

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2463.

BOROS SÁNDOR

A gyógyszerészeti tudományok korszerű kutatási irányai
című program

Programvezető: Dr. Antal István, egyetemi tanár

Konzulensek: Dr. Kövér Katalin, egyetemi tanár

Dr. Batta Gyula, egyetemi tanár

Dr. Kéri György†, egyetemi tanár

Édesapám emlékére!



Boros István
1939 - 2020

NMR mérési módszerek továbbfejlesztése és alkalmazásuk a gyógyszerkutatásban kismolekulák oldatfázisú szerkezetvizsgálatára

Doktori (PhD) értekezés

Boros Sándor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



- Konzulensek: Dr. Kövér Katalin, D.Sc., az MTA rendes tagja, egyetemi tanár
 Dr. Batta Gyula, D.Sc., egyetemi tanár
 Dr. Kéri György †, D.Sc., egyetemi tanár
- Hivatalos bírálók: Dr. Rohonczy János, Ph.D., habil. egyetemi docens
 Dr. Kraszni Márta, Ph.D., egyetemi docens
- Komplex vizsga bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, D.Sc., egyetemi tanár
- Komplex vizsga bizottság tagjai: Dr. Szökő Éva, D.Sc., egyetemi tanár
 Dr. Antal István, Ph.D., habil. egyetemi docens
 Dr. Nikolics Mária, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke, angol nyelvű rövidítések fordítása, értelmezése	4
1. Bevezetés	6
2. Célkitűzések	7
A. szekció	
Heterunukleáris skaláris csatolási állandók mérése, a HSQMBC módszer fejlesztése és alkalmazása	8
A.3. Irodalmi háttér	8
A.3.1. Közvetlen irodalmi előzmények	12
A.4. Módszerek - Saját fejlesztések a HSQMBC módszeren	13
A.4.1. 2D HSQMBC HSQMBC változat	13
A.5. Megbeszélés – modellvegyület vizsgálata	15
A.5.1. Szelektív 1D HSQMBC változat	21
A.5.2. A HSQMBC módszer más fejlesztései	23
A.6. Eredmények - a javasolt HSQMBC módszerváltozat gyakorlati alkalmazása valós szerkezeti probléma megoldására	24
A.6.1. Kémiai háttér	24
A.7. Következtetések Szerkezetvizsgálati következtetések	25
B. szekció	
^1H-^1H atomtávolságok mérése, zqs-easy-ROESY módszer fejlesztése és alkalmazása	35
B.4. Irodalmi háttér	35
B.3.1. Közvetlen irodalmi előzmények	40
B.4. Módszerek – a 2D zqs-easy-ROESY mérési módszer fejlesztése	42
B.5. Megbeszélés	44
B.5.1. a javasolt zqs-easy-ROESY módszerváltozat hatékonyságának igazolása	44
B.5.2. A szelektív 1D zqs-easy-ROESY változat fejlesztése	63
B.5.3. Annak a molekulaméret-tartománynak a vizsgálata, ahol a NOESY nem működik	70

B.6. Eredmények - A zqs-easy-random-ROESY módszerváltozat alkalmazása a gyakorlatban imidazo[1,2-<i>a</i>]piridin és imidazo[1,2-<i>a</i>]pirazin származékok vizsgálatában	75
B.6.1. Kémiai háttár	75
B.7. Következtetések	79
B.7.1 Szerkezetvizsgálati következtetések	79
B.7.2. Tautomer egyensúly vizsgálata	102
C. szekció	
Egy nem várt átrendeződés és egy konformációs mikroegyensúly feltérképezése	109
C.3. Irodalmi háttér - Kémiai előzmények	109
C.4. Módszerek	110
C.5. Eredmények - Egy kérdéssé vált szerkezet tisztázása	111
C.6. Megbeszélés - Egy jelsorozat-kettőződés felismerése	115
C.7. Következtetések - A jelsorozat-kettőződés háttérében álló gátolt forgás felderítése	120
8. Eredmények - tézispontok	122
9. Összefoglalás	125
10. Summary	126
11. Irodalomjegyzék	137
12. Saját publikációk jegyzéke	138
12.1. A dolgozatban felhasznált referált közlemények	138
12.2. A dolgozatban felhasznált nem referált közlemények (előadások, poszterek)	140
12.3. A dolgozatban fel nem használt saját közlemények	143
13. Köszönetnyilvánítás	148
14. Függelék - a fejlesztett NMR mérési módszerek forráskódjai	149

Rövidítések jegyzéke, angol nyelvű rövidítések fordítása, értelmezése

1D / 2D	egydimenziós / kétdimenziós
ADEQUATE	Astonishingly sensitive double-quantum transfer experiment meglepően érzékeny kettős-kvantum átmenet kísérlet, <i>egyfajta mérési módszer szén-szén kapcsolódások feltérképezésére</i>
BIRD	Bilinear rotation decoupling – kétirányú forgásos lecsatolás
CAMELSPIN	Cross-relaxation appropriate for minimolecules emulated by locked spins kismolekulák számára megfelelő keresztrelaxáció összezárt spineken keresztül – <i>egyfajta mérési módszer térközelségek és kémiai kicserélődés megállapítására</i> <i>(gyakorlatilag azonos a ROESY módszer első változatával)</i>
CLIP-CLAP	Clean in-phase – clean anti-phase tisztá azonos fázisú – tisztá ellentétes fázisú
CPMG	<i>Carr, Purcell, Meilboom, Gill</i> <i>pulzus elem elnevezése a megalkotóinak nevének kezdőbetűiből</i>
DANTE	Delay alternating with nutation for tailored excitation billigve alternáló várakozások szelektív gerjesztéshez <i>egyfajta módszer szelektív gerjesztésre</i>
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer torzításmentes érzékenységnövelés polarizáció átvitelével
DIPSI	(Composite pulse) decoupling in the presence of scalar interactions skaláris kölcsönhatások jelenlétében alkalmazható lecsatolás összetett pulzusokkal
dpfge-se-	double pulse field gradient echo selective excitation kétpulzusos gradiens visszhang szelektív gerjesztés
easy-	efficient adiabatic symmetrized – hatékony, adiabatikus, szimmetrizált
EXSIDE	Excitation-sculptured indirect-detection experiment (for measuring long-range heteronuclear coupling constants) szelektív gerjesztéses indirektdetektálásos kísérlet távolható heteronukleáris csatolási állandók mérésére

GARP	Globally optimized alternating phase rectangular pulses lecsatolás globálisan optimalizált alternáló fázisú négyszögpulzusokkal
HECADE	heteronuclear couplings from arbitrarily scaled shift and coupling information domain experiment önkéntesen skálázott eltolódás és csatolás információtartományból nyert különböző magok közötti csatolások
HETLOC	Heteronuclear long-range couplings különböző magok közötti távolható csatolások
HMQC	Heteronuclear multiple-quantum coherence különböző magok közötti többkvantumú koherencia
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation különböző magok közötti
HSQC	Heteronuclear single-quantum coherence különböző magok közötti egykvantumú koherencia
HSQMBC	Heteronuclear single-quantum multiple-bond correlation különböző magok közötti egykvantumú többkötéses korreláció
INEPT	Insensitive nuclei enhanced by polarization transfer érzékeny magok jelének megnövelése polarizáció átvitelével
NMR	Nuclear magnetic resonance – mágneses magrezonancia
NOESY	Nuclear <i>Overhauser</i> effect spectroscopy mag <i>Overhauser</i> effektus spektroszkópia <i>az Overhauser effektusalapján működő módszer atomok közötti térközelség meghatározására, atomtávolságok kimérésére</i>
ROESY	Rotating-frame <i>Overhauser</i> effect spectroscopy <i>Overhauser</i> effektus spektroszkópia forgó vonatkoztatási rendszerben
spfge-se-	single pulse field gradient echo selective excitation egypulzusos gradiens visszhang szelektív gerjesztés
TOCSY	Total correlation spectroscopy – teljes korrelációs spektroszkópia
zqs-	zero-quantum suppressed – zéró-kvantum elnyomásos

A magyar nyelvű NMR spektroszkópiái szakirodalomban is túlnyomóan az angol szakkifejezések rövidítései használatosak fordítás nélkül.

1. Bevezetés

Az NMR spektroszkópia a kezdetektől [1-5] mostanáig folyamatos látványos fejlődésen ment keresztül. A szerves molekulák NMR szerkezetvizsgálata kezdetben még csak ^1H illetve ^{13}C spektrumok felvételéből, spektrumleírásából valamint a finomszerkezettel rendelkező jelek mintázatából és a felhasadásokból leolvasható/kiszámítható $J(\text{H-H})$ skaláris csatolási állandók spekulatív elemzéséből állt.

Az 1990-es évek elején bekövetkezett technológiai robbanás – inverz detektálás elterjedése, biztonságos spin-lock technika rutinszerűvé válása, gradiens pulzusok megjelenése – óta az NMR spektroszkópia alkalmazása egyre inkább a különböző korrelációs technikák felé tolódott el. Kétdimenziós (2D) [6-8] illetve szelektív egydimenziós [9] korrelációs mérések alapján egzaktul felépített homo- és heteronukleáris csatolási hálózatból vonhatunk le következtetéseket a vizsgált molekula háromdimenziós szerkezetéről. Feltérképezhetjük a keresztrelaxációs viszonyokat, melyek informálnak bennünket a kémiai kötésektől független geometriai viszonyokról, valamint megfigyelhetjük kémiai kicserélődési folyamatokat, ami alapján következtethetünk a molekula viselkedésére az idő függvényében. Az elérhetővé vált nagy térerejű és nagy érzékenységgű műszerek, valamint multidimenziós technikák [10] pedig jelentősen kitölték az NMR mérés technikával vizsgálható molekulaméretet a biopolimerek felé. Mindamellettt továbbra sem szabad megfeledkezni a szájon át bevehető gyógyszerek szokásos molekulaméretéről [11] és az ezen molekulák NMR szerkezetmeghatározása során használható módszerek fejlesztéséről, finomításáról sem.

Eddigi pályafutásom során ilyen kutatásokban és fejlesztésekben vettem részt. A dolgozat ezen munkáim közül a módszerfejlesztéseket, a fejlesztett módszerek validálását modellvegyületeken majd a beállított módszerekkel kutatási mintákon mért méréseim eredményeit tartalmazza.

2. Célkitűzések

Az NMR mérés során vizsgálni kívánt jelenség sok esetben nem figyelhető meg tisztán, hanem zavaró, nem kívánatos effektusok ülnek rá, torzítják, elfedik azt. Egyes esetekben pedig a vizsgálni kívánt jelenséget szándékosan más - könnyen mérhető - jelenségre ültetjük rá. A módszerfejlesztések célja sokszor olyan változatok kifejlesztése, melyek a vizsgálni kívánt jelenséget lehetőleg hűen, tisztán, és zavaró effektusok nélkül mutatják, hogy abból kvantitatív következtetéseket lehessen levonni. Ezért a mérési módszereinkbe szűrő, tisztító elemeket építünk be, hogy a nem kívánt zavaró effektusokat elnyomjuk vagy kiszűrjük. Mindamelllett a tisztító elemek beépítése lehetőleg ne okozza a kiküszöbölt helyett újabb zavaró hatások megjelenését, a jel/zaj viszony csökkenését, illetve a szükséges mérési idő extrém meghosszabbodását, ne legyen érzékeny a paraméterek kismértékű megváltozására vagy az optimális kísérleti paraméterektől való kisebb eltérésekre.

Dolgozatomban öt eredeti közlemény anyagát dolgozom fel. Ebből kettő elsőszerzős cikk NMR módszerfejlesztés témakörben; a heteronukleáris távolható csatolási állandó mérésére alkalmas HSQMBC módszer továbbfejlesztése valamint a dipoláris keresztrelaxációs folyamatokon keresztül térközelségek és kémiai csere-folyamatok mérésére alkalmas ROESY módszer továbbfejlesztése, a zqs-easy-random-ROESY változat. Mindkét módszerfejlesztés esetében, modellvegyületeken elvégzett mérések, illetve korábbi mérési módszerváltozatokkal összevetés igazolja a javasolt változat alkalmasságát. A módszerfejlesztések gyakorlati alkalmazását is bemutatom gyógyszerkutatói minták vizsgálatán keresztül, mely eredmények többszerzős, szerkezet-hatás összefüggést bemutató közleményben jelentek meg. Ez utóbbiakból csak a saját mérések bemutatására szorítkozom, ugyanakkor igyekszem bemutatni, hogy a javasolt NMR spektroszkópiai módszernek mindkét munkában jelentős szerepe volt kémiai reakcióutak tisztázásában. Megemlítem a spektroszkópiai vizsgálatok során a molekulák időbeli viselkedésére, mikroegyensúlyaira talált felismeréseimet is. A harmadik témához nem tartozik módszerfejlesztés, viszont az NMR spektroszkópiai mérések alapján tett felismerések jelentősen befolyásolták a téma folytatását.

A dolgozat egyes elemeinek egymástól való függetlensége indokolja a dolgozat rendhagyó, három szekcióra osztott szerkezetét, az irodalmi előzményeket, kísérleti részt, a kiértékelést és a gyakorlati alkalmazást szekciónként szétválasztva mutatom be.

A.Szekció Heteronukleáris skaláris csatolási állandók mérése, HSQMBC módszer fejlesztése és alkalmazása

A.3. Irodalmi háttér

A *Lipinsky*-szabályoknak [11] megfelelő kis és közepes méretű molekulák – a szájon át alkalmazott gyógyszermolekuláink ebbe a mérettartományba tartoznak – oldatfázisú NMR mérése során a ${}^nJ(\text{H,H})$ skaláris csatolási állandók általában könnyen leolvashatók. Ez alól kivételt képeznek a véletlenül átfedő jelek csatolásai és a kémiaiailag ekvivalens, viszont mágnesezen nem ekvivalens magokat tartalmazó spinrendszerekben fellépő csatolások. A véletlen jelátfedés miatt fellépő leolvashatatlanosság feloldható oldószerváltással vagy nagyobb térerejű műszeren történő méréssel, ahol a kérdéses jelek jó eséllyel elkülönülnek. Ezen csatolások alapján feltérképezhetők az aromás kapcsolódási viszonyok – *orto*, *meta* és *para* szomszédság -, valamint a Karplus összefüggést [12-16] felhasználva egyes telített gyűrűben fellépő konfigurációs és konformációs állapotok, hidrogén atomok illetve szubsztituensek axiális illetve ekvatoriális térállása [17]. A kémiaiailag ekvivalens, de mágnesezen nem ekvivalens magok spinrendszerében fellépő skaláris csatolási állandók – néhány speciális eset kivételével – csak a spinrendszer számítógépes szimulálásával határozhatók meg.

A szerves molekulák hidrogén és szén atomjai között fellépő heteronukleáris csatolás szintén hasznos információt hordoz a kémiai szerkezetre vonatkozóan. Ezeket mégis ritkábban mérjük, egyes mérésekből (pl. 1D ${}^{13}\text{C}$ -NMR mérés) felvételtechnikai módszerekkel kiiktatjuk, hogy ezzel mérési időt takarítsunk meg és nehezen értelmezhető felhasadásoktól szabaduljunk meg, máskor (INEPT illetve DEPT-135 mérés) csak a csatoló partnerek számának páros vagy páratlan voltára vonatkozó információt tartjuk meg, megint máskor (HMQC, HSQC, HMBC) csak a *ki* *kivel* csatol jellegű információt tartjuk meg, de a csatolási állandó értékét nem.

Az egykötéses ${}^1J(\text{H,C})$ heteronukleáris csatolás jelenléte nagyon könnyen egy nagyon érzékeny HSQC vagy HMQC méréssel megállapítható és az egymással csatoló -

egymással kémiai kötésben lévő ^1H és ^{13}C magok azonosíthatók. Az $^1J(\text{H,C})$ csatolási állandó [18] nagysága is gyorsan meghatározható egy átparaméterezett, ^{13}C -csatolt HSQC vagy HMQC mérésből. A rutinszerűen alkalmazott ^{13}C GARP lecsatolás kikapcsolásával a kívánt csatolási állandó értéke kellő pontossággal leolvashatóvá válik. Egyedüli gondot bizonyos extrém csatolási állandó értékek jelenthetnek, acetilénszármazékokban előforduló viszonylag nagy $^2J(\text{H,C})$ értékek illetve 200 Hz feletti $^1J(\text{H,C})$ csatolási állandók egyes heteroaromás vegyületekben, ortoészterekben, aldehidekben és acetilénszármazékok esetén. Ez utóbbi nehézség is könnyen kiküszöbölhető a mérés paraméterezése során a csatolási állandó optimum szokásos értékének megfelelő átállításával a várt extrém csatolási állandót jobban közelítő értékre.

A távolható $^nJ(\text{H,C})$ csatolások meglétét egyszerűen kimérhetjük a HSQC-nál közel egy nagyságrenddel érzéketlenebb HMBC mérési módszerrel. A távolható csatoló partnerek azonosítása alapján felépített heteronukleáris csatolási háló legtöbbször elegendő a molekula szerkezetének felderítéséhez. Bizonyos esetekben a csatolási hálónak több, izomer szerkezet is egyaránt megfelel, illetve a kivitelezett reakcióból elképzelhető két (vagy több) termék HMBC spektruma azonos mintázatot adhat. Ilyenkor a csatolási állandó nagysága [19-29] adhat olyan információt, ami alapján a lehetséges - általában izomer - szerkezetek közül választani lehet. Kismolekulák közül különösen a cukor származékok erre vonatkozó irodalma kiterjedt. Amíg a heteronukleáris egykötéses csatolási állandó mérésére csak egy módszer - a fentebb említett ^{13}C csatolt HSQC - használatos, addig a heteronukleáris távolható csatolási állandó megmérésére számos módszer és változat ismeretes az NMR spektroszkópia szakirodalmában. Habár voltak rá próbálkozások [34-37], a HMBC-nek nincs olyan egyszerű módosított változata, mely alkalmas lenne a keresett csatolási állandó kellő pontosságú kimérésére. Mindegyik ismert módszer érzéketlen a HMBC-hez képest. Gondot okoz az, hogy a heteronukleáris távolható csatolás kiépülésére szánt időben az ezekkel azonos nagyságrendbe eső $^nJ(\text{H,H})$ homonukleáris csatolások is kiépülnek, a spektrumban interferenciákat és jeltorzulásokat okozhatnak. Továbbá problémát okoz az is, hogy a keresett csatolási állandók nagyságrendje alig nagyobb a kétdimenziós NMR módszerekben rutinszerűen alkalmazott digitális felbontásnál. Ez utóbbi nehézséget, amennyiben a keresett heteronukleáris csatolási állandót a detektált dimenzió tartalmazza, a digitális pontsűrűség növelésével, amennyiben az indirekt dimenzió

tartalmazza, J -skálázással tehetjük pontosabban leolvashatóvá. A J -skálázás negatív következménye a relaxáció miatt az érzékenység csökkenése. A három kötésen keresztül fellépő $^3J(\text{H,C})$ csatolások az általánosított Karplus féle összefüggéssel torziós szögekké számíthatók át, illetve jól használható becslést adnak a molekula háromdimenziós szerkezetében meghatározó torziós szögekre.

A heteronukleáris távolható csatolási állandók mérésére alkalmas módszereket az 1. táblázatban foglaltam össze. A módszereket és változataikat több összegző cikk is ismerteti, illetve hasonlítja össze [30-33]. A szerteágazó irodalom is mutatja, hogy a kérdésben nincs egyértelműen, minden paraméterében legjobbnak ítéltető és ezért széles körben elterjedt és a többit a használatból kiszorító módszer.

A módszerek egy része (HSQC-HECADE, HETLOC, HSQMBC) információt ad a csatolási állandó előjelére, ami alapján valószínűsíthető lehet, hogy két vagy három kötésen keresztüli csatolással kell számolnunk. Máig nem áll rendelkezésre olyan egyszerű módszer, ami bármilyen multiplicitású ^{13}C jel esetén működik és a két- és háromkötéses távolható heteronukleáris csatolásokat egymástól el tudja választani.

Mіндеzen mérési módszerek fejlesztése közül a HSQMBC módszert alkalmaztam leggyakrabban [XI], illetve ennek fejlesztésébe kapcsolódtam be [XII-XIV és I], de a többivel [IX, XI] is – legalább módszerbeállítás szintjén – foglalkoztam.

Következő oldal:

1. táblázat: Heteronukleáris távolható csatolási állandók mérésére alkalmas módszerek összehasonlítása

Módszer	Leírás	Előnyök	Hátrányok	Iskola, Referencia
Fázisérzékeny nagyfelbontású HMBC	A szokásos magnitúdó módú feldolgozás helyett nagyobb felbontású mérés és fázisérzékeny feldolgozás majd modell-számítások	Szingulett ^1H jel és viszonylag nagy távolható heteronukleáris csatolási állandó esetén ad megbízható eredményt	Általános esetben a bonyolult modellező számítás ellenére is csak közelítő értéket ad	Keeler [34-37]
J -HMBC	HMBC az indirekt dimenzióban a csatolási állandó skálafaktor-szorosával feloszorított felhasználásokkal	Viszonylag érzékeny inverz detektált a csatolási állandó értéke egyszerűen kinyerhető	J -skálázást igényel, hosszú kiépülés alatt relaxáció Magnitúdó mód, széles jelek Felbontás – skálázás - csatolási állandó optimum szabadsági fok probléma	Willker, Leibfritz [38] (3D) Furihata, Seto [39] Sorensen [40]
Szelektív J -HMBC	Előbbi ^{13}C -szelektív változata	inverz detektált a csatolási állandó értéke egyszerűen kinyerhető nem igényel J -skálázást	Magnitúdó mód, széles jelek Elkülönülő ^{13}C jelet igényel Szelektív ^{13}C pulzusokat igényel	Fündelisen, Berger [41] Furihata, Tashiro, Seto [42-44]
Szelektív J -INEPT	Egyszerű, ^1H -szelektív	Egyszerű szekvencia A keresett csatolási állandó könnyen leolvasható	Magnitúdó mód, széles jelek ^{13}C -detektált, érzéketlen Elkülönült ^1H jelet igényel	Bax [45] Hricovini, Liptaj [46]
HETLOC	TOCSY spektrum, az indirekt dimenzióban $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$, a detektált dimenzióban $^n\text{J}(\text{C},\text{H})$ csatolásokkal modulálva	Kis csatolási állandók mérésére is alkalmas, alsó határ a digitális felbontás	Viszonylag bonyolult paraméterezés és adatfeldolgozás Kvaterner ^{13}C magokra nem működik TOCSY transzfer szükségessége a két hidrogén atom között, melyek egyike és a másik pillér szénatomja között a csatolási állandót mérni akarjuk Információt ad a csatolási állandó előjeléről	Schmieder, Kuruz, Kessler [47-48] Uhrin, Batta, Kövér, Hruby, Barlow [49]
HSQC-HECADE	HSQC-TOCSY spektrum, az indirekt dimenzióban $^1\text{J}(\text{C},\text{H})$, a detektált dimenzióban $^n\text{J}(\text{C},\text{H})$ csatolásokkal modulálva	Kis csatolási állandók mérésére is alkalmas, alsó határ a digitális felbontás Egyszerű paraméterezés Nem igényel J -skálázást Információ $^n\text{J}(\text{C},\text{H})$ előjeléről	Érzéketlen Kvaterner ^{13}C magokra nem működik TOCSY transzfer megléte szükséges a két hidrogén atom között, melyek egyike és a másik hidrogén pillér szénatomja között a csatolási állandót mérni akarjuk	Kozminski, Nanz [50-51]
EXSIDE	Sávszelektív gerjesztéssel működő J -HMBC-szerű képet adó módszer	Az alkalmazható J -skálázás miatt kis csatolási állandók is leolvashatók	A szekvencia sávszelektív ^1H pulzusokat tartalmaz, emiatt aprólékos előkészítésre van szükség Egy molekula felterképezése is több mértést igényel	Krishnamurthy [52]
HSQMBC	Több kötés távolságra optimalizált HSQC Antifázisú jelek a detektált dimenzióban	Egyszerűen paraméterezhető Viszonylag érzékeny Tiszta fázisú jeleket ad	A korai változatokban a homo- és heteronukleáris csatolások között interferencia lép fel, ami a jelalakot torzítja, a leolvást nehezíti vagy lehetetlenné teszi	Williamson, Gerwick, Márquez, Kövér, Lacerda, Batta, Fehér [53-55, 57, 60-64]
Szelektív 1D HSQMBC	Az előbbi szelektív 1D változata	Nagyobb pontosság, mint a 2D HSQMBC esetén	Érzéketlen Elkülönülő ^{13}C jelet igényel	Williamson, Gerwick, Márquez, Kövér [54]

A.3.1. Közvetlen irodalmi előzmények

Az első heteronukleáris távolható csatolás, illetve csatolási állandó mérésére alkalmas egykvantumú átmeneten keresztül működő módszerváltozatot *Marek és munkatársai* publikálták [53]. Módszerük a HSQC távolható csatolásra történő optimalizálásán alapult, hátránya volt, hogy az azonos nagyságrendbe eső homonukleáris és heteronukleáris csatolások interferenciája előre nehezen kiszámítható jeltorzulásokat okozott. *Williamson és munkatársai* tisztító elemek (trim pulzus és DANTE illetve BIRD pulzusblokkok) beépítésével igyekeztek kiszűrni az egykötéses távolható csatolások jeleit [54-55]. *Köck, Kerssebaum és Bermel* az inverz-detektált heteronukleáris 2D módszerekben a ^{13}C csatornán a hagyományos, nagy kimenőteljesítményű 180° -os pulzusok helyett adiabatikus invertáló és refókuszáló pulzusok alkalmazását javasolták, az adiabatikus pulzusok alkalmazásának előnyeit egy nagyon érzéketlen módszer – az ADEQUATE – példáján illusztrálták [56], G-BIRD-adiabatikus-HSQMBC módszerváltozatuk (1. ábra) bekerült a Bruker pulzusprogramkönyvtárába. *Koskela és munkatársai* [57] a relaxációs mérésekből régről ismert *Carr, Purcell, Meiboom és Gill* kutatók nevének kezdőbetűi alapján CPMG-nek [58-59], más irodalomban XY-16-nak nevezett elemet építették be a szekvenciába a homonukleáris csatolások párhuzamos kiépülése miatt bekövetkező jeltorzulások kiszűrése érdekében. Módszerük a 180° -os pulzusok sorozatos alkalmazása miatt precíz egyedi kalibrálást igényel. *Koskela és munkatársai* [60] illetve *Lacerda és munkatársai* [61] kombinálták a CPMG-szűrőt a G-BIRD szűrővel. *Kövér és munkatársai* [62] a CPMG szűrő kompozit pulzusokat alkalmazó változatát javasolták a módszerbe építeni, kihasználható a kompozit pulzusnak azt az előnyös tulajdonságát, hogy kevésbé érzékeny a pulzuskalibrálás kis hibáira. Ez utóbbi módszerváltozatnak hátránya, hogy a kompozit pulzus megkétszerezi az egyébként is sűrűn kiadandó 180° -os pulzusok idejét, fűti a mintát, illetve a mérőfejet.

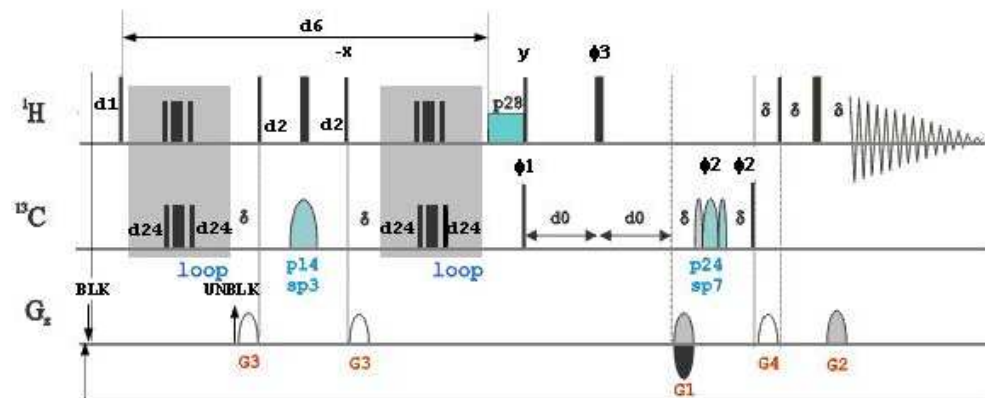
A.4. Módszerek - Saját fejlesztések a HSQMBC módszerén

A.4.1. 2D HSQMBC

Az E. Kövér Katalinnal közösen fejlesztett saját HSQMBC változatunk [XII, XIII, I] (2. ábra) ötvözi az egymástól független fejlesztői műhelyekből származó korábban említett előnyös módosításokat; G-BIRD szűrőt az egykötéses csatolások kiszűrésére, az adiabatikus ^{13}C invertáló és refókuszáló pulzusokat, valamint a kompozit-CPMG szűrőt a homonukleáris csatolások kifejlődésének lecsatolására. Saját fejlesztésű elem az, hogy a kompozit CPMG szűrő teljesítményét kisebbre vettük, helyette a pulzus idejének megnövelésével érjük el a kívánt hatást. Az általunk javasolt módszerváltozatban a CPMG kimenő teljesítménye nem a gerjesztő pulzusok nagy teljesítményével egyezik meg, hanem az ^1H csatornán a TOCSY mérés során alkalmazott spin-lock kisebb teljesítményével, a ^{13}C csatornán pedig egyidejűleg pontosan azonos hosszúságú és számított teljesítményű pulzust adunk. Az ily módon alkalmazott kompozit ^{13}C pulzusok sávszélessége elegendő a teljes ^{13}C jeltartomány átfedésére. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy amennyiben a pulzusszekvenciában előforduló utolsó gradiens pulzus és az adatgyűjtés között rövid az idő, akkor az utolsó gradiens pulzus után és adatgyűjtés előtt elhelyezett „gradient blanking” kapcsolás zajt vihet a jelek alakjába, ami csak nagyon precíz műszerbeállítással (a lock fázis nagyon precíz beállításával) előzhető meg, melynek sikere csak a mérés végeztével állapítható meg kellő biztonsággal. A jelenség akkor különösen feltűnő, amikor - mint a HSQMBC esetében - a detektált dimenzióban viszonylag nagy felbontással és jó jel/zaj viszonyal mérünk. Ez a zaj kiküszöbölhető, ha a „gradient blanking” kapcsolást az adatgyűjtés utánra – ciklusszervezési okok miatt a szekvencia elejére – helyezzük át. Mindezen beépített tisztító elemek változatlanul hagyják a mérés időtartamát, nem okoznak jel/zaj viszony csökkenést, viszont előnyösen befolyásolják a keresett csatolási állandók leolvashatóságát. A 2. ábra tartalmazza a javasolt HSQMBC változat folyamatábráját és javasolt paraméterezését. A mérőprogram forráskódja a függelékben található.



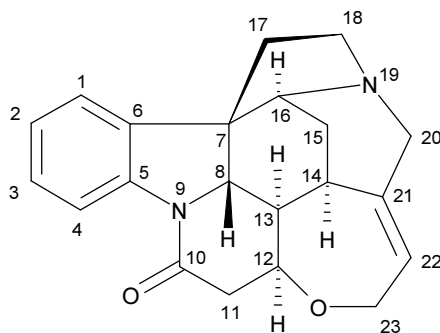
1. ábra. HSQC ed et gp jc lr nd – A Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető HSQMBC változat folyamatábrája. Vékony illetve vastag vonalak reprezentálják a 90 illetve 180°-os nagy kimenőteljesítményű pulzusokat. $d6 = 1/2J_r$ várakozás alatt történik meg a heteronukleáris távolható csatolások kifejlődése, ennek közepén elhelyezett G-BIRD elem szűri ki a egykötéses csatolásokat, $d2 = 1/(2 \cdot J)$. A mágnesezettséget INEPT pulzuspár viszi át a szénre, ott történik a második dimenzió kiépülése, majd a szén mágnesezettség refókuszálása. Inverz INEPT pulzuspár viszi vissza a mágnesezettséget a hidrogénre. G1 és G2 szelektációs gradiens pulzuspár gondoskodik a mindvégig hidrogénen volt mágnesezettség teljes defókuszálásáról.



2. ábra. A javasolt kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC változat folyamatábrája. A heteronukleáris csatolások kiépülési idejének kis kimenőteljesítményű – szürke blokkban alacsonyabbnak rajzolt – kompozit CPMG lecsatoló pulzusokkal való feltöltése lehetővé teszi a heteronukleáris távolható csatolások folyamatos kiépülését, ugyanakkor elejét veszi a $J(H,H)$ homonukleáris csatolások kiépülésének. $d24 = 120-180 \mu\text{sec}$, miáltal a kompozit CPMG elemek 240-360 μsec időközönként követik egymást. a CPMG blokkban alkalmazott ^1H pulzus hossza és kimenőteljesítménye megegyezhet a TOCSY spin-lock pulzussal ($P_{90^\circ}(\text{TOCSY}) = 25-30 \mu\text{sec}$), a vele párhuzamosan alkalmazott ^{13}C pulzus ideje ugyanennyi, kimenőteljesítménye pedig asszerint számított érték, hogy a mágnesezettség kívánt 90 illetve 180°-os elforgatását elérje. A BLKGRAD parancs áthelyezve az adatgyűjtés utánra, hogy a kapcsolás során keletkező örvényáramok ne interferálhassanak a detektált jellel. A gradiens pulzusok javasolt értékei: G1 : G2 : G3 : G4 = 80 : 20.1 : 17 : 11 %.

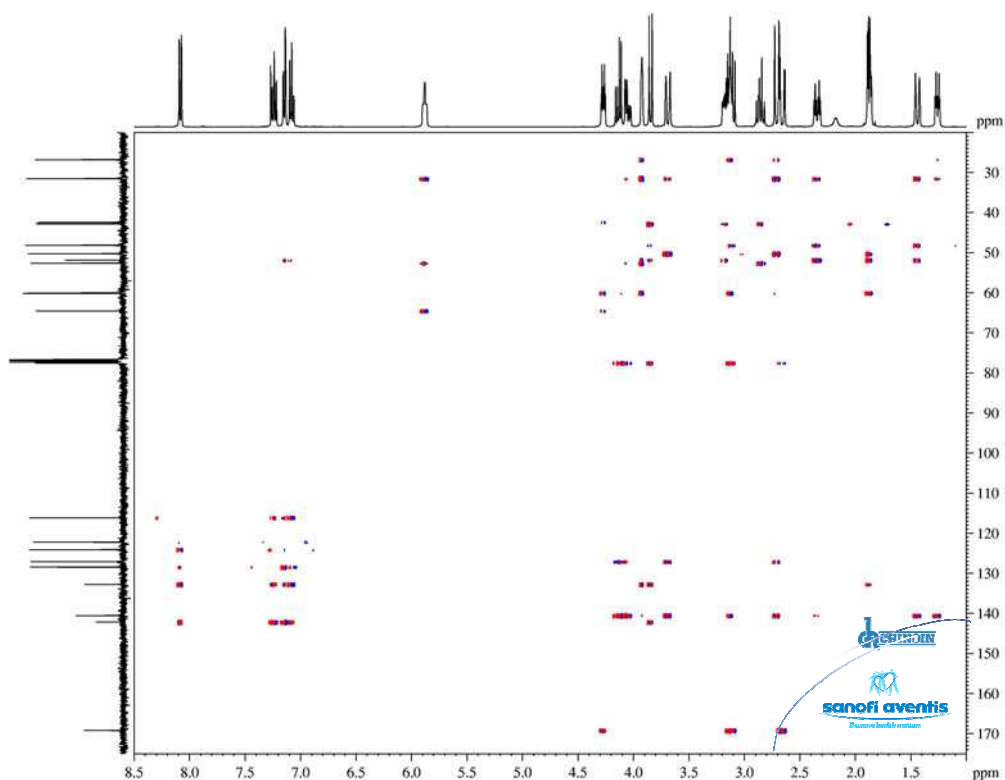
A.5. Megbeszélés – modellvegyület vizsgálata

A sztrichninnek (3. ábra) az általunk javasolt változat alkalmazásával és a Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető HSQMBC változattal mért spektrumait (4. ábra). A keresett csatolási állandó antifázisú multiplettekben az 5. ábrán bemutatott többféle módon olvasható le vagy spektrumszimulálással állapítható meg.

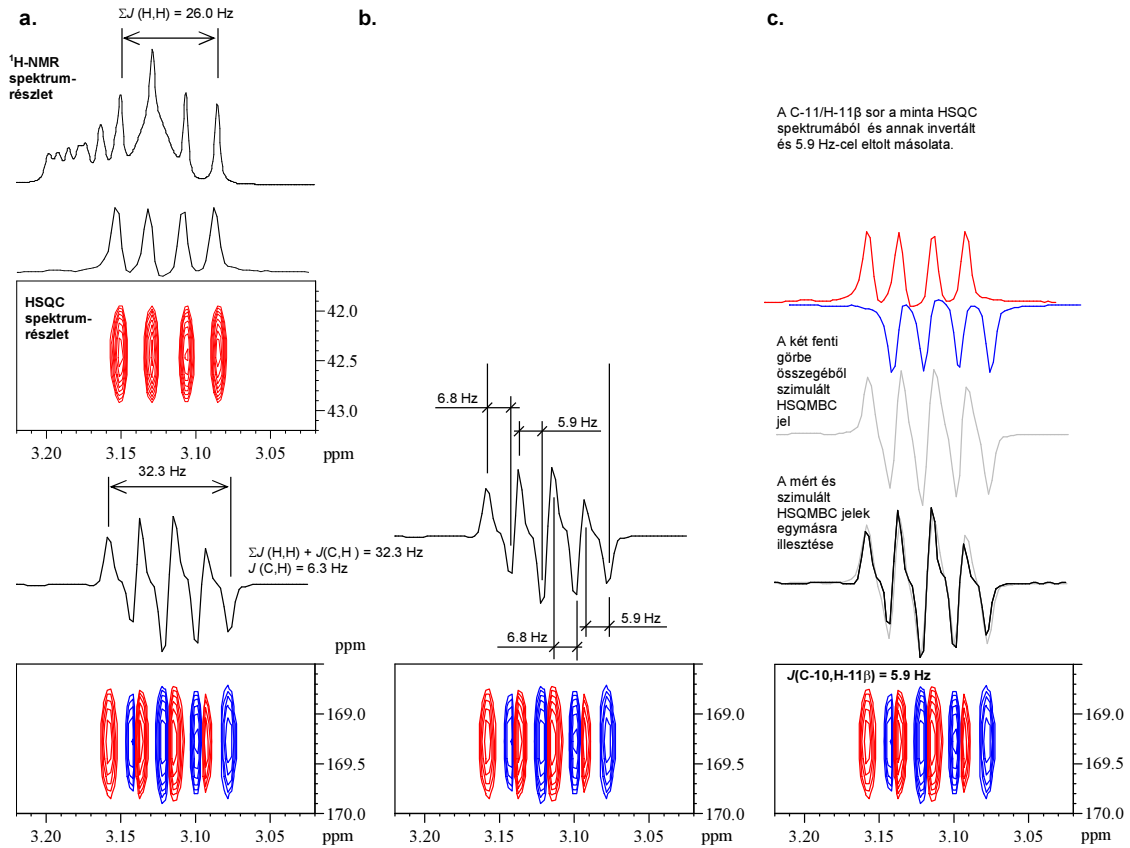


3. ábra. A modellvegyületként használt sztrichnin szerkezeti képlete a váz atomjainak szokásos számozásával. Molekulatömeg: 334.42, összegképlet: $C_{21}H_{22}N_2O_2$

Az 6-8. ábrákon a módszerváltozat robusztusságát és pontos leolvashatóságát demonstrálom, összevetve a korábbi irodalmi HSQMBC változatokkal felvett spektrumokkal. A 6. ábrán bemutatott spektrumrészletek alapján 6-8 Hz-et javaslok a heteronukleáris távolható csatolási állandó optimumaként a mérés paraméterezésekor. Ez megfelelő a várható csatolási állandók majdnem teljes tartományára. Ekkor számottevő relaxációs intenzitás-veszteséggel nem kell számolnunk, de a kis csatolások is már kellő intenzitással megjelennek a spektrumban. Viszonylag nagy – 10 Hz fölötti – csatolások várható megjelenése esetén figyelembe kell venni, hogy a csatolási állandó beállított optimumának kétszerese nulla intenzitással jelenik meg - vagyis nem jelenik meg - a spektrumban.



4. ábra. A sztrychninnek a javasolt kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC módszerrel felvett HSQMBC spektruma, kloroformban, Bruker Avance II 400 műszeren, 27 °C-on. 35 mg sztrychnin 0.6 ml deuteriokloroformban. Spektrumablak 10-0 ppm, 4096 adatpont, 8 scan az ^1H és 180-0 ppm, 256 léptetés a ^{13}C dimenzióban, a teljes mérési idő 55 perc. Relaxációs várakozás: 1 sec, $^nJ(\text{CH})_{\text{opt}} = 6.5 \text{ Hz}$, $^1J(\text{C,H})_{\text{opt}} = 145 \text{ Hz}$, $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 9.0 \mu\text{sec}$, -4 dB (24.6 W), $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 8.3 \mu\text{sec}$, -3 dB (69.7 W). A CPMG blokkban alkalmazott ^1H pulzus a TOCSY lecsatolópulzussal egyező $P_{90^\circ} = 30 \mu\text{sec}$, a vele párhuzamosan alkalmazott ^{13}C pulzus ideje ugyanennyi, kimenőteljesítményük 6,64 dB (2.2 W), illetve 8.16 dB (5.3 W), $d_{24} = 140 \mu\text{sec}$, így a CPMG blokk teljes ideje 120 μsec . Adatfeldolgozás: lineáris predikció a ^{13}C dimenzióban 512-ig, majd zéró töltés 1024-ig. QSINE ablakfüggvény $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), mindkét dimenzióban végül 2D Fourier transzformáció és kézi fázisállítás mindkét dimenzióban. Az adatmátrix végső mérete 4096*1024 adatpont, a digitális felbontás a keresett csatolási állandó leolvashatósága szempontjából lényeges ^1H dimenzióban 1 Hz/pont.



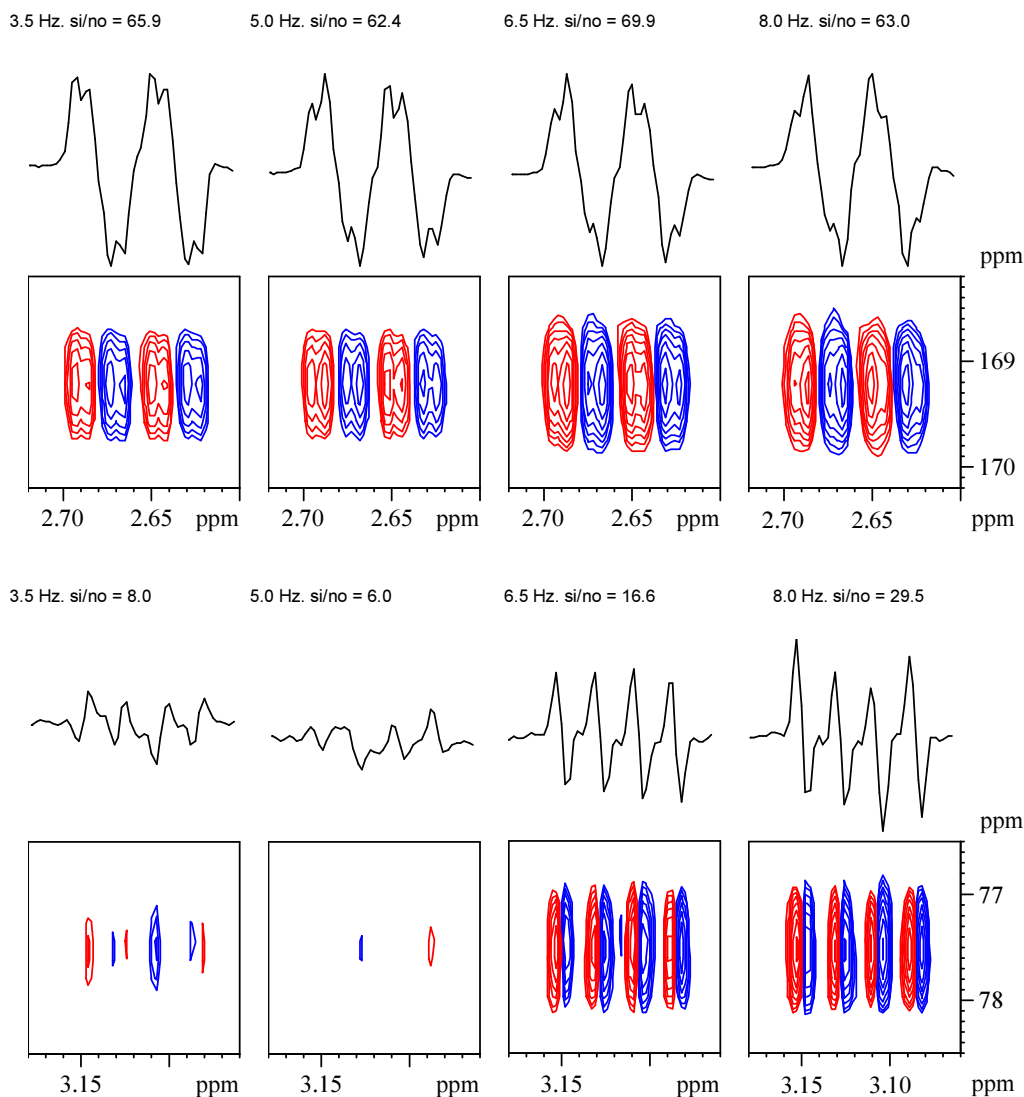
5. ábra. A keresett csatolási állandó kinyerésének lehetséges módszerei a HSQMBC spektrumból, a sztrichnin HSQMBC spektrumának C-10/H-11 β keresztcsúcsán demonstrálva.

a.) Az $^1\text{H-NMR}$ spektrumból általában, a megfelelően nagy felbontású HSQC spektrumból pedig majdnem mindig, a két szélső vonal távolságaként könnyen leolvasható a jelben fellépő $J(H,H)$ csatolási állandók összege. A HSQMBC spektrum sorában a jel két egymással ellentétes fázisú szélső vonalának távolsága ennél a keresett heteronukleáris távolható csatolási értékével nagyobb.

b.) A HSQMBC spektrum sorában az egymásnak megfelelő ellentétes fázisú spektrumvonalak távolsága a keresett heteronukleáris távolható csatolási állandó értéke. Több spektrumvonal-pár között is leolvasható, értéke az esetleges torzulások és a digitális felbontás miatt statisztikus szórást mutat.

A fenti módszereknél a keresett heteronukleáris távolható csatolási állandó leolvasása a kinagyított 2D jelen és a 2D-ből kiemelt soron egyaránt elvégezhető.

c.) A HSQMBC-vel azonos mérési körülmények (spektrumablak mérete, pozíciója és a digitális felbontás egyezzen meg) között felvett HSQC spektrum megfelelő sorát kiemelve invertálva, egymástól eltolva és összeadva szimuláljuk a HSQMBC spektrum sorát. A mért és szimulált görbe közötti eltérés akkor lesz minimális, amikor az eltolás mértéke megegyezik a keresett csatolási állandóval.



6. ábra. Két kiválasztott jel jelalakjának és jel/zaj viszonyának függése a csatolási állandónak a mérés paraméterezése során beállított optimumától.

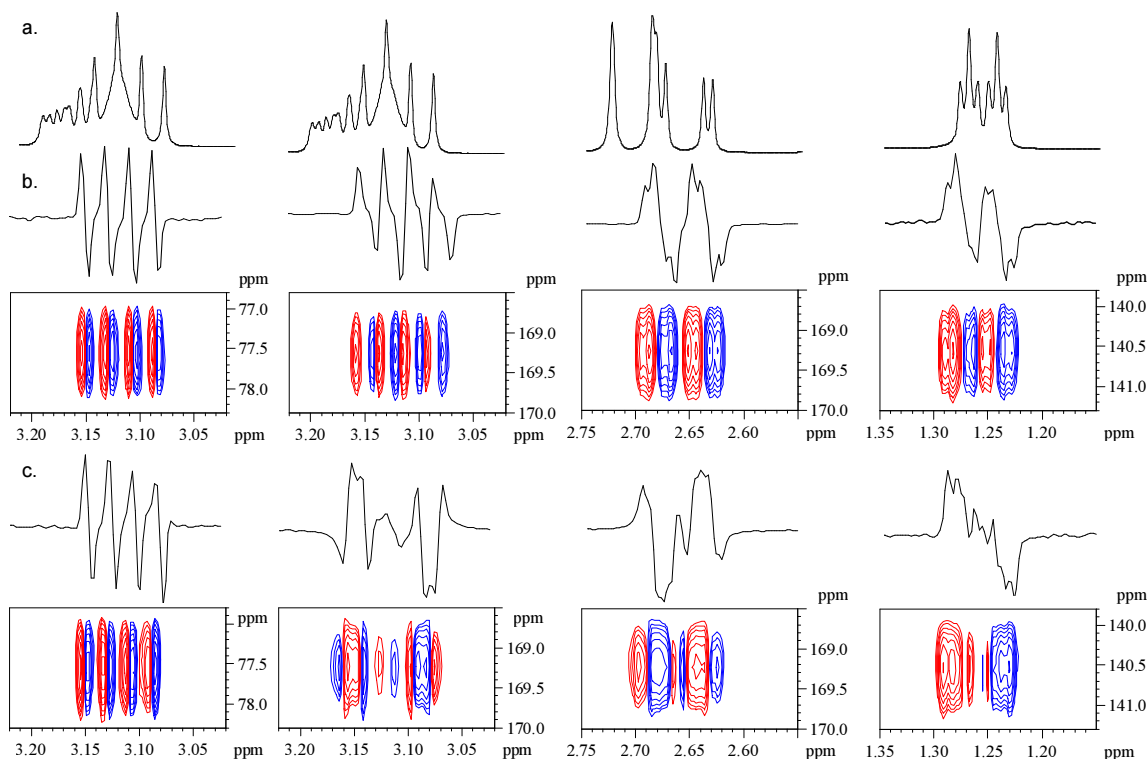
Felső sor a C-10/H-11 α keresztcsúcs, $J = 7.9$ Hz.

Alsó sor a C-12/H-11 β keresztcsúcs, $J = 2.8$ Hz

Egyes esetekben – amikor a relaxációs viszonyok optimálisak – a jelek a mintázata és az intenzitása csak kismértékben függ a csatolási állandó beállított optimális értékétől. – felső sorozat.

De más esetekben – amikor a relaxáció gyorsabb – a jelek intenzitása drasztikusan csökken, ha a mérést túl kicsi heteronukleáris távolható csatolási állandóra – ezáltal hosszú csatolás-kifejlődési időre - optimalizáljuk. – alsó sorozat.

A beállított optimális csatolási állandó és a jel/zaj viszony a spektrumrészletek fölött olvasható.



7. ábra. Válogatott HSQMBC keresztcsúcsok.

Balról jobbra haladva:

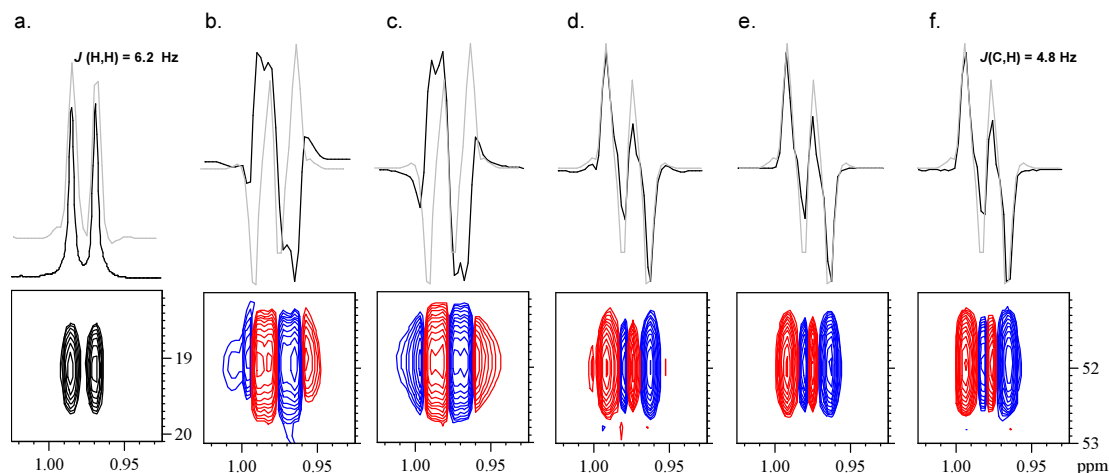
C-12/H-11 β , $J = 2.8$ Hz; C-10/H-11 β , $J = 2.6$ Hz;

C-10/H-11 α , $J = 7.9$ Hz és C-21/H-13, $J = 7.2$ Hz

- a.) Az ^1H -NMR spektrum részlete. Egyes helyeken a vizsgált jel átfedésben van más jelekkel.
- b.) Válogatott keresztcsúcsok a saját változat HSQMBC módszerrel felvett spektrumból. Mindegyik jel fölött a 2D spektrum megfelelő sorának részlete. Az összes jel tisztán adja a heteronukleáris távolható csatolások okozta mintázatot.
- c.) Válogatott keresztcsúcsok a Bruker gyári változat HSQMBC módszerrel felvett spektrumból. Mindegyik jel fölött a 2D spektrum megfelelő sorának részlete. Egyes jeleken megfigyelhetők a heteronukleáris és homonukleáris csatolások interferenciája miatt bekövetkezett jelalak-torzulások.

Az első oszlopban nincs lényeges különbség a kétféle módszerváltozattal mért jelek alakja között. A második és harmadik oszlopban a Bruker gyári változattal felvett spektrumból a csatolások interferenciája miatt nem olvasható ki a keresett csatolási állandó. A negyedik oszlopban az interferencia hatása kisebb.

Előre nehezen megjósolható, hogy mely jeleken várható a különböző csatolások miatt bekövetkező interferencia és melyeken nem.



8. ábra. A BLKGRAD parancs helyének hatása a jelalakra. A modellvegyület *cis*-2,6-dimethyl-morfolin DMSO- d_6 -ban. A HSQMBC spektrumrészletek fölött a szürke görbe a HSQC spektrum megfelelő sorából szimulált HSQMBC görbe, a fekete görbe pedig az aktuális HSQMBC spektrum sora. Az illeszkedés akkor volt a legjobb, amikor az eltolás 4.8 Hz volt.

a.) A metil csoport HSQC jele. A fekete görbe az ^1H -NMR spektrum részlete. A szürke görbe pedig a HSQC spektrum sorának részlete, amit a HSQMBC spektrumok szimulációjánál használtam.

b.) HSQCetgpcjlrnd nevű (Bruker gyári változat) pulzusprogrammal felvett G-BIRD adiabatikus HSQMBC spektrum részlete, a BLKGRAD parancs az utolsó gradiens pulzus és az adatgyűjtés között, közvetlenül az adatgyűjtés megkezdése előtt. Nemszimmetrikus oldalsávok figyelhetők meg a jel két oldalán, mivel a BLKGRAD kapcsolás okozta örvényáramoknak nem volt elég idejük lecsengeni, valamint a mintázat torzult a $J(\text{H,H})$ homonukleáris csatolások együttes kiépülése során bekövetkező interferenciák miatt.

c.) az előbbi pulzusprogram azzal a módosítással, hogy a BLKGRAD parancs az adatgyűjtés utáni helyre került. Csak a $J(\text{H,H})$ homonukleáris csatolások együttes kiépülése miatti jeltorzulások láthatók.

A b.) és c.) méréseknél semmilyen eltolási paraméterrel sem található jó illesztés a mért HSQMBC görbe és a HSQC-ből szimulált lehetséges HSQMBC görbék között.

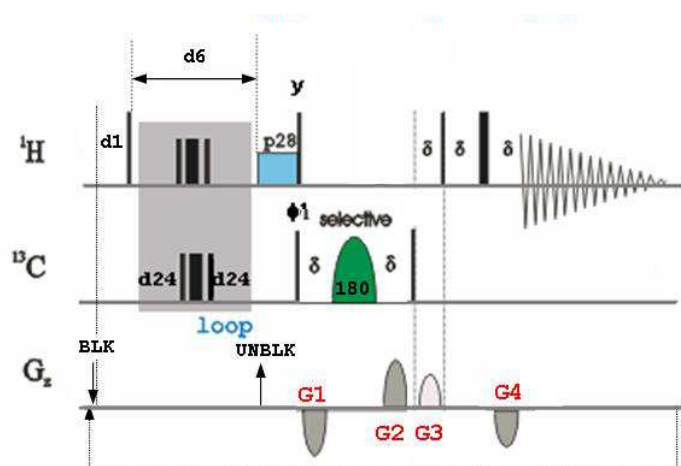
d.) nagy kimenőteljesítményű kompozit-CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC, a BLKGRAD parancs az utolsó gradiens pulzus és az adatgyűjtés megkezdése között. A mért és számolt spektrumgörbe illeszkedése jó, a mért spektrumgörbén a jel tövében – a b.) ábrán is láthatóval egyező - aszimmetrikus oldalsávok láthatók.

e.) nagy kimenőteljesítményű kompozit-CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC, a BLKGRAD parancs az adatgyűjtés után. A $J(\text{H,H})$ homonukleáris csatolások együttes kiépülését a CPMG blokk megakadályozza, a mért HSQMBC görbén nem jelentkeznek a homonukleáris csatolás okozta interferenciák, a javasolt pozícióba áthelyezett BLKGRAD parancs miatt aszimmetrikus torzulások sincsenek a mért görbén, az ezzel a módszerváltozattal felvett HSQMBC spektrumból a keresett heteronukleáris távolható csatolási állandó megbízhatóan meghatározható.

f.) kis kimenőteljesítményű kompozit-CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC a javasolt pozícióban a BLKGRAD parancs. A jel alakja megegyezik az e.) ábrán látható jelalakkal. A hosszabb ideig alkalmazott kis kimenőteljesítményű lecsatolás is elégséges a $J(\text{H,H})$ csatolások kiépülésének megakadályozására, viszont a kisebb kimenőteljesítmény miatt ez a módszerváltozat lényegesen biztonságosabb, mint az előbbi.

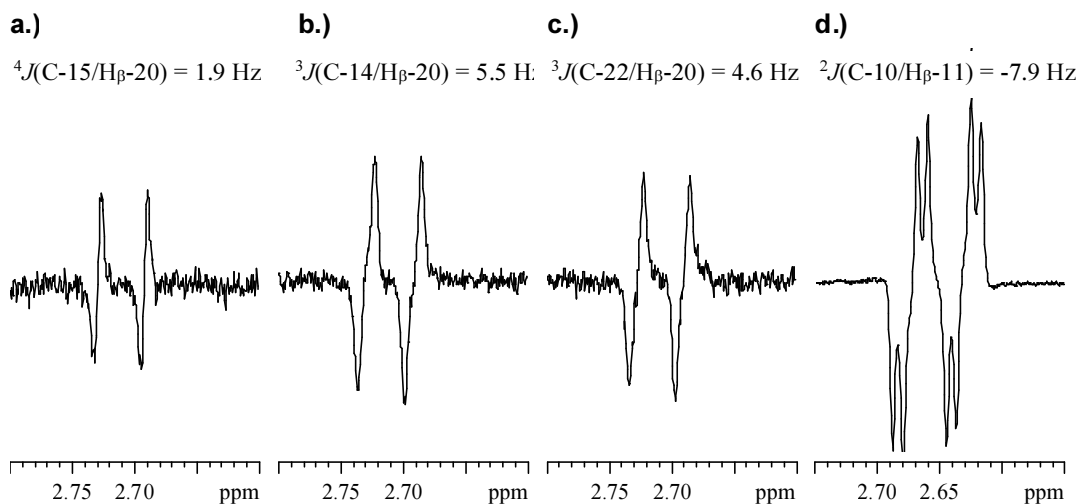
A.5.1. Szelektív 1D HSQMBC változat

Elkészítettem és teszteltem az előbbieken ismertetett 2D HSQMBC változat szelektív 1D megfelelőjét is (9. ábra). A szelektivitást egyetlen szelektív refókuszáló 180° -os ^{13}C pulzus beiktatásával lehet elérni. Az adiabatikus pulzusok immár szükségtelenné válnak, ugyanis az egyetlen érdekes, értékes ^{13}C jel a paraméterezés következtében biztosan on-rezonancia helyzetben van. Ugyancsak szükségtelenné válik az egykötéses csatolások kiszűrésére alkalmazott G-BIRD elem. A módszerrel felvett szelektív 1D spektrumok releváns részleteit a 10. ábrán mutatom be.



9. ábra. A javasolt szelektív 1D kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG HSQMBC változat folyamatábrája.

Hasonlóan a korábban ismertetett 2D változathoz, a vékony illetve vastag vonalak reprezentálják a 90° illetve 180° -os nagy kimenőteljesítményű pulzusokat. A heteronukleáris csatolások kiépülési idejének kis kimenőteljesítményű – szürke blokkban alacsonyabbnak rajzolt – kompozit CPMG lecsatoló pulzusokkal való feltöltése lehetővé teszi a heteronukleáris távolható csatolások folyamatos kiépülését, ugyanakkor elejét veszi a $J(\text{H,H})$ homonukleáris csatolások kiépülésének. $d24 = 120\text{--}180\ \mu\text{sec}$, miáltal a kompozit CPMG elemek $240\text{--}360\ \mu\text{sec}$ időközönként követik egymást. A CPMG blokkban alkalmazott ^1H pulzus hossza és kimenőteljesítménye megegyezhet a TOCSY spin-lock pulzussal ($P_{90^\circ}(\text{TOCSY}) = 25\text{--}30\ \mu\text{sec}$), a vele párhuzamosan alkalmazott ^{13}C pulzus ideje ugyanennyi, kimenőteljesítménye pedig asszerint számolt érték, hogy a mágnesezettség kívánt 90° illetve 180° -os elforgatását elérje. A kétdimenziós változatban alkalmazott G-BIRD szűrő itt szükségtelen, hiszen a szelekció során alkalmazott sáv szélesség nem éri el az egykötéses csatolások felhasadásának mértékét. A szelekciót 180° -os szelektív ^{13}C refókuszáló pulzus alkalmazásával érjük el. A BLKGRAD parancs áthelyezve az adatgyűjtés utánra, hogy a kapcsolás során keletkező örvényáramok ne interferálhassanak a detektált jellel. A módszerváltozat Bruker műszeren alkalmazható forráskódja alább található. A gradiens pulzusok javasolt értékei: $G1 : G2 : G3 : G4 = -40 : 40 : 10 : -20$



10. ábra. Válogatott multipletek a sztrichnin kis kimenőtéljesítményű kompozit CPMG szelektív 1D HSQMBC spektrumaiból. 40 ms hosszúságú 180° -os Gauss formázott pulzust alkalmaztam az a.) C-15 (CH_2), b.) C-14 (CH), c.) C-22 (CH) és d.) C-10 (C) jeleken. A szelektív 1D változat lényegesen érzékenyebb a kvaterner ${}^{13}\text{C}$ atomok jelein, mint a CH, CH_2 és CH_3 csoportok jelein.

A HSQMBC módszer korábbi változatát az IVAX Gyógyszerkutató Intézet Kft-ben Bruker Avance 500 típusú készüléken mérve sikeresen alkalmaztam borrelidin (antibiotikus hatású, gyógyszerre nem fejlesztett makrolakton molekula), és izomerének szerkezetfelderítése során. A munkából iparjogvédelmi okok miatt referált közlemény nem született. [X]

Ugyancsak sikerrel alkalmaztam a korábbi változatot a Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Szerves Vegytani Intézet kutatóival együttműködve tercier-amino effektus gyűrűzárás kiindulási anyagának és termékeinek szerkezetfelderítése során. [XI]

A.5.2. A HSQMBC módszer más fejlesztései

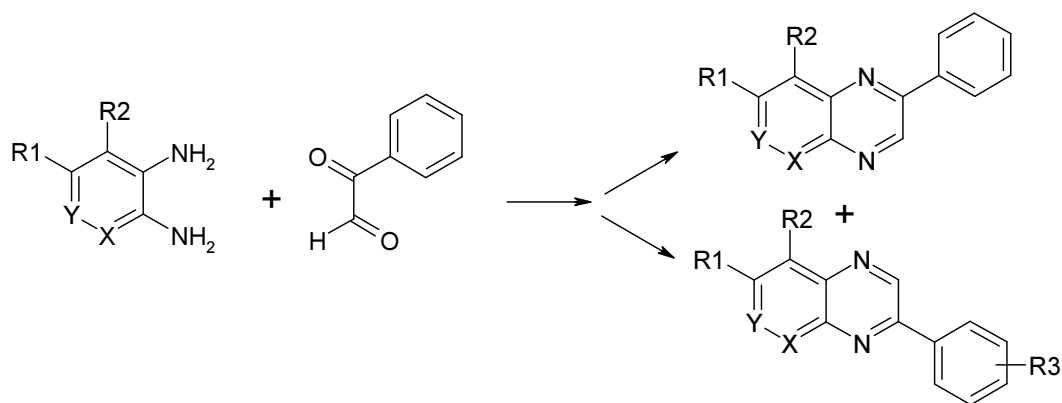
Későbbiek során más szerzők a módszeren további módosításokat javasoltak. *Kobzar és Luy* javasolták a CPMG elem beiktatását a G-BIRD szűrő belsejébe is [63], ez a változtatás kis kimenőteljesítményű CPMG esetén nem kivitelezhető, mivel a kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG blokk - hosszabb pulzusidővel - a rendelkezésre álló időbe már nem fér be az elem teljes fázisciklusa. *Parella és munkatársai* javasolták a módszer inverz-INEPT transzfer részébe a kiépüléssel egyező idejű várakozás beépítését [64], mely során a mágnesezettség refókuszálható. Az így kapott CLIP-CLAP-HSQMBC dupla mérésidő alatt felvett két spektrumából sorok összeadásával és kivonásával a homonukleáris csatolás okozta mintázat kiiktatható, a keresett csatolási állandó a saját változatunkból lehetséges 0.5-1 Hz pontosság helyett 0.25-0.5 Hz pontossággal olvasható le. *Parella és munkatársai* [65-68], illetve párhuzamosan *Kövér és munkatársai* [69-71] javaslatot tettek további javításokra, köztük pszeudo-3D HSQMBC-re, ahol a homonukleáris csatolás okozta elemek a mintázatból spektrummanipuláció nélkül kiiktathatók, ennek ára 16-szoros vagy 32-szeres mérésidő egy amúgy is kevésbé érzékeny mérési módszer esetén. Kövér Katalin munkacsoportjának ezirányú munkájában már nem vettem részt, illetve a későbbi fejlesztéseket nem állt módomban kipróbálni, a ViChem Kft-ben lévő 300 MHz-es műszer korlátozott érzékenysége ezt már nem tette lehetővé. 2016-ban megjelent egy minden korábban a témában működő szerzőtől független publikáció [72] a módszer további fejlesztéséről illetve lehetőségeiről.

