 116.6; 52.6; 51.9; 17.4.

HRMS Obliczono dla C₂₄H₂₆N₄O₄S₂ + H: 499,1454
znaleziono: 4,99,1447

An. spal. Obliczono dla C₂₄H₂₆N₄O₄S₂: C-57,81; H-5,26; N-11,24, S-12,86
znaleziono: C-57,91; H-5,25; N-11,13; S-12,76

O.R. [α_D^{20}] = -110,24 (c=0,37, DCM)

DAA-AlaOiPr 71b



Beżowy proszek, 122 mg (22%), t.t. 204-206°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.92 (s, 2H, H_a); 8.68 (s, 2H, H₁₀+H₉); 8.02 (4H, m, H₂+H₄); 7.62 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, H_b); 7.59 – 7.50 (m, 2H, H₃); 5.48 – 4.65 (m, 4H, H_{alpha}+R₂); 1.37 (6H, d, *J* = 7.2 Hz, R₂); 1.23 (6H, d, *J* = 6.4 Hz, R₂); 1.21 (6H, d, *J* = 6.4 Hz, R₁).

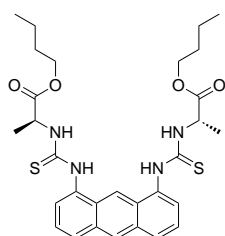
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.0; 172.0; 134.8; 132.0; 127.8; 127.0; 126.3; 125.4; 123.7; 116.6; 68.1; 52.8; 21.5; 21.4; 17.5.

HRMS Obliczono dla C₂₈H₃₄N₄O₄S₂ + H: 555,2095
znaleziono: 555,2100

An. spal. Obliczono dla C₂₈H₃₄N₄O₄S₂: C-60,62; H-6,18; N-10,10; S-11,56
znaleziono: C-60,44; H-6,21; N-10,02; S-11,47

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -106$ (c=0,503, DCM)

DAA-AlaOnBu 71c



Beżowy proszek, 163 mg (28%), t.t. 165-168°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 9.95 (s, 2H, H_a), 8.68 (s, 1H, H₁₀); 8.67 (s, 1H, H₉); 8.06 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H₂); 8.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H₄); 7.60 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H_b); 7.58 – 7.50 (m, 2H, H₃); 5.00 (2H, p, $J = 7.2$ Hz, H _{α}); 4.19 – 4.05 (m, 4H, R₂); 1.67 – 1.50 (m, 4H, R₂); 1.45 – 1.24 (m, 10H, R₂); 0.89 (6H, t, $J = 7.4$ Hz, R₁)

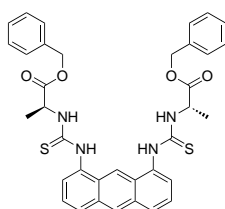
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.0; 172.6; 134.8; 132.1; 127.8; 127.1; 126.4; 125.4; 123.8; 116.7; 64.2; 52.8; 30.1; 18.6; 17.5; 13.5.

HRMS Obliczono dla C₃₀H₃₈N₄O₄S₂ + H: 583,2413
znaleziono: 583,2406

An. spal. Obliczono dla C₃₀H₃₈N₄O₄S₂: C-61,83; H-6,57; N-9,61; S-11,00
znaleziono: C-61,97; H-6,51; N-9,48; S-10,91

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -83,3$ (c=0,475, DCM)

DAA-AlaOBn 71d



Żółty proszek, 240 mg (37%), t.t. 99-101°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ : 9.93 (s, 2H, H_a); 8.68 (s, 1H, H₁₀); 8.67 (s, 1H, H₉); 8.15 (2H, d, $J = 7.3$ Hz, H₂); 8.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz, H₄); 7.56 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, H_b); 7.53 – 7.46 (m, 2H, H₃); 7.45 – 7.28 (m, 10H, R₂); 5.17 (4H, s, R₂); 5.14 – 4.95 (m, 2H, H _{α}); 1.40 (6H, d, $J = 7.2$ Hz, R₁)

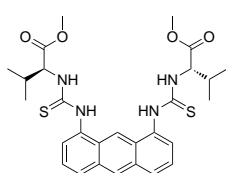
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.5; 172.9; 136.4; 135.3; 132.5; 128.9; 128.5; 128.3; 128.3; 127.5; 126.9; 125.9; 124.2; 117.1; 66.5; 53.4; 17.8

HRMS Obliczono dla $C_{36}H_{34}N_4O_4S_2 + H$: 651,2100
znaleziono: 651,2100

An. spal. Obliczono dla $C_{36}H_{34}N_4O_4S_2$: C-66,44; H-5,27; N-8,61; S-9,85
znaleziono: C-66,45; H-5,36; N-8,34; S-9,70

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -89,45$ (c=0,45; DCM)

DAA-ValOMe 71e



Żółty proszek, 250 mg (45%), t.t. 177-179°C

$^1\text{HNMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.05 (s, 2H, H_a); 8.73 (s, 1H, H_{10}); 8.68 (s, 1H, H_9); 8.08 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H_4); 7.99 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H_2); 7.80 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H_b); 7.54 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H_3); 4.95 (2H, dd, $J = 7.6; 5.3$ Hz, H_α); 3.70 (s, 6H); 2.26 – 2.15 (m, 2H); 0.98 (12H, s, $J = 6.7$ Hz)

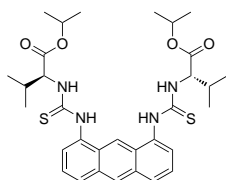
$^{13}\text{CNMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 182.7; 171.9; 134.9; 131.9; 127.5; 127.3; 125.9; 125.2; 123.4; 115.4; 62.0; 51.7; 30.6; 18.7; 18.5

HRMS Obliczono dla $C_{28}H_{34}N_4O_4S_2$: 555,2100
znaleziono: 555,2096

An. spal. Obliczono dla $C_{28}H_{34}N_4O_4S_2$: C-60,62; H-6,18; N-10,10; S-11,56
znaleziono: C-60,55; H-6,09; N-9,95; S-11,62

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -220$ (c=0,55; DCM)

DAA-ValOiPr 71f



Żółty proszek, 183 mg (30%), t.t. 200-204°C

$^1\text{HNMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.08 (s, 2H, H_a); 8.74 (s, 1H, H_{10}); 8.68 (s, 1H, H_9); 8.06 – 7.86 (m, 4H, H_2+H_4); 7.81 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H_b); 7.54 (2H, t, $J = 7.8$ Hz, H_3); 5.07 – 4.92 (m, 2H, R_2); 4.88 (2H, dd, $J = 7.7; 5.0$ Hz, H_α); 2.31 – 2.15 (m, 2H, R_1); 1.24 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, R_2); 1.23 (6H, d, $J = 6.8$ Hz, R_2); 1.00 – 0.93 (12H, m, $J = 6.7$ Hz, R_1)

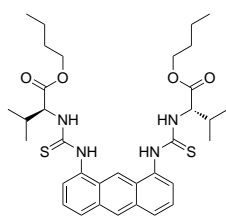
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.5; 170.7; 134.9; 131.9; 127.5; 127.3; 125.8; 125.2; 123.3; 115.4; 68.1; 61.9; 30.6; 21.6; 21.5; 18.58; 18.58

HRMS Obliczono dla C₃₂H₄₂N₄O₄S₂ + H: 611,2726
znaleziono: 611,2733

An. spal. Obliczono dla C₃₂H₄₂N₄O₄S₂: C-62,92; H-6,93; N-9,17; S-10,50
znaleziono: C-63,08; H-7,00; N-9,16; S-10,56

O.R. [α_D²⁰] = -159,5 (c=0,485; DCM)

DAA-ValOnBu 71g



Żółty proszek, 185 mg (29%), t.t. 173-175°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.07 (s, 2H, H_a); 8.73 (s, 1H, H₁₀); 8.68 (s, 1H, H₉); 8.07 – 7.92 (m, 4H, H₂+H₄); 7.80 (2H, d, J = 7.1 Hz, H_b); 7.54 (2H, t, J = 7.8 Hz, H₃); 4.93 (2H, dd, J = 7.8; 5.2 Hz, H_α); 4.29 – 3.90 (m, 4H, R₂); 2.27 – 2.14 (m, 2H, R₁); 1.74 – 1.52 (m, 4H, R₂); 1.41 – 1.32 (m, 4H, R₂); 0.97 (12H, d, J = 6.9 Hz, R₁); 0.90 (6H, t, J = 7.4 Hz, R₂)

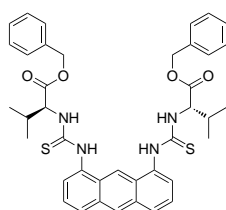
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.6; 171.3; 134.8; 131.9; 127.5; 127.3; 125.8; 125.2; 123.3; 115.4; 64.1; 62.0; 30.6; 30.1; 18.7; 18.6; 18.4; 13.4

HRMS Obliczono dla C₃₄H₄₆N₄O₄S₂ + H: 639,3027
znaleziono: 639,3050

An. spal. Obliczono dla C₃₄H₄₆N₄O₄S₂: c-63,92; H-7,26; N-8,77; S-10,04
znaleziono: C-63,65; H-7,06; N-8,68; S-10,15

O.R. [α_D²⁰] = -172,0 (c=0,62; DCM)

DAA-ValOBn 71h



Żółty proszek, 148 mg (21%), t.t. 153-156°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.08 (s, 2H, H_a); 8.73 (s, 1H, H₁₀); 8.68 (s, 1H, H₉); 8.08 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H₂); 7.99 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H₄); 7.79 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H_b); 7.63 – 7.48 (m, 2H, H₃); 7.48 – 7.30 (m, 10H, R₂); 5.22 (2H, d, *J* = 12.4 Hz, R₂); 5.17 (2H, d, *J* = 12.4 Hz, R₂); 4.98 (2H, dd, *J* = 7.7; 5.2 Hz, H_α); 2.27 – 2.15 (m, 2H, R₁); 0.96 (6H, d, *J* = 7.1 Hz, R₁); 0.94 (6H, d, *J* = 7.1 Hz, R₁)

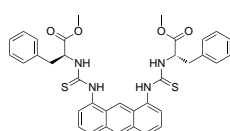
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.7; 171.2; 135.8; 134.8; 131.9; 128.4; 128.09; 128.05; 127.5; 127.3; 127.1; 125.8; 125.2; 123.3; 115.5; 66.0; 62.1; 30.6; 18.7; 18.4

HRMS Obliczono dla C₄₀H₄₂N₄O₄S₂ + H: 707,2726
znaleziono: 707,2706

An. spal. Obliczono dla C₄₀H₄₂N₄O₄S₂: C-67,96; H-5,99; N-7,93; S-9,07
znaleziono: C-67,90; H-6,07; N-7,92; S-9,05

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -141$ (c=0,5; DCM)

DAA-PheOMe 71i



Żółty proszek, 292 mg (45%), t.t. 107-110°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.05 (s, 2H, H_a); 8.71 (s, 1H, H₁₀); 8.70 (s, 1H, H₉); 8.02 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H₂); 7.89 (2H, d, *J* = 7.7 Hz, H_b); 7.57 – 7.45 (m, 2H, R₁); 7.41 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H₄); 7.37 – 7.08 (m, 10H, H₃+R₁); 5.60 – 4.90 (m, 2H, H_α); 3.69(s, 6H, R₂); 3.17 – 3.08 (m, 4H, R₁)

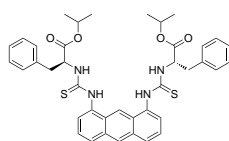
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.1; 171.7; 136.5; 134.6; 132.1; 129.2; 128.3; 127.8; 127.2; 126.6; 126.5; 125.4; 123.8; 116.5; 58.3; 51.9; 37.1

HRMS Obliczono dla C₃₆H₃₄N₄O₄S₂ + H: 651,2100
znaleziono: 651,2087

An. spal. Obliczono dla C₃₆H₃₄N₄O₄S₂: C-66,44; H-5,27; N-8,61; S-9,85
znaleziono: C-66,49; H-5,54; N-8,35; S-9,75

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -168,3$ (c=0,485; DCM)

DAA-PheOiPr 71j



Żółty proszek, 177 mg (25%), t.t. 101-103°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.07 (s, 2H, H_a); 8.73 (s, 1H, H₁₀); 8.70 (s, 1H, H₉); 8.03 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, H₂); 7.80 (2H, d, *J* = 7.9 Hz, H₄); 7.55 – 7.47 (m, 4H, H₄+R₁); 7.40 – 7.09 (m, 10H, H₃+R₁); 5.25 – 5.17 (m, 2H, R₂); 4.96 – 4.75 (m, 2H, H_α); 3.17 (2H, dd, *J* = 13.5; 5.9 Hz, R₁); 3.09 (2H, dd, *J* = 13.5; 7.1 Hz, R₁); 1.13 (6H, d, *J* = 6.2 Hz, R₂); 1.05 (6H, d, *J* = 6.2 Hz, R₂)

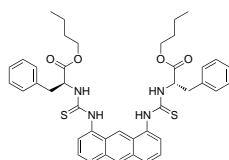
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 181.9; 170.6; 136.5; 134.6; 132.1; 129.2; 128.3; 127.8; 127.2; 126.6; 126.5; 125.4; 123.8; 116.5; 68.3; 58.2; 37.2; 21.4; 21.3

