

3.2.2. Analiza konformacyjna wokół wiązania glikozydowego C2

podstawionych tricyklicznych pochodnych guanozyny metodami NMR

Stan równowagi konformacyjnej *syn/anti* niemodyfikowanych nukleozydów pirymidynowych/purynowych w roztworze można określić za pomocą kilku metod:

i) pomiaru wielkości efektu NOE pomiędzy:

- protonem H6/H8 a protonem H1'
- protonem H6/H8 a protonami H2'/H3'/H4'
- protonem H2 a protonami rybozy

ii) pomiaru stałych sprzężeń:

- ${}^3J_{C2,H1'}$, ${}^3J_{C6,H1'}$ (nukleozydy pirymidynowe) i ${}^3J_{C8,H1'}$, ${}^3J_{C4,H1'}$ (nukleozydy purynowe)
- ${}^3J_{C2,C2'}$, ${}^3J_{C6,C2'}$ (nukleozydy pirymidynowe) i ${}^3J_{C8,C2'}$, ${}^3J_{C4,C2'}$ (nukleozydy purynowe)

iii) analizy zmian przesunięć chemicznych 1H i ${}^{13}C$ części cukrowej

Dystans pomiędzy protonami H8/H6 zasad a anomerycznym protonem H1' ściśle zależy od wartości kąta χ . Zakres odległości między w/w protonami przyjmuje wartości od 2.5 do 4.4 Å. Wyznaczając na podstawie efektu NOE szybkość wzajemnej relaksacji (krzyżowej) można określić zakres preferencji konformacyjnej wokół wiązania glikozydowego. Dla orientacji *syn* obserwuje się zdecydowanie silniejsze sygnały NOE aniżeli dla *anti*.

Kolejną, niezależną metodą w określaniu orientacji *syn/anti* jest wyznaczenie wielkości efektu NOE między protonami H6/H8 a H2'/H3'/H4'. Odległości między tymi protonami zależą nie tylko od wartości kąta χ ale również od pofałdowania rybozy.^{483,484,489} W tej metodzie niezbędne jest wcześniejsze ustalenie konformacji rybozy aby móc określić orientację wokół wiązania glikozydowego. W przypadku adenozyiny dodatkowo ustala się wielkość efektów NOE pomiędzy protonem H2 a protonami H1', H2', i H3'.

Wicynalne stałe sprzężenia ${}^3J_{C6/8,H1'}$, ${}^3J_{C2/4,H1'}$ pozwalają na określenie kąta χ na podstawie poniższych równań:⁴⁸¹

$${}^3J_{C6/8,H1'} = 4.5 \cos^2(\chi - 60^\circ) - 0.6 \cos(\chi - 60^\circ) + 0.1$$

$${}^3J_{C2/4,H1'} = 4.7 \cos^2(\chi - 60^\circ) - 2.3 \cos(\chi - 60^\circ) + 0.1$$

Porównanie wartości obu stałych sprzężeń pozwala także na wstępne, jakościowe określenie preferencji wokół wiązania glikozydowego. Gdy ${}^3J_{C6/8,H1'} > {}^3J_{C2/4,H1'}$ wówczas kąt χ przyjmuje wartości z zakresu *anti*, natomiast gdy ${}^3J_{C6/8,H1'} < {}^3J_{C2/4,H1'}$ wówczas kąt leży w zakresie *syn*. Ze względu na małą, naturalną zawartość izotopu ${}^{13}C$, nieznaczne wzbogacenie próbki tym izotopem poprawia intensywność sygnałów i dokładność pomiarów. Zastosowanie pomiarów homonuklearnych stałych sprzężeń ${}^3J_{C6/8,C2'}$, ${}^3J_{C2/4,C2'}$ do wyznaczania konformacji

syn/anti jest możliwe w przypadku całkowitego wzbogacenia odpowiednich atomów węgla izotopem ^{13}C .

Przesunięcia chemiczne $\text{H}2'$ i $\text{C}2'$ ($\delta^{\text{H}2'}$ i $\delta^{\text{C}2'}$) są w szczególności podatne na bliskie sąsiedztwo wolnych par elektronowych atomu $\text{O}^2/\text{N}3$ pirymidyn/puryn (lub $\text{N}4$ w przypadku omawianych związków tricyklicznych). Dla pochodnych pirymidyn i puryn podstawionych różnorodnymi grupami w $\text{C}6/8$ obserwuje się znaczące przesunięcie sygnału $\text{H}2'$ w stronę słabszego pola oraz zmniejszenie $\Delta\delta$ sygnałów $\text{C}2'$ i $\text{C}3'$ ($\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$).⁴⁶⁷⁻⁴⁷⁶ Te różnice przypisano efektom anizotropii grup O^2 lub $\text{N}3$ wskutek przyjęcia przez nukleozyd orientacji *syn*. Według V. Naira i wsp graniczna wartość $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ dla *anti* wynosi 2.8 ppm.⁴⁷¹ Położenie sygnału $\text{C}3'$ nie ulega tak znaczącym zmianom jak $\text{C}2'$ niezależnie od podstawnika w $\text{C}8$, stąd możliwe jest jakościowe określenie preferencji *syn/anti*.^{470,471} Ilościowe oszacowanie udziału konformerów *syn/anti* nukleozydów purynowych w oparciu o zmiany $\delta^{\text{H}2'}$ i $\delta^{\text{C}2'}$ opracował zespół D. Shugara.⁴⁷⁴ Metoda ta wymaga wstępnego wybrania dwóch analogów dla których przyjmuje się że posiadają 100% *syn* i 100% *anti*. Procentowy udział poszczególnych orientacji wylicza się z układu równań:

$$\begin{cases} \delta_{\text{obs}}\text{X}2' = P_{\text{syn}} \cdot \delta_{\text{syn}}\text{X}2' + P_{\text{anti}} \cdot \delta_{\text{anti}}\text{X}2' \\ 1 = P_{\text{syn}} + P_{\text{anti}} \end{cases}$$

gdzie:

δ_{obs} , δ_{syn} , δ_{anti} – przesunięcia chemiczne badanego związku oraz związków o wymuszonych konformacjach skrajnych

P_{syn} , P_{anti} – populacje konformerów *syn/anti*; ze względu na ogólnie przyjęty sposób oznaczania literą P kąta fazowego pseudorotacji, populację konformerów *syn/anti* w układzie równań D.Shugara oznaczam (P)

X – ^1H lub ^{13}C

Powyższe równanie stanowi uproszczoną wersję zależności, w pełnej postaci zawiera jeszcze poprawkę wynikającą z różnic w populacjach rotamerów wokół wiązania $\text{C}4'-\text{C}5'$.

Autorzy wykazali zbieżność wyników P_{syn} , P_{anti} uzyskanych na podstawie danych zarówno ^1H i ^{13}C NMR.

Wartość $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ dla $\text{C}2$ podstawionych pochodnych $\text{N}4$ -dezmetylwozyny znacząco spada do 0.1~0.5 ppm w porównaniu z wozyną ($\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}=5.28$ ppm) dla której stwierdzono 100% *anti*.^{29,30} Zmiany $\delta^{\text{C}2'}$ wynoszą od 2.67 do 3.12 ppm w stronę silniejszego pola, natomiast wartość zmian $\delta^{\text{C}3'}$ są minimalne co czyni kryterium $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ wiarygodnym w jakościowym określeniu preferencji *syn/anti* dla układu $\text{N}4$ -dezmetylwozyny. (Tabela 17, str. 141) Kierunek zmian $\delta^{\text{C}1'}$ nie jest jednakowy co należy przypisać bardziej wpływowi

podstawnika C2 aniżeli zmianom kąta χ . Identyczne zmiany $\delta^{C1'}$ obserwowano w serii 8 podstawionych analogach purynowych.^{470,471} Kierunek zmian $\delta^{H2'}$ w dół pola (0.4~0.7 ppm) jest zgodny z tym co zaobserwowano w pochodnych purynowych.⁴⁷²⁻⁴⁷⁴ Analiza zmian przesunięć ^1H i ^{13}C NMR analogów N4-dezmetylwozyny jednoznacznie wskazuje na wyraźną tendencję do przyjmowania przez nie orientacji *syn*. Przedstawione wyżej reguły oceny preferencji *syn/anti* w oparciu o dane ^1H i ^{13}C NMR mają ograniczone zastosowanie do pochodnych acetylowanych N4-dezmetylwozyny. (**Tabela 17**) Wartość $\Delta\delta^{C2'-C3'}$ jest znacznie większa dla C2 podstawionych pochodnych Vac_3 (0.9~1.4 ppm) w porównaniu z nieblokowanymi analogami. Natomiast dla Vac_3 wynosi 1.78 ppm. W konsekwencji różnica przesunięć C2' zmniejsza się do 0.9~1.7 ppm, jednak kierunek zmian w stronę silniejszego pola zostaje zachowany. Różnica przesunięć sygnału H2' w serii pochodnych Vac_3 nie ma istotnego znaczenia diagnostycznego dla acetylowych pochodnych, ze względu na małą ich wartość (0.1~0.2 ppm). Przyczynę tego stanu należy przypisać efektom indukcyjnym grup karbonylowych, które są bardziej widoczne w widmach ^1H aniżeli ^{13}C NMR. (**Tabela 17**)

Przystępując do wyliczenia procentowego udziału konformerów *syn/anti* wg metody D.Shugara i wsp przyjąłem 100% orientację *anti* dla wozyny oraz 100% *syn* dla 2-BrV. Wartości $\delta^{C2'}$ i $\delta^{H2'}$ pochodnych N4-dezmetylwozyny dla których wyznaczałem P_{anti} , mieszczą się w przedziałach wyznaczonych położeniami sygnałów w/w wzorców. Należy

Tabela 17. Wartości $\Delta\delta^{\text{C}}$ i $\Delta\delta^{\text{H}}$ części cukrowej i populacje konformerów *syn/anti* obliczone wg metody D. Shugara (P_{anti}) dla N4-dezmetylwozyny i jej pochodnych

	C2'-C3' ^a	$\Delta\delta^{C1'}$ ^b	$\Delta\delta^{C2'}$ ^c	$\Delta\delta^{C3'}$ ^d	$\Delta\delta^{H1'}$ ^e	$\Delta\delta^{H2'}$ ^f	$P_{\text{anti}} (^{13}\text{C})$	$P_{\text{anti}} (^1\text{H})$
V	3.27	—	—	—	—	—	72.9%	98.5%
2-MeOV	0.14	-0.26	-2.91	0.22	-0.12	0.38	4.9%	41.8%
2-BnOV	0.12	-0.42	-3.12	0.03	-0.08	0.41	0.0%	37.3%
2-MeSV	0.27	1.56	-3.02	-0.02	-0.10	0.54	2.3%	17.9%
2-MeV	0.53	1.10	-2.67	0.07	-0.06	0.37	10.5%	43.3%
2-HSV	0.44	2.08	-2.93	-0.10	0.57	0.55	4.4%	16.4%
2-BrV	0.18	3.39	-3.03	-0.03	-0.03	0.66	0.0%	0.0%
Vac_3	1.78	—	—	—	—	—	77.1%	70.4%
2-MeOV ac_3	0.88	-1.66	-1.64	-0.74	-0.21	0.11	1.8%	29.6%
2-BnOV ac_3	0.97	-1.55	-1.61	-0.80	-0.18	0.12	3.2%	25.9%
2-MeSV ac_3	0.91	0.36	-1.68	-0.81	-0.16	0.19	0.0%	0.0%
2-MeV ac_3	1.43	0.60	-0.88	-0.53	-0.09	0.08	36.7%	37.0%

a: różnica przesunięć C2' i C3' w badanym związku

b: różnica przesunięć C1' badanego związku i V lub Vac_3

c: różnica przesunięć C2' badanego związku i V lub Vac_3

d: różnica przesunięć C3' badanego związku i V lub Vac_3

e: różnica przesunięć H1' badanego związku i V lub Vac_3

f: różnica przesunięć H2' badanego związku i V lub Vac_3

pamiętać o względności otrzymanych rezultatów, wynikającej z arbitralności przyjętych założeń. W przypadku pochodnych acetylowych w analizie uwzględniłem jedynie dane ^{13}C NMR, przyjmując 100% orientację *anti* dla Wac_3 oraz 100% *syn* dla 2-MeSVac₃.

Wartości P_{anti} obliczone na podstawie podanego wyżej układu równań jednoznacznie wskazują na przewagę orientacji *syn* w C2 podstawionych pochodnych N4-dezmetrylowozyzny i jej triacetylowych analogów. Rozbieżności wartości P_{anti} uzyskanych na podstawie widm ^{13}C i ^1H prawdopodobnie wynikają z różnicy podatności atomów C2' i H2' na zmiany otoczenia chemicznego. Uważam, że metoda D.Shugara i wsp daje bardziej wiarygodne wyniki dla $\delta^{13}\text{C}$ NMR aniżeli ^1H NMR. Warto podkreślić, że tendencja do przyjmowania orientacji *syn* zostaje zachowana niezależnie od budowy układu heterocyklicznego zasady (C8 podstawione pochodne puryn vs C2 podstawione pochodne N4-dezmetrylowozyzny). Mam świadomość tego że wyniki te są obarczone błędem i nie precyzują dokładnie wartości kąta χ dla których spodziewam się znacznych rozbieżności.

W przypadku C2 podstawionych pochodnych wyozyzny, kierunek zmian $\delta^{\text{H}2'}$ względem wyozyzny jest zróżnicowany i wyraźnie uzależniony o rodzaju grupy w C2. W pochodnych tlenowych sygnał H2' pojawia się w słabszym polu, $\Delta\delta^{\text{H}2'}$ przybiera wartości 0.17-0.18 ppm (2-MeOW, 2-BnOW) lub 0.51 i 0.55 ppm (2-OW, N1-Me-2-OW). Natomiast w 2-MeW sygnał H2' pojawia się w słabszym polu, wartość $\Delta\delta^{\text{H}2'} = -0.12$ ppm. W 2-MeSW położenie H2' pozostaje bez zmian (**Tabela 18**, str. 143). Takie zróżnicowanie wartości $\Delta\delta^{\text{H}2'}$ można wytłumaczyć różnorodnością efektów anizotropowych spowodowanych bliskim sąsiedztwem podstawnika C2 i H2' wynikającego z obecności orientacji *anti*.

Położenie sygnału C2' po wprowadzeniu podstawnika w pozycję C2 wyozyzny ulega przesunięciu w stronę silniejszego pola, kierunek zmian jest identyczny z zaobserwowanym dla pochodnych N4-dezmetrylowozyzny. Zakres wartości $\Delta\delta^{\text{C}2'}$ względem wyozyzny wynosi od -2.58 ppm do -4.89 ppm. Natomiast sygnał C3' wykazuje większą zmienność położenia (od -0.98 do 0.46 ppm) w porównaniu z analogicznymi pochodnymi N4-dezmetrylowozyzny, dlatego zastosowanie kryterium $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ do jakościowej oceny przewagi orientacji *syn* lub *anti* w związkach typu wyozyzny staje się mało przydatne. Wartość $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ w pochodnych wyozyzny wykazuje dużą zmienność w zależności od charakteru podstawnika C2. Dla pochodnych tlenowych $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ wynosi 0.0 ppm (2-OW, N1-Me-2-OW) lub około 1.6 ppm (2-MeOW, 2-BnOW). W obecności grupy metylowej (2-MeW) lub metylotiolowej (2-MeSW) $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ wzrasta odpowiednio do 2.43 ppm i 3.68 ppm. Dla acetylowych odpowiedników pochodnych wyozyzny stwierdziłem mniejsze zróżnicowanie wartości $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ (1.8-3.7 ppm, **Tabela 18**). Uważam, że tak znacząca zmienność wartości $\Delta\delta^{\text{C}2'-\text{C}3'}$ w pochodnych wyozyzny może stanowić pośredni dowód na obecność orientacji *anti*.

Tabela 18. Wartości $\Delta\delta^C$ i $\Delta\delta^H$ części cukrowej i populacje konformerów *syn/anti* obliczone wg metody D. Shugara (P_{anti}) dla wyozyzny i jej pochodnych

	C2'-C3' ^a	$\Delta\delta C1'$ ^b	$\Delta\delta C2'$ ^c	$\Delta\delta C3'$ ^d	$\Delta\delta H1'$ ^e	$\Delta\delta H2'$ ^f	P_{anti} (¹³ C)	P_{anti} (¹ H)
W	5.28	—	—	—	—	—	100%	84.8%
2-MeOW	1.58	0.05	-3.47	0.23	-0.22	0.17	18.9%	63.3%
2-BnOW	1.61	0.16	-3.57	0.10	-0.21	0.18	16.6%	62.0%
N1-Me-2-OW	0.00	0.27	-4.82	0.46	-0.34	0.55	— ^g	15.2%
2-OW	0.00	0.08	-4.89	0.39	-0.37	0.51	— ^g	20.3%
2-MeSW	2.43	0.33	-3.23	-0.38	-0.06	0.00	24.5%	84.8%
2-MeW	3.68	-0.38	-2.58	-0.98	-0.08	-0.12	39.7%	100%
Wac ₃	2.08	—	—	—	—	—	100%	51.5%
2-MeOWac ₃	3.06	0.88	-0.76	-1.74	-0.21	-0.03	66.4%	55.9%
2-BnOWac ₃	2.76	1.47	-0.31	-0.99	-0.22	-0.03	86.3%	55.9%
N1-Me-2-OWac ₃	1.96	2.05	-0.26	-0.14	-0.37	0.26	88.5%	8.8%
2-OWac ₃	1.81	1.85	-0.46	-0.22	-0.41	0.29	79.6%	13.2%
2-MeSWac ₃	2.82	0.68	-0.3	-0.06	0.04	-0.22	53.1%	83.8%
2-MeWac ₃	3.69	-0.21	-1.48	-3.09	-0.03	-0.33	34.5%	100%

a: różnica przesunięć C2' i C3' w badanym związku

b: różnica przesunięć C1' badanego związku i W lub Wac₃

c: różnica przesunięć C2' badanego związku i W lub Wac₃

d: różnica przesunięć C3' badanego związku i W lub Wac₃

e: różnica przesunięć H1' badanego związku i W lub Wac₃

f: różnica przesunięć H2' badanego związku i W lub Wac₃

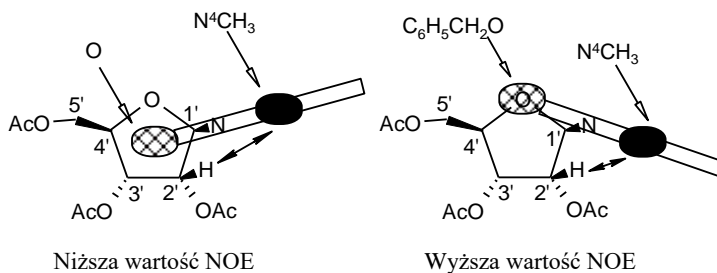
g: wartości przesunięć poza zakresem

W obliczeniach P_{anti} wyozyzny i jej nieblokowanych pochodnych jako wzorzec 100% orientacji *anti* przyjąłem W (dla $\delta^{C2'}$) i 2-MeW (dla $\delta^{H2'}$), natomiast jako wzorzec 100% orientacji *syn* przyjąłem 2-BrV. Dla pochodnych triacetylowych przyjąłem Wac₃ (100% *anti*) i 2-BrVac₃ (100% *syn*). Uzyskane na podstawie metody D. Shugara oszacowanie populacji rotamerów *anti* i *syn* dla pochodnych wyozyzny nie wskazuje jednoznacznie na przewagę orientacji *anti* (Tabela 18). Rozbieżność wyliczeń można wytłumaczyć bliską obecnością różnych podstawników C2 powodujących odmienne efekty indukcyjne na atomach H2' i C2'. Uważam, że wprowadzenie do metody D. Shugara i wsp dodatkowych poprawek uwzględniających efekty indukcyjne znacząco poprawi jej wiarygodność w odniesieniu do C2 podstawionych pochodnych wyozyzny.

Dla określenia orientacji wokół wiązania glikozydowego acetylowych pochodnych wyozyzny wykorzystałem pomiar efektu NOE między protonami zasady i części cukrowej oraz pomiar wicynalnych stałych sprzężenia $^3J_{C2,H1'}$, $^3J_{C3a,H1'}$. Wyżej wymienione pomiary wykonywałem samodzielnie w Narodowym Instytucie Chemii w Ljublanie (Słowenia) pod kierunkiem profesora Janeza Plaveca. W badanych związkach: Wac₃, 2-BnOWac₃, 2-OWac₃, N1-Me-2-OWac₃, i 2-MeSWac₃ wyniki pomiarów wskazują jednoznacznie na obecność

orientacji *anti*. Bezpośrednim dowodem wskazującym na obecność orientacji *anti* jest wysoka wartość wzmocnienia efektu NOE dla protonów H1' i N⁴CH₃ po naświetleniu odpowiednio N⁴CH₃ oraz H1'. (Tabela 19, str. 145) W przypadku związku macierzystego, Wac₃ dodatkowym potwierdzeniem jest również wysoka wartość wzmocnienia protonu H2' po nasyceniu H2 zasady. Wartość wzmocnień dla H1' i N⁴CH₃ po naświetleniu odpowiednio N⁴CH₃ i H1' mieściła się w zakresach 10.5-17.3% i 5.5-7.4%. Największe wzmocnienia zarejestrowałem dla 2-BnOWac₃ oraz N1-Me2-OWac₃, przyrost wartości wzmocnień układał się w następującej kolejności 2-OWac₃ < Wac₃ < 2-MeSWac₃ < N1-Me2-OWac₃ ≅ 2-BnOWac₃. Te znaczące zróżnicowanie obserwowanego efektu prawdopodobnie można powiązać z różnym usytuowaniem się płaszczyzny zasady względem reszty cukrowej a więc zróżnicowanymi wartościami kąta χ w rejonie *anti*. Potwierdzenie powyższego przypuszczenia może dostarczyć wstępne porównanie wartości wzmocnień H2'/N⁴CH₃ po nasyceniu sygnałów odpowiednio N⁴CH₃ i H2'.

(Rysunek 11) Dla 2-BnOWac₃ zarejestrowałem największą wartość wzmocnienia H2'/N⁴CH₃ wynoszącą 3.9%/1.3% co sugerowałoby obrót płaszczyzny zasady w stronę regionu *high-syn*, a więc zmniejszenie dystansu pomiędzy grupą N⁴CH₃ a



Rysunek 11 Zmiany odległości między protonami N4-CH₃ i H2' w zależności orientacji zasady względem części cukrowej

atomem H2'. Z kolei dla pozostałych związków zaobserwowałem mniejsze wartości wzmocnień dla H2'/N⁴CH₃, po nasyceniu N⁴CH₃/H2', w zakresie 0.1-0.5%/0.1-0.4% (Wac₃, 2-OWac₃, N1-Me-2-OWac₃) i 1.2%/0.9% (2-MeSWac₃). Wydają się, że w tych związkach kąt χ przyjmuje zbliżone wartości regionu *anti* i znacząco różne od 2-BnOWac₃.

Należy podkreślić, że uzyskanie informacji o przybliżonym zakresie wartości kąta χ na podstawie analizy wzmocnień H1'/N⁴CH₃ i H2'/N⁴CH₃ wymaga dodatkowych obliczeń dynamiki molekularnej w celu analizy zmian odległości między tymi protonami w zależności od konformacji części cukrowej i wartości kąta χ . Przeprowadzenie tych obliczeń znajduje się w moich planach badawczych. Dlatego też uzyskane wnioski dotyczące oceny zakresu wartości kąta χ w rejonie *anti* traktuję jako wstępne.