A.6. Eredmények – A javasolt HSQMBC módszerváltozat sikeres alkalmazása valós szerkezeti probléma megoldására

A.6.1. Kémiai háttér

Az előző alfejezetben bemutatott HSQMBC módszerváltozatot a Vichem Kft-ben sikeresen alkalmaztam egymáshoz képest *orto* helyzetben két, egymástól *orto* helyzetben lévő amin szubsztituenst tartalmazó aromás vegyületek és alfa-keto-aldehidek reakciója során keletkezett biciklus izomerek megkülönböztetésére [II]. További szubsztituenst is tartalmazó 2,3-diamino-piridin kiindulási anyagból pirido-pirazin izomer pár, további szubsztituenst is tartalmazó 1,2-diamino-benzol kiindulási anyagból kinoxalin izomer pár keletkezik.

A kivitelezett reakció körülményei között két termék keletkezett, melyeket oszlopkromatográfiával a legtöbb esetben sikerült elválasztani (11. ábra). A preparatív szerves kémiai munkát Kékesi László, Szabadkai István és Pató János végezték.



	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃
KS0583VR	N	CH	Br	H	H
SZI2264A	N	CH	Br	H	H
JJ1677X15	CH	CH	NO ₂	H	meta-(3-trifluorometil-benzoil-amido)
LA123X6	CH	N	H	H	H
LA182X1	CH	CH	H	F	H

11. ábra. Kinoxalin és és pirido-pirazin származékok szintézise

A további lépésekben az R₁ illetve R₂ csoportot lecserélve vagy módosítva alakítottak ki hosszabb oldalláncokat a molekulán. Az izomerek szerkezetének meghatározását célszerű volt mihamarabb elvégezni, amikor a molekula még viszonylag kicsiny, a spektrumaikban kevés a jel és minimális a jelátfedés lehetősége.

A.7. Következtetések

Szerkezetvizsgálati következtetések

Aromás gyűrűrendszerekben a három kötésen keresztül mérhető csatolási állandók adnak információt a kémiai szerkezetre, várható értékük 5-7 Hz körüli, de erősen függ egyrészt a csatolási út mentén lévő torziós szögtől, 0°-os torziós szög ezt az értéket csökkenti. 180°-os torziós szög és a csatolási útvonalba eső elektronegatív atom (nitrogén vagy oxigén) a csatolási állandót jelentősen (10 Hz fölé is) növelheti. A 4 kötésen keresztül mérhető csatolási állandók általában 1 Hz alatti értékek vagy ki sem mérhetők. A két kötésen keresztül mérhető csatolási állandók értéke sztochasztikus képet mutat, kémiai szerkezet meghatározására kevésbé használható, az is gyakran előfordul, hogy a két kötésen keresztül mérhető csatolási állandó kisebb, mint a 3 kötésen keresztül mérhető.

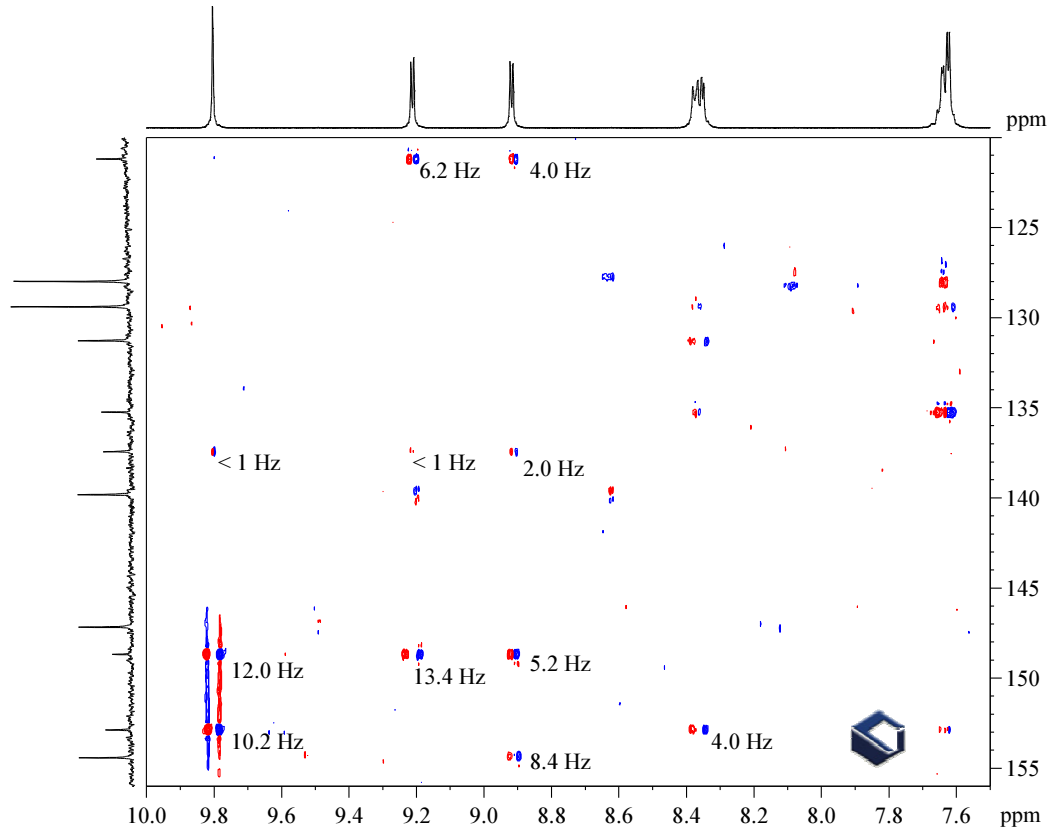
A HSQMBC vizsgálatokat és azok izomereket megkülönböztető eredményét a [II] cikkünk tartalmazza a folyóirat szerkesztői által elvárt formátumban. A molekulákat biológiai hatásuk alapján válogattuk be a cikkbe, így egyes HSQMBC módszerrel vizsgált köztitermékek, illetve belőlük keletkezett végtermékek a biológiai hatástalanságuk miatt mégsem kerültek beválogatásra. Ezen dolgozatban a spektrum-értelmezésnek egy folyóiratban terjedelmi okok miatt kevésbé szokásos - inkább a publikált dolgozatok függelékében előforduló – grafikus megjelenítését alkalmazom.

KS0583VR HSQMBC minta mérését a 12. ábra, a mérés kiértékelését a 13. ábra tartalmazza. Izomerének, az SZI2264A mintának a HSQMBC spektruma a 14., a spektrum kiértékelése a 15. ábrán látható.

A 16-23. ábrák a JJ1677X15 minta NMR spektrumait és azok értelmezését mutatják. A minta jellegzetessége, hogy bonyolult oldalláncot, ennek megfelelően a spektruma sok jelet tartalmaz, ami miatt a kiértékeléséhez többféle spektrum szükséges.

A 24. ábrán a LA123X6 minta – egy pirido-pirazin származék – HSQMBC spektruma, a 25. ábrán pedig a minta spektrumainak kiértékelése látható.

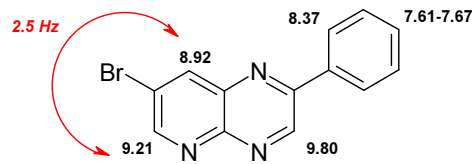
A 26. ábrán az LA182X1 minta – két kinoxalin izomer keveréke – ¹H-NMR, a 27. ábrán pedig HSQMBC spektruma látható. A 28. ábra tartalmazza a minta spektrumainak kiértékelését. A ~20 %-ban jelen lévő minor komponensnek is sikerült heteronukleáris távolható csatolási állandóit meghatároznom.



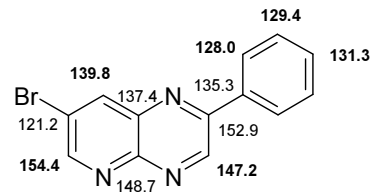
12. ábra. KS0583VR minta – pirido-pirazin származék - HSQMBC spektruma DMSO- d_6 oldószerben 30 °C-on. A csatolási állandók paraméterezett optimuma 6 Hz, digitális felbontás a detektált dimenzióban 0.4 Hz/pont. A leolvasott heteronukleáris csatolási állandók az ábrán vannak feltüntetve.

^1H -NMR kémiai eltolódások

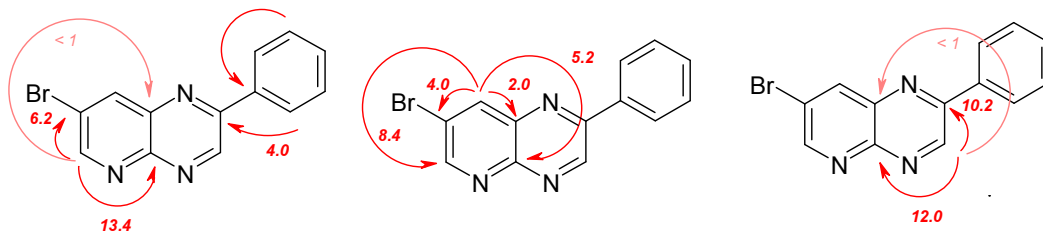
$J(\text{H,H})$ csatolási állandó



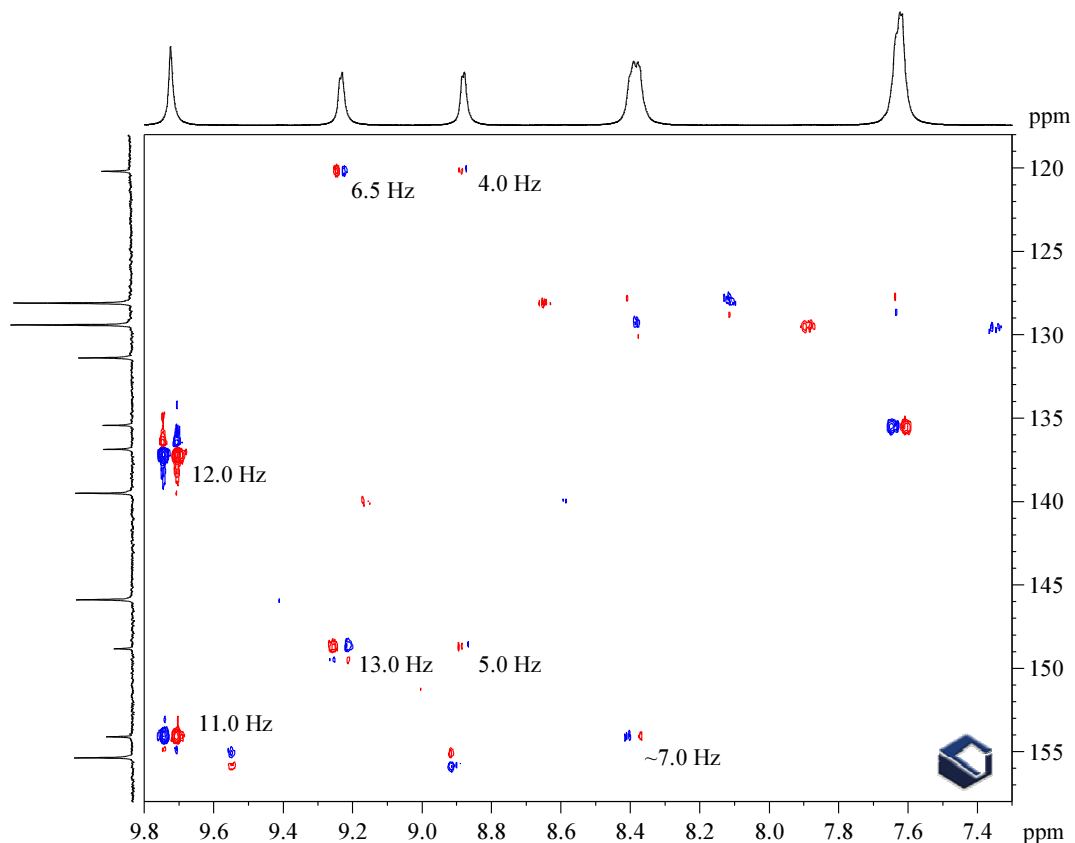
^{13}C -NMR kémiai eltolódások



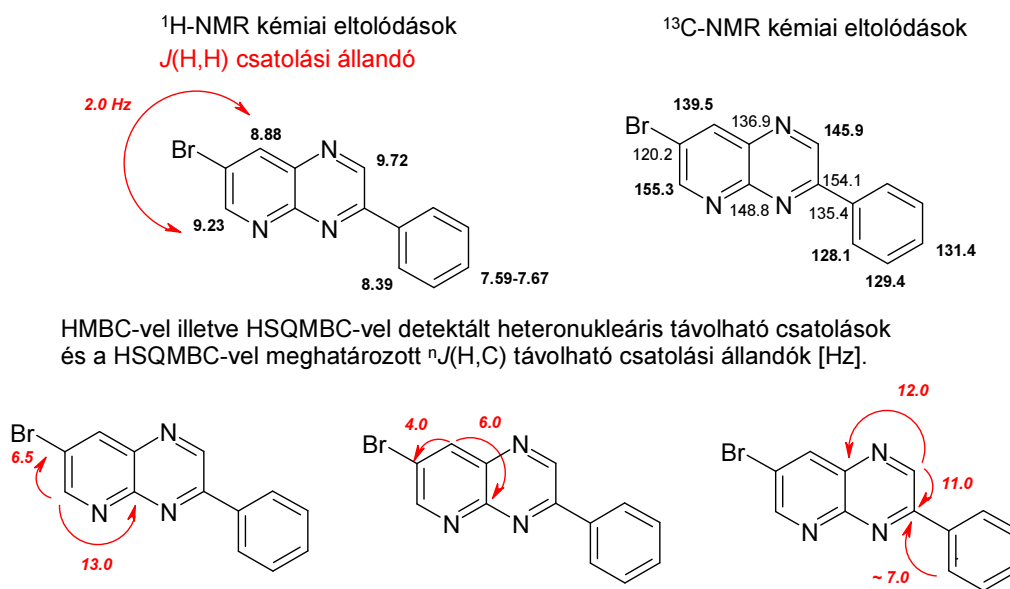
HMBC-vel illetve HSQMBC-vel detektált heteronukleáris távolható csatolások és a HSQMBC-vel meghatározott $^nJ(\text{H,C})$ távolható csatolási állandók [Hz].



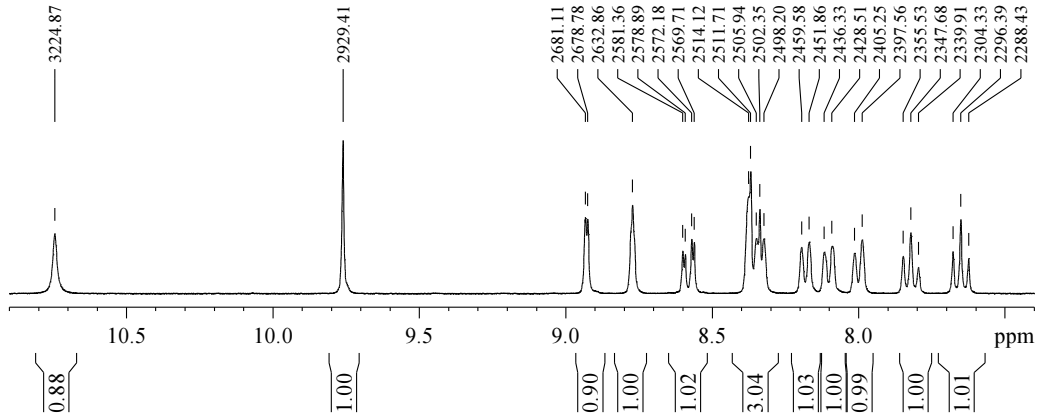
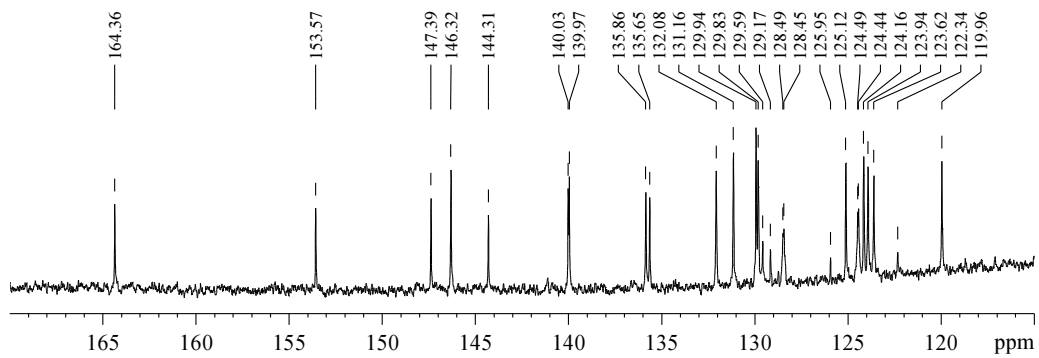
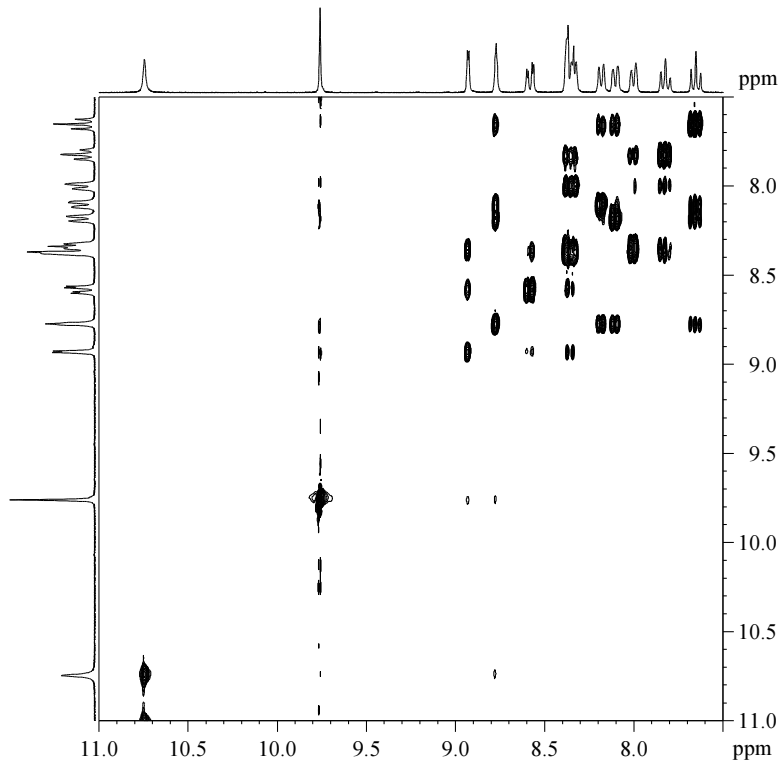
13. ábra. A KS0583VR minta – pirido-pirazin származék - spektrumainak értékelése, ^1H - és ^{13}C -NMR jelhozrendelés, valamint a heteronukleáris távolható csatolási állandók értelmezése.



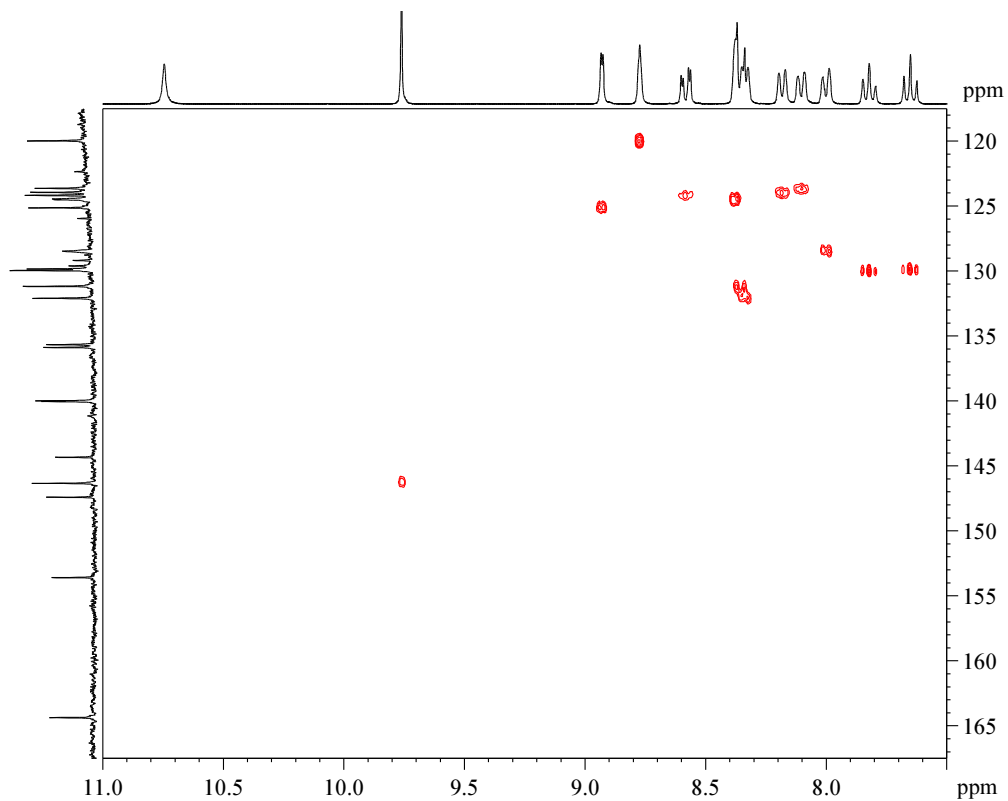
14. ábra. SZI2264A minta – pirido-pirazin származék - HSQMBC spektruma DMSO- d_6 oldószerben 30 °C-on. A leolvasott heteronukleáris csatolási állandók az ábrán vannak feltüntetve. A csatolási állandók paraméterezett optimuma 8 Hz, digitális felbontás a detektált dimenzióban 0.35 Hz/pont.



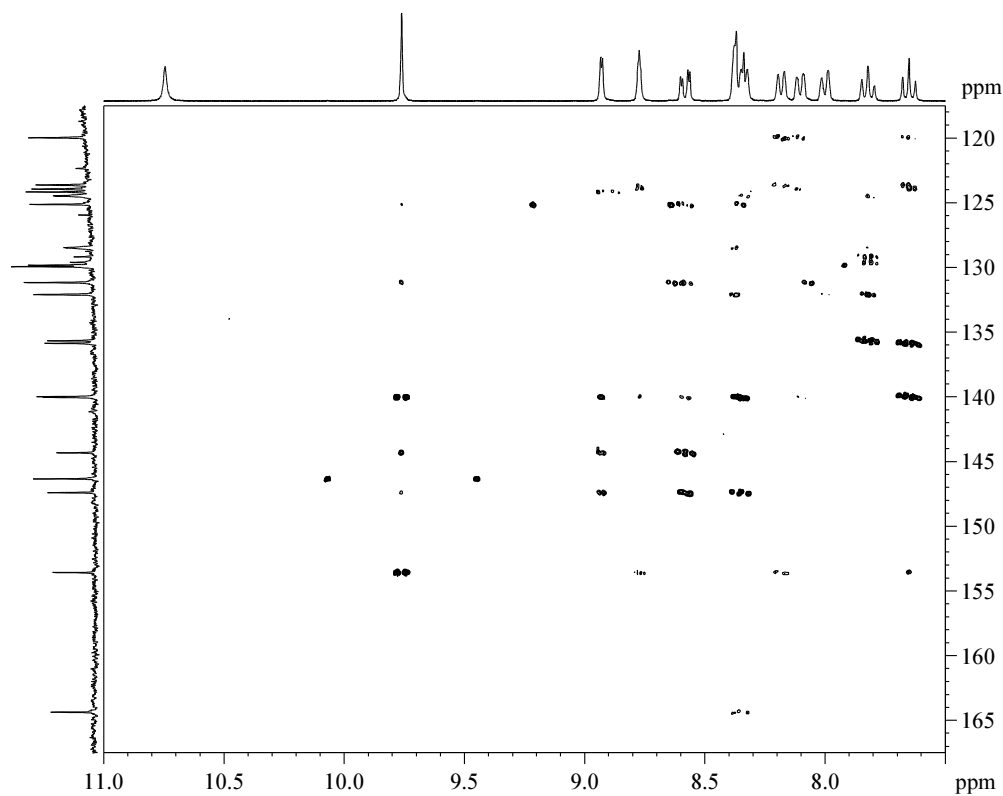
15. ábra. SZI2264A minta – pirido-pirazin származék - spektrumainak értékelése, ¹H- és ¹³C-NMR jelhozzárendelés, valamint a heteronukleáris távolható csatolási állandók értelmezése.

16. ábra. JJ1677X15 minta ^1H -NMR spektruma17. ábra. JJ1677X15 minta ^{13}C -NMR spektruma

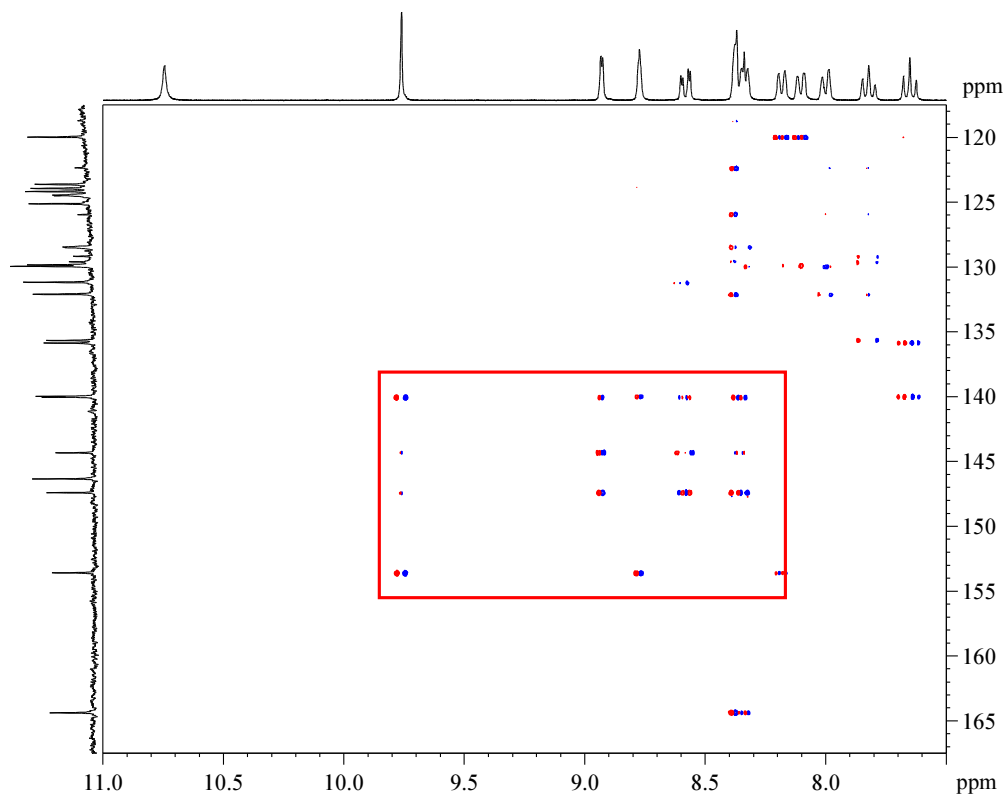
18. ábra. JJ1677X15 minta zqs-TOCSY spektruma



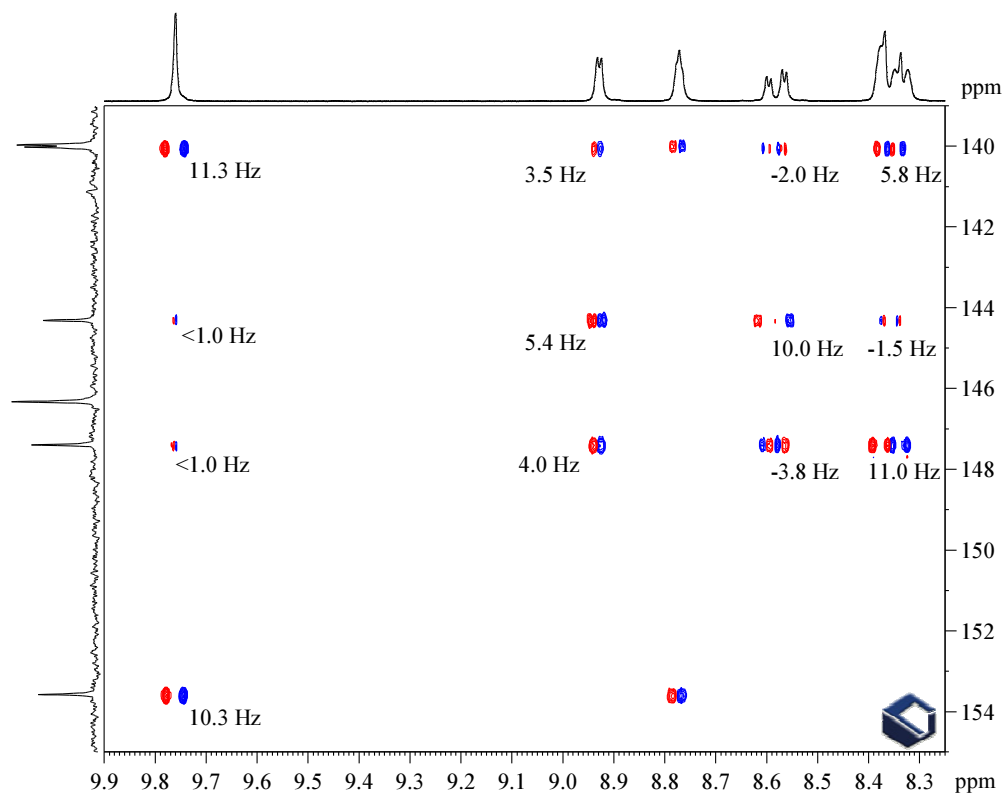
19. ábra. JJ1677X15 minta multiplicitás-szerkesztett HSQC spektruma



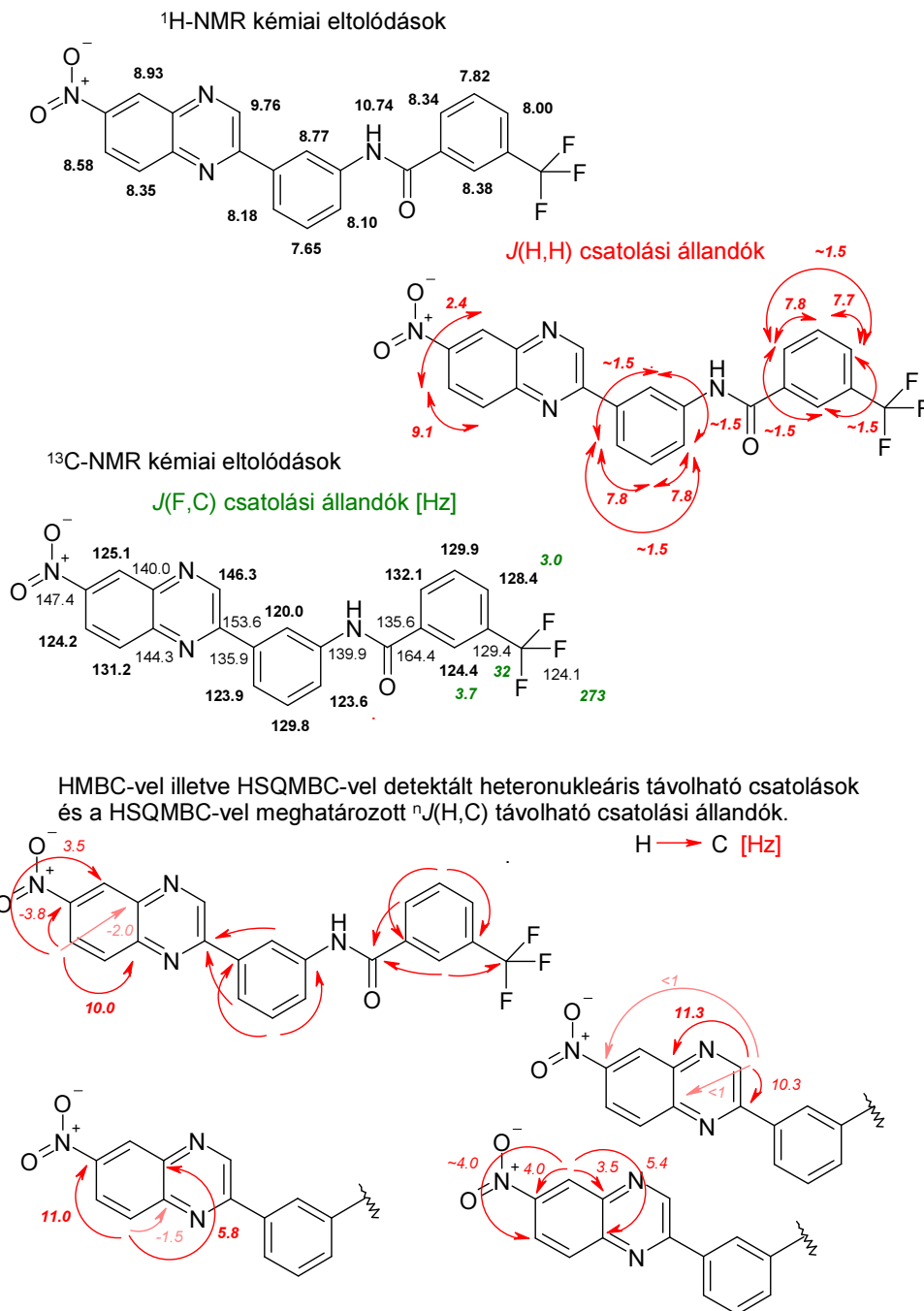
20. ábra. JJ1677X15 minta HMBC spektruma



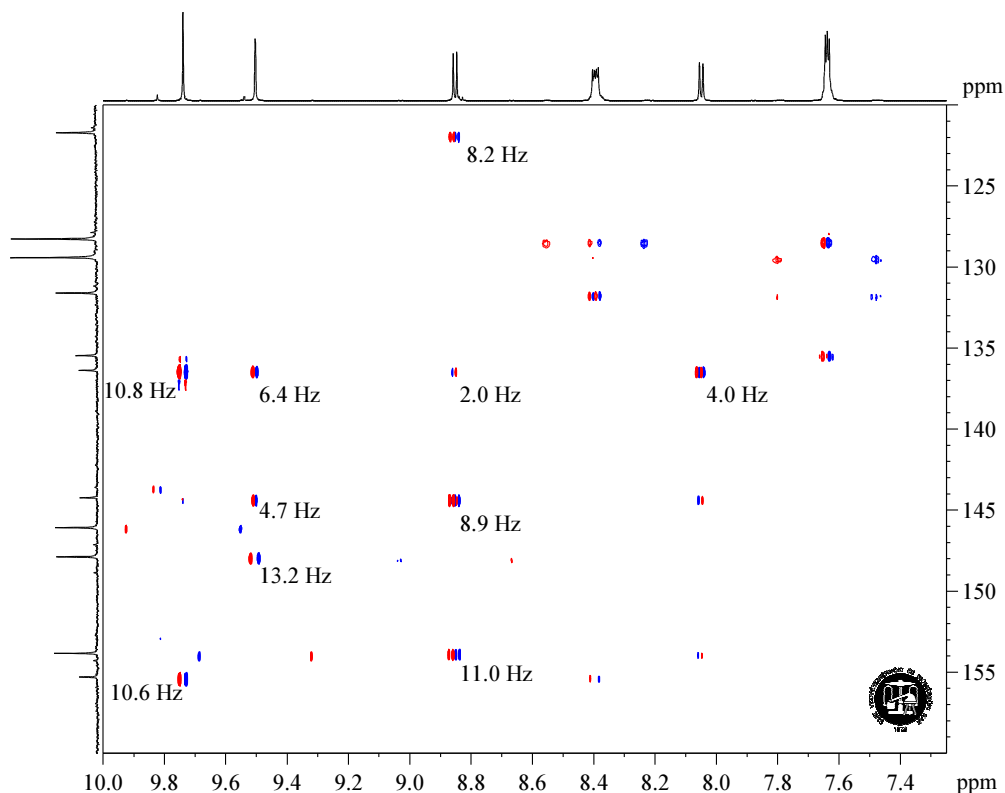
21. ábra. JJ1677X15 minta HSQC spektruma, a csatolási állandók optimuma 5 Hz



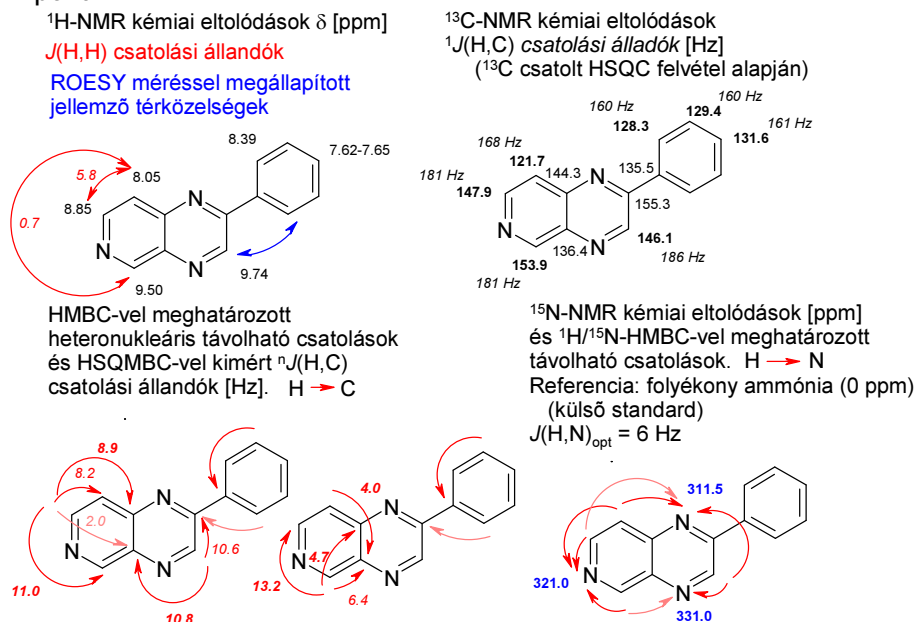
22. ábra. JJ1677X15 minta HSQC spektrumának részlete, felbontás 0.3 Hz/pont.



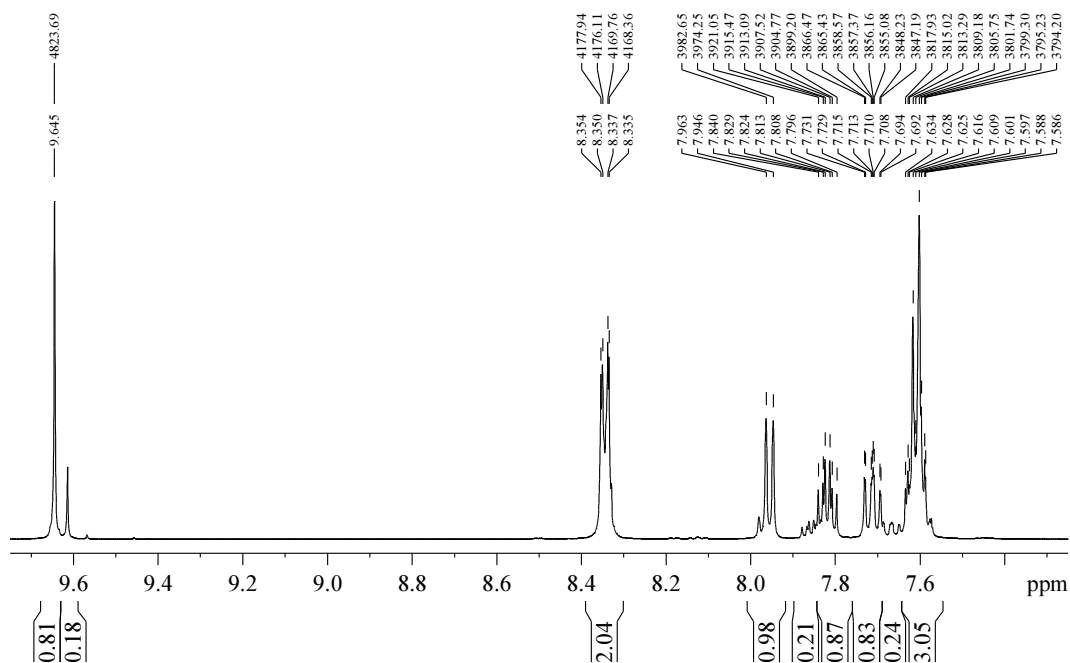
23. ábra. JJ1677X15 minta spektrumainak értékelése, ¹H- és ¹³C-NMR jelhozzárendelés, valamint a heteronukleáris távolható csatolások és csatolási állandók értelmezése. A heteronukleáris távolható csatolási állandó értékeit csak a molekula kritikus részén tüntettem fel.



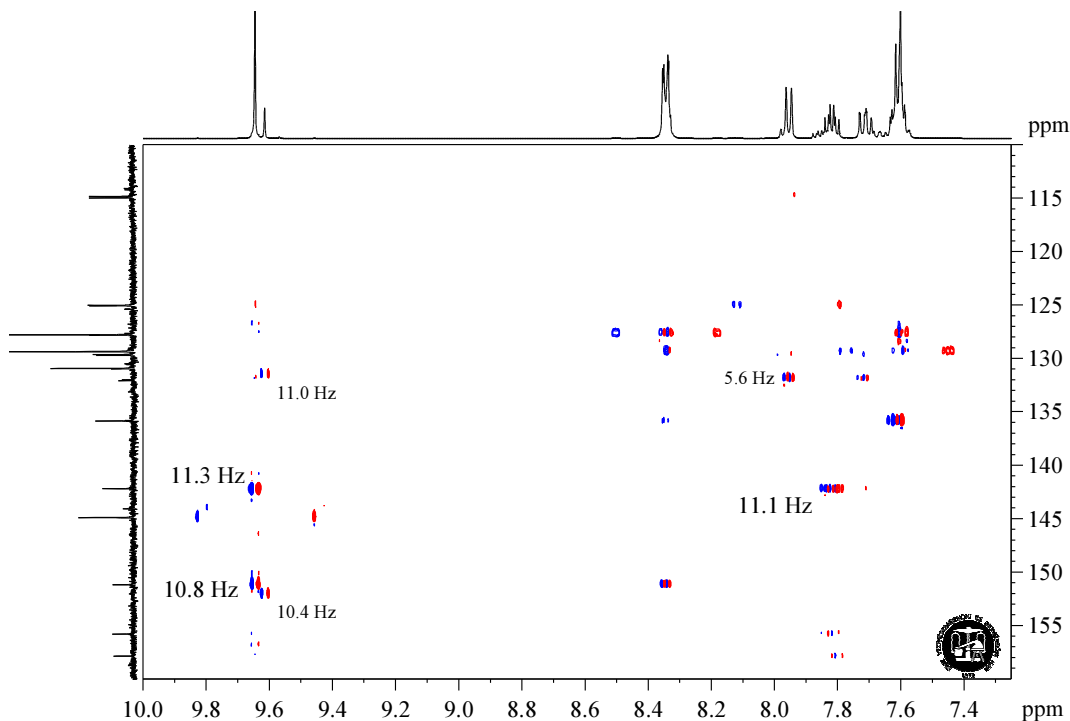
24. ábra. LA123X6 minta – pirido-pirazin származék – Bruker Avance 500 spektrométeren felvett HSQMBC spektruma DMSO- d_6 oldószerben 30 °C-on. A leolvasott heteronukleáris csatolási állandók az ábrán feltüntetve. A csatolási állandók paraméterezett optimuma 9.5 Hz, digitális felbontás a detektált dimenzióban 0.35 Hz/pont.



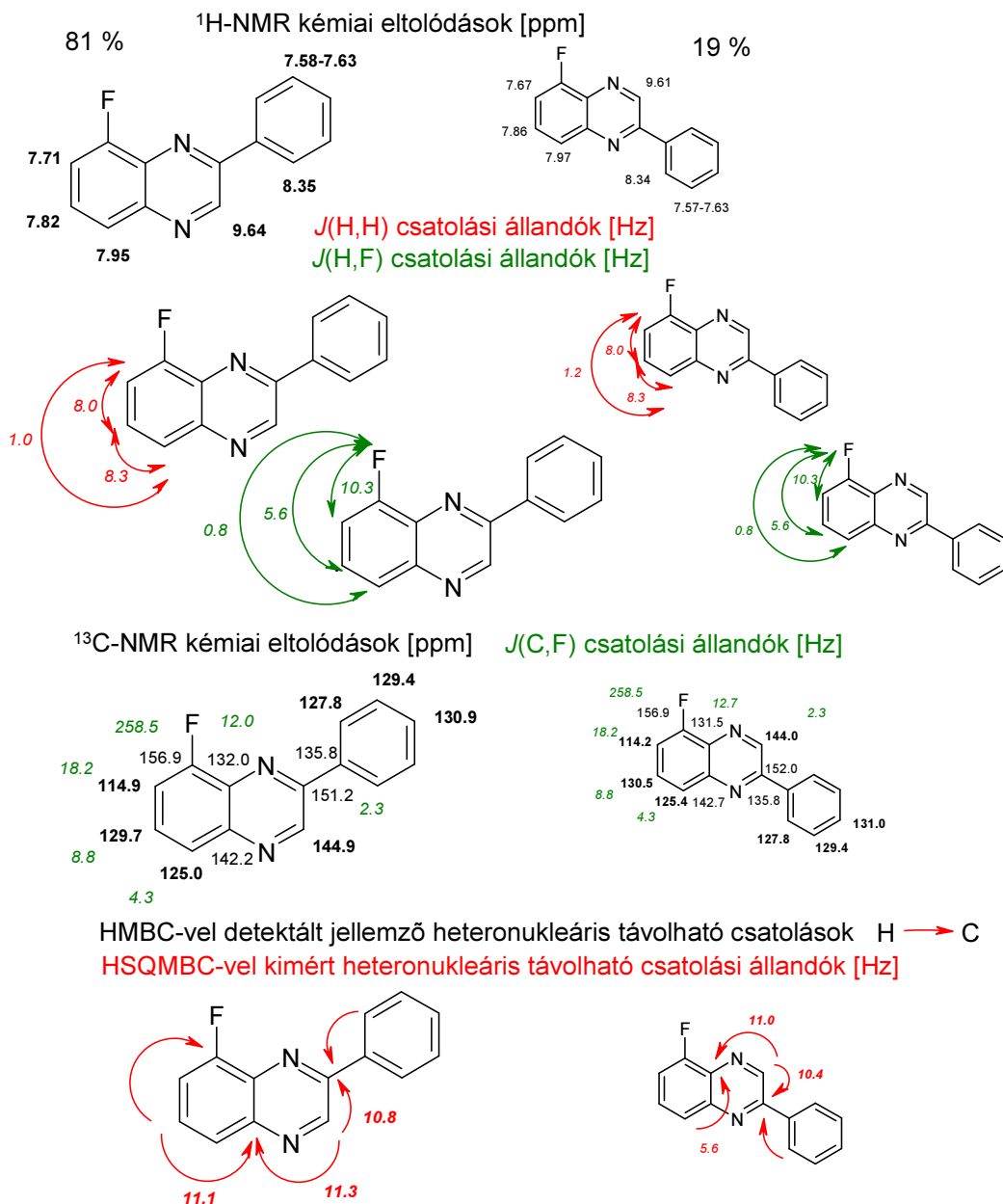
25. ábra. LA132X6 minta – pirido-pirazin származék - spektrumainak értékelése, ^1H - és $^{13}\text{C-NMR}$ jelhozzárendelés, a heteronukleáris távolható csatolási állandók, valamint az $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HMBC spektrum értelmezése.



26. ábra. LA182X1 minta ^1H -NMR spektruma, az alsó csúcslista ppm dimenzióban a kémiai eltolódás pontos olvashatósága miatt, a felső csúcslista pedig Hz dimenzióban, melyből a $J(\text{H,H})$ és $J(\text{F,H})$ csatolási állandók olvashatók le.



27. ábra. LA182X1 minta – két kinoxalin származék izomer keveréke – Bruker Avance 500 spektrométeren felvett HSQMBC spektruma $\text{DMSO-}d_6$ oldószerben 30°C -on. A leolvasott heteronukleáris csatolási állandók az ábrán feltüntetve. A csatolási állandók paraméterezett optimuma 7.5 Hz , digitális felbontás a detektált dimenzióban 0.5 Hz/pont .



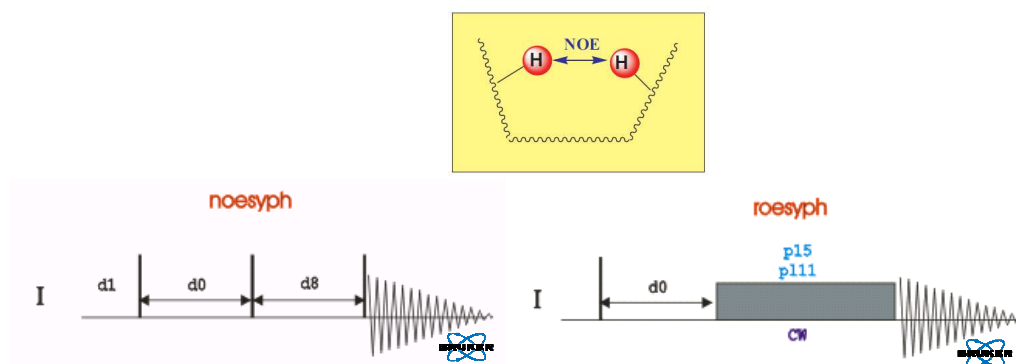
28. ábra. LA182X1 minta – két kinoxalin származék izomer keveréke - spektrumainak értékelése, ^1H - és ^{13}C -NMR jelhozzárendelés, a heteronukleáris távolható csatolási állandók. A mintában 19 %-os mennyiségben jelen lévő minor izomer NMR adatait is sikerült a spektrumokból kinyerni.

B. Szekció

^1H - ^1H atomtávolságok mérése, zqs-easy-ROESY módszer fejlesztése és alkalmazása

B.3. Irodalmi háttér

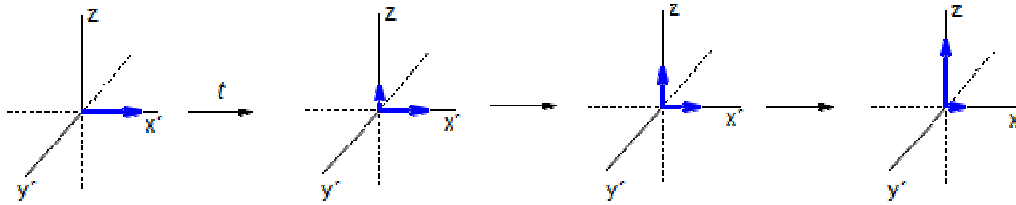
NMR spektroszkópiai módszerek közül a NOESY [73-74] és ennek spin-lock körülmények között - forgó vonatkoztatási rendszerben - alkalmazott változata a ROESY [75-76] alkalmas ^1H - ^1H atomtávolságok mérésére. Mindkét mérési módszer a keresztrelaxáció jelenségén alapul, a jelenség kiépülése során mágnesezettség-átadás történik az egymással térközelségben lévő hidrogén atomok között (29. ábra).



29. ábra. A NOESY és ROESY módszerek folyamatábrája. Az ábra elemeinek forrása Bruker NMR Guide™

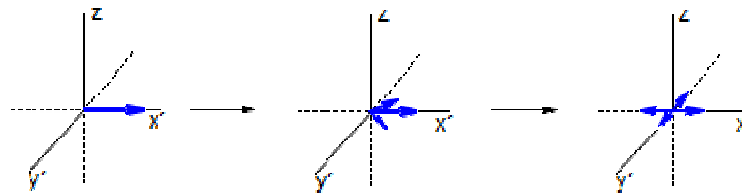
A folyamat összefüggéseinek megértéséhez a relaxációs viszonyok [77-79] mélyebb ismerete szükséges, mint a spin-spin csatolás jelenségén alapuló jelenségek esetén, ahol jórészt elegendő az adatakkumuláció során a kísérletismétlési idő lehetséges alsó korlátjának meghatározása a becsült relaxációs idők alapján. A folyamatban döntő szerepet játszik a spin-rács relaxáció közül a dipól-dipól kölcsönhatáson keresztül történő mágnesezettség-átadás, illetve eme relaxációs folyamat és spin-spin relaxációs folyamatok egymáshoz viszonyított aránya.

A T_1 relaxációs idővel jellemzett longitudinális spin-rács, relaxációs folyamat esetén a detektálható xy síkban jelentkező mágnesezettség eltűnésével párhuzamosan mágnesezettség jelenik meg a z tengely irányában és ezzel a rendszer a B_0 külső mágneses térben érvényes egyensúlyi állapothoz közelít, a folyamat entalpia-kontrolált, a gerjesztéssel bevitt energia végül hővé alakul. (30. ábra)



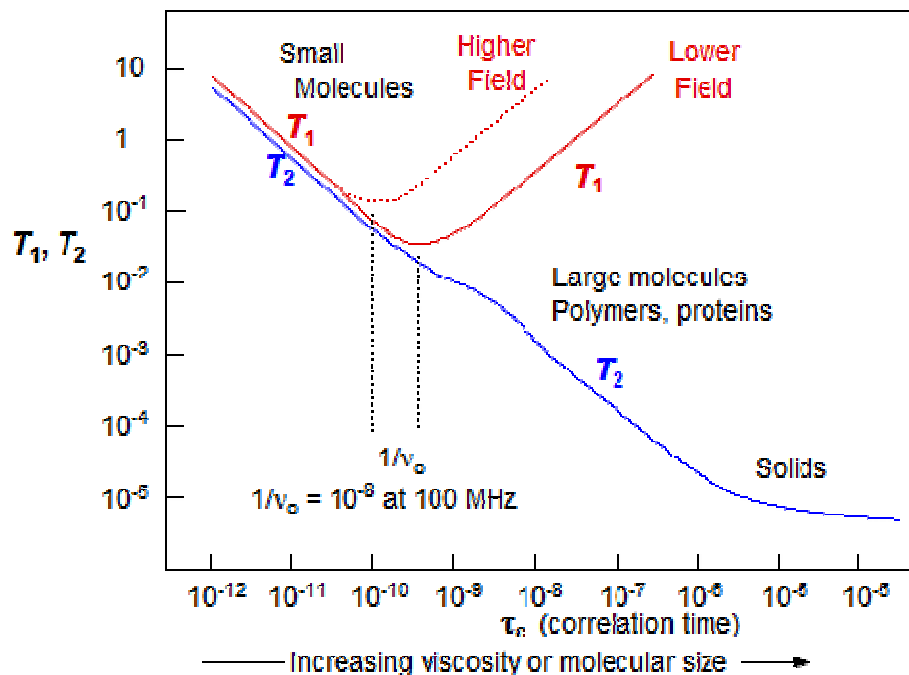
30. ábra. A longitudinális T_1 relaxáció mechanizmusa. Az xy síkban megszűnő mágneszettséggel azonos eredő mágneszettség épül ki a z tengely irányában. Az ábra forrása ref. [78]

A T_2 relaxációs idővel jellemzett transzverzális spin-spin relaxációs folyamat során az xy síkban kezdetben koherens mágneszettség szétszóródik, anélkül, hogy a z irányban ennek megfelelő mágneszettség jelenne meg. A folyamat entrópia-kontrolált, ez a jelenség az NMR spektrumvonal szélességének egyik meghatározója. Elméletileg levezethető, hogy a T_2 spin-spin relaxációs idő semmilyen körülmények között sem lehet nagyobb a T_1 spin-rács relaxációs időnél (31. ábra).



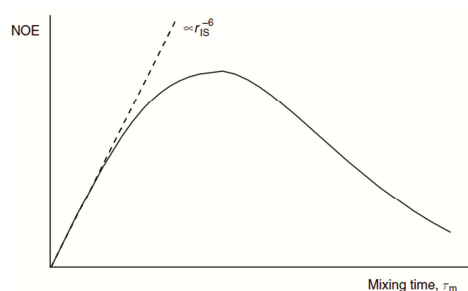
31. ábra. A transzverzális T_2 relaxáció mechanizmusa. A kezdetben koherens mágneszettség az xy síkban szétszóródik, de nem kíséri mágneszettség kiépülése a z tengely irányában. Az ábra forrása ref. [78]

A T_1 relaxációs idő a molekulaméret függvényében minimummal rendelkező görbét ír le, a relaxációs idő akkor minimális, ha a korrelációs idő közel megegyezik a Larmor frekvencia reciprokával. Kis molekula esetén a molekulamozgások olyan gyorsak lehetnek (pl. metil csoport rezgése/forgása), hogy az már túl gyors a kedvező relaxációhoz, míg nagy molekulánál a rezgési/forgási sebesség lassabb a relaxáció számára kedvezőnél. A T_2 relaxációs idő a molekulaméret növekedésével folyamatosan csökken. A tényleges érték függ az alkalmazott oldószer viszkozitásától, valamint a műszer mágnesének B_0 térerejétől is. (32. ábra)



32. ábra. A relaxációs időállandók függése a τ_c korrelációs időtől (ezzel együtt a molekulamérettől) és a külső mágneses térerőtől. Az ábra forrása: ref. [77] és [78]

A NOESY és ROESY mérés során a keverési idő - mely során a keresztrelaxációs folyamatok révén lehetőséget biztosítunk a mágneszettség kicserélődésére - függvényében a térközelségi jelek intenzitása lineárisan nő, majd a spin-diffúzió jelensége miatt telítésbe fordul, még később visszafordul és extrém hosszú keverési idő esetén a visszaálló egyensúly miatt elenyészik. (33. ábra) A kezdeti lineáris tartományban a térközelségi keresztcsúcsok intenzitása fordítottan arányos az érintett atomok távolságának hatodik hatványával, így mindkét módszer alkalmas a molekulaszervezet kvantitatív feltérképezésére. A beállított keverési időt a lineáris tartomány felső harmadára célszerű optimalizálni, hogy minél nagyobb jel/zaj viszonyt érjünk el, de ugyanakkor még fennálljon a keresztcsúcsok intenzitása és az atomtávolságok hatodik hatványa közötti fordított arányosság.



33. ábra. A NOE jel nagyságának függése a keverési időtől. Az ábra forrása ref. [78]

A szokások szerint NOESY/ROESY spektrumban az átlót negatív fázissal ábrázoljuk, a térközelségi keresztcsúcsok fázisa és intenzitása pedig a molekulaméret, molekulamozgékonyosság, oldat-viszkozitás és a B_0 térerő függvénye.

NOESY mérés során kismolekulák esetén, amikor a T_1 relaxáció dipol-dipol eleme domináns, a térközelségi keresztcsúcsok fázisa az átlóval ellentétes. Nagy molekulák és ennek megfelelően kis mozgékonyság esetén a spin-spin relaxációs folyamatok dominálnak és a térközelségi csúcsok fázisa az átlóval megegyező. Léteznek olyan körülmények, [80] amikor a T_1 relaxáció dipól-dipól komponense egyenlővé válik a T_2 relaxációval. Ez esetben a térközelség nem okoz mérhető intenzitású NOESY keresztcsúcsot, a térközelségek NOESY méréssel nem térképezhetők fel, ebben a tartományban egyedül a ROESY mérés használható.

Spin-lock körülmények között, - ROESY mérés során [75-76] - a térközelségi keresztcsúcsok fázisa molekulamérettől függetlenül mindig ellentétes az átló fázisával, bár a térközelségi csúcsok optimális körülmények között elérhető maximális intenzitása kis molekulák esetén nem éri el a NOESY esetén elérhető intenzitást [81].

A képet árnyalja kémiai kicserélődési folyamatokból eredő cserélődési keresztcsúcsok esetleges megjelenése, melyek mérési módszertől és molekulamérettől függetlenül mindig az átlóval azonos fázisúak (2. táblázat). Nagy molekulatömeg esetén, NOESY mérés során, a cserélődési és a térközelségi csúcsok azonos fázisúak, ami nehezíti az értékelést, ezért amikor kémiai kicserélődési folyamatok játszódhatnak le a mérés során, akkor a ROESY módszer használata javasolt.

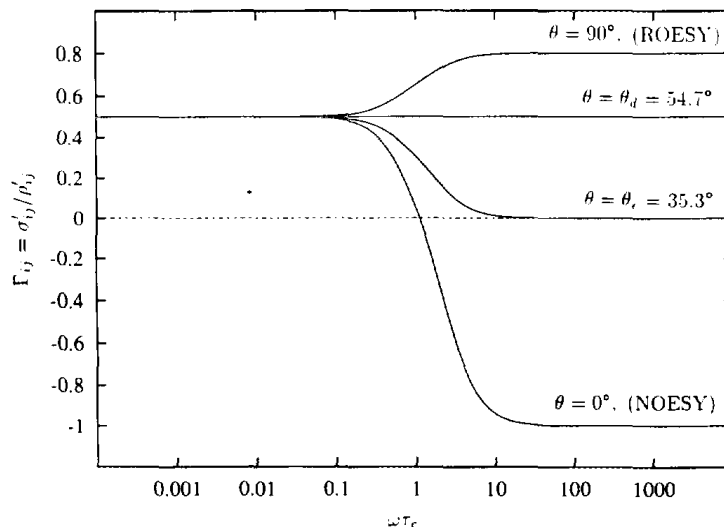
2. táblázat.

A térközelségi és cserélődési csúcsok fázisa NOESY és ROESY spektrumokban.

		NOESY		ROESY	
Jel típusa	Molekulaméret	Jel iránya	Keverési idő [ms]	Jel iránya	Keverési idő [ms]
Térközelség	Kicsi (<500 Da)	↑	400-500	↑	200-300
	Közepes (~500-1000 Da)	~0	(200-400)	↑	70-200
	Nagy (>>1000 Da)	↓	100-200	↑	35-70
Kémiai csere	Kicsi (<500 Da)	↓	400-500	↓	200-300
	Közepes (~500-1000 Da)	↓	200-400	↓	70-200
	Nagy (>>1000 Da)	↓	100-200	↓	35-70
Átló (konvenció)		↓		↓	

A tapasztalatok szerint kismolekulák esetén 300-500 ms keverési idő célszerű, míg biopolimerek esetén a 100 ms vagy még rövidebb keverési idő a megfelelő. ROESY mérés során rendre rövidebb keverési idő elegendő, mint NOESY esetén.

Létezik a ROESY mérésnek olyan változata, az off-rezonancia ROESY vagy TROESY [82], ahol a spin-lock tér frekvenciája nem a spektrum közepére (on-rezonancia) esik, hanem attól eltér, szándékosan alá és fölé hangoljuk. Ez az elhangolás kivitelezhető úgy, hogy az egyik szkenn során alá a következő során fölé hangolunk, illetve úgy is, hogy a ROESY spin-lock idejét kettéosztjuk és az idő egyik felében alá másik felében fölé hangolunk. Az elhangolást jellemző θ csapásszög nagyságával szabályozhatjuk, hogy a különböző típusú keresztcsúcsok milyen intenzitással jelenjenek meg a spektrumban. (34. ábra) [83] Ha a θ csapásszög a szilárdfázisú NMR módszerekből ismert mágikus szöggel (54.7°) egyenlő, akkor a térközelségi keresztcsúcsok elérhető intenzitása ugyan alatta marad a ROESY-vel elérhető maximumnak, de függetlenné válik a molekulamérettől. 35.3° -os csapásszög esetén pedig nagy molekulák esetén a térközelségi csúcsok kinullázódnak, így a kémiai kicserélődési folyamatok tisztán tanulmányozhatók, a térközelségi csúcsok zavaró hatása nélkül.



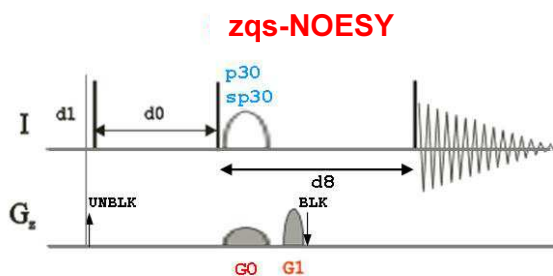
34. ábra. A NOESY/ROESY térközelségi jelek intenzitásának és fázisának függése a θ csapásszögtől.