HRMS Obliczono dla C₄₀H₄₂N₄O₄S₂ + H: 707,2726
znaleziono: 707,2726

An. spal. Obliczono dla C₄₀H₄₂N₄O₄S₂: C-67,96; H-5,99; N-7,93; S-9,07
znaleziono: C-67,74; C-6,17; N-7,83; S-9,16

O.R. [α_D²⁰] = -129,3 (c=0,55; DCM)

DAA-PheOnBu 71k



Żółty proszek, 257 mg (35%), t.t. 71-75°C

¹HNMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ: 10.07 (s, 2H, H_a); 8.72 (s, 1H, H₁₀); 8.70 (s, 1H, H₉); 8.03 (2H, d, *J* = 8.5 Hz, H₂); 7.82 (2H, d, *J* = 7.6 Hz, H₄); 7.56 – 7.48 (m, 2H, R₁); 7.45 (2H, d, *J* = 7.0 Hz, H_b); 7.30 – 7.17 (m, 6H, R₁); 7.13 (4H, m, H₃+R₁); 5.30 – 5.23 (m, 2H, H_α); 4.04 – 3.92 (m, 4H, R₂); 3.16 (2H, dd, *J* = 13.8; 6.2 Hz, R₁); 3.09 (2H, dd, *J* = 13.6; 6.9 Hz, R₁); 1.49 – 1.40 (m, 4H, R₂); 1.25 – 1.16 (m, 4H, R₂); 0.82 (6H, t, *J* = 7.4 Hz, R₂)

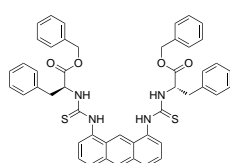
¹³CNMR (126 MHz, DMSO-d₆) δ 182.4; 171.7; 136.9; 135.1; 132.5; 129.6; 128.7; 128.2; 127.7; 127.1; 127.0; 125.8; 124.3; 117.0; 64.8; 58.8; 37.7; 30.4; 18.9; 14.0

HRMS Obliczono dla C₃₅H₅₀N₄O₄S₂ + H: 735,3039
znaleziono: 735,3034

An. spal. Obliczono dla $C_{35}H_{50}N_4O_4S_2$: C-68,64; H-6,31; N-7,62; S-8,73
znaleziono: C-68,45; H-6,50; N-7,54; S-8,80

O.R. $[\alpha_D^{20}] = 136,9$ (c=0,55; DCM)

DAA-PheOBn 71l



Żółty proszek, 297 mg (37%), t.t. 99-101°C

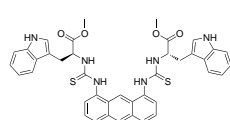
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.05 (s, 2H, H_a); 8.71 (s, 1H, H_{10}); 8.70 (s, 1H, H_9); 8.02 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H_2); 7.89 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H_b); 7.57 – 7.45 (m, 2H, R_1); 7.41 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H_4); 7.37 – 7.08 (m, 10H, H_3+R_1); 5.22 (2H, d, $J = 12.4$ Hz, R_2); 5.17 (2H, d, $J = 12.4$ Hz, R_2); 5.10 – 4.90 (m, 2H, H_α); 3.69 (s, 6H, R_2); 3.17 – 3.08 (m, 4H, R_1)

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO- d_6) δ 181.8; 171.6; 137.7; 137.1; 135.6; 135.4; 129.4; 129.1; 128.3; 128.2; 127.2; 124.6; 123.4; 120.4; 119.7; 116.2; 66.7; 55.8; 37.6

HRMS Obliczono dla $C_{48}H_{42}N_4O_4S_2 + H$: 803,2726
znaleziono: 803,2715

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -149,8$ (c=0,46; DCM)

DAA-TrpOMe 71m



Żółty proszek, 240 mg (37%), t.t. 154-157°C

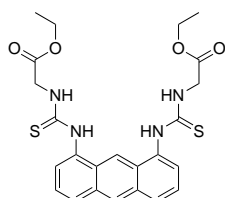
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 10.87 (s, 2H, H_a); 10.07 (s, 2H, R_1); 8.74 (s, 1H, H_{10}); 8.68 (s, 1H, H_9); 8.00 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H_b); 7.84 (2H, d, $J = 6.5$ Hz, H_4); 7.53 – 7.40 (m, 6H, R_1+H_3); 7.34 (2H, d, $J = 8.0$ Hz); 7.12 – 6.98 (m, 4H, R_1); 6.93 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, R_1); 5.37 – 5.28 (m, 2H, α); 3.31 (s, 4H, R_1)

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO- d_6) δ 181.9; 172.1; 136.0; 134.7; 132.0; 127.7; 127.2; 127.1; 126.3; 125.3; 123.9; 123.6; 121.0; 118.4; 118.1; 116.4; 111.4; 108.6; 57.8; 51.9; 27.2

HRMS Obliczono dla $C_{40}H_{36}N_6O_4S_2 + H$: 729,2318
znaleziono: 729,2315

An. spal. Obliczono dla $C_{40}H_{36}N_6O_4S_2$: C-65,91; H-4,98; N-11,53; S-8,80
znaleziono: C-65,00; H-5,15; N-11,14; S-8,63

DAA-GlyOEt 71n



Żółty proszek, 198 mg (40%), t.t. 160-162°C

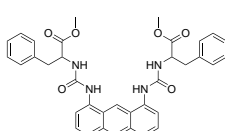
$^1\text{HNMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.04 (s, 2H, H_a); 8.73 (s, 1H, H_{10}); 8.69 (s, 1H, H_9); 8.04 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, H_2); 8.00 (2H, t, $J = 5.2$ Hz, H_b); 7.64 – 7.44 (m, 4H, H_3+H_4); 4.30 (4H, d, $J = 5.3$ Hz, α); 4.15 (4H, q, $J = 7.0$ Hz); 1.23 (6H, t, $J = 7.0$ Hz)

$^{13}\text{CNMR}$ (126 MHz, DMSO-d_6) δ 182.6; 169.7; 134.6; 132.1; 127.8; 127.0; 126.6; 125.5; 123.9; 116.9; 60.4; 46.0; 14.0

HRMS Obliczono dla $C_{24}H_{26}N_4O_4S_2 + H$: 499,1474
znaleziono: 499,1470

An. spal. Obliczono dla $C_{24}H_{26}N_4O_4S_2$: C-57,81; H-5,26; N-11,24; S-12,86
znaleziono: C-57,50; H-5,32; N-11,03; S-12,70

Tlenowy analog: DAA-O-PheOMe 98



Izocyjanian otrzymałem z chlorowodoru estru metylowego fenyloalaniny jak w procedurze dla receptorów DAB (str. 165). Otrzymany izocyjanian (850 mg, 4,14 mmol) zmieszałem z diamina **68** (208 mg, 1mmol) w odtlenowanym DCM (50 mL). Po ok. 2h, mieszaninę reakcyjną poddałem bezpośrednio oczyszczaniu chromatograficznemu, docelowy związek wymyłem 10% acetonem w DCM. Krystalizowałem z układu DCM-heksan. Pomarańczowy proszek, wyd 435 mg (70%), t.t. 183-186°C.

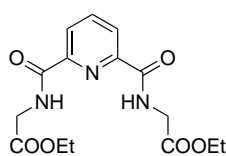
$^1\text{HNMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ : 10.54 (s, 2H, H_a); 8,90 (2H, d, $J = 7.7$ Hz, H_b); 8.74 (s, 1H, H_{10}); 8.73 (s, 1H, H_9); 8.15 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H_2); 7.57 – 7.45 (m, 2H, R_1); 7.52 (2H, d, $J = 7.0$ Hz, H_4); 7.37 – 7.08 (m, 10H, H_3+R_1); 5.60 – 4.90 (m, 2H, H_α); 3.69(s, 6H, R_2); 3.17 – 3.08 (m, 4H, R_1)

$^{13}\text{CNMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) δ 179.8; 171.6; 137.7; 137.1; 135.6; 135.4; 129.4; 129.1; 128.3; 128.2; 127.2; 124.6; 123.4; 120.4; 119.7; 116.2; 66.7; 55.8; 37.6.

An. spal. Obliczono dla C₃₆H₃₄N₄O₆: C-69.89; H-5.54; N-9.06; O-15.52
znaleziono: C-68,20; H-5,80; N-8,56

O.R. $[\alpha_D^{20}] = -13,5$ (c=0,56; DCM)

N,N'-bis-(etoksykarbonylometylo)amid kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowego, 130



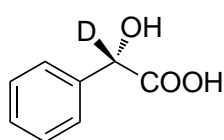
Dichlorek kwasu pirydyno-2,6-dikarboksylowego (612 mg, 3 mmol) rozpuściłem w suchym DCM (30 mL) pod argonem, schłodziłem do 0°C, dodałem DIPEA (2,5 mL, 15 mmol) i chlorowodorek estru etylowego glicyny (1,1 g, 8 mmol). Mieszaninę doprowadziłem do t.pok. i mieszałem przez 2h. Mieszaninę zatężyłem na wyparce do ok 1/3 objętości, dodałem octan etylu (50 mL). Fazę organiczną przemyłem 10% NaHSO₄ (2x50 mL), 10% NaHCO₃ (2x50 mL) i solanką (30 mL), następnie wysuszyłem nad MgSO₄. Roztwór zatężyłem na wyparce. Produkt suszyłem w eksykatorze próżniowym. Białe kryształy, 850 mg (77%)

¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.75 (2H, t, *J* = 6.2 Hz, NH); 8.40 – 8.05 (m, 3H, Ar); 4.38 – 3.90 (m, 8H, H_{alpha}+R₂); 1.22 (6H, t, *J* = 7.1 Hz, CH₃).

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 169.7; 163.7; 148.1; 139.8; 124.6; 60.7; 41.0; 14.1

5.1.6 Syntezy związków znakowanych deuterem

kwask (S)-2-fenyl-2-hydroksy(2-²H)octowy 131

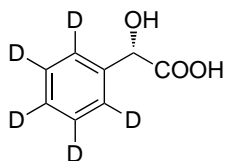


Do D₂O (15 mL) dodałem NaOH (2 g, 50 mmol) i kwas (R/S)-migdałowy (5 g, 32,9 mmol). Klarowny roztwór przenieśliem do naczynia Schlenka i ogrzewałem w 120 °C przez 20 h. Po ostudzeniu do t.pok. roztwór zakwasiłem stęż. HCl do pH~ 3 i ekstrahowałem octanem etylu (3x30 mL). Połączone fazy organiczne wysuszyłem MgSO₄ i zączyłem. Surowy produkt krystalizowałem z chloroformu. Otrzymałem 2,86g (56%) kwasu o stopniu deuterowania 87%. Znakowany racemiczny kwas (2,68 g, 17,5 mmol) zmieszałem z równomolową ilością (S)-1-fenyl-2-etyloaminy (PEA, **104**) (2,2 mL, 17,5 mmol), powstała biała sól rozpuściłem we wrzącym etanolu (16 mL). Po ostudzeniu do 4 °C odsączyłem białe kryształy, które przemyłem zimnym etanolem (2 mL), po wysuszeniu otrzymałem 2,23g (46,5%) soli, w której migdalan miał ee=55% (analiza GC po przekształceniu w ester izopropylowy¹¹⁸), po powtórzeniu krystalizacji (7,5 mL EtOH) otrzymałem 1,20g soli (25%), ee migdalanu wynosiło 87%. Sól zawiesiłem w octanie etylu (10 mL) i wytrząsałem i z 10% NaHSO₄ 20 mL, fazę organiczną zawierającą kwas migdałowy wysuszyłem nad MgSO₄ i zączyłem. Wydzielony kwas migdałowy (650 mg) krystalizowałem z dichloroetanu (5mL), otrzymałem 450 mg kwasu migdałowego (wyd. kryst: 70%) o ee=96,5%; stopień deuterowania 87%. Całkowita wydajność syntezy to 9%.

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 174,26; 140,29; 128,24; 127,77; 126,75; 72,14 (t_D, J=22,3Hz, C_α)

(²H₅)-Fenylglioksalan etylu, **106** otrzymałem zgodnie z przepisem literaturowym¹²⁰.

Kwas (*S*)-pentadeuteromigdałowy, **109**



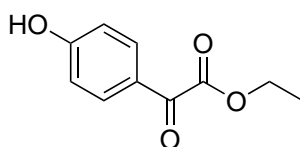
Otrzymałem zgodnie z przepisem literaturowym¹²¹. Ester **106** (2,0 g, 10,9 mmol) rozpuściłem w suchym THF (10 mL) w naczyniu Schlenka pod argonem i schłodziłem do -78°C , po czym dodałem (+)-(IPC)₂BCl (**107**, 1,7 M w heksanie, 7 mL, 12 mmol). Po trzech godzinach mieszania w temp. -78°C , ogrzałem do t.pok. Dodałem octan etylu (30 mL) i fazę organiczną przemyłem 10% NaHSO₄ (20 mL), 10% NaHCO₃ (20 mL) i solanką (20 mL). Fazę organiczną wysuszyłem nad MgSO₄ i odpawo-
wałem na wyparce. Produkt poddałem chromatografii heksan:octan etylu 8:2 - 5:5. Zebrane frakcje zawierające produkt były zanieczyszczone pochodnymi reduktora. Zanieczyszczony ester rozpuściłem w etanolu (20 mL) i dodałem wodny roztwór NaOH (1,2 g, 30 mmol w 10 mL wody). Po ok. 2h mieszania dodałem wody (30 mL), fazę wodną przemyłem dichlorometanem (2x20 mL), następnie fazę wodną zakwaśiłem stężonym HCl do pH~ 3. Wytrącony biały osad odsączyłem i wysuszyłem w eksykatorze próżniowym. Wyd. 940 mg (55%), ee=89%. Kwas ten krystalizowałem z dichloroetanu, otrzymałem 850 mg kwasu o ee>99% i stopniu deuteracji 98%

¹³CNMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 174.8; 140.7; 128.3 (t_D, $J=24,2$ Hz); 127.8 (t_D, $J=22,9$ Hz); 126.9 (t_D, $J=24,5$ Hz); 73.0.