Wartości stałych sprzężeń ³J_{H1'C2}/³J_{H1'C3a} wskazują na obecność orientacji *anti*. Należy podkreślić, że pewne wątpliwości mogą budzić odchylenia uzyskanych wartości stałych sprzężeń od teoretycznie przewidywanych przez J.H. Ippel i wsp.⁴⁸¹ oraz zaobserwowanych wartości dla wyożyny wynoszących odpowiednio 5.1 Hz i 3.0 Hz.³⁰

Tabela 19. Wartości heteronuklearnych stałych sprzężeń ${}^3J_{\text{H}1'\text{C}2}$ i ${}^3J_{\text{H}1'\text{C}3\text{a}}$ i efektu NOE

Zw	${}^3J_{\text{H}1'\text{C}2}$ [Hz]	${}^3J_{\text{H}1'\text{C}3\text{a}}$ [Hz]	H nasycany	wzmocnienie NOE (%)
Wac ₃	11.2	7.4	N4CH ₃	H1' (13.3), H2' (0.2), H3' (0.1)
			H1'	N4CH ₃ (5.8)
			H2'	N4CH ₃ (0.1), H2' (16.3)
			H3'	H2 (2.4)
			H ²	H1' (0.7), H2' (17.1), H3' (2.0)
2-BnOWac ₃	7.1	4.9	N4CH ₃	H1' (17.3), H2' (3.9), H3' (0.0)
			H1'	N4CH ₃ (6.1)
			H2'	N4CH ₃ (1.3)
2-OWac ₃	7.8	4.2	N4CH ₃	H1' (10.5), H2' (0.5), H3' (0.6)
			H1'	N4CH ₃ (5.5)
			H2'	N4CH ₃ (0.4)
N1-Me-2-OWac ₃	7.9	4.1	N4CH ₃	H1' (14.2), H2' (0.1), H3' (0.3)
			H1'	N4CH ₃ (7.4)
			H2'	N4CH ₃ (0.1)
			H3'	H2' (0.5), H3' (0.2)
2-MeSWac ₃	7.4	4.7	N4CH ₃	H1' (14.5), H2' (1.2), H3' (0.3)
			H1'	N4CH ₃ (6.0)
			H2'	N4CH ₃ (0.9), S ² CH ₃ (0.4)

^a CDCl₃ (TMS), T=298K

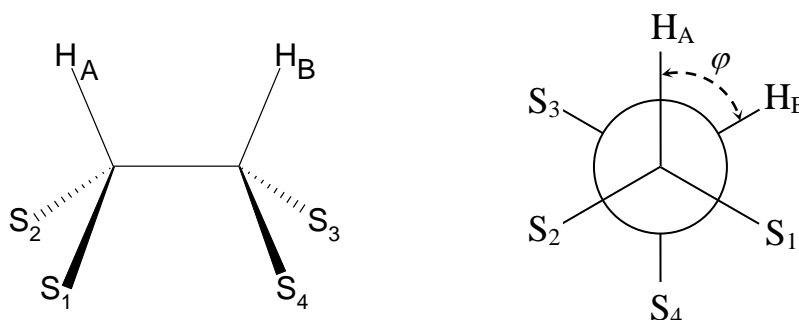
3.2.3. Analiza konformacyjna β -D-rybofuranozy metodami NMR. Podstawy teoretyczne oraz metodyka obliczeń z użyciem programu PSEUROT

Pierścień D-rybofuranozy, (oraz pozostałych furanoz) może przyjąć jedną z dwóch charakterystycznych konformacji: typu koperty (E, ang. *envelope*) lub półkrzesła (skręconą, T, ang. *twist*).⁵² Konformacja typu E występuje wówczas gdy jeden z atomów pierścienia znajduje się poza płaszczyzną wyznaczoną przez cztery pozostałe, natomiast w konformacji typu T dwa sąsiadujące atomy zajmują przeciwstawne położenie względem płaszczyzny utworzonej przez pozostały fragment pierścienia furanozy. Kierunek wychylenia określany jest jako *endo* gdy atom znajduje się po tej samej stronie co atom C5' grupy hydroksymetylenowej, w przeciwnym razie mówimy o pozycji *egzo*. W przypadku pofałdowania typu T, oba sąsiadujące atomy biorące udział w wychyleniu zajmują przeciwstawne pozycje. Każdy spośród pięciu atomów pierścienia może być wychylony w kierunku *egzo* lub *endo*, co prowadzi do istnienia 10 możliwych konformacji typu E oraz 10 typu T. Wg koncepcji Altony i Sundaralingama geometrię pofałdowania furanozy można jednoznacznie opisać dwoma parametrami: P i Φ na podstawie wartości kątów torsyjnych ν_i w obrębie pierścienia cukrowego (wzory oraz bardziej szczegółowe objaśnienia przedstawiłem w rozdziale 2.1.2 części literaturowej).⁶ Znając strukturę krystalograficzną nukleozydu, wyznaczenie wartości obu parametrów jest proste, polega na wstawieniu do odpowiednich wzorów zmierzonych kątów torsyjnych ν . W przypadku badania konformacji rybozy w roztworze, określenie typu pofałdowania jest bardziej złożone i opiera się na analizie następujących parametrów uzyskanych na drodze eksperymentów NMR:

- homonuklearnych sprzężeń skalarnych $^3J_{H1'H2'}$, $^3J_{H2'H3'}$, $^3J_{H3'H4'}$.^{60,482-484}
- heteronuklearnych sprzężeń skalarnych $^nJ_{CH}$.⁴⁸⁵⁻⁴⁸⁸
- wielkości NOE pomiędzy protonami w obrębie pierścienia cukrowego.^{489,490}

Wartości wicynalnych stałych sprzężeń $^3J_{HH}$ w układach H-C-C-H silnie zależą od kąta torsyjnego φ (**Rysunek 12**) oraz od elektroujemności $\Delta\chi$ podstawników S1, S2, S3, S4.

Rysunek 12. Kąt torsyjny φ pomiędzy H-C-C-H rybozy



Zależność ta opisana jest uogólnionym równaniem Karplusa

$${}^3J_{\text{HH}}=A_1 \cdot \cos^2(\varphi)+A_2 \cdot \cos(\varphi)+A_3+\sum_i \Delta\chi_i \cdot [A_4+ A_5 \cdot \cos^2(\zeta+A_6 \cdot |\Delta\chi_i|)] \quad (1)$$

gdzie parametry A_1 do A_6 wyznaczone są eksperymentalnie (**Tabela 20**), człon sumowania obejmuje wszystkie podstawniki fragmentu H-C-C-H, natomiast wartość ζ uzależniona jest od orientacji podstawnika i wynosi +1 dla S_1 i S_3 lub -1 dla S_2 i S_4 .^{491,492} Parametr $\Delta\chi_i$ jest różnicą elektroujemności wg skali Hugginsa⁴⁹³ poszczególnych podstawników względem atomu wodoru, uwzględnia on wpływ podstawników S_1 - S_4 na wartość sprzężenia ${}^3J_{\text{HH}}$ i wylicza się go z następującego wzoru:

$$\Delta\chi_i=\Delta\chi_i^\alpha-\sum_j A_7 \cdot \Delta\chi_j^\beta, \quad (2)$$

gdzie $\Delta\chi_i^\alpha$ i $\Delta\chi_j^\beta$ są elektroujemnościami podstawników w pozycjach α i β , parametr A_7 jest poprawką dla α -podstawnika uwzględniającą wpływ obecności β -podstawników.

Tabela 20. Wartości parametrów A_i w uogólnionym równaniu Karplusa

Fragment	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7
CH ₂ CH	13.22	-0.99	0	0.87	-2.46	19.9°	0.0
CHCH	13.24	-0.91	0	0.53	-2.41	15.5°	0.19

Kąty torsyjne φ_{HH} w pierścieniu furanozy można wyrazić jako funkcję parametrów pofałdowania pierścienia P i Φ :

$$\varphi_{\text{HH}}=B_i+A_i \cdot \Phi \cdot \cos(P+d_i) \quad (3)$$

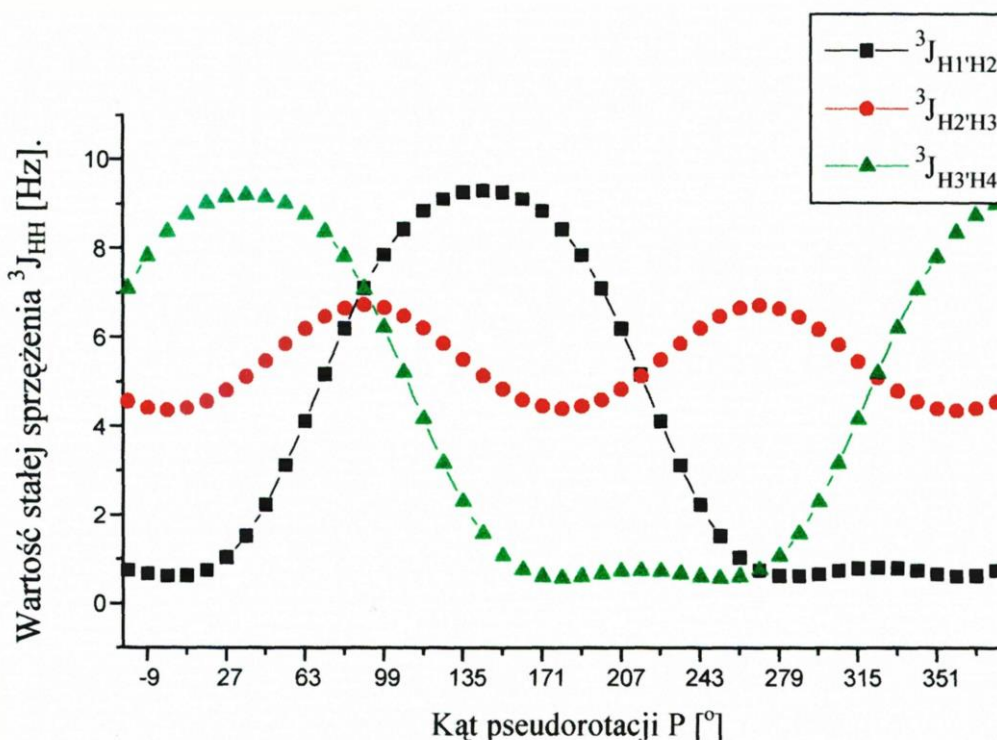
W przypadku β -D-rybofuranazy równania dla poszczególnych kątów $\varphi_{1'2'}$, $\varphi_{2'3'}$ i $\varphi_{3'4'}$ przyjmują następującą postać:

$$\begin{aligned} \varphi_{1'2'} &= 123.3^\circ + 1.102 \cdot \Phi \cdot \cos(P - 144^\circ) \\ \varphi_{2'3'} &= 0.2^\circ + 1.090 \cdot \Phi \cdot \cos(P) \\ \varphi_{3'4'} &= -124.9^\circ + 1.095 \cdot \Phi \cdot \cos(P + 144^\circ) \end{aligned} \quad (4)$$

Równania (1-4) pokazują wyraźną zależność wartości stałych sprzężeń ${}^3J_{\text{H1}'\text{H2}'}$, ${}^3J_{\text{H2}'\text{H3}'}$, ${}^3J_{\text{H3}'\text{H4}'}$ od kąta fazowego pseudorotacji P i amplitudy pofałdowania Φ . Wykresy tych funkcji dla $\Phi=40^\circ$ przedstawione są na **Rysunku 13**.

Powyższe zależności jednoznacznie wskazują na wysoką przydatność stałych sprzężeń ${}^3J_{\text{HH}}$ a w szczególności ${}^3J_{\text{H1}'\text{H2}'}$ i ${}^3J_{\text{H3}'\text{H4}'}$ do określenia konformacji rybozy. Dla czystych konformerów z regionu *North* wartości stałej sprzężenia ${}^3J_{\text{H1}'\text{H2}'}$ są niewielkie (poniżej 3 Hz), natomiast ${}^3J_{\text{H3}'\text{H4}'}$ przyjmuje wartość ponad 7 Hz. Odwrotna zależność jest obserwowana dla czystych konformerów *South*. Występowanie szybkich przejść między konformerami obu

Rysunek 13. Zależność wicynalnych stałych sprzężeń ${}^3J_{HH}$ pierścienia β -D-rybofuranozy od kąta fazowego pseudorotacji P wg uogólnionego równania Karplusa dla $\Phi=40^\circ$ ⁴⁹⁴



regionów prowadzi do uśrednienia się obu sprzężeń ${}^3J_{H1'H2'}$ i ${}^3J_{H3'H4'}$ przyjmujące wartości najczęściej w zakresie 3-7 Hz. W takich przypadkach, w analizie preferencji konformacyjnej uwzględnia się model dwustanowy N i S, który zakłada istnienie stanu równowagi pomiędzy dwoma populacjami konformerów o różnych stężeniach molowych.^{495,496} Wówczas, każda eksperymentalna wartość sprzężenia ${}^3J_{HH}$ jest liniowo zależna od populacji stanów oraz ich wartości stałych sprzężeń dla poszczególnych konformerów. Zależność tę opisuje wzór:

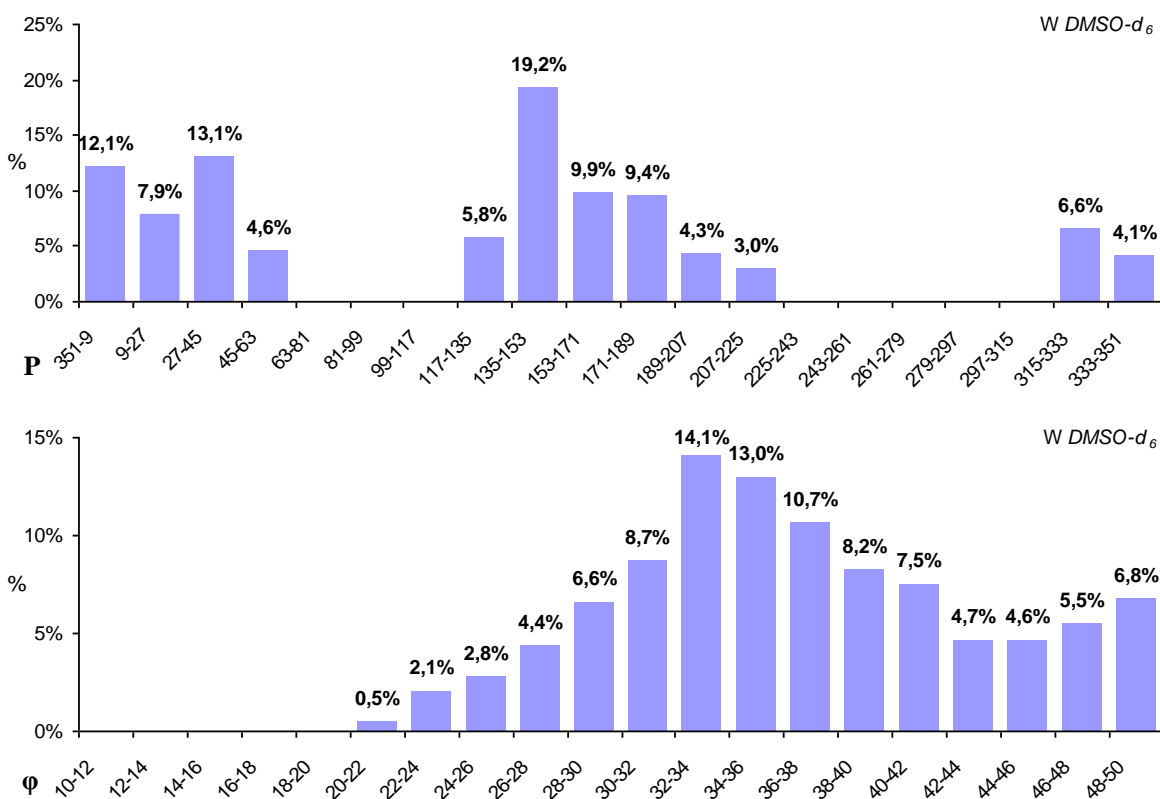
$$J_{\text{exp}} = X_N \cdot J_N + (1 - X_N) \cdot J_S \quad (5)$$

gdzie X_N oznacza ułamek molowy populacji *North*. Wykorzystanie wzorów (1-5) pozwala na wyznaczenie pięciu parametrów P_N , Φ_N , P_S , Φ_S i X_N opisujących geometrię pofałdowania i równowagę między obiema populacjami *North* i *South* w taki sposób aby obliczone dla nich teoretyczne wartości ${}^3J_{HH}$ jak najmniej różniły się od eksperymentalnych. Optymalizację w/w parametrów dla zsyntetyzowanych pochodnych układu zarówno samej wyożyny jak i jej N4-dezmetyloprekursora przeprowadziłem za pomocą programu PSEUROT (wersja 6.0).^{495,496}

3.2.3.1. Analiza konformacyjna części cukrowej C2 podstawionych pochodnych wyozyiny

Część cukrowa wyozyiny (W) preferuje konformery C2'-endo-C1'-egzo (19,2%; P=135-153°), C3'-endo-C4'-egzo (13,1%; P=27-45°) oraz C3'-endo-C2'-egzo (12,1%; P=351-9°). Nieco mniejszy udział w granicach 8-10% wykazują konformery C2'-endo, C2'-endo-C3'-egzo, C3'-endo. Największy udział w całkowitej populacji wykazują typy pofałdowania w których atomy C2' lub C3' zajmują orientację *endo*, odpowiednio 38,5% (P=135-189°) lub 33,1% (P=351-45°). Sumaryczne procentowe udziały konformerów regionów *North* oraz *South* są sobie prawie równe (odpowiednio 48,4 i 51,6%). W przypadku rozkładu udziału procentowego w zależności od amplitudy pofałdowania, obserwowane maksimum przypada na $\varphi=32-36^\circ$ (27,1%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (54,7%) wynosi 30° do 40° . (**Wykres 1**)

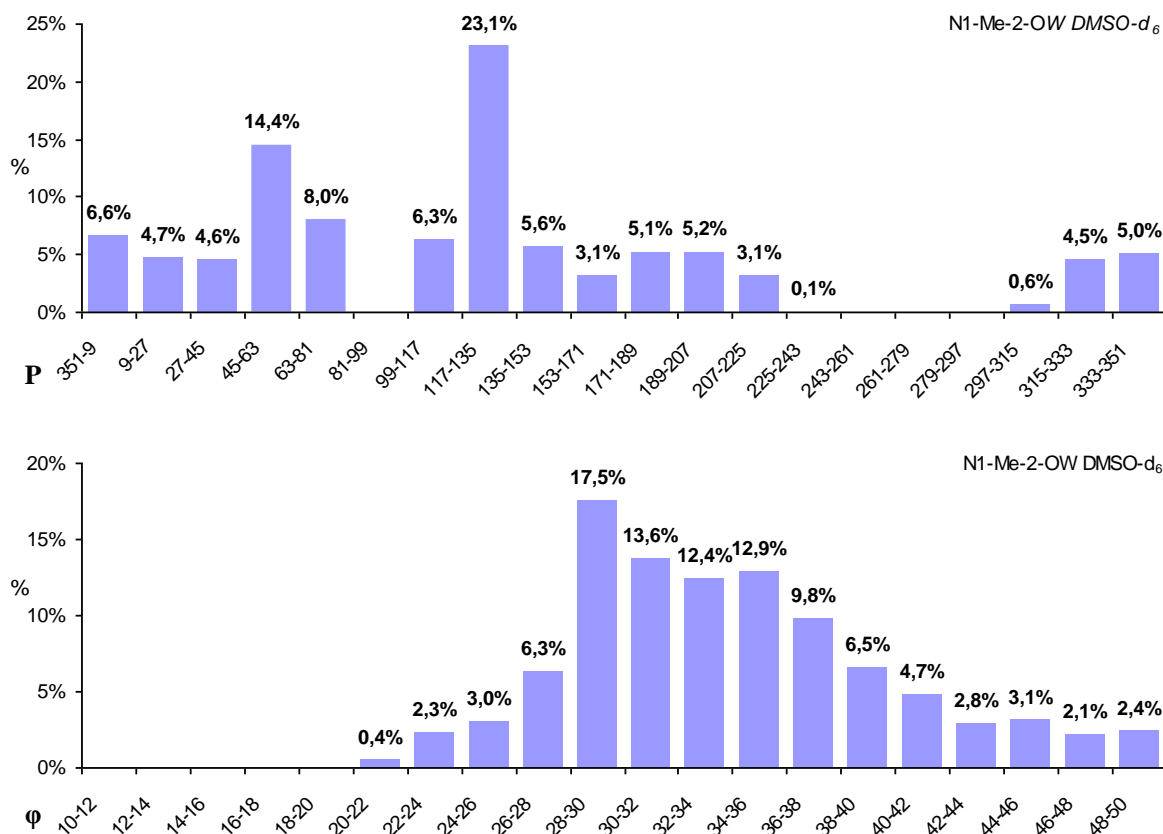
Wykres 1. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla W



Wprowadzenie grupy okso w położenie C2 zasadniczo zmienia rozkład preferencji pofałdowania części cukrowej przesuując maksimum udziału w stronę pogranicza regionów *South-East*. W przypadku N1-metylo-2-oksowyozyiny największy udział procentowy przypada na pofałdowanie C1'-egzo (23,1%; P=117-135°) nieco mniejszy udział wykazują konformery z pogranicza *North-East*: C4'-egzo (14,4%; P=45-63°) oraz O4'-endo-C4'-egzo (8,0%; P=63-81°, **Wykres 2**). Natomiast udział konformerów z pozostałych regionów koła pseudorotacyjnego oscyluje w granicach 3-6%. Zdecydowanie preferowanymi konformerami

są takie w których atom C1' lub C4' zajmuje pozycję *egzo*, suma ich udziałów wynosi odpowiednio 29,4% dla P=99-135° lub 22,4% dla P=45-81°. Sumaryczny udział procentowy konformerów regionu *South* jest nieznacznie większy od *North*, i wynosi on odpowiednio 51,6% oraz 48,4%. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania występuje w niższym zakresie wartości $\varphi=28-32^\circ$ (31,1%) wskazując na nieznaczne spłaszczenie pierścienia rybozy w porównaniu z W, natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (56,4%) wynosi od 28° do 36°.