NOESY mérés során ($\theta = 0^\circ$), $\omega\tau_c \approx 1$ esetén – ez a feltétel gyakran teljesül a szokásos gyógyszer-molekulák esetén – a térközelségi jel intenzitása közel nulla. A módszer nem használható. Az ennél kisebb molekuláknál a térközelségi és a cserélődési keresztcsúcsok fázisa eltérő, nagyobb molekulák esetén azonos.

Tiszta ROESY mérés során a térközelségi jel bármikor $\omega\tau_c$ érték esetén pozitív, az elérhető jelintenzitás a molekulatömeggel nő. Az ábra forrása ref. [83]

B.3.1. Közvetlen irodalmi előzmények

Mind a NOESY, mind a ROESY módszer esetén a kívánatos térközelségi és kémiai kicserélődési effektusokra a mérés szempontjából nem kívánatos jelenségek – zéró-kvantum effektus, NOESY esetében COSY, ROESY esetében TOCSY átmenetek – szuperponálódnak. Habár ezek elvileg nulla integrálú keresztcsúcsokat generálnak a spektrumban, vagy nulla eredőjű fluktuációt eredményeznek egy értékes jelen [84], kiküszöbölésük mégis célszerű, hogy a méréssel tanulmányozni kívánt hatást ne zavarják. Ezért a fejlesztők a mérési módszerekbe számos tisztító elemet vezettek be. A zéró-kvantum effektusok kiküszöbölésére alkalmas lehet trim-pulzus beillesztése a szekvenciába, a NOESY keverési idő néhány százalékkal randomizált változtatása, illetve a leghatékonyabbnak bizonyult módszerváltozat a *Thrippleton és Keeler* által javasolt NOESY keverési idő alatt alkalmazott adiabatikus invertáló pulzus és vele egy időben alkalmazott enyhe gradiens pulzus [85] (35. ábra).



35. ábra. A zqs-NOESY módszerváltozat [85] folyamatábrája

A ROESY (egyes korai irodalmakban CAMELSPIN néven is előfordul) [75-76] módszert kifejlesztői a NOESY lehetőségeiben lévő lyuk betömésére fejlesztették ki. Mivel a ROESY módszer bármilyen korrelációs idő esetén használható, az effektusnak semmilyen molekulatömeg esetén sincs nulla-átmenete, különösen alkalmas a NOESY helyettesítésére annak kritikus tartományában. A módszer alapváltozatának hátránya, hogy a 10 kHz körüli spin-lock térerő esetén a skaláris csatolások, és zéró-kvantum effektusok nem kívánt keresztcsúcsokat illetve alternáló fázisú keresztcsúcsokat eredményeznek a spektrumban, ami nehezíti, vagy esetenként lehetetlenné teszi a kvantitatív értékelést. *Shaka* és *Hwang* ismertették az első olyan ROESY változatot, ahol a TOCSY eredetű spektrumelemeket sikeresen kiszűrték a spektrumból off-rezonancia spin-lock alkalmazásával [82]. A spin-lock offszet-függése, valamint az

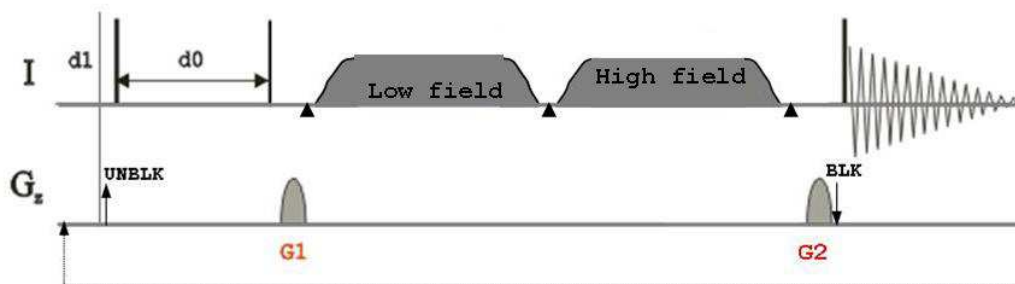
eltérő frekvencián kiadott nagy teljesítményű és spin-lock pulzusok – a frekvenciaváltás egyfajta zökkenésként jelentkezhet - sajnos újabb nehézségeket okozhatnak. *Desvaux és munkatársai* a szkenenként alternáló alá- és föléhangolást javasoltak, valamint trapéz alakú adiabatikus spin-lock pulzust ajánlottak, a változó kimenőteljesítményű szakaszt - trapéz szárait - használva arra, hogy zökkenésmentesen kivezesse a mágneszettséget az off-rezonancia állapotba majd visszahozza onnan [86]. (36. ábra) Később *Schleucher és munkatársai* a keverési idő egyik felében alá-, másik felében föléhangolást javasoltak és a mágneszettség ki- és visszavezetéséhez előbb speciális kalibrálást igénylő pulzusokat ajánlottak (js-ROESY) [87], később adiabatikus félgauss pulzusokat fejlesztettek ki (easy-ROESY) [88]. (37. ábra) A tapasztalatom szerint az easy-ROESY kiválóan működik 1000 Da, vagy annál nagyobb molekulatömegű minták esetén, de jelalaktorzulások lépnek fel a vele felvett spektrumokban, ha a molekulatömeg 4-800 Da körüli vagy kisebb.

off-rezonancia ROESY



36. ábra. Az off-rezonancia ROESY módszerváltozat [86] folyamatábrája

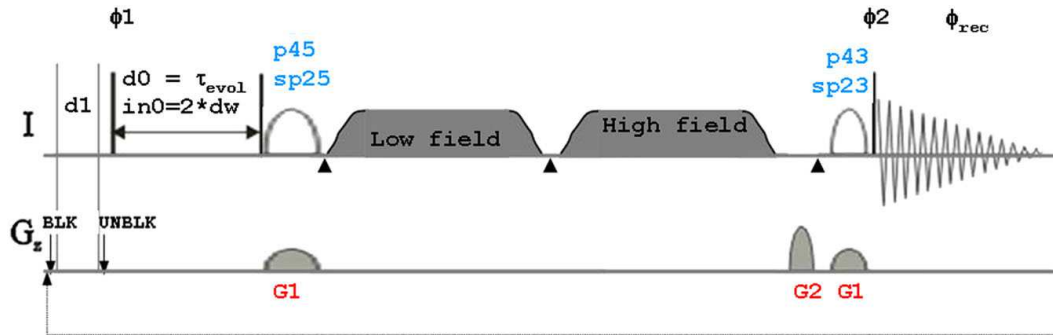
easy-ROESY



37. ábra. Az easy-ROESY módszerváltozat [88] folyamatábrája

B.4. Módszerek - a 2D zqs-easy-ROESY mérési módszerváltozat fejlesztése

A saját ROESY módszerváltozatban [IV] igyekeztem a korábbi ROESY változatok előnyös elemeit úgy kombinálni, hogy a nem kívánatos COSY, TOCSY, és zéró-kvantum koherencia eredetű spektrumelemek [84] minimalizálódjanak vagy teljesen tűnjenek el a spektrumból, ugyanakkor a megfelelő kísérleti feltételek megtartásával a térközelségi keresztcsúcsok intenzitásának távolságfüggése, illetve a cserélődési keresztcsúcsok intenzitásának függése a cserefolyamatok sebességétől továbbra is fennmaradjon. Tapasztalataim szerint a *Keeler és Thrippleton* által TOCSY és NOESY módszerekhez javasolt zéró-kvantum szűrő [85] (a szerzők nem tettek említést az általuk javasolt szűrő ROESY-be való beépíthetőségéről) előnyösen kombinálható az off-rezonancia ROESY közelmúltban ismeretessé vált változataival [88]. Választásom a *Keeler-Thrippleton* féle szűrő easy-ROESY módszerbe illesztésére esett, mivel annak teljes fázisciklusa fele a *Desvaux* féle változat [86] szükséges fázisciklusának, továbbá a gradients pulzusoknak köszönhetően a teljes 8 szkenes fázisciklust felezve vagy negyedelve is értékelhető spektrumot ad, korszerű, érzékeny műszerek esetén nem igényel feleslegesen sok mérésidőt. A nem kívánatos spektrumelemek kiszűrése tovább javítható a randomizált keverési idejű NOESY változathoz hasonlóan a spin-lock idő állandó kimenőteljesítményű szakaszának $\pm 5-7\%$ -os randomizálásával. Tapasztalatom szerint az egymást követő alá- és föléhangolt spin-lock pulzusok idejének harmonizálása sem szükségszerű. Kísérleteket végeztem a kémiai eltolódás kiépülési idő alatt a közelmúltban ismeretessé vált perfect-echo-zqs-NOESY módszerváltozat [89] analógiájára a perfect echo elem beépítésre is, de ROESY esetén nem hozta meg a remélt eredményt. A saját ROESY verzió korai változata tartalmazott egy további homospoil gradients pulzust is a spin-lock pulzusok előtt, de ennek elhagyása nem befolyásolta a spektrum minőségét, így a végleges változathoz kihagytam. Kísérleteket végeztem a zqs-pulzuspár és a homospoil gradients sorrendjének szisztematikus felcserélésére is, a végleges és közölt változat bizonyult a legjobbnak. A leírt ROESY módszerváltozat [IV] tisztító elemei eredményesen csökkentik a ROESY spektrumokban előforduló nem kívánatos spektrumelemeket, együttes alkalmazásuk nem okoz újabb kiküszöbölendő nem kívánatos jelenségeket. (38. ábra)



38. ábra. Az offszet-kompenzált zéró-kvantum elnyomásos adiabatus ROESY (zqs-easy-ROESY) folyamatábrája.

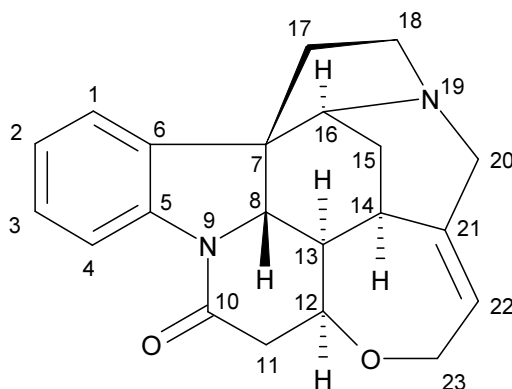
A keskeny vonalak jelentik a 90° -os, nagy kimenőteljesítményű pulzusokat. A két kitöltetlen ív jelzi a zéró-kvantum szűrő formázott adiabatus invertáló pulzusait, javasolt hosszuk rendre 50 és 30 ms. A spin-lock pulzusokat fel- illetve levezető félgauss rámpapulzusok hossza 1 ms. A spin-lock szakaszok javasolt hossza kétszer 100-150 ms, a vizsgált molekula méretétől függően, ami $\pm 5\%$ -kal randomizálható. ▲ jel jelzi az adó frekvenciájának átkapcsolásának helyét on-rezonancia és az alá- illetve fölhangolt off-rezonancia állapotok között.

A gerjesztő pulzus fázisa Φ_1 váltakozva x , $-x$. A nem jelölt pulzusok fázisa rendre x . A kiolvasó pulzus Φ_2 fázisa x , x , $-x$, $-x$, y , y , $-y$, $-y$, a detektálás Φ_{rec} fázisa x , $-x$, $-x$, x , y , $-y$, y . Az adiabatus pulzusokkal egyidejűleg, azonos időtartamban kiadott gradiens pulzusok javasolt intenzitása 2 %, az 1 ms időtaramú homospoil gradiens pulzus javasolt intenzitása 46 %. A teljes fázisciklus 8 szkennel, de 4 illetve 2 szkennel fázisciklussal is értékelhető spektrum vehető fel. A gradiens blanking parancs - mivel az utolsó gradiens pulzus és az adatgyűjtés kezdete között csak rövid, technikai idő van - az adatgyűjtés után, ciklusszervezési okok miatt a mérőprogram elején található. Mivel a spin-lock kismértékben fűti a mintát, a mérés elejére célszerű viszonylag sok eldobott szkennel alkalmazni, hogy a termikus állandósult állapot beállhasson.

B.5. Megbeszélés

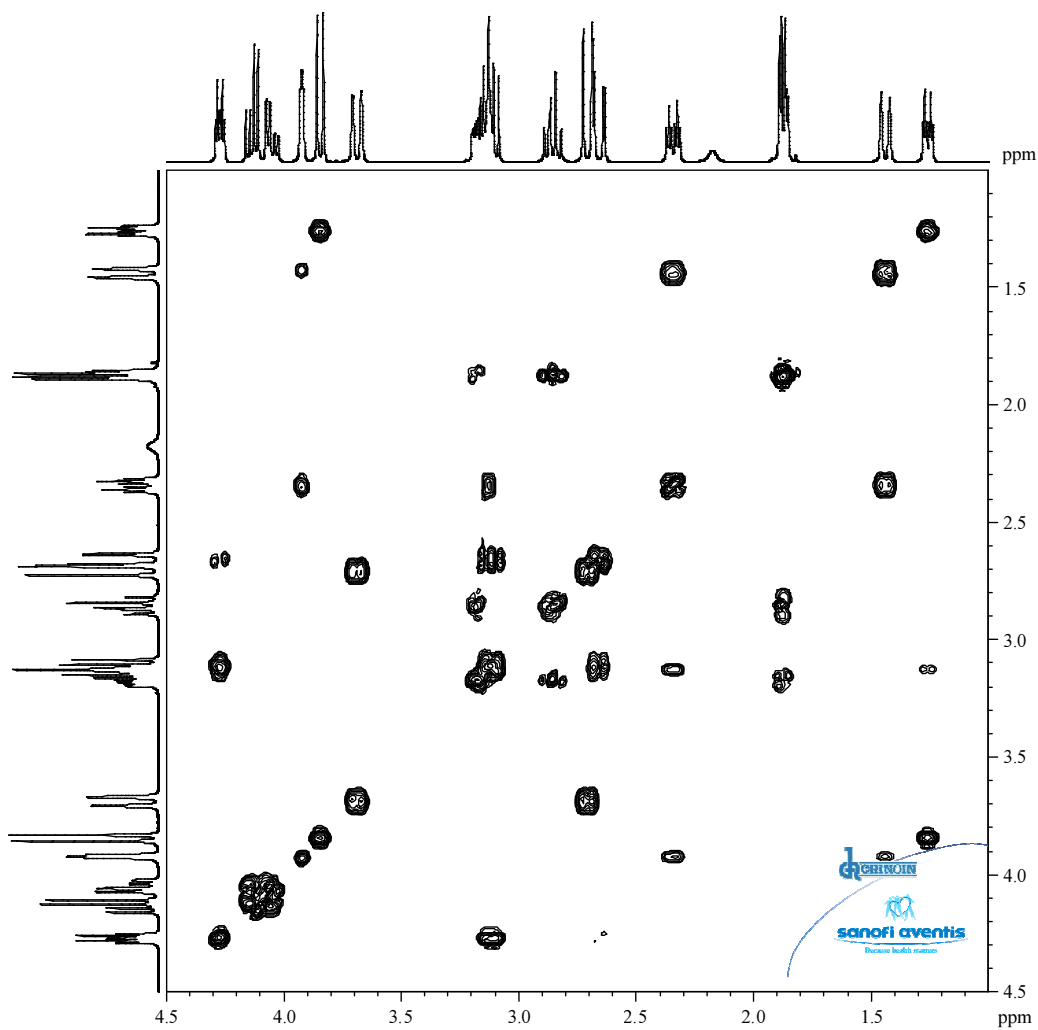
B.5.1. A javasolt zqs-easy-ROESY módszer-változat hatékonyságának igazolása

A javasolt zqs-easy-ROESY módszerváltozatot több modellvegyület molekulán teszteltem. A modellvegyületek kiválasztásánál szempont volt, hogy merev szerkezettel rendelkezzenek, legyen belőlük irodalomban hozzáférhető egykristály röntgendiffrakciós szerkezet, melyből kiemelt H-H atomtávolságok összevethetők a ROESY mérésekből számított atomtávolságokkal. A választásunk a sztrichnin (39. ábra) és a kodein vegyületekre esett.



39. ábra. A modellvegyületként használt sztrichnin szerkezete és vázatomjainak számozása. (összegképlete: $C_{21}H_{22}N_2O_3$, relatív molekulatömeg: 334.42).

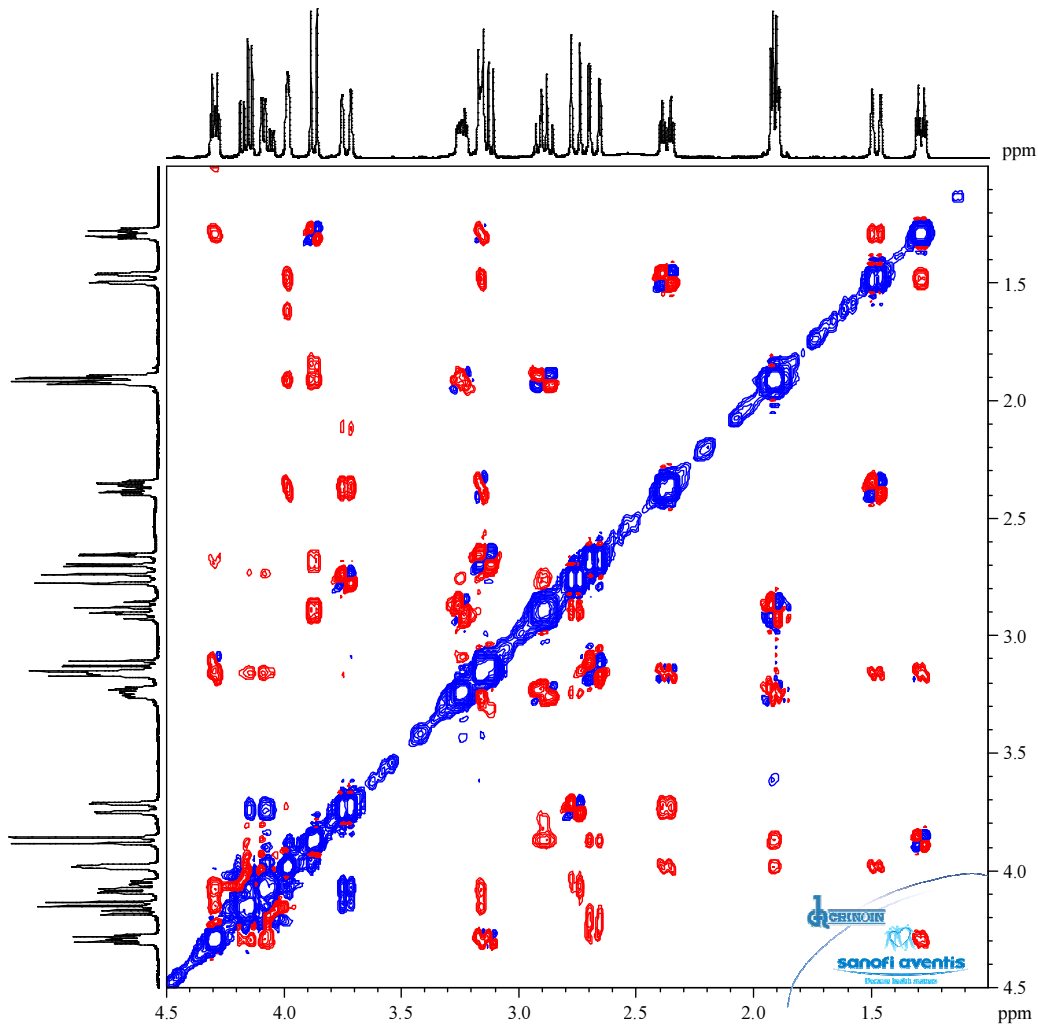
A sztrichnin spektrumait a Chinoin Zrt-ben 9.4 Tesla mágneses térerejű 5 mm-es BBFO mérőfejjel és z irányú gradienssel felszerelt Bruker Avance II 400 spektrométeren vettem fel. A műszer vezérlése és az adatfeldolgozás TopSpin 2.1 programcsomaggal történt. 5 mg sztrichnint oldottam 0.6 ml deutero-kloroformban, a mérés során a mérőfejet $27\text{ }^\circ\text{C}$ -ra termosztáltam. A spektrumok a 40-43. ábrán láthatók, a 40. ábrán a csatolási korrelációk és zéró-kvantum effektusok referenciájaként használt COSY spektrum, a 41. ábrán a Bruker pulzusprogram-könyvtárban megtalálható ROESY változattal, a 42. ábrán az easy-ROESY [88], a 43. ábrán a javasolt zqs-easy-ROESY módszerváltozattal [IV] felvett spektrum látható.



40. ábra. A sztrichnin referencia COSY spektruma. A felvétel a Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető kettőskvantum-szűrésre paraméterezett COSYgpmfqq pulzusprogrammal készült.

Felvételi paraméterek: spektrumszélesség: 9.2-0.2 ppm, 1 szkenn * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9 μ s, szinusz formájú gradiens pulzusok a Bruker ajánlása szerint 16, 12 és 40 %, a mérés időtartama ~ 5.5 perc.

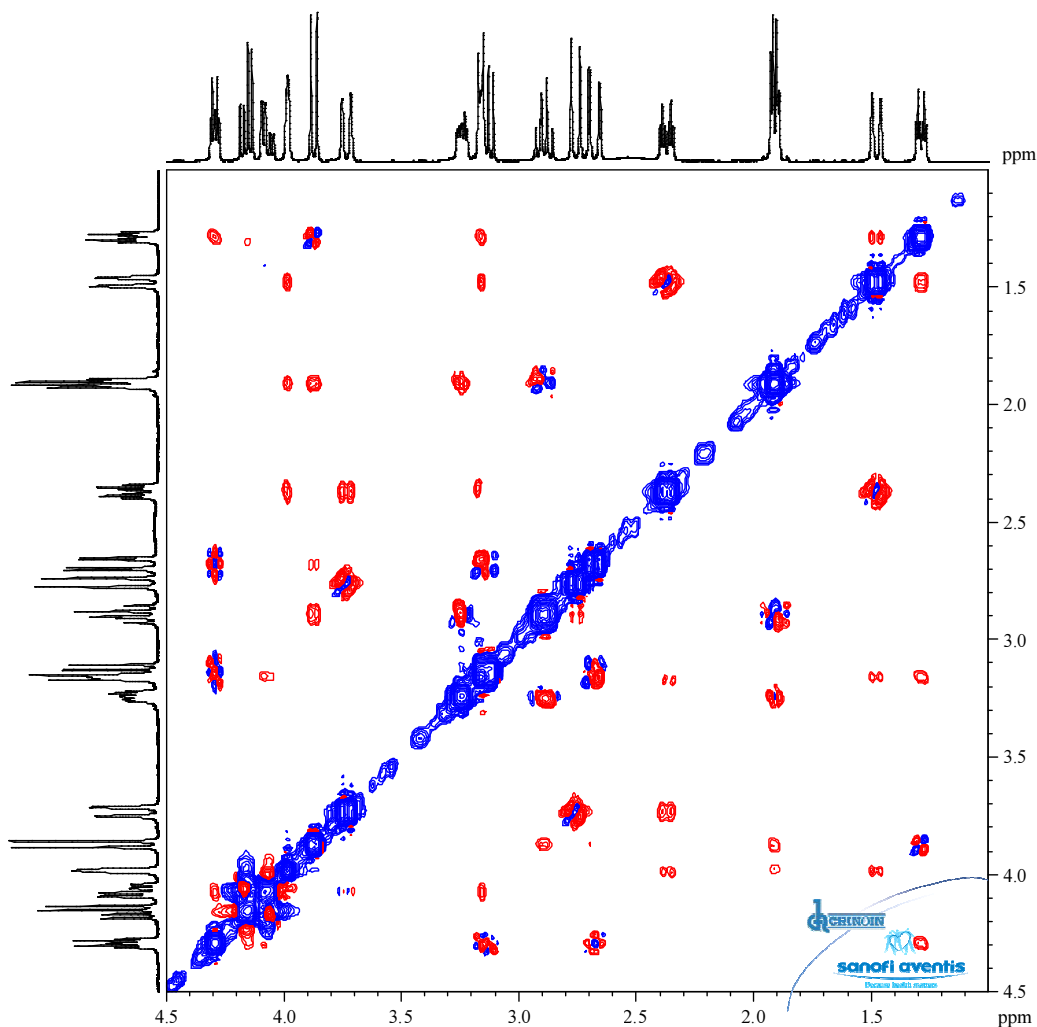
Feldolgozási paraméterek: az indirekt dimenzióban lineáris predikció 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz formájú ablakfüggvény eltolás nélkül mindkét dimenzióban, magnitúdó mód. A transzformált adatmátrix mérete 1K \times 1K adatpont, a digitális felbontás 3.5 Hz/pont.



41. ábra. A sztrychninnek a Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető ROESYph módszerrel felvett ROESY spektruma COSY/TOCSY-jellegű átmenetek miatt a számos keresztcsúcson - jellemzően az egymással csatoló partner hidrogén atomok keresztcsúcsain - jelalak-torzulás, fázisalternálás figyelhető meg.

Felvételi paraméterek: spektrumszélesség: 9.2-0.2 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9 μ s, spin-lock: 200 ms, spin-lock térerő $\gamma \cdot B_1/2\pi = 1666$ Hz. A felvétel ideje: 47 perc.

Feldolgozó paraméterek: az indirekt dimenzióban lineáris predikció 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet ablakfüggvény $\pi/2$ eltolással (SSB = 2) mindkét dimenzióban, fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált adatmátrix mérete 1K \times 1K adatpont, a digitális felbontás mindkét dimenzióban 3.5 Hz/pont.

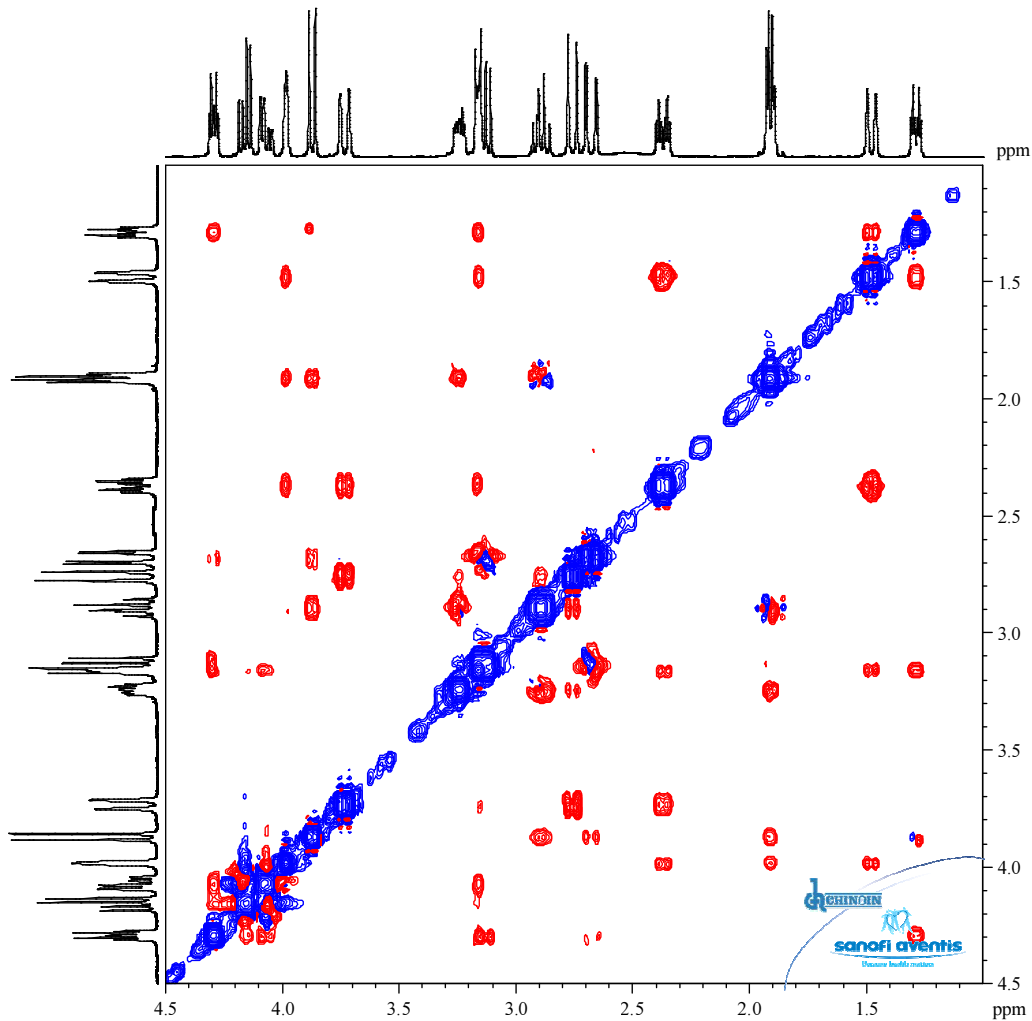


42. ábra. A sztrychnin *easy-ROESY* [88] spektruma.

A COSY/TOCSY jellegű spektrumhibák csökkentek, de nem tűntek el teljesen. A zérókvantum effektusok továbbra is alternáló fázisú elemeket adnak hozzá az egymással csatoló partner hidrogén atomok keresztcsúcsaihoz.

Felvételi paraméterek: spektrumszélesség: 9.2-0.2 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9 μ s. Spin-lock: 2*100 ms, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss adiabatikus rámpákkal, spin-lock térerő: $\gamma^*B_1/2\pi = 6977$ Hz, off-rezonancia-offszet: ± 4843 Hz, a spin-lock tér és a z tengely által bezárt szög a spektrum közepén: $\theta = 55^\circ$. Homospoil gardiens pulzusok: a spin-lock periódus előtt 27, utána 46 %, szinusz forma. A felvétel ideje: ~ 47 perc.

Feldolgozó paraméterek: az indirekt dimenzióban lineáris predikció 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet ablakfüggvény $\pi/2$ eltolással (SSB = 2) mindkét dimenzióban, fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált adatmátrix mérete 1K \times 1K adatpont, a digitális felbontás mindkét dimenzióban 3.5 Hz/pont.

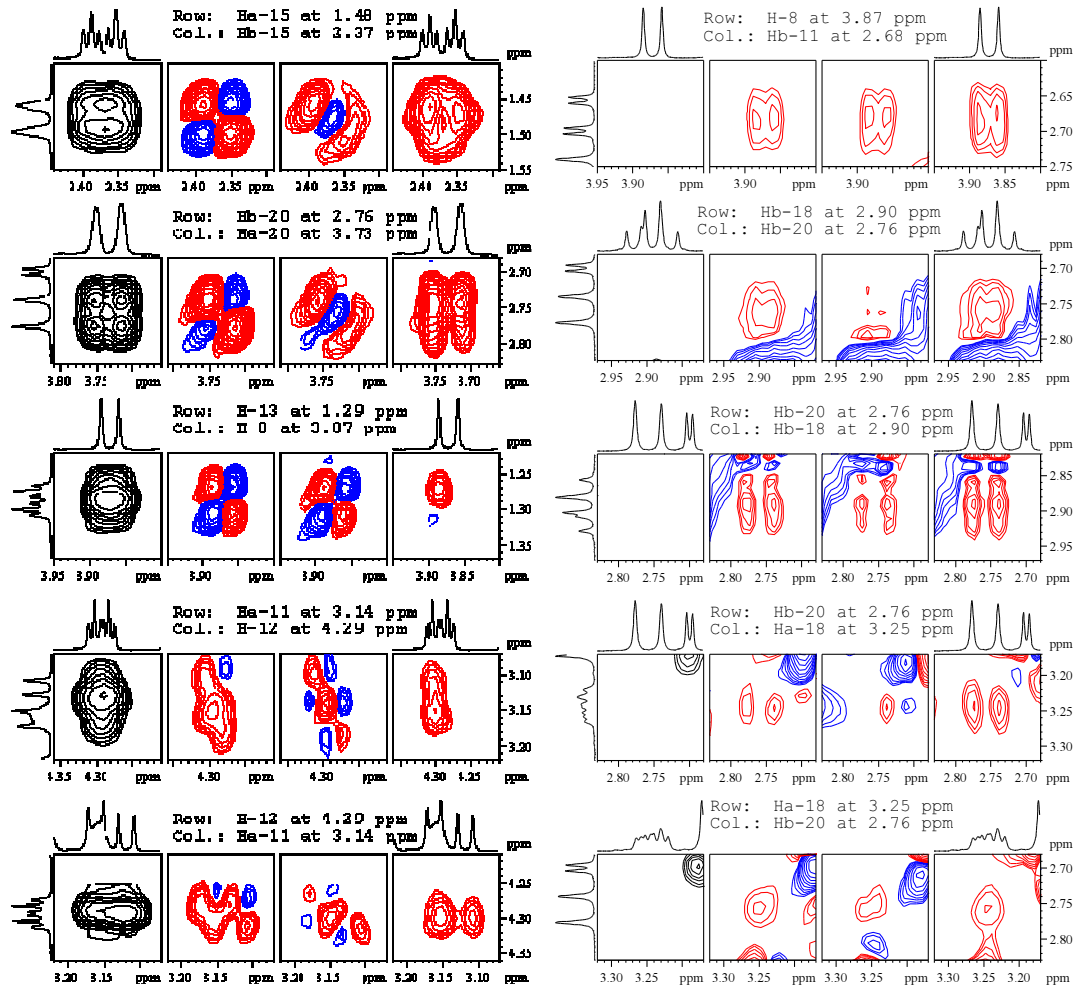


43. ábra. A sztrichnin offzet-kompenzált, zéró-kvantum elnyomásos (zqs-easy-) ROESY spektruma [IV]

A korábbi ROESY változatokkal felvett spektrumokon előfordult antifázisú elemek jórészt eltűntek a spektrumból vagy jelentős mértékben csökkent az intenzitásuk.

Felvételi paraméterek: spektrumszélesség: 9.2-0.2 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9 μ s. Spin-lock: 2*100 ms randomizálás nélkül, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss adiabatus rámpákkal, spin-lock térerő: $\gamma^*B_1/2\pi = 6977$ Hz, off-rezonancia-offzet: ± 4843 Hz, a spin-lock tér és a z tengely által bezárt szög a spektrum közepén: $\Theta = 55^\circ$. Zéró-kvantum elnyomás: a spin-lock előtt 50 ms ($\gamma^*B_1/2\pi = 316$ Hz), utána 30 ms ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz) adiabatus invertáló pulzus és velük egyidőben azonos időtartamban alkalmazott 2 % intenzitású gradiens pulzus. Homospoil gradiens pulzusok: a spin-lock periódus előtt 27, utána 46 %, szinusz forma. A felvétel ideje: 48 perc.

Feldolgozó paraméterek: az indirekt dimenzióban lineáris predikció 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet ablakfüggvény $\pi/2$ eltolással (SSB = 2) mindkét dimenzióban, fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált adatmátrix mérete 1K \times 1K adatpont, a digitális felbontás mindkét dimenzióban 3.5 Hz/pont.



44. ábra. Válogatott keresztcsúcsok a sztrichnin ROESY spektrumaiból

Mindkét táblában az első oszlop a COSY spektrum, második oszlop a Bruker pulzusprogram-könyvtárban megtalálható ROESY változattal, harmadik oszlop az easy-ROESY-vel [88] és negyedik oszlop a saját ROESY módszerváltozattal [IV] felvett spektrum részlete.

A bal tábla olyan keresztcsúcsokat tartalmaz, melyek egyben csatoló partnerek is. Jól látszik a különböző mértékű és jellegű fázisalternálás a két korábbi változattal felvett spektrum részletein és a tiszta pozitív fázis a saját változattal felvett spektrum részletein.

A jobb tábla spektrumrészletei nem csatolópartnerek közötti térközelségeket mutatnak, ezért nincs COSY keresztcsúcs az első oszlopban. Az első sorban lévő ROESY keresztcsúcs mindhárom módszerváltozattal egyaránt megfelelő. A második és harmadik valamint a negyedik és ötödik sor páronként ugyanakkor a térközelségnek az átlóra szimmetrikus két jelét mutatja. A saját változattal mért spektrumban keresztcsúcs az átló (második és harmadik sor) illetve alternáló fázisú más keresztcsúcs (negyedik és ötödik sor) közelében is megbízhatóan integrálható maradt. Ebben a sorozatban jelazonosítási és integrálási nehézség leginkább az easy-ROESY módszerváltozat (harmadik oszlop) esetén tapasztalható.

A spektrumok kvalitatív értékelése alapján a Bruker gyári ROESY változattal mért spektrum majdnem minden olyan keresztcsúcson, mely térközelségi és egyben csatoló partnerek között jelentkezik, fázisalternálás figyelhető meg, ami megnehezíti a térközelségi elem értékelését. A csatoló partnerek azonosításához referenciául szolgál a COSY spektrum. Az easy-ROESY módszerváltozattal mért spektrumban a korábban alternáló fázisú keresztcsúcsok egy része tiszta fázisúvá vált, míg más részükben a fázisalternálás továbbra is megmaradt. A saját változattal mért spektrumban csak néhány térközelségi keresztcsúcson maradt meg a COSY eredetű fázis-alternálás. Mindhárom ROESY módszerváltozattal felvett spektrumban megfelelő azoknak a keresztcsúcsoknak a jelalakja, melyek tisztán térközelségi csúcsok és nem tartalmaznak csatolásból eredő elemet. (44. ábra)

A módszerváltozat kvantitatív értékeléséhez a TopSpin programmal kiszámítottam a lehető legtöbb ROESY keresztcsúcs térfogati integrálját. A TopSpin 2D integráló moduljának algoritmus a legnagyobb integrálértéket 1-re normalja, ennek megfelelően az integrál értékek 0 és 1 közé esnek. Az átló alatt és fölött szimmetrikusan elhelyezkedő csúcspárok integrálja elvileg megegyezik, a gyakorlatban kisebb-nagyobb különbségek előfordulnak, ami egyrészt a mérési zaj véletlenszerű járuléka, másrészt a COSY eredetű jelelemek által okozott bizonytalanság. Az átló alatti és feletti integrálértékeket átlagoltam, és az atomtávolságokat az így kapott átlagértékekből a $NOE [\%] = k \cdot d^{-6}$ [90] összefüggéssel számítottam és irodalomból ismert egykristály röntgendiffrakciós mérés [91] alapján számított atomtávolságokkal vettem össze.

Itt egyrészt meg kell jegyezni, hogy azért volt szükség a módszer validáláshoz merev szerkezetű modellvegyületre, mert oldatfázisban a mért atomtávolságokra statisztikus eloszlást [92] mutató hajlékony szerkezet esetén is a kristályos szerkezet rendezett, így a kétféle módszer nem lenne összevethető. Másrészt megjegyzendő, hogy az egykristály röntgendiffrakciós szerkezet sem abszolút pontos, a kristályrácsban a röntgendiffrakció számára látható atomok helyzetére a módszer nem kiterjedés nélküli pontokat vagy az atomtörzs méretével megegyező méretű gömböket, hanem valószínűségi ellipszoidokat ad mag. Továbbá a hidrogén atomok a röntgendiffrakciós módszer számára láthatatlanok, azok pozíciója a mérési adatok feldolgozásának utolsó fázisában számítás eredménye, vagyis görgetett hibát tartalmazhat, még akkor is, ha ez a hiba a legtöbb esetben nem jelentős.

A ROESY módszer validálása során szükség van valamilyen bázis felvételére, mely alapján a $\text{NOE} [\%] = k \cdot d^{-6}$ összefüggésben a k (atomtávolságtól független paraméter) értékét meghatározzuk. Ez történhet úgy, hogy a független röntgendiffrakciós mérésből és a ROESY-ből számított atomtávolságok különbségének négyzetösszege minimális legyen, vagy történhet úgy is, hogy kitüntetünk egy olyan atomtávolságot, amely független mindenféle kémiai szerkezettől és környezettől, és ezt tekintjük bázisnak [90]. A sztrichnin méréseinek kiértékelésekor azt az utóbbi módszert választottam. Ilyen kitüntetett atomtávolság lehet CH_2 csoport két nem ekvivalens hidrogén atomjának a távolsága, vagy pedig szubsztituált fenil csoport egymástól *orto* helyzetben lévő két hidrogén atomja. Szempont még, hogy az ily módon kiválasztott bázis atomtávolság kicsi legyen, így intenzív térközelségi keresztcsúcsot adjon a ROESY spektrumban a keresztcsúcs integráljához képest viszonylag kis relatív hibával. A bázis atompár kiválasztását korlátozza az a tényező, hogy az adatpontosság miatt fázisalternálás nélküli tiszta térközelségi csúcsokat kell adnia, holott akár geminális pár, akár *orto* szomszédság a kiválasztott, mindenképpen csatoló partnerek, akiknek a térközelségi keresztcsúcsát valószínűleg csatolás eredetű fázisalternálás terheli, mely a saját módszerváltozattal jó eséllyel elnyomható, más módszerváltozattal a kvalitatív eredmények alapján ennek kevesebb esélye van. A kiválasztott bázis atomtávolság a sztrichnin $\text{H}_a\text{-}^{15}\text{H}_b\text{-}^{15}$ atomjai közötti geminális atomtávolság.

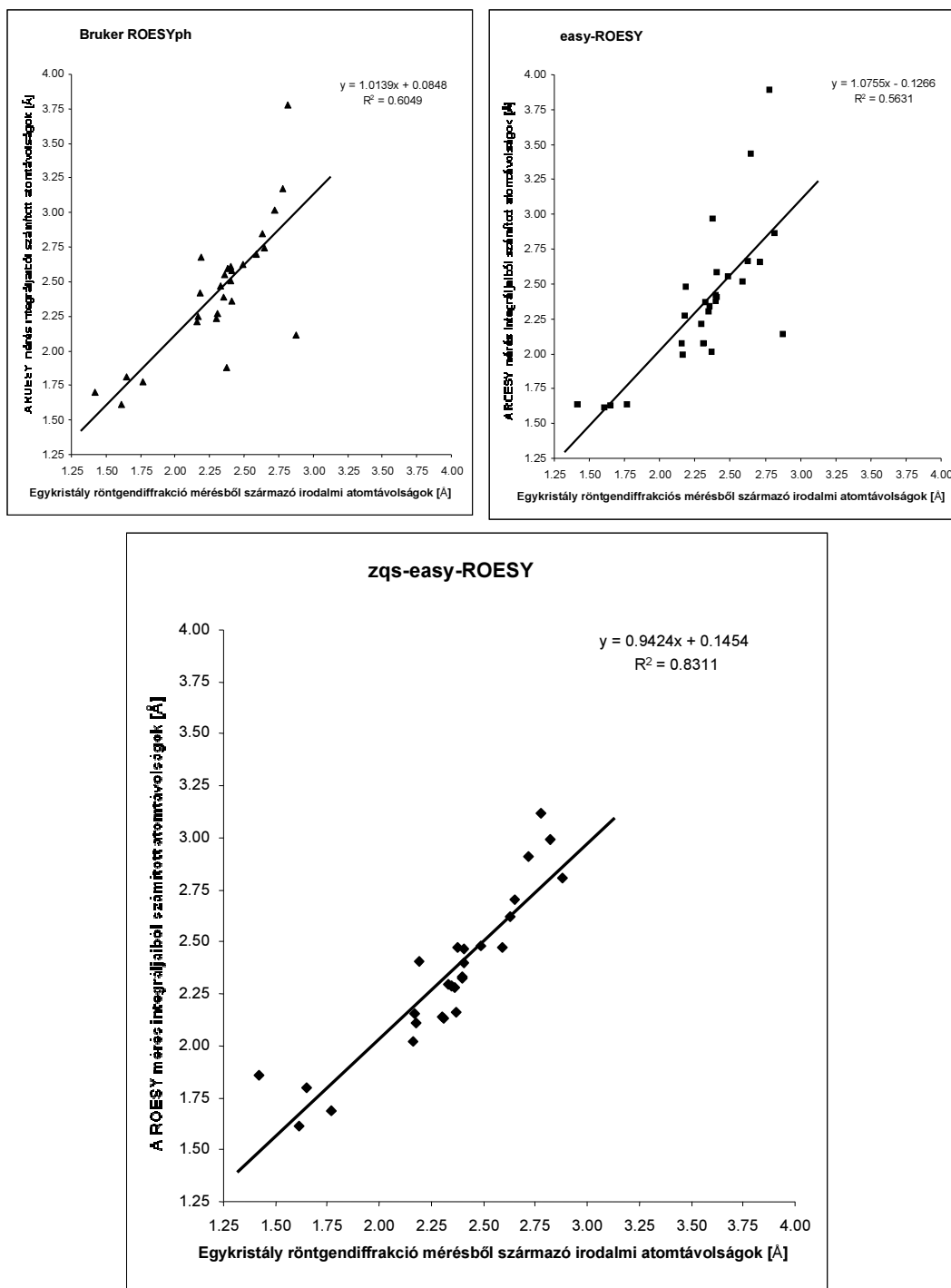
A *zqs-easy-random* ROESY módszer validálásához szükséges számításokat a 3. táblázat tartalmazza. A 45. ábrán a röntgendiffrakcióval való összevetés eredménye látható.

Következő oldal:

3. táblázat. A *zqs-easy* ROESY módszer validálásához szükséges számítások.

H/H atompár	Atom- távolság Röntgen- diffrakció alapiján [Å]	Offszet kompenzált zqs ROESY			easy-ROESY			Bruker ROESYph					
		Átló föliött	Átló alatt	Átlag	Átló föliött	Átló alatt	Átlag	Átló föliött	Átló alatt	Átlag			
H-1/H-16	2.40	0.111	0.104	0.1075	2.328	0.107	0.084	0.096	2.377	0.063	0.046	0.055	2.613
H-1/H ₂ -17	2.82	0.032	0.016	0.0240	2.989	0.058	0.005	0.032	2.859	0.007	0.005	0.006	3.775
H _a -18/H _b -18	1.65	0.517	0.481	0.4990	1.802	1.000	0.835	0.918	1.630	0.431	0.547	0.489	1.813
H ₂ -17/H _a -18	2.46												
2.31	0.184	0.183	0.1835	2.129	0.236	0.202	0.219	2.070	0.130	0.123	0.127	0.127	2.271
2.37	0.143	0.194	0.1685	2.160	0.237	0.281	0.259	2.012	0.350	0.438	0.394	0.394	1.879
2.95													
1.42	0.355	0.475	0.4150	1.858	0.896	0.909	0.903	1.634	0.716	0.718	0.717	0.717	1.701
2.17	0.171	0.173	0.1720	2.152	0.322	0.228	0.275	1.992	0.140	0.127	0.134	0.134	2.251
2.72	0.016	0.040	0.0280	2.913	0.070	0.029	0.050	2.652	0.009	0.037	0.023	0.023	3.017
2.65	0.053	0.035	0.0440	2.702	0.016	0.005	0.011	3.434	0.050	0.031	0.041	0.041	2.746
2.35	0.150	0.088	0.1190	2.289	0.164	0.070	0.117	2.297	0.133	0.054	0.094	0.094	2.388
3.38													
2.30	0.238	0.122	0.1800	2.136	0.198	0.095	0.147	2.213	0.162	0.120	0.141	0.141	2.230
2.88	0.037	0.033	0.0350	2.807	0.198	0.162	0.180	2.138	0.214	0.173	0.194	0.194	2.116
2.36	0.112	0.131	0.1215	2.281	0.104	0.109	0.107	2.334	0.063	0.062	0.063	0.063	2.554
1.61	0.962	1.000	0.9810	1.610	0.973	1.000	0.987	1.610	1.000	0.995	0.998	0.998	1.609
1.77	0.736	0.757	0.7465	1.685	0.906	0.878	0.892	1.638	0.576	0.547	0.562	0.562	1.771
2.78	0.016	0.021	0.0185	3.121	0.005	0.005	0.005	3.886	0.016	0.018	0.017	0.017	3.173
2.38	0.059	0.090	0.0745	2.475	0.000	0.051	0.026	2.962	0.058	0.056	0.057	0.057	2.594
2.40	0.138	0.073	0.1055	2.335	0.118	0.055	0.087	2.416	0.106	0.033	0.070	0.070	2.509
2.59	0.098	0.052	0.0750	2.472	0.087	0.049	0.068	2.515	0.052	0.038	0.045	0.045	2.698
2.41	0.094	0.059	0.0765	2.464	0.077	0.039	0.058	2.583	0.130	0.072	0.101	0.101	2.358
2.49	0.050	0.097	0.0735	2.480	0.054	0.071	0.063	2.551	0.032	0.074	0.053	0.053	2.625
2.19	0.107	0.070	0.0885	2.404	0.093	0.057	0.075	2.474	0.058	0.036	0.047	0.047	2.678
2.41	0.115	0.065	0.0900	2.398	0.117	0.061	0.089	2.405	0.071	0.046	0.059	0.059	2.582
2.16	0.264	0.240	0.2520	2.020	0.233	0.202	0.218	2.072	0.158	0.138	0.148	0.148	2.212
2.18	0.143	0.244	0.1935	2.111	0.080	0.173	0.127	2.268	0.076	0.098	0.087	0.087	2.417
2.33	0.109	0.123	0.1160	2.298	0.097	0.100	0.099	2.364	0.078	0.076	0.077	0.077	2.467
3.61													
2.63	0.061	0.044	0.0525	2.623	0.067	0.029	0.048	2.665	0.037	0.028	0.033	0.033	2.848

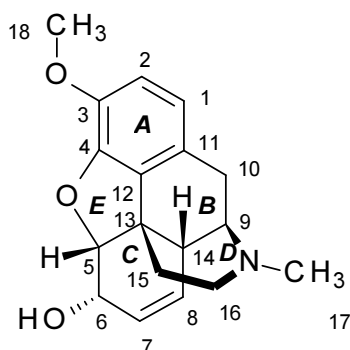
NOE=k*d⁶



45. ábra. A három ROESY módszerváltozatból nyert, illetve a röntgendiffrakció eredményeiből ismert atomtávolságok összevetése. Mindkét előzmény módszerváltozatban vannak kiugró elemek, ahol a röntgendiffrakciós és ROESY atomtávolságok jelentősen eltérnek. Mindez leginkább a csatoló partnerek térközelségi keresztcsúcsain fellépő fázisalternálás rovására írhatók. A regressziós egyenes paraméterei megfelelnek az elvárásnak, meredeksége közel 1, tengelymetszete közel 0, az R^2 illeszkedési jóságparaméter a tisztább jelalak miatt a saját változat esetén az 1-hez leginkább közeli.

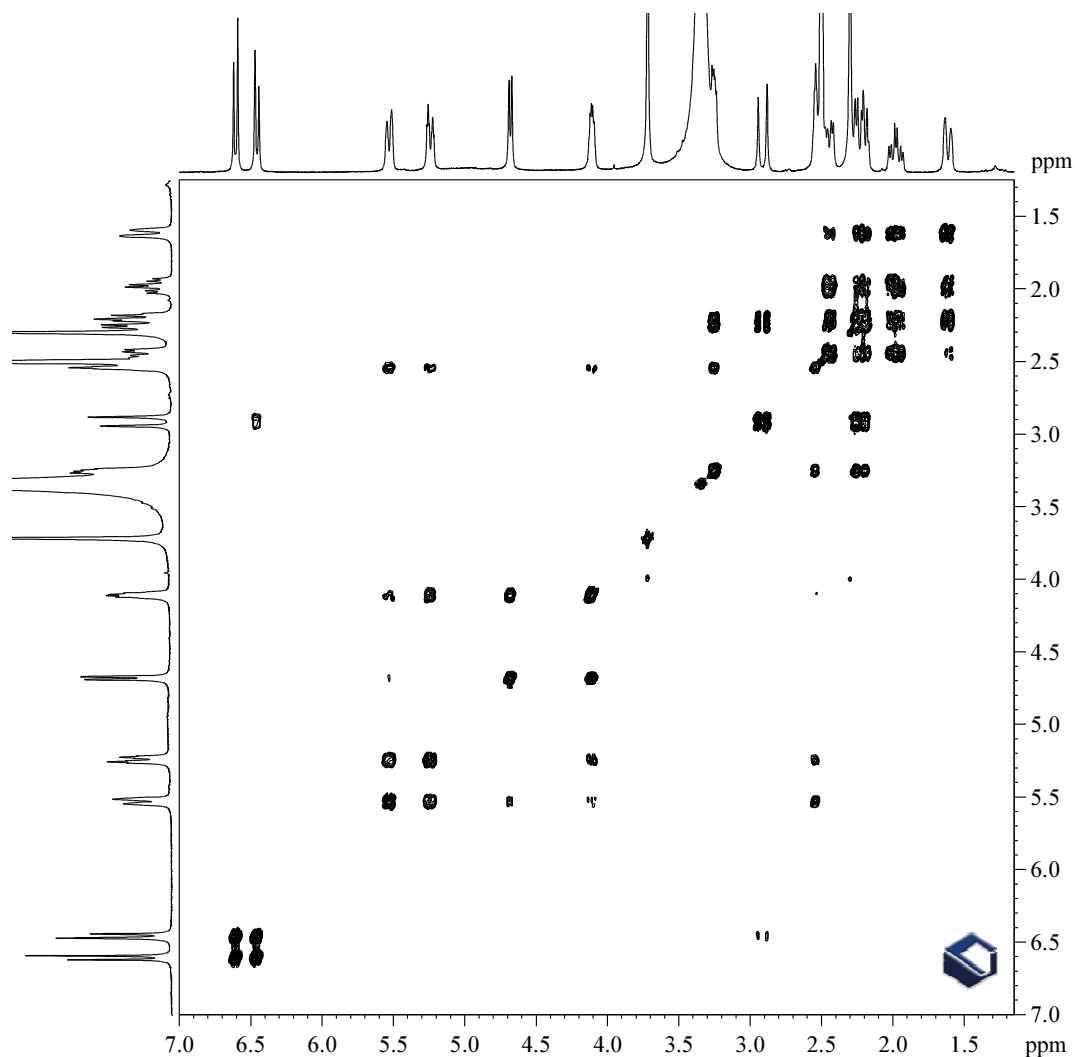
A ROESY mérések szórása - különösen a kevesebb fázisalternálást tartalmazó saját változat esetén – tovább csökkenthető lett volna hosszabb relaxációs várakozással illetve a szkenelek számának növelésével, de mindkét módosítás a mérésidő jelentős megnövekedésével járt volna, ami ellentmond annak a célunknak, hogy olyan, gyakorlatban is kivitelezhető paraméterezéssel ajánljuk a módszerváltozatot, amely megfelel a gyógyszergyári kutatóhelyen szolgáltatásként végzett munka során előforduló mintaszámnak és mintánként rendelkezésre álló mérésidőnek. Így méréseink pontossága alatta marad a [93]-as számú cikkben, nagyon precíz beállítással, extrém hosszú relaxációs várakozással és nagyszámú szkenelek felvételével elért pontosságnak, de megfelel a mindennapos gyakorlati igényeknek.

A módszer validálásához választott másik modellvegyület - a kodein - már egyértelműen a NOESY szokásos mérettartományába esik (46. ábra).



46. ábra. A modellvegyületként használt kodein szerkezete és vázatomjainak számozása (összegképlet: $C_{18}H_{21}NO_3$, relatív molekulatömeg: 299.37)

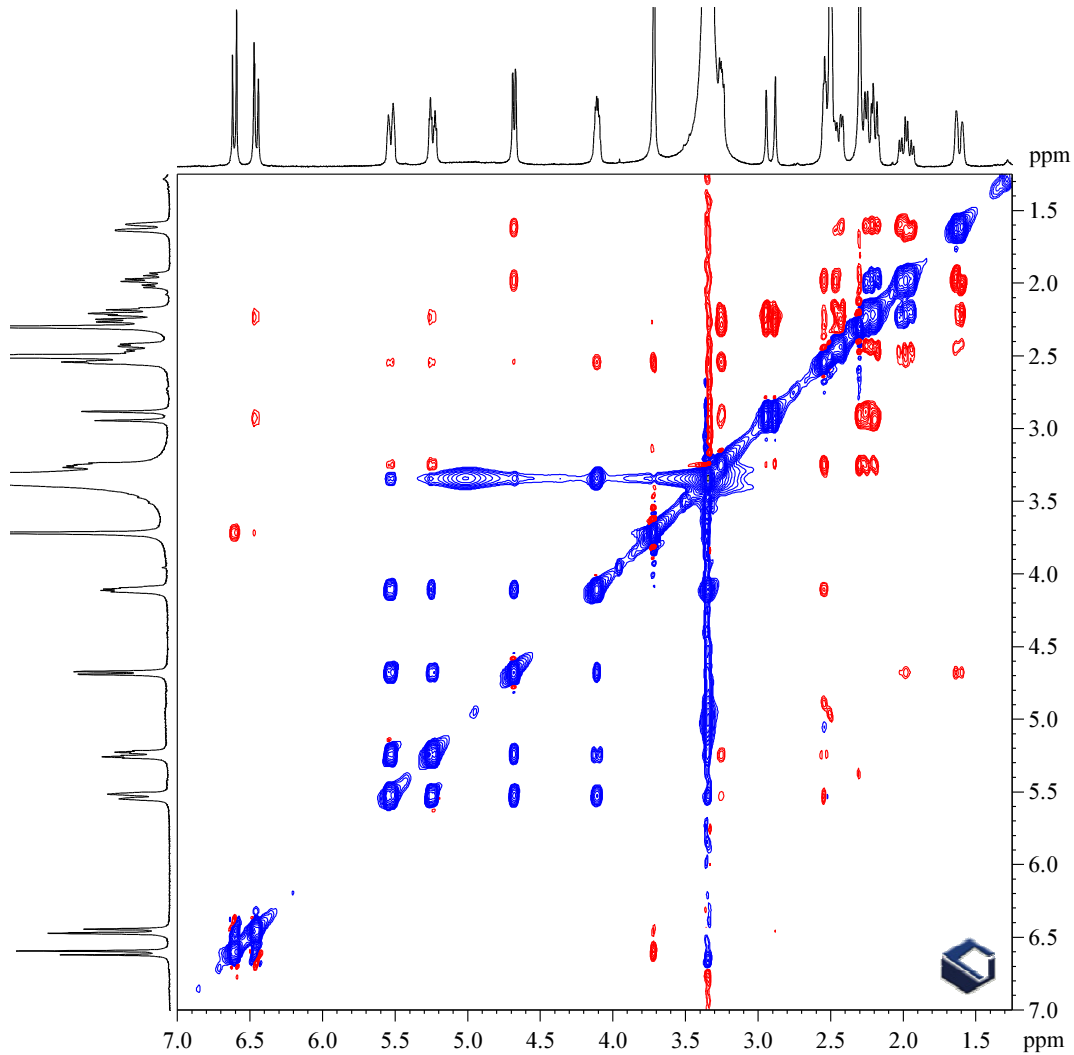
A kodein spektrumait a Vichem Kft-ben 7.04 Tesla mágneses térerejű 5 mm-es SEI mérőfejjel és z irányú gradienssel felszerelt Bruker Avance 300 spektrométeren vettem fel. A műszer vezérlése és az adatfeldolgozás TopSpin 1.3 programcsomaggal történt. 7 mg kodein bázist oldottam 0.6 ml deutero-dimetilszulfidban, a mérések során a mérőfejet 30 °C-ra termosztáltam. A minta spektrumai a 47-51. ábrákon, részletek az 52. ábrán láthatók.



47. ábra. A kodeinnek a Bruker pulzusprogram-könyvtárban elérhető COSYgpmfql pulzusprogrammal mért és referenciának használt magnitúdó módú COSY spektruma. Paraméterezés a kétkvantumos szűrésnek megfelelően.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 10-0 ppm, 1K adatpont a detektált dimenzióban, 1 szken * 256 kísérlet az indirekt dimenzióban. Relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, 1 dB erősítési tényező mellett, szinusz formájú gradiens pulzusok a Bruker ajánlása szerint rendre 16, 12 és 40 %. A felvétel ideje: 5.5 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban eltolás nélkül (SSB = 0), magnitúdó mód. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 2.9 Hz/pont mindkét dimenzióban.

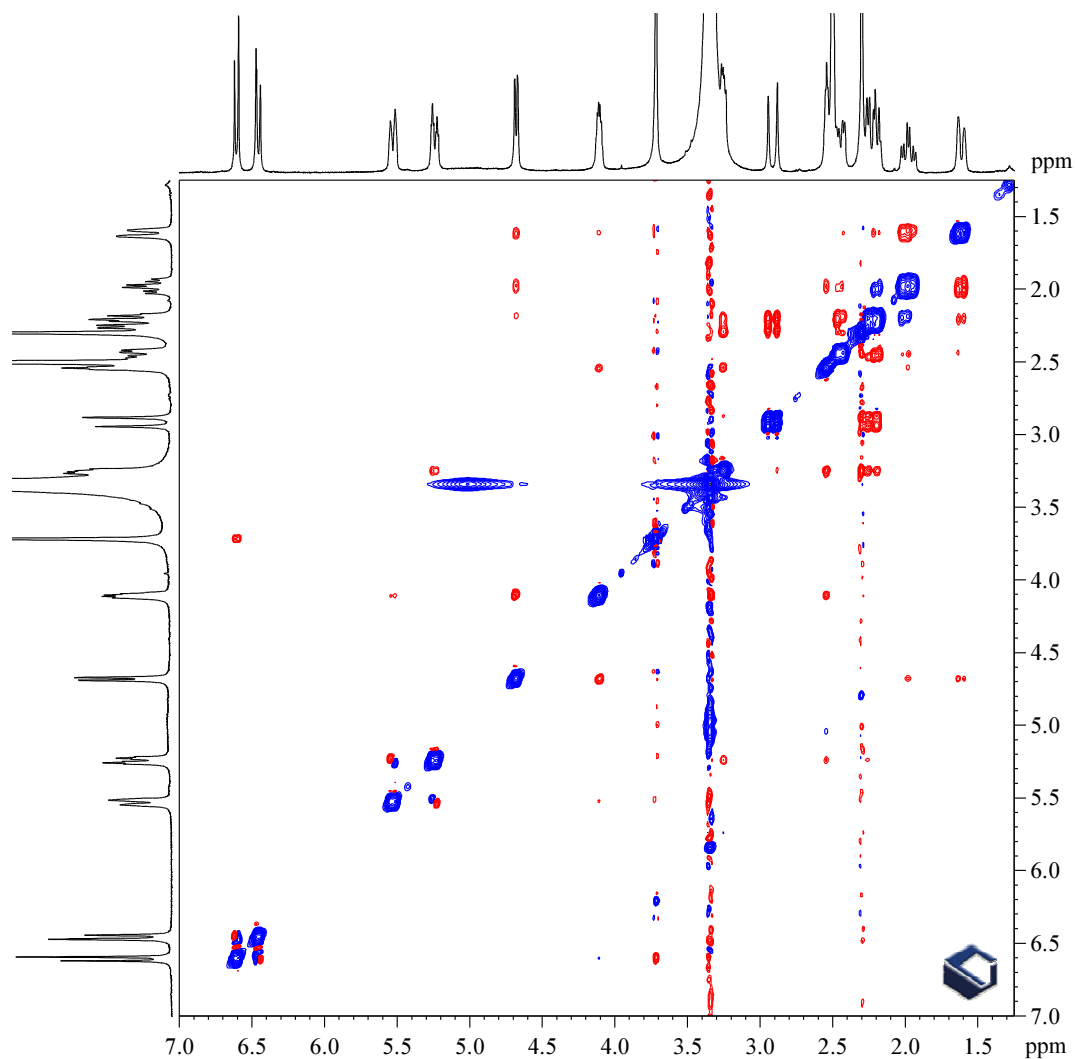


48. ábra. A kodeinnek a Bruker pulzusprogram-könyvtárban elérhető ROESY ρ h pulzusprogrammal mért ROESY spektruma.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 10-0 ppm, 1K adatpont a detektált dimenzióban, 8 szkennel * 256 kísérlet az indirekt dimenzióban. Relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, spin-lock: 200 ms, spin-lock térerő $\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 2030$ Hz. A felvétel ideje: 48 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 2.9 Hz/pont mindkét dimenzióban.