Acetylowanie D-fenylalaniny deuterowanym chlorkiem acetylu (CD₃COCl) przeprowadziłem wg. przepisu literaturowego¹³³, produkt krystalizowałem z acetonu, bezbarwne kryształy, t.t. 171-172°C.

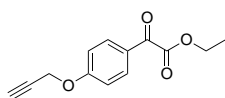
5.1.7 Syntezy związków do immobilizacji na fazie stacjonarnej i modyfikacje powierzchni faz stacjonarnych

2-(4-hydroksyfenylo)-2-oksooctan etylu (**119**) otrzymałem zgodnie z przepisem literaturowym¹³⁴.



119

2-(4-propargiloksyfenlo)-2-oksooctan etylu, 121



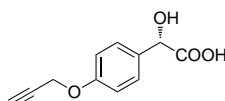
Fenol (**119**) (3,92 g, 20 mmol) rozpuściłem w DMF (60 mL), dodałem świeżo destylowanego bromku propargilu (2,8 mL, 25 mmol) i K_2CO_3 (5,5 g, 40 mmol), mieszałem intensywnie przez 16h w t.pok. Następnie załączyłem na wyparce, dodałem octanu etylu (100 mL), fazę organiczną przemyłem wodą (3x100 mL), wysuszyłem nad $MgSO_4$ i załączyłem na wyparce, otrzymany olej suszyłem pod wysoką próżnią. Pomiaranicyowy olej, wyd: 4,9g (98%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,01 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); 7,05 (2H, d, $J = 8,5$ Hz); 4,77 (2H, d, $J = 1,5$ Hz); 4,42 (2H, q, $J = 7,1$ Hz); 2,57 (1H, t, $J = 1,9$ Hz); 1,41 (3H, t, $J = 7,1$ Hz).

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 184,7; 163,9; 162,7; 132,4; 126,1; 115,0; 77,3; 76,5; 62,2; 55,9; 14,1.

An. spal. Obliczono dla $C_{13}H_{12}O_4$: C-67,23; H-5,21
znaleziono: C-67,68; H-6,01

(kwas S)-2-(4-propargiloksyfenlo)-2-hydroksyoctowy, (117)



Procedura analogiczna jak dla **109**. Do reakcji wziąłem ketoester **121** (1,37 g, 5,9 mmol), po dwóch etapach otrzymałem hydroksy kwas (S)-**117** z wydajnością 510 mg (42%) o czystości optycznej ee=87%

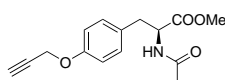
1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 8,19 (s, 1H); 7,34 (2H, d, $J = 8,3$ Hz); 6,95 (2H, d, $J = 8,3$ Hz); 4,94 (s, 1H); 4,78 (s, 2H); 3,53 (s, 1H),

^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 174,5; 156,7; 133,5; 127,9; 114,5; 79,4; 78,2; 72,1; 55,4

An. spal. Obliczono dla $C_{11}H_{10}O_4$: C-64,07; H-4,89
znaleziono: C-64,22; H-5,05

AcTyrOMe (**123**), otrzymałem na drodze acetylowania chlorowodoru estru metylowego tyrozyny¹³⁵

(2S)-2-acetloamino-3-(4-propargiloksyfenlo)propionian metylu, Ac-I-Tyr(Propargil)OMe, 124



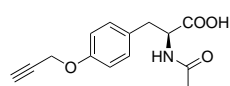
Procedura analogiczna do otrzymywania **121**. Z fenolu **123** (2,06 g, 8,71 mmol) otrzymałem związek **124** w postaci brunatnych kryształów z wydajnością 2,12 g (90%), t.t. 78-80°C

¹HNMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 7,01 (1H, d, *J* = 8,7 Hz); 6,89 (1H, d, *J* = 8,7 Hz); 5,95 (1H, d, *J* = 7,2 Hz); 4,84 (1H, dt, *J* = 7,8; 5,7 Hz); 4,66 (1H, d, *J* = 2,4 Hz); 3,72 (s, 2H); 3,09 (1H, dd, *J* = 14,0; 5,8 Hz); 3,03 (1H, dd, *J* = 14,0; 5,6 Hz); 2,52 (1H, t, *J* = 2,4 Hz); 1,98 (s, 2H)

¹³CNMR (125 MHz, CDCl₃) δ 172,1; 169,6; 156,7; 130,2; 128,7; 114,9; 78,5; 75,5; 55,8; 53,1; 52,3; 36,9; 23,1

An. spal. Obliczono dla C₁₅H₁₇NO₄: C-65,44; H-6,22; N-5,09
znaleziono: C-65,15; H-6,15; N-5,16

**kwas (2S)-2-acetloamino-3-(4-propargiloksyfenylo)proanowy,
Ac-l-Tyr(Propargil)OH, 132**



Ester **124** (1,98 g, 7,28 mmol) rozpuściłem w mieszaninie metanol:woda 3:1 (40 mL) i dodałem wodorotlenek litu (LiOH·H₂O, 640 mg, 15,2 mmol). Po dwóch godzinach mieszania w t.pok., zateżyłem mieszaninę do usunięcia metanolu, następnie zakwasiłem 2 M HCl do pH ~ 3, wytrącony kwas ekstrahowałem do octanu etylu (20 mL). Fazę organiczną po oddzieleniu od wodnej wysuszyłem nad MgSO₄ i zateżyłem. Uzyskany olej suszyłem pod wysoką próżnią, aż wykrystalizował po 4h. Otrzymałem szary proszek, wyd: 1,69 g (90%), t.t. 143-145°C.

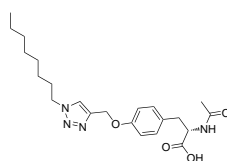
¹HNMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 12.63 (s, 1H); 8.17 (1H, d, *J* = 8.0 Hz); 7.16 (2H, d, *J* = 8.4 Hz); 6.90 (2H, t, *J* = 10.0 Hz); 4.75 (2H, d, *J* = 2.2 Hz); 4.40 – 4.29 (m, 1H); 3.54 (1H, t, *J* = 2.2 Hz); 2.97 (1H, dd, *J* = 13.9; 4.8 Hz); 2.77 (1H, dd, *J* = 13.8; 9.5 Hz); 1.78 (3H, s, *J* = 9.6 Hz)

¹³CNMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ 173.3; 169.3; 155.9; 130.4; 130.1; 114.5; 79.5; 78.2; 55.3; 53.7; 36.0; 22.4

An. spal. Obliczono dla C₁₄H₁₅NO₄: C-64,36; H-5,79; N-5,36
znaleziono: C-64,02; H-5,82; N-5,30

Azydek oktylu (**126**) otrzymałem wg literaturowej procedury¹³⁶

Modelowa reakcji „click”: 132 + 126



Alkin **132** (80 mg, 0,30 mmol) i azydek **126** (47 mg, 0,30 mmol) rozpuściłem w DMF (5 mL) i dodałem CuSO₄ (CuSO₄·5 H₂O, 7,5 mg, 0,03 mmol) i askorbinian sodu (9 mg, 0,045 mmol). Po 4h mieszania w t.pok. mieszaninę zateżyłem na wyparce z pompą olejową. Otrzymałem produkt zanieczyszczony katalizatorem bez śladów substratów

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ: 8,20 (s, 1H); 8,17 (1H, d, *J* = 8,1 Hz); 7,15 (2H, d, *J* = 8,4 Hz); 6,93 (2H, d, *J* = 8,5 Hz); 5,08 (s, 2H); 4,50 – 4,20 (m, 3H); 2,97 (1H, dd, *J* = 13,8; 4,8 Hz); 2,77 (1H, dd, *J* = 13,8; 8,4 Hz); 1,84 – 1,75 (m, 5H); 1,41 – 1,14 (m, 10H); 0,84 (3H, t, *J* = 6,7 Hz)

¹³C NMR (100 MHz, 173,3; 169,3; 162,4; 156,8; 142,7; 130,1; 130,0; 124,4; 114,4; 61,1; 53,8; 49,4; 36,0; 35,8; 31,2; 30,8; 29,8; 28,6; 28,4; 25,9; 22,4; 22,1; 14,0) δ

5.2 Miareczkowania

5.2.1 Procedura przygotowania roztworów i analiza niepewności

Jak pokazałem w rozdziale 2.3.2.1 stała *K* wyznaczona za pomocą miareczkowania jest bardzo wrażliwa na wiele potencjalnych rodzajów błędów. Nawet przy optymalnie dobranych stężeniach i prostym modelu wiązania niepewność wyznaczonej stałej zależy od wielu czynności związanych z przygotowaniem próbki. Świadomość potencjalnych źródeł błędów pomogła mi zoptymalizować procedurę przygotowania roztworów oraz oszacować niepewność pomiaru. Obok zoptymalizowanej przeze mnie procedury dla miareczkowań pod kontrolą UV-Vis, przedstawiłem procedurę stosowaną w Zespole dla miareczkowań NMR. Sposób przeprowadzanie część etapów dla miareczkowań NMR wynikała z konieczności oszczędnego używania rozpuszczalników deuterowanych.

Naważki przygotowywałem na wadze Metler Toledo XS205 zapewniająca odczyt masy z dokładnością 0,01 mg. Masę pustych naczyń (tara), oraz naczyń z naważką (brutto) wyznaczałem przynajmniej dwukrotnie, aż do uzyskania spójnych wyników ($\Delta m < 0,05 \text{ mg}$) Niepewność pomiaru masy oceniłem na 0,05 mg. Przy naważkach przekraczających 5 mg względny błąd wynosił <1%. Uznałem, że większy błąd może wynikać z czystości użytych związków. Dla receptorów oszacowałem błąd wynikający z obecności zanieczyszczeń na 2% i uwzględniłem go w tabeli w pozycji M_H . Sole TBA używane jako G są bardzo higroskopijne, dlatego ich odważanie obarczone jest większym błędem. Jakkolwiek w Zespole staramy się przenosić porcję soli możliwie szybko z zaargonowanego słoika do zakręcanej fiolki to jednak kontakt z powietrzem jest nieunikniony i błąd wynikający z pochłoniętej wody oszacowałem na 0,2 mg przy typowej naważce 20-30mg. Bardziej istotny wydaje mi się problem czystości soli TBA – zawartości wody. Dokładne dosuszenie soli jest bardzo trudne, praktycznie niemożliwe jest także utrzymywanie stałej zawartości wody. Błąd wynikający z tego faktu oszacowałem na 5% i zawarłem w M_G dla miareczkowania NMR. Mając na uwadze, że higroskopijne właściwości soli TBA są jedną z głównych przyczyn dużej niepewności w stężeniu przygotowanego roztworu zdecydowałem zastosować w swoich miareczkowaniach odmienne podejście. Przygotowywałem naważki nie soli, lecz odpowiedniego kwasów (migdałowego lub AcPheOH), które są substancjami trwymi, krystalicznymi i niehigroskopijnymi. Następnie naważkę rozpuszczałem w ok 1 mL metanolu i dodawałem stechiometryczną ilość wodorotlenku TBA. Wodorotlenek TBA jest dostępny handlowo w postaci 1,0 mol dm⁻³ roztworu w metanolu. Alkacymetryczne miareczkowania, które przeprowadziłem dla dwóch butelek odczynnika pocho-

dzających z różnych dostaw dały rzeczywiste stężenia odczynnika wynoszące $(0,946 \pm 0,016)$ mol dm⁻³ i $(1,064 \pm 0,015)$ mol dm⁻³. Niepewność stężenia TBAOH (1,5%) zawarłem w niepewności masy molarowej G. Po dodaniu TBAOH roztwór zatężyłem i suszyłem pod wysoką próżnią w 40 °C. Następnie przenieśliem ilościowo wyflukując acetonitrylem do kolby miarowej, $(25,00 \pm 0,04)$ mL. Przy miareczkowaniach NMR, do naważek H i G odpowiednią objętość rozpuszczalnika deuterowanego dodawałem strzywką 1 mL z podziałką 0,01 mL. O ile roztwór H jest dosyć rozcieńczony i przyjmowałem, że obojętość roztworu jest równa objętości rozpuszczalnika, tak dla roztworu G to uproszczenie nie jest zasadne. Przy dużym stężeniu cząstkowa objętość molowa G ma znaczenia – finalna objętość roztworu jest większa od objętość rozpuszczalnika. Błąd wynikający z tego zjawiska oszacowałem na ok. 30 μL przy rozpuszczaniu 50 mg G w 300 μL rozpuszczalnika. Bardzo rozcieńczone roztwory H do miareczkowań UV-Vis przygotowałem dwuetapowo. Naważkę H rozpuściłem w koblce miarowej $(5,00 \pm 0,02)$ mL (V_1), porcję pobrałem pipetą automatyczną (zwykle ok. 200 μL, błąd <0,5%, V_2) i rozcieńczyłem w kolbie miarowej $(25,00 \pm 0,04)$ mL (V_3). Roztwory H przenosiłem do probówek NMR za pomocą strzykawki 1 mL, zaś objętości roztworów H w kuwecie wyznaczałem na podstawie ważenia – przy ok. 2 g roztworu błąd ważenia wynoszący 1 mg jest nieistotny. Ostatecznie podczas miareczkowania NMR porcje titranta dodawałem ręcznie strzykawkami Hamilton o obj. 25 i 100 μL; dokładność dozowania objętości strzykawką 25 μL wynosi ok 0,3 μL. Miareczkowania pod kontrolą UV-Vis prowadziłem z zastosowaniem pompy strzykawkowej, której dokładność przesuwu tłoka G wynosi 0,5 nL (błąd ~ 0,01% dla porcji 5 μL), większy błąd wynika z dokładności wykonania strzykawki, który producent określa na $\leq 1\%$ ¹³⁷.