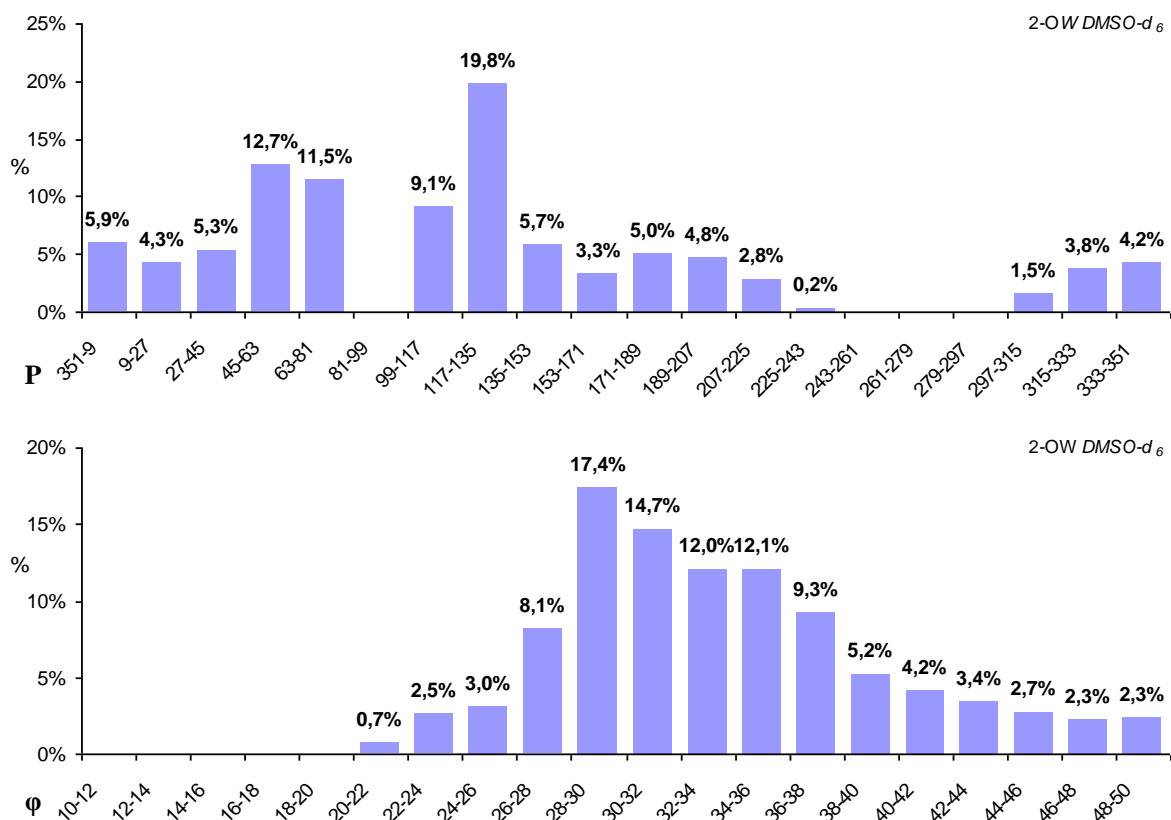
Wykres 2. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla N1-Me-2-OW



Podobnie jak w N1-Me-2-OW, obecność grupy karbonylowej w 2-OW wymusza, w porównaniu z macierzystym związkiem W, przesunięcie równowagi w kierunku pogranicza regionów *North-East/South-East*. Największy udział przypada na konformer C1'-*egzo* (19,8% P=117-135°), oraz mniejszy udział dla konformerów z pogranicza *North-East* (C4'-*egzo*, 12,7%, P=45-63° i O4'-*endo*-C4'-*egzo*, 11,5%, P=63-81°). Ponadto w regionie *East* stwierdziłem pewien udział konformera O4'-*endo*-C1'-*egzo* (9,1%, P=99-117°). Udział pozostałych konformerów jest zdecydowanie mniejszy, oscylując w przedziale 2-6%. (**Wykres 3**) Podobnie jak w N1 metylowym analogu w przewodzie są konformery, w których atom C1' lub C4' zajmują pozycję *egzo*, których sumaryczne udziały wynoszą odpowiednio 28,9% dla P=99-135° lub 24,2% dla P=45-81°. Suma populacji konformerów regionu *South* jest nieznacznie większa od *North*, wynosi odpowiednio 50,7% i 49,3%. Maksimum rozkładu

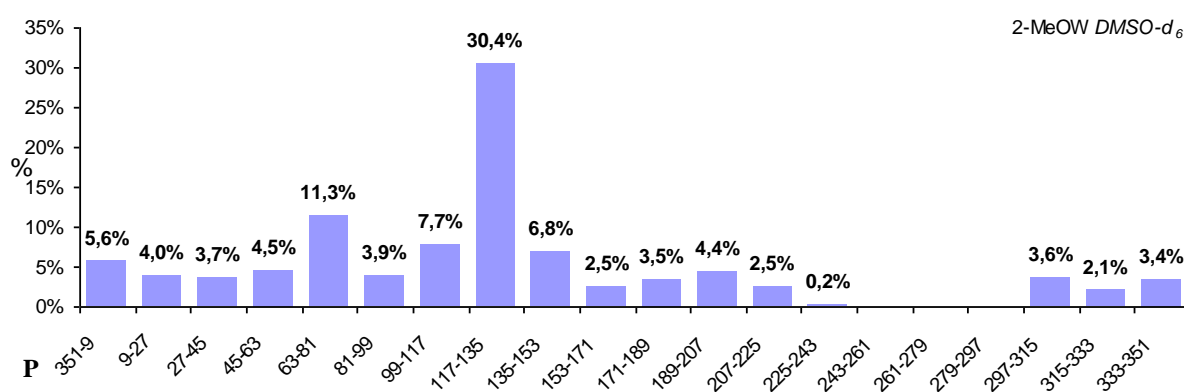
amplitudy pofałdowania przypada na niższy zakres wartości $\varphi=28-32^\circ$ (32,1%) podobnie jak w N1-Me-2-OW, natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (56,2%) wynosi od 28° do 36° .

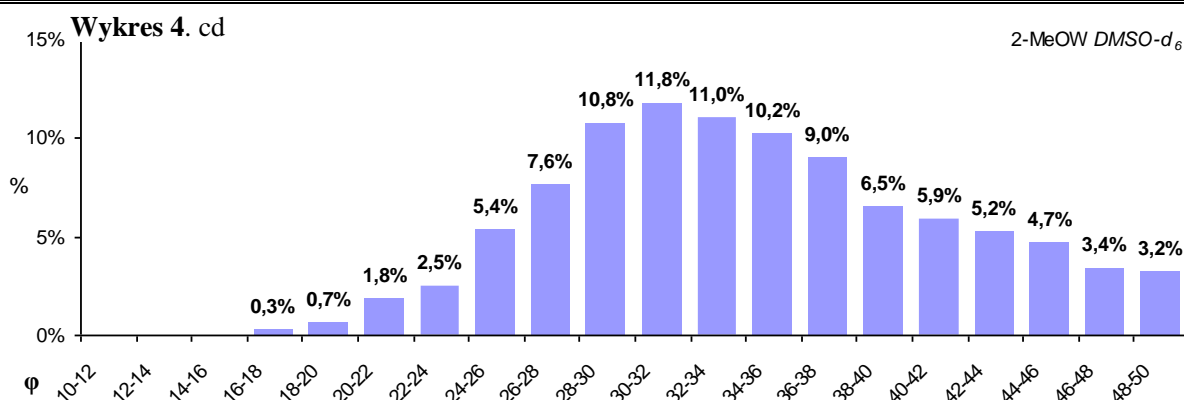
Wykres 3. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-OW



Zdecydowanie dominującym konformerem w 2-MeOW jest C1'-*egzo* (30,4% P=117-135°), w porównaniu z dwoma wyżej omówionymi tlenowymi analogami. Udział pofałdowań O4'-*endo*-C4'-*egzo* oraz O4'-*endo*-C1'-*egzo* jest znacznie mniejszy i wynosi odpowiednio 11,3% (P=63-81°) i 7,7% (P=99-117°, **Wykres 4**) Populacja konformeru C4'-*egzo* jest znacznie mniejsza (4,5%) w porównaniu z pochodnymi 2-oksowyozyny. Udział pozostałych konformerów przyjmuje wartości poniżej 6%. Sumaryczny udział procentowy konformerów regionu *South* jest wyraźnie większy od *North*, wynosi odpowiednio 58% i 42%.

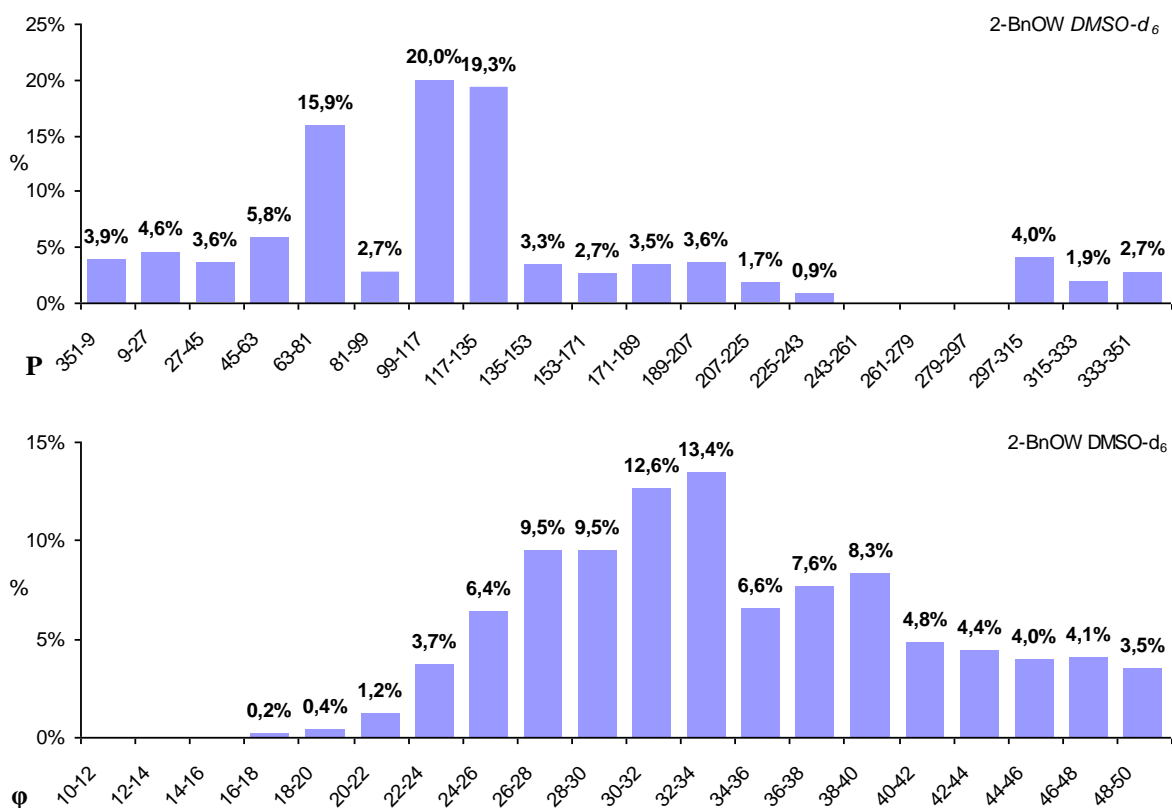
Wykres 4. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeOW





Maksimum rozkładu amplitudy połańdowania przypada na zakres wartości $\varphi=28-34^\circ$ (33,6%), natomiast zakres amplitudy połańdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (52,8%) wynosi od 28° do 38° .

Obecność grupy benzyloksylowej wymusza przewagę konformerów $O4'-endo-C1'-egzo$ (20,0% $P=99-117^\circ$) i $C1'-egzo$ (19,3% $P=117-135^\circ$), nieco mniejszy udział obserwujemy dla $O4'-endo-C4'-egzo$ (15,9% $P=63-81^\circ$, **Wykres 5**). Przewaga konformerów typu $C1'-egzo$ (39,3%) jest prawdopodobnie spowodowana sterycznym oddziaływaniem grupy benzylowej z resztą cukrową. W takiej konformacji wiązanie glikozydowe jest usytuowane pseudoekwatorialnie umożliwiając maksymalne oddalenie się podstawnika C2 od reszty cukrowej. Udział pozostałych konformerów nie przekraczał 6%. Sumaryczny udział procentowy konformerów typu *South* jest wyraźnie większy od *North* i wynosi odpowiednio **Wykres 5**. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia połańdowania (φ) rybozy dla 2-BnOW

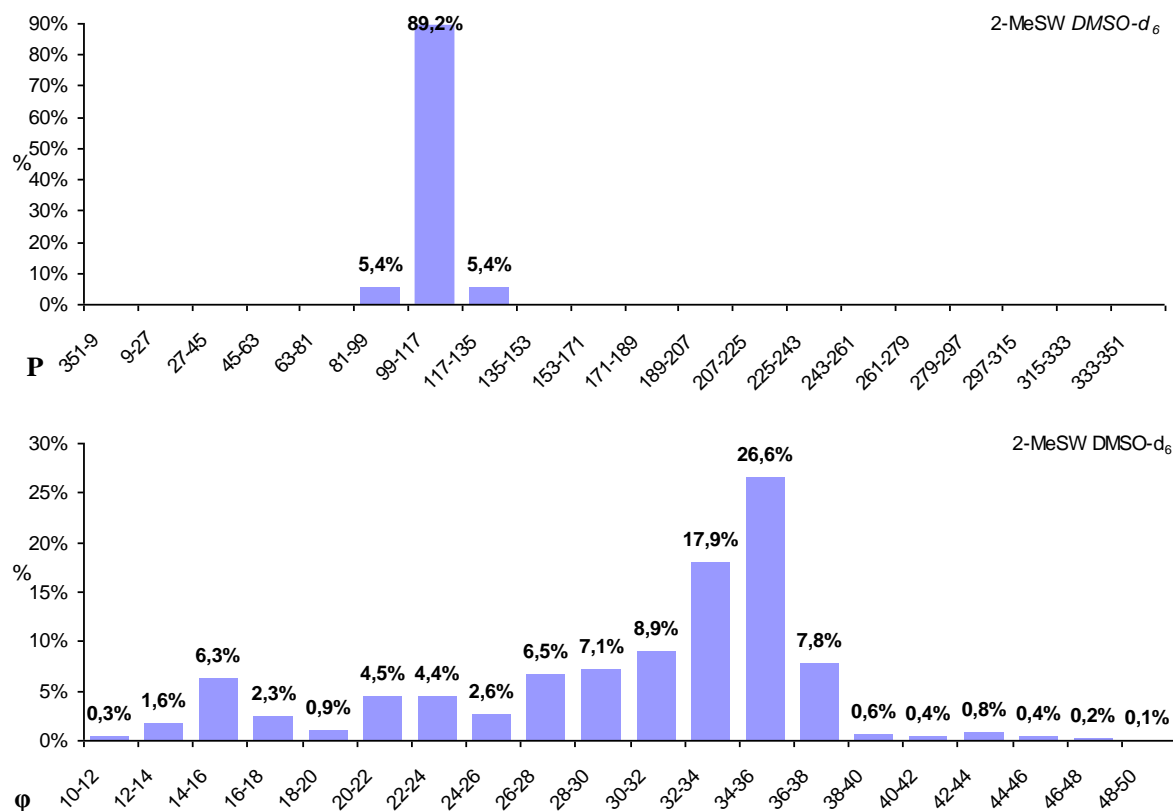


55% i 45%. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na zakres wartości $\varphi=30-34^\circ$ (26,0%), zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (51,6%) wynosi od 26° do 36° .

Podsumowując, preferencje konformacyjne części cukrowej pochodnych wyozyzny zawierające atom tlenu w pozycji C2 są podobne i koncentrują się wokół typów pofałdowań w których główny udział mają atomy C1' i C4' w pozycji *egzo*. Zróżnicowanie populacji w zakresie dominujących pofałdowań β -D-rybofuranozy wskazuje na pewien margines swobody konformacyjnej części cukrowej w warunkach zahamowanej rotacji wokół wiązania glikozydowego. Wzrost objętości podstawnika wyraźnie skierowuje preferencje w stronę konformerów O4'-*endo*-C1'-*egzo*. Amplituda pofałdowania przedstawionych wyżej pochodnych wyozyzny jest nieznacznie spłaszczona w porównaniu z samą wyozyzną.

Pofałdowanie części cukrowej 2-metylotiowyozyzny (2-MeSW) okazało się być ograniczone do wąskiego zakresu w regionie *East* ($P=99-117^\circ$) odpowiadającemu konformacji typu O4'-*endo*-C1'-*egzo*, procentowy udział tego konformera jest bardzo wysoki wynosi 89,2%. (**Wykres 6**) Pozostałe udziały przypadają na pofałdowania O4'-*endo* (5,4%) i C1'-*egzo* (5,4%). Wytłumaczeniem istnienia tak wąskiej preferencji może być znaczący wpływ odpychania sterycznego pomiędzy atomem siarki a łańcuchem 5'-CH₂OH, prowadzący do zwiększenia odległości między nimi co jest możliwe jedynie w konformerach regionu *East*. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na najwyższy w tej serii

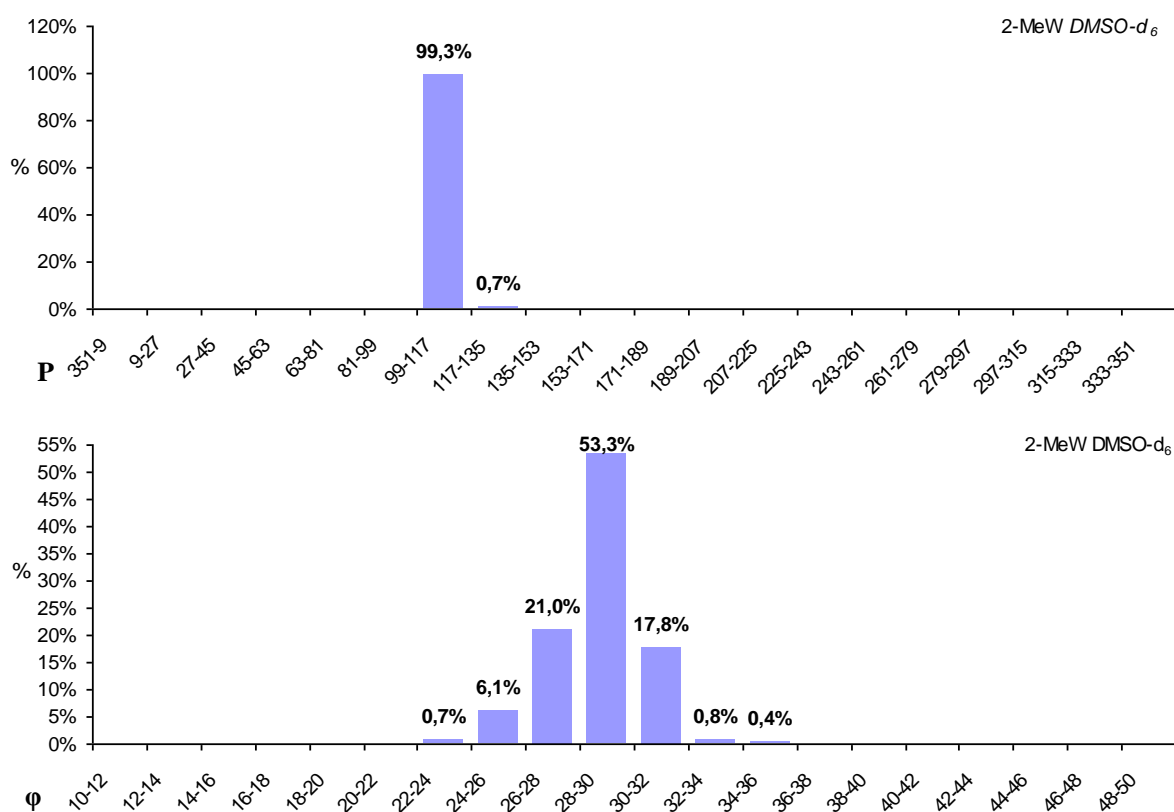
Wykres 6. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeSW



związków zakres wartości $\varphi=34-36^\circ$ (26,6%) natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów(52,3%) wynosi od 32° do 38° .

Bezpośrednie podstawienie pozycji C2 wyożyny grupą metylową (2-MeW) wywiera wpływ na preferencje pofałdowania części cukrowej bardzo zbliżony do opisanego wyżej dla grupy C2 metylotiolowej. Pofałdowanie części cukrowej 2-MeW jest ograniczone do jednego konformera: O4'-endo-C1'-egzo (99,3%, P=99-117°), leżącego w regionie *East* (**Wykres 7**). Wynik ten jest zgodny z uzyskanymi wcześniej obliczeniami.³¹ Podobnie jak w 2-MeSW, występowanie pofałdowania tylko w tym zakresie można wytłumaczyć obecnością wyraźnej tendencji do zminimalizowania oddziaływania sterycznego między dużą przestrzennie grupą metylową a resztą cukrową. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na zakres wartości $\varphi=28-30^\circ$ (53,3%), a więc pierścień jest nieco spłaszczony w porównaniu z 2-MeSW, natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący 92,1% populacji konformerów wynosi od 26° do 32° .

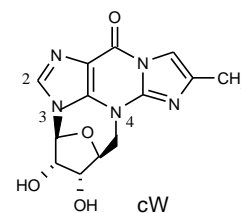
Wykres 7. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeW



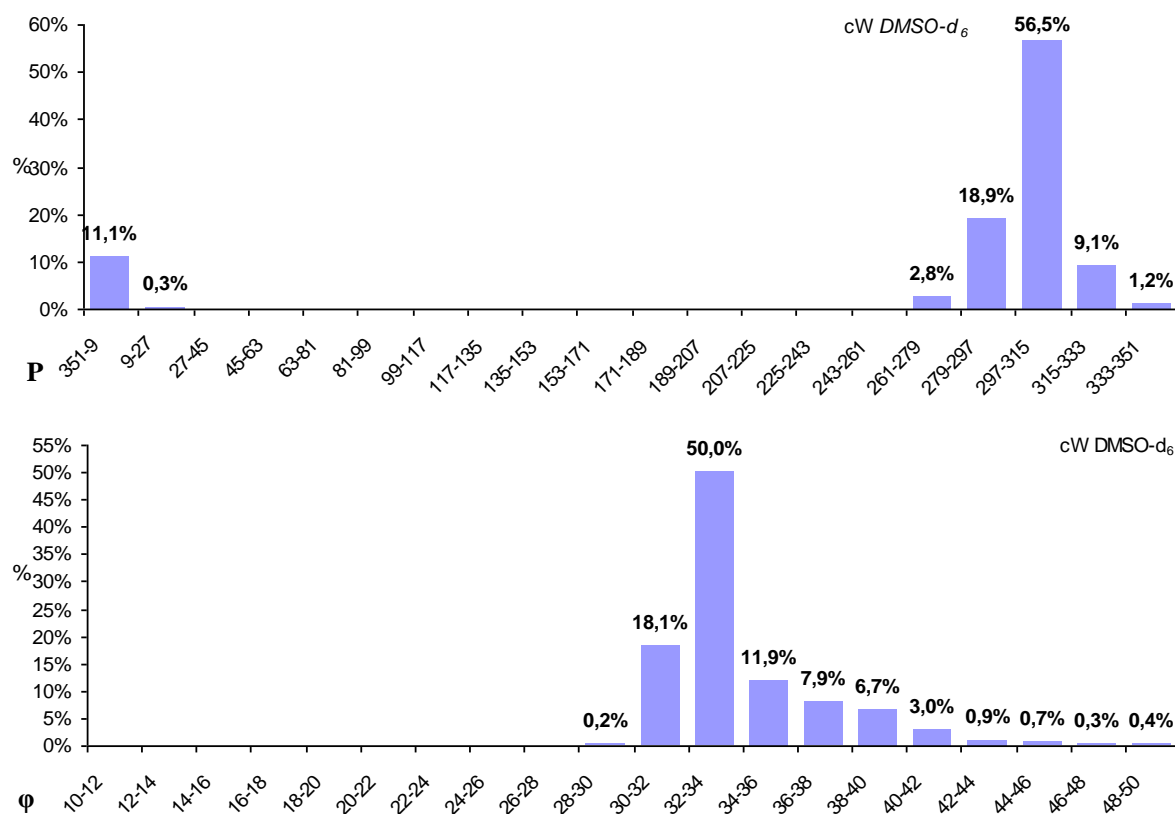
Wyraźna przewaga jednego typu konformera w pochodnych metylo- i metylotiolowej wydaje się wskazywać na decydujący wpływ wielkości odpowiednio grupy lub atomu, bezpośrednio przyłączonych do C2, na kształtowanie pofałdowania części cukrowej. Potwierdzenie powyższego przypuszczenia może dać porównanie rozkładu preferencji pofałdowania 2-MeSW z 2-MeOW. Atom siarki jako objętościowo większy od atomu tlenu wymusza bardzo wąski zakres przyjmowanych konformacji części cukrowej. Obecność grupy

metylowej w 2-MeSW i 2-MeOW wydaje się odgrywać mało istotny wpływ na pofałdowanie. Dopiero zwiększenie objętości podstawnika przez wprowadzenie grupy fenylovej w 2-BnOW powoduje ponad dwukrotny wzrost udziału O4'-endo-C1'-egzo w porównaniu z pozostałymi tlenowymi pochodnymi wyozyzny.

