

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

Стефан Емилов Бояджиев

**СТЕРЕОХИМИЯ НА ЛИНЕЙНИ ТЕТРАПИРОЛИ,  
ПРОИЗВОДНИ ОТ ЖЛЪЧНИТЕ ПИГМЕНТИ И ТЕХНИТЕ  
СЪСТАВНИ ЕЛЕМЕНТИ**

АВТОРЕФЕРАТ

НА ДИСЕРТАЦИЯ ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА НАУЧНАТА СТЕПЕН  
"ДОКТОР НА ХИМИЧЕСКИТЕ НАУКИ"

Научна специалност  
01.05.03 Органична химия

Рецензенти: 1. Проф. Светлана Симова, дхн, ИОХ-БАН  
2. Проф. Владимир Димитров, дхн, ИОХ-БАН  
3. Проф. Тодор Делигеоргиев, дхн, ХФ-СУ

Плевен, 2011 г.

Дисертационният труд съдържа 183 страници, 53 фигури, 21 схеми, 6 таблици и списък на цитираните 554 литературни източници. Приложението към него съдържа 394 страници – копия на 27 публикации, разгледани в дисертацията. По тези статии са забелязани 217 цитата.

Експериментите по дисертацията са проведени в лабораториите на Химически Факултет, Университет в Невада – Рино, САЩ. За гостоприемството в тези лаборатории и за въвеждането ми в стереохимията на билирубина изказвам дълбока благодарност на проф. Д. А. Лайтнер.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от разширен катедрен съвет на Катедра „Химия и биохимия & физика и биофизика” на Медицински университет – Плевен.

Публичната защита на дисертационната работа ще се състои на 23.06.2011 г. от 14 часа в зала „Гален” на Медицински университет – Плевен пред научно жури в състав:

Председател: Доц. Регина Комса-Пенкова, дб, МУ-Плевен

Членове: Проф. Владимир Димитров, дхн, ИОХ-БАН

Проф. Светлана Симова, дхн, ИОХ-БАН

Проф. Тодор Делигеоргиев, дхн, ХФ, Софийски Университет

Проф. Валерий Христов, дхн, ХФ, Шуменски Университет

Доц. Елена Станоева, дх, ХФ, Софийски Университет

Доц. Илиян Иванов, дх, ХФ, Пловдивски Университет.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се на интернетната страница на МУ-Плевен: <http://www.mu-pleven.bg/>

Автор: Стефан Емилов Бояджиев

Заглавие: Стереохимия на линейни тетрапироли, производни от жлъчните пигменти и техните съставни елементи.

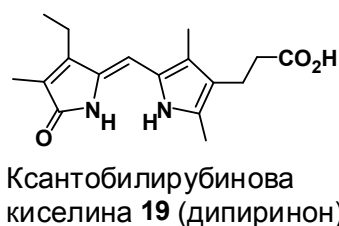
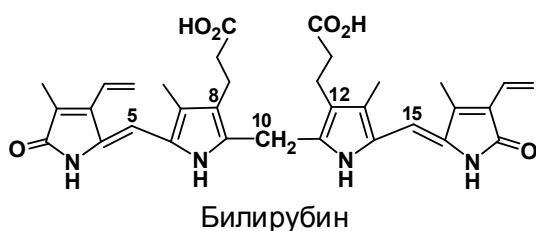
Тираж: 50 бр.

Печатна база на Медицински университет – Плевен

## УВОД

Природните пигменти на живота – хем и хлорофил, съдържат тетрапиролов макроцикъл, произведен от порфирин. Неговото метаболитно или катаболитно окислително отваряне води до линейни тетрапироли, често наричани обобщено "жлъчни пигменти". От тях, освен някои жизнено важни за растенията пигменти, най-голямо внимание е получил билирубинът поради значението му за хуманната медицина. Билирубинът е жълто-оранжевият пигмент на жълтеницата, срещаща се най-често у новородените, и видимо се проявява при чернодробни заболявания. Съвременното знание по метаболизма на билирубина е все още непълно и работите в тази насока през последните две десетилетия са удачен пример и доказателство за ролята на стереохимията в биохимичните процеси. Това познание се възприема от дву-размерни средства, като печатни страници и компютърен екран, и неусетно може да се пропусне, че химичните реакции са процеси в три измерения, каквито са и метаболитните процеси в човешкия организъм.

Структурата на билирубина е била установена и доказана с тотален синтез през 1941 г., а по-късно – и с рентгеноструктурен анализ. Пигментът се състои от два дипиринона, хромофорните му части, свързани към централна метиленова група.



Структурната формула в 2D не обяснява аномалните свойства на билирубина, чиято молекула е гъвкава и може да приеме голям брой форми с различна енергия. Предпочетените конформери, които са били доказани в кристал и разкрити в разтвор, са стабилизирани с шест вътрешномолекулни водородни връзки, образувани между срещуположни COOH и NHCO/NH групировки. Изискванията за реализиране на тези конформации са: 1) наличие на остатъци от пропионова киселина на C-8 и C-12; 2) (Z)-конфигурация на екзоцикличните двойни връзки при C-4 и C-15; 3) *син*-перипланарна конформация в дипириноните. Синтетичният, симетричен мезобилирубин XIII $\alpha$ , в който етилови групи заменят виниловите и едната от тях е на C-17, отговаря на тези изисквания и проявява почти идентични свойства с природния пигмент. Затова мезобилирубинът XIII $\alpha$  е избран в нашата работа за основната структура, чийто модификации да дадат оптично активни аналози.

## ЦЕЛ НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Да се проведе детайлно проучване на пространствената структура на синтетични оптично активни производни на линейните тетрапироли – билирубини и биливердини, както и на техни градивни елементи – дипиринони и монопироли.

## ЗАДАЧИ

За постигане целта на работата е необходимо да се модифицира структурата на базовото съединение мезобилирубин XIII $\alpha$  като в него се въведат хирални центрове на подходящи позиции. Интелигентният дизайн на такива тетрапироли позволява контрол на цялостната им молекулна форма чрез конформационен контрол, който се дължи на стерични взаимодействия между отдалечени по връзки, но пространствено сближени заместители (алостерични взаимодействия). Предварително формулираният пространствен модел за такъв конформационен контрол предлага вариации на броя и мястото на допълнителните хирални центрове, както и структурни модификации с цел въздействие върху характерните за билирубина вътрешномолекулни водородни връзки.

Получаването на оптично активни билирубини и техни синтони с желаната структура изисква прилагане на подходящи синтетични методи, включително ефективно разделяне на енантиомери на определен синтетичен етап. Необходимо е да се разработят нови и развият достъпни синтетични методи използвайки модерните постижения на органичния синтез.

Основополагащо за стереохимичните изводи е познанието на абсолютната конфигурация на целевите билирубини. Затова е необходимо доказването по недвусмислен начин на абсолютната конфигурация на някои възлови съединения. Те би трябвало да са подходящи изходни съединения в дивергентни синтези по реакции без рацемизация.

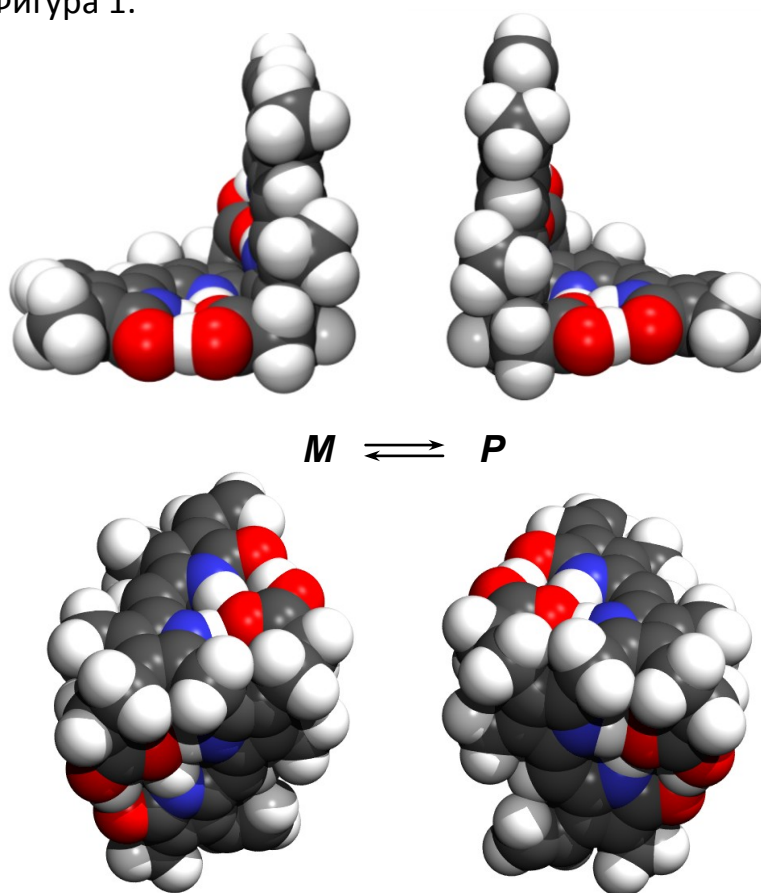
За установяване на пространствената структура на описаните в този труд билирубини е необходимо да се проведе подробен конформационен анализ. За него да се използват както изчислителни методи, така и комбинация от модерни експериментални методи като 1D и 2D ЯМР спектроскопия. Резултатите от този анализ да се съпоставят с хироптичните спектрални характеристики на получените моделни съединения.

Една от поставените съществени задачи е да се приложи широко хироптичната спектроскопия към хирални билирубини с вътрешно-присъща оптична активност. Необходимо е да се установи корелация между абсолютната конфигурация, предпочетената конформация

(екситонна хиралност) и наблюдаваните експериментално хироптични характеристики. Корелацията да се използва не само за доказване на абсолютната конфигурация на нови билирубинови аналози, но и за преценка на тяхното вътрешномолекулно водородно свързване.