Podsumowaniem powyższych szczegółów praktycznej strony przygotowania roztworów jest niepewność molowego stosunku reagentów w roztworze w dowolnym punkcie miareczkowania – ostatni wiersz Tabeli. Z przeprowadzonej przeze mnie analizy wynika, że niepewność tego stosunku dla miareczkowań NMR może sięgać nawet 11%. Zoptymalizowana procedura dla miareczkowań UV-Vis pozwala osiągnąć niepewność <3%. Jak wynika z Wykresu 2.7 (str. 36) dla odpowiednio niskich stężeń reagentów ($K \cdot [H]_0 < 1$) błąd w stężeniach przekłada się na taki sam błąd w wyznaczonej stałej. Oznacza to, że miareczkowania NMR prowadzone wg. powyższej procedury cechuje minimalna niepewność na poziomie 10%, która może być większa w zależności od jakości zebranych danych.

Trzeba jednak zaznaczyć, że jeżeli dwa miareczkowania prowadzone są z wykorzystaniem tego samego roztworu, wówczas część opisanych błędów znosi się. Z tego powodu wszystkie pary miareczkowań służące do wyznaczenia selektywności prowadziłem z wykorzystaniem tego samego roztworu receptora, jedno po drugim.

5.2.2 Miareczkowania UV-Vis

Sposób przygotowania roztworów przedstawiłem powyżej. Do pomiarów użyłem acetonitrylu jakości HPLC o zawartości wody <0,2%. Miareczkowania prowadziłem w sposób zautomatyzowany, porcję roztworu soli TBA dodawałem do roztworu receptora za pomocą pompy strzykawkowej w 30 krokach. Pomiar widm UV-Vis rozpoczynałem po wymieszaniu roztworu, tj. 15 s od zakończenia dodawania porcji titranta. Dla receptorów DAB mierzyłem widmo w zakresie 240-300 nm, z krokiem co 2 nm przy uśrednianiu 0,5 s na jedną długość fali. Dla receptorów DAA obserwowałem zakres 340-440 nm, z kro-

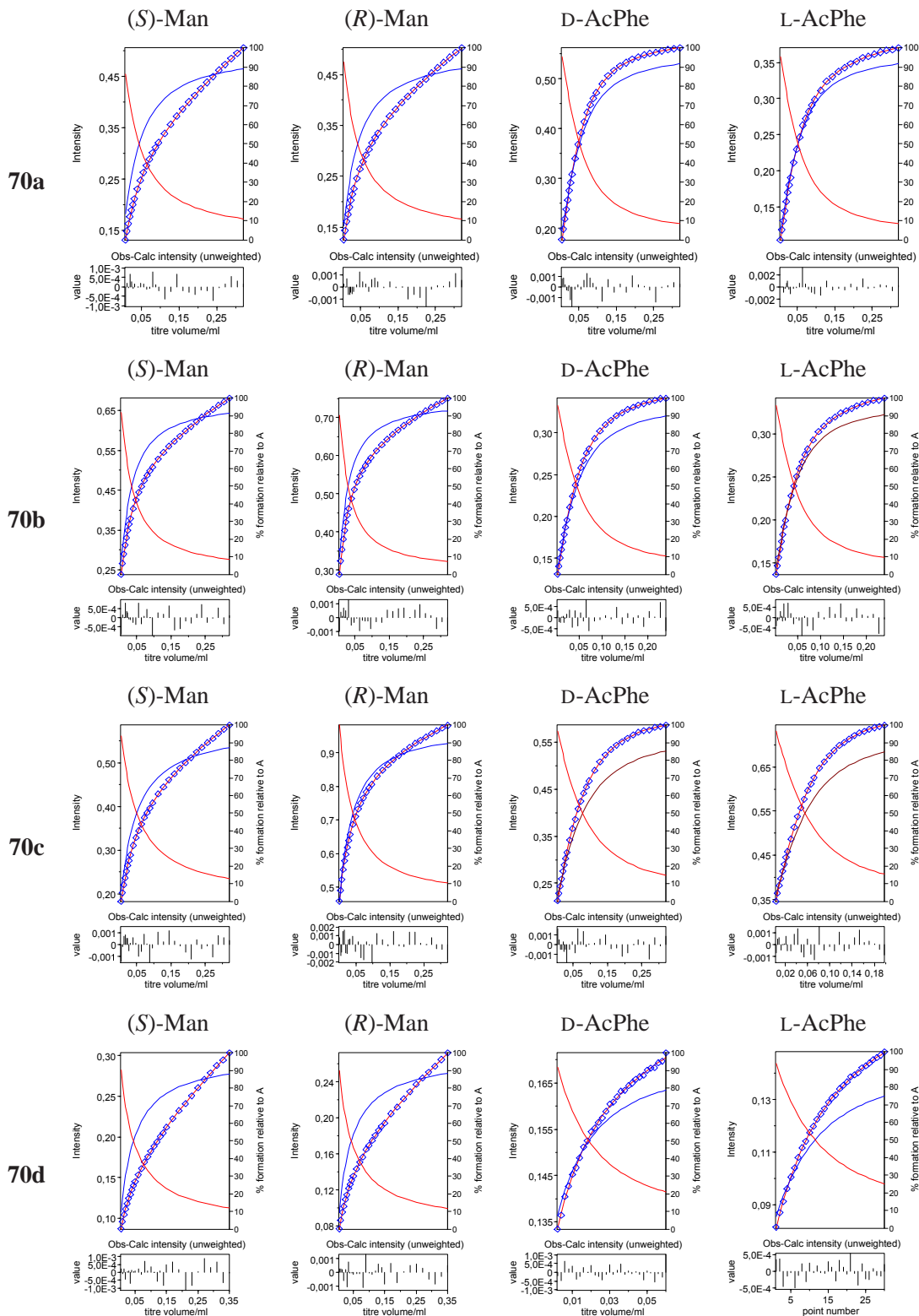
Tabela 5.1: Zestawienie źródeł błędów na poszczególnych etapach przygotowania roztworów do miareczkowania oraz wpływ tych błędów na określenie molowych stosunków reagentów podczas miareczkowania

		Miareczkowanie NMR		Miareczkowanie UV-Vis	
Roztwór H	m_H	10±0,05	mg	10±0,05	mg
	M_H	500±10	g/mol	500±10	g/mol
	V_1	2,5±0,03	mL	5±0,02	mL
	V_2	-		250±0,5	μL
	V_3	-		25±0,04	mL
	V_{pom}	0,5±0,01	mL	2±0,001	mL
Roztwór G	m_G	40±0,2	mg	38±0,03	mg
	M_G	400±20	g/mol	152±2	g/mol
	V_1	0,4±0,03	mL	25±0,04	mL
	Porcja titr.	5±0,3	μL	5±0,001	μL
Wielkości pochodne	c_H	8,00±2,4%	mmol/L	40±2,1%	μmol/L
	c_G	0,25±9,0%	mol/L	10±1,3%	nmol/L
	n_H	4,0±3,1%	μmol	80±2,1%	nmol
	n_G	1,25±11%	μmol	50±1,3%	nmol
	n_G/n_H	0,31±11%		0,63±2,5%	

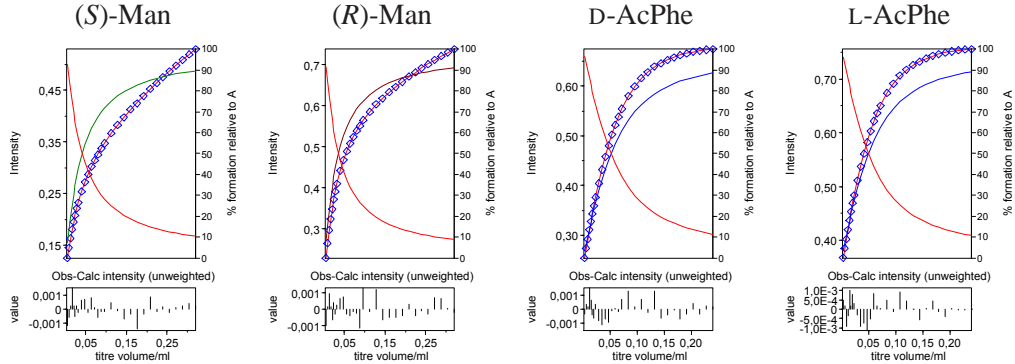
m_H , m_G - naważki H i G; V_1 - objętość, w której rozpuszczałem naważkę H lub G; V_2 objętość roztworu pobrana do rozcieńczenia do objętości V_3 ; V_{pom} - objętość roztworu przeniesiona do naczynia pomiarowego (kuwety lub próbówki); V_{titr} objętość porcji titranta.

kiem 2,5 nm i uśrednianiem 0,4 s. Stężenia i objętości titranta zostały dobrane aby zapewnić stopień skompleksowania na koniec miareczkowania $p = 0,7 - 0,90$. Dla receptorów DAB miareczkowanych migdalanem nie obserwowałem poziomego plateau, ponieważ anion migdalanu wykazuje absorpcję w mierzonym zakresie.

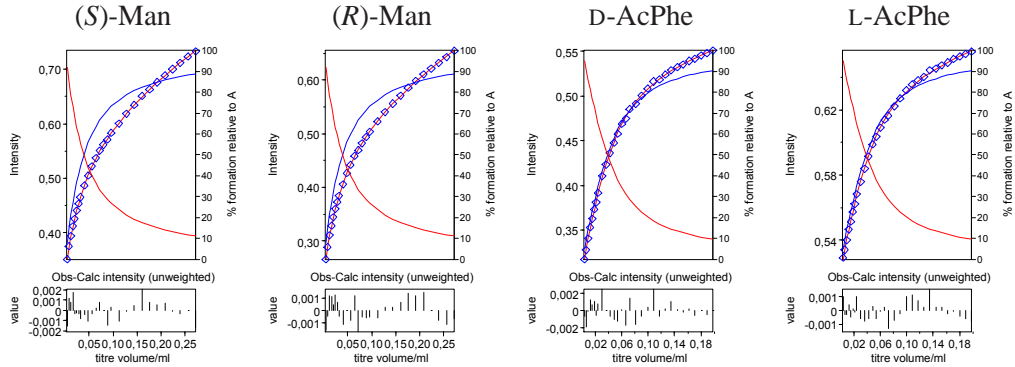
Na poniższych wykresach przeprowadzonych miareczkowań zaznaczone są punkty doświadczalne, krzywa teoretyczna będąca ich dopasowaniem, oraz procentowe udziały formy H i HG w mieszaninie (odpowiednio czerwona i niebieska krzywa). Mały wykres poniżej przestawia w postaci słupków rozkład resztek. Sinusoidalny rozkład dający się zauważyć w kilku przypadkach ma znikomą amplitudę rzędu 0,5% wartości ΔA^{max} i jest następstwem błędów w stężeniach reagentów.