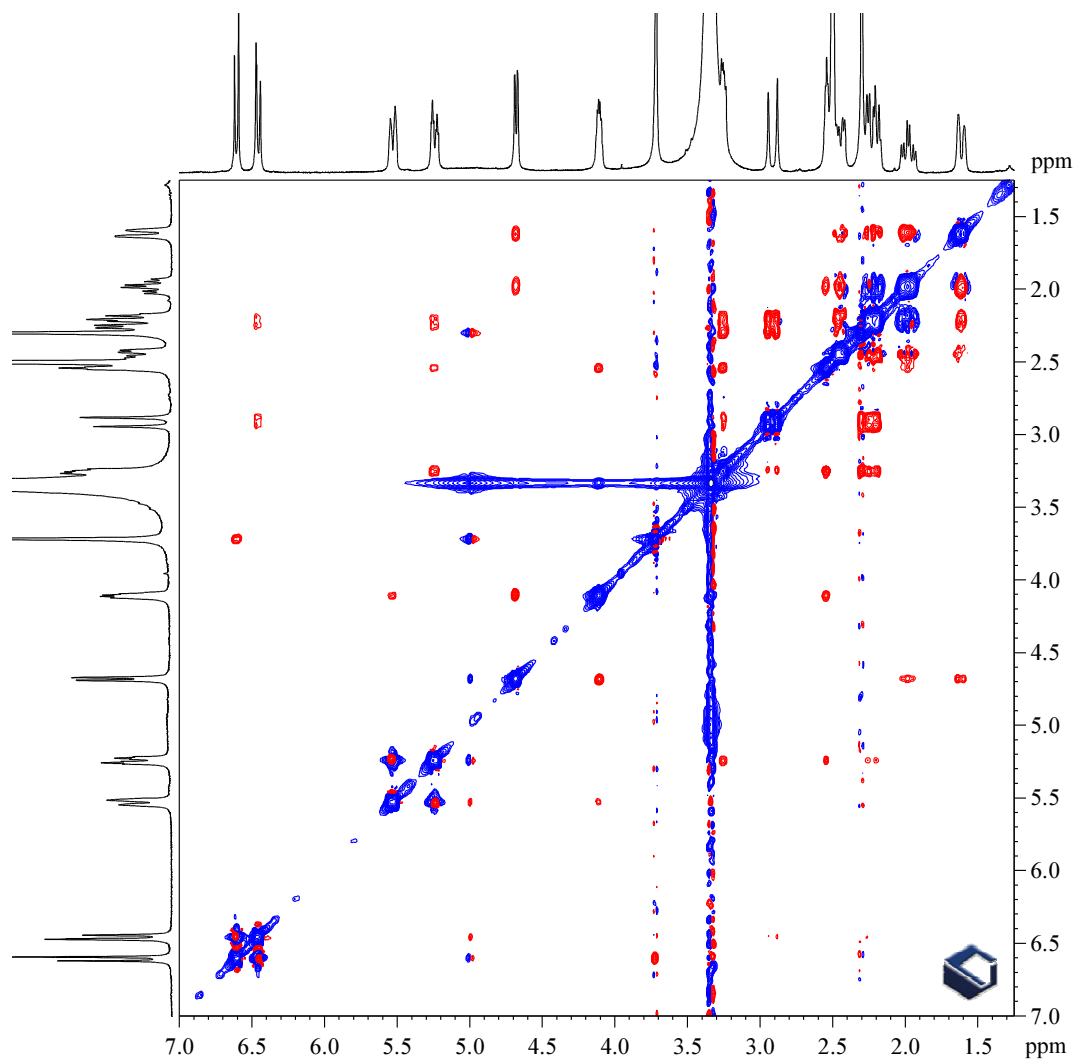
A spektrumban COSY/TOCSY eredetű jelalak-torzulások figyelhetők meg; kevert fázisú keresztcsúcsok és a spektrum közepén egy az átlóval azonos fázisú TOCSY blokk. Egyes jelek előjelváltása a viszonylag erős spin-lock térerő miatt fellépő Hartmann-Hahn oszcillációval [94] magyarázható.



49. ábra. A kodein zqs -NOESY [85] pulzusprogrammal mért NOESY spektruma.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 10-0 ppm, 1K adatpont a detektált dimenzióban, 8 szken * 256 kísérlet az indirekt dimenzióban. Relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, NOESY keverési idő: 300 ms. Zérókvantum elnyomás: a keverési idő elején 30 ms időtartamú adiabatikusan invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz) és vele egyidőben azonos időtartamú 2 % kimenőteljesítményű gradiens pulzus majd 1 ms időtartamú szinusz formájú 40 % kimenőteljesítményű homospoil gradiens pulzus. A felvétel ideje: 51 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 2.9 Hz/pont mindkét dimenzióban.

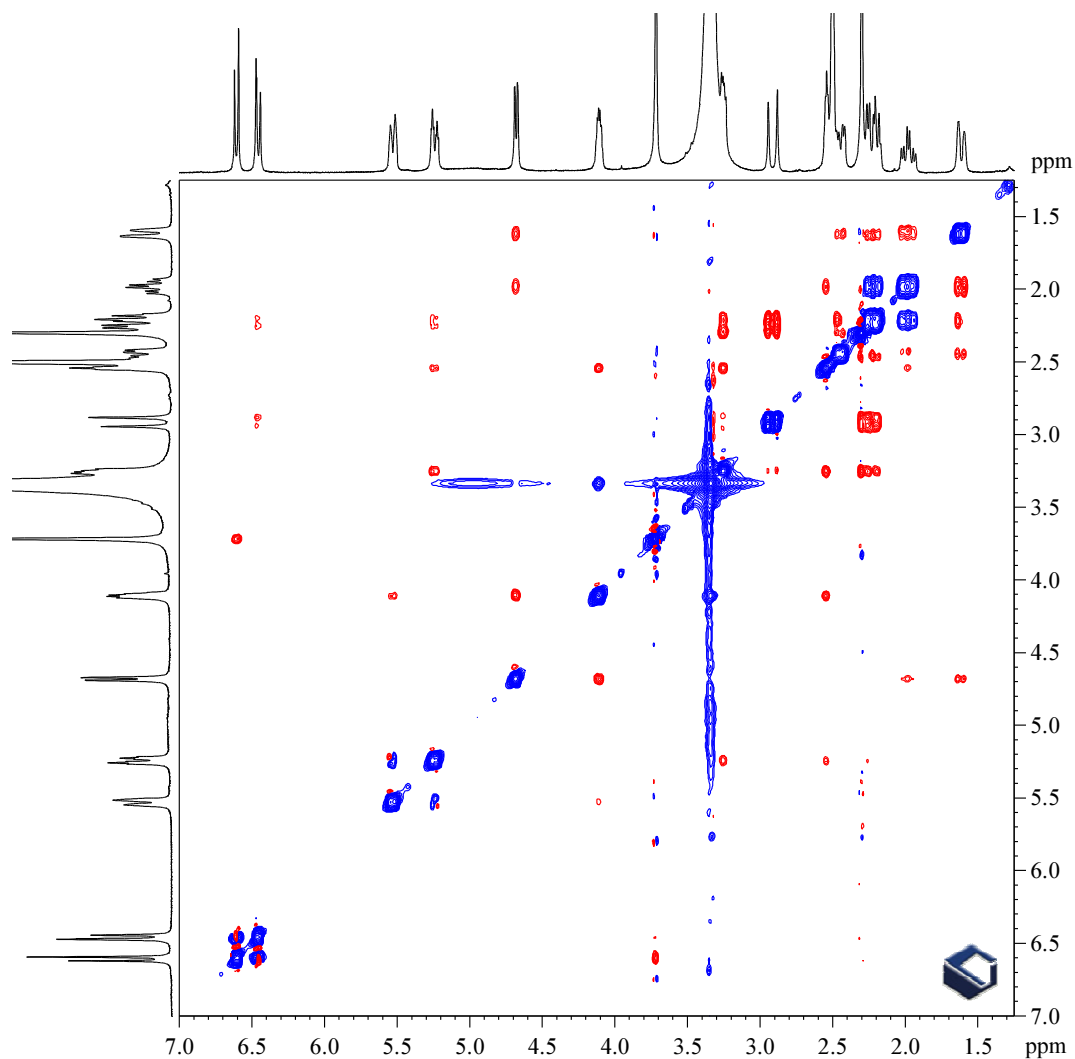


50. ábra. A kodein *easy-ROESY* [88] pulzusprogrammal mért ROESY spektruma.

A COSY/TOCSY eredetű fázistorzulások jelentős mértékben visszaszorultak, a ROESYph pulzusprogrammal felvett spektrum közepén volt TOCSY blokk most nem jelentkezik, ugyanakkor egyes keresztcsúcsokon még mindig előfordulnak fázistorzulások.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 10-0 ppm, 1K adatpont a detektált dimenzióban, 8 szkenn * 256 kísérlet az indirekt dimenzióban. Relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s. Spin-lock: 2*100 ms, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss adiabatikus rámpákkal, spin-lock térerő: $\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 5680$ Hz, off-rezonancia offszet: ± 3300 Hz, $\theta = 60^\circ$. Szinuszos formájú homospoil gradiens pulzusok: a spin-lock periódus előtt 27, utána 46 %. A felvétel ideje: 48 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinuszos-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 2.9 Hz/pont mindkét dimenzióban.

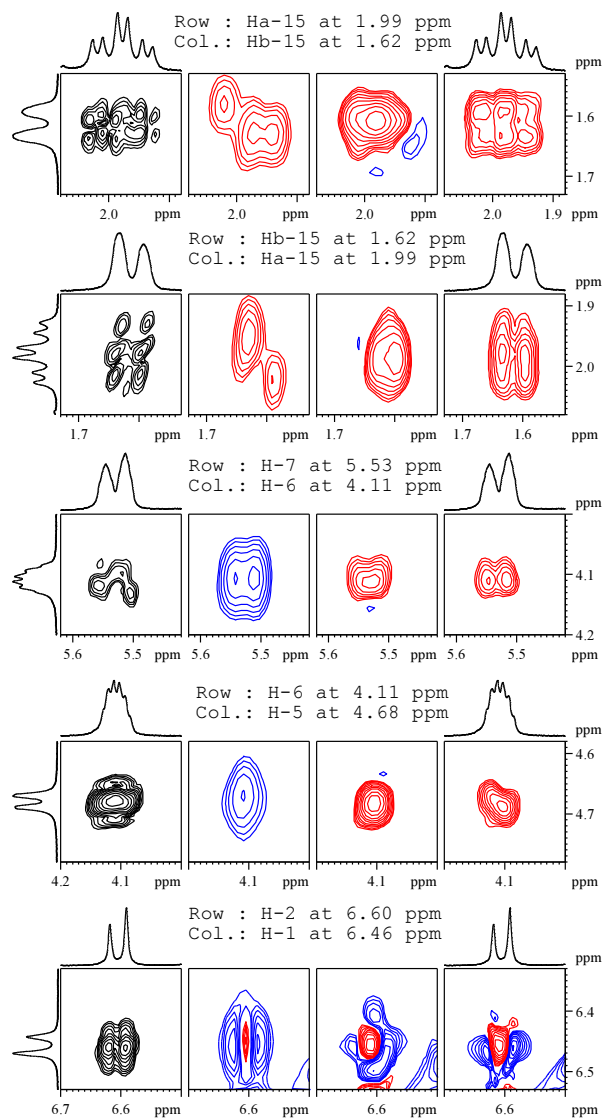


51. ábra. A kodein *zqs-easy-ROESY [IV]* pulzusprogrammal - az általunk javasolt pulzusprogram-változattal - mért ROESY spektruma.

Az antifázisú elemek a keresztcsúcsokból – két jelpár kivételével – teljesen eltűntek.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 10-0 ppm, 1K adatpont a detektált dimenzióban, 8 szkenn * 256 kísérlet az indirekt dimenzióban. Relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s. Spin-lock: 2*100 ms, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss adiabaticus rámpákkal, spin-lock térerő: $\gamma^*B_1/2\pi = 5680$ Hz, off-rezonancia offszet: ± 3300 Hz, $\theta = 60^\circ$. A spin-lock időtartamok maximum ± 5 %-kal randomizálva. Zéró-kvantum elnyomás: a spin-lock blokk előtt 50 ms időtartamú ($\gamma^*B_1/2\pi = 316$ Hz), utána 30 ms időtartamú ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz) adiabaticus invertáló pulzussal és vele egyidőben azonos időtartamú 2 % kimenőteljesítményű gradiens pulzussal, Szinus formájú 1 ms időtartamú homospoil gradiens pulzus a spin-lock periódus után 46 % teljesítménnyel. A felvétel ideje: 52 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 2.9 Hz/pont mindkét dimenzióban.



52. ábra. Válogatott keresztcsúcsok a kodein spektrumaiból.

Első oszlop: dcf-COSY spektrum referenciaként, második oszlop: a Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető ROESYph pulzusprogrammal felvett ROESY spektrum, harmadik oszlop: easy-ROESY [88], negyedik oszlop: a javasolt zqs-easy-ROESY változat [IV].

Az első két sor egy geminális pár átlóra szimmetrikus két keresztcsúcsát mutatja. Az általunk javasolt ROESY változat kitűnő jelalakot ad, míg a korábbi változatokkal mért spektrumokban a jelek alakja különböző mértékben torzult.

A harmadik és negyedik sorban egy-egy vicinális csatoló partner térközelségi keresztcsúcsa látható, ebben a két esetben a Bruker gyári pulzusprogrammal mért spektrum ezen keresztcsúcsai az átlóval azonos fázisúak, térközelség értékelésére használhatatlanok a térközelségi intenzitást túlkompenzáló TOCSY elem miatt. Az easy-ROESY és az általunk javasolt változat ezen elemei egyaránt jól értékelhetők.

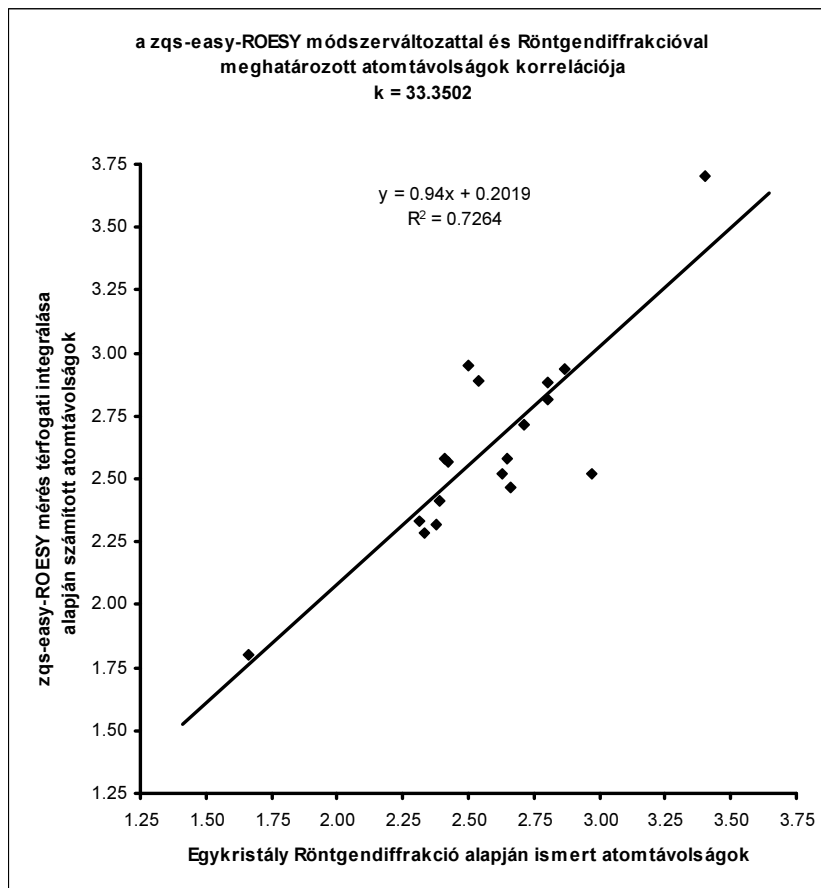
Az utolsó sor olyan spektrumrészletet mutat, ahol a beépített szűrőelemek egyike sem tudta a nemkívánatos csatolás eredetű elemet elnyomni, így mindhárom ROESY felvételben torzult jelalakot láthatunk.

A 4. táblázat tartalmazza a kodein molekulában a javasolt zqs-easy-ROESY módszerváltozattal számított $^1\text{H}/^1\text{H}$ atomtávolságokat. Az 54. ábra a ROESY mérésből és irodalmi adat egykristály röntgendiffrakciós mérésből származó atomtávolságok korrelációját mutatja.

4. táblázat. A kodein molekulában található, zqs-easy-ROESY módszerváltozattal meghatározott $^1\text{H}/^1\text{H}$ atomtávolságok táblázata.

H/H atompár	Atom- távolság egykristály röntgen- diffrakció alapján [Å]	zqs-easy-ROESY (javasolt változat)			Számított atomtávolság [Å] k=33.3502
		Térfogati integrál		átlag	
		Az átló fölött	Az átló alatt		
H-1/H-2	2.38	Alternáló fázisú keresztcsúcs			
H-1/H _a -10	2.80	0.099	0.035	0.0670	2.816
H-1/H _b -10	2.87	0.076	0.028	0.0520	2.937
H-5/H-6	2.33	0.252	0.221	0.2365	2.282
H-5/H-14	3.40	0.015	0.011	0.0130	3.701
H-5/H _a -15	2.66	0.173	0.124	0.1485	2.466
H-5/H _b -15	2.63	0.145	0.116	0.1305	2.520
H-6/H-7	2.50	0.061	0.040	0.0505	2.952
H-6/H-14	2.97	0.132	0.128	0.1300	2.521
H-7/H-8	2.29	Alternáló fázisú keresztcsúcs			
H-8/H-9	2.65	0.141	0.086	0.1135	2.579
H-8/H _a -10	2.71	0.123	0.044	0.0835	2.714
H-8/H-14	2.80	0.068	0.048	0.0580	2.884
H-9/H _a -10	2.23	Nem különül el H-9/H ₃ -17-től			
H-9/H _b -10	2.54	0.051	0.063	0.0570	2.893
H-9/H-14	2.31	0.201	0.213	0.2070	2.333
H _a -10/H _b -10 (gem)	1.60	Nem különül el H _b -10/H ₃ -17- től			
H _b -10/H _b -16	2.43	Nem különül el H _b -10/H _a -10- től			
H-14/H _a -15	2.41	0.108	0.117	0.1125	2.583
H _a -15/H _b -15 (gem)	1.66	0.968	1.000	0.9840	1.799
H _a -15/H _a -16	2.39	0.163	0.177	0.1700	2.411
H _a -15/H _b -16	2.94	Csatolás okozta jeltorzulás			
H _b -15/H _a -16	2.42	0.108	0.124	0.1160	2.570
H _b -15/H _b -16	2.38	0.211	0.218	0.2145	2.319
H _a -16/H _b -16 (gem)	1.66	Nem különül el H _a -16/H ₃ -17- től			

$$k = 33.3502 \quad \text{ROE} = k \cdot d^{-6}$$

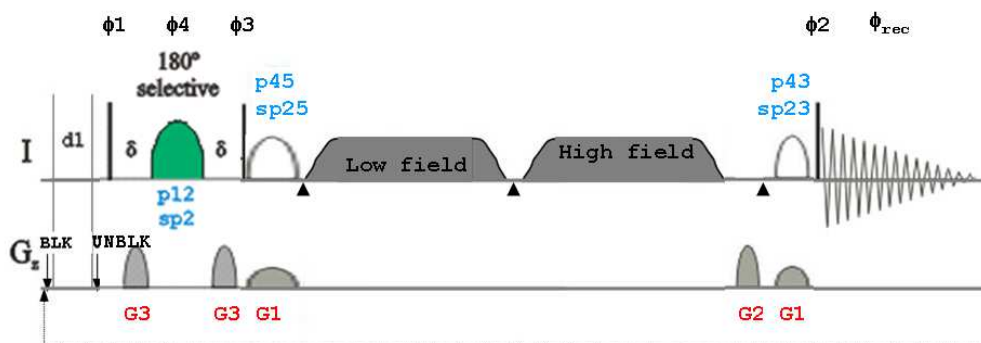


53. ábra. Az egykristály röntgendiffrakcióból [95] ismert és a zqs-easy-ROESY mérés keresztcsúcsainak térfogati integráljaiból számított $^1\text{H}/^1\text{H}$ atomtávolságok korrelációja. A korreláció számítása során nem volt kitétetett – szerkezeti okok miatt biztosnak vett – atomtávolság, a regresszió az összes adatot egyenlő súllyal vette figyelembe. A legnagyobb eltérés a H-6/H-14 és H-6/H-7 pároknál tapasztalható.

A publikációnk [IV] megjelenése óta eltelt idő során szerzőtársam, *Batta Gyula* és tanítványa *Balogh Aletta* végeztek a javasolt zqs-easy-random ROESY módszerváltozattal sikeres méréseket, integrálásokat és ez alapján eredményesen számítottak ki atomtávolságokat merev vázú vegyületeken. [96]

B.5.2. Szelektív 1D zqs-easy-ROESY változat fejlesztése

A zqs-easy-ROESY pulzusszekvenciának megírtam a szelektív 1D változatát is. A lehetséges szelektív gerjesztési módszerek közül a választásom az egypulzusos gradiens echo szelektív gerjesztésre (spfge-se) esett, mint egyszerű és hatékony változatra a lehetségesek közül. A szelektív gerjesztést a módszer általános gerjesztés után a kiválasztott jelen a mágnesezettségnek a gradiens pulzusok közötti szelektív pulzussal történő refókuszálásával, míg a ki nem választott jeleken a mágnesezettség defókuszálásával éri el. Az irodalomban ismert kettős fókuszálás a tapasztalataim szerint érzékenységmentesítéshez vezetne, a gradiens nélküli direkt szelektív gerjesztést pedig kevésbé megbízhatónak találtam. A keverési szakasz - benne a spin-lock és szűrőelemekkel - megegyezik a 2D változat során alkalmazott keverési szakasszal. Az ajánlott szelektív 1D változatban a spin-lock időtartamát nem randomizáljuk. (54. ábra) A szekvenciát a felügyeletem alatt álló műszeren a `butselau` modul forráskódjának átírásával sikeresen beillesztettem a Bruker Button-Select-NMR moduljába, az ott eredetileg található kevésbé hatékony szelektív 1D ROESY változat helyére.



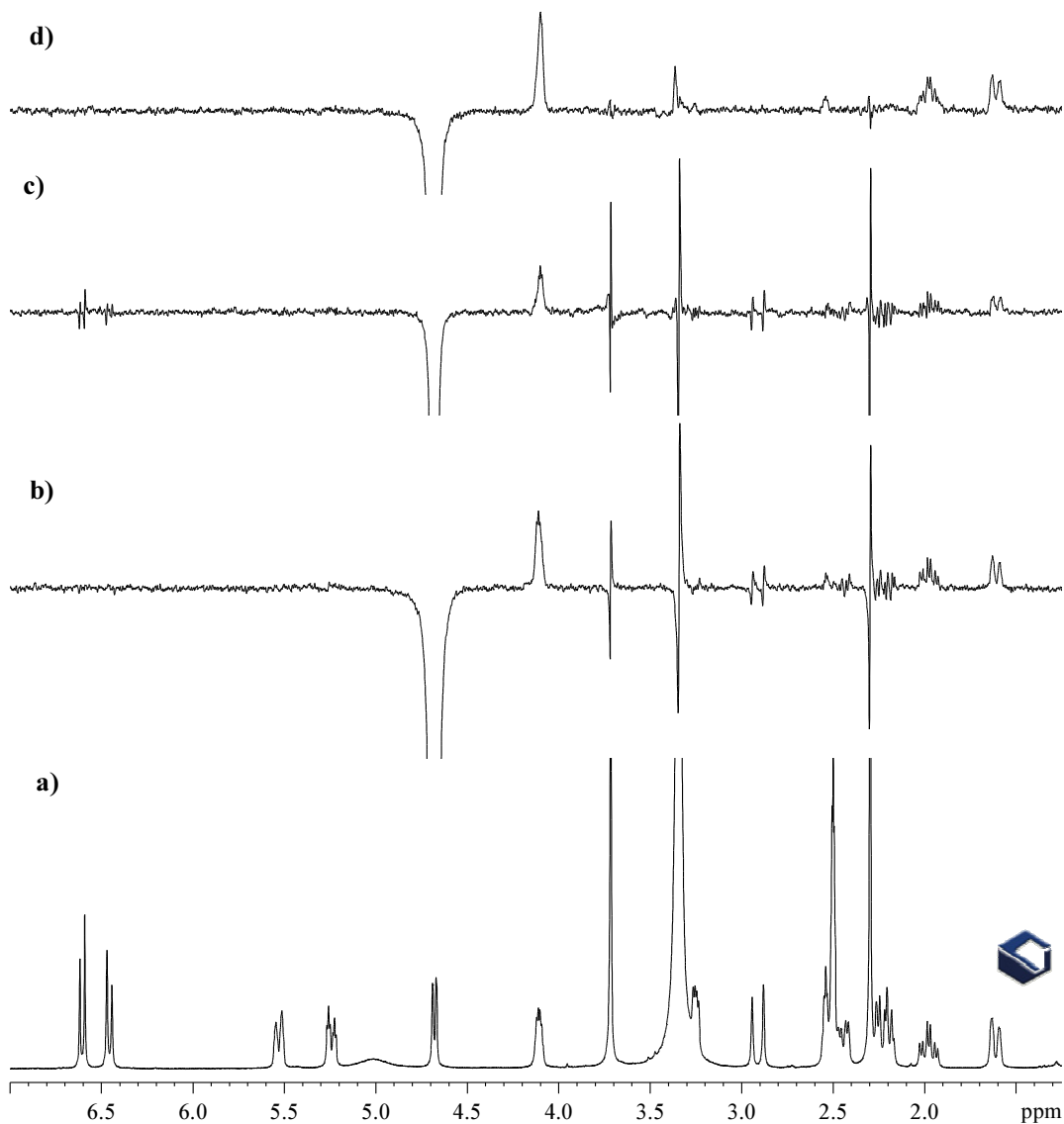
54. ábra. A spfge-se offszet-kompensált zéró-quantum elnyomásos adiabatikus szelektív 1D ROESY (spfge-se-1D-zqs-easy-ROESY) folyamatábrája.

Az ábra jelölésrendszere megegyezik a 2D változat esetén már ismertetettel. A gerjesztés szelektivitását az előkészítő részbe beillesztett spfge-se blokkal érjük el, az első nonszelektív gerjesztést a gradiens pulzusok közötti szelektív inverziós pulzus (zöld színű ívvel jelölve) csak a kiválasztott frekvencián refókuszálja és így megőrzi, minden más helyen a kezdeti gerjesztés defókuszálódik. Az off-rezonancia keverés szakasz azonos a 2D változat során alkalmazottal, a szelektív 1D változat keverési idejét nem randomizáltam. A minimális fázisciklus 8 szken (körülbelül 1 perc mérésidő), de a jobb jel/zaj viszony érdekében célszerű ennek többszörösét alkalmazni.

A gradiens pulzusok kimenő teljesítménye $G1 : G2 : G3 = 2 : 46 : 15 \%$

Mivel a spin-lock kismértékben fűti a mintát, célszerű viszonylag sok „dummy” szkent alkalmazni, hogy a termikus állandósult állapot beállhasson.

A javasolt szelektív 1D zqs-easy-ROESY változat hatékonyságát alább és a következő oldalakon, a kodein szelektív 1D spektrumsorozatain demonstrálom. (55. ábra)



55. ábra. A kodein válogatott szelektív 1D spektrumai.

A szelektíven gerjesztett jel a H-5, 4.68 ppm-nél.

a) Referencia ^1H spektrum

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 15-től -1 ppm-ig, 32 K adatpont, 16 szken, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 10.3 μs . Mérési idő 1 perc 15 másodperc.

Feldolgozási paraméterek: exponenciális ablakfüggvény 0.1 Hz vonalszélesedéssel. A digitális felbontás 0.15 Hz/pont.

b) egyszeres pulzus-tér-gradiens echo szelektív 1D ROESY, a Bruker pulzusprogramkönyvtárában hozzáférhető selrogp pulzusprogrammal.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 15-től -1 ppm-ig, 32 K adatpont, 32 szken, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 10.3 μs .

Szelekció: Gaussgörbe alakú invertáló pulzus, melynek időtartama és a kimenőteljesítménye a kiválasztott tartomány alapján a ButtonSelect NMR modul algoritmusával lett beállítva, előtte és utána 15 %-os gradiens pulzussal. Keverési idő 200 ms (spin-lock térerő, $\gamma^*B_1/2\pi = 1666$ Hz). Mérési idő 2 perc 45 másodperc.

Feldolgozási paraméterek: exponenciális ablakfüggvény 0.1 Hz vonalszélesedéssel. A digitális felbontás 0.15 Hz/pont.

c) Kétszeres pulzus-tér-gradiens echo szelektív 1D zéró-quantum elnyomásos NOESY Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 15-től -1 ppm-ig, 32 K adatpont, 32 szken, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 10.3 μ s. Szelekció: két Gaussgörbe alakú invertáló pulzus, melynek időtartama és a kimenőteljesítménye a kiválasztott tartomány alapján a ButtonSelect NMR modul algoritmusával lett beállítva, az első szelekciós pulzus előtt és után 11 %, a második szelekciós pulzus előtt és után 17 %-os 1 ms időtartamú szinusz alakú gradiens pulzus. Keverési idő 300 ms. Zéró-quantum elnyomás: a keverési idő elején 30 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz), vele egyidőben azonos időtartamban 2 %-os szinusz alakú gradiens pulzus, melyet egy 1 ms időtartamú, 40 %-os homospoil gradiens pulzus követ. Mérési idő 2 perc 48 másodperc.

Feldolgozási paraméterek: exponenciális ablakfüggvény 0.1 Hz vonalszélesedéssel. A digitális felbontás 0.15 Hz/pont.

d) Egyszeres pulzus-tér-gradiens echo szelektív 1D zqs-easy-ROESY, a javasolt módszer szelektív 1D változata

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 15-től -1 ppm-ig, 32 K adatpont, 32 szken, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 10.3 μ s. Szelekció: Gaussgörbe alakú invertáló pulzus, melynek időtartama és a kimenőteljesítménye a kiválasztott tartomány alapján a ButtonSelect NMR modul algoritmusával lett beállítva, előtte és utána 15 %-os gradiens pulzussal. Spin-lock: 2×100 ms (spin-lock térerő $\gamma^*B_1/2\pi = 5716$ Hz), 1 ms időtartamú félgauss adiabatikus rámpapulzusokkal, off-rezonancia offszet: ± 4850 Hz, $\theta = 50^\circ$. Zéró-quantum elnyomás: a spin-lock blokk előtt 50 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 316$ Hz) és vele egyidőben 2 %-os szinusz alakú gradiens pulzus, a spin-lock blokk után 30 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz), és vele egyidőben, azonos időtartamban 2 %-os szinusz alakú gradiens pulzus, melyet 1 ms időtartamú 48 %-os homospoil gradiens pulzus követ. Mérési idő 2 perc 48 másodperc.

Feldolgozási paraméterek: exponenciális ablakfüggvény 0.1 Hz vonalszélesedéssel. A digitális felbontás 0.15 Hz/pont.

További hasonló szelektív egydimenziós spektrumábrák a **IV.**-es saját közlemény elektronikus függelékében.

A Szelektív 1D spektrumok kvalitatív értékelése azt mutatja, hogy a Bruker gyári ROESY változat **b.)** illetve a dpfg-se-zqs-NOESY **c.)** egyaránt erős villódzási zaj jellegű antifázisú jeleket ad a víz, az oldószer dimetilszulfoxid valamint a minta intenzív szingulet metoxi és metil jeleinél, függetlenül attól, hogy mely jel volt a kiválasztott. Az említett villódzási zaj a javasolt spfge-se-zqs-easy-ROESY módszerváltozattal felvett spektrumoknál **d.)** a legkisebb. A kétféle szelekciós mód közül az egyszerűbb spfg-se változat is elegendő a megfelelő szelektivitáshoz, a dpfg-se változattal felvett NOESY spektrum jel/zej viszonya némiképp alatta marad az spfg-se szelekcióval felvett spektrum jel/zaj viszonyának, az elvileg jobb szelektivitás ugyanis érzékenységesítéssel jár. A Bruker gyári módszerváltozattal és az irodalmi módszerváltozattal felvett spektrumokban egyes indifferens jelek helyén villódzó zaj jelentkezik, ez a javasolt módszerváltozatnál a legkevésbé intenzív, vagy teljesen sikerült megszüntetni. Azokon a csatoló partner jelpárokon, ahol a 2D spektrumban vegyes fázisú volt a térközelségi keresztcsúcs, a szelektív 1D NOESY és ROESY spektrumokban is jelentkezik a fázisingadozás, legkevésbé a javasolt módszerváltozat esetén. Összefoglalva a kvalitatív kép alapján a javasolt módszerváltozat megállja a helyét, versenyképes a korábbi műszerceges és irodalmi szelektív 1D térközelségi módszerekkel.

Elvégeztem a javasolt szelektív 1D ROESY módszerváltozat kvantitatív értékelését az egykristály röntgendiffrakcióból nyert atomtávolságokkal összevetve, illetve az előbbieken bemutatott 2D ROESY változatot és a javasolt szelektív 1D ROESY változatot összevetve (5. táblázat, 56. és 57. ábra).

5. táblázat.

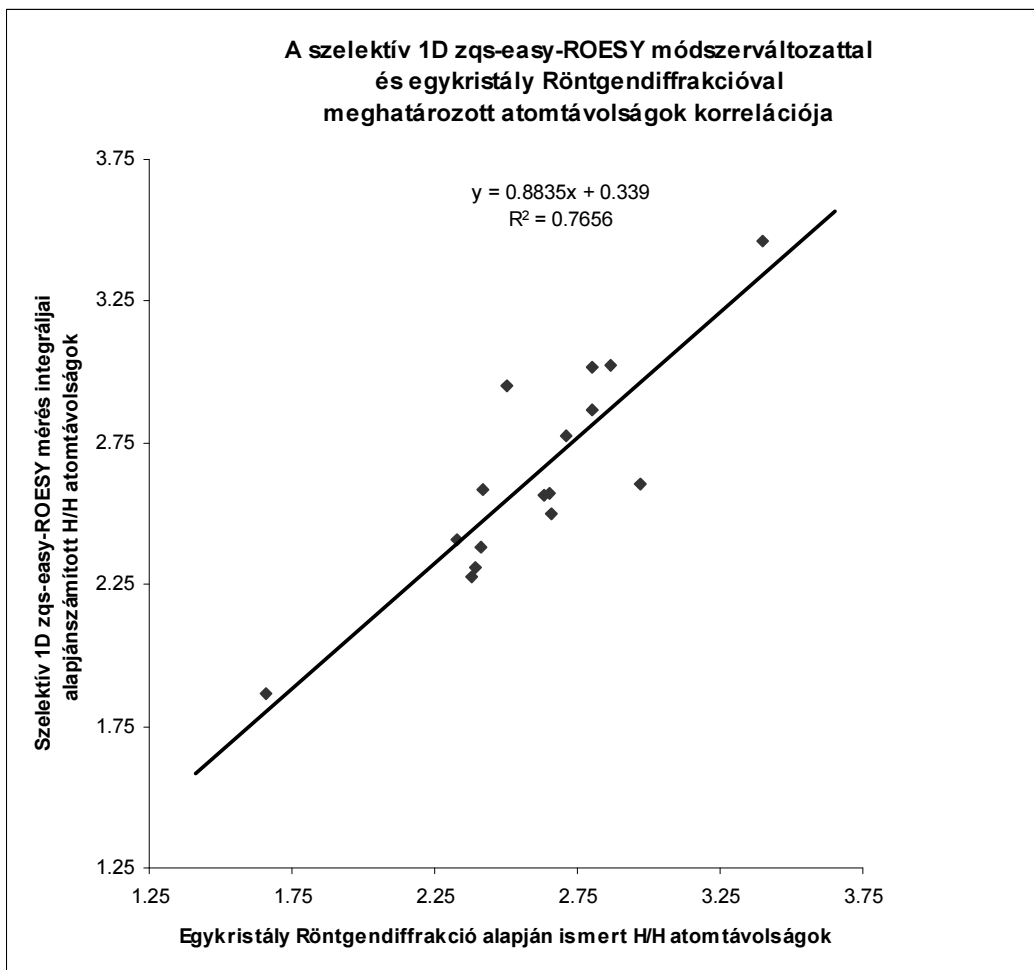
Az irodalmi egykristály röntgendiffrakció adatokból és az spfge-se 1D zqs-easy-ROESY mérésekből meghatározott atomtávolságok összevetése

H/H Atompár	Atom- távolság egykristály röntgen- diffrakció alapján [Å]	¹ H-NMR kémiai eltolódás	Szelektív 1D zqs-easy-ROESY			
			integrál		k	Számított atom- távolság [Å] k=600
			A kiválasztott jel integrálja -100-ként definiálva	Átlag		
H-1/H-2	2.38	6.46 / 6.60	Alternáló fázisú jel			
H-1/H _a -10	2.80	6.40 / 2.23	0.800	0.8000	385.51	3.015
H-1/H _b -10	2.87	6.40 / 2.91	0.790	0.7900	441.48	3.021
H-5/H-6	2.33	4.68 / 4.11	3.259	2.916	3.0875	494.01
H-5/H-14	3.40	4.68 / 2.55	0.350	0.3500	540.68	3.460
H-5/H _a -15	2.66	4.68 / 1.98	1.865	3.034	2.4495	867.69
H-5/H _b -15	2.63	4.68 / 1.62	1.607	2.616	2.1115	698.75
H-6/H-7	2.50	4.11 / 5.53	0.890	0.930	0.9100	222.16
H-6/H-14	2.97	4.11 / 2.55	1.919	1.9190	1317.08	2.606
H-7/H-8	2.29	5.53 / 5.24	Alternáló fázisú jel			
H-8/H-9	2.65	5.24 / 3.25	2.060	2.0600	713.41	2.575
H-8/H _a -10	2.71	5.24 / 2.23	1.316	1.3160	521.28	2.775
H-8/H-14	2.80	5.24 / 2.55	1.087	1.0870	523.81	2.865
H-9/H _a -10	2.23	3.25 / 2.23	Nem különíthető el a H-9/H ₃ -17 jeltől			
H-9/H _b -10	2.54	3.25 / 2.91				
H-9/H14	2.31	3.25 / 2.55	Nem különíthető el a szelektív 1D-ben			
H _a -10/H _b -10	1.60	2.23 / 2.91	Nem különíthető el a H _b -10/H ₃ -17 jeltől			
H _b -10/H _b -16	2.43	2.91 / 2.23	Nem különíthető el a H _b -10/H _a -10 jeltől			
H-14/H _a -15	2.41	2.55 / 1.98	3.265	3.2650	639.71	2.385
H _a -15/H _b -15	1.66	1.98 / 1.62	15.609	12.783	14.1960	297.03
H _a -15/H _a -16	2.39	1.98 / 2.44	3.960	3.9600	738.04	2.309
H _a -15/H _b -16	2.94	1.98 / 2.23	Csatolás által dominált jel			
H _b -15/H _a -16	2.42	1.62 / 2.44	2.019	2.0190	405.53	2.584
H _b -15/H _b -16	2.38	1.62 / 2.23	4.332	4.3320	787.31	2.275
H _a -16/H _b -16	1.66	2.23 / 2.44	Nem különíthető el a H _a -16/H ₃ -17 jeltől			

átlag:

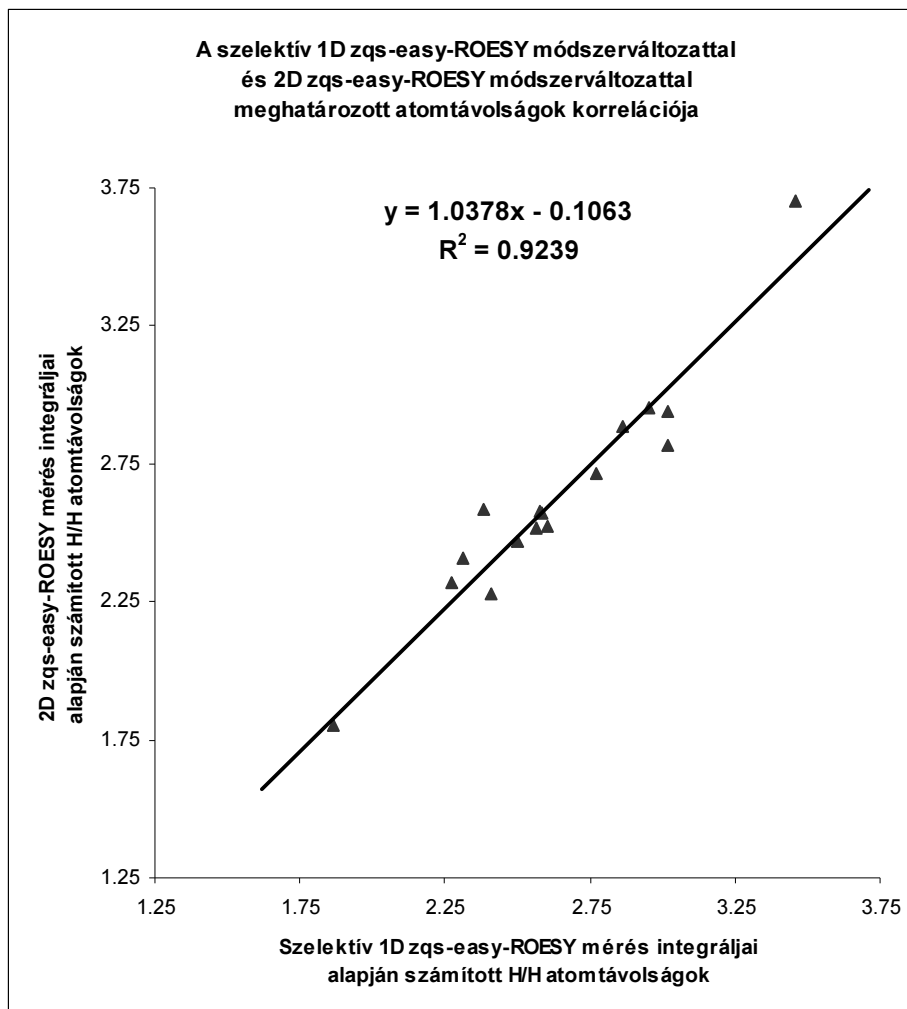
599.60

$$\text{ROE}=\text{k}\cdot\text{d}^6$$



56. ábra. A szelektív 1D *zqs-easy-ROESY* módszerváltozattal és egykristály Röntgen-diffrakcióval meghatározott atomtávolságok korrelációja

A szelektív 1D ROESY változat és a röntgendiffrakció közötti korrelációs együttható ($R^2=0.7656$) értéke közel azonos a 2D módszerváltozat és a röntgendiffrakció között talált korrelációs ($R^2=0.7264$) együttható. Mindez annak ellenére, hogy a szelektív 1D mérés amennyire lehet rövid mérésidővel (32 szkennelés, kevesebb, mint 3 perc alatt) történt. A legnagyobb eltérés a H-6/H-14 és H-6/H-7 pároknál tapasztalható. A rendelkezésre álló műszer viszonylag kis térerejéből adódó korlátozott jelszeperáció miatt bizonyos jelpárok nehezen voltak detektálhatók.

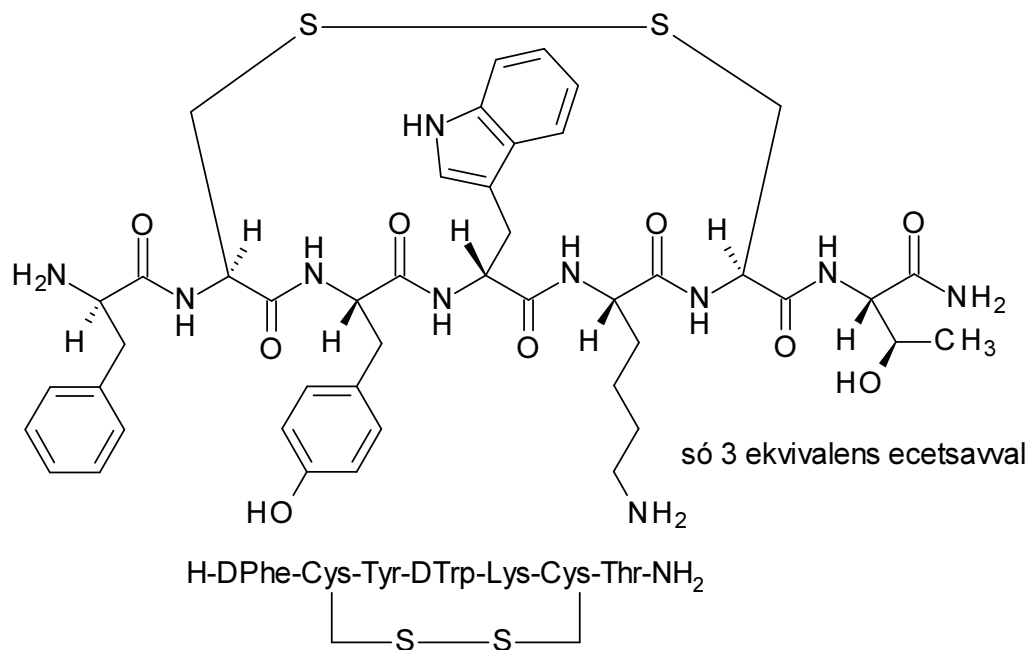


57. ábra. A javasolt 2D zqs-easy-ROESY és annak szelektív 1D változatok közötti korreláció

Csak azokat a pontokat vettem figyelembe, amelyek esetén mindkét ROESY módszer megbízhatóan értékelhető és integrálható térközelségi jeleket adott. A talált $R^2=0.924$ korrelációs együttható nagyon szoros korrelációt jelez. Ebben a korrelációban nincs kiugró pont, mivel a 2D és szelektív 1D változatok irodalmi röntgendiffrakciós eredményekkel történt összevetése során ugyanazok a pontok ugyanabban az irányban voltak kiugróak. A röntgendiffrakciós adatokból nyert atomtávolságokkal történt összevetés során tapasztalt két kiugró érték felveti annak lehetőségét, hogy a kristályban, illetve oldat fázisban a kodein **C** gyűrűjének lapultsága különböző. A molekula Dreiding modellje alapján a két kritikus atomtávolság erősen függ a **C** gyűrű lapultságától. Az sem zárható ki, hogy a röntgendiffrakciós mérésekből a hidrogén atomok pozícióinak számítása vezetett pontatlan eredményre.

B.5.3. Annak a molekulaméret-tartományban a vizsgálata, ahol a NOESY nem működik

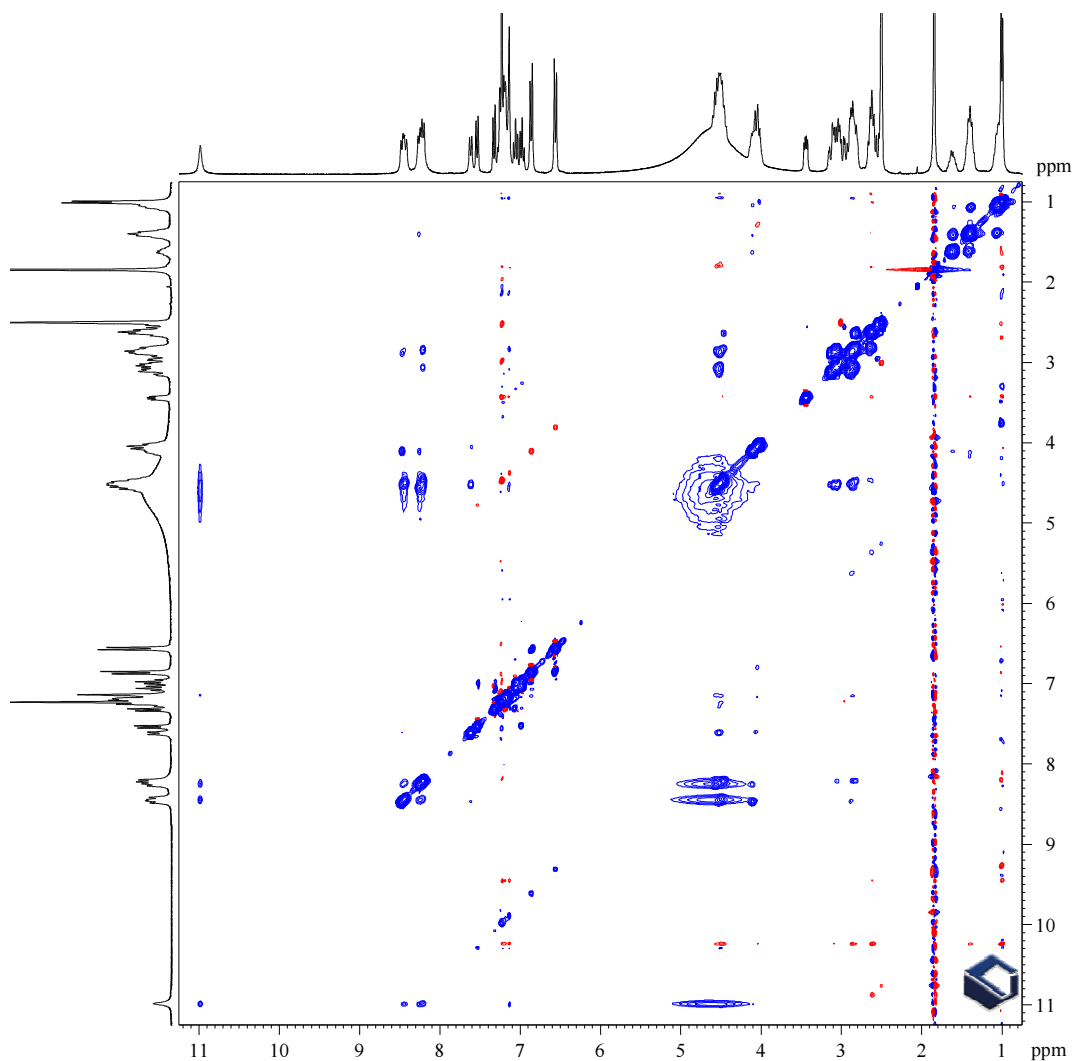
A 2D zqs-easy-ROESY módszerváltozatot egy a NOESY és ROESY közötti átmeneti tartományba eső molekulán a TT232-n [97], (58. ábra) is teszteltem.



58. ábra. A TT232 molekula [97] szerkezete
(összegképlet: C₄₅H₅₈N₁₀O₉S₂, relative molekulatömeg: 947.15)

A TT232 ciklopeptid spektrumait 7.04 Tesla mágneses térerejű 5 mm-es SEI mérőfejjel és *z* irányú gradienssel felszerelt Bruker Avance 300 spektrométeren és 11.75 Tesla mágneses térerejű 5 mm-es TXI mérőfejjel és *z* irányú gradienssel felszerelt Bruker Avance II 500 spektrométeren is felvettem. A műszer vezérlése és az adatfeldolgozás TopSpin programcsomaggal történt. ~15 mg TT232-t oldottam 0.6 ml deutero-dimetilszulfidban, a mérések során a mérőfejet 30 °C-ra termosztáltam.

A zero-kvantum elnyomással továbbfejlesztett ROESY módszerváltozat előnyei az easy-ROESY-vel szemben, az 1 kDa körüli molekulatömeg mellett kevésbé nyilvánvalóak, mint kisebb molekulatömeg esetén, lásd a kodein és a sztrichnin spektrumait. Ugyanakkor a javasolt módszerváltozat mindkét műszeren lényegesen jobb minőségű spektrumokat adott, mint bármelyik lehetséges NOESY változat. (59-62. ábrák). A felvételekről csak kvalitatív értékelés készült.

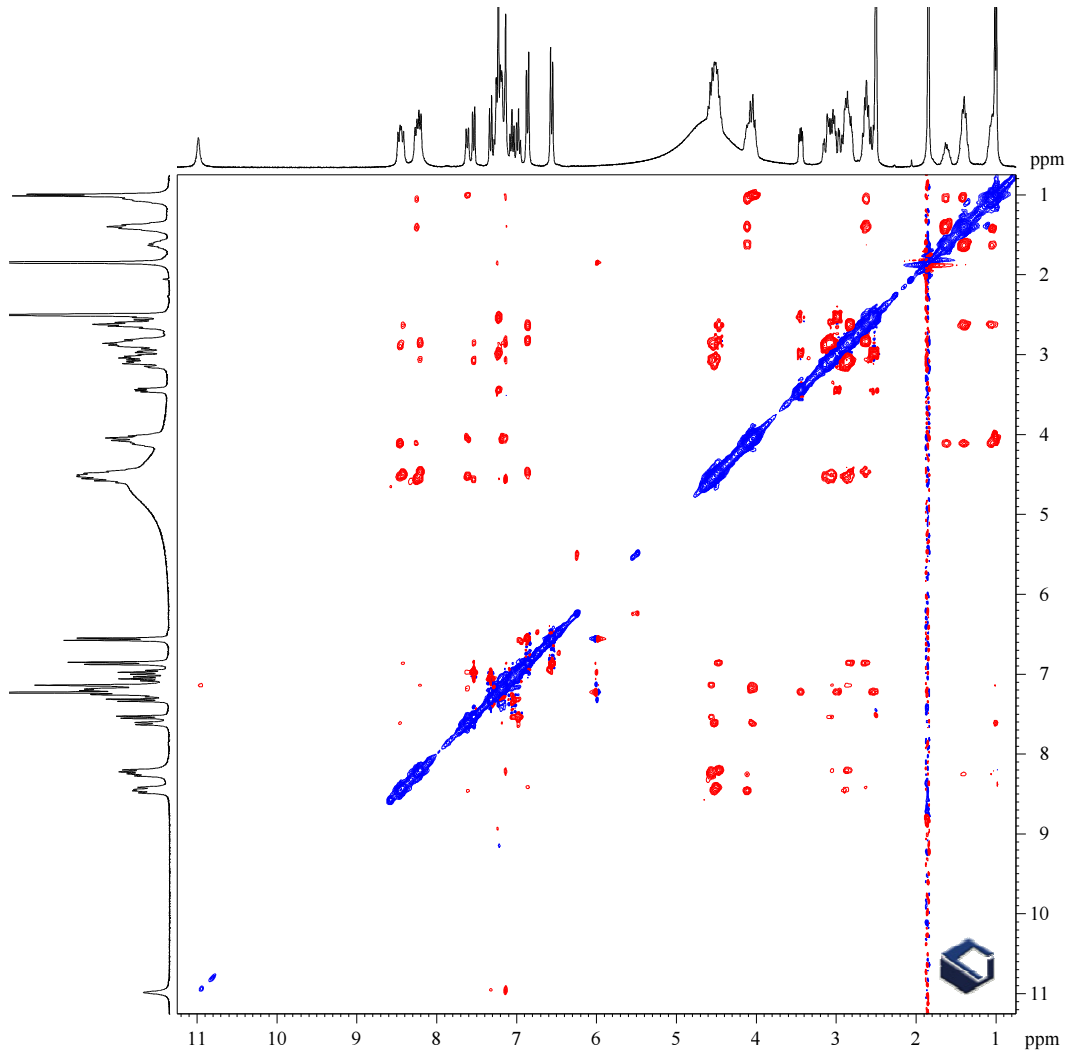


59. ábra. A TT232 minta 300 MHz-en felvett zqs-NOESY [85] spektruma

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 11.5-0.5 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőtjeljesítményű pulzus: 9.5 μ s, keverési idő: 300 ms, zero-kvantum elnyomás: a keverési idő elején 30 ms időtartamú, adiabaticus invertáló pulzus ($\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 408$ Hz), és vele egyidőben, azonos időtartamban 2 % szinusz formájú gradiens pulzus, melyet 1 ms időtartamú 40 % -os szinusz formájú homospoil gradiens pulzus követ. A mérés időtartama 50 perc 30 másodperc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 3.2 Hz/pont mindkét dimenzióban.

A felvett NOESY spektrum gyakorlatilag használhatatlan, mivel a molekulaméret arra a tartományra esik, ahol a NOESY előjelet vált, a viszonylag intenzív térközelségi keresztcsúcsok már az átlóval azonos fázisúak, más várható térközelségi keresztcsúcsok belevesztek az alapsíkba.

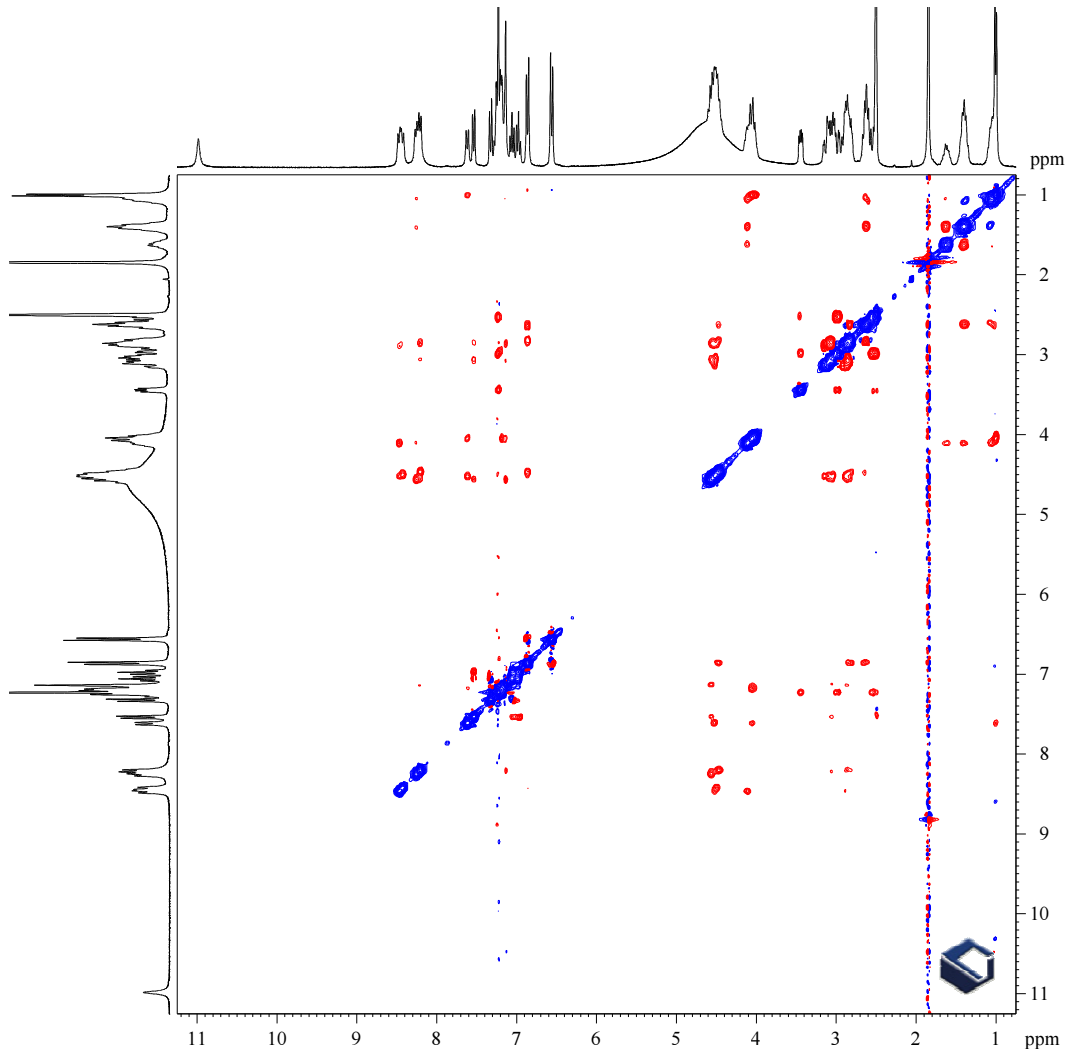


60. ábra. A TT232 minta easy-ROESY [88] spektruma

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 11.5-0.5 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, keverési idő: 2*100 ms off-rezonancia spin-lock, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss alakú adiabatikus rámpapulzusokkal, spin-lock téroró: $\gamma*B_1/2\pi = 5716$ Hz, az off-rezonancia spin-lock csapásszöge $\theta = 50^\circ$, off-rezonancia offszet: ± 4850 Hz. Szinuszos formájú, 1 ms időtartamú homospoil gradiens pulzusok a spin-lock blokk előtt 27 %, és utána 46 % kimenőteljesítménnyel. A mérés időtartama 47 perc 30 másodperc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinuszos-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 3.2 Hz/pont mindkét dimenzióban.

A spektrumban kevésbé jelentkezték zavaró, alternáló fázisú keresztcsúcsok, mint a módszerrel kisebb molekulákról felvett spektrumokban.

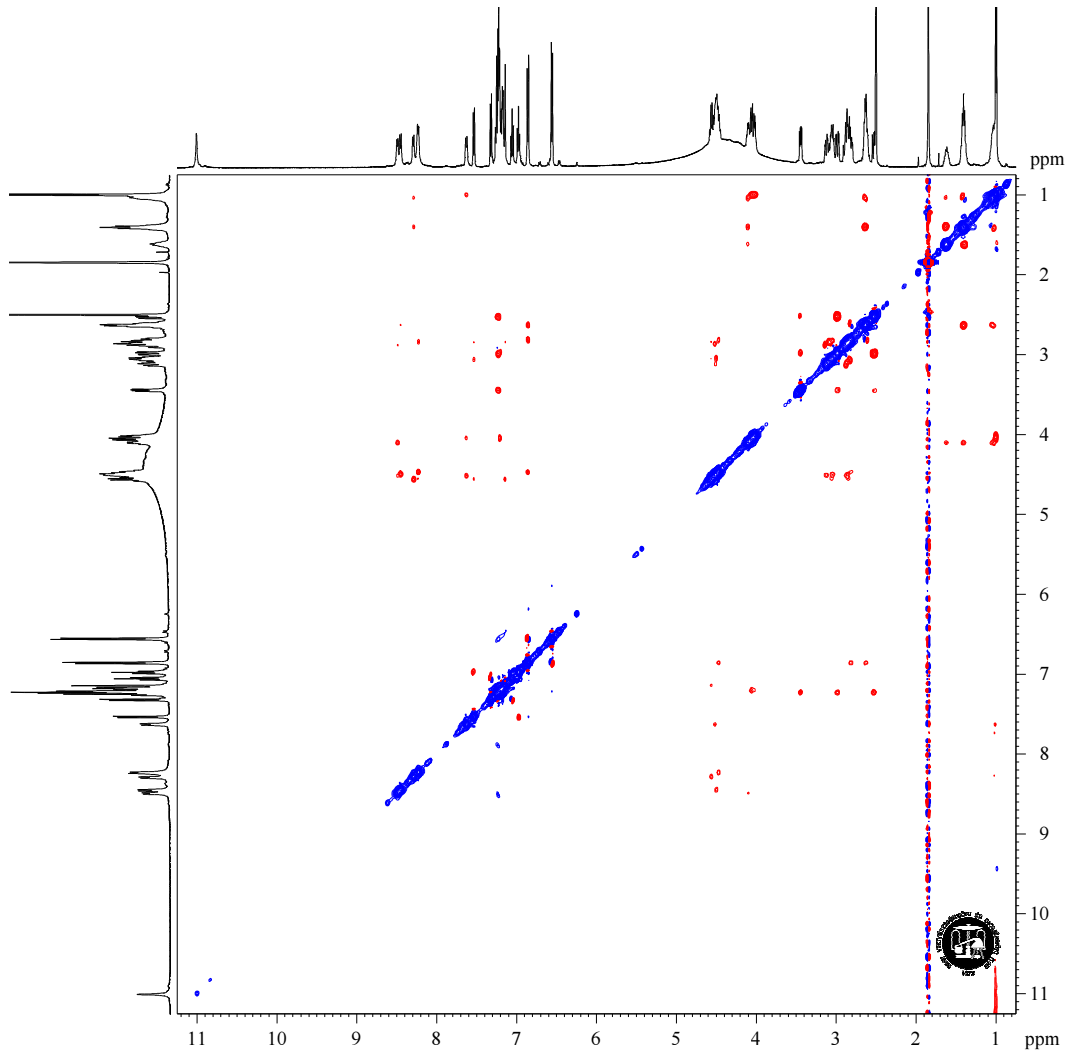


61. ábra. A TT232 mintának a zqs-easy-random-ROESY módszerváltozattal [IV] 300 MHz-en felvett spektruma

A módszerváltozat tiszta fázisú térközelségi keresztcsúcsokat eredményez.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 11.5-0.5 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, keverési idő: 2*100 ms off-rezonancia spin-lock, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss alakú adiabatikus rámpapulzusokkal, spin-lock térerő: $\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 5716$ Hz, az off-rezonancia spin-lock csapásszöge $\theta = 50^\circ$, off-rezonancia offszet: ± 4850 Hz. Az alá és föléhangolt spin-lock elemek időtartama - egymástól függetlenül - ± 5 %-kal randomizálva. Zéró-kvantum elnyomás: a spin-lock blokk előtt 50 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 316$ Hz), a spin-lock blokk után 30 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma \cdot B_1 / 2\pi = 408$ Hz), és velük egyidőben azonos időtartamban 2 % intenzitású szinusz formájú gradiens pulzus. Szinusz formájú, 1 ms időtartamú 46 % teljesítményű homospoil gradiens pulzus a spin-lock blokk és a második zéró-kvantum elnyomó elem között. A mérés időtartama 50 perc 30 másodperc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 3.2 Hz/pont mindkét dimenzióban.



62. ábra. A TT232 mintának a zqs-easy-ROESY módszerváltozattal [IV] 500 MHz-en felvett spektruma

A módszerváltozat tiszta fázisú térközelségi keresztcsúcsokat eredményez.

Adatgyűjtési paraméterek: spektrumszélesség: 11.5-0.5 ppm, 8 szken * 256 kísérlet, relaxációs várakozás: 1 s, 90° nagy kimenőteljesítményű pulzus: 9.5 μ s, keverési idő: 2*100 ms off-rezonancia spin-lock, előtte és utána 1 ms időtartamú félgauss alakú adiabatikus rámpapulzusokkal, spin-lock téroró: $\gamma^*B_1/2\pi = 5716$ Hz, az off-rezonancia spin-lock csapásszöge $\theta = 50^\circ$, off-rezonancia offszet: ± 4850 Hz. Zéró-kvantum elnyomás: a spin-lock blokk előtt 50 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 316$ Hz), a spin-lock block után 30 ms időtartamú adiabatikus invertáló pulzus ($\gamma^*B_1/2\pi = 408$ Hz), és velük egyidőben azonos időtartamban 2 % intenzitású szinusz formájú gradiens pulzus. Szinusz formájú, 1 ms időtartamú 46 % teljesítményű homospoil gradiens pulzus a spin-lock blokk és a második zéró-kvantum elnyomó elem között. A mérés időtartama 50 perc.