Ostatnim związkiem jaki poddałem analizie w tej serii jest cykliczna pochodna wyozyzny - 4,5'-cyklowyozyzna (cW, **346**) zawierająca wiązanie pomiędzy C5' a N4, czyli ograniczoną swobodę rotacji wymuszoną obecnością wiązania kowalencyjnego. Ponieważ dla związku tego są dostępne dane krystalograficzne ($P=309^\circ$, $\varphi_{\max}=40^\circ$)⁴²⁴ postanowiłem przeanalizować konformację części cukrowej w roztworze DMSO- d_6 . Uzyskany wynik, praktycznie pokrywał się z wynikiem dla ciała stałego. Dominującym konformerem w ogólnej populacji był C1'-endo (56,5%; $P=297-315^\circ$), nieco mniejsze udziały przypadały na sąsiednie typy pofałdowań - C1'-endo-O4'-egzo (18,9%, $P=279-297^\circ$) i C1'-endo-C2'-egzo (9,1%, $P=315-333^\circ$, **Wykres 8**). Należy dodać iż obserwowane typy pofałdowań zarówno w ciele stałym jak i roztworze są praktycznie niespotykane w nukleozydach posiadających swobodę rotacji wokół wiązania glikozydowego. W przypadku rozkładu częstości występowania w zależności od amplitudy pofałdowania maksimum przypadało na $\varphi=32-34^\circ$ (50,0%), nieco mniejszy w zakresach $\varphi=30-32^\circ$ (18,1%) i $\varphi=34-36^\circ$ (11,9%). Obserwowana zbieżność danych w ciele stałym i roztworze wskazuje na fakt najsilniejszego oddziaływania dodatkowego wiązania



Wykres 8. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla cW



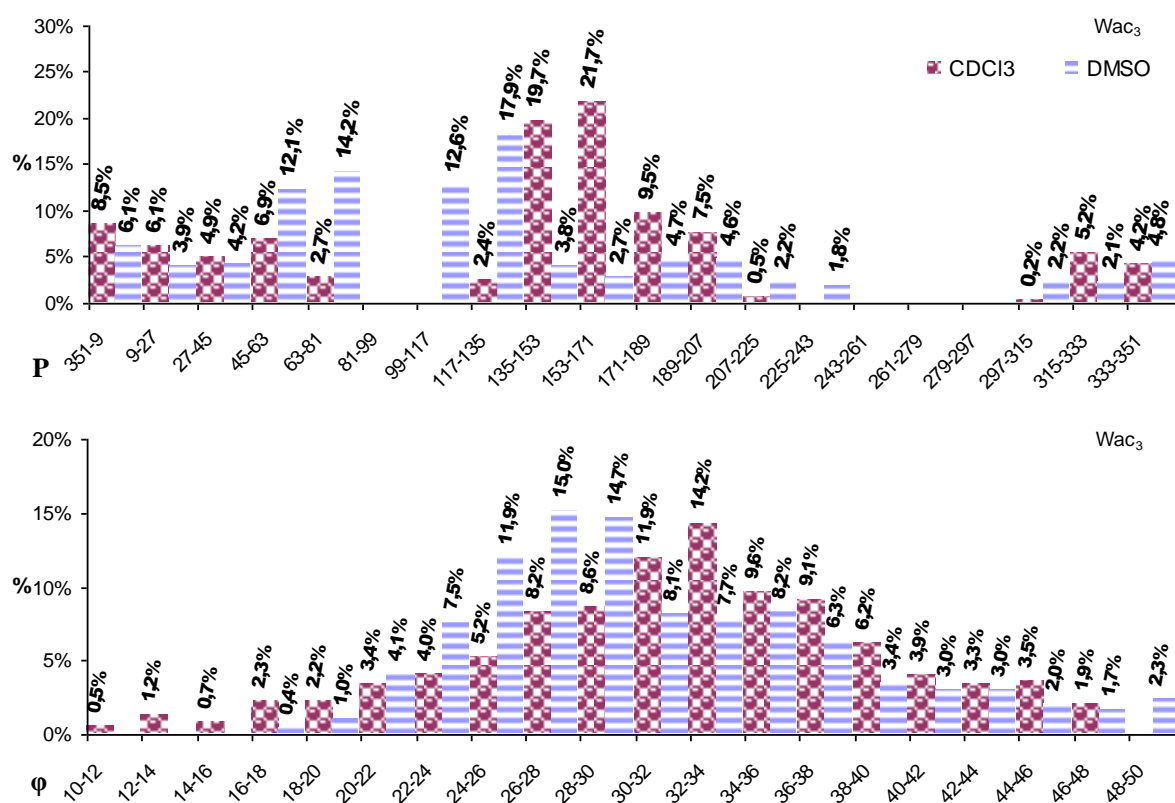
kowalencyjnego na konformację rybozy w porównaniu modyfikacjami polegającymi na wymianie podstawników.

3.2.3.2. Analiza konformacyjna części cukrowej C2 podstawionych pochodnych wyozyiny w formie triacetylowanej

Do przeprowadzenia tego rodzaju analizy skłoniło mnie kilka powodów. Związki nieblokowane są słabo rozpuszczalne w innych rozpuszczalnikach niż DMSO-d₆. Przejście do pochodnych acetylowych umożliwiło także pomiary w CDCl₃, rozpuszczalniku o znacznie mniejszej polarności niż DMSO-d₆, oraz uzyskanie informacji na temat wpływu tej właściwości na konformację cukru. Wartości stałych dielektrycznych (ϵ) obu rozpuszczalników wynoszą odpowiednio 46,7 i 4,806. Ponadto acetylowanie części cukrowej nukleozydu znacznie upraszcza jej widma ¹H NMR w porównaniu ze związkami nieblokowanymi. Wybór tych a nie innych rozpuszczalników był podyktowany faktem ich powszechnego stosowania jak i kosztami.

W roztworze Wac₃ w CDCl₃ przeważający udział w całkowitej populacji mają konformery z zakresu P=135-207°, a więc z regionu *South* (58,4 %). Maksimum przypada na konformer C2'-endo (21,7%; P=153-171°) i C2'-endo-C1'-egzo (19,7%; P=135-153°), oraz o połowę mniej na C2'-endo-C3'-egzo (9,5%; P=171-189°, **Wykres 9**). Można przyjąć, że typy pofałdowań zawierające atom C2' w położeniu *endo* za najbardziej preferowane przez część

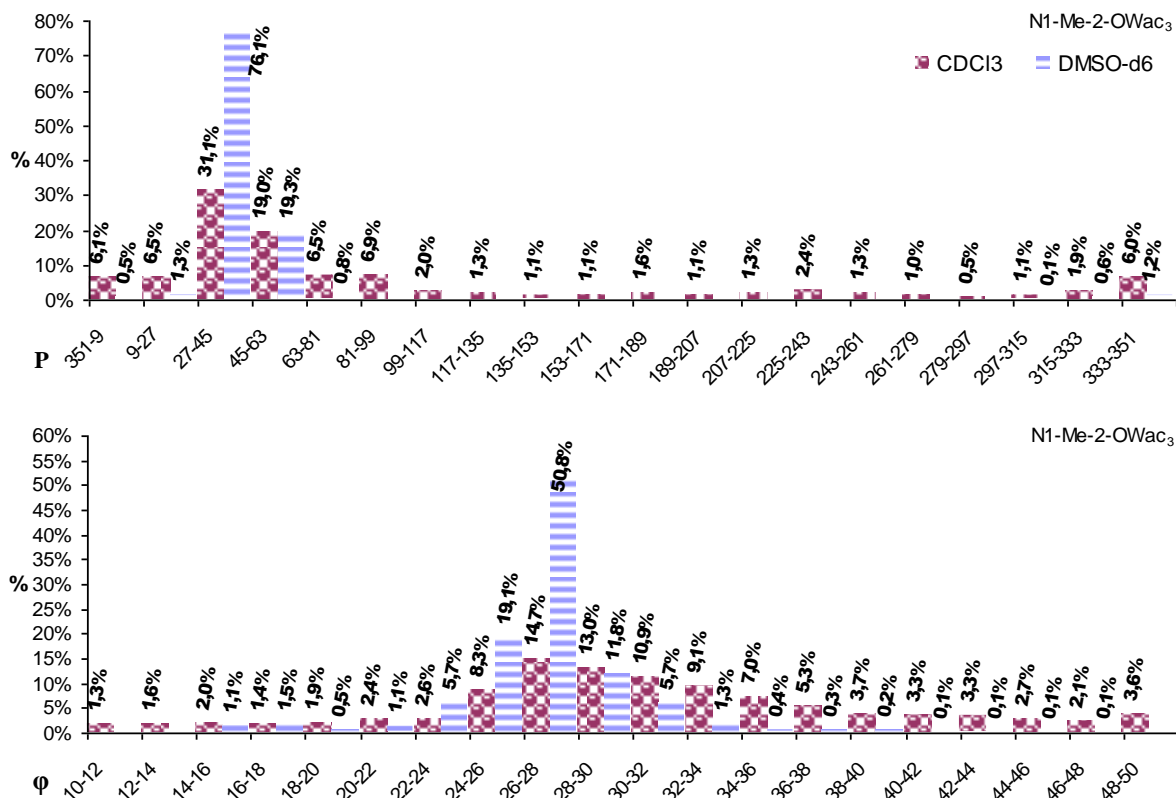
Wykres 9. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (ϕ) rybozy dla Wac₃



cukrową Wac_3 . Natomiast w regionie *North* preferencje obejmują znacznie szerszy zakres konformerów-od $C1'$ -endo- $C2'$ -egzo do $C4'$ -egzo ($P=315-63^\circ$) bez wyraźnej preferencji ktoregokolwiek z nich. Procentowy udział poszczególnych konformerów waha się w granicach od 4,2% do 8,5%, gdzie największy udział ma konformer $C3'$ -endo- $C2'$ -egzo (8,5%). Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na $\varphi=30-34^\circ$ (26,1%) natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (53,4%) wynosi 28° do 38° .

W roztworze Wac_3 w $DMSO-d_6$ obserwowałem wyrównany udział obu populacji konformerów regionów *North* oraz *South* (sumaryczny udział wynosił odpowiednio 49,6% i 50,4%) Maksimum rozkładu procentowego udziału w zależności od P przypada na dwa obszary: $45-81^\circ$ oraz $99-135^\circ$ czyli na pograniczu regionów *North/East* i *South/East*. Udział procentowy poszczególnych struktur jest następujący 12,1% i 14,2% (odpowiednio $C4'$ -egzo i $C4'$ -egzo- $O4'$ -endo), 12,6% i 17,9% ($O4'$ -endo- $C1'$ -egzo i $C1'$ -egzo,). W porównaniu z preferencjami konformacyjnymi Wac_3 w $CDCl_3$ gdzie typ pofałdowania zawierający atom $C2'$ w położeniu *endo* jest najbardziej preferowany, zmiana rozpuszczalnika na bardziej polarny wywiera wyraźną zmianę preferencji w stronę uczestnictwa w pofałdowaniu wiązań $C4'$ - $O4'$ oraz $O4'$ - $C1'$. Maksimum rozkładu udziału procentowego amplitudy pofałdowania przypada na $\varphi=26-30^\circ$ (29,7%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (57,2%) wynosi 22° do 32° . Warto zwrócić uwagę na wyraźne spłaszczenie pierścienia cukrowego w porównaniu z roztworem Wac_3 w $CDCl_3$. Przedstawione różnice wywołane zamianą rozpuszczalnika, wskazują na istotny udział polarności medium w wyborze konformacji przez Wac_3 .

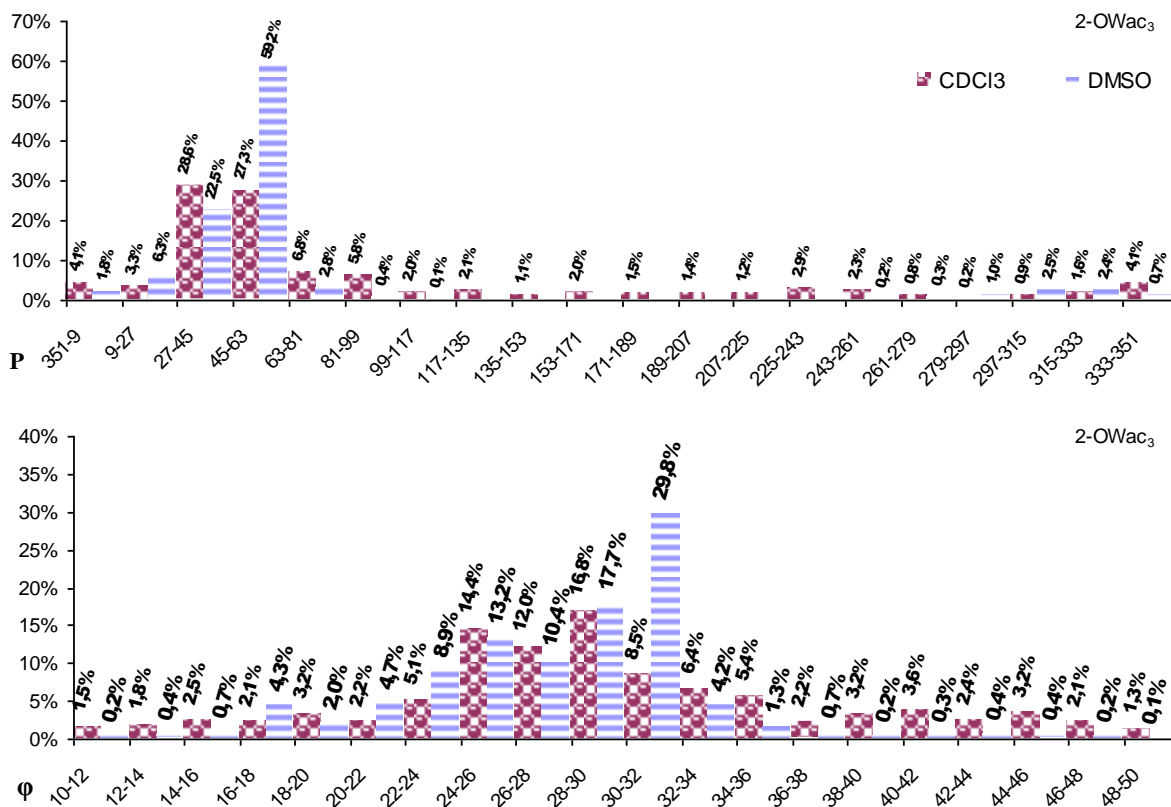
Wprowadzenie grupy okso w położenie $C2$ zasadniczo zmienia rozkład preferencji pofałdowania części cukrowej przesuując ją w stronę pogranicza regionów *North-East*. Preferencje obu pochodnych są bardzo zbliżone. Dla $N1-Me-2-OWac_3$ w $CDCl_3$ największy udział procentowy przypada na pofałdowanie $C3'$ -endo- $C4'$ -egzo (31,1%; $P=27-45^\circ$) nieco mniejszy udział wykazuje konformer $C4'$ -egzo (19,0%; $P=45-63^\circ$). Warto zwrócić uwagę na nieznaczny ale widoczny udział konformerów z regionu *East* ($O4'$ -endo- $C4'$ -egzo 6,5% oraz $O4'$ -endo 6,9%, **Wykres 10**). Udział pozostałych konformerów regionu *North* wynosi poniżej 6%. Reasumując, część cukrowa $N1$ -metylo-2-okso pochodnej preferuje typ pofałdowania w którym atom $C4'$ zajmuje pozycję *egzo*. Natomiast udział konformerów z pozostałych regionów koła pseudorotacyjnego jest minimalny. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na niższy zakres wartości $\varphi=26-32^\circ$ (38,6%) wskazując na nieznaczne spłaszczenie pierścienia rybozy w porównaniu z Wac_3 . Zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (56%) wynosi od 24° do 34° .

Wykres 10. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla N1-Me-2-OWac₃

W roztworze N1-Me-2-OWac₃ w DMSO-d₆ stwierdzam znaczący wzrost udziału populacji konformerów regionu *North* w porównaniu z rezultatem uzyskanym dla CDCl₃, oraz wyraźną zmianę dystrybucji konformerów w tym regionie. Dominującym typem pofałdowania jest konformer C3'-endo-C4'-egzo, którego udział wynosi 76,1%, nieco mniejszy udział przypada na C4'-egzo (19,3%). W tym przypadku zmiana rozpuszczalnika wymusza przede wszystkim znaczący wzrost dominującego typu pofałdowania C3'-endo-C4'-egzo. Udział konformerów w pozostałych regionach jest minimalny (Wykres 10). Obserwowane maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na $\varphi=26-28^\circ$ (50,8%), natomiast prawie 81,7% populacji występuje w zakresie od 24° do 30° .

W przypadku 2-OWac₃ w CDCl₃ dominującymi konformerami są C3'-endo-C4'-egzo (28,6%, P=27-45°) oraz C4'-egzo (27,3%, P=45-63°), ponadto w regionie *East* stwierdzam nieznaczny udział konformerów O4'-endo-C4'-egzo (6,8%, P=63-81°) oraz O4'-endo (5,8%, P=81-99°). Udział pozostałych konformerów jest mniejszy niż 4% (Wykres 11). Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na niższy zakres wartości $\varphi=26-30^\circ$ (28,8%) wskazując na podobne do N1-Me-2-OWac₃ nieznaczne spłaszczenie pierścienia rybozy w porównaniu z Wac₃, natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (51,7%) wynosi od 24° do 32° .

Preferencje pofałdowania dla 2-OWac₃ w roztworze DMSO-d₆ nie odbiegają znacząco od preferencji N1-Me-2-OWac₃. Dominującym typem pofałdowania jest C4'-egzo, którego

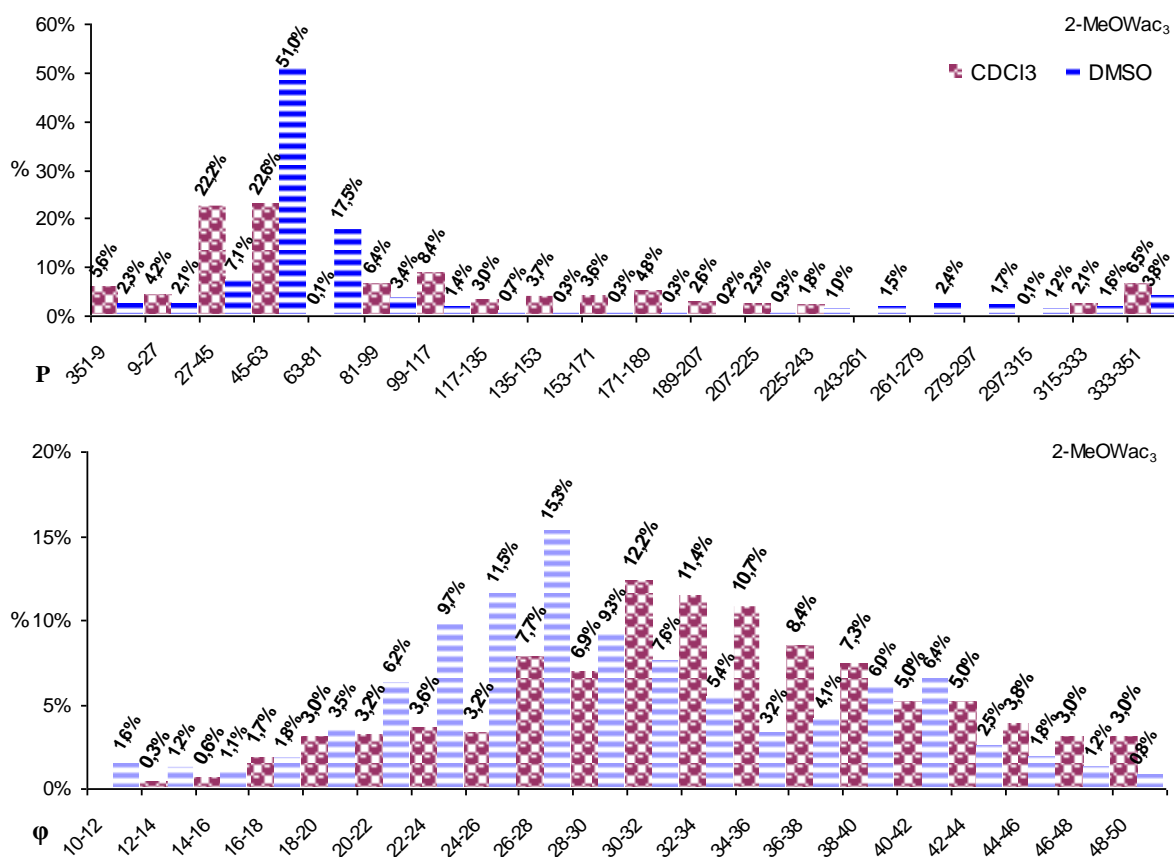
Wykres 11. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-OWac₃

udział procentowy wynosi 59,2%, natomiast dla sąsiadującego konformera tj. C3'-endo-C4'-egzo-22,5%. (Wykres 11). Rozkład częstości występowania amplitudy pofałdowania 2-OWac₃ jest bardzo zbliżony do poprzednio omawianego związku. Maksimum częstości występowania przypada na $\varphi=28-32^\circ$ (47,5%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący 71% populacji wynosi od 24° do 32° .

Konformacja części cukrowej w 2-MeOWac₃ w CDCl₃ jest bardzo zbliżona do wyżej omówionych pochodnych 2-okso. Największy udział mają konformery C3'-endo-C4'-egzo (22,2%, P=27-45°) oraz C4'-egzo (22,6%, P=45-63°), w regionie East nieznaczny udział mają konformery O4'-endo (6,4%, P=81-99°) i O4'-endo-C1'-egzo (8,4%, P=99-117°). Częstość występowania konformatorów regionu South jest zdecydowanie mniejsza, nie przekracza 1%. Sumaryczny udział procentowy konformatorów regionu South jest wyraźnie mniejszy od North, wynosi odpowiednio 34% i 66%. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na zakres wartości $\varphi=30-34^\circ$ (23,8%), natomiast zakres φ obejmujący ponad połowę populacji konformatorów (57,4%) wynosi $26-38^\circ$ (Wykres 12). Wzrost polarności rozpuszczalnika wyraźnie przesunął preferencje pofałdowania w stronę konformera C4'-egzo (51,6%) oraz C4'-egzo-O4'-endo (17,5%). Kierunek zmiany jest jednakowy z wyżej omówionymi 2-okso analogami, co może wskazywać na bardzo zbliżoną naturę oddziaływania efektów solwatacyjnych obu rozpuszczalników jak i podobny wpływ obecności atomu tlenu w C2. Maksimum amplitudy pofałdowania jest przesunięte w stronę niższych wartości w

porównaniu z CDCl_3 ($\varphi=26-28^\circ$, 15,3%), natomiast 53,4% populacji mieści się w zakresie $\varphi=22-32^\circ$. W porównaniu z 2-okso analogami, następuje odwrócenie występowania maksimum amplitudy pofałdowania w 2-MeOWac₃ w zależności od rozpuszczalnika tj. pierścień cukrowy ulega spłaszczeniu wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika.