### АЛОСТЕРИЧЕН МОДЕЛ ЗА КОНФОРМАЦИОННА СЕЛЕКЦИЯ В ХИРАЛНИ БИЛИРУБИНИ

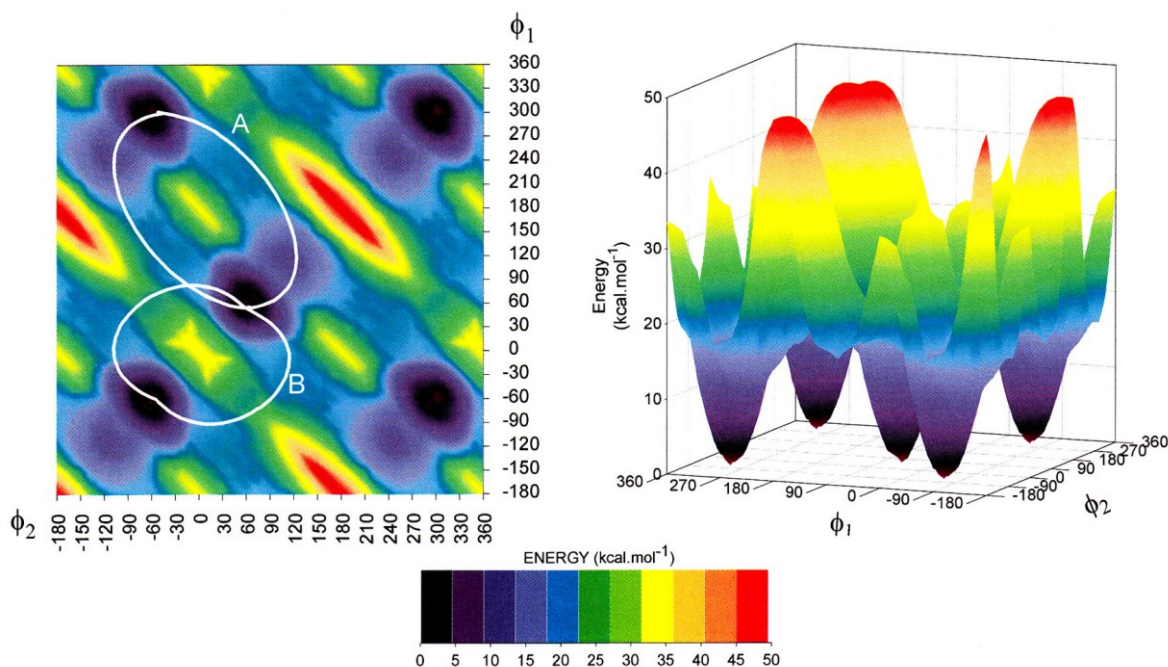
Билирубинът е ахирално съединение. Двете му силно предпочетени, изоенергийни конформации са псевдоенантиомерни, еднакво населени в изотропна среда и се намират в динамично равновесие, Фигура 1.



Фигура 1. Предпочетените конформации на билирубин

Изместване на това равновесие и, в следствие, генериране на оптична активност преди началото на нашата работа е било постигано от други автори само в присъствие на допълнително добавени в разтвор хирални агенти като човешки серумен албумин, амини, сулфоксиди, циклодекстрини, липиди и други. Конформационният анализ на билирубин, проведен с молекулно-механични (ММ) изчисления, предостави основата за изграждане на модел и предсказване на възможността за изместване на равновесието  $M \rightleftharpoons P$  чрез въвеждане на

хирални центрове в остатъците от пропионова киселина.<sup>1-5</sup> Идентични с билирубина разлики в енергиите на отделните конформации се получават при мезобилирубин XIII $\alpha$ , чиято конформационна карта (Фигура 2) илюстрира изменението на енергията при независимо въртене на дипириноните около връзките C-9/C-10 ( $\Phi_1$ ) и C-10/C-11 ( $\Phi_2$ ).

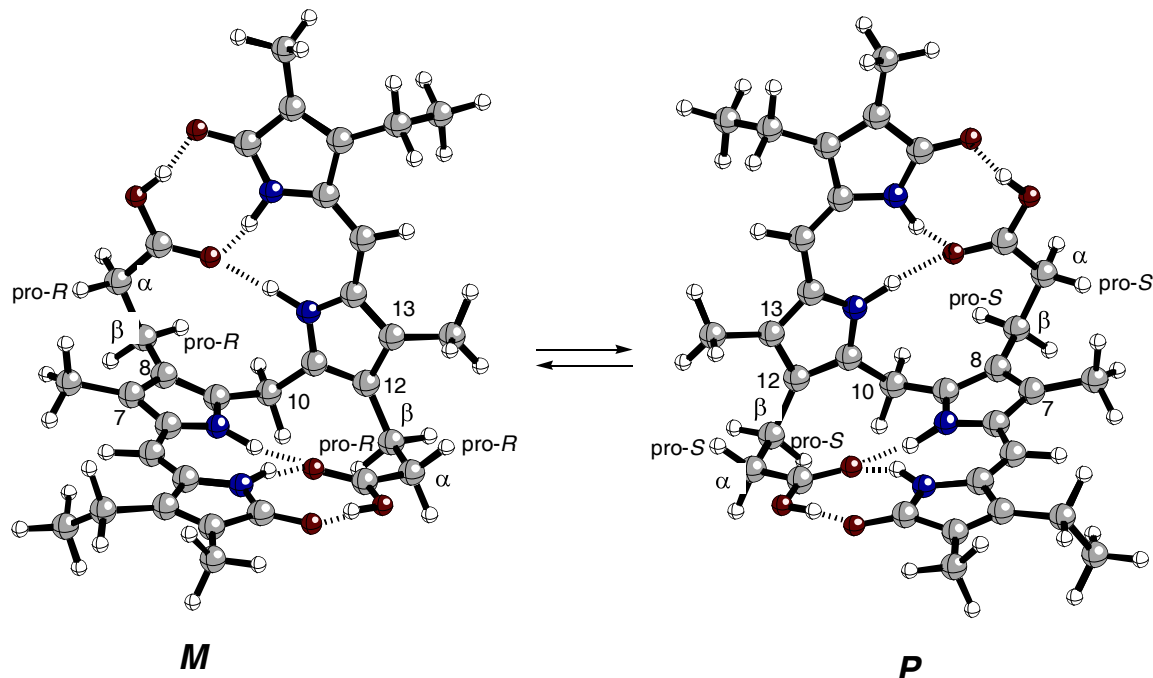


Фигура 2. Контурна карта и повърхност на конформационната енергия за мезобилирубин XIII $\alpha$

Намерената с ММ изчисления конформация в глобален минимум във Фигура 2 при торзионни ъгли  $\Phi_1 = \text{N-22} / \text{C-9} / \text{C-10} / \text{C-11} = 60^\circ$  и  $\Phi_2 = \text{C-9} / \text{C-10} / \text{C-11} / \text{N-23} = 60^\circ$  е с *P*-хиралност, а останалите в минимумите – с *M*-хиралност. При тези стойности двустенният ъгъл между дипириноните е  $\sim 100^\circ$ , което е в съответствие с данните от рентгеноструктурен анализ. Остатъците от пропионова киселина приемат фиксирана конформация в етановия фрагмент, като при това подреждане полярните крайни групи C=O и -OH са геометрично предразположени към участие във вътрешномолекулни Н-връзки. Несвързващите разстояния N-H...O=C и COOH...O=C попадат във възприетите граници за дължина на водородна връзка. Барьерата за конформационна инверсия по пътя (A) е малко по-ниска ( $82 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) отколкото по пътя (B) и съвпада задоволително с експериментално установената стойност.

Анализът на несвързващите междуатомни взаимодействия в енантиомерните конформери във Фигура 3 разкрива няколко твърде къси разстояния и коренно различни стерични обкръжения на един и същ водороден атом в етановите фрагменти на киселинните остатъци когато

молекулата е сгъната в *M*- или в *P*-хирална конформация. Тези разлики подсказаха елегантен начин да се повлияе върху нормалното 1:1 равновесие  $M \rightleftharpoons P$  без да се прибегва до допълнителни оптично активни агенти, модификация на карбоксилните групи с оптично активни реагенти и подобни подходи, които разчитат на образуване на *диастереомери* и на различните им енергии. Алостеричният модел за изместване на  $M \rightleftharpoons P$  равновесието, в противоположност, разчита на *вътрешномолекулно "оптично разделяне"* на *диастереомерни* конформери поради стерични отблъсквания – въздействия от разстояние на разумно поставени групи.<sup>1-5</sup>



Фигура 3. Конформационно предпочитаните енантиомерни структури на мезобилирубин XIII $\alpha$  и конфигурационните означения на ключовите места за заместване

В конформационния *M*-хирален енантиомер (*pro-R*)-водородните атоми на  $\alpha$ - и  $\alpha'$ -метиленовите групи са в непосредствена близост до C-7 и C-13 метиловите групи, но ( $\alpha, \alpha'$ -*pro-S*)-водородите са значително по-малко стерично запречени. В енантиомерната *P*-хирална конформация се наблюдава обратното – ( $\alpha, \alpha'$ -*pro-R*)-H атомите се намират в по-свободно пространство, но сега ( $\alpha$ - и  $\alpha'$ -*pro-S*)-H са доведени в близост до метиловите групи на C-7 и C-13. Когато един от  $\alpha$ - и  $\alpha'$ -метиленовите водородни атоми се замести с по-обемист атом или група, те ще се стремят да бъдат най-малко стерично запречени и ще заемат свободните от стерично напрежение достъпни пространства. Следователно, заместването на всеки един от (*pro-R*)  $\alpha$ -водородите, например с метилова група, ще дестабилизира конформационния енантиомер с *M*-хиралност поради  $\alpha$ -CH<sub>3</sub> / C-7 CH<sub>3</sub> и  $\alpha'$ -CH<sub>3</sub> / C-13 CH<sub>3</sub> челно отблъскване и

равновесието следва да се измести в посока към **P**-енантиомера. И обратното, заместване на ( $\alpha, \alpha'$ -*pro-S*)-водородите с метилови групи ще дестабилизира енантиомера с **P**-хиралност поради  $\text{CH}_3 / \text{CH}_3$  отблъскване и ще насочи равновесието към **M**-енантиомера.