Feldolgozás paraméterei: lineáris predikció az indirekt dimenzióban 512, majd zéró töltés 1K adatpontig. Szinusz-négyzet alakú ablakfüggvény mindkét dimenzióban $\pi/2$ eltolással (SSB = 2), fázisérzékeny mód kézi fáziskorrekcióval. Alapsík-simítás mindkét dimenzióban. A transzformált spektrum végső mérete 1K \times 1K adatpont mindkét dimenzióban. A digitális felbontás 5.6 Hz/pont mindkét dimenzióban.

B.6. Eredmények

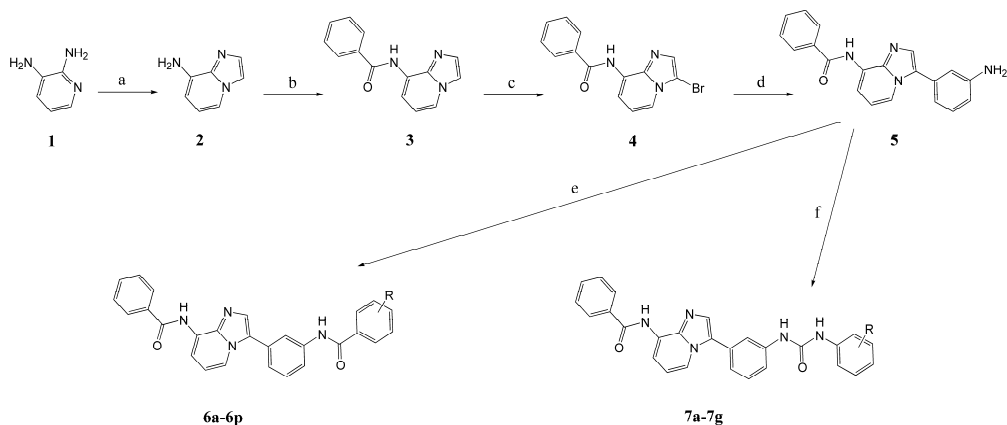
A zqs-easy-random-ROESY módszerváltozat alkalmazása a gyakorlatban imidazo[1,2-*a*]piridin és imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok vizsgálatában

B.6.1. Kémiai háttér

Az előző fejezetben ismertetett zqs-easy-ROESY módszerváltozatot, illetve fejlesztési előzményeit napi rutin méréseim során 2010 óta eredményesen alkalmazom a vizsgálataim során a Bruker pulzusprogram-könyvtárban hozzáférhető változatok helyett. A Chinoin Zrt-ben végzett méréseim eredményét tartalmazó publikáció iparjogvédelmi okok miatt nem készülhetett, így ott felvett valós mintáról készült spektrumot bemutatni nem áll módomban.

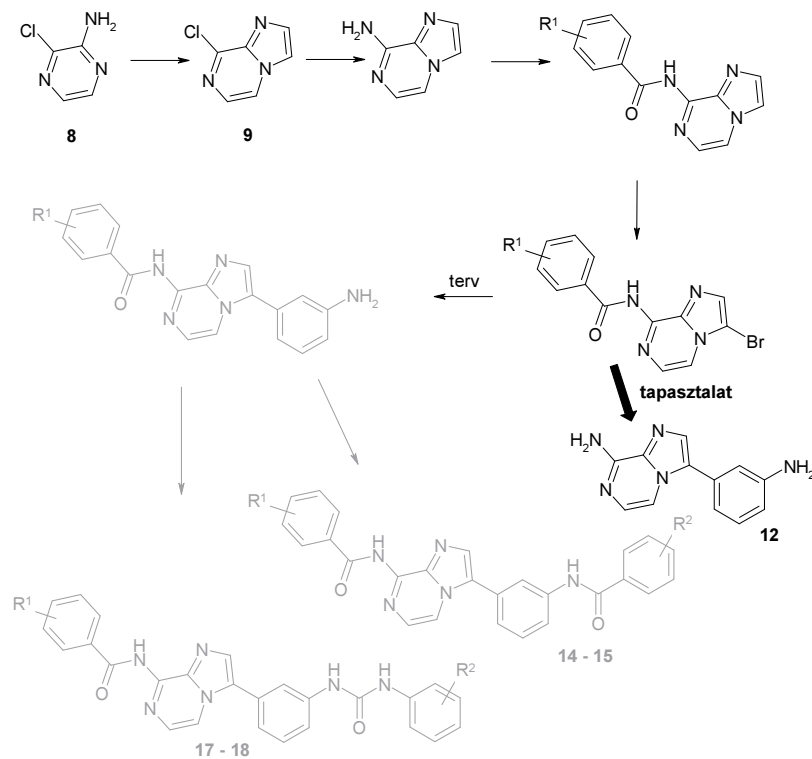
A Vichem Kft-ben ennek a módszernek az alkalmazásával készültek az imidazo[1,2-*a*]piridin és imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok, melyek előállításáról és vizsgálatáról írt dolgozatunk függelékében közölt ROESY felvételek. A szintéziseket Garamvölgyi Rita végezte, biológus munkatársaink a végtermékek melanóma elleni hatását vizsgálták a rákos sejtekben előforduló mutáns BRAF fehérjére kifejtett gátló hatásán keresztül [98]. A kitűzött cél Sorafenib (*CAS 284461-73-0*) [99-100] illetve Vemurafenib (*CAS 918504-65-1*) [101-102], forgalomban lévő hatóanyagok követő vegyületeinek előállítása volt. Az én feladatomban a közti- és végtermékek NMR szerkezetvizsgálata volt. A szintéziseket - mivel az nem az én munkám - csak az összefüggések érthetővé tétele miatt ismertetem [V].

Az imidazo[1,2-*a*]piridin származékoknak a 63. ábra szerint történt szintézise és a szerkezetvizsgálatra kapott közti- illetve végtermékek NMR spektroszkópiás nyomonkövetése nem okozott nehézséget. Az egyetlen olyan lépés, ahol a várt szerkezettel izomer molekula keletkezhetett volna a *c* reakciólépés, a bromozás volt. A vizsgálatra kapott minták szerkezete rendre megfelelt a vártnak és tisztasága megfelelő volt a továbblépésre illetve a biológiai vizsgálatra.



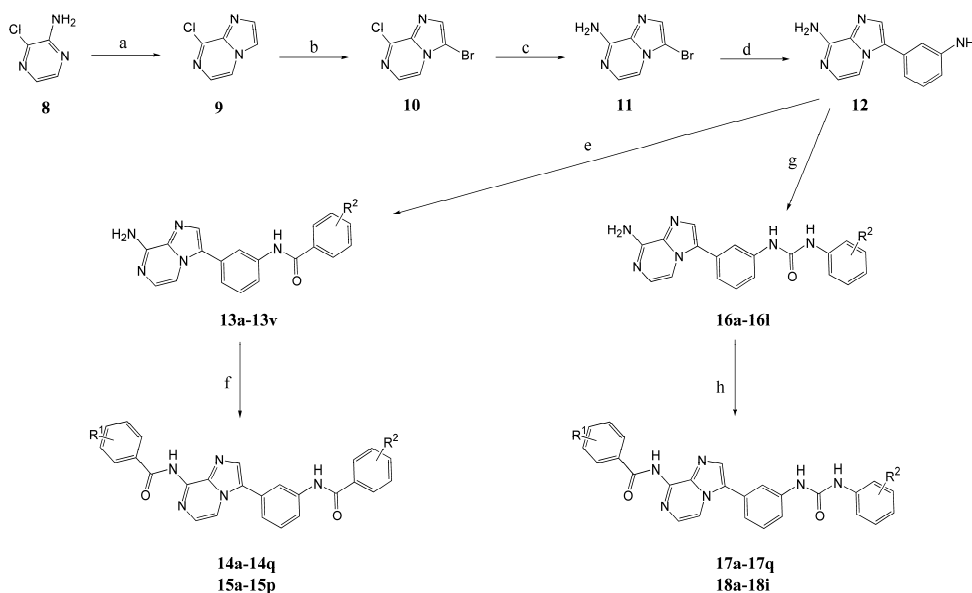
63. ábra. Imidazo[1,2-*a*]piridin származékok szintézise. Reagensok és körülmények: (a) 50% vizes klóracetaldehyd, EtOH, reflux, 3.5 óra, 58%; (b) benzoésav, EDCI, piridin, 40 °C, 4 óra, 67%; (c) *N*-brómszukcimid, CH₂Cl₂, szobahőmérséklet, 30 perc, 83%; (d) 3-aminofenilboronsav, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, víz, mikrohullám, 140 °C, 1.5 óra, 64%; (e) különféle benzoésav származékok, EDCI, piridin, 70 °C, 2 óra, 52-84%; (f) aril-izocianát, vízmentes piridin, szobahőmérséklet, 2 óra, 56-90%.

A fentiekkel analóg imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok szintézisére a közel analóg séma az alábbi lehetett volna, mely elvileg elkerülte volna az olyan közttermékeket, melyek két helyen is azonos reaktivitással rendelkező funkciócsoportokat tartalmaznak (64. ábra).



64. ábra. Imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok szintézisének első terve.

A szintézisterv megvalósítása során nem várt nehézségek léptek fel. A Suzuki reakciólépésben ugyanis a már beépített szubsztituált benzoészav amid, mely stabil volt az imidazo[1,2-*a*]piridin származékok esetén, most lebomlott, a **12**-es számú diamint kaptuk, melyet kevesebb lépésszámmal is elő lehet állítani. Ezért új reakcióutat kellett keresni. (65. ábra)



65. ábra. Imidazo[1,2-*a*]pirazin származékok előállítás. Reagensek és körülmények: (a) brómactaldehid dietilacetál, hidrogén-bromid 48 %-os vizes oldata, reflux, 1.5 óra, NaHCO₃/IPA, azután **8**, reflux, 3 óra, 73%; (b) *N*-brómszukcimid, CH₂Cl₂, szobahőmérséklet, 3 óra, 93%; (c) 25%-os vizes ammóniumhidroxid oldat, IPA, mikrohullám, 120 °C, 3 óra, 85%; (d) 3-amino-fenilboronsav, Pd(PPh₃)₄, Na₂CO₃, 1,4-dioxán, víz, mikrohullám, 140 °C, 1.5 óra, 75%; (e) benzoészav-származék, EDCl, piridin, 40 °C, egész éjszaka, 35-70%; (f) benzoészav származék, EDCl, piridin, 70 °C, 6 óra, 11-81%; (g) aril-izocianát, vízmentes piridin, szobahőmérséklet, 2 óra, 20-69%; (h) benzoészav származék, EDCl, piridin, 70 °C, 6 óra, 10-64%.

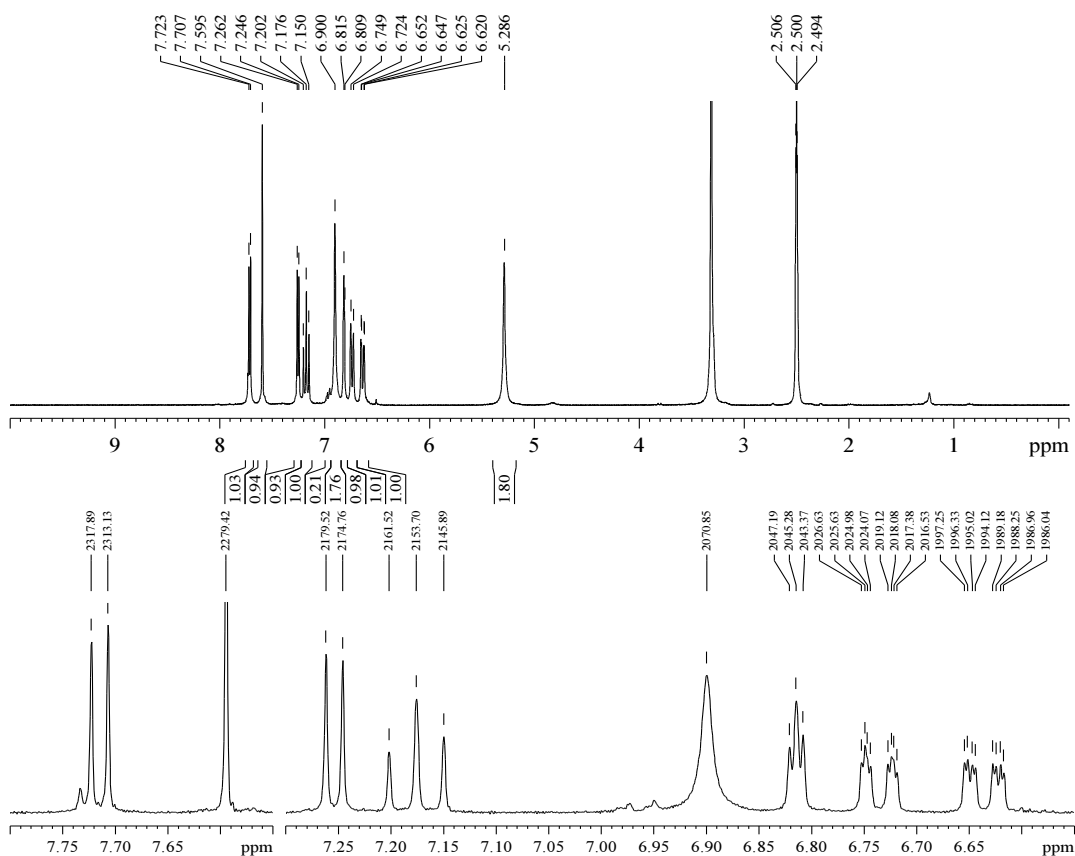
A választott reakciósema számos lehetséges buktatót és csapdát tartalmaz, melyet ki kellett küszöbölni, illetve kontrol alatt kellett tartani. A *b* reakciólépésben kérdéses a brómozódás helye, továbbá részleges halogéncsere is történik, keveréktermék keletkezett, ráadásul az NMR szerkezetvizsgálat sem ad kellőképpen megbízható támpontot. Kritikus volt, hogy **10** és ennek a klór helyén is brómot tartalmazó analógja miként viselkedik a *c* aminálási lépésben. A tapasztalat szerint a **10** és ennek dibrom analógja megfelelő termeléssel egységesen szolgáltatotta **11**-et. **11** Suzuki kapcsolása (*d* lépés) rendben elvégezhető volt, **12** köztiterméken vált bizonyíthatóvá az egy reakciólépéssel korábbi brómozás helye. Viszont a keletkezett **12** termék ismételt két

acilezhető aromás amin csoportot tartalmazott, melyek reaktivitásáról nem volt előzetes információnk. **12** enyhe körülmények között, egy ekvivalens reagenssel végrehajtott acilezése (*e* lépés) illetve aril izocianáttal reagáltatása (*g* lépés) egyaránt egységes termékhez - **13**-hoz, illetve **16**-hoz - vezetett. Ezeknél a kulcs-köztitermékekénél volt döntő fontosságú a térközelségek meghatározása NOESY vagy ROESY módszerrel. Ezeket a méréseimet az előző fejezetben ismertetett zqs-easy-random-ROESY módszerváltozattal végeztem. A zqs-easy-random-ROESY spektrumok kiértékelésénél - a lehetséges alternatív szerkezetek közötti különbségtételnél - elegendőnek bizonyult a kvalitatív - *ki kivel van térközelségben* - értékelés is, így az atomtávolságokra jellemző ROESY térfogati integrálokat nem határoztam meg, számításokat nem végeztem.

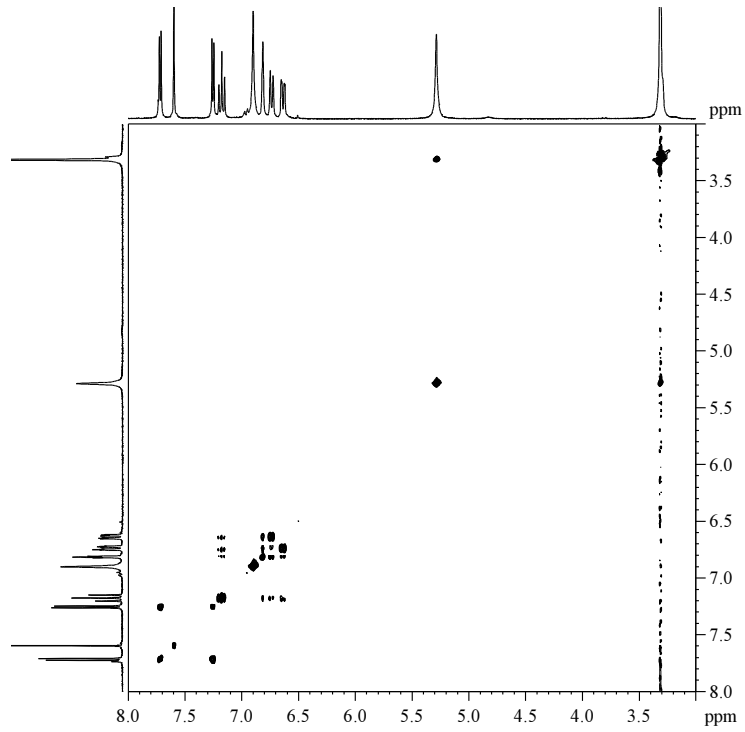
B.7. Következtetések

B.7.1. Szerkezetvizsgálati következtetések

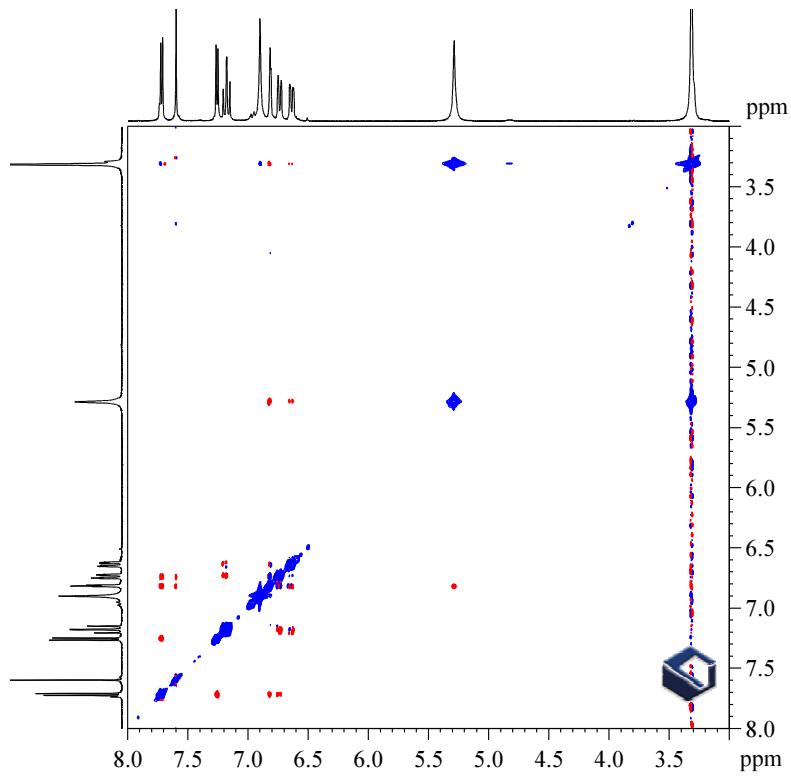
A következőkben a sorozat néhány kiválasztott közttermékének és végtermékének szerkezetbizonyítását mutatom be spektrumábrákon és azok értelmezésén keresztül, külön kitérek az előzőekben említett buktatók és csapdák elemzésére. (66-69, 70-74, 75-79 valamint 80-84. ábrák)



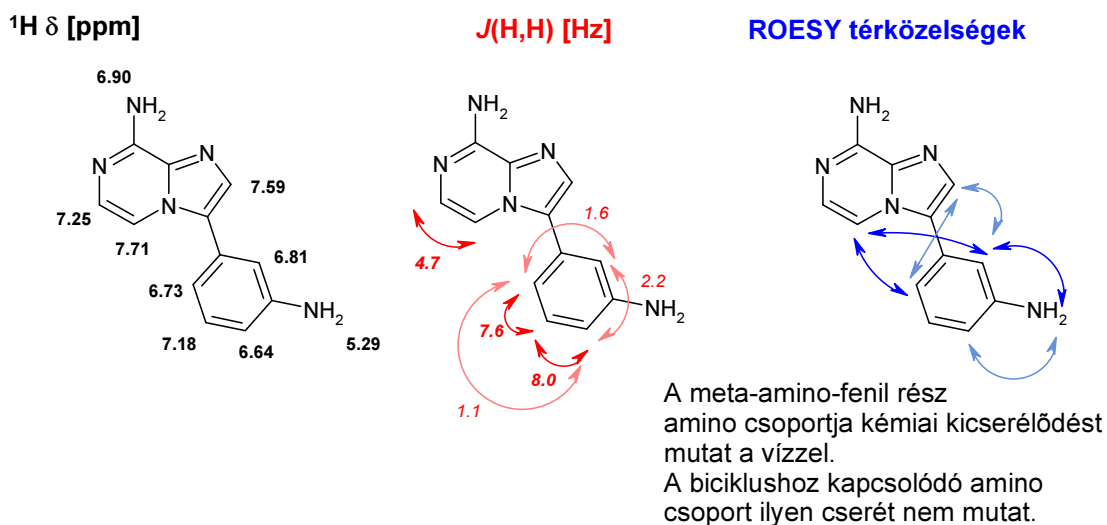
66. ábra. VIC30702 vegyület, RG-1201T minta $^1\text{H-NMR}$ spektruma (átnézeti és részlet)



67. ábra. VIC30702 vegyület, RG-1201T minta zqs-TOCSY spektruma

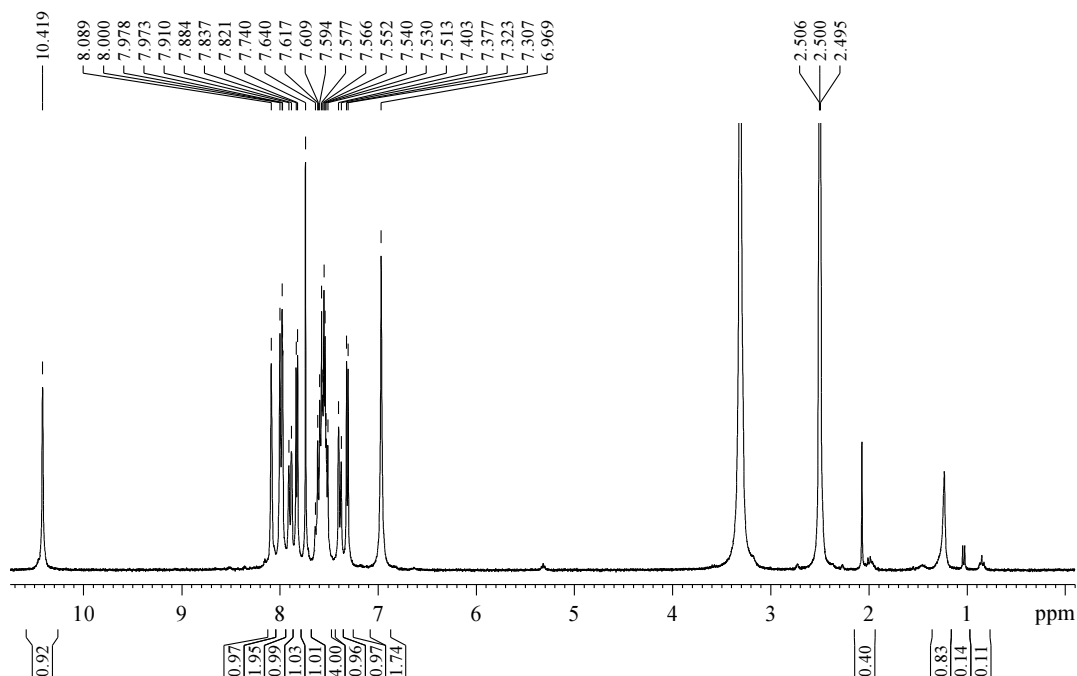


68. ábra. VIC30702 vegyület, RG-1201T minta zqs-easy-random ROESY spektruma

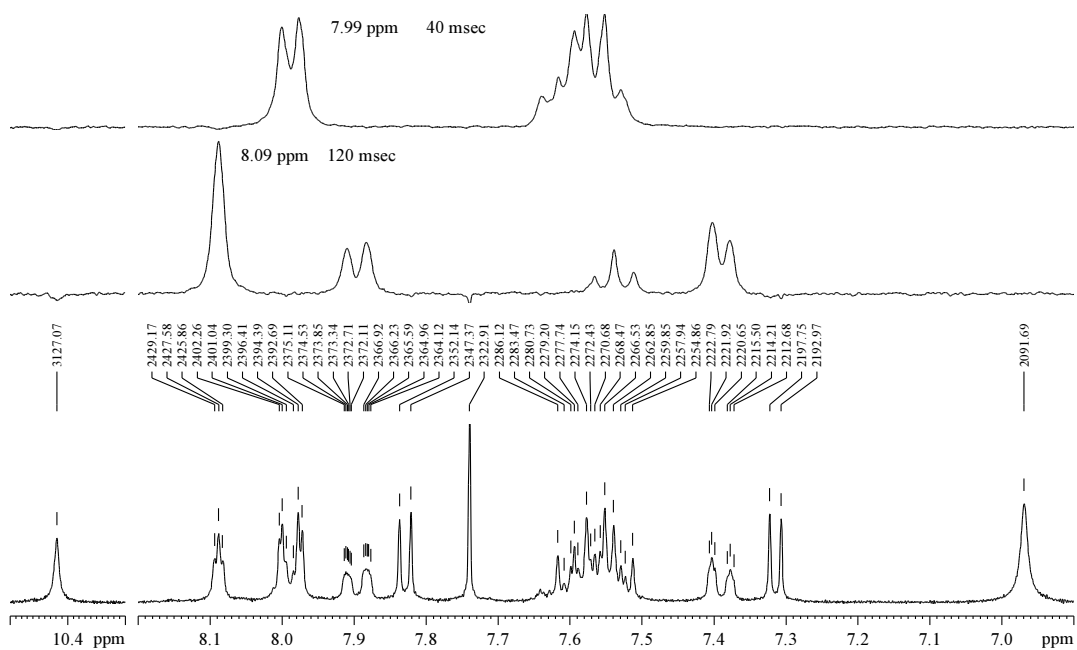


69. ábra. VIC30702 vegyület (12-es sorszámon az V. számú saját publikációban), RG-1201T minta ^1H -NMR, zqs-TOCSY és zqs-easy-random-ROESY spektrumainak értelmezése, jelhozzárendelés, csatolási mintázat és a ROESY méréssel igazolt térközelségek.

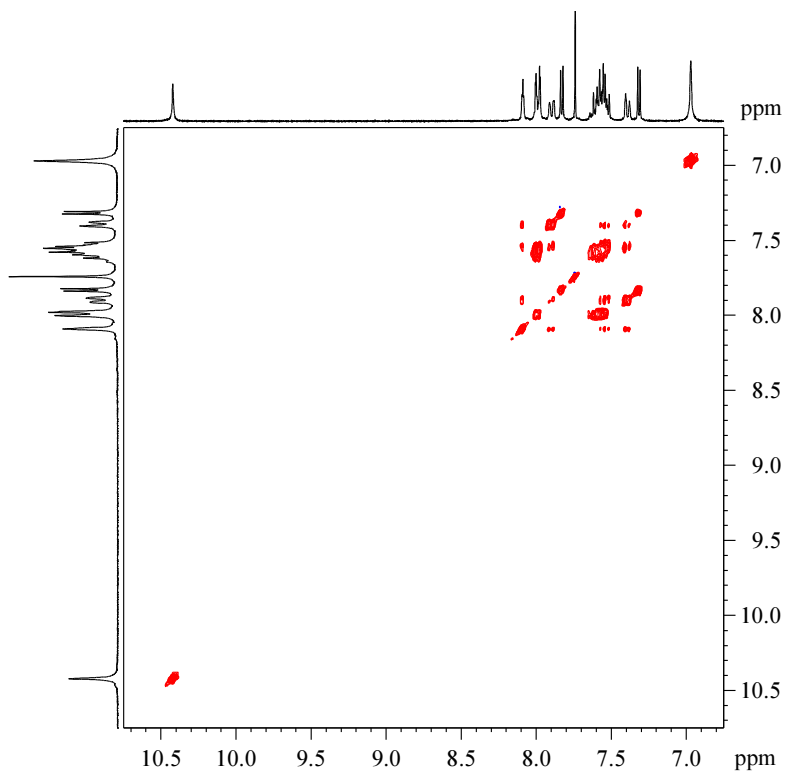
A ROESY spektrumban talált térközelségi keresztcsúcsok bizonyítják a biciklus és a meta-amino-fenil csoport kapcsolódását. A két amino csoport viselkedése eltérő, a meta-amino fenil rész amino csoportja kémiai kicserélődésben van a vízzel, erre utaló keresztcsúcs pár látható a TOCSY spektrumban illetve jellegzetes átlón kívüli, az átlóval azonos fázisú cserélődési keresztcsúcs a ROESY spektrumban. A biciklushoz kapcsolódó amino csoport ilyen szignifikáns cserélődési keresztcsúcsot nem ad a vízzel. A két amino csoport eltérő viselkedése a spektrumokban előrevetíti a későbbi különbséget a két csoport reaktivitásában.



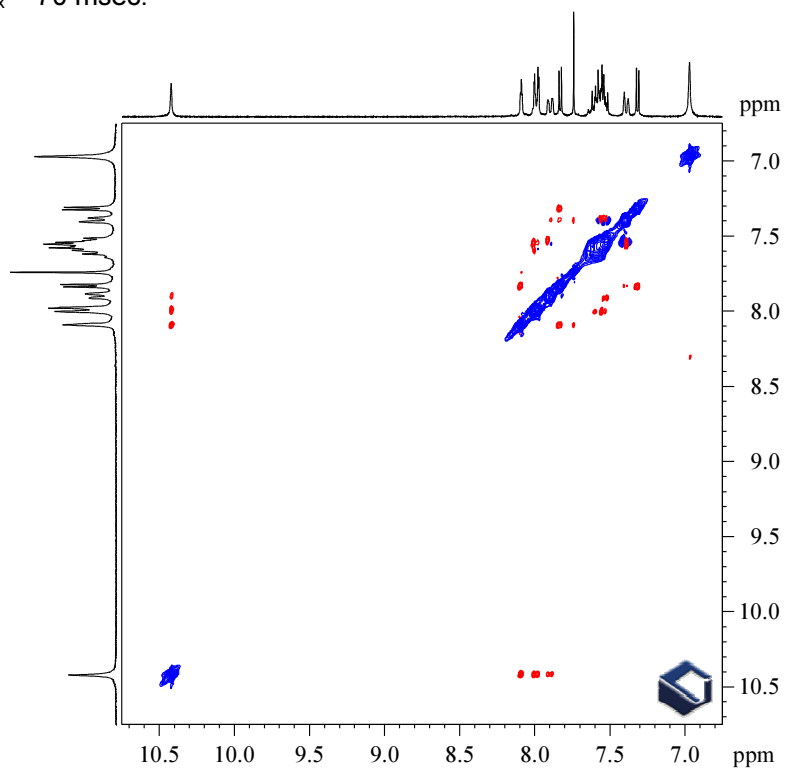
70. ábra. VI-31371 vegyület, RG1365 minta átnézeti $^1\text{H-NMR}$ spektruma



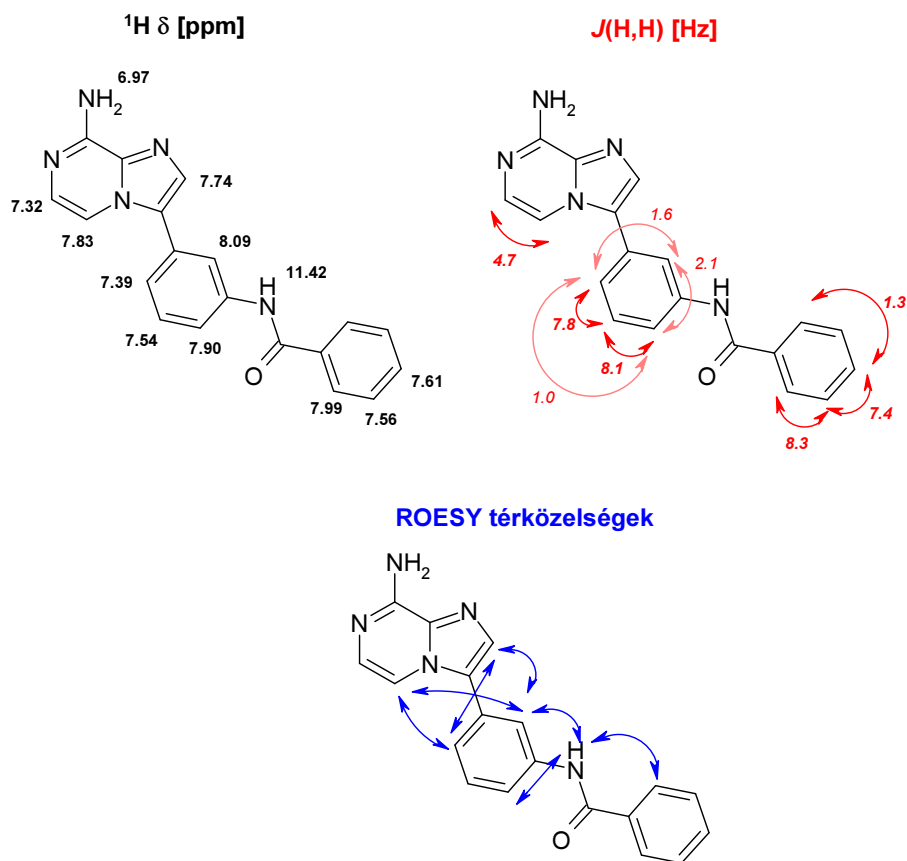
71. ábra. Alul a VIC31371 vegyület, RG1365 minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felbontású részlete, a spektrum fölött a csúcslista Hz mértékegységben. Az $^1\text{H-NMR}$ spektrum fölött két különböző szelektív 1D zqs-TOCSY spektrum, mindkét TOCSY spektrum fölött feltüntetve a kiválasztott jel és az alkalmazott optimalizált keverési idő.



72. ábra. VIC31371 vegyület, RG1365 minta zqs-TOCSY spektruma, 2 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 70$ msec.



73. ábra. VIC31371 vegyület, RG1365 minta zqs-easy-random-ROESY spektruma, 8 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 2 * 100$ msec \pm 5 %, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás 1.5 Hz/pont.

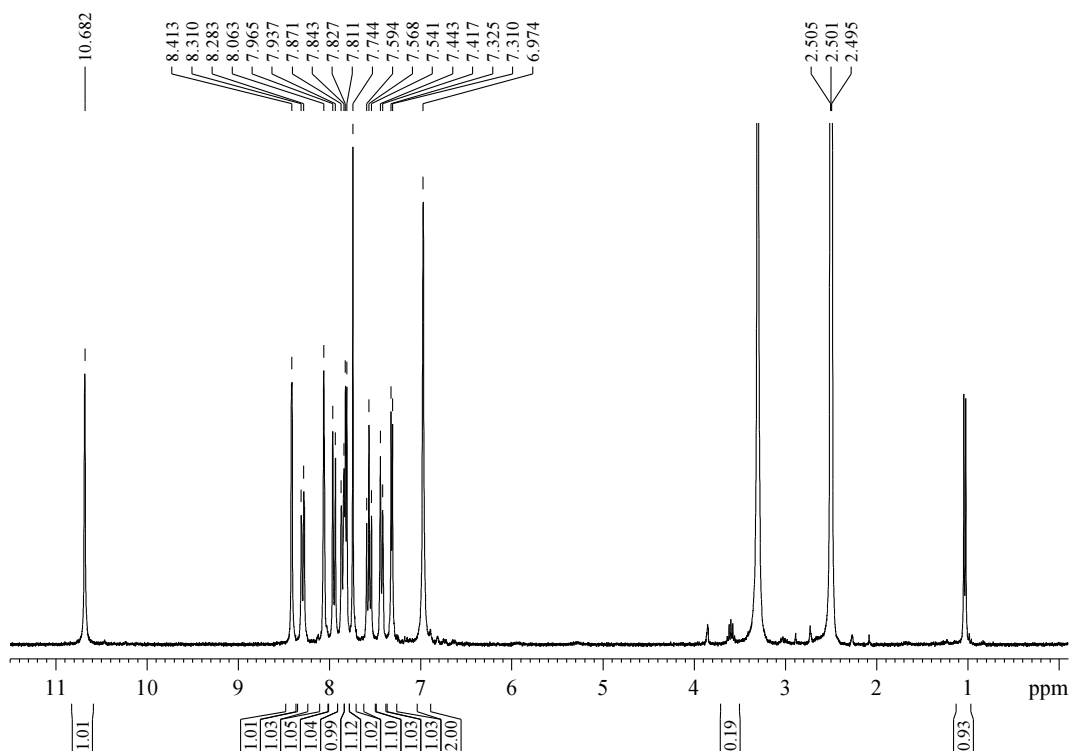


74. ábra. VIC31371 vegyület, RG1365 minta (13a sorszám az V. számú saját publikációban) molekula $^1\text{H-NMR}$ jelhozzárendelése, a csatolási mintázat értelmezése és a szerkezet bizonyítása a zqs-easy-random-ROESY spektruma alapján. A ROESY spektrumban 6.91/8.31 ppm-nél található aszimmetrikus keresztcsúcs a jobb digitális felbontás érdekében a spektrumablakból kihagyott víz betükröződése.

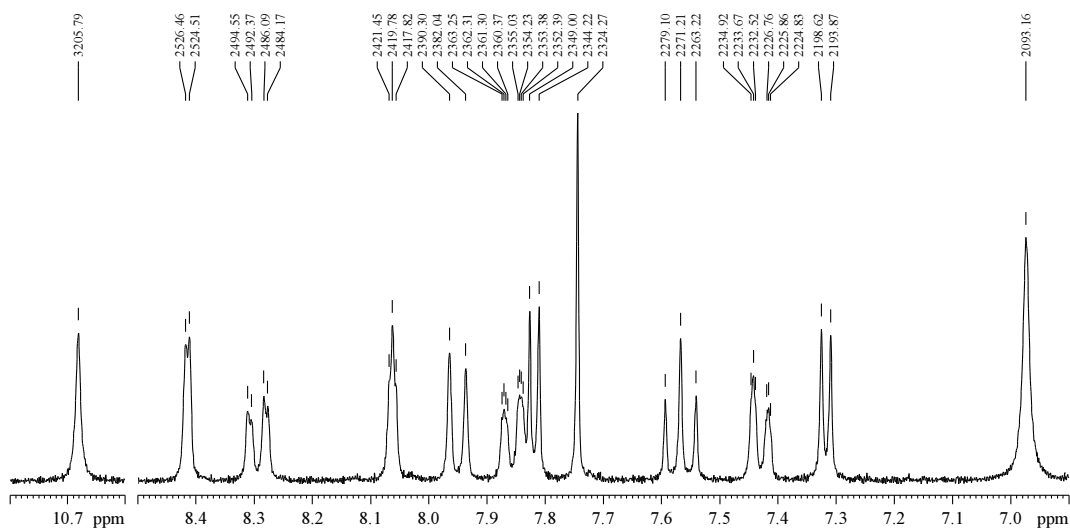
A zqs-easy-random-ROESY spektrumban az amid NH térközelségi keresztcsúcsai a benzoil csoport *orto* hidrogénjeivel illetve a meta-amino-fenil csoport két hidrogénjével bizonyítják, hogy a benzoil csoporttal acilezés a meta-amino-fenil csoport aminján történt. Az amino csoport, jele 6.91 ppm-nél nem mutat semmilyen térközelséget egyetlen más hidrogénnel sem, egyetlen látható kölcsönhatása a keresztcsúcs intenzitása alapján mérsékeltnek ítélt kémiai csere folyamat a vízzel.

A spektrumábrák között szereplő szelektív 1D zqs-TOCSY felvételek rosszabb felbontása annak következménye, hogy a szelektív 1D zqs-TOCSY simítása $\text{LB} = 1$ Hz-es exponenciális ablakfüggvénnyel történt. Az alatta szereplő a részletspektrum esetén alkalmazott – lényegesen jobb felbontást adó - Gauss ablakfüggvény alkalmazását a szelektív 1D zqs-TOCSY rosszabb jel/zaj viszonya nem tette lehetővé.

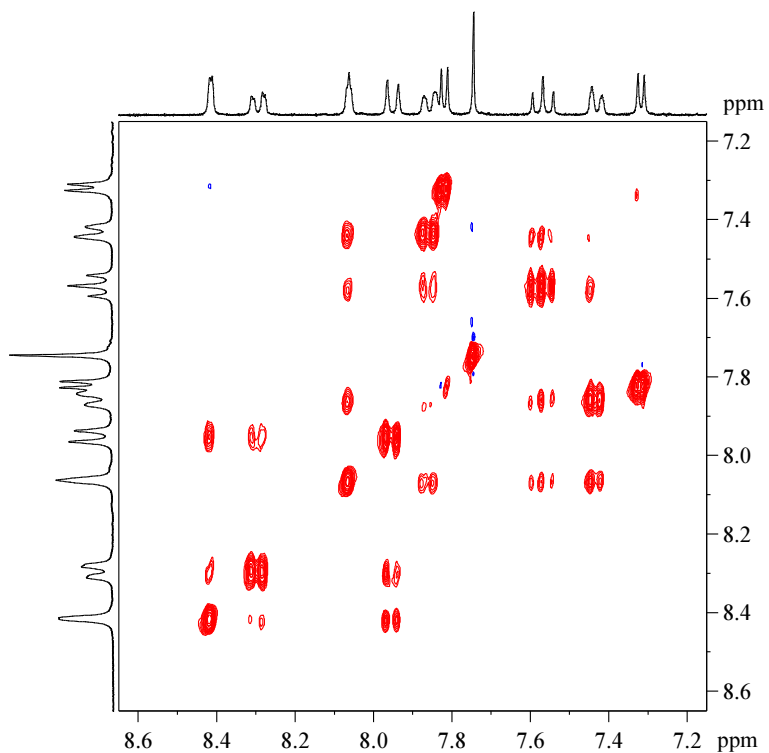
A 2D zqs-TOCSY és a zqs-easy-random-ROESY spektrumokban a térközelség szempontjából fontos keresztcsúcsok mindegyike tisztán abszorpciós, csupán egyes olyan keresztcsúcsokban lép fel alternáló fázisú elem, melyek kémiai eltolódásban közel állnak egymáshoz, egymás csatoló partnerei. Ilyen jellegzetes spektrumelem a 7.36/7.54 keresztcsúcs, térközelségi és egyben csatoló partner hidrogén atomok jelei egymástól 0.18 ppm távolságra, köztük a csatolási állandó értéke viszonylag nagy, 7.8 Hz.



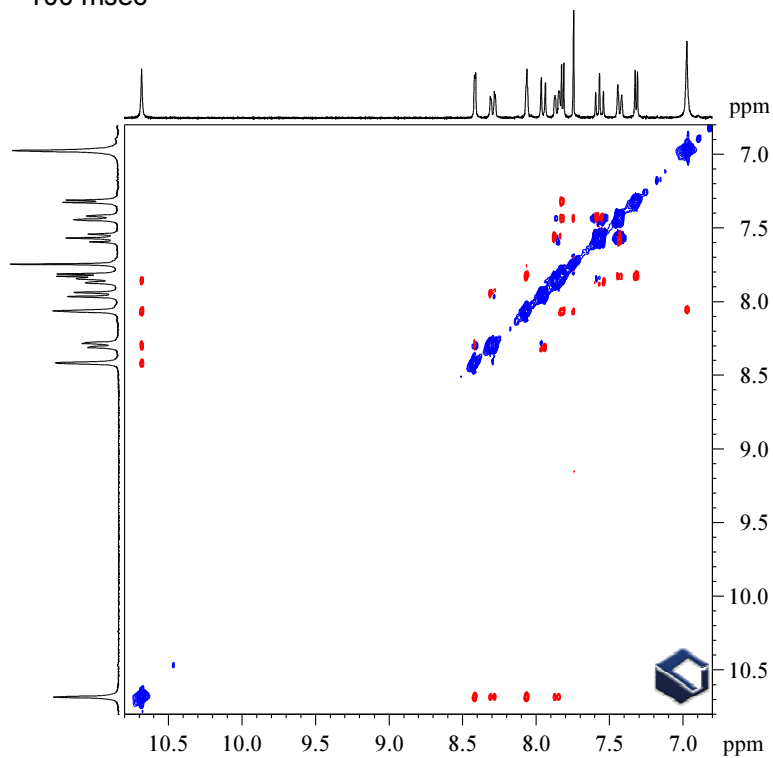
75. ábra. VIC31338 vegyület, RG1331 minta átnézeti $^1\text{H-NMR}$ spektruma



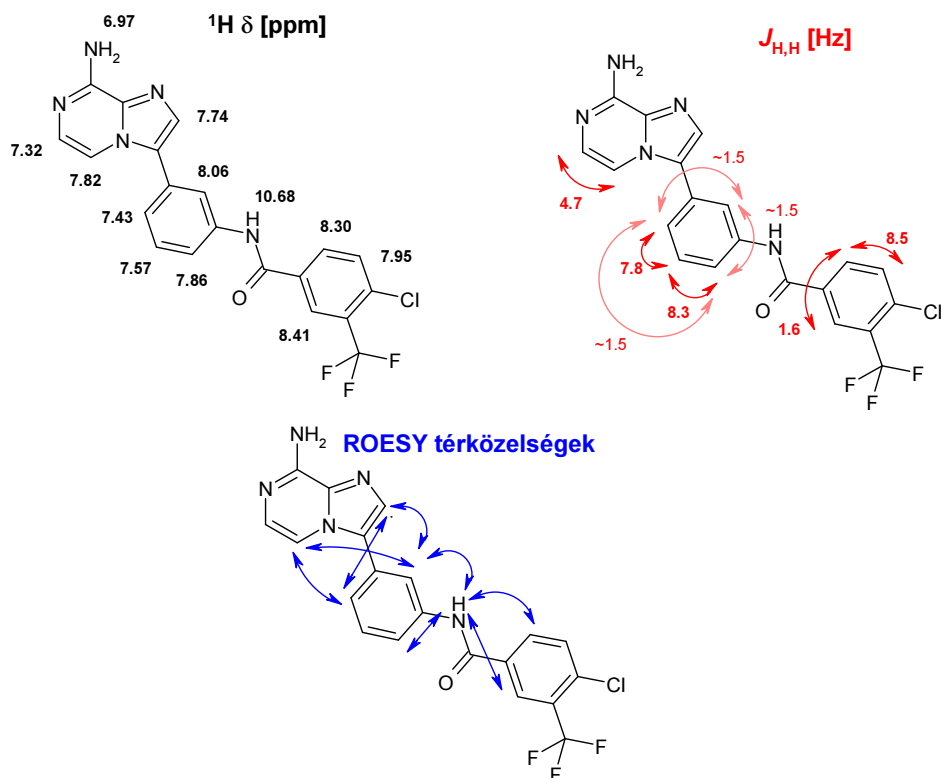
76. ábra. VIC31338 vegyület, RG1331 minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.33) javított felfontású részlete, a csúcslista Hz-ben.



77. ábra. VIC31338 vegyület, RG1331 minta zqs-TOCSY spektruma, 2 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 100$ msec

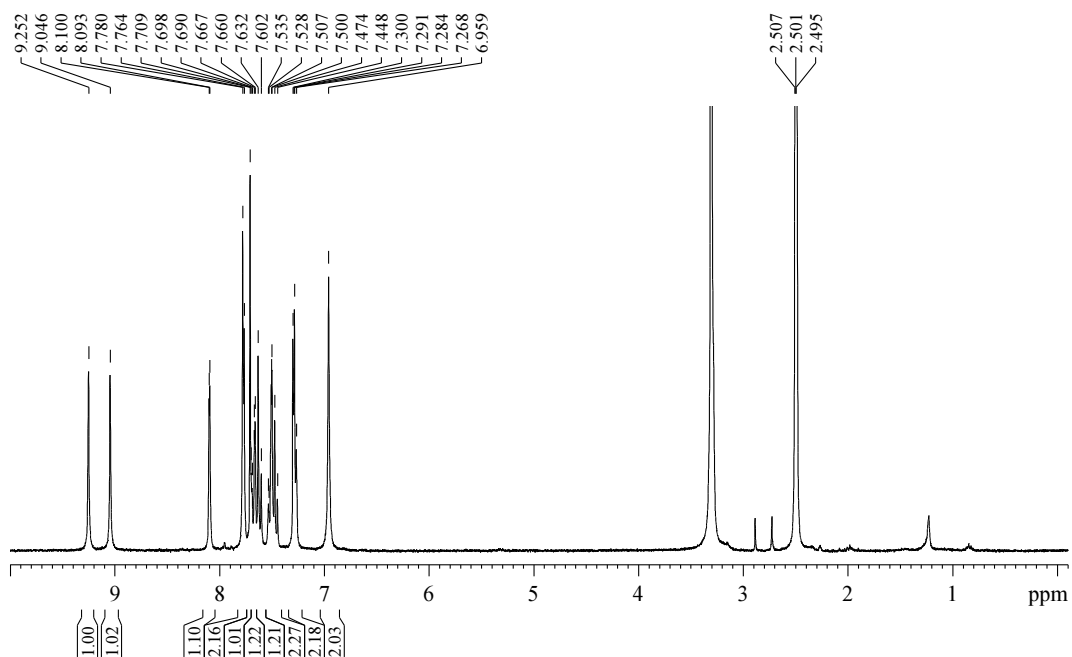


78. ábra. VIC31338 vegyület, RG1331 minta zqs-easy-random-ROESY spektruma, 8 scan * 128 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 2 * 100$ msec $\pm 5\%$, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás 1.4 Hz/pont. A ROESY spektrumban a 6.97/8.08 keresztcsúcs a víz betükröződése.

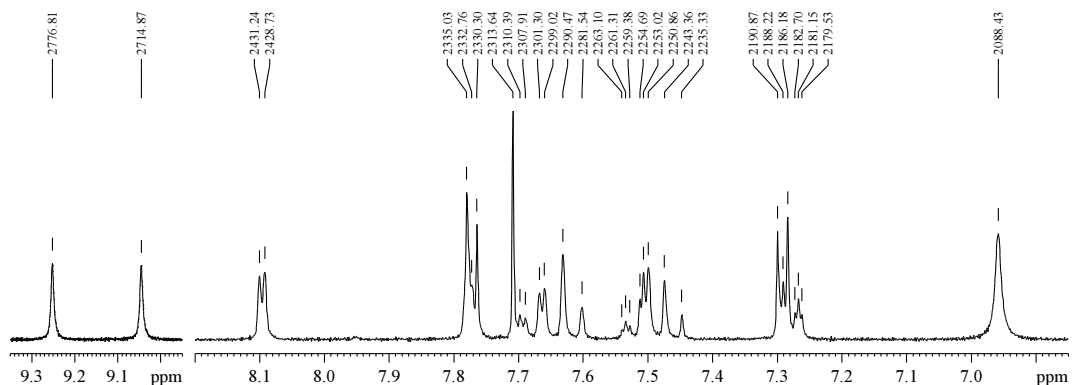


79. ábra. VIC31338 vegyület, RG1331 minta (13o sorszám az V. számú saját publikációban) molekula NMR spektrumainak értelmezése.

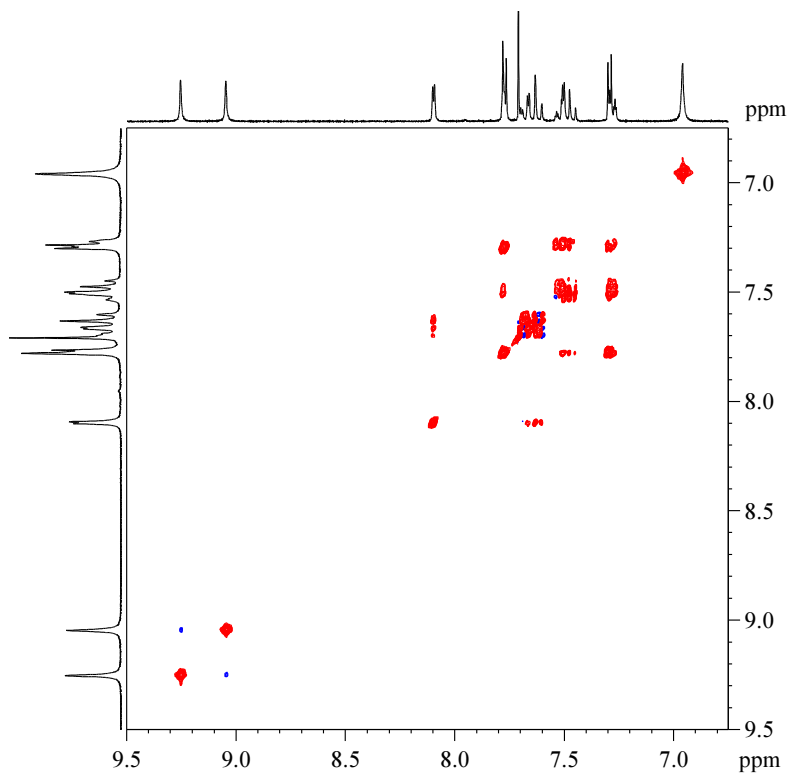
A minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumban minden jel elkülönül, jelátfedések nincsenek. A minta zqs-TOCSY spektrumában tiszta pozitív fázisú jelek jelentkeznek. A jobb ábrázolhatóság miatt a spektrumábrán csak az aromás tartományt tüntettem fel. A zqs-easy-random-ROESY spektrumban csak néhány egymáshoz közeli kémiai eltolódású térközelségi és egyben csatoló partner hidrogén atom jelének keresztcsúcsaiban lép fel fázis-alternálás. A szerkezet megállapítása szempontjából kritikus térközelségi keresztcsúcsok mind tiszta abszorpciós pozitív fázisúak. Az amid NH térközelséget mutat két aromás gyűrű hidrogén atomjaival, míg az aromás amin csoport a vízzel történő mérsékelt sebességű cserefolyamaton kívül más kölcsönhatást nem mutat.



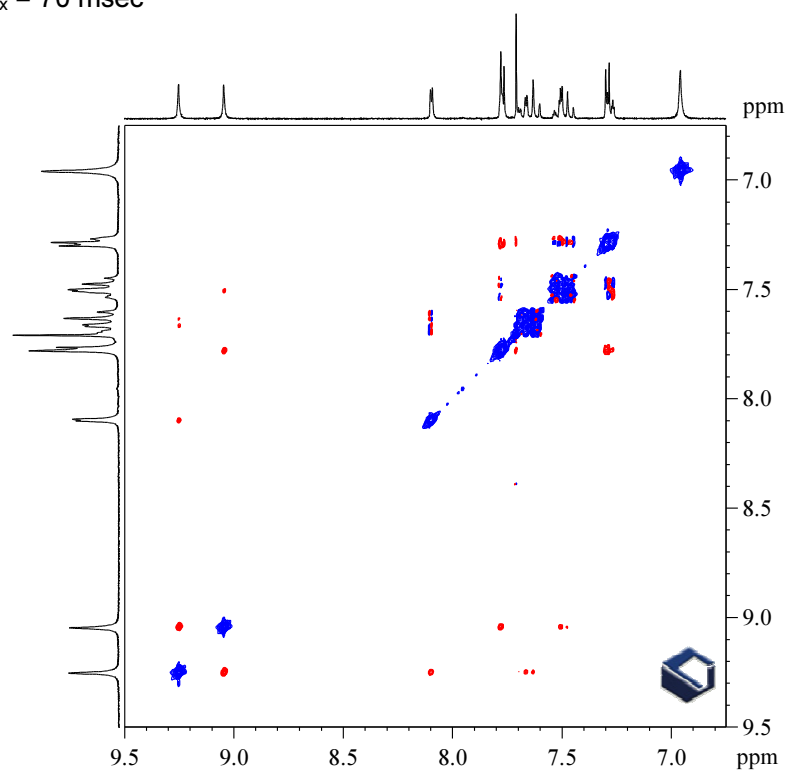
80. ábra. VIC31359 vegyület, RG1352 minta átnézeti $^1\text{H-NMR}$ spektruma



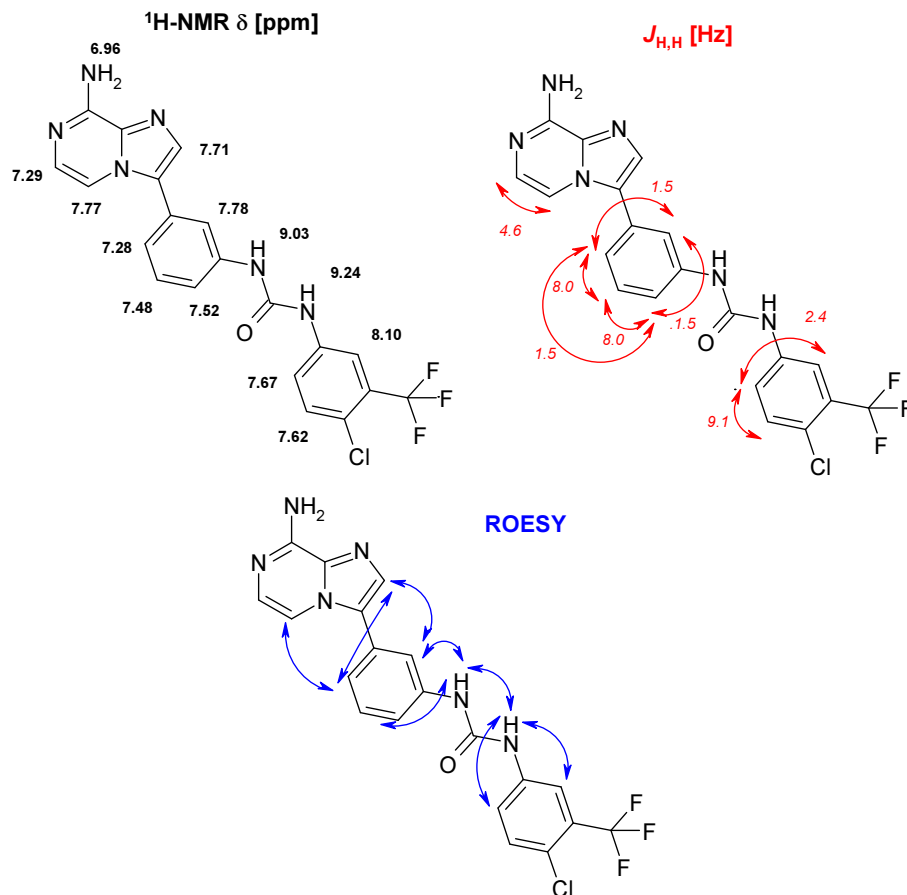
81. ábra. VIC31359 vegyület, RG1352 minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felbontású részlete, a spektrum fölött a csúcslista Hz mértékegységben.



82. ábra. VIC31359 vegyület, RG1352 minta zqs-TOCSY spektruma; 2 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 70$ msec



83. ábra. VIC31359 vegyület, RG1352 minta zqs-easy-random-ROESY spektruma; 8 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 2 * 100$ ms \pm 5 %, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás, 0.9 Hz/pont.



84. ábra. VIC31359 vegyület, RG1352 minta (16j sorszám az V. számú saját publikációban) $^1\text{H-NMR}$, zqs-TOCSY és zqs-easy-random-ROESY spektrumainak értelmezése, jelhozzárendelésük.

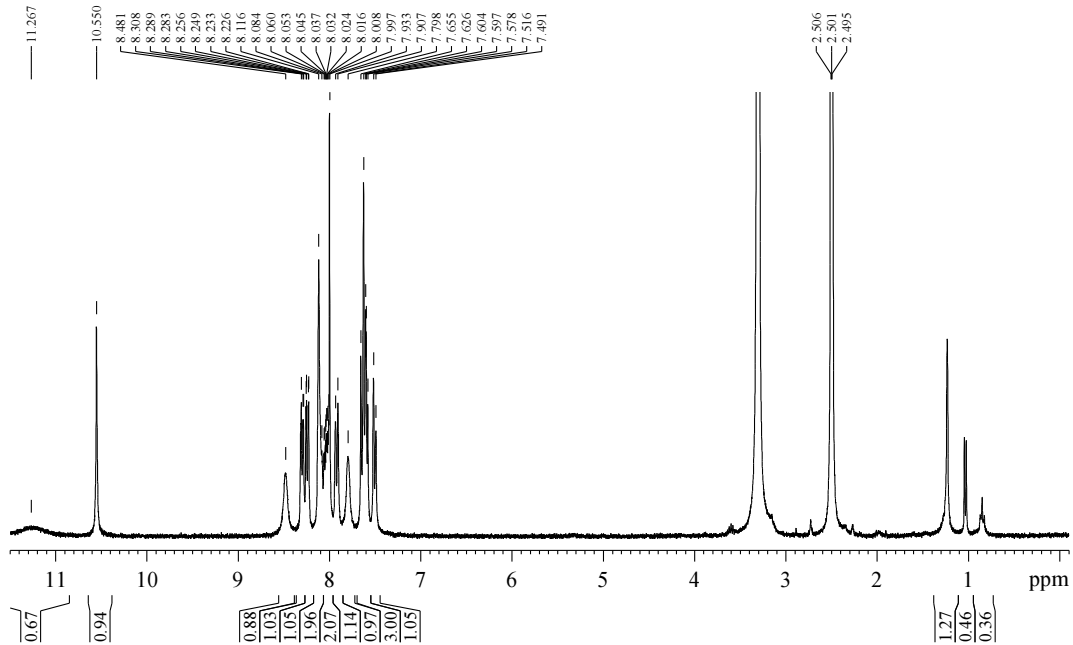
A minta zqs-easy-random-ROESY spektrumáiban előfordulnak egymáshoz közeli kémiai eltolódású térközelségi és egyben csatoló partnerektől eredő alternáló fázisú keresztcsúcsok, de a szerkezet megállapítása szempontjából fontos térközelségi csúcsok ebben a spektrumban is tiszta fázissal jelentkeznek. A karbamid kialakítás izocianáttal ugyanazon az amino csoporton játszódik le, mint a szubsztituált benzoészav származékkal történt acilezés. A szelektivitást a kiindulási anyag két amin csoportjának eltérő reakciókészsége határozza meg, a reaktáns szubsztituált benzoészavnak illetve szubsztituált fenilizocianátnak nincs számottevő szerepe.

A mintáról $^{13}\text{C-NMR}$, valamint Bruker gyári pulzusprogram-változattal mért multiplicitás-szerkesztett HSQC és HMBC felvétel is készült, melyek alapján teljes $^{13}\text{C-NMR}$ hozzárendelés és spektrumértelmezés adható, de, mivel az anyag csak köztitermék volt, közlésüket helytakarékosságból mellőzöm.

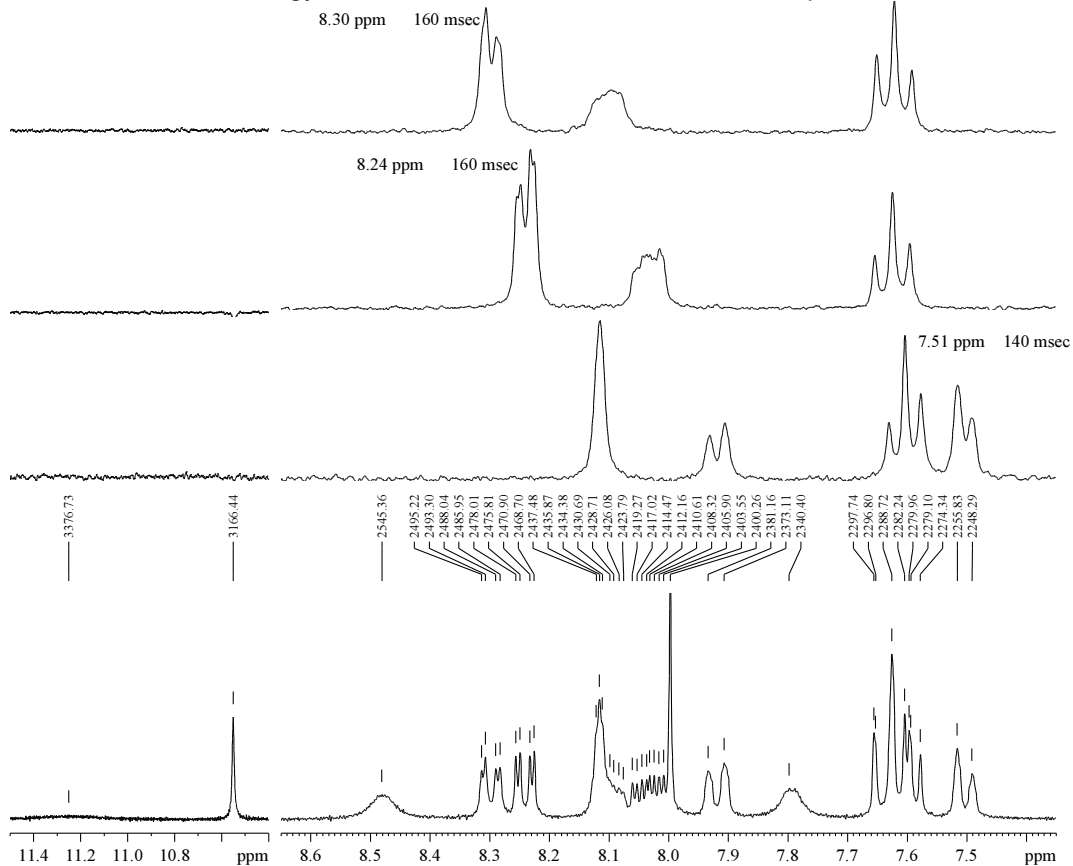
A biciklus és a meta-amino-fenil csoport kapcsolódását bizonyítják az elemeik között fellépő térközelségi keresztcsúcsok. A biciklus és az *orto*-amino fenil csoport alternatív kapcsolódása esetén az *orto*-amino-fenil egység nem mutatna térközelséget a biciklus mindkét gyűrűjével. Az amid NH térközelséget mutat két gyűrű váz hidrogén atomjaival is, igazolva, hogy a *meta*-amino fenil csoport aminja acileződött. Ugyanakkor a megmaradt amin jel nem mutat térközelséget egyetlen más hidrogénnel sem. Ha az amid a biciklus aminjából alakult volna ki, akkor a megmaradt amin térközelséget mutatna a meta szubsztituált fenil csoport hidrogén atomjaival, illetve az amid csak a fluor-klór-benzoil csoport hidrogén atomjaival mutatna térközelséget, mivel a biciklus érintett régiója nem tartalmaz hidrogén atomot.