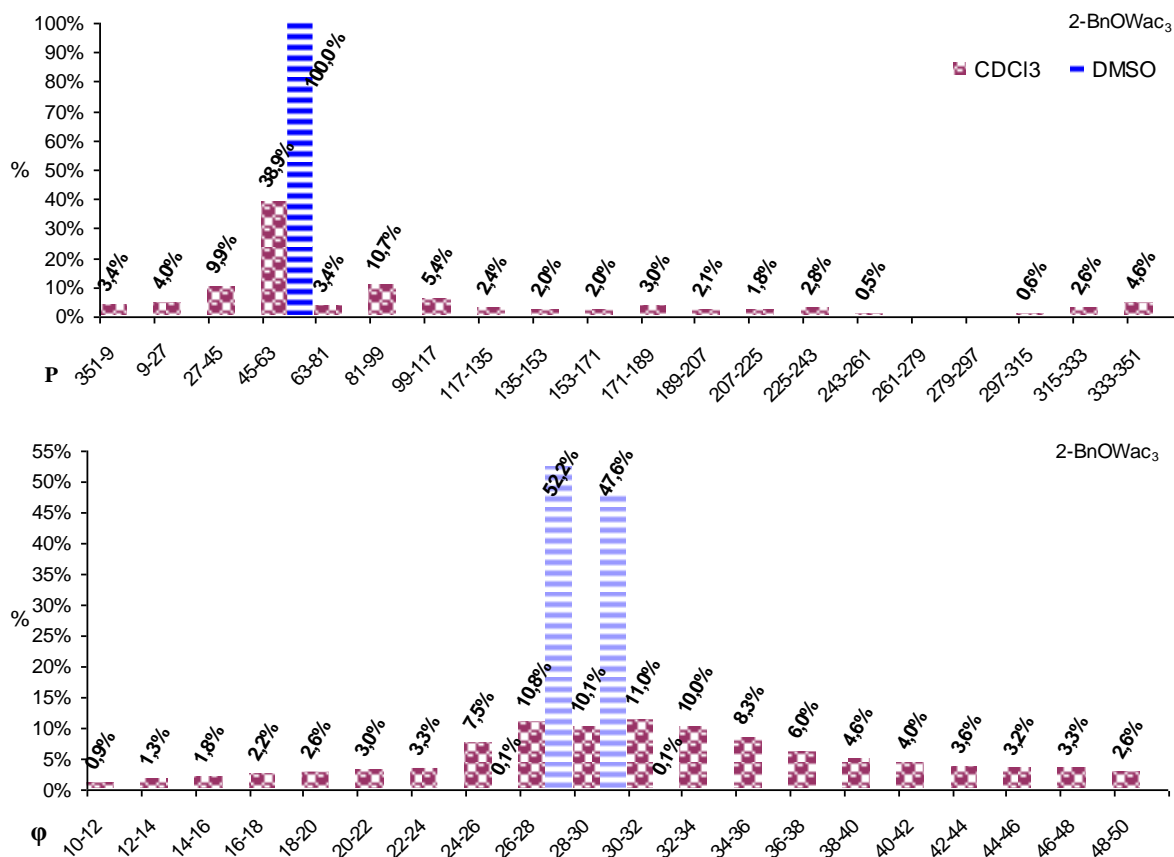
Wykres 12. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeOWac₃



Preferencje pofałdowania części cukrowej 2-BnOWac₃ w CDCl_3 są zbliżone do preferencji wyżej omówionych tlenowych analogów (**Wykres 13**). Dominujący udział procentowy przypada na konformery regionu *North*, jednak z tą różnicą iż zdecydowana większość udziału przypada na jeden typ pofałdowania: C4'-egzo (38,9%, P=45-63°). Udział konformera C3'-endo-C4'-egzo wynosi zaledwie 9,9%, a więc jego udział jest wyraźnie zmniejszony w porównaniu z pozostałymi tlenowymi pochodnymi. Z kolei w regionie *East* wyraźny jest wzrost udziału konformerów zawierających atom O4' w orientacji *endo* do 19,5% (P=63-117°) z maksimum przypadającym na konformer O4'-endo (10,7%). Powyższy wzrost można przypisać zwiększeniu udziału oddziaływania sterycznego pomiędzy obszerną grupą benzyłową a resztą cukrową w kształtowaniu pofałdowania rybozy, jakkolwiek wydaje się iż efekty indukcyjne wywołane przez atomu tlenu w C2 wydają się mieć wpływ na przyjmowanie konformacji typu C4'-egzo i C3'-endo- C4'-egzo. Efekt ten maleje jednak wraz ze wzrostem podstawnika. Pośrednim dowodem na poparcie tezy udziału efektów elektronowych w kształtowaniu konformacji rybozy może dać porównanie zmian przesunięć

^{13}C i ^{15}N w obrębie imidazolowego fragmentu zasady (N1-C2-N3-C3a-C9a) tlenowych pochodnych wyożyny, które omówiłem w rozdziale 3.3.1.2 Położenie maksimum amplitudy pofałdowania pierścienia rybozy nieznacznie różni się od pozostałych dwóch tlenowych pochodnych, występując w zakresie $\varphi=26-34^\circ$ (41,9%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (57,7%) wynosił $24-36^\circ$.

Wykres 13. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-BnOWac₃

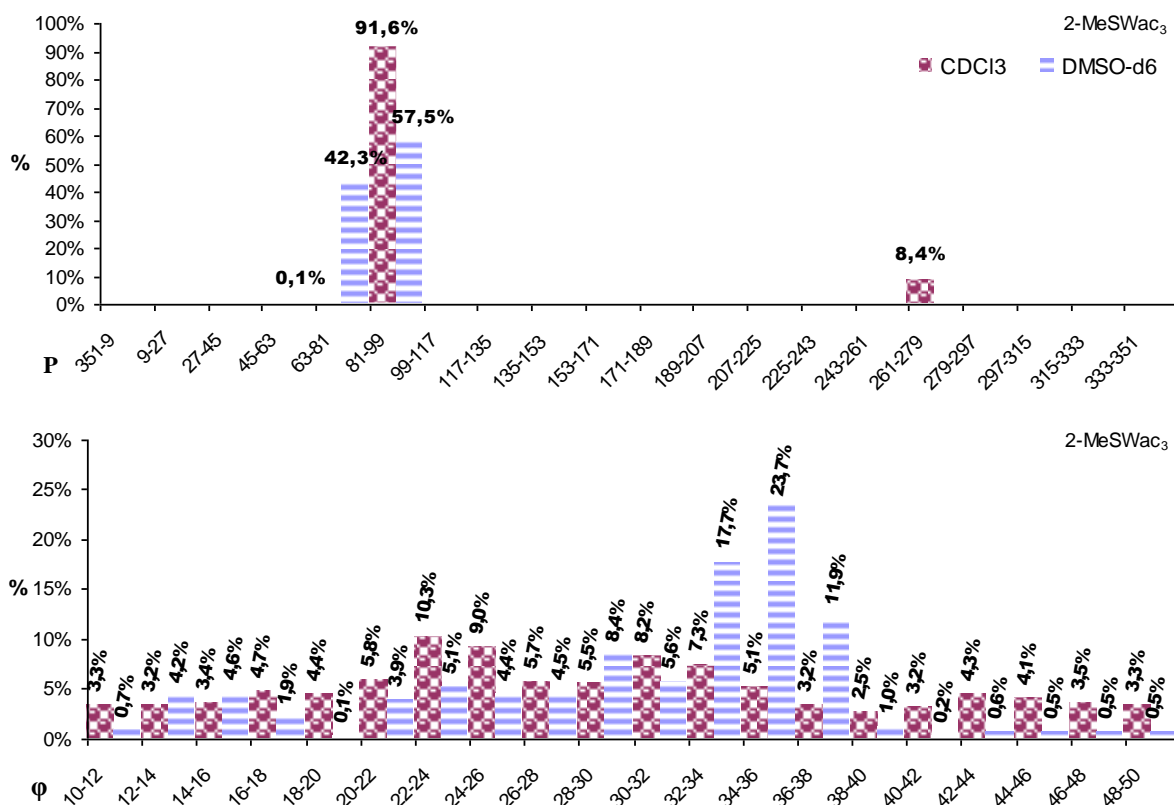


Zwiększenie polarności rozpuszczalnika wywiera największy pod względem ilościowym, wpływ na preferencje pofałdowania 2-BnOWac₃. W przypadku roztworu CDCl₃, udział konformeru C4'-egzo nie przekraczał 40%, natomiast w DMSO-d₆, konformer stał się praktycznie jedynym w całej populacji - udział wynosi 100%. Powyższy wzrost może sugerować znaczne zwiększenie udziału oddziaływania sterycznego pomiędzy obszerną grupą benzylową a resztą cukrową w kształtowaniu pofałdowania rybozy. Jakkolwiek wydaje się iż efekty indukcyjne wywołane przez atom tlenu w C2 oraz solwatacyjne rozpuszczalnika nie pozostają bez wpływu na pojawianie się konformerów typu C4'-egzo, a nie bardziej uprzywilejowanego dla zmniejszenia odpychania sterycznego konformeru O4'-endo. Statystyka amplitudy pofałdowania wskazuje na tendencję do przyjmowania wąskiego zakresu wartości $\varphi=26-30^\circ$ (99%, **Wykres 13**).

Kolejną C2 podstawioną pochodną Wac₃ jest 2-MeSWac₃, dla której pofałdowanie części cukrowej w CDCl₃ jest ograniczone do wąskiego zakresu w regionie *East* (P=81-99°)

czyli konformacji O4'-endo. Procentowy udział tego konformera jest wysoki i wynosi 91,6%. (**Wykres 14**) Bardzo podobny obraz preferencji pofałdowania cukru uzyskałem dla 2-MeSW, które omówiłem wcześniej (**Wykres 6**, str 155). W konformacji O4'-endo, oba podstawniki przy C1' (zasada) oraz C4' (5'-CH₂OAc) są najbardziej od siebie oddalone wskutek przyjęcia przez wiązania C1'-N3 i C4'-C5' orientacji pseudoekwatorialnej. Atomy C1'-C2'-C3'-C4' leżą w jednej płaszczyźnie, co prowadzi do synperiplanarnego ustawienia się wiązań C2'-H2'/C3'-H3' oraz 2'OH/3'OH. Taka sytuacja jest energetycznie niekorzystna i rzadko obserwowana w strukturach krystalicznych nukleozydów. Występowanie pofałdowania tylko w tym zakresie można wytłumaczyć dominującym udziałem efektu sterycznego nad efektem elektronowym pomiędzy atomem siarki a resztą cukrową. Pośredni dowód na powyższą tezę można otrzymać analizując zmiany przesunięć chemicznych ¹³C i ¹⁵N NMR w obrębie zasady. Efekt indukcyjny atomu siarki ogranicza się praktycznie do atomu C2, $\Delta\delta^{C2}$ wynosi ok. 9-12 ppm w stronę słabszego pola. W przypadku pochodnych tlenowych $\Delta\delta^{C2}$ jest większa (15-17 ppm), ponadto wpływ efektu indukcyjnego atomu tlenu obserwowałem także w pozycji C9a. Wyżej omówione różnice można wytłumaczyć faktem mniejszej elektroujemności atomu siarki od tlenu, czyli powiązać z spadkiem wpływu efektu elektronowego na pofałdowanie części cukrowej. Większy promień van der Waalsa atomu siarki w porównaniu z tlenem może odpowiadać za wzrost udziału efektu sterycznego. Rozkład amplitudy pofałdowania w porównaniu z wyżej omówionymi pochodnymi Wac₃

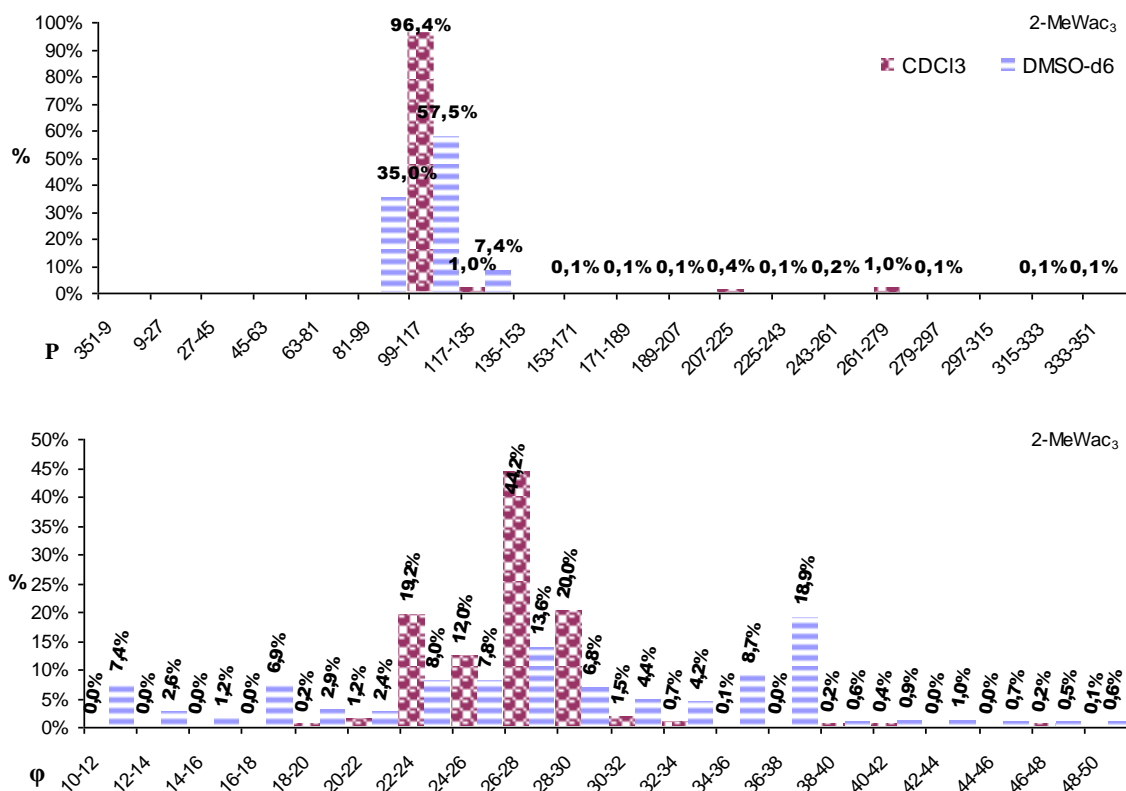
Wykres 14. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania(ϕ) rybozy dla 2-MeSWac₃



charakteryzuje się odmiennym przebiegiem. Maksimum amplitudy pofałdowania jest przesunięte w kierunku niższych wartości $\varphi=22-26^\circ$ (19,3%), natomiast w zakresie $\varphi=20-34^\circ$ udział ten wynosi 51,8%. Efekt spłaszczenia pierścienia prawdopodobnie można przypisać tendencji do zminimalizowania oddziaływania sterycznego. **(Wykres 14)** Zmiana rozpuszczalnika z CDCl_3 na DMSO-d_6 zmniejszyła udział pofałdowania $\text{O4}'\text{-endo}$ (57,5%) na rzecz wzrostu $\text{O4}'\text{-endo-C4}'\text{-egzo}$ (42,3%). Maksimum udziału stopnia pofałdowania jest przesunięte w kierunku wyższych wartości $\varphi=32-36^\circ$ (41,4%), natomiast w zakresie $\varphi=32-38^\circ$ udział ten wynosi 53,3%. Udział procentowy reszty populacji przypada na niższe zakresy wartości amplitudy pofałdowania. Wzrost polarności medium wywołuje w tym przypadku znaczne przesunięcie maksimum udziału procentowego amplitudy pofałdowania w stronę wyższych wartości, jakkolwiek sumaryczny udział populacji konformerów o spłaszczonym pierścieniu rybozy jest znaczny.

Analizie preferencji konformacyjnej części cukrowej poddałem także 2-MeWac_3 . Bezpośrednie podstawienie pozycji C2 grupą metylową wywiera zbliżony do atomu siarki wpływ na preferencję pofałdowania części cukrowej, ograniczonej do wąskiego zakresu w regionie *East* ($P=99-117^\circ$) odpowiadającej konformacji typu $\text{O4}'\text{-endo-C1}'\text{-egzo}$. Procentowy udział tego konformeru wynosił 96,4%. **(Wykres 15)** Występowanie pofałdowania tylko w tym zakresie można wytłumaczyć obecnością wyraźnej tendencji do zminimalizowania oddziaływania sterycznego między obszerną grupą metylową a resztą cukrową. Efekt ten

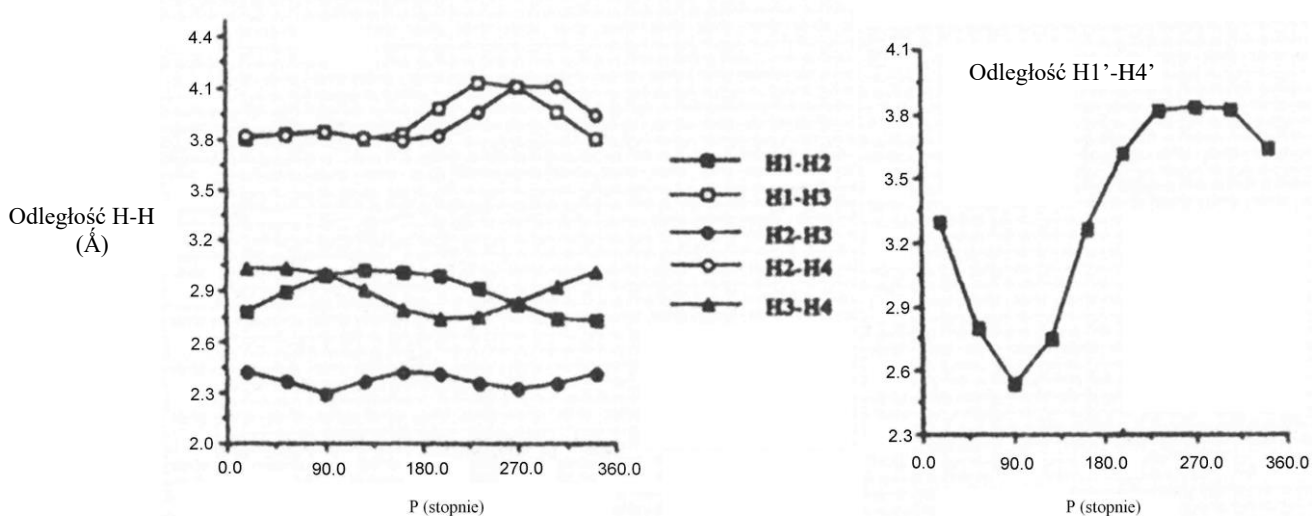
Wykres 15. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeWac_3



wydaje się być mniejszy w porównaniu z 2-MeSWac₃ skoro część cukrowa może przyjąć zamiast konformacji kopertowej, konformację skręconą. Położenie maksimum amplitudy pofałdowania przypada na zakres $\varphi=26-28^\circ$ (44,2%), natomiast 95,4% populacji na $\varphi=22-30^\circ$. W porównaniu z wyżej omówionymi pochodnymi tej serii maksimum amplitudy pofałdowania związku 2-MeWac₃ występuje w największym zakresie wartości φ . W roztworze DMSO-d₆ preferencje pofałdowania części cukrowej 2-MeWac₃ rozszerzają się nieznacznie do dwóch konformerów regionu *East*: O4'-endo-C1'-egzo (57,5%) oraz O4'-endo (35,0%) w porównaniu z CDCl₃ (**Wykres 15**). Położenie maksimum amplitudy pofałdowania pierścienia rybozy 2-MeWac₃ w DMSO-d₆ przypada na zakres $\varphi=36-38^\circ$ (18,9%), drugie maksimum występuje w zakresie $\varphi=26-28^\circ$ (13,6%). Zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący 72,4% wynosi od 22° do 38° . czyli jest znacznie szerszy niż w CDCl₃.

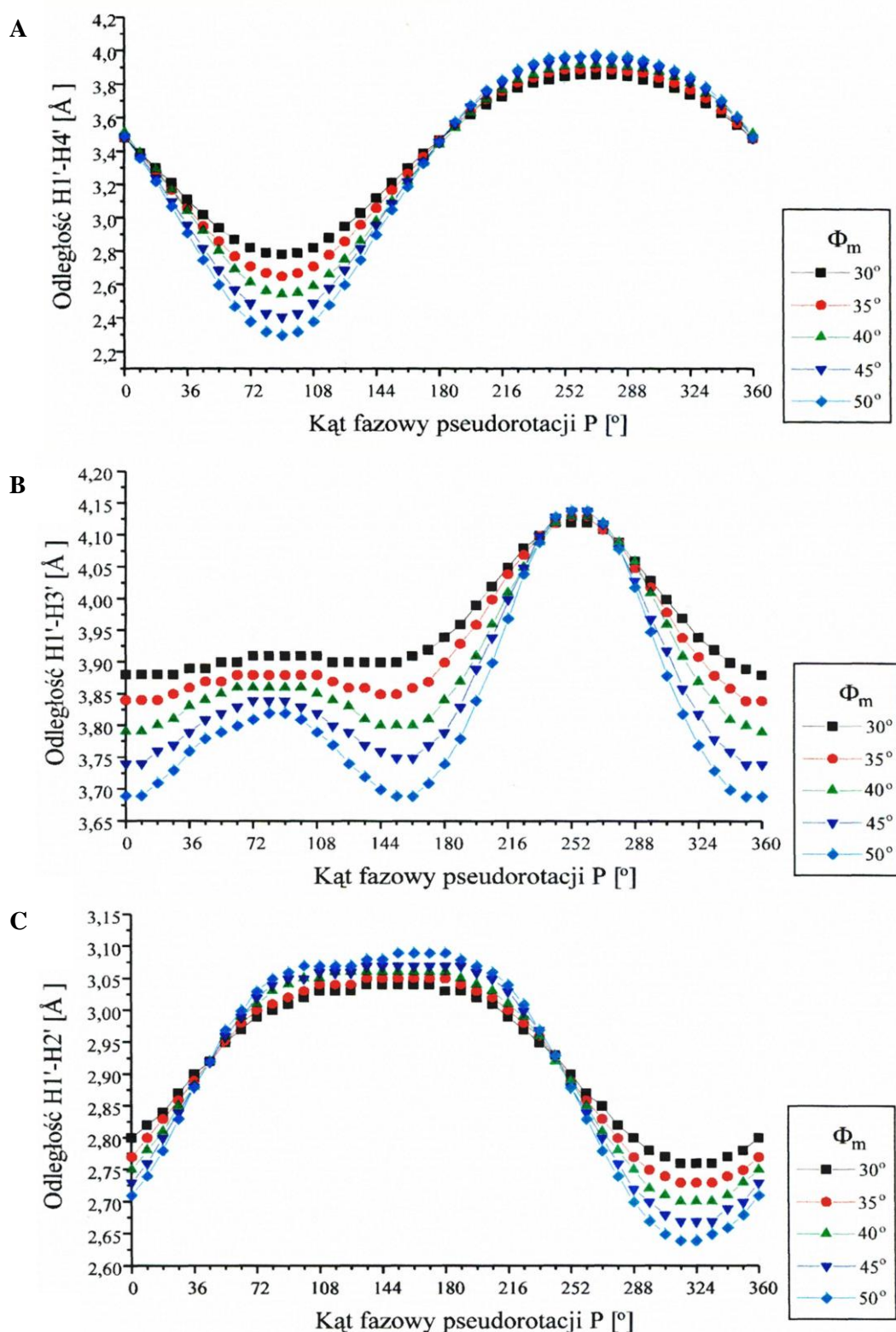
W celu zweryfikowania rezultatów uzyskanych na podstawie obliczeń z użyciem programu PSEUROT przeprowadziłem szereg pomiarów efektu NOE w obrębie części cukrowej pochodnych triacetylowych wyożyny. A. Serianni i wsp przedstawili wykres zmian odległości między protonami w β -D-rybofuranozie, który uzyskano na podstawie obliczeń MO (**Rysunek 14**).⁴⁸⁷ Wg autorów rezultat tych obliczeń wskazywał iż spośród sześciu przeanalizowanych zmian odległości jedynie zmiany dystansu H1'-H4' po przejściu przez przez wszystkie konformery są najbardziej wyraźne w porównaniu z pozostałymi i tylko ta odległość może stanowić najbardziej wiarygodny wskaźnik informujący o dominującej konformacji.