Силни стерични отблъсквания се очакват и при заместване на  $\beta$ -водородни атоми с метилови групи, но в този случай стеричната конфронтация е с централната C-10 метиленова група. От Фигура 3 се вижда, че  $\beta, \beta'$ -(*pro-R*) водородите са в близост до C-10  $\text{CH}_2$  когато пигментът е сгънат в **M**-хирална конформация. Следователно, заместването на тези ( $\beta$ -*pro-R*)-H с метилови групи би довело до изместване на равновесието към конформера с **P**-хиралност, в която и двете ( $\beta R$ )- и ( $\beta'R$ )- $\text{CH}_3$  групи ще са отдалечени от C-10 водородните атоми. Заместване на ( $\beta$ -*pro-S*)- и ( $\beta'$ -*pro-S*)-H с метилови групи ще е съпроводено с притискането им към C-10  $\text{CH}_2$  в **P**-хиралния конформер и в резултат се предсказва, че **M**-хиралният конформер ще бъде предпочитан.

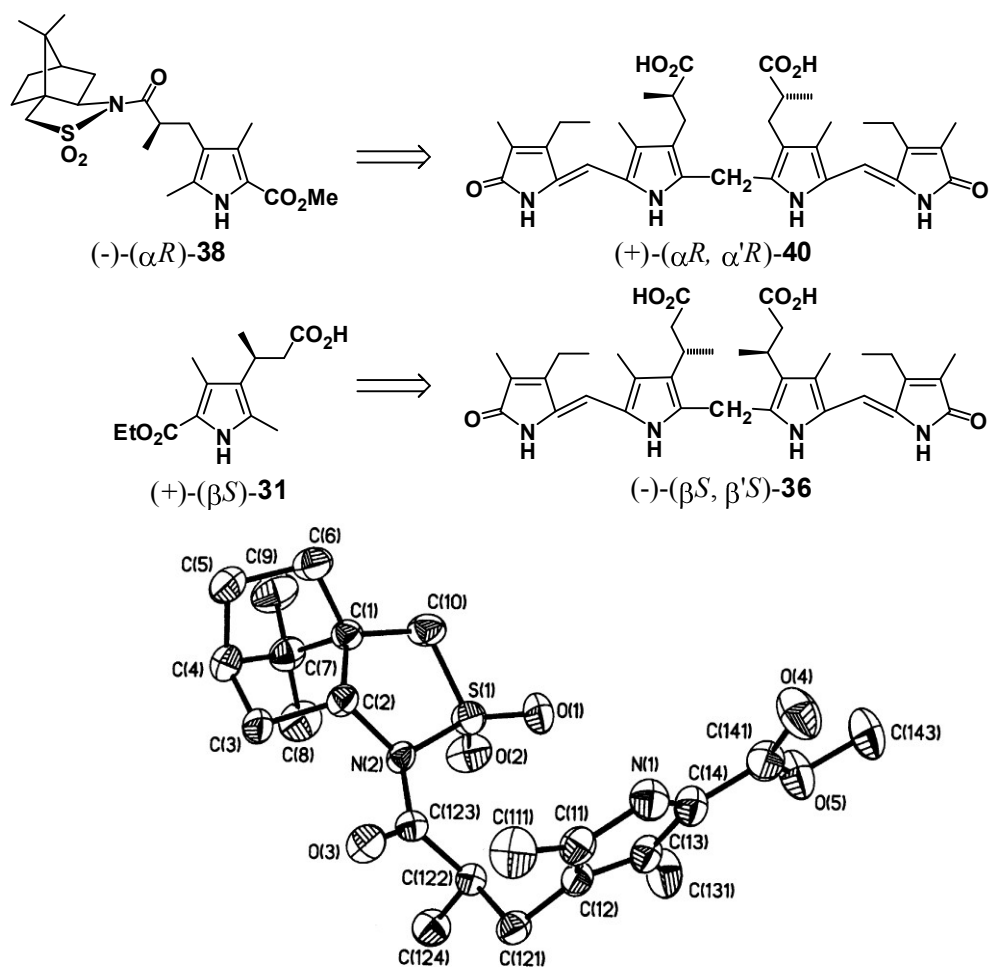
В случаите когато конфигурациите не са еднакви, както в  $\alpha, \alpha'$ - и  $\beta, \beta'$ - (*R, S*)-диастереомери (от мезо- тип поради наличие на равнина на симетрия) оптична активност не се очаква, но различното вътрешномолекулно водородно свързване ще доведе до различни свойства на пигментите. В тях се въвеждат идентични дестабилизиращи стерични отблъсквания както в **P**-, така и в **M**-хиралните диастереомери, които ще са еднакво населени.

Съобразно задачите на работата по предложените по-горе  $\alpha$ - или  $\beta$ -заместени мезобилирубини трябва да се подчертае, че предвижданията на алостеричния модел биха се реализирали в реалност само ако вътрешномолекулното свързване чрез H-връзки продължава да е мощен фактор за стабилизацията на конформерите от Фигура 3. В случай, че нововъведените стерични взаимодействия от заместване с метилови групи отслабват или унищожават мрежата вътрешномолекулни H-връзки, моделът няма да оперира както се предсказва по-горе и конформационната селекция **M**- или **P**- би била минимална.

### ОПТИЧНО АКТИВНИ ( $\alpha R, \alpha'R$ )- И ( $\beta S, \beta'S$ )-ДИМЕТИЛМЕЗОБИЛИРУБИНИ

Синтезът на енантиомерно чистите ( $\alpha R, \alpha'R$ )- и ( $\beta S, \beta'S$ )-диметилмезобилирубини постигнахме от разделени на енантиомери монопиролови предшественици **38** и **31**. Разделянето на първия бе осъществено чрез превръщане на рацемичния, подходящо заместен пирол в амид с (1*S*)-камфор-2,10-султам,<sup>4</sup> а на **31** – чрез класическо разделяне на солите образувани с (–)-бруцин.<sup>3</sup> Абсолютната конфигурация на **31**·(–)-бруцин и на **38** (Фигура 4) бе доказана с рентгеноструктурен анализ.

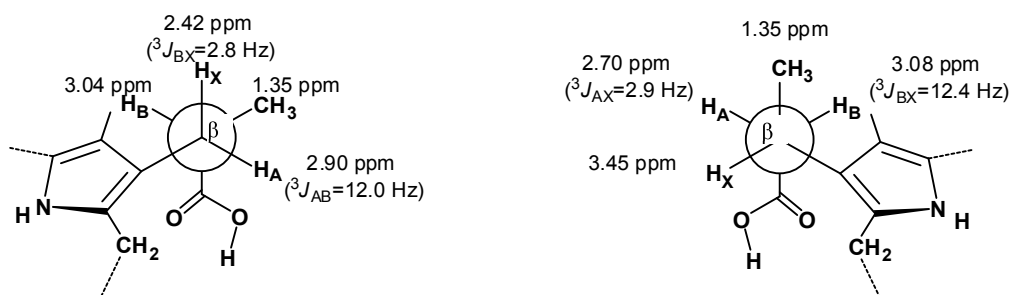




Фигура 4. Структура на **38** от рентгеноструктурен анализ

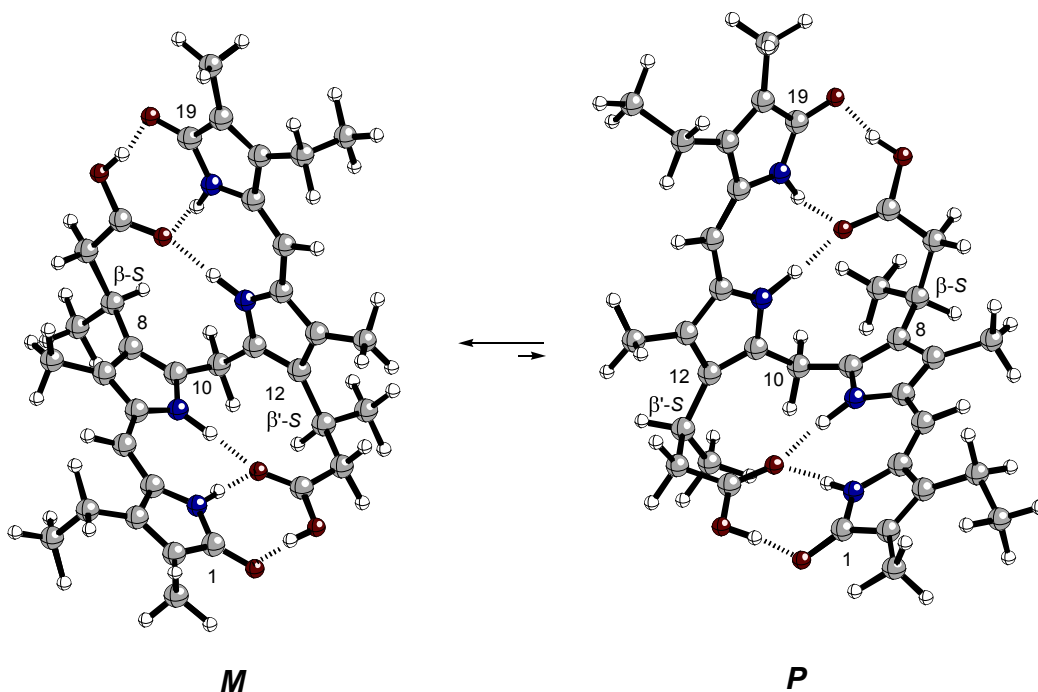
Съответната на **38** пирол-пропионова киселина проявява различни ЯМР спектри в зависимост от енантиомерното съотношение и концентрацията. Тези ефекти се дължат на формиране на димерни структури с участие на междумолекулни Н-връзки, като (*R*, *S*)-хетеродимерът е по-стабилен. Използвайки адаптирани за конкретния случай синтетични методи от литературата, пиролите **31** и **38** бяха превърнати последователно в дипиринони, мезобиливердини и съответните мезобилирубени **36** и **40**, с което се доказва и абсолютната конфигурация не само на целевите мезобилирубени, но и на междинните съединения.