A végtermékek NMR szerkezetvizsgálatát, az előzőekhez hasonlóan a zqs-easy-random-ROESY és a zqs-TOCSY mérésekre építettem. Szükség esetén, amikor több jel került véletlen átfedésbe, szelektív 1D zqs-TOCSY módszerrel fejttem föl az átfedő spektrumvonalak hovatarozását. Egyes végtermékek esetén ^{13}C , multiplicitásszerkesztett HSQC valamint HMBC méréseket is végeztem, a kiemelt példáknál ezeket a spektrumokat és értékelésüket is bemutatom.

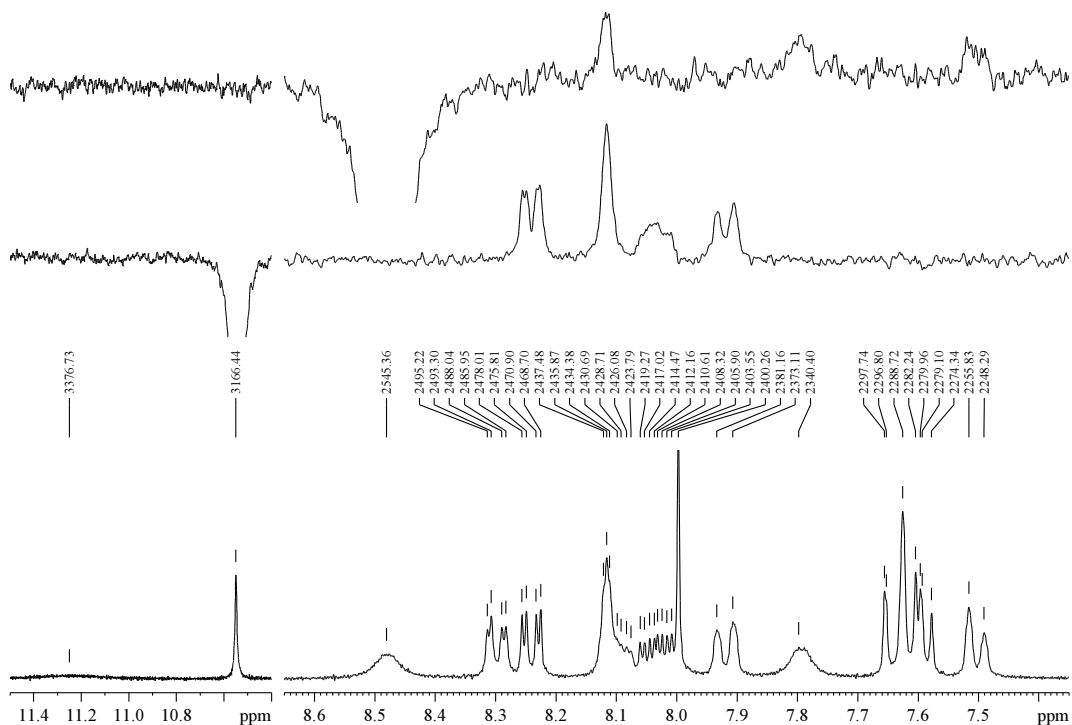
A példákban szereplő **14f** és **17e** végtermékek ^1H -NMR spektrumában az imidazo-pirazin biciklus pirazin gyűrűjének két jele, valamint az amid NH jel széles, korrelációs spektrumaikban a korrelációik ennek következtében csak részlegesen, illetve csökkent intenzitással jelennek meg, a ^{13}C -információt is tartalmazó spektrumokból az extrém jelkiszélesedés miatt a megfelelő jelek hiányoznak, a rendelkezésre álló mérésidő alatt nem emelkedtek ki az alapvonalból, illetve alapsíkból. (**14f**: 85-93 ábrák, **17e**: 94-101. ábrák)



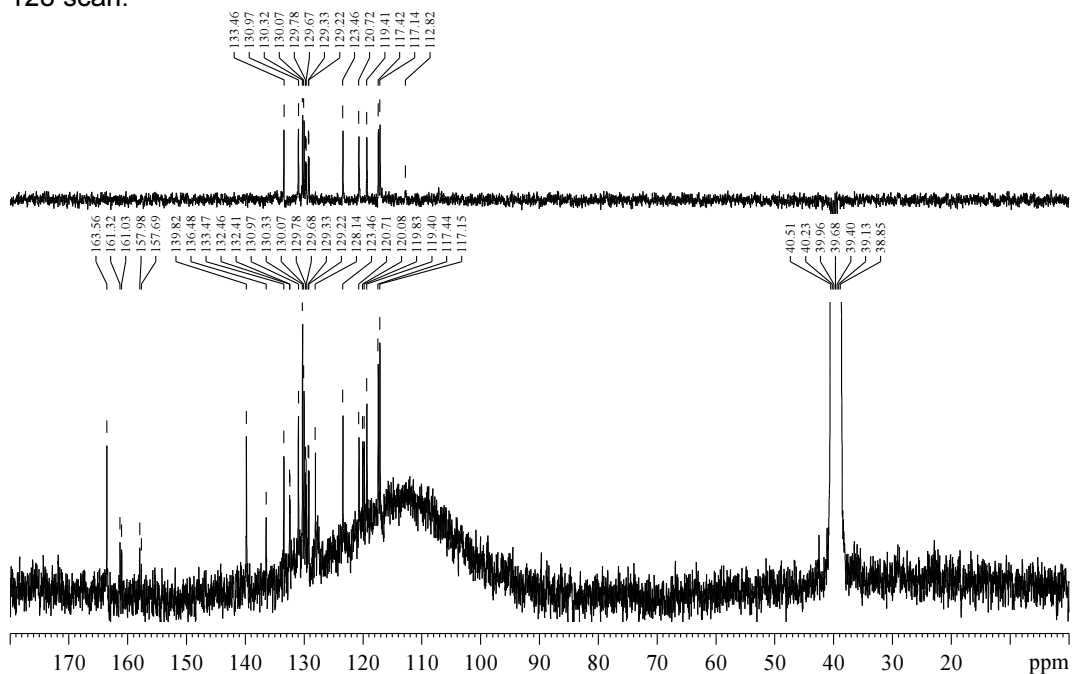
85. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta átnézeti $^1\text{H-NMR}$ spektruma



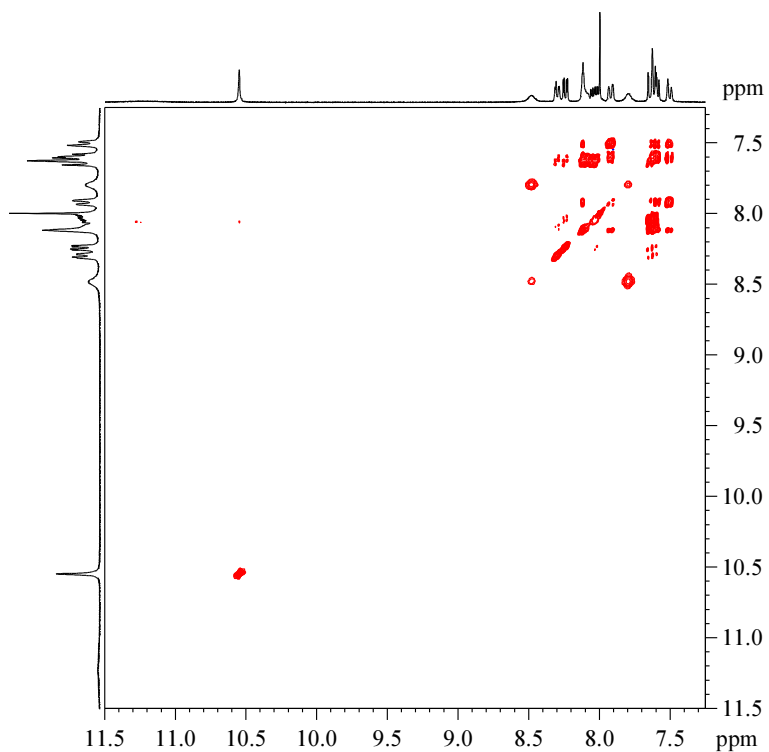
86. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felbontású részlete, a spektrum fölött a csúcslista Hz mértékegységben, valamint a minta három szelektív 1D zqs-TOCSY felvétele, megadva a kiválasztott jel és az optimalizált keverési idő.



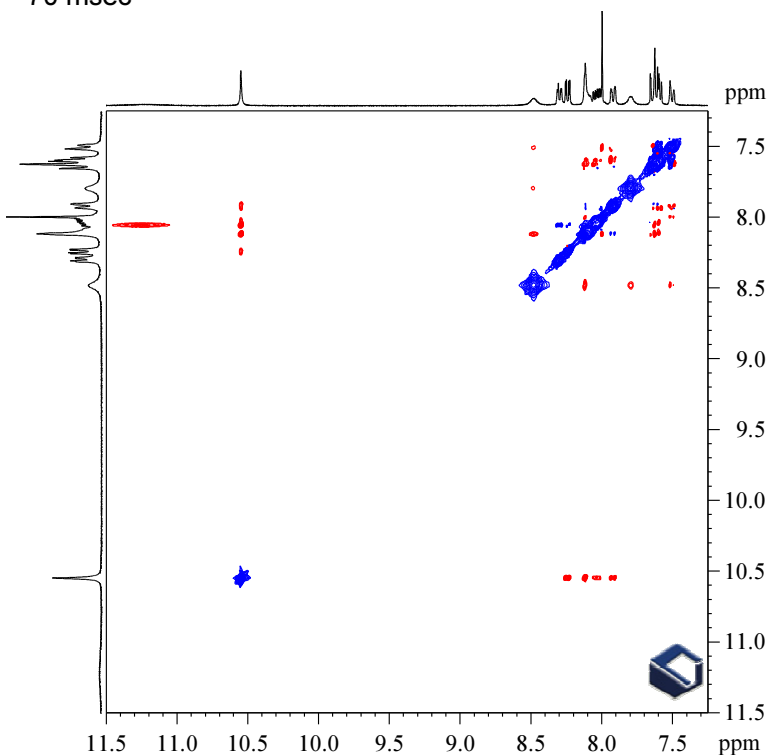
87. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felbontású részlete, valamint a minta két szelektív 1D zqz-easy ROESY felvétele. 2 * 100 msec keverési idő randomizálás nélkül, 128 scan.



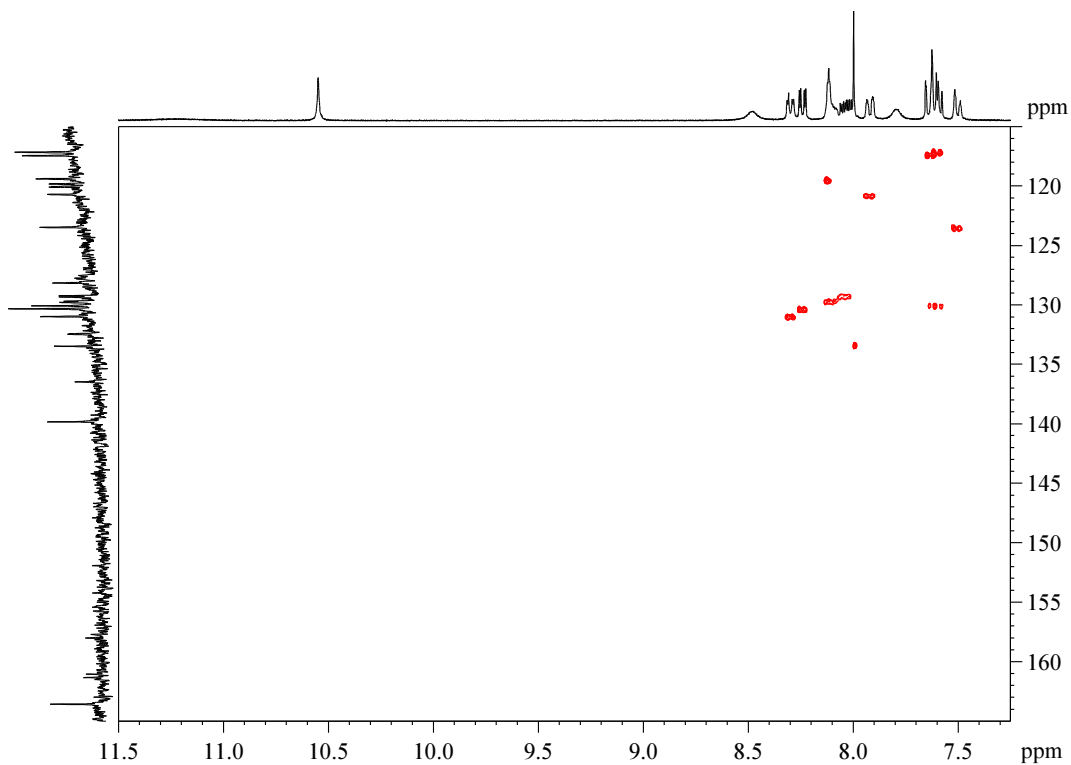
88. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta $^{13}\text{C-NMR}$ és DEPT-135 spektruma, a $^{13}\text{C-NMR}$ mérés két éjszaka (38 ezer scan), a DEPT mérés egy teljes éjszaka alatt (19 ezer scan) készült, ennek ellenére egyes jelek nem emelkedtek ki az alapvonalból.



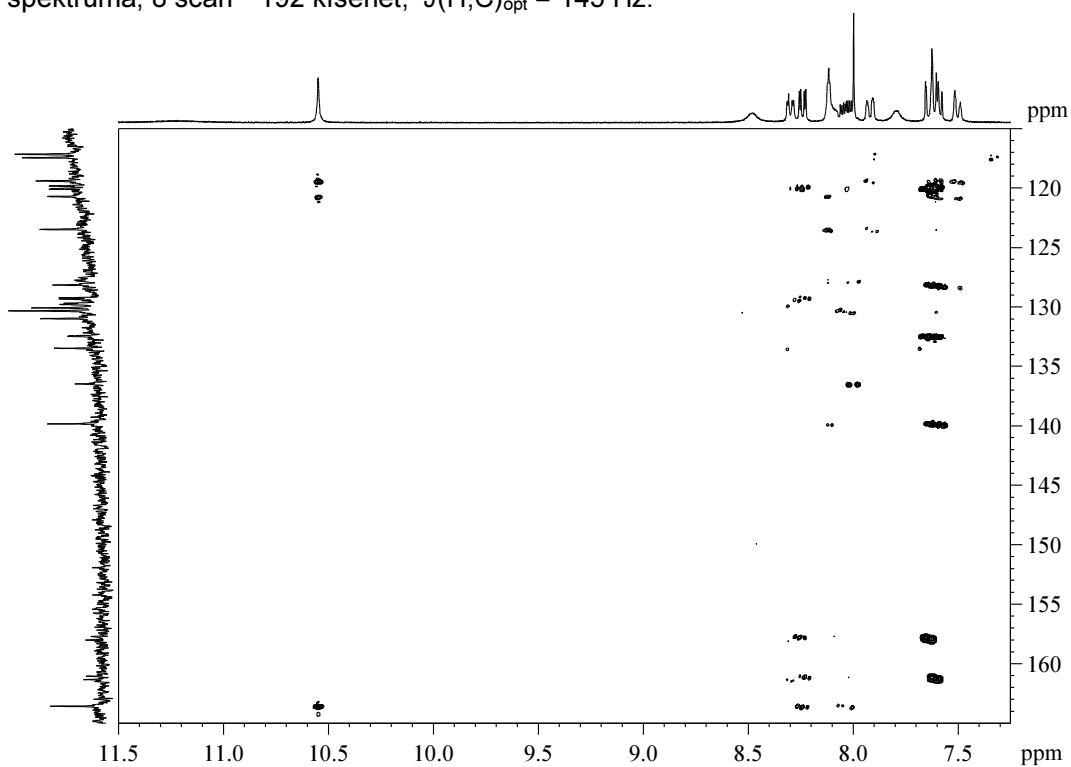
89. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta zqs-TOCSY spektruma; 2 scan * 256 kísérlet, $\tau_{\text{mix}} = 70$ msec



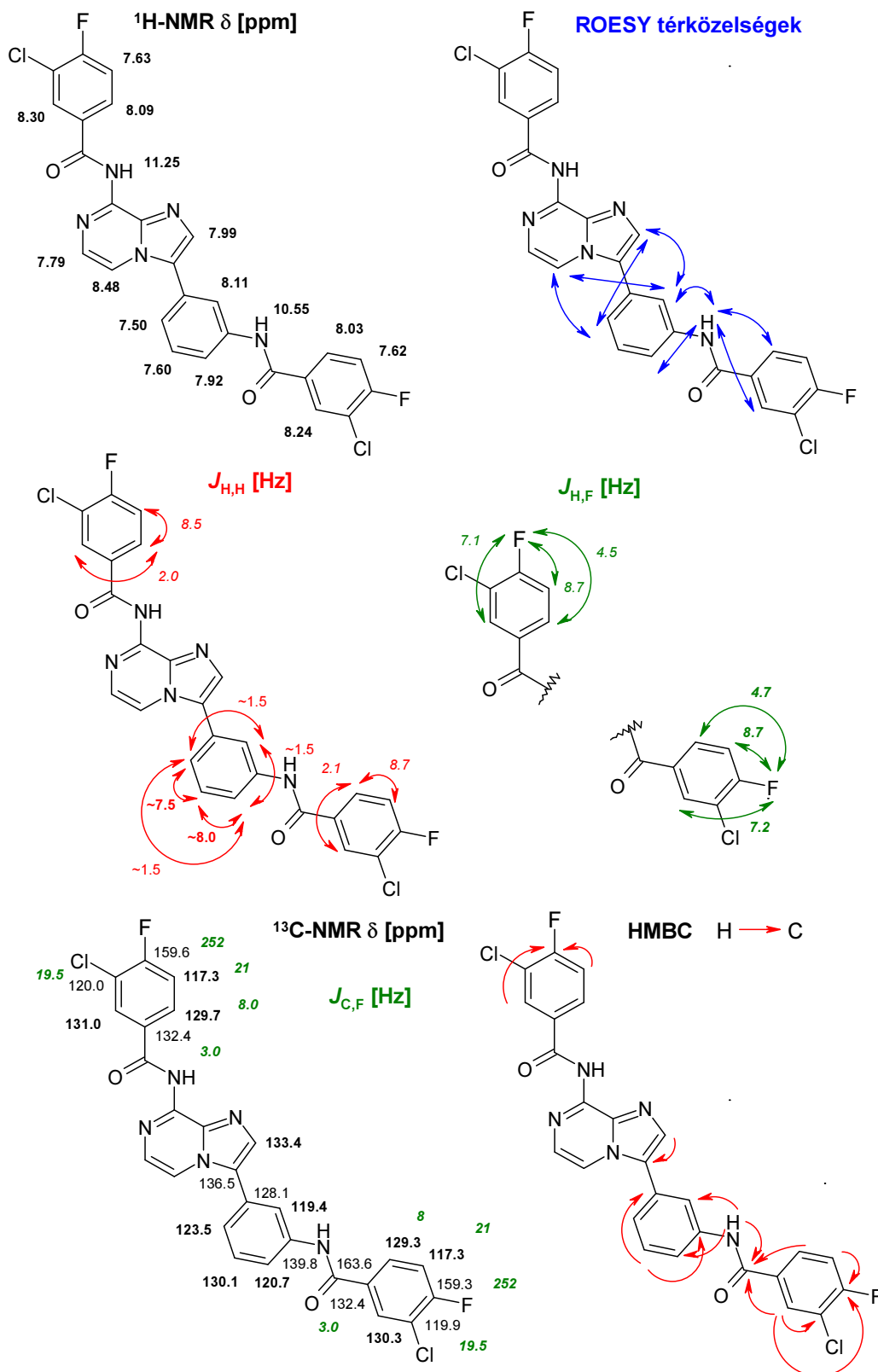
90. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta zqs-easy-random-ROESY spektruma; 8 scan * 256 kísérlet, $\tau_{\text{mix}} = 2 * 100$ ms \pm 5 %, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás mindkét dimenzióban 1.4 Hz/pont.



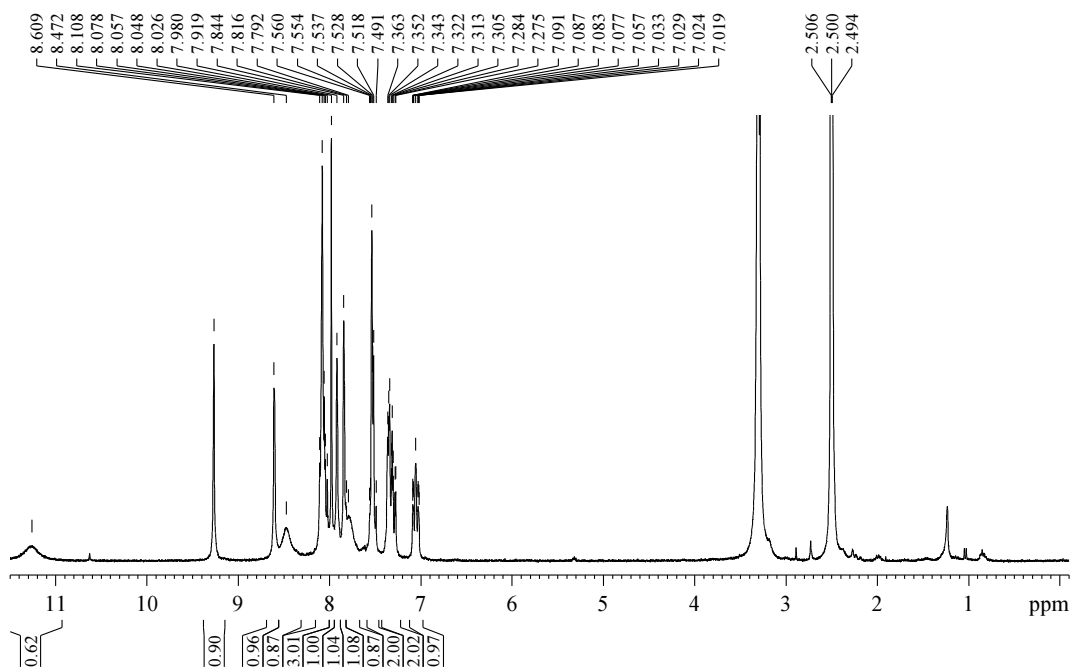
91. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta minta multiplicitás-szerkesztett HSQC spektruma; 8 scan * 192 kísérlet, $^1J(\text{H,C})_{\text{opt}} = 145$ Hz.



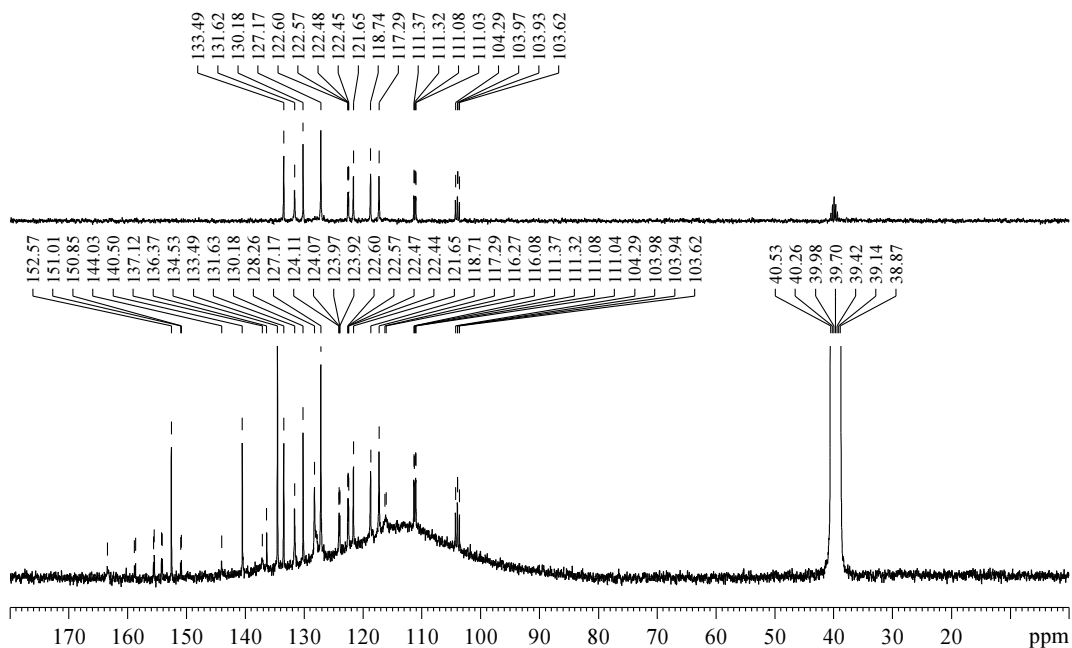
92. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T minta HMBC spektruma; 128 scan * 256 kísérlet, $^nJ(\text{H,C})_{\text{opt}} = 7$ Hz.



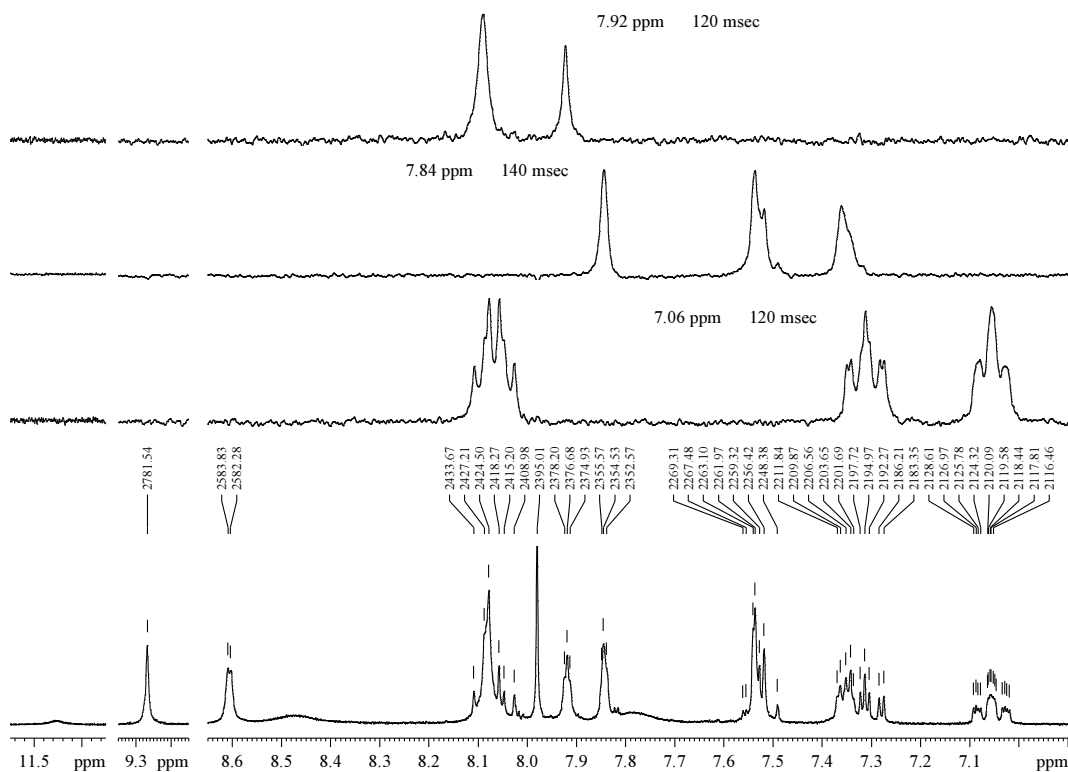
93. ábra. VIC31772 vegyület, RG1475T (14f sorszám az V. számú saját publikációban) minta NMR spektrumainak értelmezése



94. ábra. VIC31874 vegyület (17e sorszám az V. számú saját publikációban), RG1505 minta átnézeti ^1H -NMR spektruma

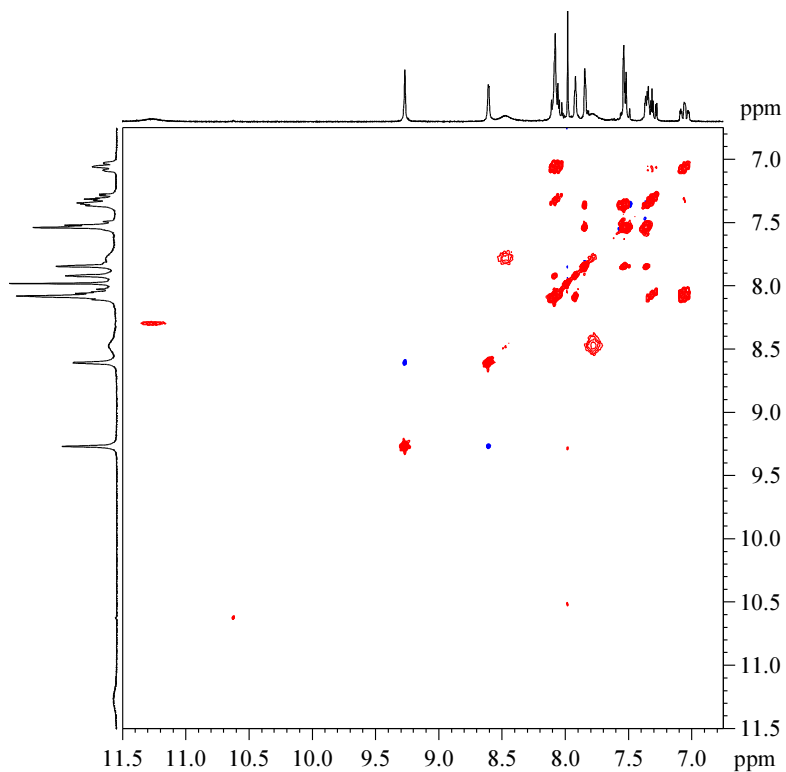


95. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta ^{13}C -NMR és DEPT-135 spectruma

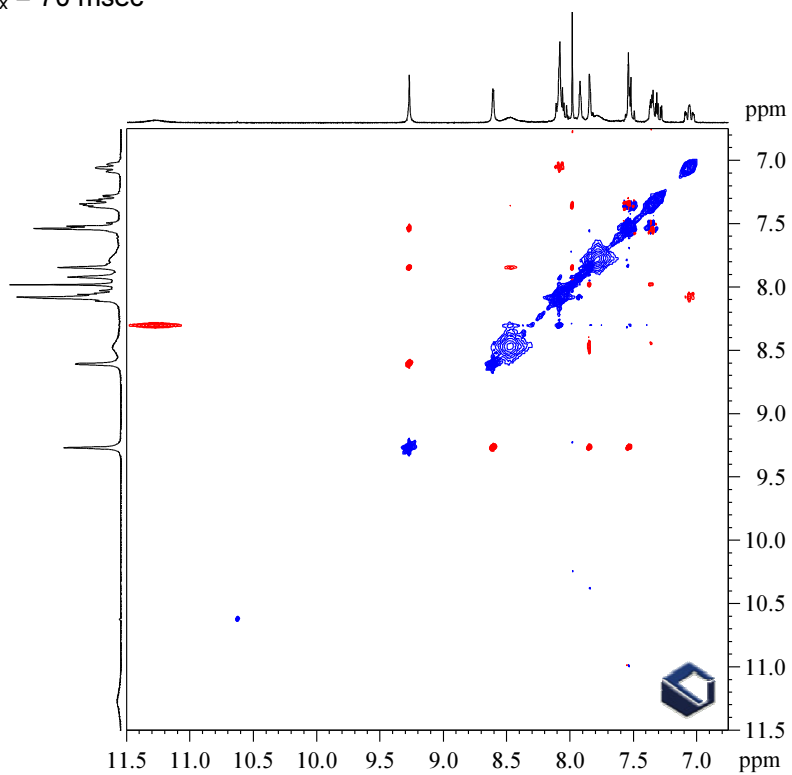


96. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta $^1\text{H-NMR}$ spektrumának Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felbontású részlete, a spektrum fölött Hz listával. A spektrum fölött három különböző szelektív 1D zqs-TOCSY spektrum, minden TOCSY spektrum fölött feltüntetve a kiválasztott jel és az alkalmazott optimalizált keverési idő.

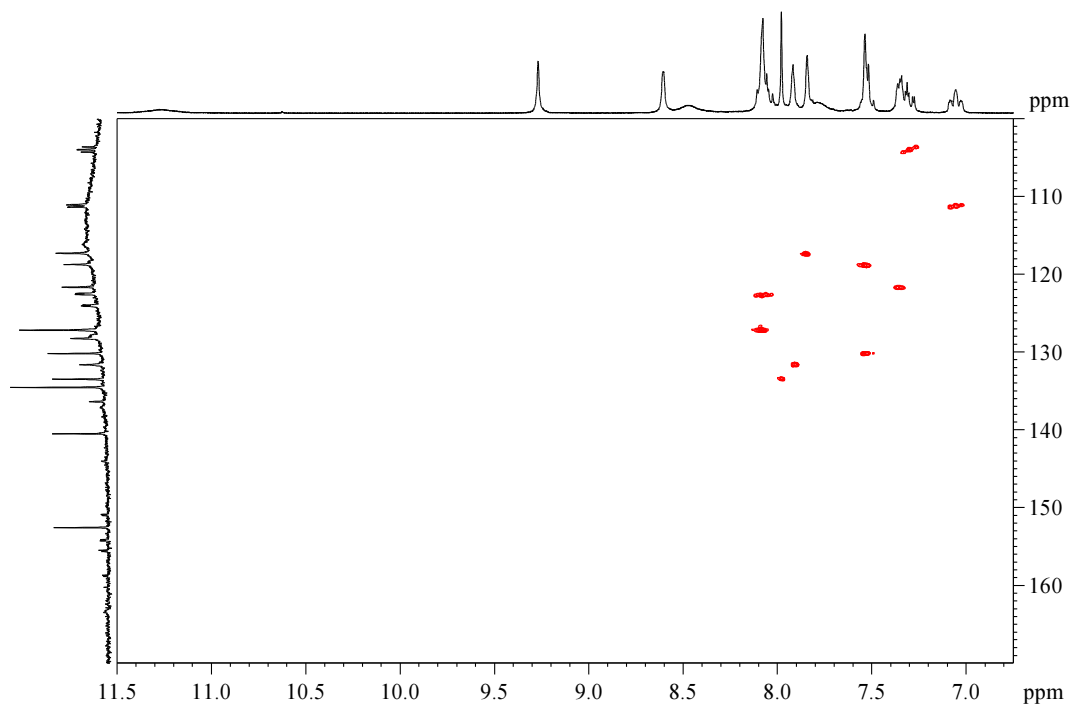
A szelektív 1D zqs-TOCSY módszerrel az átfedésben lévő, és a 2D változat korlátozott digitális felbontása miatt még mindig bizonytalan jelek is feltérképezhetők, az egyes spektrumvonalakról megállapítható, hogy melyik jel elemei, így a csatolási mintázat könnyebben azonosítható.



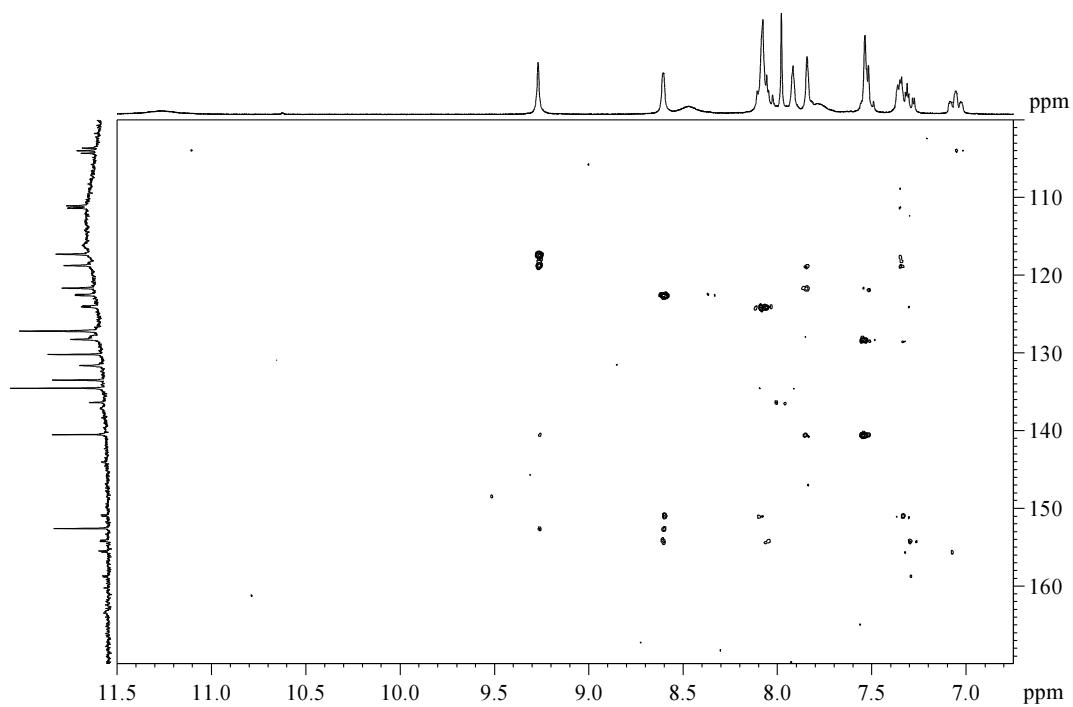
97. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta zqz-TOCSY spektruma; 2 scan * 192 kísérlet, $\tau_{\text{mix}} = 70$ msec



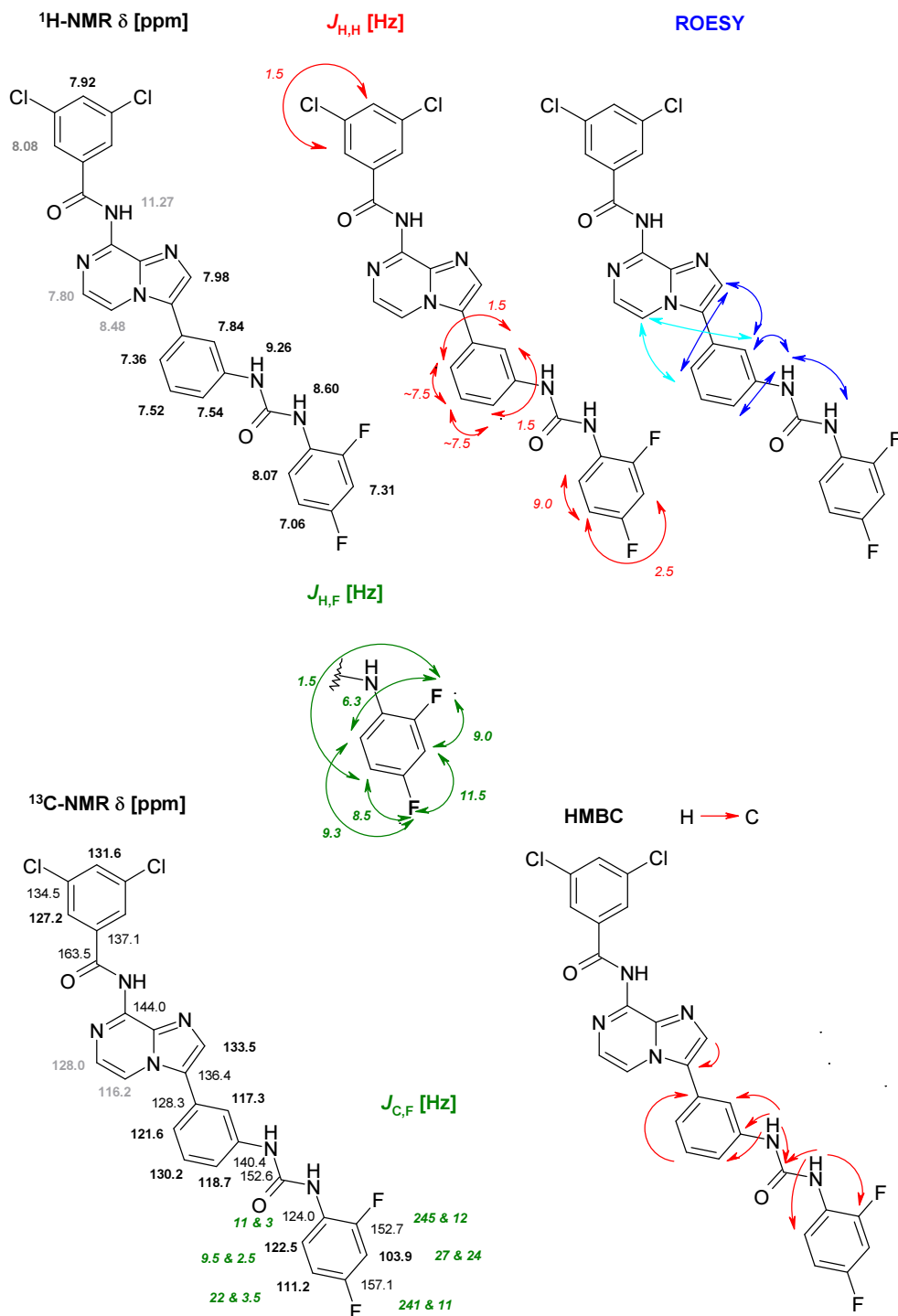
98. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta zqz-easy-random ROESY spektruma; 8 scan * 192 kísérlet, $\tau_{\text{mix}} = 2 * 100$ ms \pm 5 %, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás, 1.5 Hz/pont.



99. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta multiplicitás-szerkesztett HSQC spektruma; 16 scan * 192 kísérlet, $^1J(\text{H,C})_{\text{opt}} = 145$ Hz.



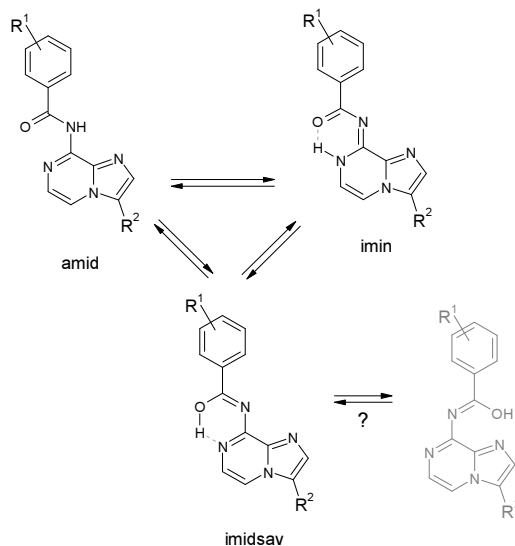
100. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta HMBC spektruma; 48 scan * 192 kísérlet, $^nJ(\text{H,C})_{\text{opt}} = 7$ Hz.



101. ábra. VIC31874 vegyület, RG1505 minta (17e sorszám az V. számú saját publikációban) spektrumainak értelmezése, jelhozzárendelésük. Az ¹H-NMR hozzárendelést szemléltető szerkezeti képletben szürke színnel tüntettem föl a kiszélesedett jelek kémiai eltolódásait.

B.7.2. Tautomer egyensúly vizsgálata

Az illusztrációban eddig bemutatott két végtermék minta (**14f** és **17e**) - és általában az analóg szerkezetű minták - esetében a biciklus pirazin gyűrűjének két hidrogén jele, benzoil csoport *orto* helyzetben lévő hidrogén atomjainak jelei valamint az amid NH jel szélesek, rajtuk mintázat, felhasadás nem ismerhető fel, a korrelációs spektrumokban a jelkiszélesedés miatt csatolási korrelációjuk nem ad értékelhető jelet, térközelségi korrelációjuk jele – a 101. ábrán a többitől eltérő kék színárnyalattal jelölve - bizonytalan. Ezen atomok jeleinek kémiai eltolódását szürke színnel tüntettem fel a 101. ábrán. A jelenség oka az, hogy az aromás amidok esetében általában nem kell számolnunk az amid lehetséges tautomerjeinek, az imidsavnak illetve az iminnek a számottevő jelenlétével, mivel azok energiája általában nagyobb az amid energiájánál. Az előállított vegyületcsalád esetében azonban az imin illetve imidsav tautomereket intramolekuláris hidrogén híd alakulhat ki az imidazo-pirazin gyűrű egyik nitrogén atomjának részvételével, ez a hidrogén híd az amid energiaszintje közeli értékre csökkenti az imin és imidsav tautomerek energiáját (102. ábra). Az amid tautomer esetén nincs ilyen energiacsökkentő járulékos effektus.

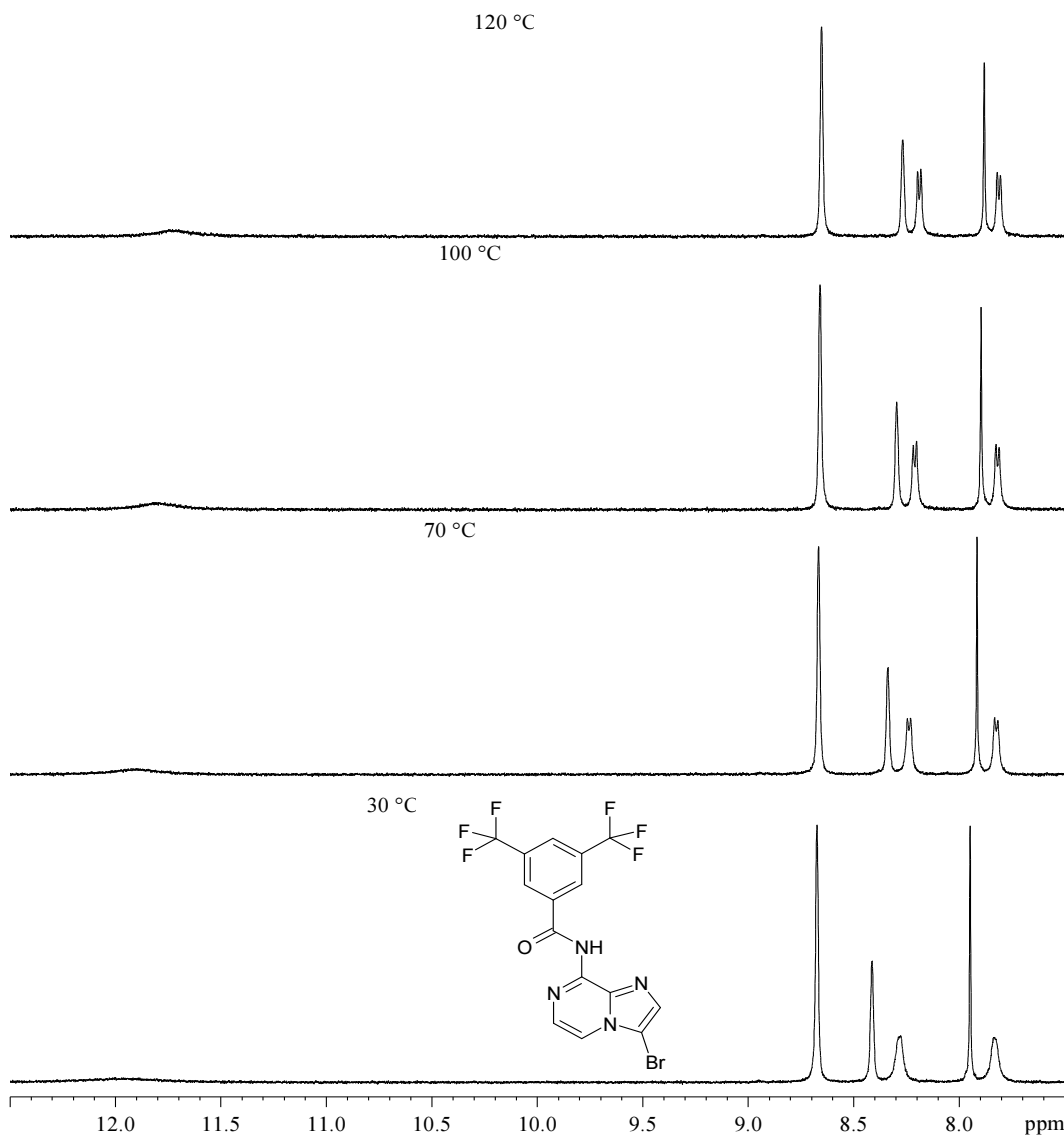


102. ábra. Az amid, imin és imidsav tautomer mikroegyensúlyi rendszer. Imidsav esetén elvi lehetőség van kötés körüli 180°-os elfordulásra is, ez esetben a biciklus imidazol gyűrűjének nitrogén atomja vehet részt a hidrogén hídban.

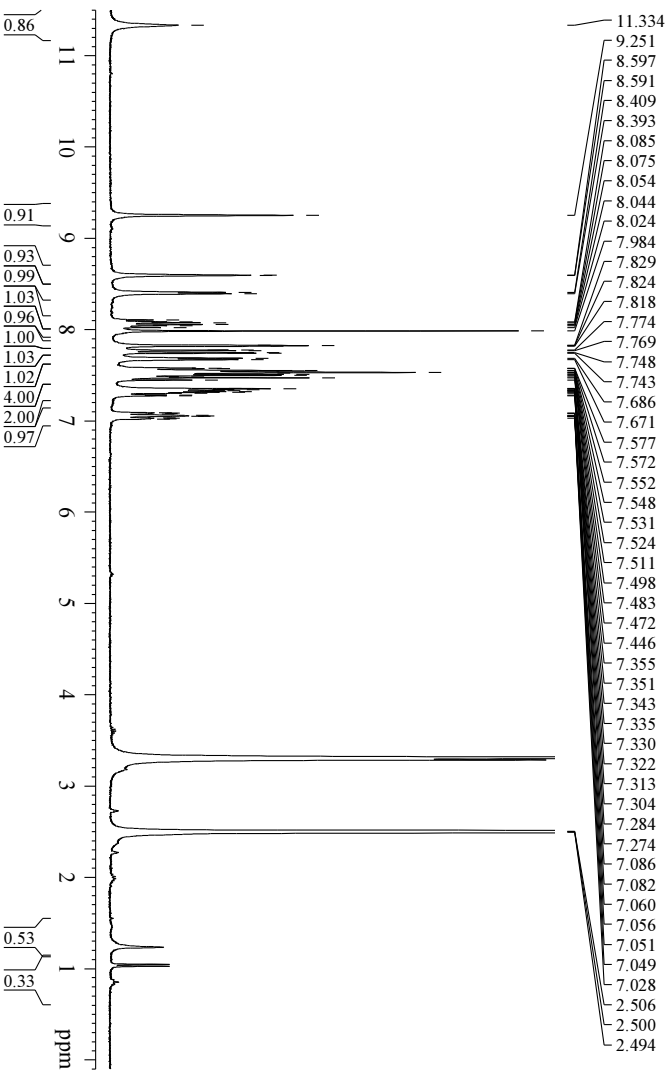
A bemutatott tautomer mikroegyensúly összefüggésben áll az imidazo-pirazin származékok szintézisére tervezett első szintézisterv (64. ábra) sikertelenségével. A Suzuki reakció lépés során olyan körülmények állnak fenn, melyek elősegítik az imin és

imidsav tautomerek nem elhanyagolható mértékű jelenlétével meggyengített benzoilamid elbomlását.

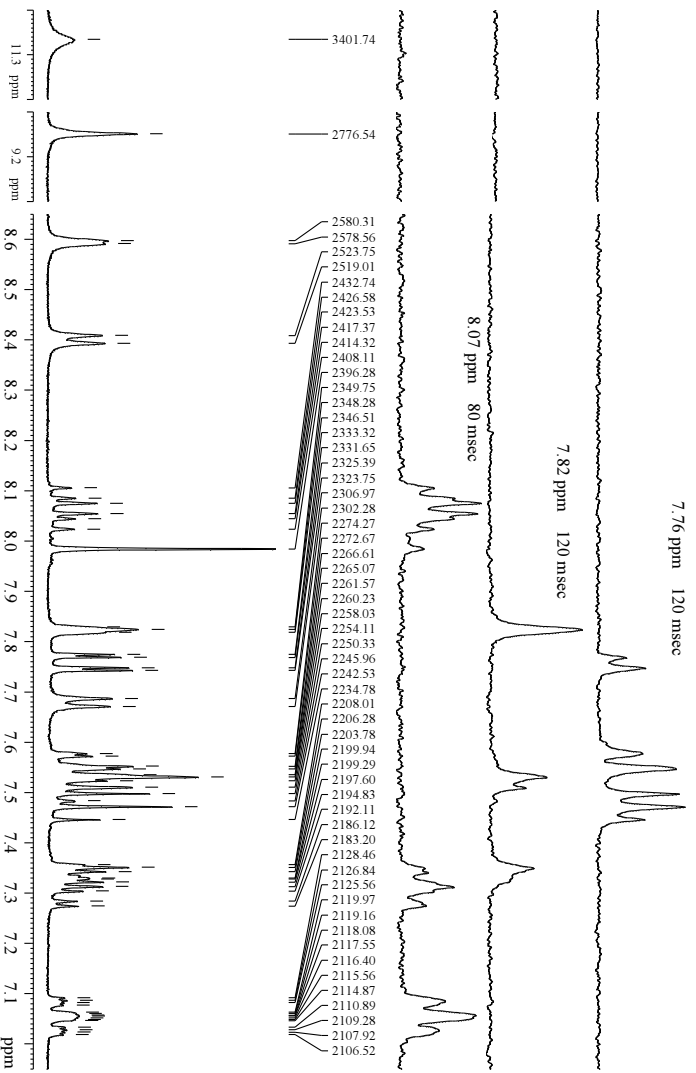
A 103. ábrán egy „lecsupaszított” modellvegyület hőmérsékletfüggő $^1\text{H-NMR}$ spektrumsorozatán mutatom be a tautomer egyensúlyi rendszer viselkedését. Az amid NH, valamint az imidazo-pirazin biciklus pirazin gyűrűjének jelei $30\text{ }^\circ\text{C}$ -on szélesek, a két CH jelen 7.81 és 8.28 ppm-nél csatolási mintázat nem ismerhető fel. $120\text{ }^\circ\text{C}$ -ig felfűtve - ahogy a tautomer állapotok élettartama a hőmérséklet növekedésével rövidül - a két CH jel élesedik, megjelenik rajtuk a csatolási mintázat.



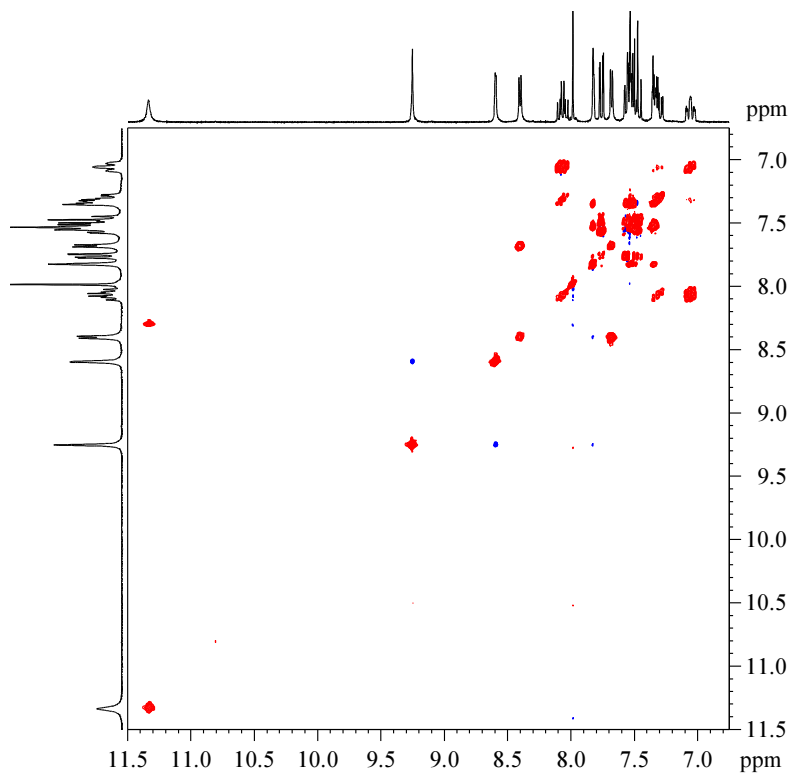
103. ábra. Az előbbieken ismertetett tautomer egyensúly szemléltetése a jelenséget mutató, de a lehetőséghez képest minél kevesebb jelet tartalmazó, leegyszerűsített modellvegyület (RG1531T minta) hőmérsékletfüggő $^1\text{H-NMR}$ spektrumsorozata $\text{DMSO-}d_6$ oldószerben.



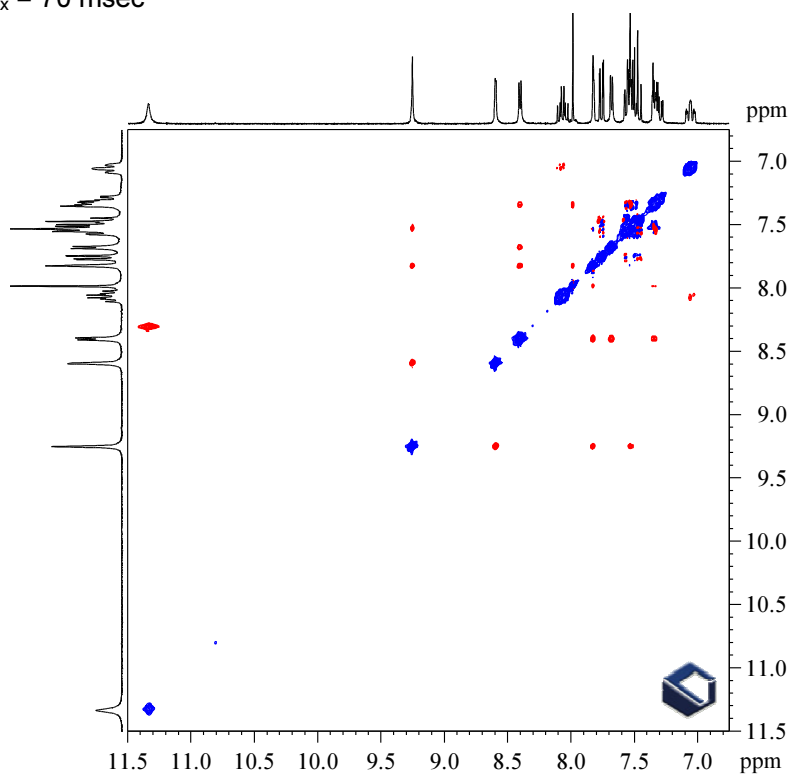
104. ábra. VIC31872 vegyület (17c számon V saját publikációban), RG1503 minta átnézeti $^1\text{H-NMR}$ spektruma



105. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta $^1\text{H-NMR}$ spektruma Gauss ablakfüggvénnyel (LB = -1, GB = 0.25) javított felfontású részlet spektruma; a spektrum fölött a csúcslista Hz mértékegységben. A spektrum fölött három különböző szelektív 1D zqs-TOCSY spektrum, minden TOCSY spektrum fölött feltüntetve a kiválasztott jel és az alkalmazott optimalizált keverési idő.

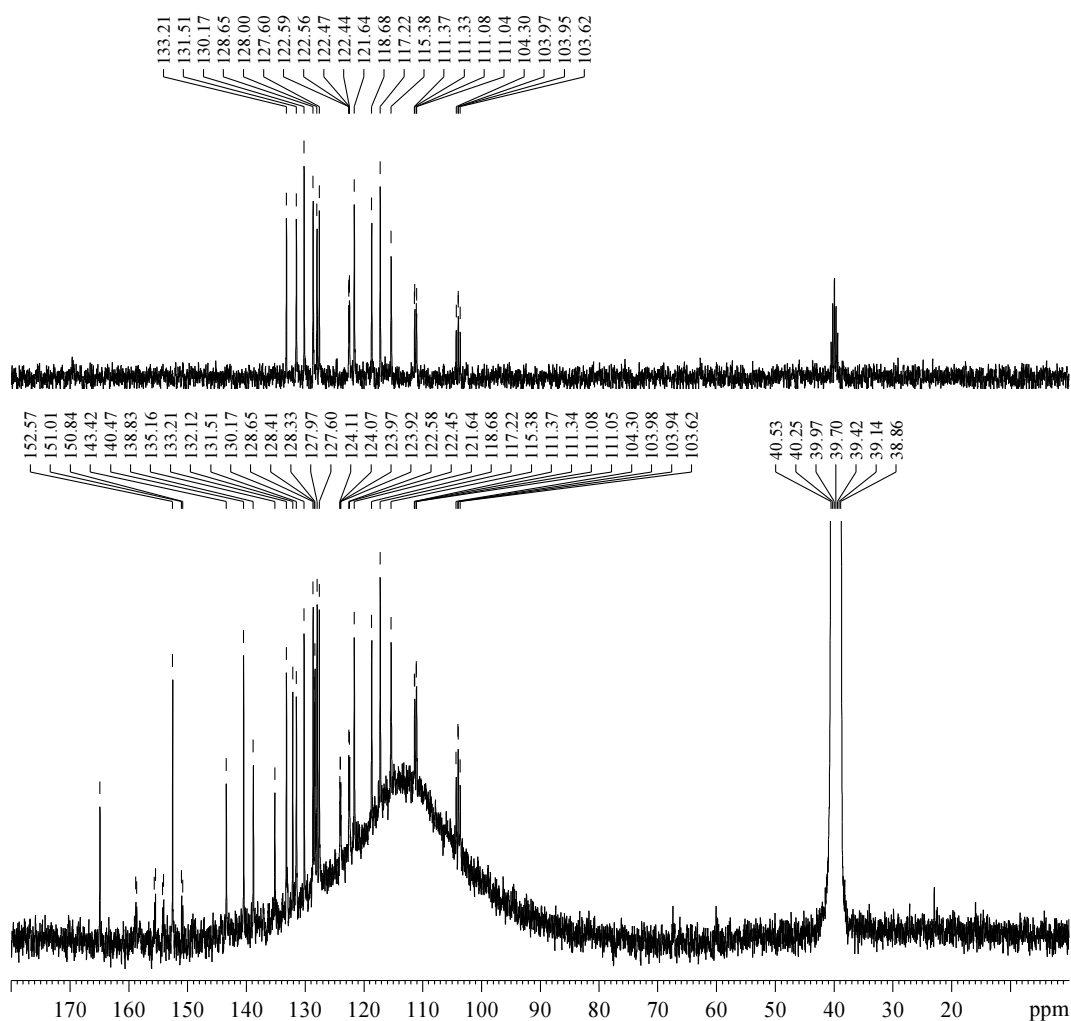


106. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta zqs-TOCSY spektruma; 2 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 70$ msec

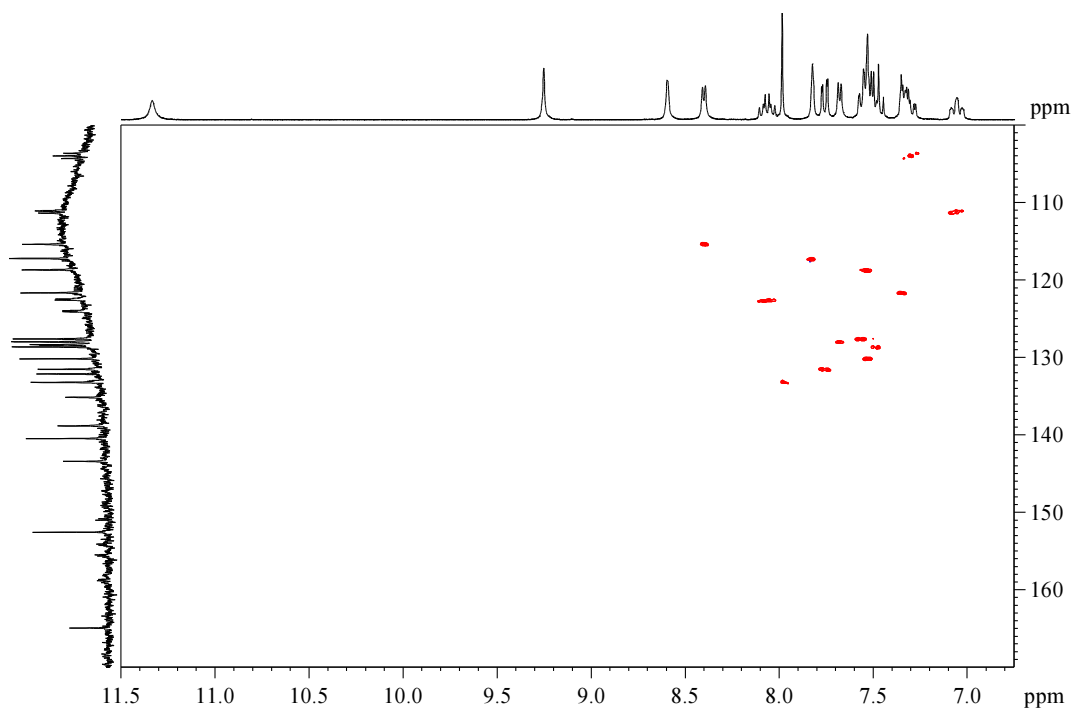


107. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta zqs-easy-ROESY spektruma; 8 scan * 192 kísérlet, $T_{\text{mix}} = 2 * 100$ ms \pm 5 %, $\theta = 54.7^\circ$, lineáris predikció és zéró töltés után digitális felbontás, 1.5 Hz/pont.