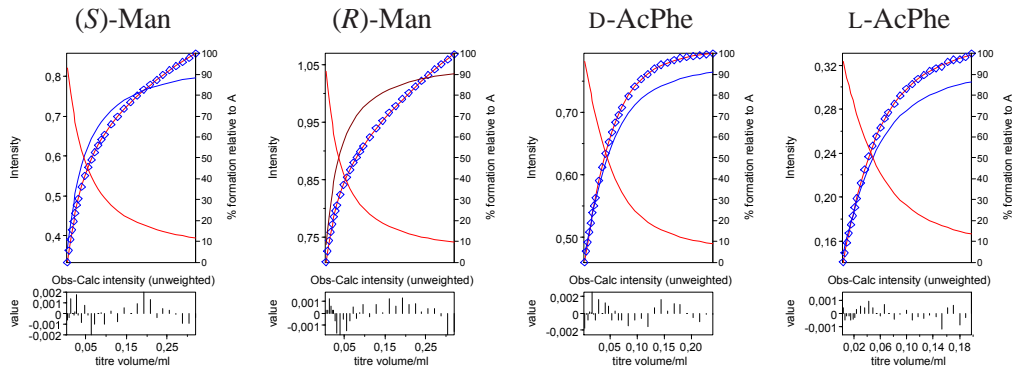
70e



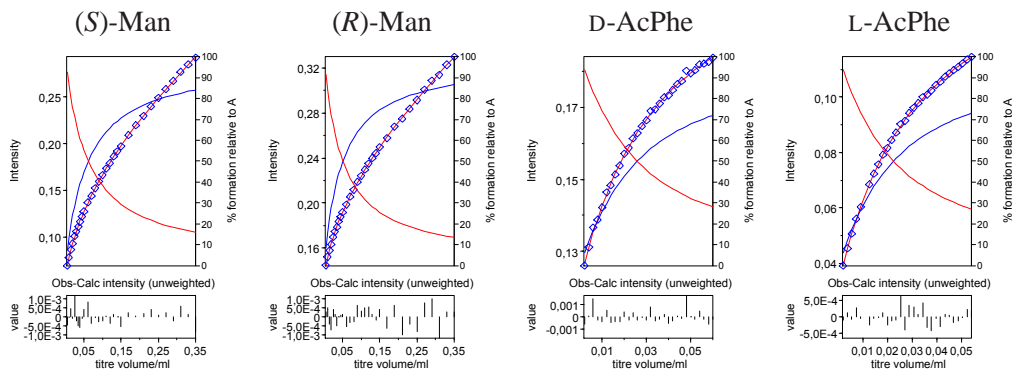
70f

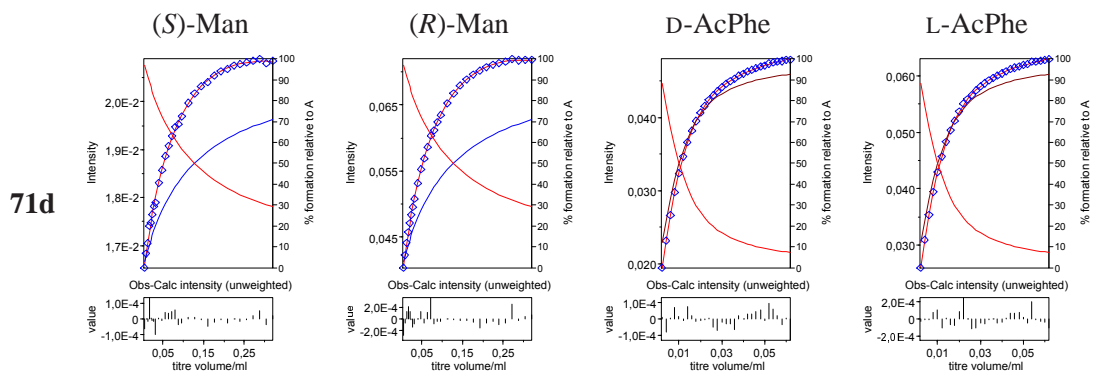
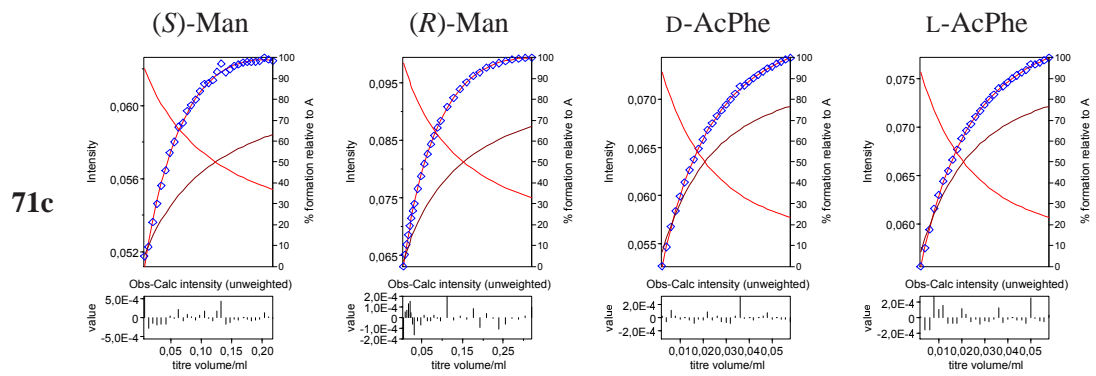
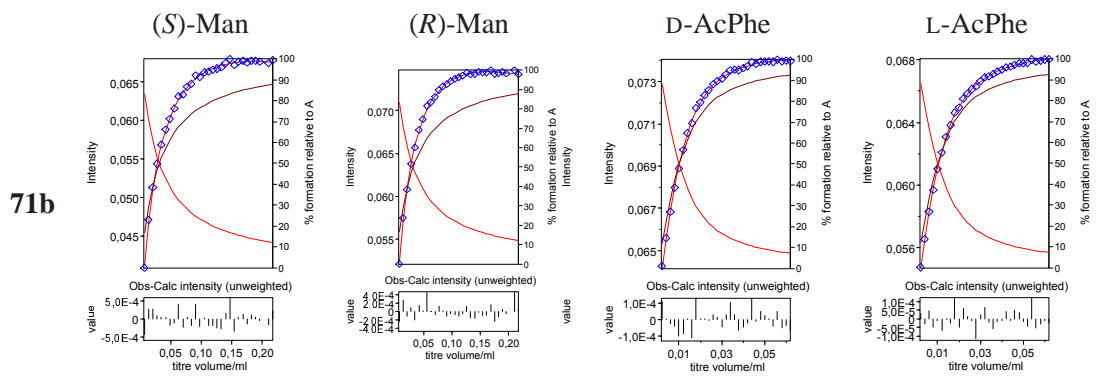
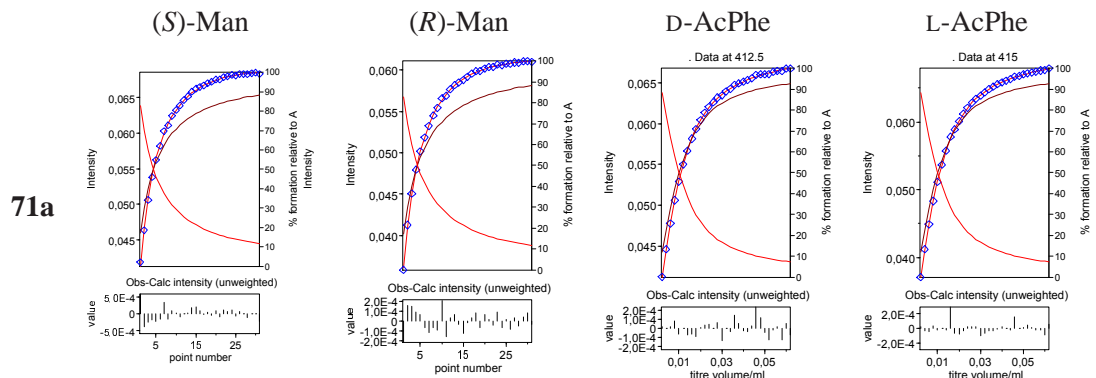