Характерните  $^1\text{H}$  ЯМР химични отмествания на лактамните и пироловите *NH*, както и на  $\text{COOH}$  протоните, свидетелстват за вътрешномолекулно водородно свързани конформации на **36** и **40**, подобни на вече описаните при билирубин и мезобилирубин XIII $\alpha$ . Стойностите на вициналните константи на спин-спиново взаимодействие в киселинните вериги в  $(\alpha R, \alpha'R)\text{-40}$  и  $(\beta S, \beta'S)\text{-36}$  са доказателство за сегмент с фиксирано, скосено подреждане на заместителите, както е показано във Фигура 5.



Фигура 5. Проекции на Newman на киселинните вериги в *P*-хиралния **40** (ляво) и в *M*-хиралния **36** (дясно) съгласно стойностите на *J*-константи и резултатите от 1D nOe измервания

Предпочитанието към една от двете форми на сгъване на **36** и **40** бе установено експериментално с подробни измервания на  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  ядрения ефект на Overhauser (nOe). Силните 1D nOe между лактамните и пиролови NH протони, както и между C-5, C-15 –CH= и (C-3, C-17 CH<sub>2</sub> и C-7, C-13 CH<sub>3</sub>) в CDCl<sub>3</sub>, съответстват на плоски дипиринони в *син*-(*Z*)-конформация и се наблюдават винаги при присъствие на пълно вътрешномолекулно Н-свързване в изследваните мезобилирубини.



Фигура 6. Предпочетените конформации на ( $\beta_S$ ,  $\beta'S$ )-**36**, от които *M*-хиралната значително преобладава

Силните nOe между  $\alpha, \alpha'$ -H<sub>B</sub> и C-7, C-13 CH<sub>3</sub> (Фигура 5) и отсъствието на ефект между  $\alpha, \alpha'$ -CH<sub>3</sub> и пироловите CH<sub>3</sub> групи убедително доказват *P*-хиралната конформация на ( $\alpha R$ ,  $\alpha'R$ )-**40**. Разкритата от nOe стерична

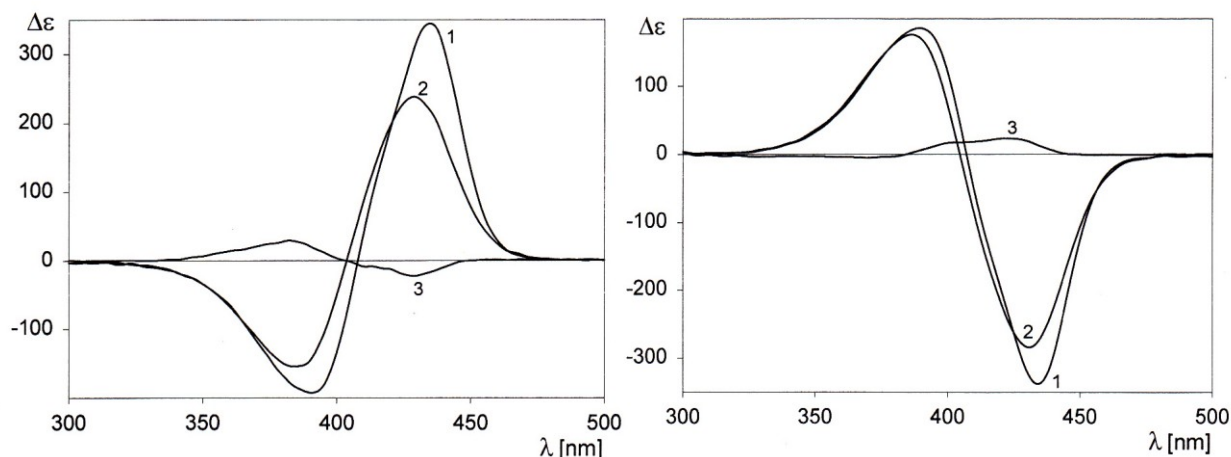
близост между  $\beta, \beta'$ -CH<sub>x</sub> и C-10 CH<sub>2</sub>, както и на C-7, C-13 CH<sub>3</sub> и  $\beta, \beta'$ -CH<sub>3</sub> е в съответствие със съществуването на ( $\beta S, \beta' S$ )-**36** в *M*-хирална конформация, както е илюстрирано във Фигура 6. Данните от ЯМР, в цялост, не изтъкват нарушения в мрежата вътрешномолекулни Н-връзки при заместване с  $\alpha$ - или с  $\beta$ -метилови групи спрямо мезобилирубина.

Експерименталните доказателства за вътрешномолекулно Н-свързване и конформационна предпочетеност намериха подкрепа в резултатите от молекулно-механични изчисления. Конформационните карти на **36** и енантиомера на **40** са почти идентични и не подсказват различия в силата на стеричните взаимодействия на  $\alpha$ - или  $\beta$ -метилов заместител. Изчисленията показват, че и в двата (*S, S*)-рубина *M*-хиралната конформация е значително по-стабилна от *P*-хиралната.

Наличието на излишък от *M*- или *P*-хиралния конформер в билирубини може да се установи със спектроскопия на кръгов дихроизъм (CD). Когато ахиралният билирубин или негов аналог образува комплекс с хирален агент, *индуцираният CD* се проявява в характерни спектри, съставени от два много силни Котонови ефекта (KE) във видимата област, с почти еднаква интензивност и с противоположни знаци. Билирубините са дихромофорни системи. Локално възбудените им електронни състояния взаимодействат помежду си по екситонен механизъм. Взаимодействието и, съответно, абсорбционният и CD спектър зависи от разстоянието и пространственото разположение на електричните диполни моменти на прехода, поляризиран по дългата ос на дипириноните. Двата диполни момента в предпочетените билирубинови конформации се намират в хирално формиране, произлизащо от торзионните ъгли  $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ . От установяването му следва стереохимична информация, която е недостъпна от друг източник. Съгласно теорията на екситонния CD, базирана на неемпирични постановки, когато екситонно свързаните диполни моменти на преходите формират лява спирала, се реализира минус екситонна хиралност и се наблюдава отрицателен екситонен CD куплет (отрицателен дълговълнов KE и положителен късовълнов KE), а когато диполните моменти описват дясна спирала – съответната плюс екситонна хиралност е отговорна за положителен екситонен куплет.

Анализът на данните от *вътрешно-присъщ CD* от изучените от нас оптично активни мезобилирубини, съгласно екситонната теория, предоставя директно знака на диедричния ъгъл между компонентните диполни моменти на прехода и, следователно, преобладаващата молекулна хиралност, *M*- или *P*-. Внимателно е анализиран ефектът на разтворителя върху CD и връзката му с конформационната хомогенност на пигмента, която е в зависимост от степента на вътрешномолекулно водородно свързване. От редица разтворители, тук са избрани три с цел

сравнение със следващите съединения: 1. хлороформ, представител на неполярните разтворители, в които вътрешномолекулните Н-връзки са най-здрави; 2. метанол, хидрофилен и протонодонорен разтворител; и 3. диметилсулфоксид, много полярен разтворител, също способен да участва в Н-връзки, Фигура 7.



Фигура 7. Кръгово-дихроични спектри на  $(\alpha R, \alpha'R)$ -**40** (в ляво) и на  $(\beta S, \beta'S)$ -**36** (в дясно) в  $\text{CHCl}_3$  (спектри 1), в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (спектри 2) и в  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  (спектри 3)

В пълно съответствие с алостеричния модел **40** показва интензивни ( $\Delta\epsilon +344.4$  (435 nm),  $\Delta\epsilon -192.9$  (391 nm) в  $\text{CHCl}_3$ )<sup>4</sup> положителни екситонни куплети в неполярни разтворители, а **36** – отрицателни екситонни куплети ( $\Delta\epsilon -337.3$  (434 nm),  $\Delta\epsilon +186.4$  (389 nm) в  $\text{CHCl}_3$ ).<sup>3</sup> Знаците им доказват предпочитание към *M*-хиралния конформер в **36** и към *P*-хиралния в **40**, с което за пръв път бе установена абсолютната конфигурация на конформационен енантиомер от билирубинов тип. От тези спектри бе изведена корелацията между абсолютна конфигурация, предпочетена молекулна хиралност (екситонна хиралност) и знаци на кръгово-дихроичните ефекти в хирални мезобилирубини. Еднаквите, на практика, абсолютни стойности на  $\Delta\epsilon$  от **36** и **40** и много високата интензивност на техните КЕ са указание за еднакво, вероятно пълно, изместване на конформационното равновесие на Фигура 3.

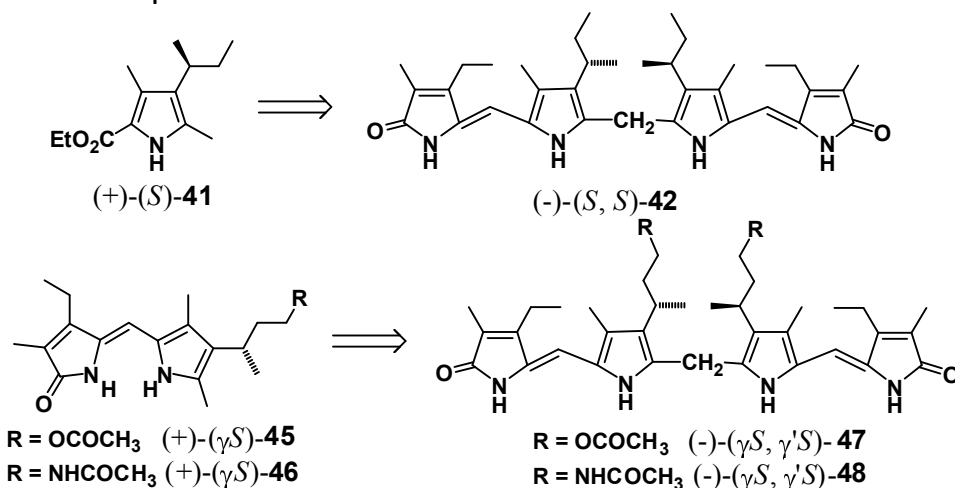
Важността на вътрешномолекулното Н-свързване при контрола на хиралността на билирубинови конформери е видна при сравнение на CD в различни разтворители. Интензивността на CD намалява в по-полярни разтворители като метанол и ацетонитрил, но и в тях се наблюдава значителна диастереоселекция. От нея следва заключението, че подобни полярни или хидроксилни разтворители не могат да нарушат напълно Н-връзките в **36** и **40**. В диметилсулфоксид (DMSO), за който е известно, че разрушава мрежата вътрешномолекулни Н-връзки в билирубин,

алостеричният ефект на  $\alpha,\alpha'$ - и  $\beta,\beta'$ -CH<sub>3</sub> се загубва. Тези групи нямат съществена роля в избора в DMSO на един или друг конформер и CD е много ниско интензивен поради конформационна хетерогенност.