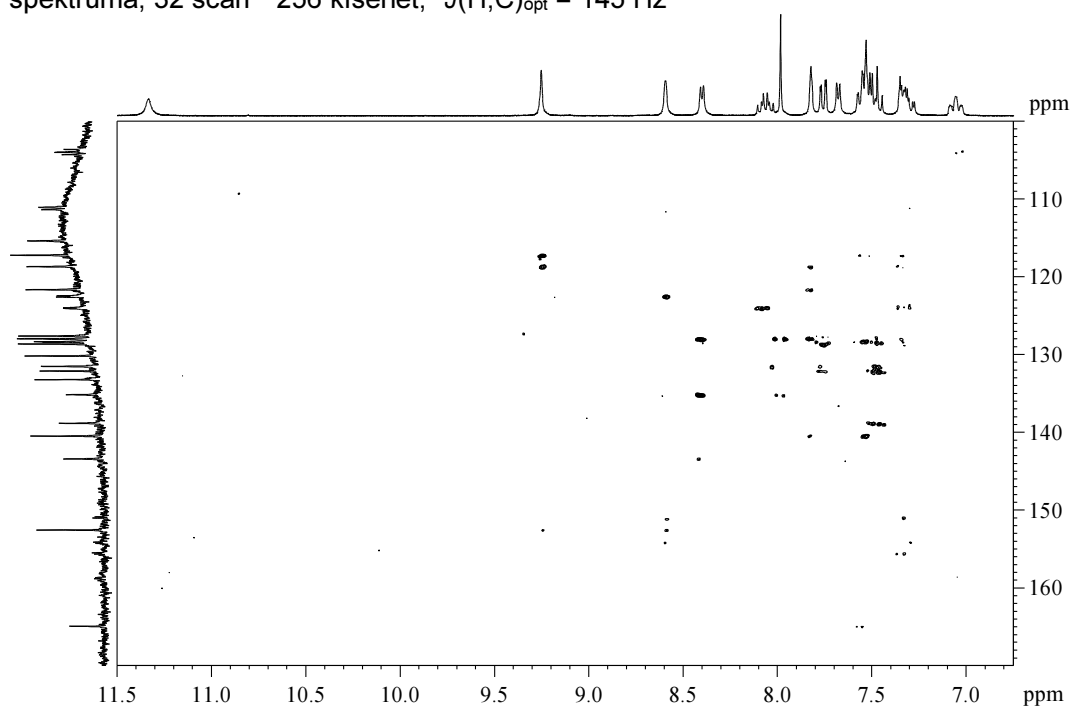
17c molekula spektrumában az imidazo-pirazin végtermékek esetén általában tapasztalt jelkiszélesedés a benzoil csoport *ortho* pozíciójában, a biciklus pirazin részének két jelén, valamint az amid csoport NH jelén nem lépett fel (104-111. ábra). A most tapasztalt szabályos viselkedés magyarázata az, hogy az *ortho* szubsztituens elektronegatív klór, valamint a biciklus imidazol gyűrűjének térközelségben lévő nitrogén atomja, mintegy kehelyként fogják közre az amid csoport hidrogén atomját. Ezzel az amid tautomerén is fellép egy energiacsökkenés, ami stabilizálja az amid konfigurációját és csökkentik a korábban elemzett, általában nem szokványos, tautomer lehetőségek kialakulásának valószínűségét. Lásd a 111. ábrán látható kitüntetett tautomert és konformert, vedd össze a 102. ábrán bemutatott tautomerekkel.



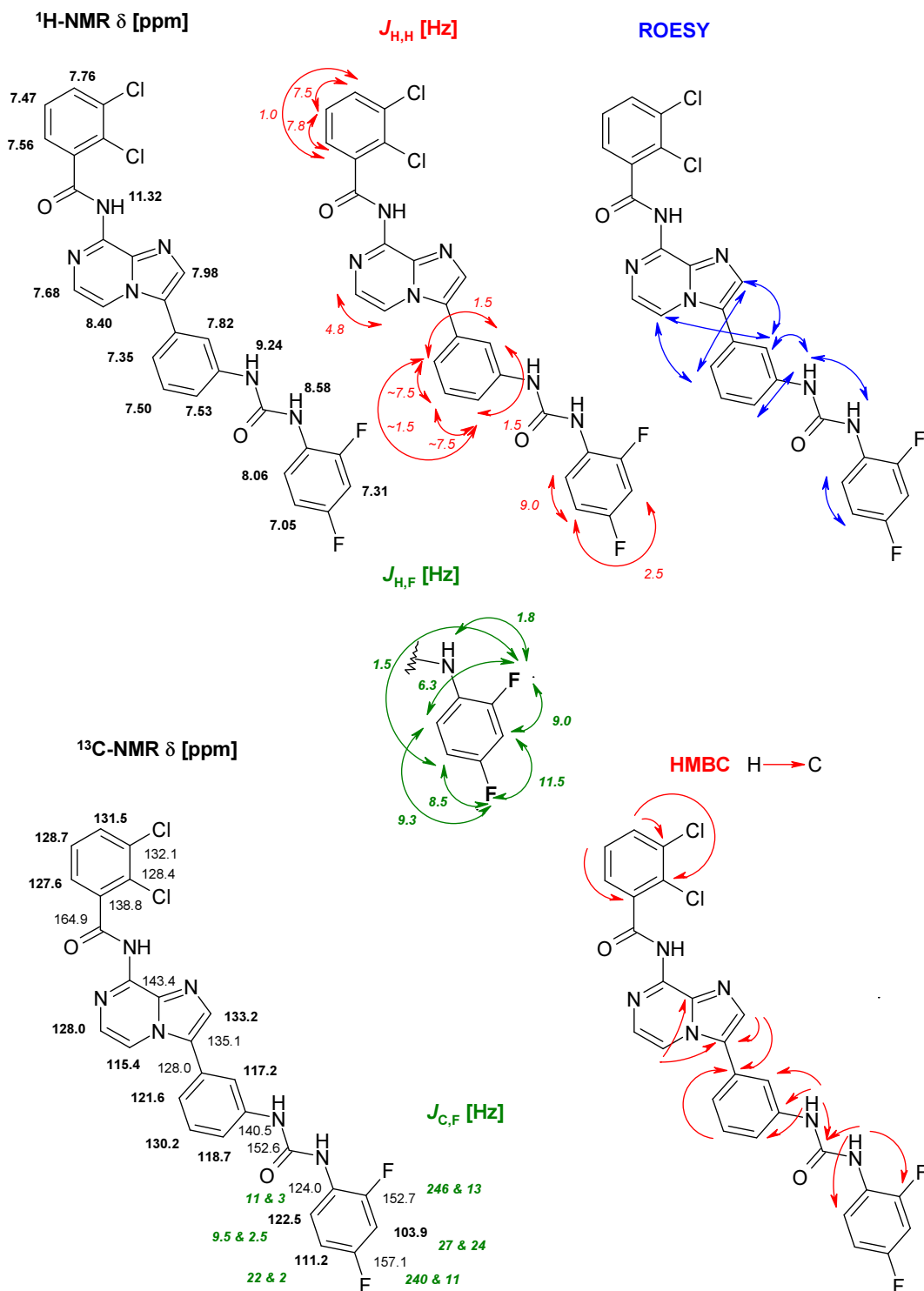
108. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta ^{13}C -NMR és DEPT-135 spektruma, hétvégi mérés pár 110 ezer illetve 16 ezer scan



109. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta multiplicitás-szerkesztett HSQC spektruma, 32 scan * 256 kísérlet, $^1J(\text{H,C})_{\text{opt}} = 145 \text{ Hz}$



110. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta HMBC spektruma, 64 scan * 256 kísérlet, $^nJ(\text{H,C})_{\text{opt}} = 7 \text{ Hz}$

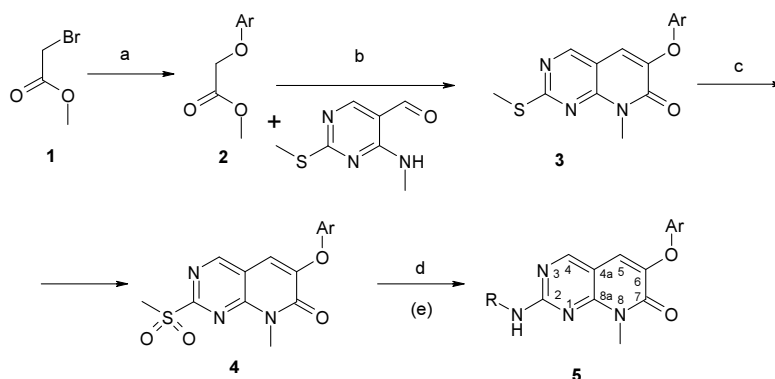


111. ábra. VIC31872 vegyület, RG1503 minta (17c számon a V. saját publikációban) NMR spektrumainak értelmezése. Teljes ¹H- és ¹³C-NMR jelhozrendelés adható, zqs-easy-ROESY korrelációk alapján az azonos mintázatú ¹H jelek is egyértelműen hozzárendelhetők, HMBC korrelációk alapján az összes kvaterner ¹³C jel is úgyszintén hozzárendelhető.

C. szekció Egy nem várt átrendeződés és egy konformációs mikroegyensúly feltérképezése

C.3. Irodalmi háttér - Kémiai előzmények

Publikált dolgozatunkban és benyújtott szabadalmi bejelentésünkben leírtuk, hogy a Vichem Kft-ben *Pamapimod* (CAS 449811-01-2) [103] és *R1487* (CAS 449808-64-4) [104] hatóanyagokkal analóg 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8-methyl-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on származékokat állítottunk elő és vizsgáltuk hatásukat diabétesz kezelésében [VI-VII]. A több éve folyó témába annak utolsó éveiben kapcsolódtam be. A végtermékeket a 112. ábrán látható, irodalomból [105] ismert reakcióséma szerint állították elő.



112. ábra. 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8-methyl-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on származékok előállítás.

a: szubsztituált fenol, *N*-metil-pirrolidon, K_2CO_3 , 6 óra, szobahőmérséklet;

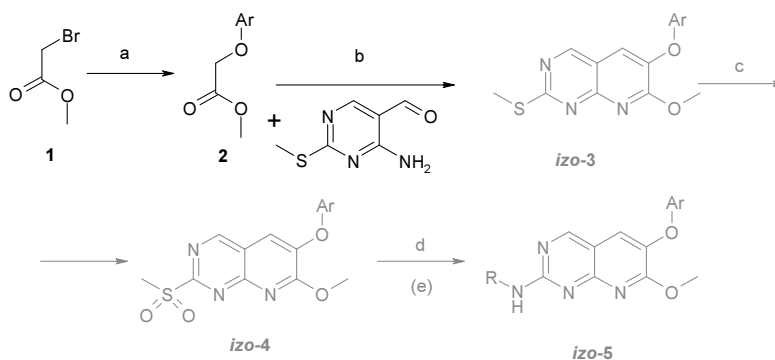
b: *N*-metil-pirrolidon, K_2CO_3 , 12 óra, 120 °C;

c: meta-klór-perbenzoesav, kloroform;

d: alkil-, aralkil vagy aril-amin, pirrolidin, piperidin;

e: esetleges védőcsoportok hidrolízise, szükség szerint sóképzés, izolálás

Később, mivel az irodalom számos **5** típusú *N*-metil származékot tartalmaz, metoxi származékról pedig csak elvéve számolnak be, tervezték szabadalmilag független 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8H-7-metoxi-pirido[2,3-d]pirimidin származékok előállítását is a 113. ábra szerint.



113. ábra. 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8H-7-metoxi-pirido[2,3-d]pirimidin származékok tervezett szintézise. Szürke színnel azok a reakciólépések, melyek nem az elképzelés szerint játszódtak le. Reakciókörülmények a 112. ábrán.

Mivel a kétféle szintézissor között körülbelül két év telt el, először örömmel tapasztalták, hogy termékek HPLC-MS-sel mért molekulatömege megfelel a vártnak, valamint $^1\text{H-NMR}$ spektrumában benne van a metoxi csoport várható kémiai eltolódásának megfelelő jel.

C.4. Módszerek

Én 2012-ben kapcsolódtam be a témába, amikor csatlakoztam a Vichem Kft csapatához, elődöm pedig ezzel egyidőben visszavonult. Akkorra a 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8-methyl-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on vegyületek irodalom szerinti célirányos előállítására már régen lezárult és áttértek a 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8H-7-metoxi-pirido[2,3-d]pirimidin származékok terv szerinti szintézisére. A legalább egy éve alkalmazott reakcióút bejáratottnak tűnt, magam is jópár „metoxi származék” szerkezetét hagytam jóvá csupán $^1\text{H-NMR}$ felvételük alapján. Később, különösen bonyolultabb amin oldalláncokat tartalmazó végtermékek esetében multiplicitás-szerkesztett HSQC és HMBC méréseket is végeztem, de a témához mindvégig a műszer könyvtárában található mérési módokat használtam, így ez dolgozatomban ezen szekciója módszerfejlesztést nem tartalmaz. A későbbiekben taglat mikroegyensúly felderítése érdekében hőmérsékletfüggő $^1\text{H-NMR}$ és zqs-NOESY [85] méréseket végeztem.

C.5. Eredmények

Egy kérdésessé vált szerkezet tisztázása

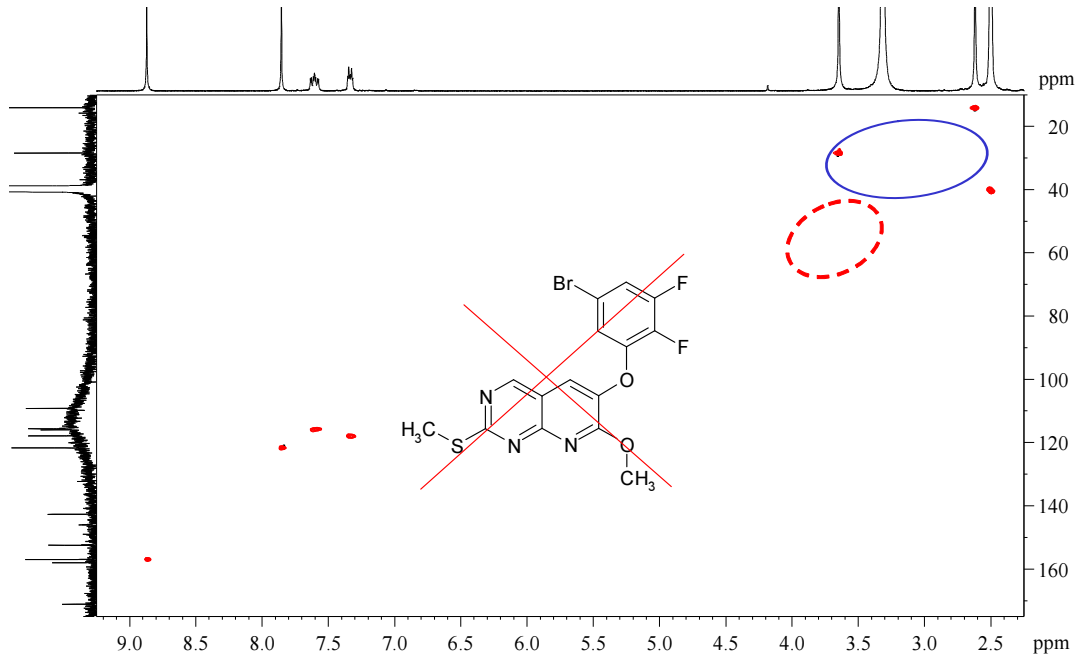
Egy bonyolultabb -R oldallánc spektroszkópiai tisztázása miatt felvett, ^{13}C -NMR információt is tartalmazó, HSQC mérés során ismertem fel, hogy a metoxi származékok előállítását célzó második reakcióút mégsem az elképzelésnek megfelelően játszódott le. A spektrum adatbankunkat átfésülve vált nyilvánvalóvá, hogy a tervezett metoxi végtermékek rendre azonosak az első reakcióséma szerint előállított *N*-metil termékekkel, a metoxi csoportnak feltételezett jel valójában mindig nitrogén atomhoz kapcsolódó metilcsoporttól eredt. A reakció során a metil csoport átvándorolt az oxigénről nitrogénre.

Az *izo-3* szerkezetként készített, de **3** szerkezetnek bizonyult, minta multiplicitás-szerkesztett HSQC spektrumát a 114., HMBC spektrumát a 115. ábrán mutatom be.

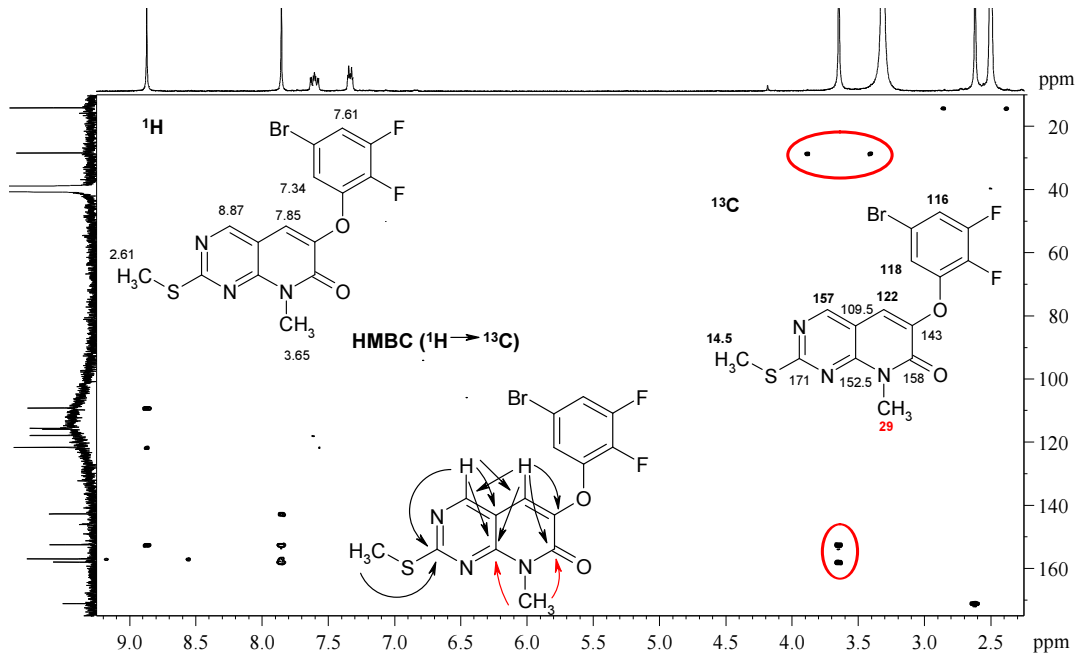
A felismerést követően a teljes addigi metoxi részprojektet felül kellett vizsgálni, mert egyetlen valódi metoxi származékot sem sikerült találnom.

Néhány metoxi származékot a 116. ábrán látható séma szerint sikerült előállítani. Az egyik *izo-3* vegyület HSQC és HMBC spektrumai, valamint a spektrumok értelmezése a 117. és 118. ábrán látható.

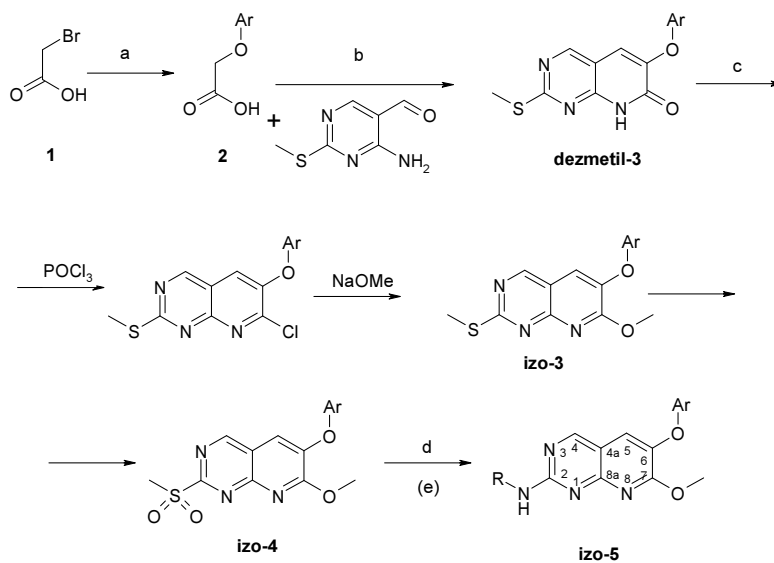
Mivel a biológiai vizsgálati célok voltak az elsődlegesek, bármennyire is érdekes lett volna, nem volt mód és kapacitás a metilvándorlás mechanizmusának mélyebb felderítésére. Végül a téma folytatása a preparatív munkát végző Greff Zoltán munkatársunk váratlan halála miatt abbamaradt. [XX]



114. ábra. Az *izo-3* szerkezetnek készített, de **3** szerkezetnek bizonyult minta HSQC spektruma. Piros szaggatott ellipszis mutatja egy metoxi csoport keresztcsúcsának várható helyét, míg kék ellipszis mutatja egy metilamino csoport jelének várható helyét. A metoxi csoport várható helyén nincs jel, a jel a metilamino csoport várható tartományának szélén található, mely tartomány a hidrogén dimenzióban átfed a metoxi jel várható tartományával, szén dimenzióban azonban elkülönül [106]



115. ábra. Az *izo-3* szerkezetnek szánva készített, de **3** szerkezetnek bizonyult minta HMBC spektruma. Piros ellipszisekkel kiemelve a metilamino csoportra jellemző heteronukleáris távolható csatolások keresztcsúcsai. A spektrumokba illesztett szerkezeti képleteken a jelek ^1H - és ^{13}C -NMR kémiai eltolódásai, valamint a HMBC spektrum keresztcsúcsainak értelmezése van feltüntetve.



116. ábra. Valóban metoxi származékok sikeres előállítása klórvegyületen keresztül.

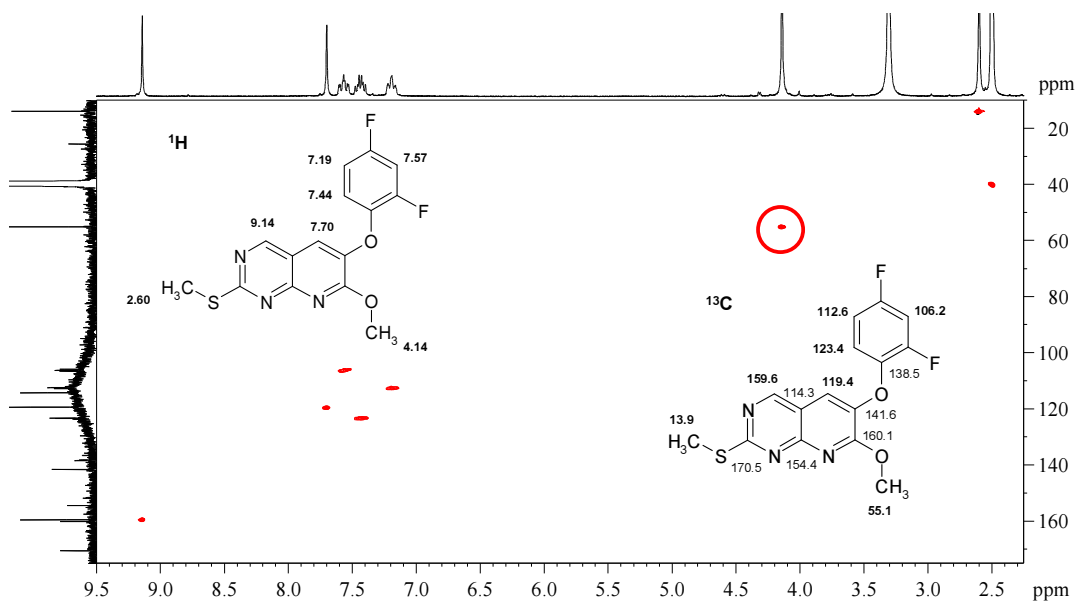
a: szubsztituált fenol, *N*-metil-pirrolidon, K_2CO_3 , 6 óra, szobahőmérséklet;

b: *N*-metil-pirrolidon, K_2CO_3 , 12 óra, 120 °C;

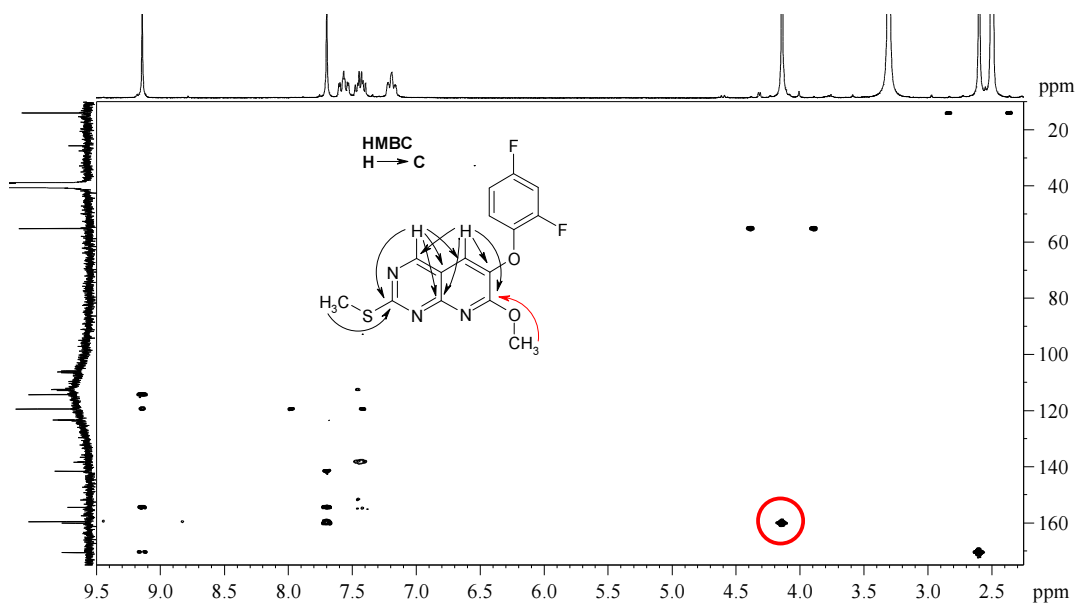
c: foszfor-oxi-klorid, majd nátrium-metilát
meta-klór-perbenzoesav

d: alkil-, aralkil vagy aril-amin, pirrolidin vagy piperidin

e: esetleges védőcsoportok hidrolízise, szükség szerint sóképzés, izolálás



117. ábra. *Izo-3* vegyület HSQC spektruma, valamint ^1H - és ^{13}C -NMR jelhozzárendelése. Pirossal kiemelve a szerkezet meghatározásában döntő korreláció.



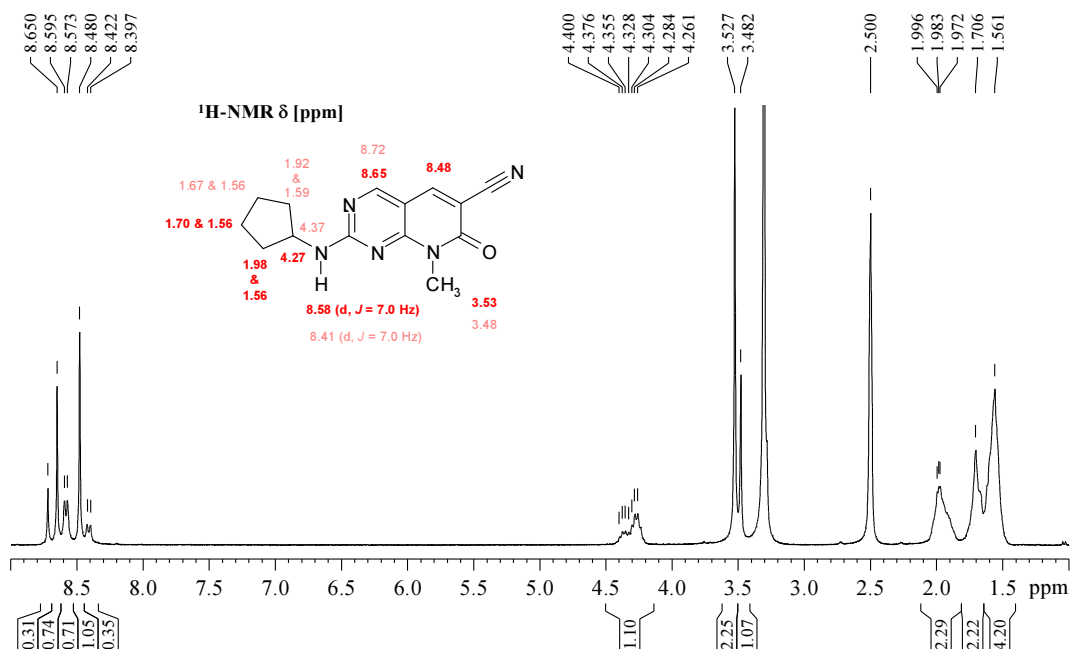
118. ábra. *Izo-3* vegyület HMBC spektruma, valamint a spektrum értelmezése. Pirossal kiemelve a szerkezet meghatározásában döntő korreláció.

C.6. Megbeszélés

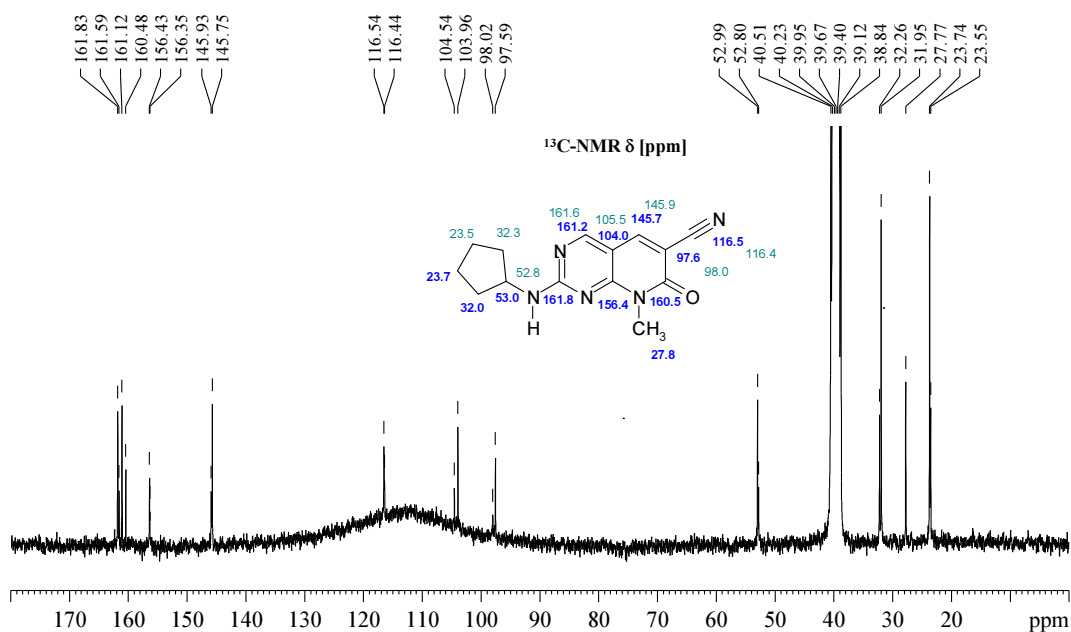
Egy jelsorozat-kettőződés felismerése

A 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8-methyl-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on (**5**, R = alkil) típusú végtermékek szobahőmérsékleten felvett ¹H-NMR spektrumaiban rendre két 70 : 30 arányú két jelsorozatot figyeltem meg. A két jelsorozat felfűtve egybeolvad, ami gátolt konformációs mozgásra utal. Ugyanez a jelenség figyelhető meg a 6-aril- és 6-ciano- származékok esetén is. A jelenség nem lép fel akkor, ha a 2-es pozíció szubsztituense dialkil-amino csoport vagy pirrolidin illetve piperidin. Ha a 2-es pozíció szubsztituense arilamino, akkor a jelenség szobahőmérsékleten csak egyes jelek kiszélesedésében nyilvánul meg, de minor jelsorozat nem ismerhető fel.

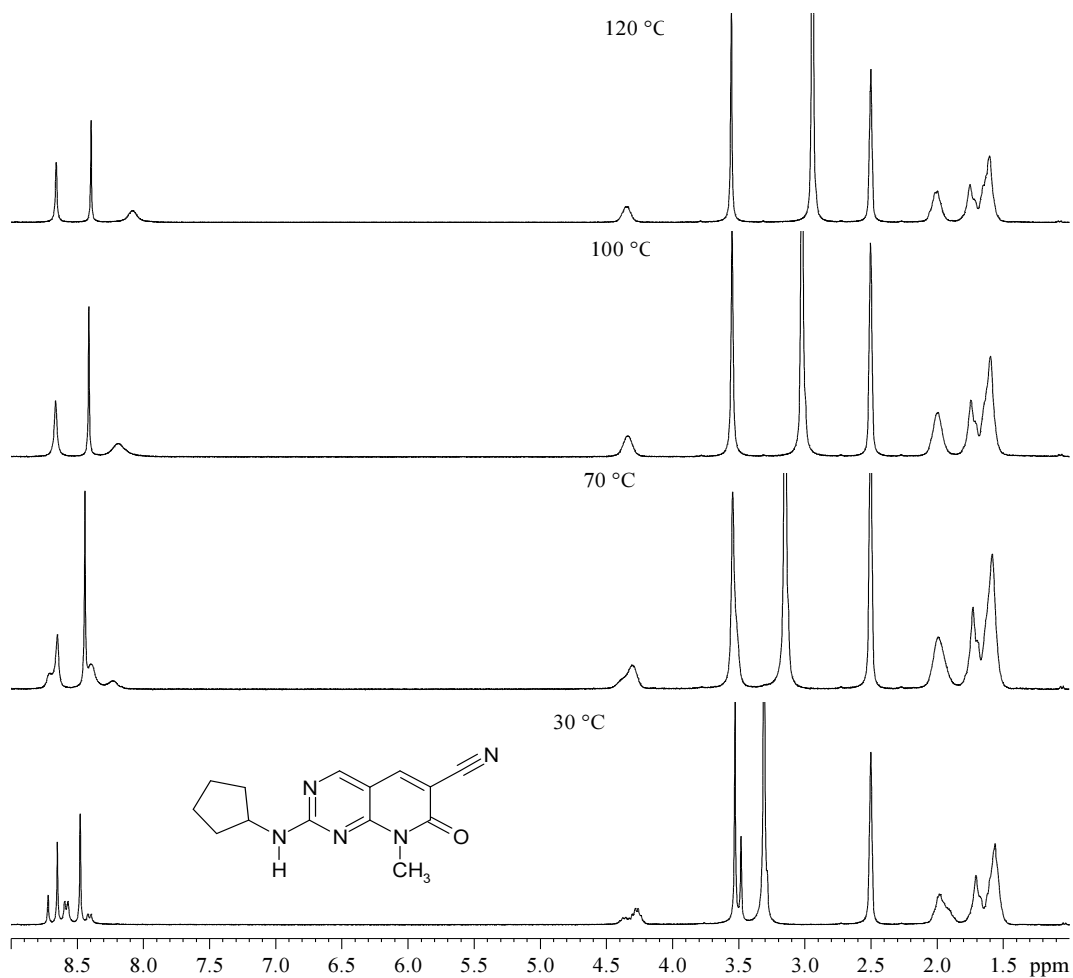
A jelenséget a minél egyszerűbb jelszerkezet érdekében olyan modellvegyület bemutatásával illusztrálom, ahol a 6-os pozíció szubsztituense ciano csoport, mely nem ad jelet az ¹H-NMR spektrumban [**VI-VII** és **XXI**]. A modellvegyület spektrumai a 119-124. ábrán láthatók.



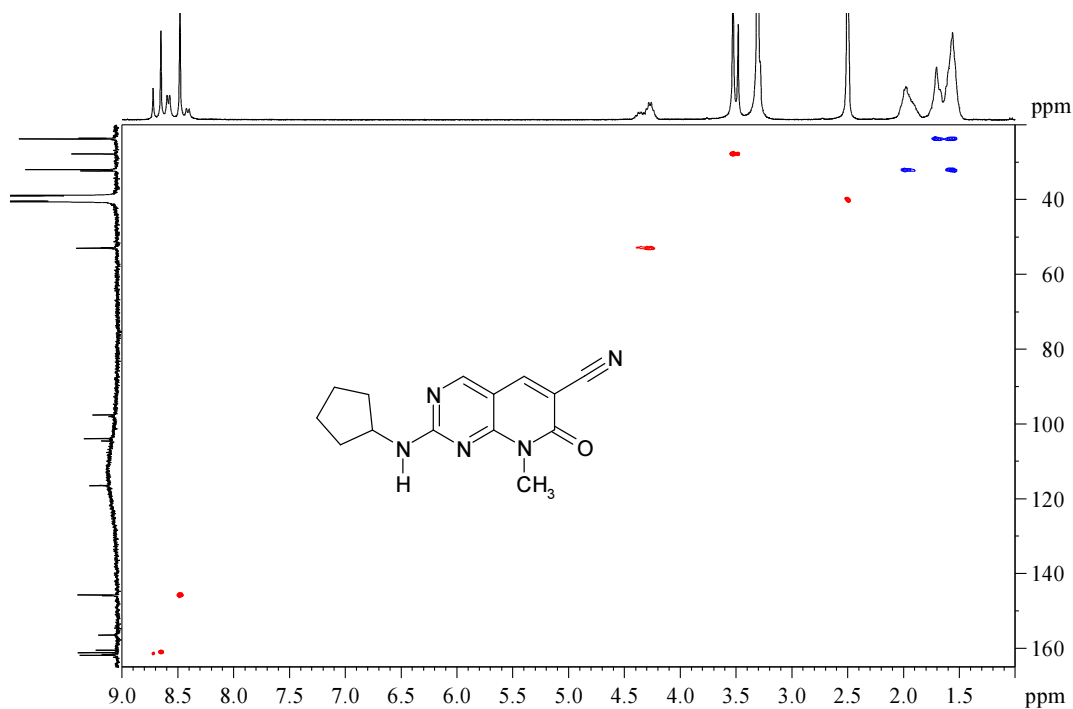
119. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on modellvegyület ¹H-NMR spektruma DMSO-*d*₆ oldószerben 30 °C-on, valamint a spektrum jelhozzárendelése. A fő jelsorozat spektrumadatai pirossal, a minor jelsorozat adatai narancsszínűvel szerepelnek.



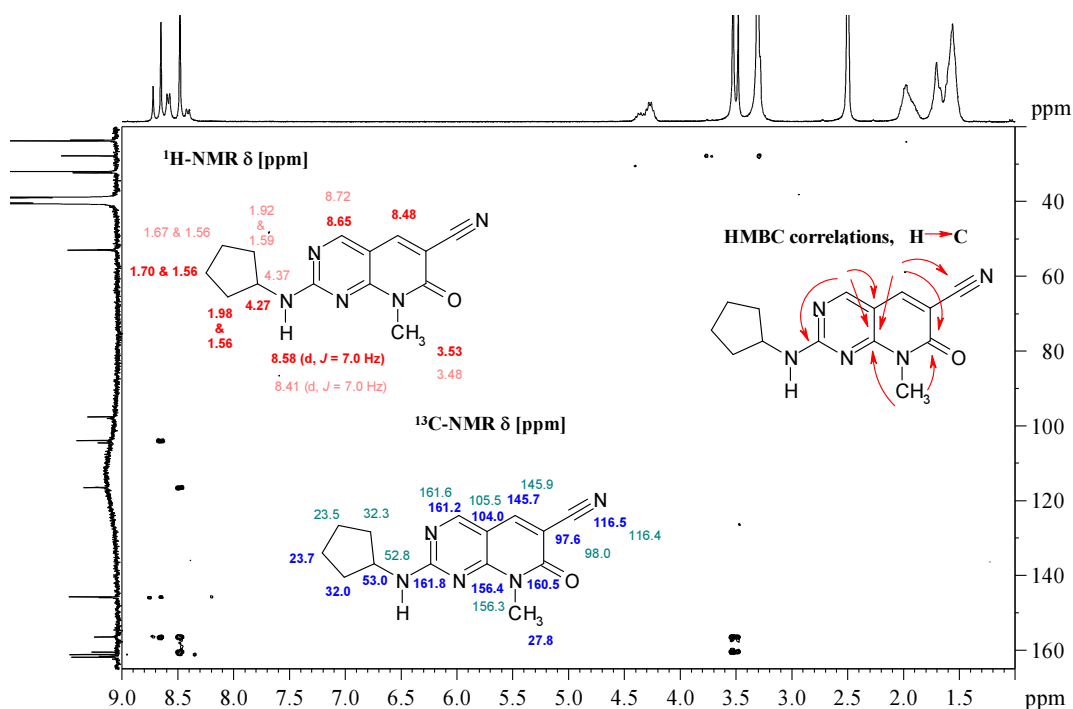
120. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on modellvegyület ¹³C-NMR spektruma DMSO-*d*₆ oldószerben 30 °C-on, valamint a spektrumok jelhozzárendelése. A spektrumon a fő jelsorozat spektrumadatai sötétkékkel, a minor jelsorozat adatai világoskékkel szerepelnek.



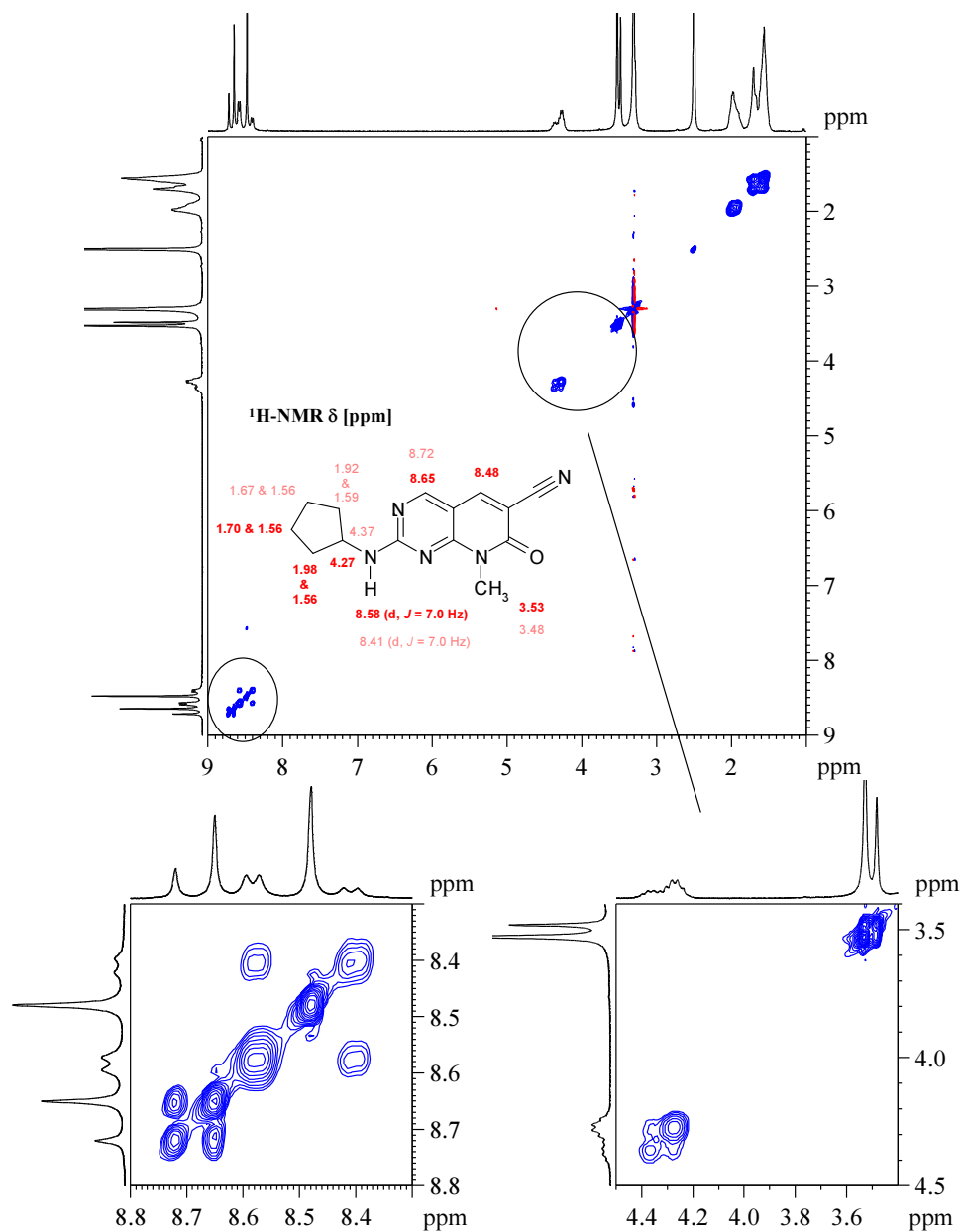
121. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on modellvegyület hőmérsékletfüggő ¹H-NMR spektrumsorozata DMSO-*d*₆ oldószerben. A két jelsorozat csatolási mintázata a fűtés során eltűnik, egybeolvadó, finomszerkezet nélküli széles jelek látszanak 70 °C-on, majd 120 °C-ig tovább fűtve egyetlen jelsorozatként élesedik.



122. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on modellvegyület multiplicitás-szerkesztett HSQC spektruma.



123. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on HMBC spektruma, a spektrumba illesztett szerkezeti képleteken feltüntetve a modellvegyület ¹H- és ¹³C-NMR jelhozzárendelése, valamint a HMBC spektrumban jelentkező heteronukleáris távolható csatolások értelmezése.

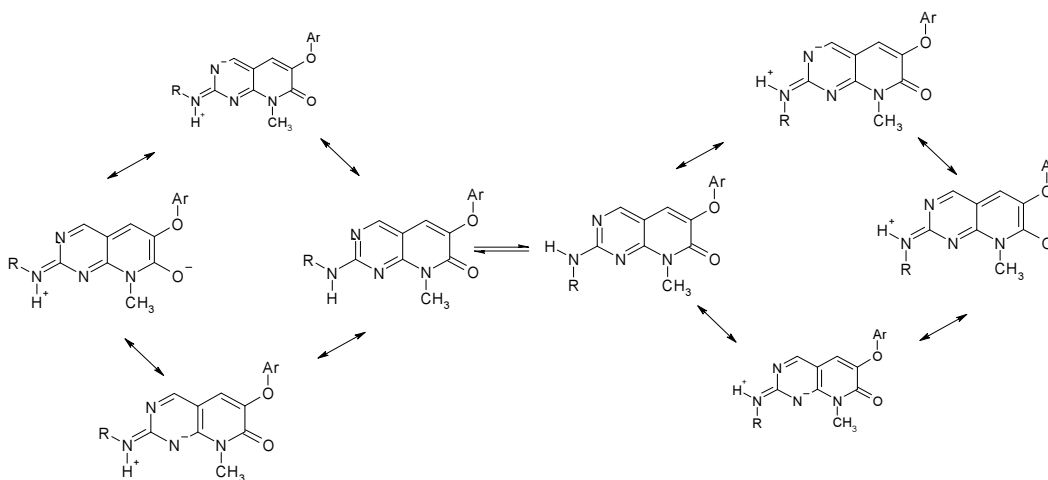


124. ábra. A 6-ciano-2-(ciklopentilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on modellvegyület NOESY (EXSY) ($T_{\text{mix}} = 250$ ms) spektruma, valamint kinagyított spektrumrészletei. Azon major-minor jelpárok között, melyek egymással csere folyamatban állnak, az átlóval azonos fázisú cserélődési keresztcsúcsok figyelhetők meg. Ugyanezek a jelpárok mutatják az egybeolvadás jelenségét a korábbi hőmérsékletfüggő spektrumsorozatban. Lásd 121. ábra

C.7. Következtetések - A jelsorozat-kettőződés hátterében álló gátolt forgás felderítése

A meglepő jelsorozat-kettőződés magyarázata az, hogy a vizsgált vegyületeknek léteznek ikerionos mezomer határszerkezetei, melyekben a központi biciklus 2-es pozíciójú szén atomja és a szubsztituens nitrogén atomja között kettős kötés van, a nitrogénhez kapcsolódó hidrogén atom pozitív töltést visel, a negatív töltést pedig a biciklus valamelyik elektronegatív atomja viseli. (125. ábra) A valós töltéseloszlás a lehetséges határszerkezetek által határolt térben egy dinamikus köztes állapot, az ikerionos szerkezetek figyelembevételével a 2-es helyzetű szén és a szubsztituens nitrogén atom közötti kötésnek részleges kettős kötés jellege van, mely miatt a szubsztituens forgása gátolt.

Egy állapot élettartama az NMR feloldási időnél legalább fél nagyságrenddel hosszabb, $DW=104 \mu\text{sec}$ feloldási idő esetén az állapot átlagos élettartamára való alsó becslésem fél msec. Ugyanakkor a ($\tau_{\text{mix}} = 250 \text{ ms}$) keverési idővel felvett NOESY (EXSY) felvételen a cserélődési keresztcsúcsok egyértelműek, így az állapot élettartamára való felső becslésként 250 msec adható.



125. ábra. A 6-ariloxi-2-(alkilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-on típusú vegyületek rotamer egyensúlya és a rotamerek lehetséges mezomer határszerkezetei.

A fent említett viselkedés volt jellemző a cikkben **12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 36, 37, 40, 47** sorszámokkal jelölt végtermékekre, ahol az R csoport rendre alkil illetve aralkil csoport volt.

Amikor az R csoport aril csoport volt (**15, 22, 27, 29, 34, 41, 44, 51** sorszámú vegyületek a cikkben), az aromás *orto* hidrogén atomok jelei adtak többé-kevésbé kiszélesedett jeleket a minta ¹H-NMR spektrumában. Ezen minták szobahőmérsékleten tapasztalt viselkedése nagyjából az előző csoport 70 °C-ra felfűtött állapotban tapasztalt viselkedésének felel meg.

A **33, 35, 38, 39, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 50** sorszámú végtermékek esetén, amikor az amino csoport terciér, nincs pozitív töltés viselésére alkalmas hidrogén atom az adott helyen a molekulában, a forgás teljesen szabad, ennek megfelelően egyetlen éles jelsorozat van a minta ¹H-NMR spektrumában.

8. Eredmények - tézispontok

1.

A heteronukleáris távolható csatolási állandók precíz mérésére alkalmas HSQMBC módszer fejlesztésébe kapcsolódtam be. A munkám eredménye a kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC módszerváltozat.

A HSQMBC módszer javasolt változata a több, egymástól független NMR-es műhelyben is fejlesztett HSQMBC módszer előnyös módosításait ötvözi. Egyik forrásból átvettem az adiabatikus pulzusokat, másik forrásból a G-BIRD CPMG szűrő blokkot, harmadik forrás javaslata volt a nagy kimenőteljesítményű kompozit CPMG elem, mely kevésbé érzékeny a kis kalibrálási pontatlanságokra, mint a korábbi megoldások, de ugyanakkor mérhetően fűti a mintát és a műszerelektronikát. A Kövér Katalinnal (Debreceni Egyetem) közösen továbbfejlesztett változatban saját javaslatom a kompozit CPMG elem kis kimenőteljesítménye az elektronika nagyobb biztonsága miatt, és a gradiens blanking kapcsoló áthelyezése a szebb jelalak érdekében. A beépített szűrőelemek javasolt kombinációja nem csökkenti a módszer érzékenységét, nem növeli a szükséges mérési időt, viszont robusztus, kalibrációs hibára illetve oparátorhibára kevésbé érzékeny módszerváltozatot eredményez. A módszerváltozat hatékonyságát a sztrichnin modellvegyületen végzett összehasonlító mérésekkel mutattam be. [I]

2.

Elkészítettem és teszteltem a kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG adiabatikus HSQMBC módszer szelektív 1D változatát is. [I]

3.

Vichem-ben végzett munkám során a HSQMBC módszer javasolt változatát sikeresen alkalmaztam különbözőképpen szubsztituált pirido-pirazin izomerek megkülönböztetésére. A módszert sikerrel alkalmaztam a Chinoin Zrt-ben végzett méréseim során, de azokról referált közlemény nem jelent meg. [II, III]

4.

Kezdetben korábbi munkahelyemen a Chinoín Zrt-ben, majd a Vichem Kft-ben, Batta Gyulával (Debreceni Egyetem) közösen fejlesztettük a zqs-easy-ROESY módszerváltozatot molekulán belüli ^1H - ^1H térközelségek és kémiai cserefolyamatok mérésére. A ROESY módszer egyik off-rezonancia változatába (easy-ROESY) építettem be a TOCSY és NOESY módszerváltozatokhoz leírt, adiabatikus invertálást és szimultán enyhe gradiens pulzust alkalmazó zéró-kvantum szűrő elemet. A javasolt zqs-easy-ROESY módszer szélesebb, a kismolekulákat is felölelő, molekulaméret-tartományban használható eredményesen, mint a korábbi ROESY módszerváltozatok. A módszer hatékonyságát kodein, sztrichnin és TT232 molekulákon végzett összehasonlító mérésekkel illusztráltam, a kodein és a sztrichnin esetén statisztikai vizsgálatokkal validáltam. [IV, VIII]

5.

A zqs-easy-ROESY módszerváltozat korábbi, fejlesztési verziója mindennapos használatban volt a Chinoín Zrt-ben végzett méréseim során, a publikált változat pedig jelenleg is mindennapos használatban van a Vichem Kft-ben. A módszerváltozatot eredményesen alkalmaztam imidazo-piridin és imidazo-pirazin alapvázat tartalmazó, biológiai vizsgálatra szánt végtermékek valamint hozzájuk vezető köztitermékek szerkezetvizsgálatában. [V]

6.

Tautomer egyensúlyt figyeltem meg imidazo-pirazin alapvázat tartalmazó biológiai vizsgálatra szánt végtermékek esetén.

Azt tapasztaltam, hogy az imidazo-pirazin alapvázat tartalmazó végtermék molekulák egy jól körülhatárolható régiójának ^1H -NMR jelei szélesek, míg az analóg imidazo-piridin származékok szabályosan viselkednek. A jelenség oka az, hogy a gyűrűrendszerben a benzoil-amidnak léteznek olyan nem szokványos tautomerjei, melyeket hidrogén híd stabilizál. Ehhez a stabilitáshoz szükség van az imidazo-pirazin gyűrű nitrogén atomjára. A szintetikus kísérleti tapasztalat azt mutatja, hogy amíg a benzoilezett imidazo-piridin tovább építhető Suzuki reakcióval, a benzoilezett imidazo-pirazinról a benzoil lehasad a Suzuki reakció körülményei között, így az elvileg egymással analóg szerkezetek kiépítésére eltérő szintézisutat kellett választani. A

benzoil csoport leválása összefüggésben van a hidrogénhidat tartalmazó tautomerek számottevő jelenlétével, molekulák $^1\text{H-NMR}$ spektrumában fellépő jelkiszéledést és az amid kötés instabilitását ez az anomális hidrogén híd okozza. Néhány vizsgált molekula $^1\text{H NMR}$ spektrumában ez a jelkiszéledés nem lép fel, ezek a molekulák olyan szubsztituenst tartalmaznak, ami az amid formát is stabilizálja. [V]

7.

Pirido-pirimidon magot tartalmazó végtermékek előállítása során az alapváz kialakításakor egy metil csoport nem várt vándorlását figyeltük meg és bizonyítottam NMR spektroszkópiai módszerekkel. Karbonsav-metilésztert alkalmazva reaktánsként, a metil csoportot a keletkezett termékben már nitrogén atomhoz kapcsolódva azonosítottam. [VI, VII]

8.

Pirido-pirimidon alapvázat és hozzá kapcsolódó alkilamino szubsztituenst tartalmazó végtermékek esetén egy alkilamino csoport forgása gátolt, emiatt a molekula NMR spektrumai két jelsorozatot tartalmaznak 70:30 arányban. Az amidok gátolt forgása gyakori és közismert jelenség, amin gátolt forgása viszont nagyon ritka, csak speciális kémiai környezetben fellépő jelenség.

A vizsgált molekulák NOESY spektrumában cserélődési keresztcsúcsok jelennek meg a két jelsorozat egymásnak megfelelő jelei között, felfűtve a mintát, az $^1\text{H-NMR}$ spektrumban látható két jelsorozat egybeolvad. A jelenség magyarázata az, hogy a valós szerkezetben és töltéeloszlásban szerepet játszanak olyan ikerionos mezomer határszerkezetek is, melyekben az amin nitrogén és a pirido-pirimidin gyűrű között kettős kötés van. Az eredő olyan szerkezet, ahol a biciklus és az amin nitrogén között részleges kettős kötés van. A gátolt forgáshoz szükség van a pirido-pirimidin gyűrű karbonil csoportjára is, analóg pirimidinek esetén a forgás teljesen szabad, egy jelsorozat van. Ugyancsak egy jelsorozat van terciér aminok esetén is. [VI, VII]

9. Összefoglalás

A távolható heteronukleáris csatolási állandók mérésére alkalmas CPMG-HSQMBC módszert fejlesztettem tovább. Az ismertett változat a nehéz magon adiabatikus invertáló és refókuszáló pulzusokat alkalmaz. Egyidejűleg alkalmazott kis kimenőtjelésű – ezért biztonságos - kompozit 180 fokos XY-16 CPMG pulzust vezettem be a hidrogén és a nehéz magon a heteronukleáris távolható csatolás kiépülési ideje alatt, hogy kiküszöböljem a homonukleáris csatolások egyidejű kiépülése következtében fellépő jelalak-torzulásokat. A javasolt pulzusszekvenciával felvett spektrumban tiszta abszorpciós antifázisú multipletként jelentkeznek a keresztcsúcsok, melyekből a keresett $^nJ_{XH}$ csatolási állandók könnyen és pontosan leolvashatók. A módszer alkalmazhatóságát a sztrichnin modellvegyületen demonstráltam. A módszer szelektív egydimenziós változatát is kifejlesztettem és teszteltem. A módszert sikeresen alkalmaztam pirido-pirazin származékok különbözőképpen helyettesített izomer származékainak megkülönböztetésére.

Hidrogén-hidrogén atomtávolságok és lassú kémiai cserefolyamatok mérésére alkalmas off-rezonancia ROESY módszerváltozatot fejlesztettem. A javasolt változat adiabatikus rámpapulzusokat használ a mágneszettség alá- illetve föléhangolt off-rezonancia állapotba történő ki-, majd onnan visszavezetésére. A nem kívánatos zérókvantum effektusokat adiabatikus invertáló és vele egyidejűleg alkalmazott gradiens pulzuspár nyomja el. A bemutatott módszer tiszta abszorpciós fázisú, megbízhatóan integrálható keresztcsúcsokat eredményez, alkalmazhatóságát sztrichnin, kodein és TT232 modellvegyületek mérésével demonstráltam. A módszer szelektív egydimenziós változatát is kifejlesztettem és teszteltem. A módszert sikeresen alkalmaztam imidazo[1,2-a]piridin és imidazo[1,2-a]pirazin származékok szerkezetvizsgálata során. Az imidazo[1,2-a]pirazin származékok vizsgálata során egy nem várt tautomer egyensúlyt figyeltem meg, mely kihatással van a vegyület reakcióképességére is.

Nem várt metil-csoport vándorlást figyeltem meg pirido-pirimidon gyűrűrendszer kialakítása során, amikor 4-amino-2-metilszulfanil-pirimidin-5-karbaldehidet reagáltattak különbözőképpen helyettesített ariloxiecetsav metilészter származékokkal. A kiindulási metilészter metil csoportja a termékben nitrogén atomhoz kapcsolódva jelent meg. Alkil-aril szekunder aminok gátolt forgásának speciális esetét figyeltem meg.

10. Summary

A modified version of CPMG-HSQMBC pulse scheme is presented for the measurement of long-range heteronuclear coupling constants. The method implements adiabatic inversion and refocusing pulses on the heteronucleus. Low-power composite 180° XY-16 CPMG pulse train is applied on both proton and X nuclei during the evolution of long-range couplings to eliminate phase distortions due to co-evolution of homonuclear proton–proton couplings. The pulse sequence yields pure absorption antiphase multiplets allowing precise and direct measurement of the $^nJ_{XH}$ coupling constants regardless from the size of the proton-proton couplings. The applicability of the method is demonstrated using strychnine as a model compound. The selective 1D version of the method is also presented. The method was used to distinguish between isomers of pyrido-pyrazine derivatives.

A robust version of the off-resonance ROESY pulse scheme is suggested for the measurement of proton–proton distances or slow chemical exchange in small to medium-sized molecules. The method implements adiabatic ramps to establish a pair of opposite frequency off-resonance spin lock fields as well as adiabatic inversion pulses with simultaneous gradients for efficient zero-quantum suppression. The amended pulse sequence yields pure absorption crosspeaks and works safely for small to medium-sized molecules. The applicability of the method has been demonstrated using small, rigid molecules (strychnine and codeine) and was also applied for a cyclic peptide TT232. The one-dimensional (selective) version of the new method is also powerful for measuring selected pair-wise interactions and distance determination. The method was used for structure elucidation of imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives. During the investigation of the imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives a tautomeric equilibrium was observed, which is in correlation with the different reactivity of the imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrazine derivatives.

Unexpected methyl group migration was observed during the formation of pyrido-pyrimidone core structure reacting 4-amino-2-methylsulfanyl-pyrimidine-5-carbaldehyde with different aryloxyacetic acid methylesters. A special case of an unexpected restricted rotation of alkyl-aryl secondary amines was observed and discussed.

11. Irodalomjegyzék

1. Purcell EM, Torrey HC, Pound RV. (1946) Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.*, 69: 37-38.
2. Bloch F, Hansen WW, Packard M. (1946) Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 69: 127
3. Bloch F. (1946) Nuclear Induction. *Phys. Rev.*, 70: 460-474.
4. Bloch F, Hansen WW, Packard M. (1946) The Nuclear Induction Experiment. *Phys. Rev.*, 70: 474-485.
5. Arnold JT, Dharmatti SS, Packard ME. (1951) Chemical Effects on Nuclear Induction Signals from Organic Compounds. *J. Chem. Phys.*, 19: 507.
6. Jeener J. (1971) Ampere International Summer School, Basko Polje, Yugoslavia, presentation
7. Kessler H, Gehrke M, Griesinger C. (1988) Two-Dimensional NMR Spectroscopy: Background and Overview of the Experiments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27: 490-536.
8. Ernst RR. (1992) Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31: 805-823.
9. Parella T. (1996) High-Quality 1D Spectra by Implementing Pulsed-Field Gradients as the Coherence Pathway Selection Procedure. *Magn. Reson. Chem.*, 34: 329-347.
10. Wüthrich K. (2003) NMR Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules. *Bioscience Reports*, 23: 119-168.
11. Lipinsky CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23: 3-25.
12. Lemieux RU, Kullnig RK, Moir RY. (1958) The Configurations of the 3-Methoxycyclohexene Oxides. A Novel Application of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy to the Determination of Structure and Configuration. *J. Am. Chem. Soc.*, 80: 2237-2242.
13. a) Karplus M. (1959) Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J. Chem. Phys.*, 30: 11-15
b) Karplus M. (1963) Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2870-2871.

14. Haasnoot CAG, de Leeuw FAAM, Altona C. (1979) The relationship between proton-proton NMR coupling constants and substituent electronegativities-I, an empirical generalization of the Karplus equation. *Tetrahedron*, 36: 2783-2792.
15. Navarro-Vásquez A, Cobas JC, Sardina FJ, Casanueva J, Díez E. (2004) Mestre-J, A Graphical Tool for the Prediction of Vicinal Proton-Proton $^3J_{\text{HH}}$ Coupling Constants. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 44: 1680-1685.
16. a) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-03-jcoupl.htm>
b) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-04-2j.htm>
c) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/05-hmr-05-3j.htm>
d) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/h-data/h-coupling.htm>
megtekintve 2019. dec. 11-én
17. Bifulco G, Dambruoso P, Gomez-Paloma L, Roiccio R. (2007) Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods, *Chem. Rev.*, 107: 3744-3779.
18. a) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/06-cmr-05-1jch.htm>
b) <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/10-cdata-05-jch.htm>
megtekintve 2019. dec. 11-én
19. <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/06-cmr-06-2jch.htm>
megtekintve 2019. dec. 11-én
20. Ippel JH, Wijrnenga SS, de Jong R, Heus HA, Hilbers CW, de Vroom E, van der Marel GA, van Boom JH. (1996) Heteronuclear Scalar Couplings in the Bases and Sugar Rings of Nucleic Acids: Their Determination and Application in Assignment and Conformational Analysis. *Magn. Reson. Chem.*, 34: 156-176.
21. Tvaroska I, Taravel FR. (1995) Carbon-proton coupling constants in the conformational analysis of sugar molecules. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 51: 15-61.
22. Vogeli U, von Philipsborn W. (1975) Vicinal C,H Spin Coupling in Substituted Alkenes, Stereochemical Significance and Structural Effects. *Org. Magn. Reson.*, 7: 617-627.
23. Mulloy B, Frenkiel TA, Davies DB. (1988): Long-range carbon—proton coupling constants: Application to conformational studies of oligosaccharides. *Carbohydr. Res.*, 184: 39-46.