Rysunek 14. Zależność odległości pomiędzy protonami części cukrowej a kątem fazowym pseudorotacji



Podobny przebieg zmian został przedstawiony na **Rysunku 15** (str 167), który uwzględnia dodatkowo wpływ wartości amplitudy pofałdowania na zmiany w odległościach pomiędzy protonami.⁴⁹⁴

Rysunek 15. Zależność odległości pomiędzy protonem H1' a protonami H4' (a), H3' (b) H2' (c) od kąta fazowego pseudorotacji ⁴⁹⁴



Mając na uwadze powyższe zależności przeprowadziłem odpowiednie pomiary NOE, dla Wac_3 i wybranych pochodnych, których wyniki przedstawiłem w Tabeli 21. Obok zmierzonych wartości NOE dla pary H1'-H4', w celu uzyskania pośrednich dowodów wspierających rezultaty obliczeń, przedstawiłem również wyniki eksperymentów NOE dla

następujących par protonów H1'-H2', H2'-H3', H3'-H4' H2'-H2^{zasada} oraz H3'-H2^{zasada}. Największą wartość wzmocnienia NOE wynoszącą 6.5/6.2% uzyskałem dla pary H1'-H4' dla związku 2-MeSWac₃, co potwierdzałoby obecność kopertowej konformacji typu O4'-endo (**Tabela 21**). W konformacji O4'-endo (P=90°) odległość między protonami H1' i H4' jest najmniejsza co przekłada na wyraźny wzrost wartości wzmocnień NOE między tymi protonami. Pozostałe związki pod względne wielkości wzmocnienia NOE dla H1'-H4' układają się w następujący szereg 2-BnOWac₃>N1-Me-2-OWac₃>2-OWac₃>Wac₃. Wartości wzmocnienia NOE dla pary H1'-H4' w tlenowych pochodnych Wac₃ są wyraźnie większe niż w Wac₃. Wynik ten wskazuje na zmniejszenie dystansu pomiędzy H1'-H4', potwierdzając odnotowaną tendencję przyjmowania przez część cukrową tlenowych pochodnych Wac₃ konformacji typu C4'-egzo. Zależność pomiędzy odległością H1'-H4', H1'-H2' oraz H1'-H3' a kątem fazowym pseudorotacji została przedstawiona na **Rysunkach 15a-c**.

Dla Wac₃ dodatkowym potwierdzeniem większej preferencji pofałdowań z regionu *South* jest wartość wzmocnienia NOE sygnałów H2'/H3' oraz H2 po nasyceniu odpowiednio H2 i H2'/H3' (**Tabela 21**). Zdecydowanie większa wartość wzmocnienia dla H2' niż dla H3' po nasyceniu sygnałów H2 (17.1% i 2.1%) wskazuje na konieczność przyjęcia przez wiązanie C3'-H3' orientacji typowo pseudoekwatorialnej a dla C2'-H2' pseudoaksjalnej, aby odległość H2-H3' była większa od H2-H2'. Taki układ jest możliwy dla pofałdowania typu C2'-endo. Dodatkowo wysoka wartość wzmocnienia dla H2' wskazuje na obecność orientacji *anti*. Kolejnym potwierdzeniem przewagi konformerów *South* może być porównanie wartości wzmocnień pary sygnałów H3'-H4' i H2'-H1'. Przy założeniu przewagi pofałdowania typu C2'-endo odległość pomiędzy H3'-H4' jest mniejsza niż dla pary H2'-H1', co w efekcie winno dać większą wartość wzmocnienia NOE dla pary H3'-H4' (3.3% i 3.9%) w porównaniu z H2'-H1' (2.8% i 3.0%). W przypadku pochodnych tlenowych wartości wzmocnień NOE dla sygnałów H2'/H3' po ich wzajemnym nasycaniu są zdecydowanie wyższe od Wac₃ co mogłoby wskazywać na zmniejszenie pomiędzy nimi odległości, a więc zmniejszenie wartości kąta torsyjnego H3'-C3'-C2'-H2' co jest obserwowane dla pofałdowania C4'-egzo w porównaniu z C2'-endo.

Tabela 21. Wartości NOE dla części cukrowej Wac₃ i jej C2 podstawionych pochodnych CDCl₃

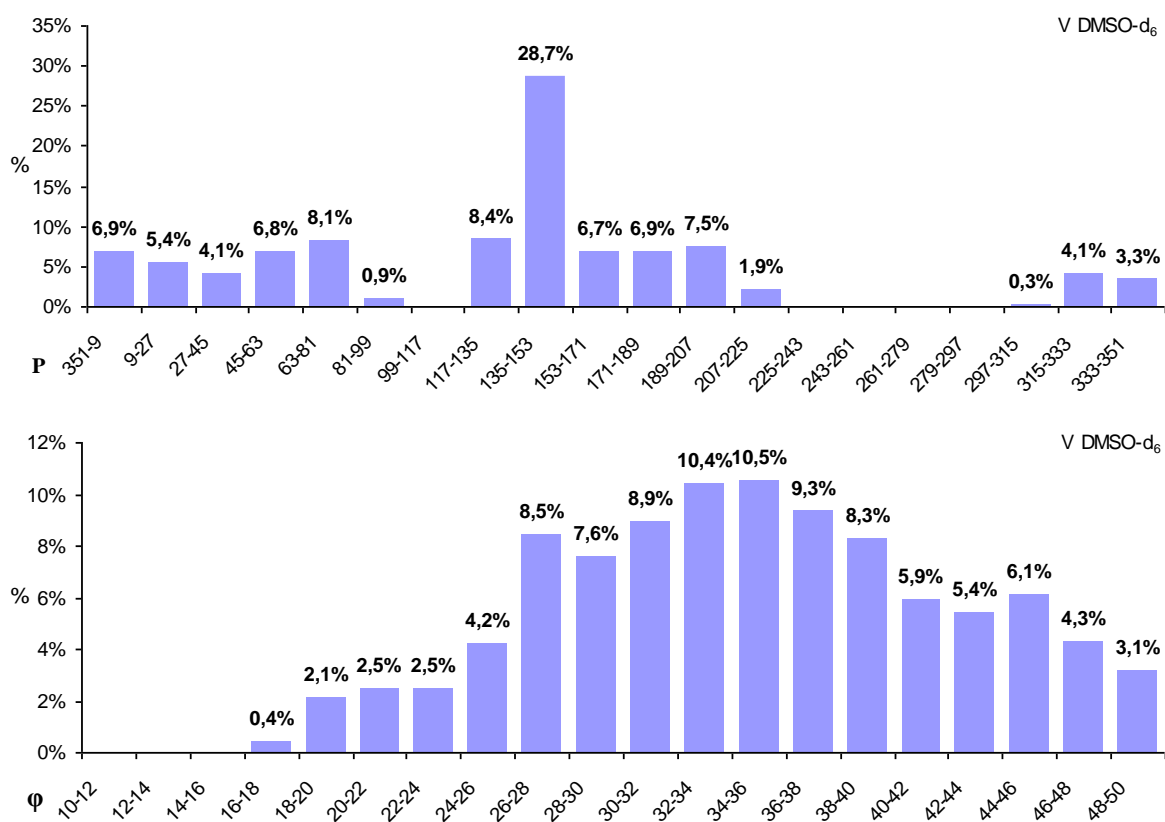
	Wac ₃ (%)	2-OWac ₃ (%)	N1-Me-2-OWac ₃ (%)	2-BnOWac ₃ (%)	2-MeSWac ₃ (%)
H1'-H4'	2.3/2.6	3.2/3.0	3.7/3.9	3.6/4.5	6.5/6.2
H1'-H2'	3.0/2.8	3.4/3.7	4.4/4.2	3.6/3.5	3.3/2.4
H2'-H3'	11.1/10.6	14.2/13.2	14.6/14.9	15.3/14.9	15.2/14.7
H3'-H4'	3.3/3.9	3.7/3.9	3.9/4.2	3.4/3.4	2.8/3.4
H2'-H2 ^{zasada}	17.1/16.3	_____	_____	_____	0.4/0.6
H3'-H2 ^{zasada}	2.1/2.4	_____	_____	_____	_____

3.2.3.3. Analiza konformacyjna części cukrowej C2 podstawionych pochodnych N4-dezmetylowozyiny

Brak grupy metylowej w pozycji N4 pozwala na większą swobodę rotacji wokół wiązania glikozydowego, a tym samym zwiększenie stopnia swobody całej cząsteczki. Przeprowadzenie analizy konformacyjnej dla tej serii związków pozwoliło na uzyskanie informacji o roli orientacji wokół wiązania glikozydowego w kształtowaniu pofałdowania części cukrowej.

W przypadku V zdecydowanie dominującym konformerem jest C2'-endo-C1'-egzo ($P=135-153^\circ$), którego udział wynosi 28,7%. W pozostałych zakresach P udziały oscylują w zakresie 4-8%. (**Wykres 16**). Sumaryczny udział konformerów regionu *South* jest większy niż *North* (61% vs 39%). Reasumując, nieobecność podstawnika metylowego w pozycji N4 przesuwa położenie równowagi $North \leftrightarrow South$ w kierunku *South* w porównaniu z W (5). W przypadku rozkładu udziału procentowego w zależności od amplitudy pofałdowania, obserwowane maksimum przypada na zakres: $\varphi=32-36^\circ$ (20,9%), z kolei zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (55%) wynosi $28-40^\circ$.

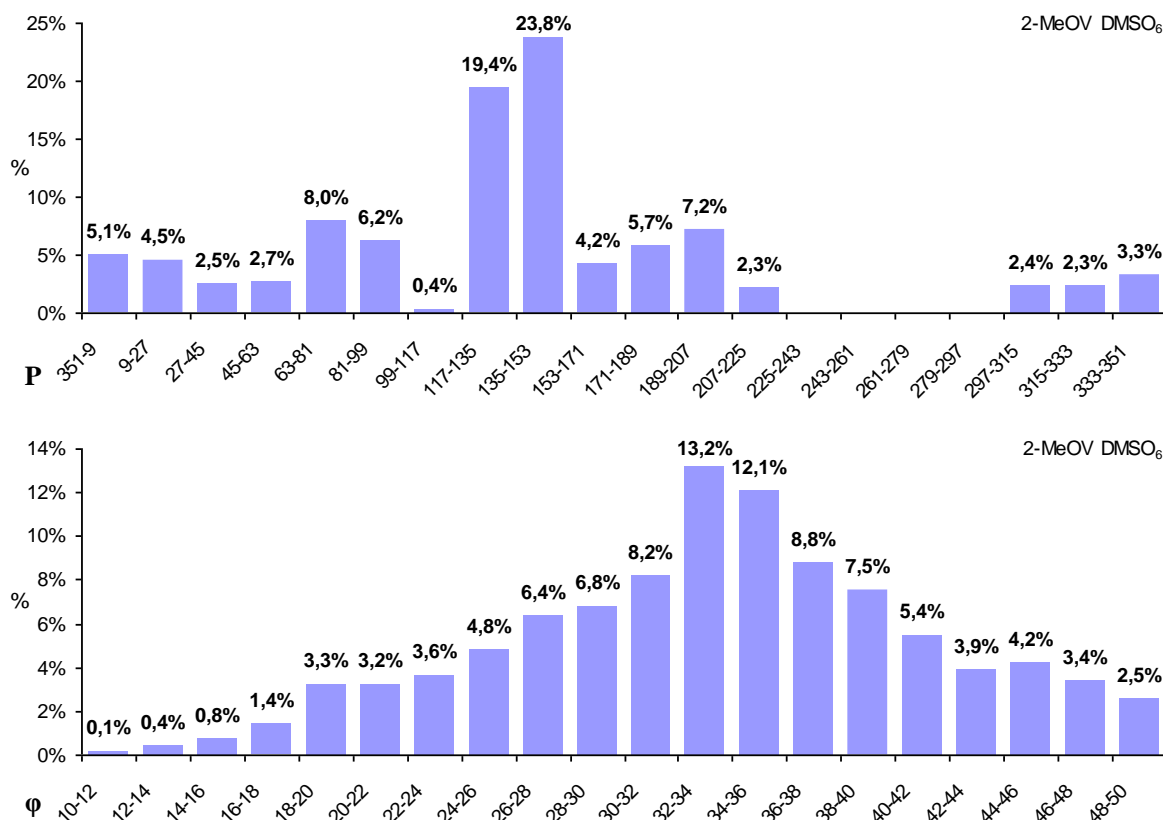
Wykres 16. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla V



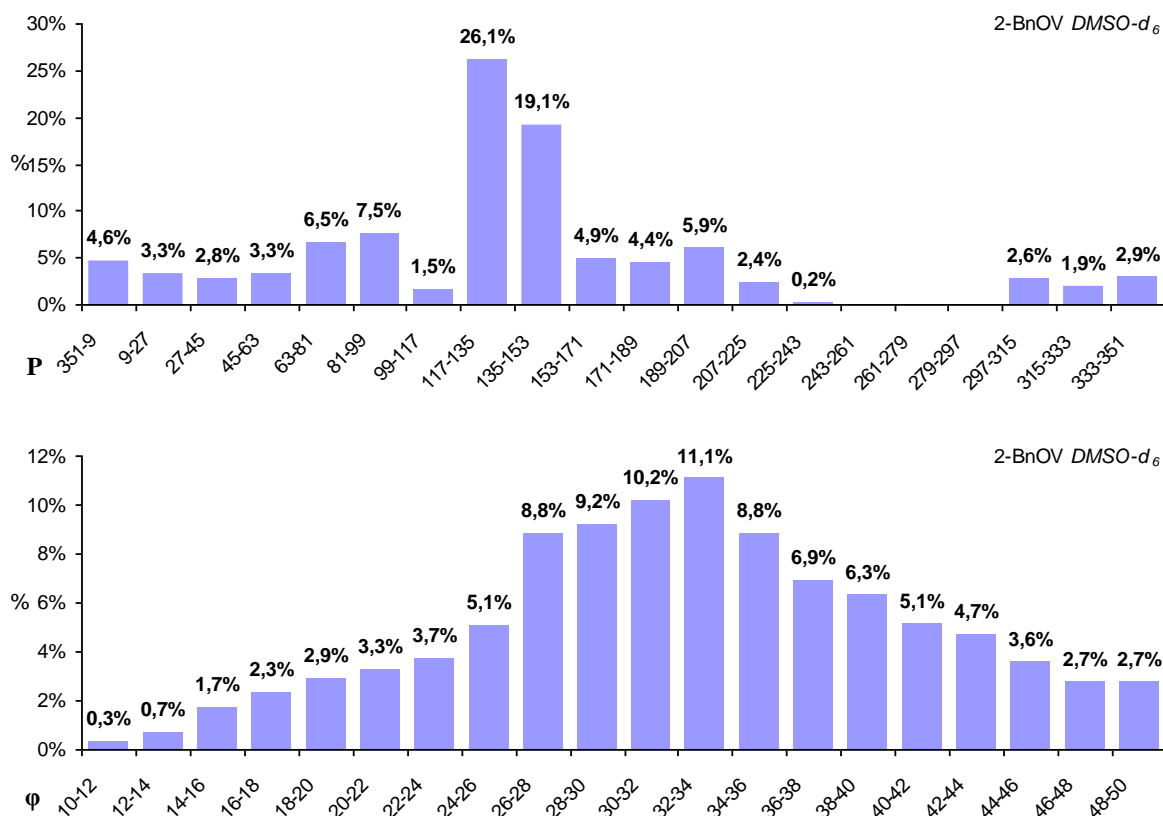
Wprowadzenie grupy metoksy w położenie C2 powoduje znaczący wzrost populacji konformerów C1'-egzo w porównaniu z V oraz wzrost sumy populacji konformerów regionu *South* (66,1%). Największy udział procentowy przypada na pofałdowanie C2'-endo-C1'-egzo

(23,8%; P=117-135°), nieco mniejszy udział wykazują konformery: C1'-*egzo* (19,4%; P=135-153°), O4'-*endo*-C4'-*egzo* (8,0%; P=63-81°), C3'-*egzo* (7,2%; P=189-207°). W pozostałych zakresach P wielkość udziału oscyluje najczęściej w granicach 2-6% (**Wykres 17**). Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na zakres wartości $\varphi=32-36^\circ$ (25,3%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (63,7%) wynosi od 26° do 40° .

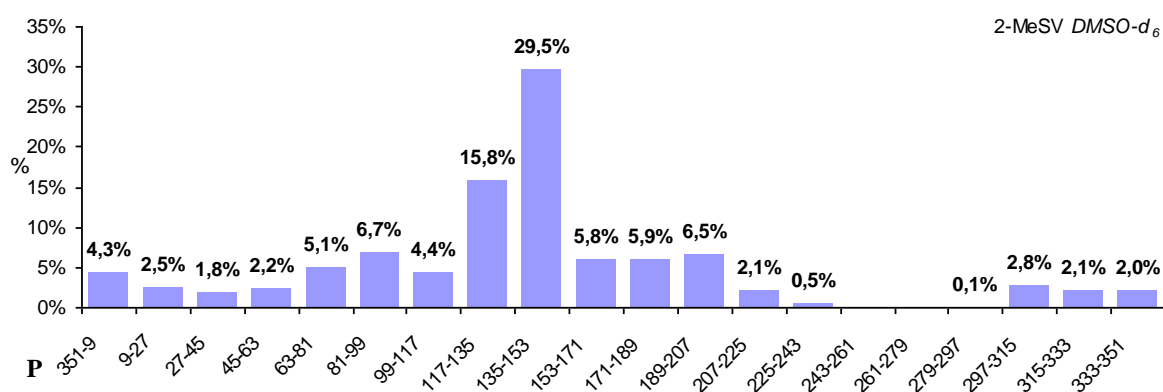
Wykres 17. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeOV

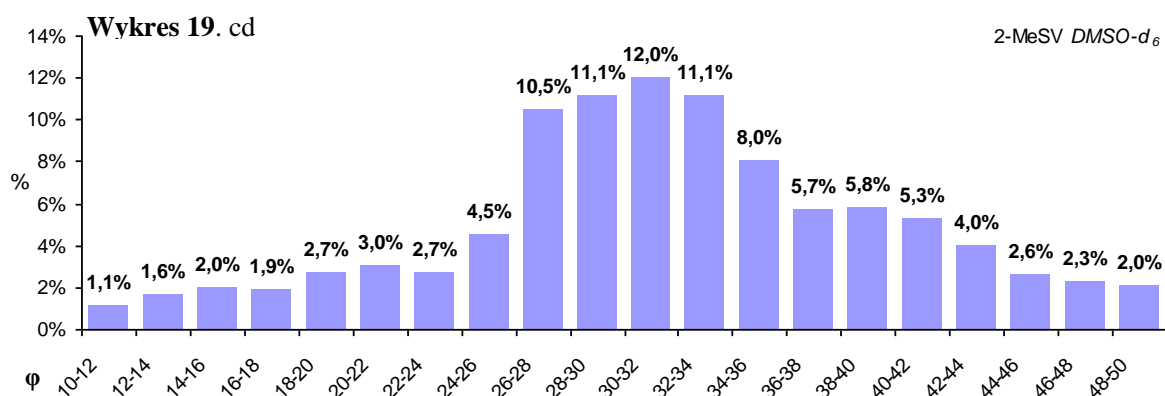


Obecność grupy benzyloksy w położeniu C2 wyraźnie przesunęła preferencje pofałdowania części cukrowej w stronę konformera C1'-*egzo* (26,1%; P=117-135°), nieco mniejszy udział wykazuje konformer: C2'-*endo*-C1'-*egzo* (19,1%; P=135-153°) i O4'-*endo*-C4'-*egzo* (7,5%; P=63-81°). W pozostałych zakresach P wielkość udziału oscyluje w granicach 2-6% (**Wykres 18**, str. 171). Porównując preferencje pofałdowania 2-BnOV i 2-MeOV z V zauważyć można wzrost populacji konformera C1'-*egzo* oraz spadek C2'-*endo*-C1'-*egzo* wraz ze wzrostem objętości podstawnika. Suma populacji konformerów regionu *South* jest większa niż dla *North* i wynosi 63,5%. Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania przypada na zakres wartości $\varphi=30-34^\circ$ (21,3%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (55%) wynosi od 26° do 36° .

Wykres 18. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-BnOV

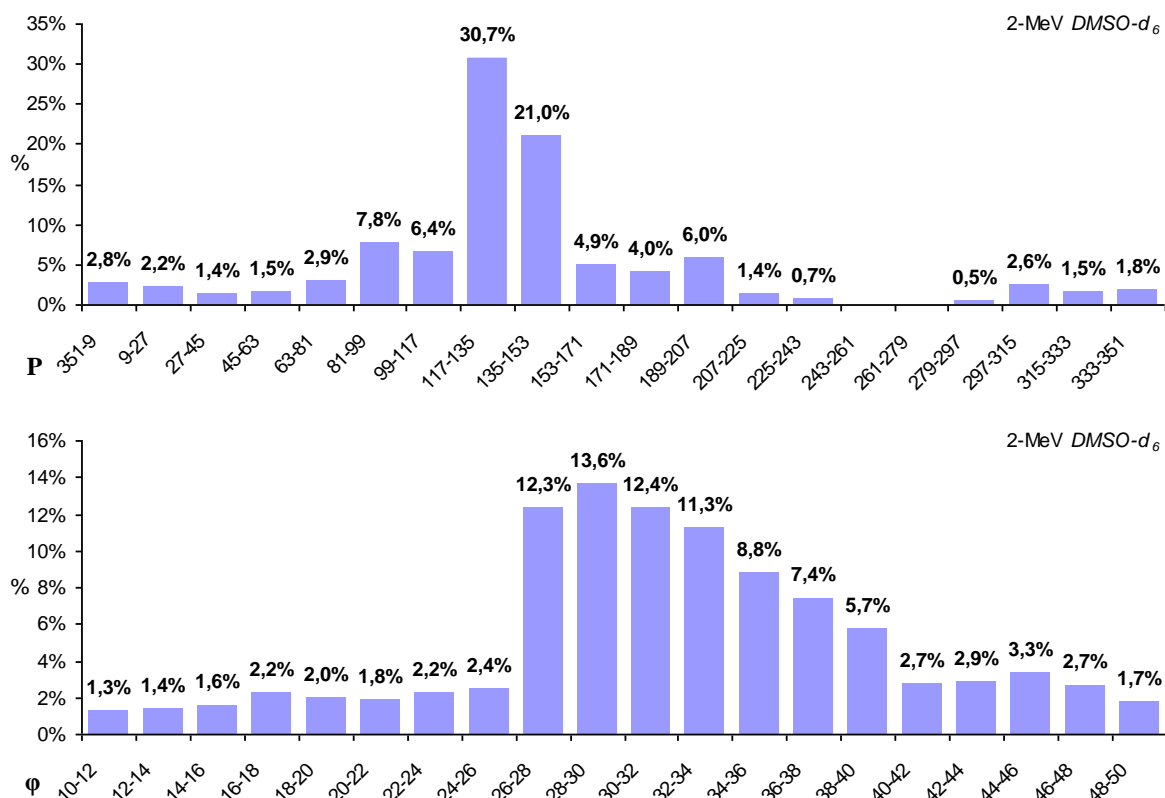
Bardzo zbliżoną konformację do N4-dezmetylwozyny ma pochodna podstawiona grupą metylotiolową. Suma populacji konformerów regionu *South* zwiększa się do 72,7%. Dominującym typem pofałdowania jest C2'-*endo*-C1'-*egzo* (29,5%, P=135-153°), o połowę mniejszy udział procentowy wykazuje C1'-*egzo* (15,8%; P=117-135°). W przypadku rozkładu udziału procentowego w zależności od amplitudy pofałdowania, obserwowane maksimum przypada na zakres: $\varphi=28-34^\circ$ (34,2%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (52,7%) wynosi 26-36°. (**Wykres 19**).

Wykres 19. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeSV



Preferencje pofałdowania części cukrowej w 2-MeV nie różnią się istotnie od wyżej omówionych pochodnych N4-dezmetylowozyny. Suma populacji konformerów regionu *South* jest największa i wynosi 78,6% (**Wykres 20**). Dominującym typem pofałdowania jest C1'-*egzo* (30,7%; P=117-135°), nieco mniejszy udział przypada na konformer C2'-*endo*-C1'-*egzo* (21,0%, P=135-153°). Maksimum rozkładu amplitudy pofałdowania obejmuje zakres: φ=26-32° (38,3%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący ponad połowę populacji konformerów (58,4%) wynosi 26-36°.