Мезо диастереомерите на **36** и **40** с (*R*, *S*)-конфигурация са значително по-полярни и с различна разтворимост поради стеричните им затруднения да формират вътрешномолекулни водородни връзки в едната си половина.

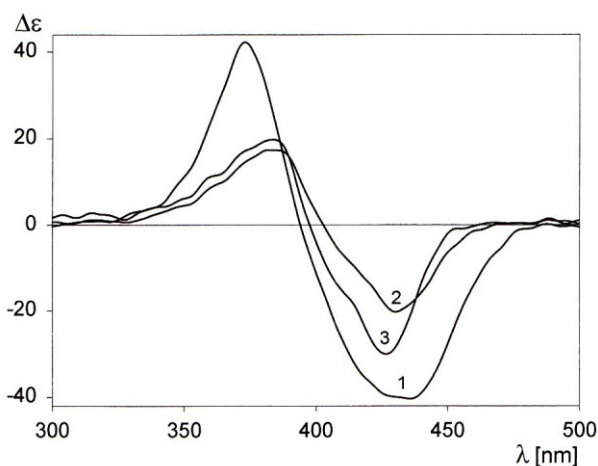
### РАЗГРАНИЧАВАНЕ НА СТЕРИЧНИЯ ФАКТОР ОТ КОНФОРМАЦИОННАТА СТАБИЛИЗАЦИЯ ЧРЕЗ ВОДОРОДНИ ВРЪЗКИ

Принудителното изместване на равновесието  $M \rightleftharpoons P$  в хирални мезобилирубини включва два главни фактора: 1) наличие на конформационно-направляващи заместители и 2) конформационна стабилизация чрез вътрешномолекулни водородни връзки. Разграничаване значимостта на всеки от тези фактори постигнахме при изследване на стереохимията на моделни мезобилирубини, които са неспособни да формират вътрешномолекулни Н-връзки или имат ограничена и деформирана насока за образуване на Н-връзки, спрямо природния пигмент. Допускаше се, че ако в такива аналози бъде открита значителна конформационна селекция и интензивни КЕ, би било вероятно важният конформационно-определящ фактор във всички билирубини да е минимизацията на несвързващите стерични взаимодействия, а Н-свързването да има второстепенна роля.



Синтезът на хиралния мезобилирубин без карбоксилни групи (**42**) започва от енантиомерно чист монопирол **41**, който е резултат от редуктивно отстраняване на COOH в **31**.<sup>6</sup> Получаването на рублините с обърнати естерни и амидни функции (**47** и **48**) се основава на разработени за целта трансформации върху С-8 страничната верига в дипиринона, синтезиран от **31** (**43** в Схема 1 на стр. 16).<sup>6,7</sup>

Данните от  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$  NОе за **42**, **47** и **48** са в съгласие със сгъната *M*-хирална конформация, но наблюдаваните ефекти са много слаби. Също слаб NОе между отдалечените С-2, С-18  $\text{CH}_3$  и С-10  $\text{CH}_2$  групи показва присъствие на димери от **42** в  $\text{CHCl}_3$ , които бяха доказани с осмометрично измерване на привидната молекулна маса в разтвор.<sup>8</sup> Конформационната карта на **42**, получена от ММ изчисления, се различава съществено от показаната във Фигура 2 и от тези за **36** и **40** по възможността за населеност на множество конформации, която следва от по-малките им енергийни разлики. Съгласно изчисленията, както мономерните, така и димерните структури на **42** с *M*-хиралност са малко по-стабилни. Главната геометрична особеност в индивидуална молекула **42** е усукването на дипириноните около връзките С-5/С-6 и С-14/С-15, породено от отсъствие на Н-свързване.



Фигура 8. Кръгово-дихроични спектри на **42** в  $\text{CHCl}_3$  (спектър 1), в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (спектър 2) и в  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$  (спектър 3)

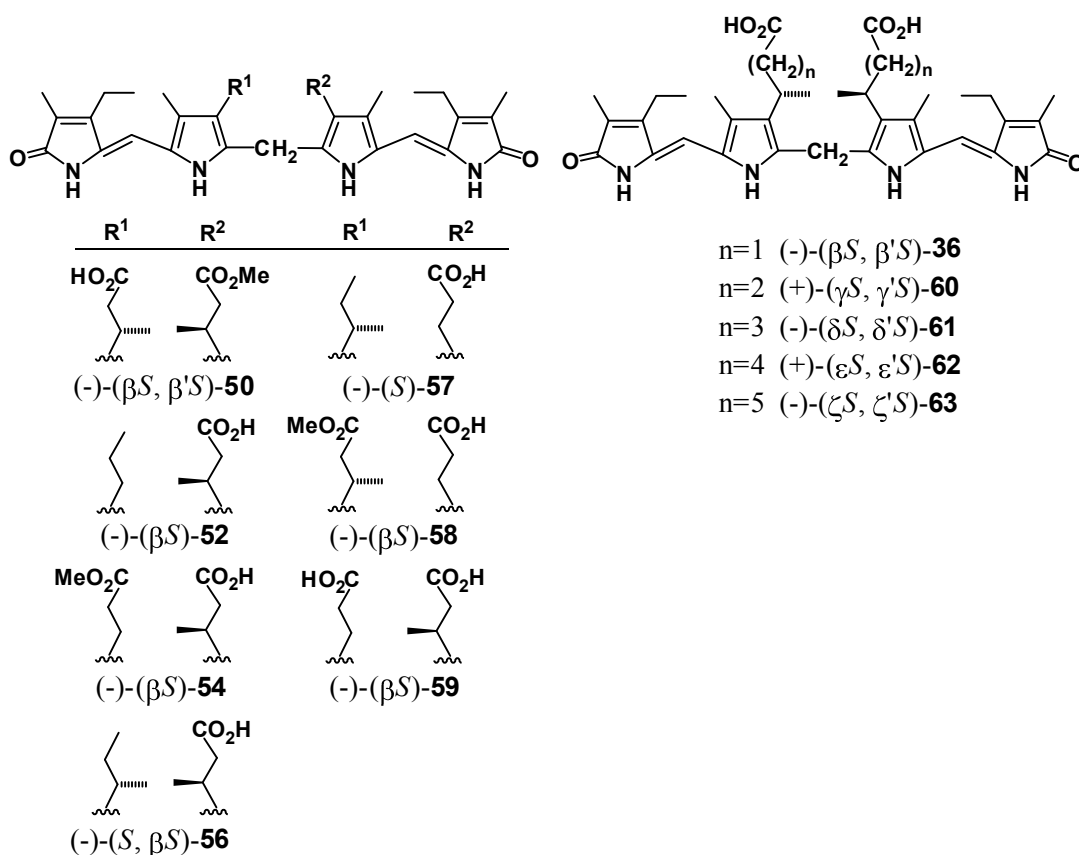
Кръговият дихроизъм от екситонен произход в **42**, **47** и **48** ги характеризира с предпочетеност към *M*-хиралната конформация при (*S*, *S*)-конфигурация, дори включвайки приноси от димери. Интензивността на КЕ от **42** е само 10-15% от наблюдаваната при **36** и **40** и спектрите му са по-малко зависими от природата на разтворителя, Фигура 8. Диестерът **47** показва подобие с **42**, но бис-амидът **48** прояви по-интензивен CD, вероятно поради възможност да стабилизира дадена конформация чрез ограничен брой Н-връзки от ацетамидната функция.

Множеството допустими в равновесие конформации в **42** и подобните **47** и **48** са по-същество без присъщата за билирубин конформационна стабилизация от вътрешномолекулни водородни връзки. Това множество води до ниска интензивност на кръговия дихроизъм поради анулиране приносите на енантиомерни конформации. Селекцията на един от *M*- или *P*-хиралните конформери в **36** и **40**, където

стабилизацията с Н-връзки е налице, е много по-голяма, отколкото в **42**, който разчита само на конформационно-насочващото действие на заместители при хиралните центрове. Следователно, приносът на вътрешномолекулното водородно свързване в билирубин и производните му, определен с чувствителния към конформационни ефекти CD метод, е съществен и анализът на спектралните им данни трябва да започва със структурите във Фигура 1.

### ОПТИЧНО АКТИВНИ МЕЗОБИЛИРУБИНИ С ЕДНА КАРБОКСИЛНА ГРУПА И С УДЪЛЖЕНИ КИСЕЛИННИ ВЕРИГИ

Важността на разположението на един или два хирални центъра в разнообразни С-8 и С-12 заместители, както и на способността на единствена карбоксилна група да поддържа силно предпочетена конформация, преценихме от изучаване стереохимията на оптично активни мезобилирубини съдържащи по една карбоксилна група.<sup>9, 10</sup>



Влиянието на дължината на киселинната верига върху конформацията и Н-свързването в енантиомерно чисти мезобилирубини бе демонстрирано с пигментите **60-63**.<sup>11</sup>

Синтетичният принос за получаване на несиметрични мезобилирубини е в провеждането на окислителна кондензация в смес от два различни дипиринона. Концепцията е илюстрирана в Схема 1 за

моноестера на **36**, който е труднодостъпен по друг метод.<sup>9, 10</sup> Синтезираните в смес и статистично съотношение мезобиливердини **34**, **35** и **49** могат да се разделят препаративно поради твърде различната им полярност - резултат от използваните различно полярни дипиринони.