24. Tvaroska I, Hricovini M, Petrakova E. (1989) An attempt to derive a new Karplus-type equation of vicinal proton-carbon coupling constants for C-O-C-H segments of bonded atoms. *Carbohydr. Res.*, 189: 359-362.
25. Cloran F, Carmichael I, Serianni AS. (1999) Density Functional Calculations on Disaccharide Mimics: Studies of Molecular Geometries and Trans-*O*-glycosidic $^3J_{\text{COCH}}$ and $^3J_{\text{COCC}}$ Spin-Couplings. *J. Am. Chem. Soc.*, 121: 9843-9851.
26. Anderson JE, Ijeh AI. (1994) Eclipsed ground-state conformations for methoxycyclohexanes with adjacent methyl-group substitution. An NMR criterion and molecular mechanics calculations. *J. Chem. Soc., Perkin 2*, 1994: 1965-1967.
27. Tvaroska I, Mazeau K, Blanc-Muesser M, Lavaitte S, Driguez H, Taravel FR. (1992) Karplus-type equation for vicinal carbon-proton coupling constants for the C-S-C-H pathway in 1-thioglycosides. *Carbohydr. Res.*, 229: 225-231.
28. Aydin R, Günther H. (1990) ^{13}C , ^1H spin-spin coupling. X—Norbornane: A reinvestigation of the Karplus curve for $^3J(^{13}\text{C}, ^1\text{H})$. *Magn. Reson. Chem.*, 28: 448-457.
29. de Marco A, Llinás M. (1979) Complete assignment of carbon signals in a stereospecific peptide via selective and single off-resonance Proton decoupling experiments. Analysis of the carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum of alumichrome at 67.88 MHz. *Biochemistry*, 18: 3846-3854.
30. Contreras RH, Peralta JE. (2000) Angular dependence of spin-spin coupling constants. *Progr. Nuc. Magn. Reson. Spectr.*, 37: 321-425.
31. Marquez BL, Gerwick WH, Williamson RT. (2001) Survey of NMR experiments for the determination of $^nJ(\text{C},\text{H})$ heteronuclear coupling constants in small molecules. *Magn. Reson. Chem.*, 39: 499-530.
32. Nath N, Suryaprakash L, Suryaprakash N. (2012) Measurement and Applications of Long-Range Heteronuclear Scalar Couplings: Recent Experimental and Theoretical Developments. *Chem. Phys. Chem.*, 13: 645-660.
33. Parella T, Espinosa TJF. (2013) Long-range proton-carbon coupling constants: NMR methods and applications. *Progr. Nuc. Magn. Reson. Spectr.*, 73: 17-55.
34. Keeler J, Neuhaus D, Titman JJ. (1988) A convenient technique for the measurement and assignment of long-range carbon-13 proton coupling constants. *Chem. Phys. Lett.*, 146: 545-548.

35. Titman JJ, Neuhaus D, Keeler J. (1989) Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.*, 85: 111-131.
36. Richardson JM, Titman JJ, Keeler J, Neuhaus D. (1991) Assessment of a Method for the Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.*, 93: 533-553.
37. Edden RAE, Keeler J. (2004) Development of a method for the measurement of long-range ^{13}C - ^1H coupling constants from HMBC spectra. *J. Magn. Reson.*, 166: 53-68.
38. Willker W, Leibfritz D. (1995) Determination of heteronuclear long-range H,X coupling constants from gradient-selected HMBC spectra. *Magn. Reson. Chem.*, 33: 632-638.
39. Furihata K, Seto H. (1999) *J*-Resolved HMBC, a new NMR technique for measuring heteronuclear long-range coupling constants. *Tetrahedron Lett.*, 40: 6271-6275.
40. Meissner A, Sørensen O. (2001) Measurement of $J(\text{H,H})$ and long-range $J(\text{X,H})$ coupling constants in small molecules. Broadband XLOC and *J*-HMBC. *Magn. Reson. Chem.*, 39: 49-52.
41. Findeisen M, Berger S. (2003) A new technique for differentiating between $^2J(\text{C,H})$ and $^3/4J(\text{C,H})$ connectivities. *Magn. Reson. Chem.*, 41: 431-434.
42. Furihata K, Tashiro M, Seto H. (2009) Selective *J*-resolved HMBC, an efficient method for measuring heteronuclear long-range coupling constants. *Magn. Reson. Chem.*, 47: 814-818.
43. Furihata K, Tashiro M, Seto H. (2011) BIRD-*J*-resolved HMBC and BIRD-high-resolution HMBC pulse sequences for measuring heteronuclear long-range coupling constants and proton-proton spin coupling constants in complicated spin systems. *Magn. Reson. Chem.*, 49: 53-58.
44. Furihata K, Tashiro M. (2012) Selective COSY-*J*-resolved-HMBC, a new method for improving sensitivity of cross peaks of methine proton signals attached to a methyl group. *Magn. Reson. Chem.*, 50: 409-414.
45. Bax A. (1984) Structure Determination and Spectral Assignment by Pulsed Polarization Transfer via Long-Range ^1H - ^{13}C Couplings. *J. Magn. Reson.*, 75: 314-318

46. Hricovini M, Liptaj T. (1989) Measurement of Long-Range Proton-Carbon Coupling Constants in Medium-Sized Molecules. *Magn. Reson. Chem.*, **27**: 1052-1056.
47. Kurz M, Schmieder P, Kessler H. (1991) HETLOC, an Efficient Method for Determining Heteronuclear Long-Range Couplings with Heteronuclei in Natural Abundance. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**: 1329-1331.
48. Schmieder P, Kurz M, Kessler H. (1991) Determination of heteronuclear long-range couplings to heteronuclei in natural abundance by two- and three-dimensional NMR spectroscopy, *J. Biomol. NMR*, **1**: 403-420.
49. Uhrin D, Batta Gy, Hruby V, Barlow PN, Kövér KE. (1998) Sensitivity- and Gradient-Enhanced Hetero (ω_1) Half-Filtered TOCSY Experiment for Measuring Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *J. Magn. Reson.*, **130**: 155-161.
50. Koźmiński W, Nanz D. (1997) HECADE: HMQC- and HSQC-Based 2D NMR Experiments for Accurate and Sensitive Determination of Heteronuclear Coupling Constants from E.COSY-Type Cross Peaks. *J. Magn. Reson.*, **124**: 383–392.
51. Koźmiński W, Nanz D. (2000) Sensitivity Improvement and New Acquisition Scheme of Heteronuclear Active-Coupling-Pattern-Tilting Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, **142**: 294-299.
52. Krishnamurthy VV. (1996) Excitation-Sculptured Indirect-Detection Experiment (EXSIDE) for Long-Range CH Coupling-Constant Measurement. *J. Magn. Reson., Series A* **121**: 33-41.
53. Marek R, Králík L, Sklenař V. (1997): Gradient-Enhanced HSQC Experiments for Phase-Sensitive Detection of Multiple Bond. Interactions *Tetrahedron Letters*, **38**: 665-668.
54. Williamson RT, Márquez BL, Gerwick WH, Kövér KE (2000) One- and two-dimensional gradient-selected HSQMBC NMR experiments for the efficient analysis of long-range heteronuclear coupling constants. *Magn. Reson. Chem.*, **38**: 265-273
55. Williamson RT, Boulanger A, Vulpanovici A, Roberts MA, Gerwick WH. (2002) Structure and Absolute Stereochemistry of Phormidolide, a New Toxic Metabolite from the Marine *Cyanobacterium Phormidium* sp. *J. Org. Chem.*, **67**: 7927-7936.

56. Köck M, Kerssebaum R, Bermel W. (2003) A broadband ADEQUATE pulse sequence using chirp pulses. *Magn. Reson. Chem.*, 41: 65-69.
57. Koskela H, Kilpeläinen I, Heikkinen S. (2003) LR-CAHSQC: an application of a Carr–Purcell–Meiboom–Gill-type sequence to heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 164: 228-232.
58. Carr HY, Purcell EM. (1954) Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Phys. Rev.*, 94: 630–638.
59. Meiboom S, Gill D (1958) Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Rev. Sci. Instrum.*, 29: 688–691.
60. Koskela H, Kilpeläinen I, Heikkinen S. (2004) CAGEBIRD: improving the GBIRD filter with a CPMG sequence. *J. Magn. Reson.*, 170: 121-126.
61. Lacerda V, da Silva GVJ, Constantino MG, Tormena CF, Williamson RT, Márquez BL. (2006) Long-range J_{CH} heteronuclear coupling constants in cyclopentane derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, 44: 95-98.
62. Kövér KE, Batta Gy, Fehér K. (2006) Accurate measurement of long-range heteronuclear coupling constants from undistorted multiplets of an enhanced CPMG-HSQMBC experiment. *J. Magn. Reson.*, 181: 89-97.
63. Kobzar K, Luy B. (2007) Analyses, extensions and comparison of three experimental schemes for measuring ($^nJ_{CH} + D_{CH}$)-couplings at natural abundance. *J. Magn. Reson.*, 186: 131-141.
64. Gil S, Espinosa JF, Parella T. (2010): IPAP–HSQMBC: Measurement of long-range heteronuclear coupling constants from spin-state selective multiplets. *J. Magn. Reson.*, 207: 312-321.
65. Gil S, Espinosa JF, Parella T. (2011) Accurate measurement of small heteronuclear coupling constants from pure-phase α/β HSQMBC cross-peaks. *J. Magn. Reson.*, 213: 145-150.
66. Saurí J, Parella T, Espinosa JF. (2013) CLIP-HSQMBC: easy measurement of small proton–carbon coupling constants in organic molecules. *Org. Biomol. Chem.*, 11: 4473-4478.
67. Saurí J, Parella T. (2013) On the interference of $J(HH)$ modulation in HSQMBC-IPAP and HMBC-IPAP experiments. *Magn. Reson. Chem.*, 51: 509-516.

68. Castanar L, Saurí J, Williamson RT, Virgili A, Parella T. (2014): Pure In-Phase Heteronuclear Correlation NMR Experiments. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53: 8379–8382.
69. Tímári I, Kaltschnee L, Kolmer A, Adams RW, Nilsson M, Thiele CM, Morris GA, Kövér KE. (2014) Accurate determination of one-bond heteronuclear coupling constants with “pure shift” broadband proton-decoupled CLIP/CLAP-HSQC experiments. *J. Magn. Reson.*, 239: 130–138.
70. Tímári I, Szilágyi L, Kövér KE. (2015) PSYCHE CPMG–HSQMBC: An NMR Spectroscopic Method for Precise and Simple Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants. *Chem. Eur. J.*, 21: 1-5.
71. Tímári I, Illyés TZ, Adams RW, Nilsson M, Szilágyi L, Morris GA, Kövér KE. (2015) Precise Measurement of Long-Range Heteronuclear Coupling Constants by a Novel Broadband Proton–Proton-Decoupled CPMG-HSQMBC Method. *Chem. Eur. J.*, 21: 3472-3479.
72. Glanzer S, Kunert O, Zangger K (2016) Determination of unresolved heteronuclear scalar coupling constants by J(up)-HSQMBC. *J. Magn. Reson.*, 268: 88-94.
73. a) Jeener J, Meier JB, Bachmann P, Ernst RR. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *J. Chem. Phys.*, 71, 4546-4553.
b) Kumar A, Ernst RR, Wüthrich K. (1980) A two-dimensional nuclear Overhauser Enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95: 1-6.
74. Neuhaus D, Williamson M. The nuclear Overhauser effect in structural and conformational analysis. VHC Publishers, Inc., New York, 1989.
75. Bothner-By AA, Stephens RL, Lee J-M, Warren CD, Jeanloz RW. (1984) Structure Determination of a Tetrasaccharide: Transient Nuclear Overhauser Effects in the Rotating Frame. *J. Am. Chem. Soc.*, 106: 811-813.
76. Bax A, Davis DG. 1985) Practical Aspects of Two-Dimensional Transverse NOE Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 63: 207-213.
77. Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV (1948) Relaxation Effects in Nuclear Magnetic Resonance Absorption. *Phys Rev.*, 73: 679-746.

78. <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/nmr/08-tech-01-relax.htm>
megtekintve 2019. dec. 11-én
79. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/techniques/other/t1t2/t1t2.html#t2>
megtekintve 2019. dec. 11-én
80. Otter A, Kotovych G. (1988) The solution conformation of the synthetic tubulin fragment Ac-tubulin- α (430-441)-amide based on two-dimensional ROESY experiments. *Can. J. Chem.*, 68: 1814-1820.
81. Bull TE. (1988) ROESY Relaxation Theory. *J. Magn. Reson.*, 8:, 470-481.
82. Hwang TL, Shaka AJ. (1992) Cross Relaxation without TOCSY: Transverse Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.*, 114: 3157-3159.
83. Desvaux H, Berthault P, Birlirakis N, Goldman MJ. (1994) Off-Resonance ROESY for the Study of Dynamic Processes. *J. Magn. Reson. A*, 108: 219-229.
84. Griesinger C, Ernst RR. (1987) Frequency Offset Effects and Their Elimination in NMR Rotating-Frame Cross-Relaxation Spectroscopy. *J. Magn. Reson.*, 75: 261-271.
85. Thrippleton MJ, Keeler J (2003) Elimination of Zero-Quantum Interference in Two-Dimensional NMR Spectra. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42: 3938-3941.
86. a) Desvaux H, Berthault P, Birlirakis N, Goldman N, Piotto M. (1995) Improved versions of Off-Resonance ROESY. *J. Magn. Reson. A*, 113: 47-53
b) Birlirakis N, Berthault P, Desvaux H, Goldman M, T. E. Malliavin, Piotto M. (1996) Off-resonance ROESY: a new ^1H -NMR method for the simultaneous study of molecular structure and dynamics. *Bruker Report*, 142: 34-38.
87. Schleucher J, Quant J, Glaser S, Griesinger C (1995) A Theorem Relating Cross Relaxation and *Hartmann-Hahn* Transfer in Multiple-Pulse Sequences. Optimal Suppression of TOCSY Transfer in ROESY. *J. Magn. Reson A*, 112: 144-151.
88. Thiele CM, Petzold K, Schleucher J. (2009) EASY ROESY: Reliable Cross-Peak Integration in Adiabatic Symmetrized ROESY. *Chem. Eur. J.*, 15: 585-588.
89. Baishya B, Verma A. (2015) Elimination of Zero-Quantum artifacts and sensitivity enhancement in perfect echo based 2D NOESY. *J. Magn. Reson.*, 252: 41-48.

90. Ämmälähti E, Bardet M, Molko D, Cadet J. (1996) Evaluation of Distances from ROESY Experiments with the Intensity-Ratio Method. *J. Magn. Reson. A*, 123: 230-232.
91. Glover SSB, Gould RO, Walkinshaw MD. (1985) Structures of Strychnine (I), $C_{21}H_{22}N_2O_2$, and a Solvate of Brucine (II), $C_{23}H_{26}N_2O_4 \cdot C_2H_6O \cdot 2H_2O$. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.*, 41: 990-994.
92. Jones CR, Butts CP, Harvey JN. (2011) Accuracy in determining interproton distances using Nuclear Overhauser Effect data from a flexible molecule. *Beilstein J. Org. Chem.*, 7: 145-150.
93. Butts CP, Jones CR, Towers EC, Flynn JL, Appleby L, Barron NJ. (2011) Interproton distance determinations by NOE – surprising accuracy and precision in a rigid organic molecule. *Org. Biomol. Chem.*, 9: 177-184.
94. Elbayed K, Canet D. (1990) Behaviour of a coupled two-spin-1/2 system in the presence of a spin-locking radio-frequency field. Relaxation and *Hartmann-Hahn* transfers. *Mol. Phys.*, 71: 979-993.
95. Canfield DV, Barrick J, Giessen BC. (1987) Structure of Codeine, *Acta Cryst.*, C 43: 977-979.
96. Balogh A. Szénhidrát-alapú, nitrogéntartalmú triciklusok térszerkezetének vizsgálata NMR módszerekkel. M. Sc. Szakdolgozat, Debreceni Egyetem, 2017.
97. Simon Á, Czajlik A, Perczel A, Kéri Gy, Nyikos L, Imri Zs, Kardos J. (2004) Binding crevice for TT-232 in a homology model of type 1 somatostatin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316: 1059-1064.
98. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, Moses TY, Hostetter G, Wagner U, Kakareka J, Salem G, Pohida T, Heenan P, Duray P, Kallioniemi O, Hayward NK, Trent JM, Meltzer PS (2003): High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.*, 33: 19-20.

99. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, Eveleigh D, Rowley B, Liu L, Adnane L, Lynch M, Auclair D, Taylor I, Gedrich R, Voznesensky A, Riedl B, Post LE, Bollag G, Trail PA. (2004) BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and angiogenesis. *Cancer Res.*, 64: 7099-7109.
100. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol. Cancer Ther.*, 7: 3129-3140.
101. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Hcho H, Spevak W, Zhang C, Zhang Y, Habets G, Burton EA, Wong B, Tsang G, West BL, Powell B, Shellooe R, Marimuthu A, Nguyen H, Zhang KYJ, Artis DR, Schlessinger J, Su F, Higgins B, Iyer R, D'Andrea K, Koehler A, Stumm M, Lin PS, Lee RJ, Grippo J, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, Chapman PB, Flaherty KT, Xu X, Nathanson KL, Nolop K. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature*, 467: 596-599.
102. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, Hirth P. (2012) Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 11: 873-886.
103. Hill RJ, Dabbagh K, Phippard D, Li C, Suttman RT, Welch M, Papp E, Song KW, Chang KC, Leaffer D, Kim YN, Roberts RT, Zabka TS, Aud D, Porto JD, Manning AM, Peng SL, Goldstein DM, Wong BR. (2008) Pamapimod, a Novel p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor: Preclinical Analysis of Efficacy and Selectivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 327: 610-619.
104. Chen JJ, Dunn JP, Goldstein DM, Stahl CM. (2002) Preparation of 2,6-disubstituted 7-oxopyrido[2,3-d]pyrimidines for treating p38 mediated disorders. WO2002064594, USA patent application

105. Goldstein DM, Soth M, Gabriel T, Dewney N, Kuglsatter A, Arzeno H, Chen J, Bingenheimer W, Dalrymple SA, Dunn J, Farrell R, Frauchiger S, la Fargue JA, Ghate M, Graves B, Hill RJ, Li F, Loe RLB, McIntosh J, McWeeney D, Papp E, Park J, Reese HF, Roberts RT, Rotstein D, Pablo BS, Sarma K, Stahl M, Sung ML, Suttman RT, Sjogren EB, Tan Y, Trejo A, Welch M, Weller P, Wong BR, Zecic H. (2011) Discovery of 6-(2,4-Difluorophenoxy)-2-[3-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)propylamino]-8-methyl-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one (Pamapimod) and 6-(2,4-Difluorophenoxy)-8-methyl-2-(tetrahydro-2H-pyran-4-ylamino)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-one (R1487) as Orally Bioavailable and Highly Selective Inhibitors of p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase. *J. Med. Chem.*, 54: 2255-2265.
106. Bruker Almanac 2009: 18-19

12. Saját publikációk jegyzéke

12.1. A dolgozatban felhasznált referált közlemények

I.

Sándor Boros, Katalin E. Kövér:

Low-power-composite-CPMG HSQMBC experiment for accurate measurement of long-range heteronuclear coupling constants

Magn. Reson. Chem., **49**: 106-110 (2011)

DOI: 10.1002/mrc.2717

II.

László Kékesi, András Dancsó, Eszter Illyés, **Sándor Boros**, János Pató, Zoltán Greff, Gábor Németh, Rita Garamvölgyi, Ferenc Baska, László Örfi, György Kéri:

Preparation of Pyrido[2,3-b]pyrazine Ring System via Regioselective Condensation Reaction

Lett. in Org. Chem., **11**: 651-656 (2014) DOI: 10.2174/1570178611666140606205028

III.

Kékesi László, Sipos Anna, Németh Gábor, Dancsó András, Illyés Eszter, **Boros Sándor**, Breza Nóra, Nemes Zoltán, Hegymegi-Barakonyi Bálint, Pató János, Greff Zoltán, Kéri György, Örfi László:

Erlotinib-érzékeny és erlotinib-rezisztens sejtvonalakat gátló pirido[2,3-b]pirazinok, és előállításuk régiószelktív kondenzációs reakcióval

Acta Pharmaceutica Hungarica, **84**: 91-104 (2014)

IV.

Sándor Boros, Gyula Batta:

Offset-compensated and zero-quantum suppressed ROESY provides accurate ^1H - ^1H distances in small to medium-sized molecules

Magn. Reson. Chem., **54**: 947-952 (2016)

DOI: 10.1002/mrc.4474

V.

Rita Garamvölgyi, Judit Dobos, Anna Sipos, **Sándor Boros**, Eszter Illyés, Ferenc Baska, László Kékesi, István Szabadkai, Csaba Szántai-Kis, György Kéri, László Örfi:

Design and synthesis of new imidazo[1,2-*a*]pyridine and imidazo[1,2-*a*]pyrazine derivatives with antiproliferative activity against melanoma cells

Eur. J. Med. Chem., **108**: 623-643 (2016) DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.12.001

VI.

Laura Simon-Szabó, Márton Kokas, Zoltán Greff, **Sándor Boros**, Péter Bánhegyi, Lilián Zsákai, Csaba Szántai-Kis, Tibor Vántus, József Mandl, Gábor Bánhegyi, István Vályi-Nagy, László Örfi, Axel Ullrich, Miklós Csala, György Kéri:

Novel compounds reducing IRS-1 serine phosphorylation for treatment of diabetes

Bioorg. Med. Chem. Letters, **26**: 424-428 (2016) DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.099

VII.

Kéri György, Örfi László, Greff Zoltán, Bánhegyi Péter, Szántai-Kis Csaba, Erős Dániel, **Boros Sándor**, Breza Nóra, Zsákai Lilián:

Új kináz inhibitor hatású vegyületek, és felhasználásuk fibrotikus sejtosztódás szabályozására

(Novel use of kinase antagonist compounds to alter fibrotic cell proliferation)

P1500620 ügyszámú magyar szabadalmi bejelentés, (2015. dec. 16.)

VIII.

Sándor Boros, Zoltán Gáspári, Gyula Batta:

Accurate NMR Determinations of Proton–Proton Distances

In *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (ed. by Webb GA), **94**: 1-39 (2018)

DOI: 10.1016/bs.arnmr.2017.12.002

12.2. A dolgozatban felhasznált nem referált közlemények (előadások, poszterek)

IX.

Sándor Boros, Gábor. Tóth:

Measurements of heteronuclear long-range coupling constants on macrolides

19th Valtice Meeting of the Central European NMR Discussion Groups

April 19-21, 2004, Valtice, Czech Republic (page 35, oral)

X.

Sándor Boros, Gábor Tóth:

A practical Comparison of Methods for Determination of Long-range $^nJ_{C,H}$ Coupling constants

VIth Central European NMR Symposium and Bruker Users Meeting

September 27-28, 2004, Linz, Austria (page 4, poster)

XI.

Éliás Olivér, **Boros Sándor**, Harmat Veronika, ifj. Regdon Géza, Hódi Klára, Erős István, Mátyus Péter:

Egy C-C gyűrűzárási reakció az analitikusok szemével

Vegyészkonferencia 2004,

47. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés és Bioanalitika 2004 Szimpózium

2004. jún. 30. – júl. 2., Balatonföldvár (117. oldal, poszter)

XII.

Sándor Boros, Katalin E. Kövér:

Low-power-composite-CPMG G-BIRD adiabatic HSQMBC, an improved sequence for determination of heteronuclear long-range coupling constants

EUROMAR 2009 Magnetic Resonance Conference

5-9 July, 2009, Göteborg, Sweden (Poster, So38)

XIII.

Boros Sándor, Kövér Katalin:

Alacsony kimenőtjeljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC -

módosított módszer heteronukleáris távolható csatolási állandók mérésére

2009 EAST-NMR Regional Meeting

Az MTA Analitikai Kémiai Bizottság NMR Munkabizottsága és az MKE Analitikai Szakosztály NMR Szakcsoport szervezésében

2009. december 11., Budapest, Richter Gyógyszergyár (előadás)

XIV.

Boros Sándor, E. Kövér Katalin:

Kis kimenőtjeljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC, továbbfejlesztett módszer heteronukleáris távolható csatolási állandók mérésére

Vegyészkonferencia és 53. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés

2010. jún. 30 – júl. 2., Hajdúszoboszló (poszter, P-61)

XV.

Boros Sándor:

Homonukleáris korrelációk zéró-kvantum elnyomással

Vegyészkonferencia és 53. Magyar Spektrokémiai Vándorgyűlés

2010. jún. 30 – júl. 2., Hajdúszoboszló (poszter, P-62)

XVI.

Sándor Boros:

Zero-quantum suppressed homonuclear correlations

WWMR2010, Joint EUROMAR 2010 and 17th ISMAR Conference

July 4-9, 2010, Florence-Firenze, Italy (poster, P557)

XVII.

Sándor Boros:

Zero-quantum suppressed homonuclear correlations for the better signal shape of the NMR spectra

LGCR Newsletter of sanofi-aventis, Issue 2, July 2010, pp. 19-20

(a corporate internal journal)

XVIII.

Boros Sándor:

Zéró-kvantum elnyomás ahol csak lehet – COSY, TOCSY, NOESY, ROESY

Az MTA Analitikai Kémiai Bizottság NMR Munkabizottsága és az MKE Analitikai Szakosztály NMR Szakcsoport előadónapja

2010. december 13., Budapest, Richter Gyógyszergyár (előadás)

XIX.

Boros Sándor:

Egykötéses és távolható heteronukleáris csatolási állandók mérése és az ezekből nyert szerkezeti információk

Az MTA Analitikai Kémiai Bizottság NMR Munkabizottsága előadónapja

2013. május 9-10., Pécs, Egyetem (előadás)

XX.

Boros Sándor:

Nem várt reakciótermékek szerkezetmeghatározása

Az MTA Analitikai Kémiai Bizottság NMR Munkabizottsága előadónapja

2014. október 2-3., Balatonszemes, Richter Gyógyszergyár üdülője (előadás)

XXI.

Boros Sándor, Garamvölgyi Rita, Greff Zoltán:

Tautomer és rotamer egyensúlyok, ahol nem is gondolnánk rá

Az MTA Kémiai Tudományok Osztálya NMR Munkabizottsága előadónapja

2015. április 24-25., Balatonszemes, Richter Gyógyszergyár üdülője (előadás)

XXII.

Boros Sándor, Batta Gyula:

^1H - ^1H távolságok pontosabb mérése zéró-kvantum elnyomásos off-rezonancia ROESY módszerrel, validálás és alkalmazás merev vázú molekulákon

Az MTA Kémiai Tudományok Osztálya NMR Munkabizottsága és az MKE Analitikai Szakosztály NMR Szakcsoport előadónapja

2016. május 20-21., Debrecen, MTA Debreceni Területi Bizottságának székháza (előadás)

12.3. A dolgozatban fel nem használt saját közlemények

Cs. Nemes, A. Lévai, T. Patonay, G. Tóth, S. Boros, J. Halász, W. Adam, D. Golsch:
Dioxirane Oxidation of 3-Arylidene flavanones: Diastereoselective Formation of
trans,trans Spiroepoxides from the *E* Isomers
J. Org. Chem., **59**, 900-905 (1994) DOI: 10.1021/jo00083a035

G. Tóth, J. Halász, S. Boros, A. Lévai, Cs. Nemes, T. Patonay:
Structure elucidation of the oxidation products of 2-arylidene-1-indanones
and 2-arylidene-1-benzosuberones
Magn. Res. Chem., **34**, 932-936 (1996)
DOI: 10.1002/(SICI)1097-458X(199611)34:113.0.CO;2-3

P. Mátyus, E. Zára-Kaczián, S. Boros, Zs. Böcskei:
Synthesis of Novel 2-Phenylpyridazino[4,5-*b*][1,5]thiazepines
J. Het. Chem., **33**, 583 (1996) DOI: 10.1002/jhet.5570330309

É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann, E. Gács-Baitz:
Synthesis of 6-deoxy-5-thio-**D**-glucose
Carbohydrate Res., **290**, 159-173 (1996) DOI: 10.1016/0008-6215(96)00143-7

P. Mátyus, I. Varga, E. Zára-Kaczián, A. Mezei-Török, Á. Behr, A. Simay, N. Haider, S.
Boros, A. Bakonyi, E. Horváth, K. Horváth:
Novel pyridazino[4,5-*b*][1,5]oxazepines and -thiazepines az 5-HT_{1A} receptoor ligands
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **7**, 2857-2862 (1997)
DOI: 10.1016/S0960-894X(97)10089-0

M. Márton-Merész, E. Zára-Kaczián, S. Boros, P. Mátyus:
Cyclocondensation Reaction of a 1,5-Diketone with 1,2-Diamines
J. Heterocyclic Chem., **34**, 1033-1036 (1997) DOI: 10.1002/jhet.5570340350

É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-cyanophenyl 2-deoxy-1,5-dithio- β -**D**-*threo*-pentopyranoside
Carbohydrate Res., **299**, 59-67 (1997) DOI: 10.1016/S0008-6215(97)00001-3

É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-cyanophenyl 2-azido-2-deoxy- and 3-azido-3-deoxy-1,5-dithio- β -**D**-
xilopyranosides
Carbohydrate Res., **301**, 23-32 (1997) DOI: 10.1016/S0008-6215(97)00079-7

É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-cyanophenyl 4-azido-4-deoxy-1,5-dithio- β -**D**-xylopyranoside
Carbohydrate Res., **302**, 149-162 (1997) DOI: 10.1016/S0008-6215(97)00128-6

A. Jekkel, A. Kónya, É. Ilkőy, S. Boros, Gy. Horváth, J. Sütő:
Microbial Conversion of Mevinolin
J. Antibiot., **50**, 750-754 (1997) DOI: 10.7164/antibiotics.50.750

- É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-cyanophenyl 1,5-dithio- β -**D**-glucopyranoside and its 6-deoxy, as well as 6-deoxy-5-ene derivatives as oral antithrombotic agents
Carbohydrate Res., **304**, 271-280 (1997) DOI: 10.1016/S0008-6215(97)10041-6
- P. Mátyus, A. P. Borossy, M. Morvai, S. Boros:
Conformational analyses of two pyrazino[4,5-*b*][1,5]axazepines and a pyridazino [4,5-*b*][1,5]thiazepine
Acta Chimica Hungarica - Models in Chemistry, **135**, 591-600 (1998)
- É.Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann, E. Gács-Baitz, L. Párkányi:
An economic synthesys of 1,2,3,4-tetra-*O*-acetyl-5-thio-**D**-xylopyranose and its transformation into 4-substituted-phenyl 1,5-dithio-**D**-xylopyranosides possessing antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **308**, 297-310 (1998) DOI: 10.1016/S0008-6215(98)00088-3
- É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesys of 4-cyanophenyl and 4-nitrophenyl 1,5-dithio-**L**- and -**D**-arabinopyranoside possessing antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **311**, 191-202 (1998) DOI: 10.1016/S0008-6215(98)00221-3
- É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann, E. Gács-Baitz:
The Fate of the Methanesulfonyloxy Group on Reduction with LAH
Tetrahedron, **55**, 8095-8102 (1999) DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00417-2
- É- Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-Cyanophenyl and 4-Nitrophenyl 2,6-Anhydro-1,2-dithio-**D**-manno- and altropyranosides and Their Derivatives Possessing Antithrombotic Activity
Polish J. Chem., **73**, 989-1001 (1999)
- É. Bozó, S. Boros, J. Kuzsmann:
Orally active antithrombotic thioglycosides, Part VIII. Synthesis of 4-cyanophenyl and 4-nitrophenyl 1,5-dithio-**D**-ribopyranosides as well as their 2-deoxy and 2,3-dideoxy derivatives possessing antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **321**, 52-66 (1999) DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00175-5
- É. Bozó, A. Medgyes, S. Boros, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-substituted phenyl 2,5-anhydro-1,6-dithio- α -**D**-gluco- and α -**D**-guloseptanosides possessing antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **329**, 25-40 (2000) DOI: 10.1016/S0008-6215(00)00156-7
- É. Bozó, S. Boros, L. Párkányi, J. Kuzsmann:
Synthesis of 4-cyano- and 4-nitrophenyl 2,5-anhydro-1,6-dithio- α -**D**-gluco- and - α -**L**-guloseptanosides carrying different substituents at C-3 and C-4
Carbohydrate Res., **329**, 269-286 (2000) DOI: 10.1016/S0008-6215(00)00190-7

- É. Bozó, S. Boros, J. Kuszmann:
Synthesis of 4-substituted phenyl 3,6-anhydro-1,3-dithio-**D**-glucofuranosides and –
pyranosides as well as 2,6-anhydro-1,2-dithio- α -**D**-altrofurans possessing
antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **329**, 525-538 (2000) DOI: 10.1016/S0008-6215(00)00218-4
- A. Jekkel, I. Barta, A. Kónya, J. Sütő, S. Boros, Gy. Horváth, G. Ambrus:
Microbiological transformation of mycophenolic acid
J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, **11**, 423-426 (2001)
DOI: 10.1016/S1381-1177(00)00146-6
- É. Bozó, S. Boros, J. Kuszmann:
Conversion of 2,6-anhydro-**D**-altrose and –mannose derivatives with 4-substituted
phenyl thiols to prepare compounds with potential antithrombotic activity
Carbohydrate Res., **332**, 325-333 (2001) DOI: 10.1016/S0008-6215(01)00102-1
- A. Jekkel, I. Barta, S. Boros, J. Sütő, Gy. Horváth, Zs. Szabó, G. Ambrus:
Microbial transformation of mycophenolic acid Part II
J. Molecular Catalysis B: Enzymatic, **19-20**, 209-214 (2002)
DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00169-8
- J. Kuszmann, G. Medgyes, S. Boros:
Synthesis of a polysulfated heparin degradation product
Pharmazie, **59**, 344-348 (2004)
- J. Kuszmann, G. Medgyes, S. Boros:
Synthesis of 2,5-anhydro-(β -**D**-glucopyranosyluronate)- and (α -**L**-idopyranosyl-
uronate)-**D**-mannitol hexa-*O*-sulfonate hepta sodium salt
Carbohydrate Res., **339**, 1569-1579 (2004) DOI: 10.1016/j.carres.2004.03.006
- J. Kuszmann, G. Medgyes, S. Boros:
Two approaches to the synthesis of 3- β -**D**-glucopyranosyl-**D**-glucitol
Carbohydrate Research, **339**, 2407-2414 (2004) DOI: 10.1016/j.carres.2004.07.019
- J. Kuszmann, G. Medgyes, S. Boros:
Synthesis of poly-*O*-sulfated glycosides of 2,5-anhydro-**D**-mannitol
Carbohydrate Res., **340**, 1739-1749 (2005) DOI: 10.1016/j.carres.2005.05.006
- Zs. Riedl, K. Monsieurs, G. Krajsovsky, P. Dunkel, B. U. W. Maes, P. Tapolcsányi,
O. Egyed, S. Boros, P. Mátyus, L. Pieters, G. L. F. Lamière, Gy. Hajós:
Synthesis of novel 1-methyl-1H-pyridazino[3,4-*b*]indoles
Tetrahedron, **62**, 121-129 (2006) DOI: 10.1016/j.tet.2005.09.136
- A. Tegdes, G. Medgyes, S. Boros, J. Kuszmann:
Glycosidation of 2,5-anhydro-3,4-di-*O*-benzyl-**D**-mannitol with different
glucopyranosyl donors. A comparative study
Carbohydrate Res., **341**, 776-781 (2006) DOI: 10.1016/j.carres.2006.01.028

- A. Molnár, S. Boros, K. Simon, I. Hermech, Cs. Gönczi:
Unexpected ring transformations of an azoxyquinoxaline
Eur. J. Pharm. Sci., **38**, Suppl. Issue, 187-189 (2009)
- A. Molnár, S. Boros, K. Simon, I. Hermech, Cs. Gönczi:
Unexpected transformations of an azoxyquinoxaline
Arkivoc, 2010 (x) 199-207
- L. Károlyházy, G. Krajsovsky, L. Farkas, S. Boros, A. Csámpai, P. Mátyus
Reaction of chloropyridazin-3(2*H*)-ones with iodide ion. Part II
Arkivoc, 2011 (ii) 18-28
- G. Krajsovsky, L. Károlyházy, P. Dunkel, S. Boros, A. Grillo, P. Mátyus:
Suzuki-aza-Wittig, Suzuki-condensation and aza-Wittig-electrocyclic ring-closure
tandem reactions for synthesis of fused nitrogen-containing ring systems
Arkivoc, 2011 (x) 229-253
- Sz. Kovács, Á. I. Csincsi, T. Zs. Nagy, S. Boros, G. Tímári, Z. Novák:
Design and application of new imidazolylsulfonate-based benzyne precursor: an
efficient triflate alternative.
Organic Letters, **14** (8), 2022-2025 (2012) DOI: 10.1021/ol300529j
- M. V. Pilipecz, T. R. Varga, P. Scheiber, Z. Mucsi, A. Fàvre-Mourgues, S. Boros,
L. Balázs, G. Tóth, P. Nemes:
Reductive transformations of unsaturated azabicyclic nitrolactams
Tetrahedron, **68** (27-28), 5547-5553 (2012) DOI: 10.1016/j.tet.2012.04.100
- F. Faigl, Sz. Deák, Z. Mucsi, T. Hergert, L. Balázs, S. Boros, B. Balázs, T. Holczbauer,
M. Nyerges, B. Mátravölgyi:
A novel and convenient method for the preparation of 5-(diphenylmethylene)-1*H*-
pyrrol-2(5*H*)-ones; synthesis and mechanistic study,
Tetrahedron, **72**, (35), 5444-5455 (2016) DOI: 10.1016/j.tet.2016.07.032
- Zs. Czudor, M. Balogh, P. Bánhegyi, S. Boros, N. Breza, J. Dobos, M. Fábrián, Z.
Horváth, E. Illyés, Cs. Szántai-Kis, P. Markó, A. Sipos, B. Szokol, L. Örfi:
Novel compounds with potent CDK9 inhibitory activity for the treatment of myeloma
Bioorg. Med. Chem. Letters **28**, 769-773 (2018) DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.01.002
- Czudor Zs., Bánhegyi P., Boros S., Breza N., Fábrián M., Szántai-Kis Cs., Markó P.,
Sipos A., Szokol B., Örfi L.:
Potenciálisan mielóma multiplex ellenes vegyületek szintézise és vizsgálata
Acta Pharmaceutica Hungarica, **88**, 47-58 (2018)
- Z. Nemes, K. Takács-Novák, G. Völgyi, K. Valkó, Sz. Béni, Z. Horváth, B. Szokol, N.
Breza, J. Dobos, Cs. Szántai-Kis, E. Illyés, S. Boros, R. J. Kok, L. Örfi:
Synthesis and characterization of amino acid substituted sunitinib analogues for the
treatment of AML
Bioorg. Med. Chem. Letters **28**, 2391-2398 (2018) DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.06.026

P. Gyulavári, B. Szokol, I. Szabadkai, D. Brauswetter, P. Bánhegyi, A. Varga, P. Markó, S. Boros, E. Illyés, Cs. Szántai-Kis, M. Krekó, Zs. Czudor, L. Órfi:

Discovery and optimization of novel benzothiophene-3-carboxamides as highly potent inhibitors of Aurora kinases A and B

Bioorg. Med. Chem. Letters, **28**, 3265-3270 (2018) DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.05.064

I. Szabadkai, R. Torka, R. Garamvölgyi, F. Baska, P. Gyulavári, S. Boros, E. Illyés, A. Choidas, A. Ullrich, L. Órfi:

Discovery of N-[4-(quinolin-4-yloxy)-phenyl]-benzenesulfonamides as novel AXL kinase inhibitors

J. Med. Chem., **61**, 6277–6292 (2018) DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00672

V. Singh, A. Pacitto, S. Donini, D. M. Ferraris, S. Boros, E. Illyés, B. Szokol, M. Rizzi, T. L. Blundell, D. B. Ascher, J. Pató, V. Mizrahi

Synthesis and Structure–Activity relationship of 1-(5-isoquinolinesulfonyl)piperazine analogues as inhibitors of Mycobacterium tuberculosis IMPDH

Eur. J. Med. Chem., **174**, 309-329 (2019) DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.04.027

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm első mesteremnek, prof. Tóth Gábornak, hogy tanulmányaim során megismertett a modern szerkezetanalitikai módszerekkel, különös tekintettel az NMR spektroszkópiára és pályámat mindmáig támogató figyelemmel kíséri.

Köszönöm a műszercégek mérnökeinek – Molnár Károlynak és Dvortsák Péternek (Bruker), valamint Sándor Péternek (ex-Varian), hogy szerviz, műszerbeállítás, illetve alkalmazástechnikai kérdésekkel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.

Köszönöm a gyümölcsöző együttműködést az NMR módszerfejlesztésekhez biztatást és támogató segítséget adó konzulenseimnek, E. Kövér Katalinnak és Batta Gyulának (Debreceni Egyetem), akik társszerzőim a módszerfejlesztéseket tartalmazó publikációimban.

Köszönöm a korábbi munkahelyeim volt vezető, analitikus, NMR spektroszkópus és szintetikus vegyész munkatársaimnak a támogatásukat és a tőlük kapott inspirációkat. Simay Antal, Bodor Miklós, Pallagi István, Kuzmann János, Bozó Éva, Medgyes Gábor, Zubovics Zoltán, Sólyom Sándor, Ilkóczy Éva (GYOKI), Bátori Sándor, Claudine Pickard, Irimie Katalin, Balázs László, Halász Judit, Molnár-Gábor Dóra, Podányi Benjámin, Bokotey Sándor, Tímári Géza, Bata Imre, Kánai Károly, Behr Ágnes, Varga Márton, Szlávik Zoltán, Bodor Veronika (sanofi-aventis, Chinoin), Örfi László, Illyés Eszter, Garamvölgyi Rita, Balogh Mária, Varga Zoltán, Horváth Zoltán, Szokol Bálint, Bánhegyi Péter, Szabadkai István, Czudor Zsófia, Markó Péter, Pató János, Kékesi László, Baska Ferenc, Wácsek Frigyes, Nemes Zoltán (Vichem Kft).

Köszönöm jelenlegi munkahelyem – az NSZKK – vezetőinek támogatását.

Ezúton emlékezem meg azokról a vezetőimről és munkatársaimról, akiknek már nincs lehetőségem személyesen megköszönni a bizalmukat és támogatásukat: Bajusz Sándor (GYOKI), Hermecz István és Simon Kálmán (Chinoin), valamint Greff Zoltán és Kéri György (ViChem).

Köszönöm családom - feleségem Anita, gyerekeim Zsófia és Máté, valamint szüleim - támogatását és esetenként türelmét, amikor körükben, otthon is valamely éppen aktuális témával foglakoztam.

Köszönöm bírálóimnak az építő jellegű észrevételeiket, javaslataikat, olvasóimnak és hallgatóimnak a megtisztelő figyelmet.

14. Függelék

a fejlesztett NMR mérési módszerek forráskódjai

A kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG G-BIRD adiabatikus HSQMBC mérőprogram forráskódja Bruker gyártmányú műszerre

```
;HSQC et gp jc LR nd lowpowercpxy
;avance-version (02/06/17)
;HSQMBC
;2D H-1/X correlation via double inept transfer
;for determination of XH long range coupling constants
; via splitting in F2
;phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection
;no decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;using G-BIRD with adiabatic 13C inversion pulse
;using adiabatic pulse for 13C refocusing
;using XY-16 CPMG (Carr, Purcell, Meilboom, Gill) sequence
; with low power composite pulses
; before and after the G-BIRD block to suppress the J(H,H) coupling evolution
;the BLKGRAD command is positioned after the data aquisition in order to avoid
; the phase artifacts caused by the swich before the beginning of the acquisition
;
;R. Marek, L. Králík, V. Sklenar
; Tetrahedron Lett., 38, 665-668 (1997) (GSQMBC)
;R.T. Williamson, B.L. Marquez, W.H. Gerwick, K.E. Kövér
; Magn. Reson. Chem. 38, 265-273 (2000) (basic vesion of HSQMBC)
;B.L. Marquez, W.H. Gerwick, R.T. Williamson
; Magn. Reson. Chem., 39, 499-530 (2001) (review of methods for J(XH)long-range)
;H. Koskela, I. Kilpeläinen, S. Heikkinen
; J. Magn. Reson., 164, 228-232 (2003) (LR-CAHSQC)
;K. E. Kövér, Gy. Batta, K. Fehér
; J. Magn. Reson. 181, 89-97, (2006) (advanced version with composite pulses)
;V. Lacerda Jr., G. V. J da Silva, M. G. Constantino, C. F. Tormena, R. T. Williamson,
; B. L. Marquez: Magn. Reson. Chem., 44, 95-98 (2006)
; (G-BIRD and XY-16 in the HSQMBC)
;S. Boros, K. E. Kövér:
; Magn. Reson. Chem., 49, 106-110 (2011)
; (low-power-composite-CPMG G-BIRD adiabetic HSQMBC)

;$OWNER=
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"

"d0=3u"
"d2=1s/(cnst2*2)" ;1/2J(XH)one bond
"d6=1s/(cnst13*2)" ;1/2J(XH)long-range

; "in0=inf1/2" in TopSpin 2.1 or higher version

"DELTA=p16+d16+p2+d0*2-4u"
"DELTA1=p16+d16+4u"
; d6 = 2*p16 + 2*d16 + 2*4u + 2*p1 +2*d2 + larger(p2, p14) + 2*(2*d24 + p6*4 +6u)*11
; l1 should be multiple of 8
"FACTOR1=((d6-(2*p16+ 2*d16 + 2*4u + 2*p1 + 2*d2 + p14))/(2*(2*d24 + p6*4 + 6u)))/8+0.5"
"l1=8*FACTOR1"
"d56 = 2*p16 + 2*d16 + 2*4u + 2*p1 +2*d2 + larger(p2, p14) + 2*(2*d24 + p6*4 +6u)*11"
"d57 = 1/(2*d56)"
;d56 and d57 are check values for d6 cnst13 after the parametrisation
;due to the making round operation in the parametrisation

1 ze
2 20u pll:f1 BLKGRAD
3 d1
```

```

(pl ph1):f1
4 d24 p110:f1 p115:f2      ; first composite XY-16 CPMG block
   (center (p6 ph20):f1 (p9 ph20):f2)
   3u
   (center (p6*2 ph21):f1 (p9*2 ph21^):f2)
   3u
   (center (p6 ph20):f1 (p9 ph20^):f2)
   d24
   lo to 4 times l1

4u p11:f1 p12:f2 UNBLKGRAD
p16:gp3      ; begin G-BIRD with adiabatic pulse
d16
(pl ph1):f1
d2
(center (p2 ph1):f1 (p14:sp3 ph1):f2 )
d2
(pl ph7):f1
p16:gp3
d16          ; end of G-BIRD
4u

5 d24 p110:f1 p115:f2      ; second composite XY-16 CPMG block
   (center (p6 ph20):f1 (p9 ph20):f2)
   3u
   (center (p6*2 ph21):f1 (p9*2 ph21^):f2)
   3u
   (center (p6 ph20):f1 (p9 ph20^):f2)
   d24
   lo to 5 times l1
4u p11:f1 p12:f2
(p28 ph1):f1      ; 1H trim pulse
4u
(pl ph2):f1

(p3 ph3):f2
d0
(p2 ph5):f1
d0
p16:gp1*EA      ;encoding gradient
d16
(p24:sp7 ph4):f2
4u
DELTA p12:f2
(p3 ph4):f2
3u
p16:gp4
d16

(pl ph1):f1
DELTA1
(p2 ph1):f1
3u
p16:gp2      ;decoding gradient
d16
go=2 ph31
20u BLKGRAD
d1 mc #0 to 3
F1EA(igrad EA, id0 & ip3*2 & ip31*2)
d56      ; check of d6 after the parametrisation d6 is nearly = d56
d57      ; check of nJ(X,H)opt after the parametrization d57 is nearly = cnst13
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph7=2
ph20=1 2 1 2 2 1 2 1 3 0 3 0 0 3 0 3
ph21=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;p11 : f1 (1H) channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 (X) channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 (1H) channel - level for low power
;p115: f2 (X) channel - level for low power
;p1 : f1 (1H) channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 (1H) channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 (X) channel - 90 degree high power pulse
;p6 : f1 (1H) channel - 90 degree low power pulse
;p9 : f2 (X) channel - 90 degree low power pulse
;sp3: f2 (X) channel - shaped pulse (180 degree inversion)
;spnam3: Crp60,0.5,20.1
;p14: f2 (X) channel - 180 degree shaped pulse for inversion
;      = 500usec for Crp60,0.5,20.1
;sp7: f2 (X) channel - shaped pulse (180degree refocussing)
;spnam7: Crp60comp.4
;p24: f2 (X) channel - 180 degree shaped pulse for refocussing
;      = 2msec for Crp60comp.4
;p28: f1 (1H) channel - trim pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;cnst2: = J(XH)
;d2 : 1/(2J)XH
;cnst13: = J(XH)long-range
;d6 : delay for evolution of long range couplings 1/2Jlr
;d24: 120-180 usec for suppress the J(H,H) evolution
;l1 = multiple of 8
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;nd0 (or td0 from TopSpin 2.0): 2
;NS: 2 * n (full cycle: 8)
;DS: >= 8
;td2 (detected 1H dimension): at least 4K for good digital resolution
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                      80 : 20.1 : 17 : 11 for C-13
;                      80 : 8.1 : 17 : 11 for N-15

; gp1 * gammaX = gp2 * gammaH

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13 8.1 for N-15
;gpz3: 17%
;gpz4: 11%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100

; based on $Id: hsqcetgpjclrnd,v 1.1 2002/06/21 12:56:36 ber Exp $

```

A szelektív 1D kis kimenőteljesítményű kompozit CPMG HSQMBC mérőprogram forráskódja Bruker gyártmányú műszerre

```

;Selective 1D HSQC gp jc lr nd low-power-cpxy
;avance-version
;Selective 1D HSQMBC
;Selective 1D H-1/X correlation via double inept transfer
;for determination of XH long range coupling constants
;no decoupling during acquisition
;using trim pulses in inept transfer
;using Gaussian pulse for selective 13C inversion
;using XY-16 CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill) sequence with low power composite
pulses
; before and after the G-BIRD block to suppress the J(H,H) coupling evolution
;the BLKGRAD command is positioned after the data aquisition in order to avoid
; the phase artifacts caused by the swich before the beginning of the acquisition
;
;R. Marek, L. Králík, V. Sklenář
; Tetrahedron Lett., 38, 665-668 (1997) (GSQMBC)
;R.T. Williamson, B.L. Marquez, W.H. Gerwick, K.E. Kövér
; Magn. Reson. Chem. 38, 265-273 (2000) (basic vesion of HSQMBC (2D & sel. 1D))
;B.L. Marquez, W.H. Gerwick, R.T. Williamson
; Magn. Reson. Chem., 39, 499-530 (2001) (review of methods for J(XH)long-range)
;M. Köck, R. Kerssebaum, W. Fehér:
; Magn. Res. Chem., 41, 65-69 (2003) (adiabatic refocusing & inversion)
;H. Koskela, I. Kilpeläinen, S. Heikkinen
; J. Magn. Reson., 164, 228-232 (2003) (LR-CAHSQC)
;K. E. Kövér, Gy. Batta, K. Fehér
; J. Magn. Reson. 181, 89-97, (2006) (advanced version with composite pulses)
;V. Lacerda Jr., G. V. J da Silva, M. G. Constantino, C. F. Tormena, R. T. Williamson,
; B. L. Marquez: Magn. Reson. Chem., 44, 95-98 (2006) (G-BIRD and XY-16)
;S. Boros, K. E. Kövér
; Magn. Reson. Chem., 49, 106-110 (2011)
; (low-power-composite CPMG G-BIRD adiabatic
HSQMBC,
; and low-power-composite CPMG selective 1D HSQMBC)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"

"d6=1s/(cnst13*2)" ;1/2J(XH)long-range

"DELTA1=p16+d16"
; d6 = (2*d24 + p6*4 + 6u)*11
; l1 should be multiple of 8
"FACTOR1=(d6 / (2*d24 + p6*4 + 6u))/8 + 0.5"
"l1=8*FACTOR1"

1 ze
2 20u p11:f1 p12:f2 BLKGRAD
3 d1
(pl ph1):f1
; composite XY-16 CPMG block
4 d24 p110:f1 p115:f2 ; d24 = 120-180 usec for suppression of J(HH) evolution
(center (p6 ph20):f1 (p9 ph20):f2)
3u
(center (p6*2 ph21):f1 (p9*2 ph21^):f2)
3u
(center (p6 ph20):f1 (p9 ph20^):f2)
d24
10 to 4 times l1
4u p11:f1 p12:f2 UNBLKGRAD
(p28 ph1):f1 ; 1H trim pulse
3u
(pl ph2):f1
(p3 ph3):f2
p16:gpl
d16
(pl2:sp1 ph1:r):f2 ;selective 180 degree refocusing pulse
3u

```

```

p16:gp2
d16
(p3 ph1):f2
p16:gp3
d16
(p1 ph1):f1
DELTA1
(p2 ph1):f1
p16:gp4
d16
go=2 ph31
20u BLKGRAD
30m mc #0 to 3 F0(zd)
20u BLKGRAD
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph20=1 2 1 2 2 1 2 1 3 0 3 0 0 3 0 3
ph21=0 1 0 1 1 0 1 0 2 3 2 3 3 2 3 2
ph31=0 2

;p11 : f1 (1H) channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 (X) channel - power level for pulse (default)
;p110: f1 (1H) channel - level for low power
;p115: f2 (X) channel - level for low power
;p1 : f1 (1H) channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 (1H) channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 (X) channel - 90 degree high power pulse
;p6 : f1 (1H) channel - 90 degree low power pulse
;p9 : f2 (X) channel - 90 degree low power pulse
;p12: f2 (X) channel - shaped pulse (180 degree selective refocusing)
;spnam1: Gauss1.1000
;p28: f1 (1H) channel - trim pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;cnst13: = J(XH) long-range
;d6 : delay for evolution of long range couplings 1/2Jlr
;d24: 120-180 usec for suppress the J(H,H) evolution
;l1 = multiple of 8
;NS: 8 * n
;DS: 8

;use gradient ratio:  gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
;                      -40 : 40 : 10 : -20   for C-13
;                      40 : -40 : 10 : -8    for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: -40%
;gpz2: 40%
;gpz3: 10%
;gpz4: -20%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100

; based on $Id: hsqcetgpjclrnd,v 1.1 2002/06/21 12:56:36 ber Exp $

```

A zqs-easy ROESY mérőprogram [IV] forráskódja Bruker gyártmányú műszerre

```

;zqs-easy-random-ROESY
;2D symmetrized ROESY with zero-quantum suppression, and adiabatic ramps for mixing
;with off-resonance randomized length spin-locks
;phase sensitive using States-TPPI mode

;CAMELSPIN & ROESY
; A. A. Bothner-By, R. L. Stephens, Ju-Mee Lee, C. D Warren & R. W. Jeanloz:
;   J. Am. Chem. Soc., 106, 811-813 (1984)
; A. Bax & D. G. Davis:
;   J. Magn. Reson., 63, 207-213 (1985)

;off resonance ROESY
; Tsang-Lin Hwang & A. J. Shaka:
;   J. Am. Chem. Soc., 114, 3157-3159 (1992)
; H. Desvaux, P. Berthault, N. Birlirakis, & M. J. Goldman:
;   J. Magn. Reson. A, 108, 219 (1994)

;off resonance ROESY with trapezoidal shaped spin-lock
; N. Birlirakis, P. Berthault, H. Desvaux, M. Goldman, T. E. Malliavin & M. Piotto:
;   Bruker Report, 142, 34-38 (1995)

; Jump-symmetrized off-resonance ROESY:
; J. Schleucher, J. Quant, S. Glaser, C. Griesinger:
;   J. Magn. Reson A, 112, 144-151 (1995)

;with adiabatic half-Gaussian ramp pulses, Efficient Adiabatic SYmmetrized (EASY) ROESY:
; C. M. Thiele, K. Petzold, J. Schleucher:
;   Chem. Eur. J. 15, 585-588 (2009)

;with zero-quantum suppression before and after the off-resonance spin-lock
; M. J. Thrippleton, J. Keeler:
;   Angew. Chem. Int. Ed. 42, 3938-3941 (2003)

;The length of the spinlock time is randomized
;in order to suppress the residual COSY-origin phase alternations
; S. Boros, Gy Batta:
;   Magn. Reson. Chem. 54, 947-952 (2016)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>

"d0=in0/2-p1*4/3.1416"
"cnst1=0" ;offset for the on-resonance pulses
"cnst30=tan((cnst31/180)*3.1416)"
"cnst3=(cnst2/cnst30)"
;calculate high-field RF offsets for cnst31 degree pulses, suggested 60° or magic angle
"cnst4=-(cnst2/cnst30)" ;calculate low-field RF offsets for cnst31 degree pulses
"p63=0.5*p15"
;"in0=2*dw" forTopSpin 2.0 or earlier
;"in0=inf1" for TopSpin 2.1 or newer

1 ze
2 3u BLKGRAD
3 d1
3u p11:f1 UNBLKGRAD
3u fq=cnst1(sfo hz):f1 ; set RF carrier to spectrum middle
(pl ph1):f1
d0
(pl ph0):f1
3u
(center (p45:sp25 ph0):f1 (p45:gpl)) ; zero-quantum suppression
d16
3u fq=cnst3(sfo hz):f1 ; switch RF carrier to low-field position
(p61:sp24 ph0):f1 ; adiabatic ramp to low-field spin-lock
3u p163:f1
p63:r:f1 ph0 ; low-field spinlock, Tmix / 2
3u p11:f1
(p61:sp26 ph0):f1 ; adiabatic ramp back from low-field spin-lock
3u
3u fq=cnst4(sfo hz):f1 ; switch RF carrier to high-field position
(p61:sp27 ph0):f1 ; adiabatic ramp to high-field spin-lock

```



```

3u p163:f1
p63:r:f1_ph0 ; high-field spinlock, Tmix / 2
3u p11:f1
(p61:sp28_ph0):f1 ; adiabatic ramp back from high-field spin-lock
3u
p16:gp2 ; homospoil gradient
dl6 fq=cnst1(sfo hz):f1 ; set RF carrier to spectrum middle
(center (p43:sp23_ph0):f1 (p43:gp1)) ; zero-quantum suppression
dl6
p1 ph2
go=2 ph31
3u BLKGRAD
dl mc #0 to 3 F1PH(ipl, id0)
3u BLKGRAD
exit

ph0= 0
ph1= 0 2
ph2= 0 0 2 2 1 1 3 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p163: f1 channel - power level for ROESY-spinlock and ramps
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p7: f1 channel - pulse for ROESY spinlock, half mixing time
;p61: 1 ms, f1 channel - adiabatic ramps for spinlock
;p15: ROESY mixing time
;p16: gradient pulses to purge undesired magnetization
;p43: 30 ms duration of zqs sweep
;spnam23: Crp_20kHz_30ms 20 kHz, 30 ms 180 deg adiabatic pulse
;p45: 50 ms duration of zqs sweep
;spnam25: Crp_20kHz_50ms 20 kHz, 50 ms 180 deg adiabatic pulse
;sp24: power level for the ramp, identical with p111
;sp26: power level for the ramp, identical with p111
;sp27: power level for the ramp, identical with p111
;sp28: power level for the ramp, identical with p111
;sp23: power level for the 30 ms zqs sweep
;sp25: power level for the 50 ms zqs sweep
;spnam24: jslowon adiabatic ramp to low-field spinlock
;spnam26: jslowoff adiabatic ramp back form low-field spinlock
;spnam27: jshighon adiabatic ramp to high-field spinlock
;spnam28: jshighoff adiabatic ramp back from high-field spinlock
;sp24, 27 / sp26, 28: adiabatic ramps to move magnetization to / from spin lock axis
;sp16: off-resonance CW spinlock pulses
;d0 : incremented delay (2D) setting gives 90/-180 0/1st order phase in f1
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;dl6: delay for homospoil/gradient recovery
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
;ns: 8 (full phase cycle)
;DS: 4
;cnst1: offset for on-resonance pulses
;cnst2: (gamma*B1)/(2*pi) field strength of spin-lock in Hz
;cnst3, cnst4: off-resonant offsets for low- and high-field spinlocks
;cnst31: Theta for the off resonance, Magic angle or 60 deg suggested
;v9: 5 % for randomization
;calculations of cnst3, cnst4 gives spinlock cnst31 degrees off z axis

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 2 : 46
;for z-only gradients:
;gpz1: 2 % for ZQ suppression with the chirp pulse simultaneously
;gpz2: 46 % homospoil gradient

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

;FnMODE : States TPPI
;suggested processing:
;QSINE window function with SSB=2 for both dimensions
;PH_mod=ph for both dimensions
;FCOR=1 for both dimensions
;FT_mod=no for both dimensions

```

A szelektív egydimenziós zqs-easy ROESY mérőprogram [IV] forráskódja Bruker gyártmányú műszerre

```

;sel ROESY spfgse easy gp zqs
;avance-version (03/05/16)
;Selective 1D symmetrized ROESY with adiabatic ramps for mixing with off-resonance
spinlocks

;SPFGE selective (ROESY) experiment
; J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler and A. J. Shaka:
; J. Am. Chem. Soc., 116, 6037-6038 (1994)
;symmetrization:
; J. Schleucher, J. Quant, S. Glaser, C. Griesinger:
; J. Magn. Reson A, 112, 144-151, 1995.
;implementation with adiabatic half-Gauss ramp pulses:
; C. M. Thiele, K. Petzold, J. Schleucher:
; Chem. Eur. J. 15, 585-588, 2009.
;with zero-quantum suppression before and after the off-resonance spin-lock
; M. J. Thrippleton, J. Keeler:
; Angew. Chem. Int. Ed. 42, 3938-3941 (2003)
; by S. Boros, Gy Batta 2010-2016 (this work, Magn. Reson. Chem. 2016)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"cnst1=0" ; offset for the on-resonance pulses
"cnst30=tan((cnst31/180)*3.1416)"
"cnst3=(cnst2/cnst30)" ; calculate high-field RF offsets for cnst31 degree pulses,
suggested 60 deg or magic angle
"cnst4=-((cnst2/cnst30))" ; calculate low-field RF offsets for cnst31 degree pulses
"p62=0.5*p15"

1 ze
2 30m
20u p11:f1 BLKGRAD
d1
50u UNBLKGRAD
(p1 ph1):f1
3u
p16:gp3
d16
p12:sp2:f1 ph4:r
3u
p16:gp3
d16 p11:f1
p1 ph3
3u
(center (p25:sp25 ph0):f1 (p25:gp1))
d16
3u fq=cnst3(sfo hz):f1 ;switch RF carrier to low-field position
(p61:sp24 ph0):f1 ;adiabatic ramp to low-field spin-lock
3u
(p62:sp16 ph0):f1 ;low-field spinlock, Tmix /2
3u
(p61:sp26 ph0):f1 ;adiabatic ramp back from low-field spin-lock
3u
3u fq=cnst4(sfo hz):f1 ;switch RF carrier to high-field position
(p61:sp27 ph0):f1 ;adiabatic ramp to high-field spin-lock
3u
(p62:sp16 ph0):f1 ;high-field spinlock, Tmix / 2
3u
(p61:sp28 ph0):f1 ;adiabatic ramp back from high-field spin-lock
3u
p16:gp2 ;homospoil gradient
d16 fq=cnst1(sfo hz):f1

```

```

(center (p23:sp23 ph0):f1 (p23:gp1))
d16
3u p11:f1
p1 ph2
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
20u BLKGRAD
exit

ph0=0
ph1=0 2
ph2=0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
    2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2
ph3=0 0 2 2
ph4=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2
    2 0 0 2 0 2 2 0 2 0 0 2 0 2 2 0

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp2: f1 channel - shaped pulse for selection
;spnam2: Gaus1.1000
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p6 : f1 channel - 90 degree low power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse
;p61: 1 ms, f1 channel - adiabatic ramps for spinlock
;p15: ROESY mixing time
;p16: homospoil/gradient pulse [1 msec]
;p23 : 30 ms duration of second sweep
;spnam23: Crp_20kHz_30ms 20 kHz, 30 ms, 180 deg adiabatic pulse
;sp23: power level for the second sweep
;p25 : 50 ms duration of first sweep
;spnam25: Crp_20kHz_50ms 20 kHz, 50 ms, 180 deg adiabatic pulse
;sp25: power level for the first sweep
;spnam16: jslock
;spnam24: jslowon adiabatic ramp to low-field spinlock
;spnam26: jslowoff adiabatic ramp back from low-field spinlock
;spnam27: jshighon adiabatic ramp to high-field spinlock
;spnam28: jshighoff adiabatic ramp back from high-field spinlock
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: (gamma*B1)/(2*pi) field strength of spin lock in Hz
;cnst31: Theta for the off resonance, Magic angle or 60 deg suggested
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4
;phcor 2 : phase difference between power levels sp1 and p11

;choose p12 according to desired selectivity
;the flip-angle is determined by the amplitude
; set 01 on resonance on the multiplet to be excited or use spoffs

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 2 : 46 : 15
;for z-only gradients:
;gpz1: 2 % for ZQ suppression with the chirp pulse simultaneously
;gpz2: 46 % homospoil gradient
;gpz3: 15 % gradient in the spfge block
;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100

```