70g

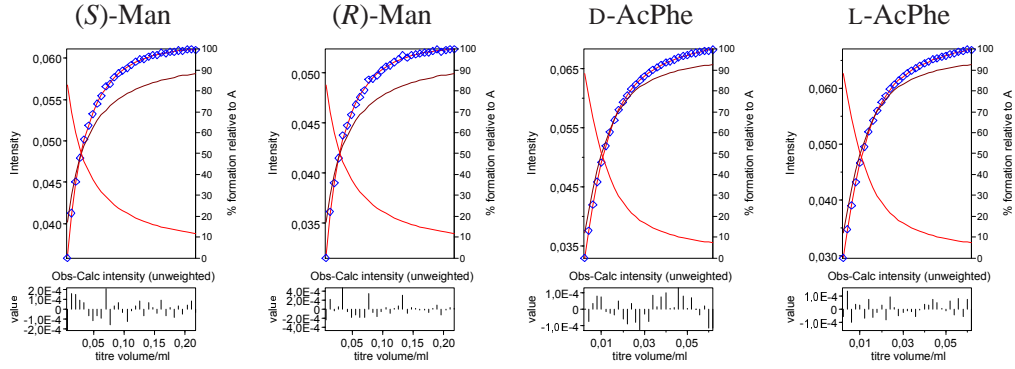


70h

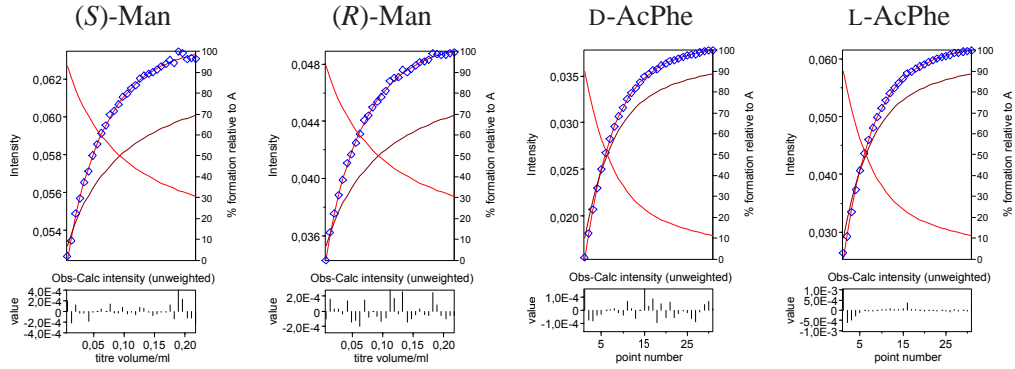




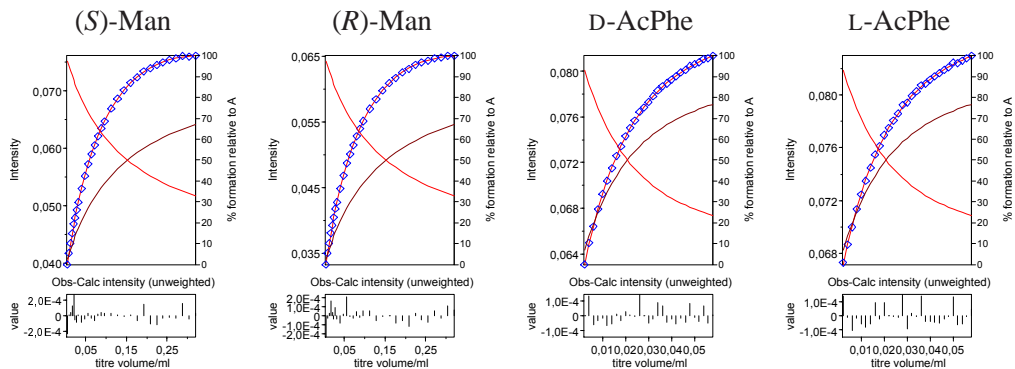
71e



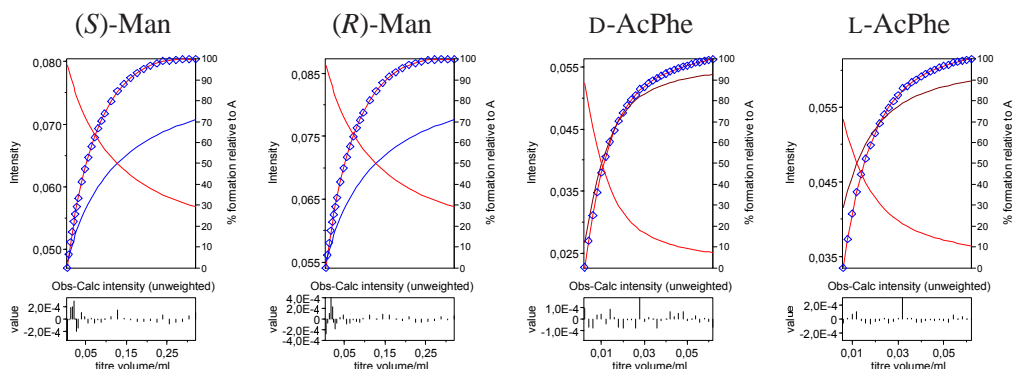
71f

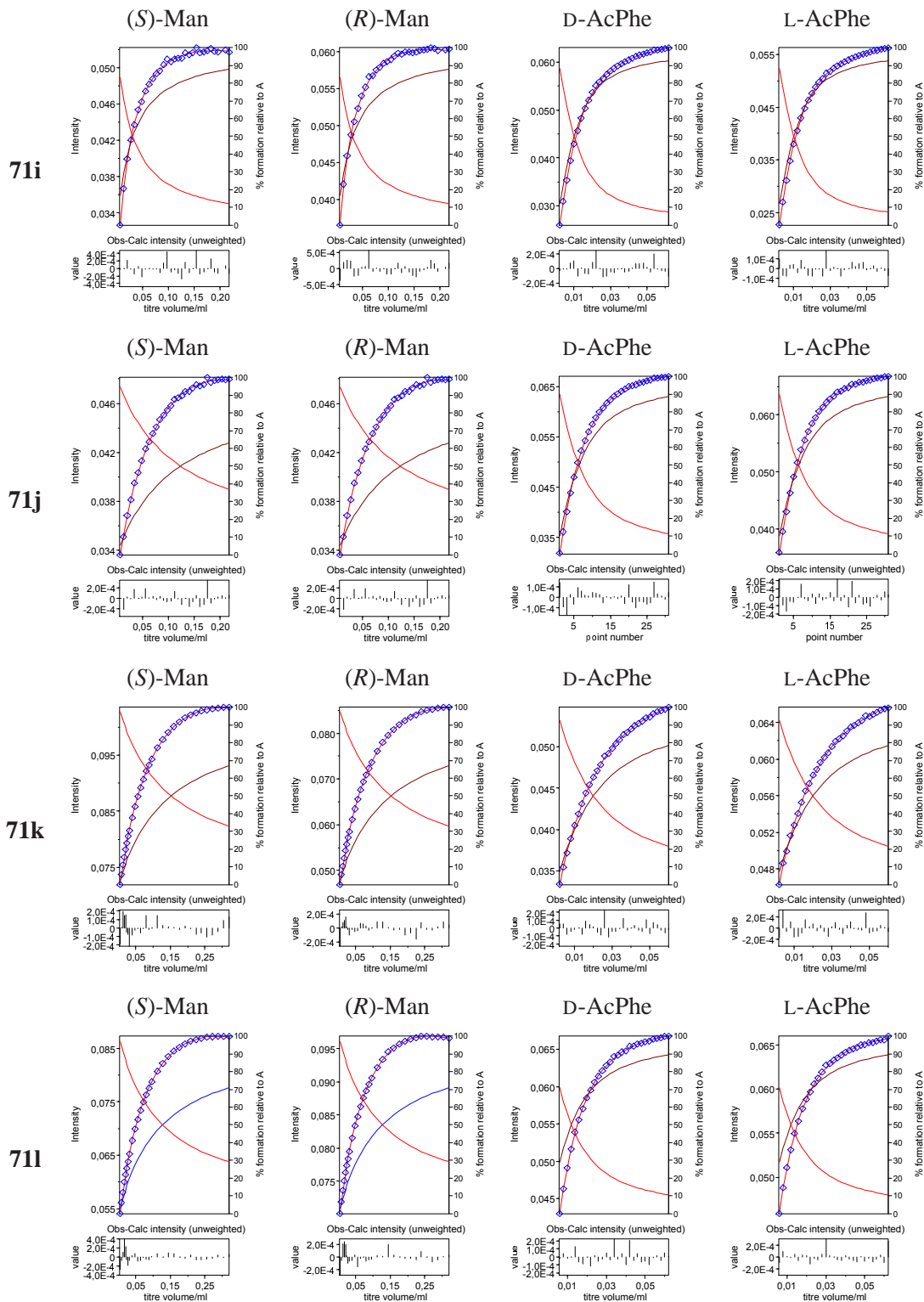


71g



71h

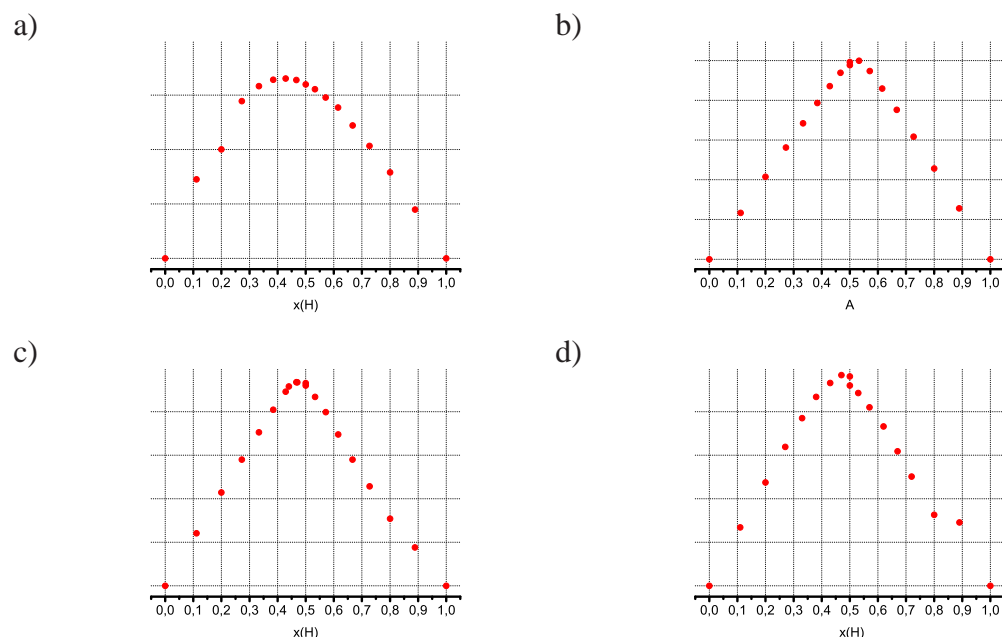




5.2.3 Eksperymenty Joba

Eksperymenty Joba prowadziłem pod kontrolą ^1H NMR, przy stężeniu ok 0,02 M, co zapewniało dobrą czułość pomiaru. Poniżej przedstawiam wykresy Joba dla czterech receptorów, anionem był (S)-migdalan TBA. Dla receptora **69a** śledziłem przesunięcia wygaśnięcia pochodzącego od pirolowego NH, dla receptorów serii DAB i DAA śledziłem przesunięcia sygnałów pochodzących od wewnętrznych

atomów grupy (tio)mocznikowej.



Rysunek 5.2: Wykres Joba dla a) **69a** wskazuje na mieszaną stechiometrię $HG + HG_2$, b) **70a** i c) **71e**) wskazują prostą stechiometrię 1 : 1, wykres d) błędnie sugeruje prostą stechiometrię dla receptora **71m** (a- $CDCl_3$, b,c,d- CD_3CN)

5.3 Miareczkowania konkurencyjne

5.3.1 Miareczkowania z receptorem odniesienia

Miareczkowania konkurencyjne prowadziłem w $MeCN-d_3$ (zawartość wody $<0,05\%$). Stężenie badanego receptora wynosiło 0,01 M, stężenie achiralnego receptora odniesienia 0,005 M, początkowa objętość w próbówce $V = 0,5\text{ mL}$. Stężenie chiralnych soli TBA wynosiło 0,15 M. Roztwór anionu dodawałem w ośmiu krokach po 6,25 μL za pomocą mikrostrzykawki, aż do osiągnięcia 1 ekw. anionu ($n_H + n_{H^{ref}} = n_{anion}$). Pozwalało to uzyskać 7 punktów spełniających warunek (3.4). Położenia sygnałów mierzyłem z dokładnością do 3 miejsc po przecinku. Maksymalne przesunięcia (δ^{max}) dla receptora odniesienia **70i** wyznaczyłem za pomocą miareczkowań odpowiednim anionem pod kontrolą $^1\text{H NMR}$. Wynosiły one $\delta^{max} = 9,170\text{ ppm}$ dla Man i $\delta^{max} = 9,307\text{ ppm}$ dla AcPhe. Wartość maksymalnego przesunięcia dla badanego receptora udokładniałem numerycznie pod kątem największej spójności wyników między wszystkimi punktami doświadczalnymi – minimalizacja $\sum_i \frac{(\bar{\alpha} - \alpha_i)^2}{\bar{\alpha}^2}$. Niepewność każdego pomiaru oszacowałem jako odchylenie standardowe wyników dla poszczególnych punktów doświadczalnych i przemnożyłem przez współczynnik t-Studenta, wynoszący 2,01 (dla $n = 7$ i przedziału ufności 95%).

5.3.2 Miareczkowanie bez receptora odniesienia

Miareczkowania konkurencyjne z wykorzystaniem racemicznego migdalanu prowadziłem w MeCN-d₃. Stężenie soli w próbce wynosiło 0,01 M, a początkowa objętość 0,5 mL. Stężenie receptora ograniczone jego rozpuszczalnością wynosiło 0,025 M. Porcje receptora do osiągnięcia 1 ekw. dodawałem w ośmiu krokach po 25 μL, następnie dodałem dwie porcje po 100 μL uzyskując punkty 1,5 i 2,0 ekw. Za maksymalne przesunięcie jednego z enancjomerów migdalanu przyjąłem wartość z ostatniego punktu miareczkowania (2 ekw.), δ^{max} dla drugiego udokładniałem numerycznie tak, jak opisałem powyżej. Analogicznie przeprowadziłem pomiary z zastosowaniem pseudoramiczniczej-znakowanej deuterem mieszaniny migdalanu. Dla usprawnienia pomiaru do mieszaniny dodałem po 5 μL CDCl₃ i CDCl₃, które służyły za sygnały odniesienia. Niepewność pomiaru oszacowałem w obu wariantach tak, jak dla miareczkowania ze wzorcem.

5.3.3 Pomiary ELSE i ELLE

Przygotowanie żywic jonowymiennych

Żywica z przeciwjonem hydroksylowym Amb-OH

Handlowo dostępną żywicę Amberlite-400-Cl (100 g, ok. 140 mL) umieściłem w szklanej kolumnie do chromatografii i przepłukałem 5% NaOH (1 L) w powolnym przepływie (ok. 30 mL min⁻¹), aż kropla wycieku dodana do 0,1 M AgNO₃ powodowała tylko słabe zmętnienie. Następnie żywicę przemyłem wodą destylowaną (1,5 L, przepływ ok. 60 mL min⁻¹), aż pH wycieku wynosiło ok 8-9. W kolejnym kroku złożyłem przemyłem metanolem (0,5 L, 60 mL min⁻¹), po odsączeniu suszyłem na wyparce próżniowej w 40 °C.

Otrzymywanie żywicy z chiralnym karboksylanem, metoda ogólna

Żywicę Amb-OH (5 g, 9mmol grup funk.) zawiesiłem w roztworze chiralnego kwasu (15 mmol) w metanolu (25 mL) i mieszałem mechanicznie przez 10 min. Po opadnięciu ziaren, rozpuszczalnik zdekantowałem, żywicę trzykrotnie wypłukałem metnolem, który oddzielałem przez dekantację, następnie resztę metanolu odparowałem na wyparce. Żywicę suszyłem przez noc pod wysoką próżnią. Dla kwasu migdałowego otrzymałem 6,12g żywicy (przyrost 1,12g), zaś po zateżeniu połączonych porcji metanolu otrzymałem 920 mg osadu. Oba wyniki spójnie wskazują na obsadzenie grup funkcyjnych na żywicy wynoszące 1,8 mmol g⁻¹.

Eksperyment ELSE

W zakręcanej fiołce 2 mL umieściłem 10 μmol receptora, 60 mg żywicy (ok 100 μmol anionu), dodałem 200 μL acetonitrylu i 100 μL 0,05 M TBACl w MeCN (5 μmol). Wrzuciłem mieszadło magnetyczne (4x1 mm) i zakręciłem fiołkę. Intensywnie mieszałem przez 3h. Mieszaninę przesączyłem przez warstwę Celitu®(ok. 5mm) w pipiecie zatkanej zwitkiem waty, przesącz zbierałem do zakręcanej fiołki 2 mL. Dla pomiarów z migdalanem Celit przemyłem izopropanolem (500 μL), dodałem 6 M HCl w izopropanolu (100 μL). Fiołkę zakręciłem nakrętką z uszczelką silikonowo-teflonową. Derywatyzację prowadziłem w 90 °C przez 30 min. Następnie roztwór ochłodziłem do t.pok., dodałem wodę (500 μL) i ekstrahowałem otrzymany ester do n-heksanu (200 μL)¹¹⁸. Dla pomiarów z aminokwasami, Celit przemyłem acetonitrylem (500 μL), dodałem jodek izopropylu (2 μL, 20 μmol). Fiołkę zakręciłem nakrętką z uszczelką

silikonowo-teflonową. Derywatyzację prowadziłem w 80 °C przez 1 h¹¹⁹.

Eksperyment ELLE

Racemiczny wodny roztwór migdałanu sodu 0,2 M, doprowadziłem do pH=6 dodając kroplami 0,01 M HCl i NaOH. W zakręcanej fiołce umieściłem 10 μmol receptora, dodałem 500 μL 0,01 M roztworu TBACl w DCM i 500 μL wodnego roztworu migdałanu sodu. Fazy intensywnie mieszałem na mieszadle magnetycznym przez 3h. Po zaprzestaniu mieszaniu i rozdzieleniu faz przy użyciu mikrostrzykawki 250 μL pobierałem ostrożnie fazę organiczną, którą przenosiłem do kolejnej fiołki, w której prowadziłem derywatyzację tak jak w metodzie ELSE.

Analiza GC enancjomerów migdałanu

Estry izopropylowe kwasu migdałowego ekstrahowane do n-heksanu analizowałem na kolumnie Chirasil-Dex-CB (25m, Agilent). Warunki rozdziału: $V_{nastrz} = 3 \mu\text{L}$, split=8:1, $t_{col} = 130^\circ\text{C}$, przepływ 2 mL min^{-1} , $t_{inj} = 230^\circ\text{C}$, $t_{detek} = 250^\circ\text{C}$, $t_R[\text{min}]$: 8,1((S)-Man) i 8,9 ((R)-Man).

Analiza GC mieszaniny aminokwasów

Estry izopropylowe N-acetylowych pochodnych aminokwasów analizaowałem na kolumnie Chirasil-Val (25m, Agilent). Warunki rozdziału: $V_{nastrz} = 3 \mu\text{L}$, split=8:1, $t_{col} = 60^\circ\text{C}$ 3 min, ramp. 5°C min^{-1} ; 120°C , przepływ $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, $t_{inj} = 230^\circ\text{C}$, $t_{detek} = 250^\circ\text{C}$, $t_R[\text{min}]$: 8,5 (D-Ala), 9,7 (L-Ala), 12,2 (D-Val), 13,6 (L-Val), 15,4 (D-Leu), 17,6 (L-Leu), 24,7 (D-Met), 25,9 (L-Met), 27,4 (D-Phe), 28,4 (L-Phe).

5.4 Pomiary MS

Roztwory do pomiarów MS przygotowałem z użyciem acetonitrylu klasy LC-MS (Merck).

Pseudoracemiczne mieszaniny soli TBA otrzymałem poprzez zmieszanie równomolowych ilości znakowanego i nieznakowanego enancjomeru kwasu (po ok. 0,2 mmol), mieszaninę rozpuściłem w metanolu (5 mL), za pomocą pipety automatycznej dodałem dokładnie 1 ekw. mianowanego roztworu TBAOH w metanolu $1,065 \text{ mol dm}^{-3}$. Metanol odparowałem na wyparce, pozostały olej suszyłem pod wysoką próżnią. Olej rozpuściłem w acetonitrylu i przenieśliem ilościowo do kolby miarowej 10 mL, rozcińczyłem do 10 mL, otrzymując roztwór o znanym stężeniu.