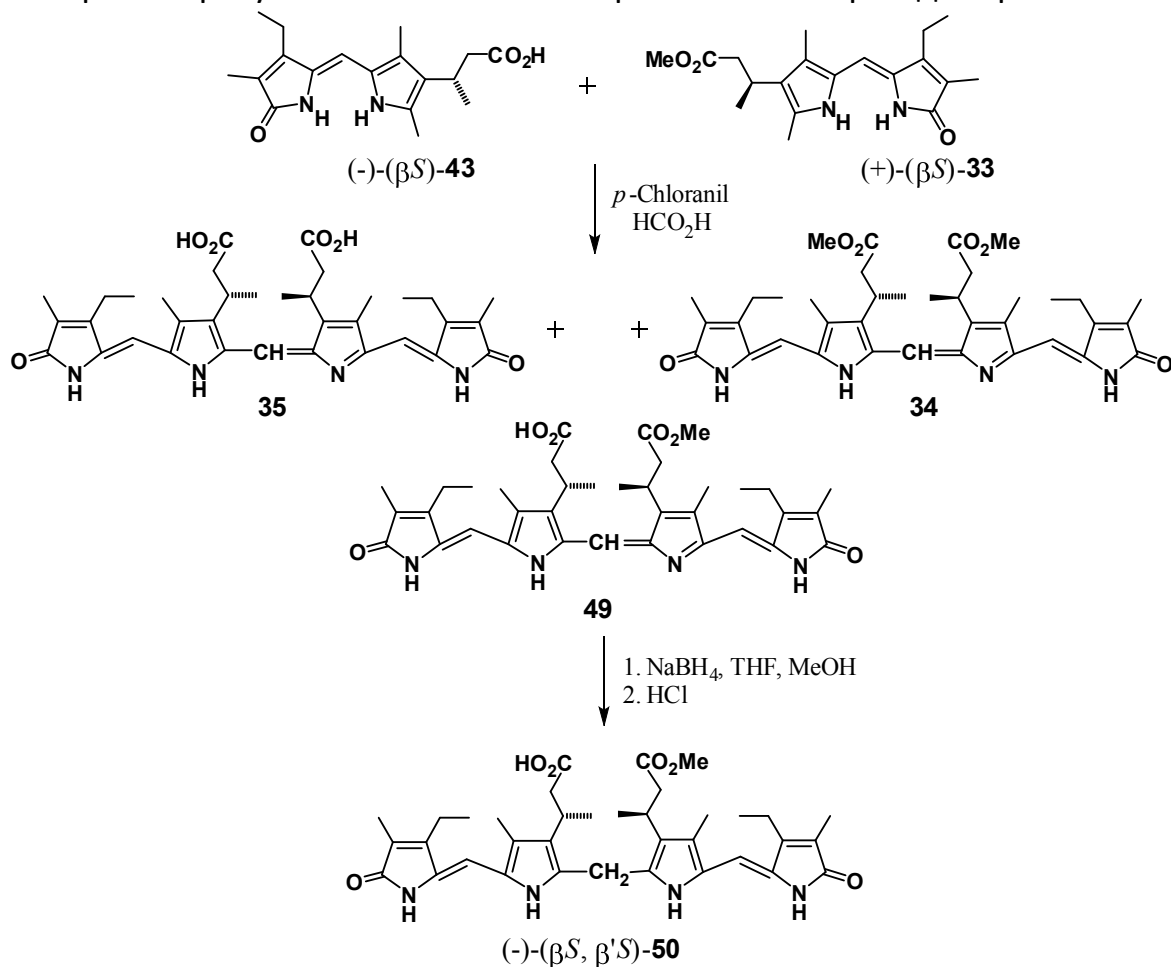


Схема 1

Синтезът на хомолозите на **36** (**60-63**) се постига по стандартен начин от съответните им дипиринони. Всички те произлизат от пиrolа **31**, чиято верига от пропионова киселина бе системно удължена използвайки цианид за едно-въглероден синтон и диалил малонат за дву-въглероден синтон.<sup>7</sup>

Анализът на ЯМР данни, включително на малки разлики в <sup>13</sup>C спектрите, потвърди присъствието на подобен на **36** мотив на вътрешно-молекулно Н-свързване и подобни сгънати конформации в несиметричните **50**, **52**, **54**, **56-59**. Пространствената близост на възлови групи в моноестера **50** и аналозите с една карбоксилна група бе потвърдена от пОе експерименти, които, съгласувано с големината на *J*-константите, показват предпочетеност към *M*-хирална конформация.

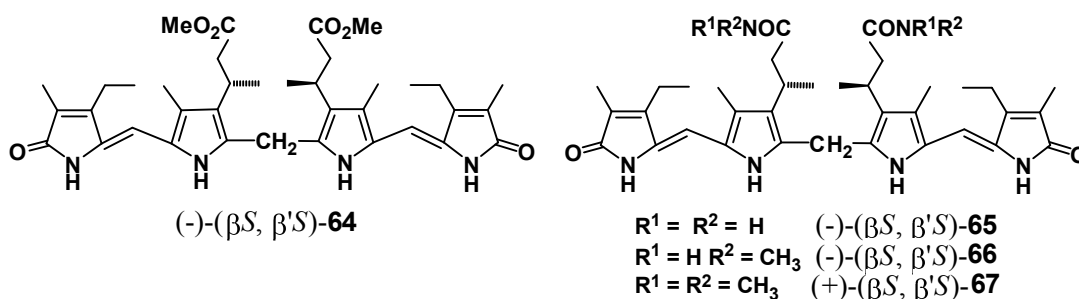


При сравнение на CD спектрите от рубините с по една карбоксилна група се разкрива най-убедително същността на алостеричното действие на заместителите при хирален център. Например, монокиселината **50** изявява по-ниско интензивни КЕ отколкото дикиселината **36** поради намалената способност на естерната верига да поддържа предпочетена конформация. Още по-слаби са КЕ от **52**, където въглеродородната верига няма конформационно-стабилизираща роля, а най-ниска селекция се наблюдава при диметилския естер на **36**. От подобни сравнения следва заключението, че дори една единствена карбоксилна група е в състояние да упражни значителна конформационна стабилизация. За успешното стерично въздействие на единствен хирален център, той трябва да е подкрепен от конформационна стабилизация, получена от същата верига където се намира. Само един хирален център измества силно конформационното равновесие когато е придружен от пълен комплект вътрешномолекулни водородни връзки, но когато е в естерна или алкилова верига – действието му е нищожно, дори ако втората верига е свързана с Н-връзки.

По-дългите остатъци от алканови киселини в **60-63** повлияват върху конформацията поради стремежа си към вътрешномолекулни Н-връзки. Вследствие на тях се променя ориентацията на екситонно взаимодействащите диполни моменти на прехода. Разликите в CD спектрите на тези хомолози са драстични, като в **62** се наблюдава много ниска конформационна селекция, а в бис- $\gamma$ -метилбутановата киселина **60** – необичайна положителна екситонна хиралност.

### ДИМЕТИЛОВ ЕСТЕР И АМИДИ НА ( $\beta S$ , $\beta'S$ )-ДИМЕТИЛМЕЗОБИЛИРУБИН

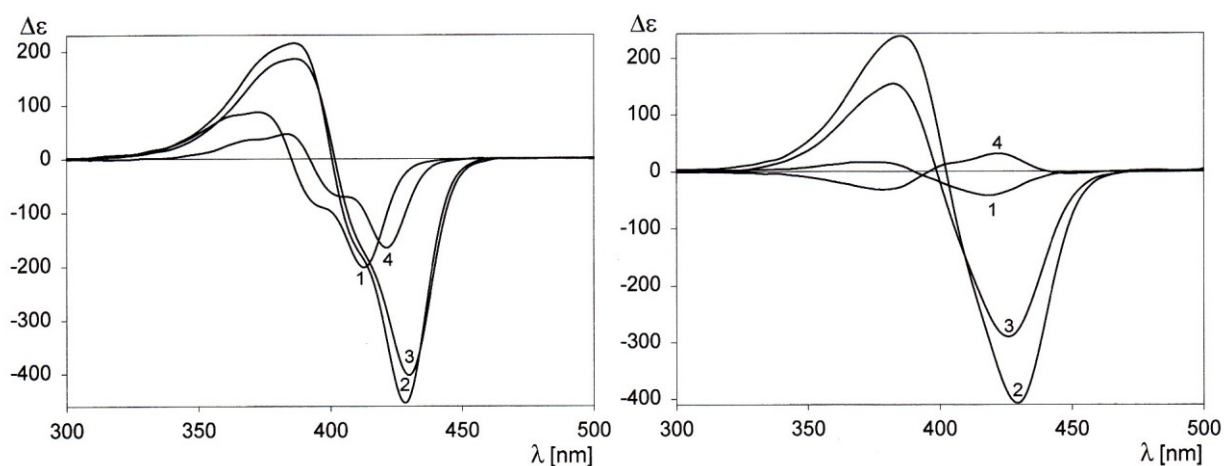
Влиянието на модификации на карбоксилните групи в **36** върху равновесието  $M \rightleftharpoons P$  установихме с моделните диметил естер на ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**64**) и неговите първичен (**65**), вторичен (**66**) и третичен (**67**) бис-амиди.<sup>12, 13</sup>



Синтезът на **64** се осъществява чрез редукция на предшественик на **36** – диметилския естер на ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-диметилмезобиливердин XIII $\alpha$ , а на амидите – чрез формиране на амидна връзка в ( $\beta S$ )-метилксанто-

билирубинова киселина (**43**), получена от **31**, следвано от окислителна кондензация на дипириноните и редукция.