Wykres 20. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeV



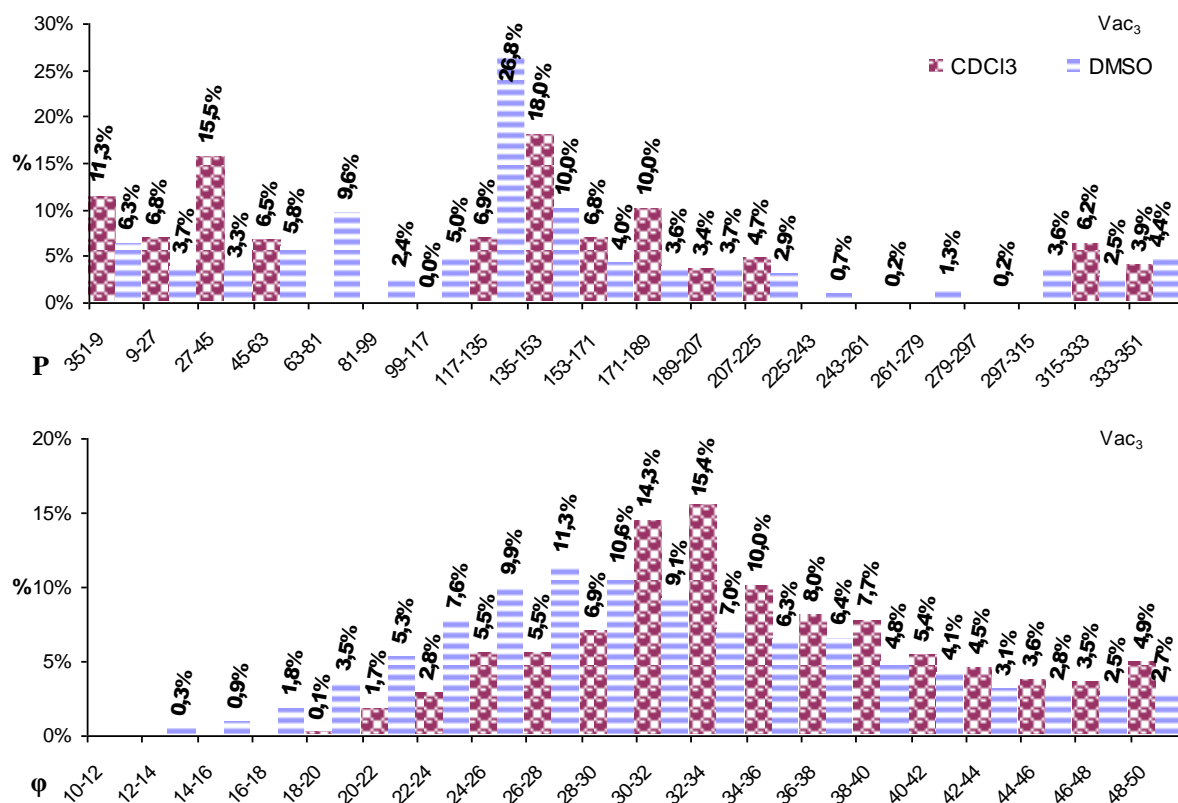
Podsumowując stwierdziłem w serii N4-dezmetylowozyny wyraźną tendencję do kształtowania pofałdowania wzdłuż wiązania C1'-C2', preferowanymi konformerami są te w których atom C1' zajmuje pozycję *egzo*. Sumaryczny udział obu konformerów pochodnych N4-dezmetylowozyny mieści się w zakresie 43-52%. Wpływ podstawnika C2 na część

cukrową jest ograniczony do wzrostu populacji pofałdowania C1'-*egzo* i spadku C2'-*endo*-C1'-*egzo* oraz wzrostu sumy całkowitej populacji konformerów *South*. Komentując podobieństwo preferencji pofałdowania N4-dezmetylowozyiny i jej analogów przypuszczam, że siła wpływu podstawnika C2 na kształtowanie konformacji części cukrowej jest zmniejszona wskutek przesunięcia równowagi *syn/anti* w kierunku *syn*. Potwierdzeniem tego przypuszczenia są różnice w preferencjach pofałdowania w serii pochodnych wozyiny.

3.2.3.4. Analiza konformacyjna części cukrowej C2 podstawionych pochodnych N4-dezmetylowozyiny w formie triacetylowanej

Dominującym typem pofałdowania Vac₃ w roztworze CDCl₃ jest C2'-*endo*-C1'-*egzo* (18,0%, P=135-153°), nieco mniejsze udziały wykazują konformery C3'-*endo*-C4'-*egzo* (15,5%, P=27-45°), C3'-*endo*-C2'-*egzo* (11,3%, P=351-9°) oraz C2'-*endo*-C3'-*egzo* (10,0%, P=171-189°, **Wykres 21**). Suma udziałów populacji konformerów regionów *North* i *South* jest bardzo zbliżona i wynosi odpowiednio 50,2% i 49,8%. Maksimum amplitudy pofałdowania przypadające na zakres 30-34° (29,7%) jest nieznacznie przesunięte w stronę wyższych wartości w porównaniu z roztworem w DMSO-d₆. Zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący 54,6% populacji konformerów wynosi 28-38°. Wzrost polarności medium wskutek zmiany rozpuszczalnika z CDCl₃ na DMSO-d₆ prowadzi do znaczących zmian w rozkładzie udziałów procentowych w zależności od P oraz φ. Preferowanym konformerem

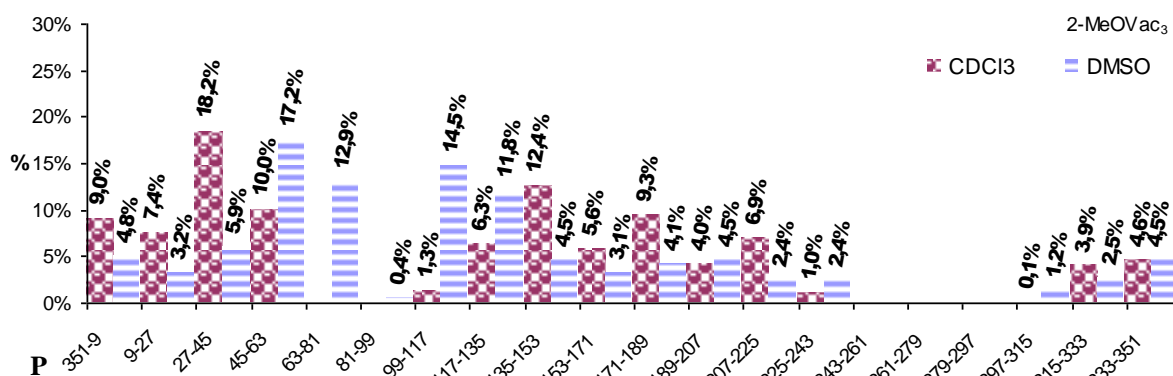
Wykres 21. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla Vac₃

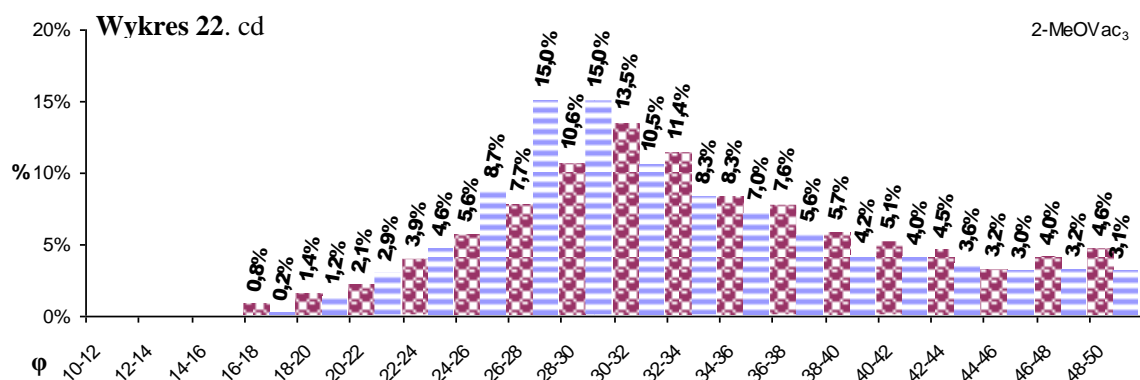


części cukrowej Vac_3 w DMSO-d_6 jest $\text{C1}'\text{-egzo}$ (26,8%, $P=117\text{-}135^\circ$), znacznie mniejsze udziały stwierdziłem dla $\text{C2}'\text{-endo-C1}'\text{-egzo}$ (10,0%) oraz $\text{O4}'\text{-endo-C4}'\text{-egzo}$ (9,6%, **Wykres 21**). W pozostałych zakresach kąta fazowego P udziały procentowe oscylują w granicach 4-6%. W porównaniu z pofałdowaniem części cukrowej dla Wac_3 w DMSO-d_6 , gdzie $\text{C1}'\text{-egzo}$ ma 17,9% udział, widoczny jest wyraźny wzrost udziału tego konformeru kosztem pozostałych. Konformery regionu *South* przeważają nad konformerami *North* i suma udziałów wynosi odpowiednio 58,8% oraz 41,2%. Rozkład częstości występowania w zależności od amplitudy pofałdowania charakteryzuje się jednym niezbyt wyraźnym maksimum przypadającym na zakres $\varphi=26\text{-}30^\circ$ (21,9%). Zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący 55,5% populacji konformerów wynosi $22\text{-}34^\circ$. Podsumowując, zmiana rozpuszczalnika z CDCl_3 na DMSO-d_6 przesuwa równowagę $\text{North}\leftrightarrow\text{South}$ w kierunku *South*, zmieniając wyraźnie preferencje pofałdowania części cukrowej. Obecność grup acetylowych powoduje nieznaczne zmniejszenie amplitudy pofałdowania w porównaniu z V.

Przeważającym konformerem części cukrowej 2-MeOVac₃ w CDCl_3 jest $\text{C3}'\text{-endo-C4}'\text{-egzo}$ (18,2%, $P=27\text{-}45^\circ$), nieco mniejszy udział przypada na $\text{C4}'\text{-egzo}$ (10%, $P=45\text{-}63^\circ$). Pozostałe konformery regionu *North* występują nieco rzadziej: $\text{C3}'\text{-endo-C2}'\text{-egzo}$ (9,0%, $P=351\text{-}9^\circ$), $\text{C3}'\text{-endo}$ (7,4%, $P=9\text{-}27^\circ$). W regionie *South* dominującym konformerem jest $\text{C1}'\text{-egzo-C2}'\text{-endo}$ (12,4%, $P=135\text{-}153^\circ$), oraz $\text{C2}'\text{-endo-C3}'\text{-egzo}$ (9,3%, $P=171\text{-}189^\circ$, **Wykres 22**). Maksimum amplitudy pofałdowania jest nieco przesunięte w stronę wyższych wartości, $\varphi=30\text{-}34^\circ$ (24,9%), natomiast w zakresie $26\text{-}36^\circ$ mieści się 51,5% populacji. Suma populacji konformerów regionów *North* i *South* wynoszą odpowiednio 53,1 % i 46,8%. W roztworze bardziej polarnego rozpuszczalnika (DMSO-d_6) dominującym konformerem staje się $\text{C4}'\text{-egzo}$ (17,2%), nieco mniejsze udziały wykazują konformery: $\text{O4}'\text{-endo-C4}'\text{-egzo}$ ($P=63\text{-}81^\circ$, 12,9%), $\text{O4}'\text{-endo-C1}'\text{-egzo}$ ($P=99\text{-}117^\circ$, 14,5%) oraz $\text{C1}'\text{-egzo}$ ($P=117\text{-}135^\circ$, 11,8%). W pozostałych zakresach P udział procentowy jest niewielki (1-5%). Sumy populacji konformerów *North* i *South* w DMSO-d_6 wynoszą 52,4% i 47,6%.

Wykres 22. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeOVac₃

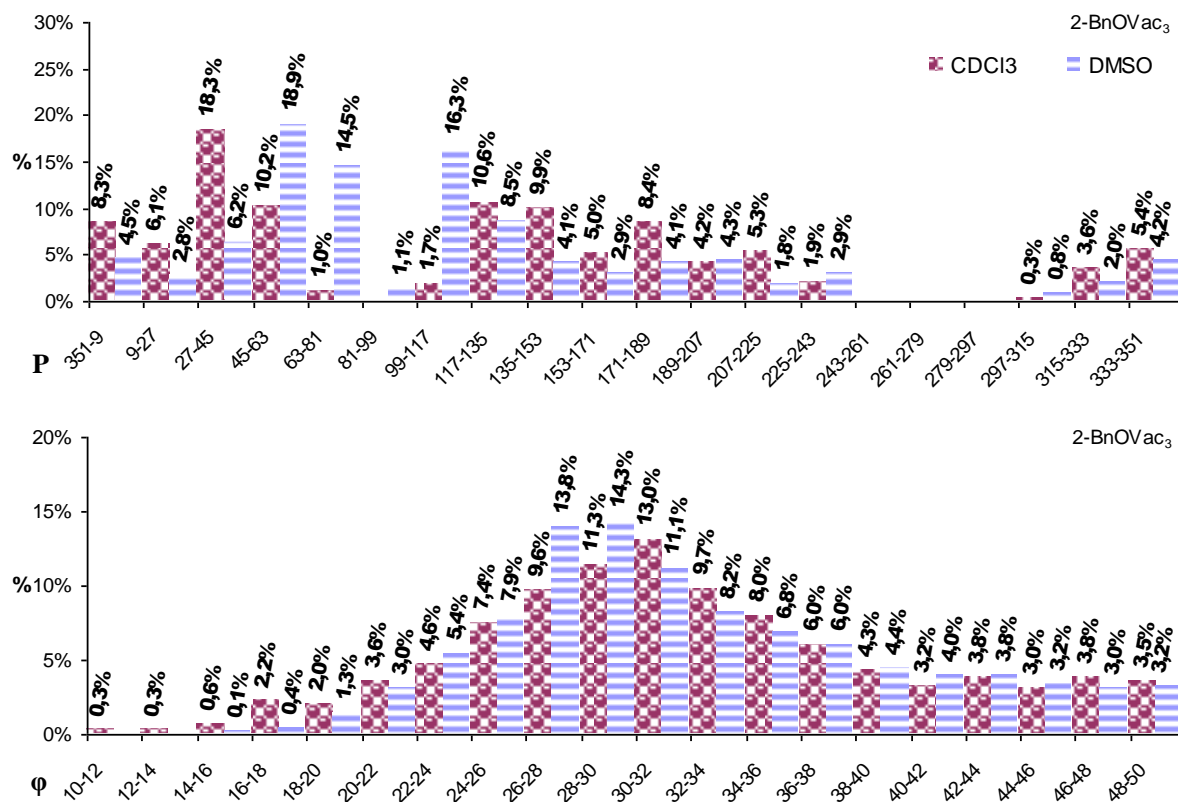




Należy zwrócić uwagę na znaczący wzrost udziału konformerów *North* (52,2%) w porównaniu z 2-MeOV (33,9%). Rozkład amplitudy pofałdowania cechuje się jednym wąskim i wyraźnym maksimum przypadającym na $\varphi=26-30^\circ$ (30,0%). W porównaniu z 2-MeOV pierścień cukrowy w 2-MeOVac₃ ulega nieznacznemu spłaszczeniu, wskutek obecności grup acetylowych. Zakres wartości φ od 24° do 34° obejmuje 57,5%.

Zwiększenie objętości podstawnika w C2 przez wprowadzenie grupy benzyloksylowej (2-BnOVac₃) w roztworze CDCl₃ nie zmienia rozkładu preferencji pofałdowania części cukrowej w porównaniu z 2-MeOVac₃. Dominującym pofałdowaniem regionu *North* jest C3'-endo-C4'-egzo (18,3%, P=27-45°), nieco mniejsze udziały wykazują C4'-egzo (10,2%, P=45-63°) i C3'-endo-C2'-egzo (8,3%, P=351-9°, **Wykres 23**). W regionie *South* najczęściej występującymi konformerami są: C1'-egzo (10,6%, P=117-135°), C1'-egzo-C2'-endo (9,9%,

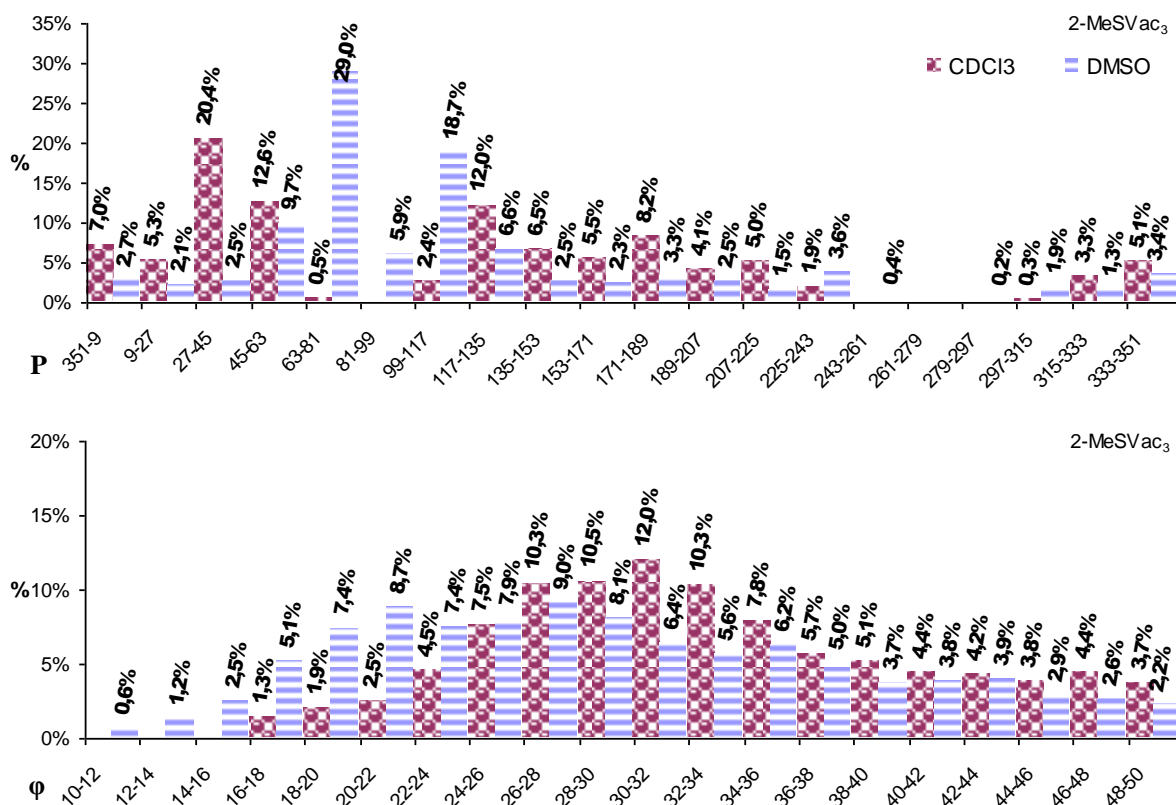
Wykres 23. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-BnOVac₃



P=135-153°) i C2'-endo-C3'-egzo (8,4%, P=171-189°). Maksimum amplitudy pofałdowania przypada na zakres $\varphi=28-32^\circ$ (24,3%), natomiast 51,6% populacji występuje w zakresie $\varphi=26-36^\circ$. Zmiana rozpuszczalnika na bardziej polarny (DMSO-d₆) powoduje wzrost udziału pofałdowań regionu *East* (P=63-117°), których sumaryczny udział wynosi 31,9% (14,5% dla O4'-endo-C4'-egzo, 16,3% dla O4'-endo-C1'-egzo i 1,1% dla O4'-endo). Największy udział w populacji ma C4'-egzo (18,9%). Kierunek zmian preferencji pofałdowania przy przejściu z 2-BnOV do 2-BnOVac₃ jest zbliżony do pary 2-MeOV/2-MeOVac₃, co skłania do przypuszczenia istnienia podobnego wpływu grup acetylowych na kształtowanie pofałdowania części cukrowej. Położenie maksimum amplitudy pofałdowania pierścienia rybozy, przypada na zakres $\varphi=26-30^\circ$ (28,1%), natomiast zakres amplitudy pofałdowania (φ) obejmujący niemal połowę populacji konformerów (55,3%) wynosi 24° do 34° .

Obecność grupy metylotiolowej w 2-MeSVac₃ nie zmienia obserwowanej tendencji w omawianych pochodnych Vac₃ w roztworze CDCl₃ do kształtowania się pofałdowania reszty cukrowej wzdłuż wiązania C3'-C4'. Preferowanym konformerem jest C3'-endo-C4'-egzo (20,4%, P=27-45°). Nieco mniejszy udział mają konformery C4'-egzo (12,6%, P=45-63°) i C3'-endo-C2'-egzo (7,0%, P=351-9°, **Wykres 24**). Sumaryczny udział konformerów typu C4'-egzo wynosi 33% i jest największy z spośród wszystkich pozostałych typów pofałdowań. W regionie *South* największy udział procentowy wynoszący 18,5% przypada na pofałdowanie z atomem C1' w pozycji *egzo* (C1'-egzo i C2-endo-C1'-egzo, P=117-153°) i nieco mniej na

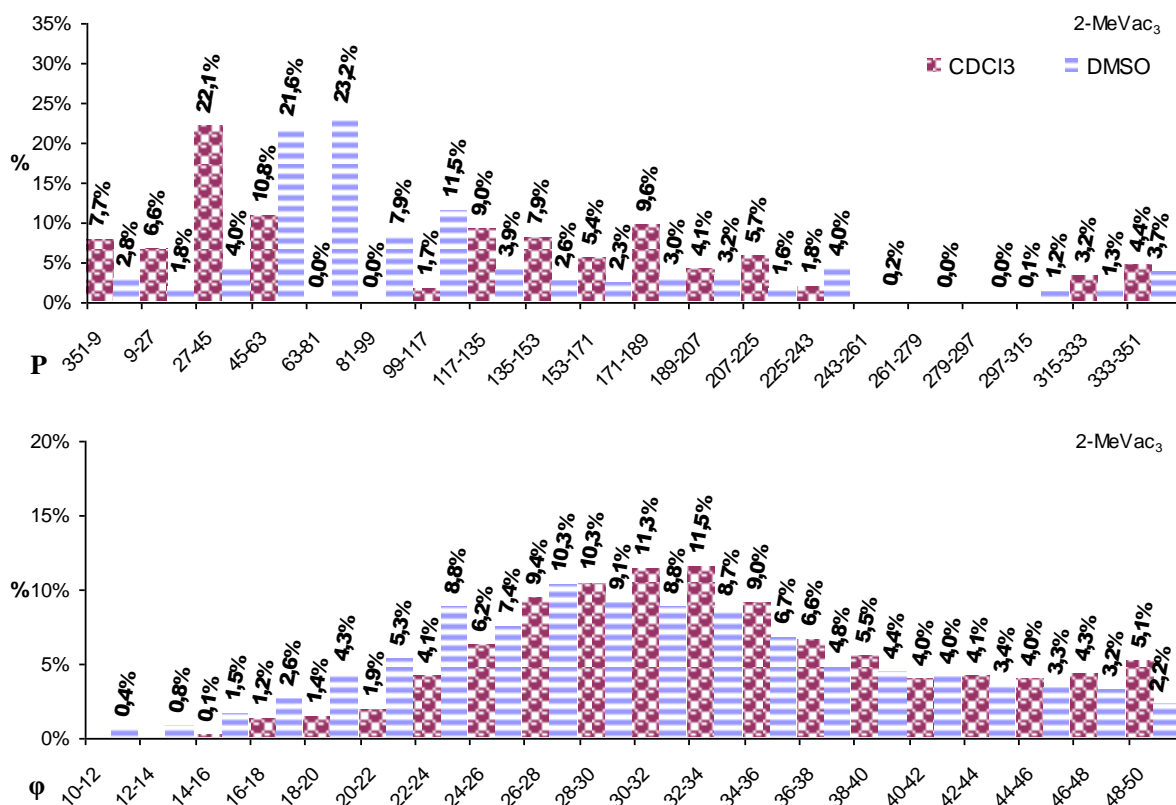
Wykres 24. Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeSVac₃



$C2'$ -endo- $C3'$ -egzo (8,2%, $P=171-189^\circ$). Rozkład amplitudy pofałdowania jest nieznacznie przesunięty w stronę wyższych wartości, maksimum przypada na $\varphi=28-34^\circ$ (32,8%), natomiast zakres amplitudy, w której udział jest powyżej 50,9% mieści się w $26-36^\circ$. Podobnie jak w wyżej przedstawionych pochodnych Vac_3 w roztworze bardziej polarnego rozpuszczalnika (DMSO- d_6) pofałdowanie części cukrowej kształtuje się wzdłuż wiązań $C4'-O4'$ i $O4'-C1'$. Dominującym konformerem w DMSO- d_6 jest $O4'$ -endo- $C4'$ -egzo ($P=63-81^\circ$, 29,0%), drugim konformerem wykazującym wyraźny udział jest $O4'$ -endo- $C1'$ -egzo (18,7%). Warto zwrócić uwagę z jednej strony, na znaczący spadek konformera $C4'$ -egzo (9,7%) w porównaniu z omawianymi pochodnymi Vac_3 , a z drugiej na zbliżoną z 2-BnOVac₃ wielkość udziału $O4'$ -endo- $C1'$ -egzo. Rozkład amplitudy pofałdowania charakteryzuje się brakiem wyraźnego maksimum przypadającym na $26-30^\circ$ (17,1%). W zakresie wartości $\varphi=16-36^\circ$ mieści się 71,7% populacji całkowitej.