Pomiar RPI

Do typowego pomiaru Ms używałem mieszaniny receptora i pseudoracemicznej soli o stężeniach odpowiednio: $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ i $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Takie stężenia gwarantowały, że intensywność sygnałów od kompleksów była w optymalnym przedziale czułości detektora ($5 \times 10^5 - 5 \times 10^6 \text{ cps}$)

Aparat: 4000 Q-TRAP (Applied Biosystems)

Źródło jonów - Electospray Turbo Ion

Ustawienia źródła jonów:

gaz kurtnowy	<i>curtain gas</i>	CUR	20	psi
gaz rozpylający	<i>ion source gas 1</i>	GS1	20	psi
potencjał deklasteringu	<i>declustering potential</i>	DP	0	V
napięcie iglicy	<i>Ion Spray</i>	(IS)	4500	V

Roztwór dozowany był pompą strzykawkową z szybkością $10 \mu\text{L min}^{-1}$. Analiza intensywności pików o wybranej wartości m/z realizowana była aparaturową procedurą *Multiion*.

5.5 Fazy stacjonarne

Impregnowanie handlowych płytek TLC

Płytki pokryte żelem krzemionkowym 60 (Merck) o wymiarach 10×10 cm zanurzałem na 5 s w roztworze wybranej soli TBA w metanolu, po wyjęciu płytkę osuszałem ręcznikiem papierowym, następnie suszyłem przez 8 h w eksykatorze próżniowym. Kontrolną płytkę odniesienia zanurzałem w czystym metanolu i suszyłem w taki sam sposób. Receptory nanosiłem na żel za pomocą kapilary, płytkę analizowałem przy użyciu lampy UV 366 nm.

Płytki pokrywane samodzielnie

Do wody destylowanej (90 mL) dodałem 25% roztwór TMAOH w metanolu (10,3 mL, dokładne stężenie $2,42 \text{ mol dm}^{-3}$, 25 mmol) oraz enancjomerycznie czysty kwas migdałowy (3,8g, 25 mmol, $0,5 \text{ mmol/g}_{\text{CSP}}$) i mieszałem aż do całkowitego rozpuszczenia kwasu. Do roztworu dodałem następnie żel krzemionkowy (50 g, 10% gipsu), wymieszałem do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Warstwę żelu rozporowadzałem szklanych płytkach 20×20 cm za pomocą ręcznego aplikatora Camag z grubością warstwy ustawioną na 0,50 mm. Opisaną porcją zawiesiny mogłem powlec 4-5 płytek. Płytki pozostawiłem do wyschnięcia na noc. Bezpośrednio przed użyciem, płytki suszyłem przez 2h w suszarce w temp. 80°C . Analizy prowadziłem na pociętych płytkach o wielkości 10×10 cm. Receptory nanosiłem na żel za pomocą kapilary, płytkę analizowałem przy użyciu lampy UV 366 nm.

CSP-1

Żywicę Amberlite-400 z jonami hydroksylowymi **Amb-OH** (5,0 g) zawiesiłem w roztworze kwasu (*S*)-migdałowego (1,7 g, 11,2 mmol) w metanolu (30 mL). Żywicę przepłukałem czystym metanolem (3×30 mL) oddzielając rozpuszczalnik przez dekantację, resztę rozpuszczalnika usunąłem na wyparce. Następnie żywicę roztarłem w moździerzu na drobny proszek i suchym złożem napełniłem obudowę do kolumny HPLC o wymiarach $10 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm ID}$.

CSP-2

Żel krzemionkowy do HPLC (6,5g, Watsil spherical, 100 \AA , $5 \mu\text{m}$, $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) wysuszyłem przez azeotropowe odparowanie wody z toluenem. Suchy żel zawiesiłem w suchym toluenie (35 mL) i dodałem 3-bromopropylotrichlorosilan ($65 \mu\text{L}$, 0,25 mmol)¹²³, reakcję prowadziłem w temp. wrzenia pod chłodnicą zwrotną, pod argonem, z mieszaniem mechanicznym przez 2 dni. Żel odsączyłem na lejku ze spiekami G5 i przemyłem toluenem. Analiza elementarna próbki żelu suszonego w 50°C pod wyso-

ką próżnią dała wynik: C-1,55%; H-0,37%; Br-0,92%, co odpowiada obsadzeniu powierzchni żelu ok 1 cząst. na 10 nm² (75 μmol g⁻¹).

Następnie żel zawiesiłem w toluenie (35 mL) z heksametylodisilanem (HMDS, 2 mL), reakcję prowadziłem w temp. wrzenia, pod chłodnicą zwrotną, pod argonem, z mieszaniem mechanicznym przez noc. Żel odsączyłem i przemyłem. Analiza elementarna dała wynik: C-2,0%; H-0,55%, Br-0,89%, co wskazuje na przyłączenie grup trimetylosililowych do powierzchni.

Żel zawiesiłem w acetonitrylu (30 mL), dodałem tributylloaminę (2 mL) reakcję prowadziłem w temp. wrzenia z mieszaniem mechanicznym przez noc. Żel odsączyłem i przemyłem. Analiza elementarna dała wynik C-2,73%; H-0,71%; N-0,10%, co jest zgodne z całkowitym podstawieniem bromu przez grupę tributylloaminową. Wyniki analizy elementarnej dla bromu nie były powtarzalne, co za tym idzie miarodajne.

Żel zawiesiłem w cykloheksanie i zawiesziną napełniłem obudowę kolumny do HPLC. Przy użyciu pompy do HPLC przez kolumnę przepuściłem 200 mL 0,1 M roztworu (*S*)-migdałanu TBA w acetonitrylu (140-krotny nadmiar względem jonów bromkowych na kolumnie), w wolnym przepływie 0,1 mL/min. Następnie kolumnę przemyłem czystym acetonitrylem (100 mL). Tak przygotowaną kolumnę używałem do analiz.

Żel krzemionkowy z grupami azydkowymi (CSP-4) Pokrywanie powierzchni krzemionki bromopropylotrichlorosilanem oraz HMDS przeprowadziłem tak jak dla **CSP-2**.

Żel krzemionkowy modyfikowany grupami bromopropylowymi zawiesiłem w DMF (30 mL) i dodałem azydek sodu (2 g), reakcję prowadziłem w 80°C przez noc. Krzemionkę odsączyłem, przemyłem DMF i THF, wysuszyłem. Analiza elementarna: C-2,2%, H-0,49%, N-1,6%, Br-brak, wskazywała, że reakcja substytucji przebiegła do końca. Obecność grup -N₃ potwierdza pasmo 2115 cm⁻¹ na widmie IR (w KBr). Obsadzenie żelu - 1 cząst. na 10 nm² (75 μmol g⁻¹).

Procedura typowej reakcji dipolarnej cykloaddycji między modyfikowaną krzemionką (CSP-4) a kwasami 117 i 118

Modyfikowany żel **CSP-4** (500 mg, 37 μmol grup N₃) zawiesiłem w DMF (5 mL), dodałem odpowiedni kwas z podstawnikiem propargilowym (1 mmol), CuSO₄ (12 mg, 0,05 mmol) oraz kwas askorbinyowy (12 mg, 0,07 mmol). Reakcję prowadziłem przez 1-3 dni, testowałem temperatury 25, 40 i 80°C. Opcjonalnie dodawałem ligand **127** (26 mg, 0,05 mmol). Postęp reakcji oceniałem na podstawie analizy spaleniowej pobranej, przemytej i wysuszonej porcji krzemionki oraz widm IR (w KBr)

5.6 Modelowanie molekularne

Struktury na Rys. 3.2 i 3.7 uzyskałem za pomocą programu Spartan (Wavefunction Inc.), optymalizację struktury przeprowadziłem za pomocą półempirycznej metody PM6. Uzyskane geometrie mają charakter jedynie poglądowy.

Bibliografia

- [1] M. J. Chmielewski oraz J. Jurczak, *Chemistry*, 2006, **12**, 7652–67.
- [2] P. Dydio, D. Lichosyt oraz J. Jurczak, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 2971–85.
- [3] J. Jurczak, M. J. Chmielewski, P. Dydio, D. Lichosyt, F. Ulatowski oraz T. Zieliński, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 1543–1554.
- [4] P. Dydio, T. Zieliński oraz J. Jurczak, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 1076–8.
- [5] M. Chmielewski oraz J. Jurczak, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6007–6010.
- [6] H. D. Flack, *Acta Crystallogr. A.*, 2009, **65**, 371–89.
- [7] P. Cintas, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 4016–24.
- [8] L. Pasteur, *Annales de Chimie et de Physique, 3rd series*, 1848, **3**, 442–459.
- [9] T. Attwood, *Oxford Dictionary of Biochemistry And Molecular Biology*, Oxford University Press, 2006.
- [10] E. B. Kyba, K. Koga, L. R. Sousa, M. G. Siegel oraz D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 2692–2693.
- [11] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, 7017.
- [12] L. Salem, X. Chapuisat, G. Segal, P. C. Hiberty, C. Minot, C. Leforestier oraz P. Sautet, 1987, 2887–2894.
- [13] A. Ogsten, *Nature*, 1948, **162**, 963–963.
- [14] W. H. Pirkle, *Chem. Rev.*, 1989, **89**, 347–362.
- [15] R. C. Helgeson, J. M. Timko, P. Moreau, S. C. Peacock, J. M. Mayer oraz D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 6762–6763.
- [16] B. Feibush, A. Figueroa, R. Charles, K. D. Onan, P. Feibush oraz B. L. Karger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 3310–3318.

- [17] R. Baczuk, G. Landram, R. Dubois oraz H. Dehm, *Journal of Chromatography A*, 1971, **60**, 351–361.
- [18] K. Ariga, G. J. Richards, S. Ishihara, H. Izawa oraz J. P. Hill, *Sensors (Basel)*, 2010, **10**, 6796–820.
- [19] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 1305–23.
- [20] L. Fielding, *Tetrahedron*, 2000, **56**, year.
- [21] K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2001, 193–209.
- [22] D. Leggett, *Computational methods for the determination of formation constants*, Plenum Press, 1985.
- [23] H. Schneider oraz H. Dürr, *Frontiers in Supramolecular Organic Chemistry and Photochemistry*, VCH Verlagsgesellschaft, 1991.
- [24] K. Hirose, w: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, 2012, rozdz. Quantitative Analysis of Binding Properties.
- [25] Y. Cohen, w: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, 2012, rozdz. Diffusion NMR in Supramolecular Chemistry and Complexed Systems.
- [26] F. Schmidtchen, w: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, 2012, rozdz. Isothermal Titration Calorimetry in Supramolecular Chemistry.
- [27] *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2000.
- [28] V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi oraz M. Milani, *Chem. a Eur. J.*, 2010, **16**, 4368–80.
- [29] J. Dowden, P. Edwards oraz J. Kilburn, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 1095–1098.
- [30] K.-X. Xu, X.-J. Wu, Y.-B. He, S.-Y. Liu, G.-Y. Qing oraz L.-Z. Meng, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 833–839.
- [31] S.-y. Liu, Y.-b. He, G.-y. Qing, K.-x. Xu oraz H.-j. Qin, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 1527–1534.
- [32] K.-X. Xu, Y.-B. He, H.-J. Qin, G.-Y. Qing oraz S.-Y. Liu, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 3042–3048.
- [33] D. Yang, X. Li, Y.-f. Fan oraz D.-w. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 7996–7.
- [34] G.-y. Qing, Y.-b. He, Y. Zhao, C.-g. Hu, S.-y. Liu oraz X. Yang, *European J. Org. Chem.*, 2006, **2006**, 1574–1580.

- [35] H. Qin, Y. He, G. Qing, C. Hu oraz X. Yang, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 2143–2148.
- [36] K. Xu, Y. He, G. Qing, H. Qin, S. Liu oraz L. Meng, *Chinese J. Chem.*, 2007, **25**, 390–394.
- [37] A. V. Yakovenko, V. I. Boyko, V. I. Kalchenko, L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone oraz R. Ungaro, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 3223–31.
- [38] G.-y. Qing, Y.-b. He, F. Wang, H.-j. Qin, C.-g. Hu oraz X. Yang, *European J. Org. Chem.*, 2007, **2007**, 1768–1778.
- [39] K.-x. Xu, G.-y. Qing, Y.-b. He, H.-j. Qin oraz L. Hu, *Supramol. Chem.*, 2007, **19**, 403–409.
- [40] G. Qing, T. Sun, Z. Chen, X. Yang, X. Wu oraz Y. He, *Chirality*, 2009, **21**, 363–73.
- [41] X.-h. Huang, Y.-b. He, C.-g. Hu oraz Z.-h. Chen, *J. Fluoresc.*, 2009, **19**, 97–104.
- [42] J. Bois, I. Bonnamour, C. Duchamp, H. Parrot-Lopez, U. Darbost oraz C. Felix, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 2128.
- [43] G.-y. Qing, T.-l. Sun, F. Wang, Y.-b. He oraz X. Yang, *European J. Org. Chem.*, 2009, **2009**, 841–849.
- [44] A. Kormos, I. Móczár, D. Pál, P. Baranyai, J. Kupai, K. Tóth oraz P. Huszthy, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2013, **24**, 62–65.
- [45] M. K. Choi, H. N. Kim, H. J. Choi, J. Yoon oraz M. H. Hyun, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4522–4525.
- [46] Y. K. Kim, H. N. Lee, N. J. Singh, H. J. Choi, J. Y. Xue, K. S. Kim, J. Yoon oraz M. H. Hyun, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 301–4.
- [47] S. Y. Liu, K. Y. Law, Y. B. He oraz W. H. Chan, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 7857–7860.
- [48] V. del Amo, A. P. McGlone, J. M. Soriano oraz A. P. Davis, *Tetrahedron*, 2009, **65**, 6370–6381.
- [49] A. Sirikulajorn, T. Tuntulani, V. Ruangpornvisuti, B. Tomapatanaget oraz A. P. Davis, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 7423–7428.
- [50] H. Wang, W.-h. Chan oraz A. W. M. Lee, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 929–34.
- [51] A. Pappalardo, M. E. Amato, F. P. Ballistreri, G. A. Tomaselli, R. M. Toscano oraz G. Trusso Sfrassetto, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 7684–7.
- [52] F. P. Ballistreri, A. Pappalardo, G. A. Tomaselli, R. M. Toscano oraz G. T. Sfrassetto, *European J. Org. Chem.*, 2010, **2010**, 3806–3810.
- [53] A. González-Alvarez, I. Alfonso, P. Díaz, E. García-España, V. Gotor-Fernández oraz V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 374–82.