Проведеният конформационен анализ на тези производни, включващ ММ изчисления и резултати от ЯМР спектроскопия, ясно показва предпочетеност към *M*-хиралния конформер. Неговата стабилизация е по-голяма в бис-амидите **65** и **66**, способни да формират пълен комплект вътрешномолекулни водородни връзки (както в базовия за сравнение рубин **36**), в сравнение с диестера **64** и бис-амида **67**. Участието на *син*-CONHR (R = H, CH<sub>3</sub>) амиден протон в такива връзки се изявява в голямото му деекраниране в <sup>1</sup>H ЯМР спектри в неполярни разтворители по отношение на съответния дипиринон или биливердин. Известно е, че диестери на билирубина образуват димери. Експериментални резултати<sup>8</sup> дават основание да се изключат от разглеждане такива димерни структури при диестера **64** и третичния бис-амид **67**.



Фигура 9. Кръгово-дихроични спектри на диметилския естер **64** (спектри 1), първичния бис-амид **65** (спектри 2), вторичния бис-амид **66** (спектри 3) и третичния бис-амид **67** (спектри 4) в бензен (в ляво) и в метанол (в дясно)

Кръгово-дихроичните спектри на **64-67** са убедително доказателство за силно преобладаващ *M*-хирален конформер в неполярни разтворители, Фигура 9. Нарастване полярността на разтворителя и способността му да се намесва в Н-връзките влияе най-силно върху **64** и **67**, където са възможни по-малко на брой конформационно-стабилизиращи водородни връзки. Когато билирубин-амидите съдържат *N-H*, тази група допринася към конформационната стабилизация по същия начин както и *O-H* в дикиселината **36**. Като следствие, тези амиди са с еднаква пространствена форма както дикиселината. От сравнения на CD интензивностите е явно, че амидните фрагменти със *син*-*N-H* към карбонилната група могат да формират по-стабилни водородни връзки със срещуположния лактамен

пръстен отколкото киселинните фрагменти. От максимално измерените до тогавашния момент  $\Delta\epsilon$  стойности от хирални мезобилирубини се приема, че диастереоселекцията *M*- спрямо *P*- в **65** и **66** е пълна, но диестерът и третичният бис-амид са конформационно хетерогенни.

### ПРЕЦЕНКА НА КОНФОРМАЦИОННОТО РАВНОВЕСИЕ СТЕРЕОКОНТРОЛ НА БИЛИРУБИНОВАТА КОНФОРМАЦИЯ ОТ ЧЕТИРИ МЕТИЛОВИ ГРУПИ

Отговор на въпросите каква е максималната присъща оптична активност на една хомохирална билирубинова конформация и до каква степен е изместено равновесието  $M \rightleftharpoons P$  в съединенията ( $\alpha R, \alpha'R$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**40**) и ( $\beta S, \beta'S$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**36**) дадохме с изследването на мезобилирубини, в които са въведени четири конформационно-направляващи метилови групи.<sup>14, 16</sup> За синтеза им беше създаден метод за генериране и оптимизирани условията за метилиране на литиев енолат от метиловия естер на **31**, Схема 2.<sup>14</sup> Показахме също, че енолатните дианиони от N-незащитени пироли реагират чисто с разнообразни електрофили.<sup>15</sup>

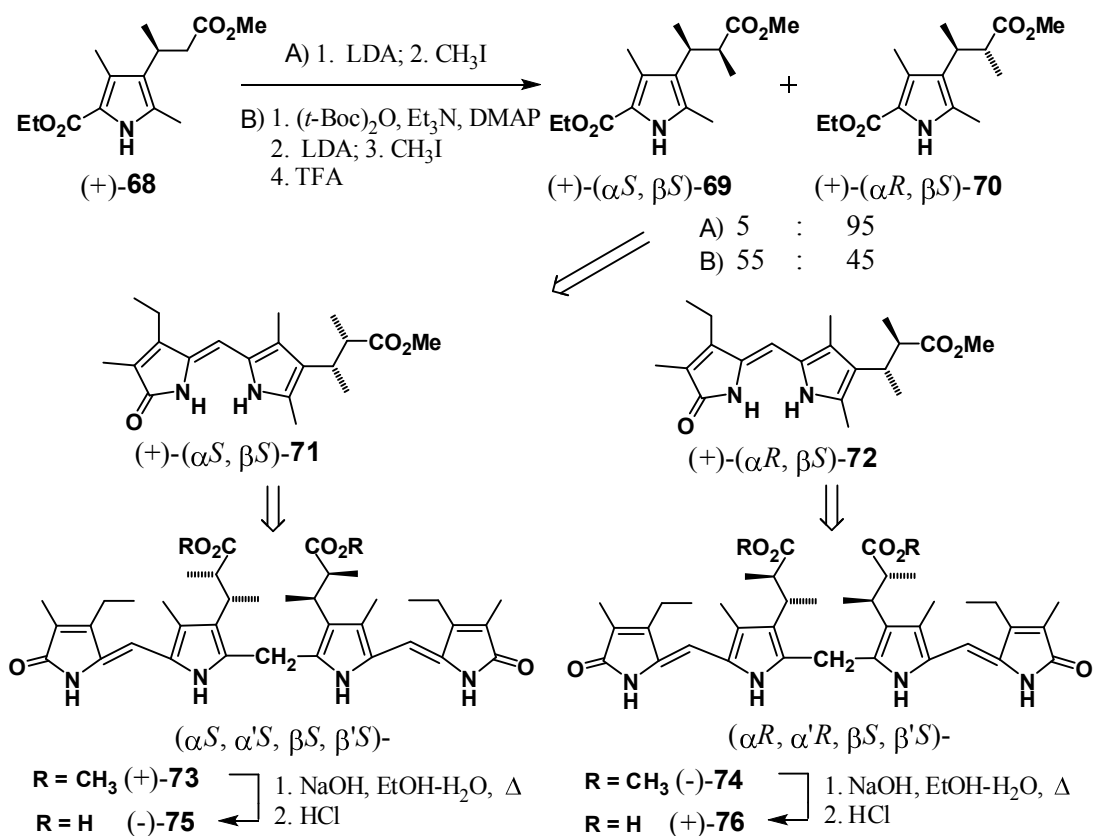
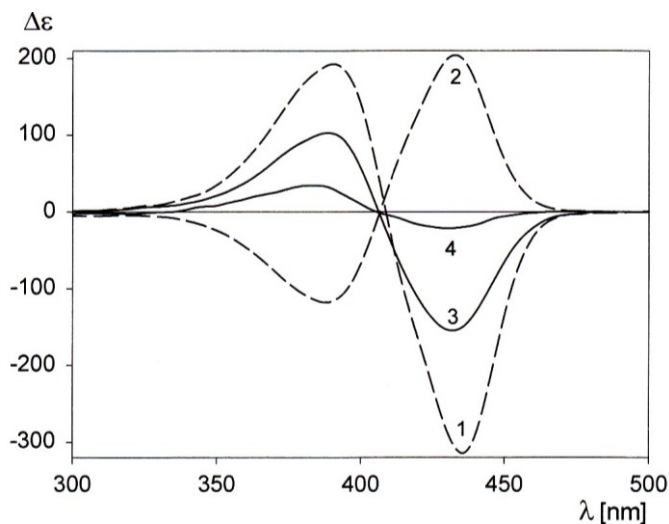


Схема 2

*Еритро*-конфигурацията на главния продукт **70** бе доказана с рентгеноструктурен анализ, от която следва ( $\alpha R, \beta S$ )-абсолютна

конфигурация на (+)-**70** и ( $\alpha S$ ,  $\beta S$ )- на (+)-**69**.<sup>14</sup> След обикновеното превръщане на монопириролите **69** и **70** в дипиринони, те бяха окислително кондензирани до съответните мезобиливердини. Поради пространствено запречване от  $\alpha$ -CH<sub>3</sub> и неустойчивост на вердиновия скелет в необходимите условия, хидролизата на естерите бе осъществена след редукцията до мезобилирубени. Тази смяна на последователността от реакции има значение при по-нататъшните синтети на мезобилирубени с обемист  $\alpha$ -заместител.

Данните от ЯМР експерименти върху **75** и **76** доказват вътрешно-молекулно Н-свързани структури, сгънати в керемидо-подобна форма. В тях алостеричните ефекти на метиловите заместители предизвикват изместване на конформационното равновесие към *M*-хиралност, когато абсолютната конфигурация и на  $\alpha$ - и на  $\beta$ -центровете е (*S*). Действайки в унисон ( $\alpha S$ ,  $\alpha' S$ )- и ( $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-метиловите лостове усилват взаимно влиянието си в избора на *M*-хиралността, която бе доказана с редица силни  $nOe$  в **75**. Поведението на диастереомера с противоположна конфигурация на  $\alpha$ - и  $\beta$ -центровете не може да бъде предсказано, а ЯМР спектрите не предоставиха убедителна информация за конформацията на **76**. От предпоставките на модела следва само, че ( $\alpha R$ ,  $\alpha' R$ )-CH<sub>3</sub> ще опитват да ориентират молекулата **76** към *P*-хирална конформация, но ( $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-CH<sub>3</sub> ще действат в противоположна насока и ще насочват молекулата към *M*-хиралност.