Preferowanym konformerem części cukrowej 2-MeVac₃ w $CDCl_3$ jest $C3'$ -endo- $C4'$ -egzo ($P=27-45^\circ$, 22,1%). Nieco mniejszy udział przypada na konformery $C4'$ -egzo ($P=45-63^\circ$, 10,8%) i $C3'$ -endo- $C2'$ -egzo ($P=351-9^\circ$, 7,7%). Podobnie jak w wyżej omówionych związkach udział konformerów w których atom $C4'$ zajmuje pozycje *egzo* ($P=27-63^\circ$) jest największy spośród wszystkich pozostałych typów pofałdowań (32,9%, Wykres 25). W regionie *South* największy udział procentowy wynoszący 16,9% przypada na pofałdowanie z atomem $C1'$ w pozycji *egzo* ($P=117-153^\circ$; $C1'$ -egzo, $C1'$ -egzo- $C2'$ -endo). Rozkład amplitudy

Wykres 25 Statystyka struktur konformacyjnych (P) i stopnia pofałdowania (φ) rybozy dla 2-MeVac₃



pofałdowania jest nieznacznie przesunięty w stronę wyższych wartości w porównaniu z DMSO-d₆, maksimum przypada na wartość $\varphi=30-34^\circ$ (22,8%). Ponad połowa populacji (51,5%) przyjmuje amplitudę w zakresie $\varphi=26-36^\circ$. Zmiana charakteru rozpuszczalnika na bardziej polarny (DMSO-d₆) znacząco zmienia rozkład pofałdowania części cukrowej 2-MeVac₃. Dominującymi konformerami części cukrowej są O4'-*endo*-C4'-*egzo* (23,2%, P=63-81°) i C4'-*egzo* (21,6%, P=45-63°). Znacznie mniejsze udziały wykazują pofałdowania O4'-*endo* (7,9%, P=81-99°) i O4'-*endo*-C1'-*egzo* (11,5%, P=99-117°). Sumaryczny udział konformerów przyjmujących wartości P w zakresie od 63° do 117° (umownie region *East*) wynosi 41,0% (**Wykres 25**). Maksimum amplitudy pofałdowania przypada na zakres $\varphi=26-30^\circ$ (19,4%). Ponad połowa populacji (53,1%) przyjmuje amplitudę w zakresie $\varphi=22-34^\circ$.

Podsumowując stwierdzam, że częstość pojawiania się poszczególnych konformerów części cukrowej w Vac₃ i jej pochodnych wyraźnie zależy od rodzaju rozpuszczalnika. W roztworze CDCl₃ preferowane są konformery w których atomy C3' i C2' zajmują pozycję *endo*. Natomiast w obecności bardziej polarnego rozpuszczalnika (DMSO-d₆) preferencje pofałdowania przesuwają się w stronę konformerów w których atomy C4' i C1' zajmują pozycję *egzo*. Wpływ podstawnika C2 na konformację części cukrowej okazuje się być bardziej istotny w roztworze DMSO-d₆ aniżeli CDCl₃. Obecność grup acetylowych znacząco zmienia rozkład preferencji pofałdowania w porównaniu z nieblokowanymi pochodnymi N4-dezmetylowyozyny.

3.2.4. Orientacja wokół wiązania C4'-C5' w C2 podstawionych tricyklicznych pochodnych guanozyny

Rozkład populacji rotamerów wokół wiązania C4'-C5' omawianych związków w roztworze DMSO-d₆ i CDCl₃ wyznaczyłem na podstawie szeroko stosowanej metody wykorzystującej zależność wartości pomiędzy stałymi sprzężenia $J_{H4'5'}/J_{H4'5''}$ a kątem torsyjnym γ . Inne metody wykorzystują stałe sprzężenia $J_{C3'4'/5'H5'/5''}$ lub odległości pomiędzy H4'/3' a H5'/5''.⁴⁸¹ Rejestrację widm oraz symulację stałych sprzężeń przeprowadziłem w temperaturze 298K, jednak nie we wszystkich przypadkach udało mi się uzyskać akceptowalną zbieżność widma obliczonego z eksperymentalnym w zakresie występowania sygnałów H5'/H5''. Procentowe udziały poszczególnych rotamerów uzyskałem na podstawie następujących równań:

$$f_{gg} = \frac{13.3 - ({}^3J_{4'5'} + {}^3J_{4'5''})}{9.7} {}^{481}$$

lub

$$\begin{cases} gg + gt + tg = 1 \\ 2.4gg + 2.6gt + 10.6tg = J_{4'5'} \\ 1.3gg + 10.5gt + 3.8tg = J_{4'5''} {}^{497} \end{cases}$$

Wartości stałych sprzężeń $J_{4'5'}$ i $J_{4'5''}$ oraz obliczone procentowe udziały wszystkich rotamerów wokół wiązania C4'-C5' przedstawiłem w **Tabeli 22**. Przeważającym rotamerem w wyożynie (W) jest *gauche-gauche* (70%). Udział ten jest jest nieco większy od uzyskanego w pracy³⁰, który wynosił 55%. Wprowadzenie podstawnika w C2 powoduje wyraźny spadek udziału rotameru *gauche-gauche* (gg) o 22.8-36.5% na rzecz pozostałych dwóch rotamerów (*trans-gauche* i *gauche-trans*). Największy spadek względem W stwierdziłem w 2-MeOW (36.5%), 2-BnOW i 2-MeSW (ok. 35%), nieco mniejszy w 2-OW i N1-Me-2-OW (ok. 23%). Wyjątek stanowi 2-MeW gdzie różnica wynosi 12.8%. Wy tłumaczeniem zaobserwowanego zmniejszenia procentowego udziału gg może być tendencja do zmniejszenia oddziaływania sterycznego między grupą 5'OH i podstawnikiem C2. W przypadku 4,5'-cyklowoizyny (cW) udział *gauche-gauche* jest największy (88.6%) co można wytłumaczyć zahamowaniem swobody rotacji wokół wiązania C4'-C5'. Ten ostatni wynik jest zgodny z uzyskanym dla ciała stałego.⁴²⁴

Bardzo zbliżoną tendencję spadkową do wyżej przedstawionej zaobserwowałem dla pochodnych układu N4-dezmetylowoizyny (V). Spadek procentowego udziału gg względem V wynosi 30-33% w 2-MeOV, 2-BnOV, 2-MeSV i 16% w 2-MeV. Zaobserwowany efekt

spadkowy należy raczej przypisać bliskiemu sąsiedztwem zasady i przewodze orientacji *syn* aniżeli rodzajowi podstawnika.

Tabela 22. Wycylnalne stałe sprzężenia ${}^3J_{H4'H5'}$, ${}^3J_{H4'H5''}$ i populacje poszczególnych rotamerów

Związek	$J_{4'5'}$ [Hz]	$J_{4'5''}$ [Hz]	F gg	gg%(sc)	gt%(ap)	tg%(-sc)
W (DMSO-d ₆)	3.20	3.40	69.1	70.4	20.3	9.3
2-OW (DMSO-d ₆)	4.20	4.70	30.9	47.6	31.2	21.2
N1-Me-2-OW (DMSO-d ₆)	4.40	4.60	44.3	46.9	29.4	23.7
2-MeOW (DMSO-d ₆)	4.90	5.40	30.9	33.9	36.5	29.6
2-BnOW (DMSO-d ₆)	4.70	5.40	33.0	35.7	37.2	27.1
2-MeSW (DMSO-d ₆)	5.10	5.10	32.0	35.3	32.6	32.1
2-MeW (DMSO-d ₆)	3.20	4.60	56.7	57.6	33.4	8.9
cW (DMSO-d ₆)	2.60	2.20	87.6	88.6	9.2	2.2
Wac ₃ (DMSO-d ₆)	3.07	5.15	52.4	52.9	39.9	7.2
Wac ₃ (CDCl ₃)	2.85	2.87	78.1	79.2	15.7	5.1
2-OWac ₃ (DMSO-d ₆)	3.15	4.50	58.2	59.1	32.5	8.4
2-OWac ₃ (CDCl ₃)	2.74	5.30	54.2	54.3	42.6	3.1
N1-Me-2-OWac ₃ (DMSO-d ₆)	3.15	4.48	58.5	59.3	32.3	8.4
N1-Me-2-OWac ₃ (CDCl ₃)	2.80	5.56	50.9	50.9	45.3	3.8
2-MeOWac ₃ (DMSO-d ₆)	2.90	5.40	51.5	51.8	43.2	5.0
2-MeOWac ₃ (CDCl ₃)	3.30	4.00	61.9	63.1	26.5	10.3
2-BnOWac ₃ (DMSO-d ₆)	3.15	4.48	58.5	59.3	32.3	8.4
2-BnOWac ₃ (CDCl ₃)	3.45	5.73	42.5	43.3	45.0	11.7
2-MeSWac ₃ (DMSO-d ₆)	6.00	2.4	50.5	56.1	0.0	43.9
2-MeSWac ₃ (CDCl ₃)	5.65	3.25	45.4	50.1	10.5	39.4
2-MeWac ₃ (DMSO-d ₆)	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a
2-MeWac ₃ (CDCl ₃)	3.00	3.30	72.2	73.3	19.9	6.8
V (DMSO-d ₆)	3.5	3.5	64.9	66.7	20.4	12.9
2-MeOV (DMSO-d ₆)	4.8	5.5	30.9	33.7	38.0	28.3
2-BnOV (DMSO-d ₆)	4.7	5.5	32.0	34.6	38.3	27.1
2-MeSV (DMSO-d ₆)	4.9	5.1	34.0	37.1	33.2	29.7
2-MeV (DMSO-d ₆)	4.2	4.4	48.5	50.8	27.9	21.3
Vac ₃ (DMSO-d ₆)	3.45	4.95	50.5	51.6	36.4	11.9
Vac ₃ (CDCl ₃)	4.40	3.30	57.7	60.8	15.2	24.0
2-MeOVac ₃ (DMSO-d ₆)	3.7	5.45	42.8	44.1	41.1	14.9
2-MeOVac ₃ (CDCl ₃)	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a	--- ^a
2-BnOVac ₃ (DMSO-d ₆)	3.60	5.10	47.4	48.7	37.6	13.7
2-BnOVac ₃ (CDCl ₃)	4.15	3.60	57.2	59.8	19.3	20.9
2-MeSVac ₃ (DMSO-d ₆)	3.70	5.65	40.7	41.9	43.3	14.8
2-MeSVac ₃ (CDCl ₃)	3.90	5.90	36.1	37.5	45.3	17.2
2-MeVac ₃ (DMSO-d ₆)	3.00	5.65	47.9	48.2	45.6	6.2
2-MeVac ₃ (CDCl ₃)	4.30	5.90	32.0	33.9	44.0	22.1

^a brak możliwości ustalenia stałych sprzężenia ze względu na nakładanie się sygnałów H4' i H5'/H5''

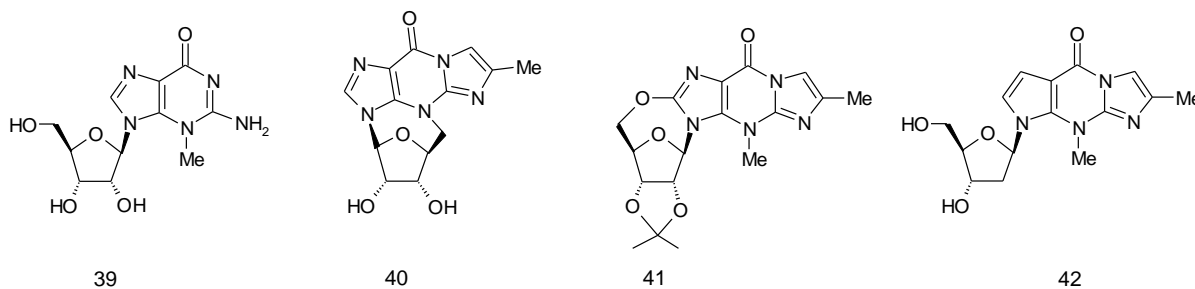
3.3. Badanie trwałości wiązania glikozydowego C2 podstawionych pochodnych wyozyiny

Otrzymanie C2 podstawionych pochodnych wyozyiny pozwoliło przeprowadzić badania wpływu podstawnika C2 na skłonność wiązania glikozydowego do hydrolizy kwasowej oraz podjęcie próby oceny udziału czynników decydujących o jego trwałości.

Dane literaturowe wykazują wysoką labilność wiązania glikozydowego wyozyiny (**5**) oraz jej purynowego analogu, 3-metyloguanozyny (**39**) w środowisku kwaśnym. Stwierdzono 10^5 krotny wzrost szybkości rozpadu wiązania w porównaniu z guanozyną (**Tabela 23**).^{458,498}

Tabela 23. Czas połowiczny ($t_{0.5}$) reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego guanozyny i niektórych jej pochodnych

Związek	$t_{1/2}$	
	0.1N HCl, 85°C	0.1N HCl, 25°C
Guanozyna (1)	41 min ⁴⁹⁸	2026 h ⁴⁵⁸
N4-dezmetylowyozyina (2)	157 min ⁴⁹⁸	25666 h ⁴⁹⁸
3-metyloguanozyna (39)	-----	42 s ⁴⁹⁸
Wyozyina (5)	-----	95 s ⁴⁹⁸
4,5'-cyklowyozyina (40)	110 min ⁴⁹⁸ (116 min ²⁸)	-----
2,5'-cyklo-2-okso-2',3'-O-isopropylidenowyozyina (41)	30 min w 50°C ⁴⁹⁹	b. wolny rozpad ⁴⁹⁹



Obniżenie trwałości wiązania glikozydowego próbowano w dwojaki sposób wyjaśnić w oparciu o wpływ odmiennych czynników: przestrzennego i elektronowego. W pierwszym przypadku, efekt ma być spowodowany zatłoczeniem przestrzennym wywołanym bliskim sąsiedztwem rybozy w N-9 (N-3) i grupy metylowej w położeniu N-3 (N-4) w 3-metyloguanozynie i wyozyinie.^{498,499} Poparcie dla tego przypuszczenia mogą stanowić zsyntetyzowane modele cyklicznych analogów wyozyiny: 4,5'-cyklowyozyina (**40**) oraz 2,5'-cyklo-2-okso-2',3'-O-isopropylidenowyozyina (**41**) cechujące się zwiększoną trwałością wiązania glikozydowego (**Tabela 23**).

W obu przypadkach, uważa się, że wzrost trwałości wynika z obecności usztywnionej struktury, zmniejszającej oddziaływanie pomiędzy grupą N4-metylową a resztą cukrową, jakkolwiek w przypadku **41** autorzy pracy zaznaczyli iż nie można zaniedbać efektu wywołanego obecnością mostka tlenowego.⁴⁹⁹ Natomiast wyniki badań Pracowni Chemii Nukleozydów IChB PAN sugerowały zasadniczy wpływ czynników elektronowych na stopień trwałości wiązania glikozydowego w związkach typu 3-metyloguanozyny i wyozyzny. Odnotowano 595-krotny lub 750-krotny (w pH odpowiednio 4.6 i 5.5) spadek trwałości wiązania glikozydowego w 2'-deoksywyozyynie w porównaniu z wyozyzną.⁵⁰⁰ Tak znaczącą różnicę można wyjaśnić w oparciu o stabilizujący wpływ obecności grupy 2'-OH na fragment O4'-C1'-C2' części cukrowej. Z kolei zastąpienie rybozy łańcuchem (2-hydroksyetoksy)-metylowym w N3 wyozyzny lub N9 3-metyloguanozyny powoduje odpowiednio 29 i 19-krotny wzrost trwałości.⁵⁰¹ Zwiększenie trwałości wiązania glikozydowego obserwowano także po zablokowaniu grup OH części cukrowej grupami acetylowymi (w przypadku Wac₃ 80-krotny wzrost trwałości wiązania glikozydowego w stosunku do W).⁵⁰² Natomiast w przypadku 4,5'-cyklowyozyzny, inni autorzy również uważają efekt elektronowy za czynnik dominujący.²⁸

Interesujący przykład może stanowić 2'-deoksy-1-deazawyozyyna (**42**) dla której stwierdzono wzrost trwałości wiązania glikozydowego w porównaniu z wyozyzną. Modyfikacja części zasadowej przez zastąpienie atomu N1 atomem C najwyraźniej wymusiła takie zmiany w rozkładzie elektronów prowadzące do wzrostu trwałości, a zarazem udowodniła rolę atomu N1 jako akceptora protonu podczas hydrolizy kwasowej.⁵⁰³ W powyższej pracy pojawiła się sugestia, iż szybka hydroliza wyozyzny w porównaniu z guanozyną, spowodowana jest występowaniem tej pierwszej w konformacji *anti*. Według autorów, nukleozyd w konformacji *anti* jest bardziej podatny na hydratację, co ma znaczenie dla stabilizacji obdarzonego ładunkiem produktu przejściowego.

Wpływ wprowadzonych przeze mnie podstawników w położeniu C2 wyozyzny na hydrolityczną wrażliwość wiązania glikozydowego w środowisku kwasowym okazał się interesująco różnorodny.

Ocenę trwałości wiązania glikozydowego przeprowadziłem wg metody Vierordta. Istota tej metody polega na pomiarze absorpcji UV w dwóch długościach fal, charakterystycznych dla substratu i produktu jego hydrolizy w określonych odstępach czasowych. Wyznaczone wartości absorpcji wstawiałem do poniższego wzoru Vierordta, otrzymując procent molowy substratu (X) w danym czasie pomiaru:

$$X = \frac{A_B^{\lambda_1} \times A_m^{\lambda_2} - A_B^{\lambda_2} \times A_m^{\lambda_1}}{A_B^{\lambda_1} \times A_A^{\lambda_2} - A_B^{\lambda_2} \times A_A^{\lambda_1}}$$

Gdzie $A_A^{\lambda_1}$, $A_A^{\lambda_2}$ – absorpcja substratu przy pierwszej i drugiej długości fali

$A_B^{\lambda_1}$, $A_B^{\lambda_2}$ – absorpcja produktu przy pierwszej i drugiej długości fali

$A_m^{\lambda_1}$, $A_m^{\lambda_2}$ – absorpcja mieszaniny przy pierwszej i drugiej długości fali

Metoda ta bardzo dobrze nadaje się do badania trwałości analogów wyożyny, ze względu na znacząco odmienne widmo UV produktu hydrolytycznego rozpadu.

Wyżej wymienione związki. poddawałem reakcji hydrolyzy w trzech różnych stężeniach HCl (0.1N, 0.01N, 0.001N) w temperaturze 37°C i wyznaczałem czas połowiczny ($t_{0,5}$) reakcji hydrolyzy wiązania glikozydowego. Stężenie HCl dla którego wyznaczyłem $t_{0,5}$ reakcji hydrolyzy wszystkich omawianych związków to 0.01N. Dla tego stężenia przeprowadzę dyskusję wartości $t_{0,5}$.

Najwyższą wartość $t_{0,5}=600\text{min}$ wykazywał związek 2-OW, nieco mniejszą $t_{0,5}=480\text{min}$ wyznaczyłem dla jego N1 metylo analogu. (**Tabela 24**) Trwałość wiązania glikozydowego analogów tlenowych pozostaje w wyraźnym kontraście z trwałością wyznaczoną dla W, gdzie $t_{0,5}$ wynosi zaledwie 6-6,5 min. Tak drastyczny wzrost $t_{0,5}$ przypuszczalnie spowodowany może być zmianami rozkładu gęstości elektronowej w obrębie układu imidazolowego zasady (N1-C2-N3-C3a-C9a), czego dowodem są obserwowane zmiany przesunięć chemicznych ^{13}C i ^{15}N tego fragmentu (omówione wcześniej str. 138, **Tabele 15 i 16**). Natomiast 2-MeOW i 2-BnOW charakteryzują się około 2 krotnie wyższym ale porównywalnym $t_{0,5}$ W wynoszącym odpowiednio 14 i 12 min. Wzmocnienie trwałości wiązania glikozydowego w pochodnych 2-okso należy przypisać zmniejszeniu aromatycznego charakteru lewego pierścienia imidazolowego zasady. W odniesieniu do 2-MeOW i 2-BnOW nieznaczny wzrost trwałości również należy przypisać indukcyjnemu oddziaływaniu atou tlenu na pierścień imidazolowy jednak wpływ tego czynnika nie jest aż tak znaczący jak w przypadku pochodnych 2-okso. Zdecydowanie niższy czas $t_{0,5}$ wykazywały pochodne 2-MeSW i 2-MeW – odpowiednio 85-90 s i 25-30 s. W tym przypadku, znaczny spadek trwałości wiązania prawdopodobnie można przypisać przyjętej przez pierścień β -rybozy konformacji z regionu *East*. Wydaje się, że dla 2-MeSW i 2-MeW wpływ czynników elektronowych na trwałość wiązania glikozydowego jest znacznie słabszy od czynników sterycznych spowodowanych oddziaływaniem grupy C2-część cukrową. Dodatkowym potwierdzeniem powyższej hipotezy mogą być niemal identyczne widma ^{13}C w części zasadowej obu związków i niewielkie różnice w przesunięciach chemicznych w porównaniu z wyożyną.

Tabela 24. Czas połowiczny ($t_{0,5}$) reakcji hydrolizy wiązania glikozydowego wyożyny i jej C2 podstawionych w środowisku HCl ($t=37^{\circ}\text{C}$) wyznaczony metodą Vierordta

	λ_1 (nm)	λ_2 (nm)	$t_{0,5}$ 0.1N	$t_{0,5}$ 0.01N	$t_{0,5}$ 0.001N
W	270	290	32 s	6 min	70 min
	300	310	35 s	6.5 min	75 min
2-MeOW	245	290	---	14 min	135 min
2-BnOW	245	275	---	12 min	115 min
N1-Me-2-OW	246	292	45 min	480 min	-----
2-OW	245	297	55 min	600 min	-----
2-MeSW	239	260	---	85 s	13,5 min
	270	290	---	90 s	13,5 min
2-MeW	230	245	---	25 s	4,5 min
	290	320	---	30 s	5,5 min