- [54] A. M. Costero, M. Colera, P. Gaviña, S. Gil, M. Kubinyi, K. Pál oraz M. Kállay, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 3217–3224.
- [55] S. Bartoli, T. Mahmood, A. Malik, S. Dixon oraz J. D. Kilburn, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 2340–5.
- [56] A. González-Alvarez, I. Alfonso, P. Díaz, E. García-España oraz V. Gotor, *Chem. Commun. (Camb.)*, 2006, **1**, 1227–9.
- [57] J. Sessler, A. Andrievsky, V. Král oraz V. Lynch, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 9385–9392.
- [58] V. Amendola, M. Boiocchi, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi oraz E. Monzani, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 2632–9.
- [59] H. Qin, Y. He, C. Hu, Z. Chen oraz L. Hu, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2007, **18**, 1769–1774.
- [60] H. Miyaji, S.-J. Hong, S.-D. Jeong, D.-W. Yoon, H.-K. Na, J. Hong, S. Ham, J. L. Sessler oraz C.-H. Lee, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 2508–11.
- [61] Q.-s. Lu, L. Dong, J. Zhang, J. Li, L. Jiang, Y. Huang, S. Qin, C.-w. Hu oraz X.-q. Yu, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 669–72.
- [62] K. M. K. Swamy, N. Jiten Singh, J. Yoo, S. K. Kwon, S.-Y. Chung, C.-H. Lee oraz J. Yoon, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 2009, **66**, 107–111.
- [63] L. Yang, S. Qin, X. Su, F. Yang, J. You, C. Hu, R. Xie oraz J. Lan, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 339–48.
- [64] K.-x. Xu, L.-r. Yang, Y.-X. Wang, J. Zhao oraz C.-j. Wang, *Supramol. Chem.*, 2010, **22**, 563–570.
- [65] I. Stibor oraz P. Zlatušková, *Top. Curr. Chem.*, 2005, **255**, 307–341.
- [66] A. Pappalardo, M. E. Amato, F. P. Ballistreri, G. A. Tomaselli, M. Toscano, G. T. Sfrassetto, S. Chimiche, U. Catania oraz A. Doria, 1–35.
- [67] Z.-h. Chen, Y.-b. He, C.-G. Hu oraz X.-h. Huang, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 2051–2057.
- [68] V. D. Jadhav oraz F. P. Schmidtchen, *Org. Lett.*, 2006, **8**, 2329–32.
- [69] V. D. Jadhav oraz F. P. Schmidtchen, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1077–87.
- [70] B. J. Whitlock oraz H. W. Whitlock, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 3910–3915.
- [71] A. Tejada, A. I. Oliva, L. Simón, M. Grande, M. Cruz Caballero oraz J. R. Morán, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 4563–4566.
- [72] M. Martín, C. Raposo, A. I. Oliva, L. Simón, C. Caballero oraz J. R. Morán, *Chem. Lett.*, 2000, 718–719.

- [73] A. I. Oliva, L. Simón, F. M. Muñiz, F. Sanz oraz J. R. Morán, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3755–3762.
- [74] J. Hernández, M. Almaraz, C. Raposo, M. Martín, A. Lithgow, M. Crego, C. Caballero oraz J. R. Morán, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 7401–7404.
- [75] E. M. Pérez, A. I. Oliva, J. V. Hernández, L. Simón, J. R. Morán oraz F. Sanz, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 5853–5856.
- [76] C. Schalley, w: *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, 2012, rozdz. Mass Spectrometry and Gas Phase Chemistry of Supramolecules.
- [77] P. Tarnowski, *Praca doktorska*, Instytut Chemii Organicznej PAN, 2001.
- [78] A. Pokrop, *Praca doktorska*, Instytut Chemii Organicznej PAN, 2006.
- [79] K. a. Schug oraz W. Lindner, *J. Sep. Sci.*, 2005, **28**, 1932–1955.
- [80] M. Sawada, T. Hitoshi, Y. Shigeki, T. Kanedaj, T. Tanaka, K. Kamada, T. Mizooku, S. Takeuchi, K. Ueno, K. Hirose, Y. Tobe oraz K. Naemura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 7726–7736.
- [81] M. Sawada, Y. Takai, H. Yamada, J. Nishida, T. Kaneda, R. Arakawa, M. Okamoto, K. Hirose, T. Tanaka oraz K. Naemura, 1998, 701–710.
- [82] I. H. Chu, D. V. Dearden, J. S. Bradshaw, P. Huszthy oraz R. M. Izatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4318–4320.
- [83] D. V. Dearden, C. Dejsupa, Y. Liang, J. S. Bradshaw oraz R. M. Izatt, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 353–359.
- [84] B. Schuur, B. J. V. Verkuijl, A. J. Minnaard, J. G. de Vries, H. J. Heeres oraz B. L. Feringa, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 36–51.
- [85] M. Newcomb, J. L. Toner, R. C. Helgeson oraz D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 4941–4947.
- [86] L. J. Lawless, A. G. Blackburn, A. J. Ayling, M. N. Pérez-Payán oraz A. P. Davis, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2001, 1329–1341.
- [87] B. Baragaña, A. G. Blackburn, P. Breccia, A. P. Davis, J. de Mendoza, J. M. Padrón-Carrillo, P. Prados, J. Riedner oraz J. G. de Vries, *Chemistry*, 2002, **8**, 2931–6.
- [88] K.-H. Kellner, A. Blasch, H. Chmiel, M. Lammerhofer oraz W. Lindner, *Chirality*, 1997, **9**, 268–273.
- [89] J. Debowski, D. Sybilska oraz J. Jurczak, *Chromatographia*, 1982, **16**, 198–200.
- [90] J. Debowski, J. Jurczak oraz D. Sybilska, *Journal of Chromatography A*, 1983, **282**, 83 – 88.

- [91] H. Aboul-Enein, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, **32**, 1055–1059.
- [92] R. Bhushan, J. Martens oraz G. T. Thiongo, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **21**, 1143–7.
- [93] R. Bhushan oraz V. Parshad, *J. Chromatogr. A*, 1996, **736**, 235–238.
- [94] R. Bhushan oraz V. Parshad, *Methods*, 1996, **721**, 369–372.
- [95] R. Bhushan oraz G. T. Thiongo, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 1998, **708**, 330–4.
- [96] J. Sessler, P. Gale oraz W. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society of Chemistry, 2006.
- [97] F. G. Bordwell, G. E. Drucker oraz H. E. Fried, *J. Org. Chem.*, 1981, **46**, 632–635.
- [98] M. H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.*, 1993, **22**, 73.
- [99] C. O. Usifoh oraz L. O. Okunrobo, *Monatshefte fur Chemie / Chem. Mon.*, 2002, **133**, 1067–1070.
- [100] Heller, *Chemische Berichte*, 1916, **49**, 547.
- [101] S. J. Brooks, P. a. Gale oraz M. E. Light, *Chem. Commun. (Camb)*, 2005, 4696–8.
- [102] 1–29.
- [103] M. K. Dhaon, R. K. Olsen oraz K. Ramasamy, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 1962–1965.
- [104] J. S. Nowick, D. L. Holmes, G. Noronha, E. M. Smith, T. M. Nguyen oraz S.-L. Huang, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 3929–3934.
- [105] A. Dahan, T. Ashkenazi, V. Kuznetsov, S. Makievski, E. Drug, L. Fadeev, M. Bramson, S. Schokoroy, E. Rozenshine-Kemelmakher oraz M. Gozin, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2289–96.
- [106] S. J. Brooks, P. A. Gale oraz M. E. Light, *Chem. Commun. (Camb)*, 2005, 4696–8.
- [107] R. W. Taft, *J. Am. Chem.Soc.*, 1952, **74**, 2729–2732.
- [108] R. W. Taft, *J. Am. Chem.Soc.*, 1952, **74**, 3120–3128.
- [109] R. W. Taft, *J. Am. Chem.Soc.*, 1953, **75**, 4538–4539.
- [110] A. Ploom, D. Panov oraz A. Tuulmets, *Arkivoc*, 2006, **2006**, 37–42.
- [111] J. A. MacPhee, A. Panaye oraz J.-E. Dubois, *Tetrahedron*, 1978, **34**, 3553 – 3562.
- [112] P. Blümmler, B. Blümich, R. Botto oraz E. Fukushima, *Spatially Resolved Magnetic Resonance: Methods, Materials, Medicine, Biology, Rheology, Geology, Ecology, Hardware*, Wiley, 2008.
- [113] P. L. Polavarapu, L. P. Fontana oraz H. F. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 94–99.

- [114] J. C. Leung, L. M. Geary, T.-Y. Chen, J. R. Zbieg oraz M. J. Krische, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 15700–3.
- [115] A. Aitken oraz A. Thomas, *Synlett*, 1997, 293–294.
- [116] B. Pal oraz K. K. S. Gupta, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2000, **73**, 553–560.
- [117] E. Skogley oraz A. Dobermann, *J. Environ. Qual.*, 1996, **25**, 13–24.
- [118] S. Kežić, I. Jakaša oraz M. Wenker, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2000, **738**, 39–46.
- [119] J. C. Lee, Y. S. Oh, S. H. Cho oraz J. D. Lee, *Organic Preparations and Procedures International*, 1996, **28**, 480–483.
- [120] S. Hu oraz D. C. Neckers, *J. Mater. Chem.*, 1997, **7**, 1737–1740.
- [121] P. V. Ramachandran, S. Pitre oraz H. C. Brown, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 5315–5319.
- [122] B. M. Tissue, *Chromatogram Simulator*, <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/simulations/spreadsheets.html>.
- [123] C. Haensch, S. Hoepfner oraz U. S. Schubert, *Nanotechnology*, 2008, **19**, 035703.
- [124] D. Lin-Vien, N. Colthup, W. Fateley oraz J. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, Elsevier Science, 1991.
- [125] P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White oraz S. J. Williams, *Chem. Commun.*, 2008, 2459–2461.
- [126] M. J. Chmielewski, M. Charon oraz J. Jurczak, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 3501–4.
- [127] F. Fécourt, B. Delpech, O. Melnyk oraz D. Crich, *Org. Lett.*, 2013, **15**, 3758–61.
- [128] D. Moye-sherman, S. Jin, S. Li, M. B. Welch, J. Reibenspies oraz K. Burgess, 1999, 2730–2739.
- [129] H. D. Showalter, a. D. Sercel, B. M. Leja, C. D. Wolfangel, L. a. Ambroso, W. L. Elliott, D. W. Fry, a. J. Kraker, C. T. Howard, G. H. Lu, C. W. Moore, J. M. Nelson, B. J. Roberts, P. W. Vincent, W. a. Denny oraz a. M. Thompson, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 413–26.
- [130] A. J. Sobral, N. G. Rebanda, M. da Silva, S. H. Lampreia, M. Ramos Silva, A. Beja, J. Paixão oraz A. M. Rocha Gonsalves, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 3971–3973.
- [131] S. Kim, J. I. Lee oraz Y. C. Kim, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 560–565.
- [132] R. F. W. Jackson, N. Wishart, A. Wood, K. James oraz M. J. Wythes, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 3397–3404.
- [133] A. K. Croft oraz M. K. Foley, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1594–600.

- [134] U. Heiser oraz D. Ramsbeck, *Novel Inhibitors*, *US Pat. No. 20110092501*, 2010.
- [135] T. P. Boyle, J. B. Bremner, J. Coates, J. Deadman, P. a. Keller, S. G. Pyne oraz D. I. Rhodes, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 11270–11290.
- [136] E. J. O'Neil, K. M. DiVittorio oraz B. D. Smith, *Org. Lett.*, 2007, **9**, 199–202.
- [137] *Trueness and Precision Statement of Conformance*, <http://www.hamiltoncompany.com/downloads/>.

B. Org. 352/13



Praca została złożona przy pomocy programu L^AT_EX z wykorzystaniem następujących pakietów, które bardzo wspomogły pracę z numeracją związków chemicznych, notacją wzorów cząsteczek i zapisem reakcji chemicznych:

- chemcompunds
- chemstyle
- mhchem

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

O-B.352/13



30000000130067