Фигура 10. Кръгов дихроизъм на ( $\alpha S$ ,  $\alpha' S$ ,  $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-**75** в CHCl<sub>3</sub> (спектр 1) и в CH<sub>3</sub>OH (спектр 3) и на ( $\alpha R$ ,  $\alpha' R$ ,  $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-**76** в CHCl<sub>3</sub> (спектр 2) и в CH<sub>3</sub>OH (спектр 4)

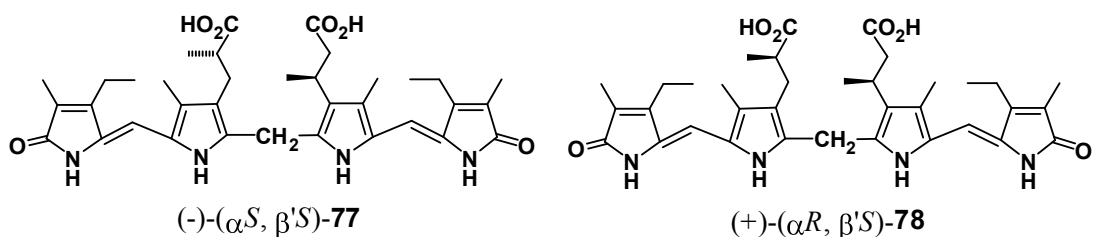
Данните от CD на **73-76** предоставиха решителните доказателства за стереохимията на тези мезобилирубени и в частност – за непредвидимата конформация на **74** и **76**, Фигура 10. Сравнението в тази Фигура ясно демонстрира предимството при проява на екситонно взаимодействие, от

чийто CD куплети се извежда директно информация за торзионния ъгъл между електричните диполни моменти на прехода и, съответно – за конформационната хиралност. Мезобилирубинът ( $\alpha S$ ,  $\alpha' S$ ,  $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-**75** показва във всички изследвани разтворители, с изключение на DMSO, отрицателна екситонна хиралност поради силно преобладаващ *M*-хирален конформер. Интензивността на КЕ в този случай беше от по-голям интерес. Амплитудата на екситонния куплет от **75** в неполярни разтворители се оказа по-малка от тази на **36** и **40**. Следователно, усилване лостовото действие на ( $\alpha S$ ,  $\alpha' S$ )-CH<sub>3</sub> от страна на ( $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-CH<sub>3</sub> не се реализира в **75** и, вероятно, две метилови групи са достатъчни за пълно изместване на конформационното равновесие в мезобилирубени. Наличието на още две вицинални метилови групи дори има отрицателен ефект поради стеричното претрупване.

Диастереомерът ( $\alpha R$ ,  $\alpha' R$ ,  $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-**76** показва положителни CD куплети в неполярни разтворители в съответствие с изместено равновесие към *P*-хирална конформация. При балансираното влияние на един  $\alpha$ -заместител, действащ в стерично противоречие с  $\beta$ -заместител с еднакъв стеричен размер,  $\alpha$ -заместителят взема преимущество и доминира  $\beta$ - при насочване към предпочетената конформация в мезобилирубени. Това надмощие не е така ефективно в по-полярни разтворители, където интензивностите на КЕ от **76** са по-ниски от тези от **75** поради частичното вътрешномолекулно Н-свързване.

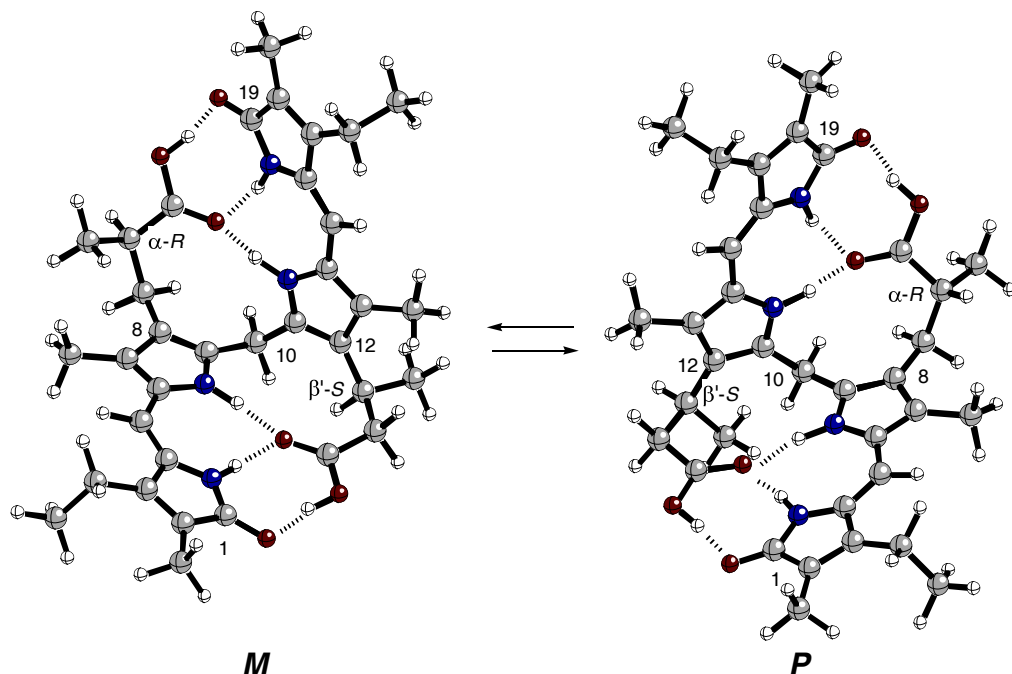
### СТЕРЕОГЕНЕЗИС НА КОНКУРЕНЦИЯТА ЗА ПРОСТРАНСТВО ПРИ КОНФОРМАЦИОННА СЕЛЕКЦИЯ В МЕЗОБИЛИРУБИНИ

Установеното отсъствие на адитивност на стеричните приноси от четири конформационно-направляващи групи и предполагаемото по-силно стерично отблъскване  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -CH<sub>3</sub> / C-7, C-13 CH<sub>3</sub> отколкото  $\beta$ ,  $\beta'$ -CH<sub>3</sub> / C-10 CH<sub>2</sub> изискват допълнителни доказателства. Такива получихме от стереохимично по-елегантните ( $\alpha S$ ,  $\beta' S$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**77**), в който метиловите групи на всеки един остатък от пропионова киселина са в синхрон при конформационната селекция, и от ( $\alpha R$ ,  $\beta' S$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**78**), в който метиловите групи действат в опозиция.<sup>17</sup> Синтезът на тези рубини беше проведен чрез кондензация на рацемичен метил  $\alpha$ -метилксантобилирубинат с оптично чиста ( $\beta S$ )-метилксантобилирубинова киселина (**43**),<sup>3, 7</sup> с доказана абсолютна конфигурация, по аналогия със Схема 1.



Свойствата на дикиселините **77** и **78** са атипично различни за диастереомери, чиято единствена разлика е конфигурацията на един хирален център и тяхното изследване е посветено на разкриване генезиса на разликите между тях. Доказателство за абсолютната конфигурация на значително по-полярния изомер **78** бе получено след реакция на "размесване" на дипириноните му и впоследствие конфигурацията бе потвърдена от рентгеноструктурния анализ на  $(\alpha R)$ -**38**. Съединението **78** е псевдо-мезо региоизомер на **36** или **40**, чиито ахирални, полярни мезо-диастереомери бяха вече изучени.

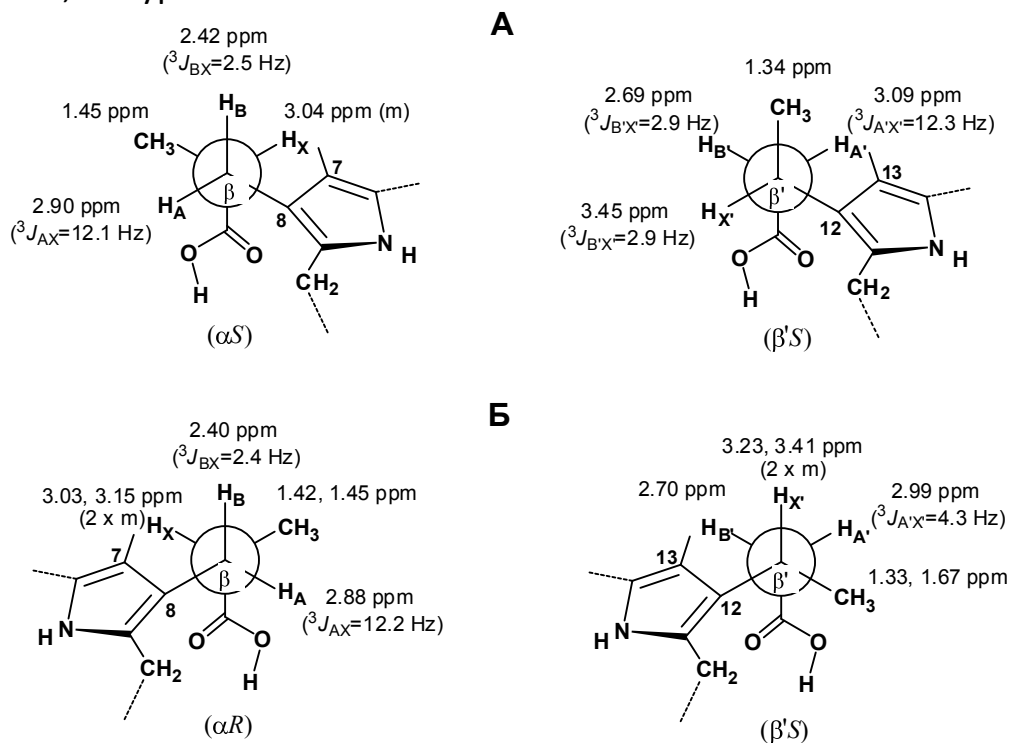
Конформационният анализ на **77** и **78** следва по идентичен път вече извършените за **36** и **40**. Резултатите от ММ изчисления подкрепят напълно ЯМР данните в описанието на **77** като сгънат в *M*-хиралност пигмент, но не предсказват точно конформационната предпочетеност в **78**, където се допускат почти еднакви несвързващи стерични взаимодействия и в двете стабилни конформации, Фигура 11.



Фигура 11. Стабилните конформации на  $(\alpha R, \beta' S)\text{-78}$  с незначително по-ниска енергия (ММ) на *M*-хиралната форма

В *M*-спиралната конформация на **77** при  $(\alpha S, \beta' S)$ -конфигурация стеричното пречене между  $\alpha\text{-CH}_3$  / C-7  $\text{CH}_3$  и  $\beta'\text{-CH}_3$  / C-10  $\text{CH}_2$  се избягва,

като заместителите и на двата хирални центъра не пречат при формиране на пълен комплект вътрешномолекулни водородни връзки. Това намира отражение в свойствата и ЯМР спектрите на **77**, наподобяващи сума от спектри на 1:1 смес от **36** и **40**, с подобни за тях характерни  $\rho_{\text{Oe}}$  и  $J$  константи, Фигура 12.

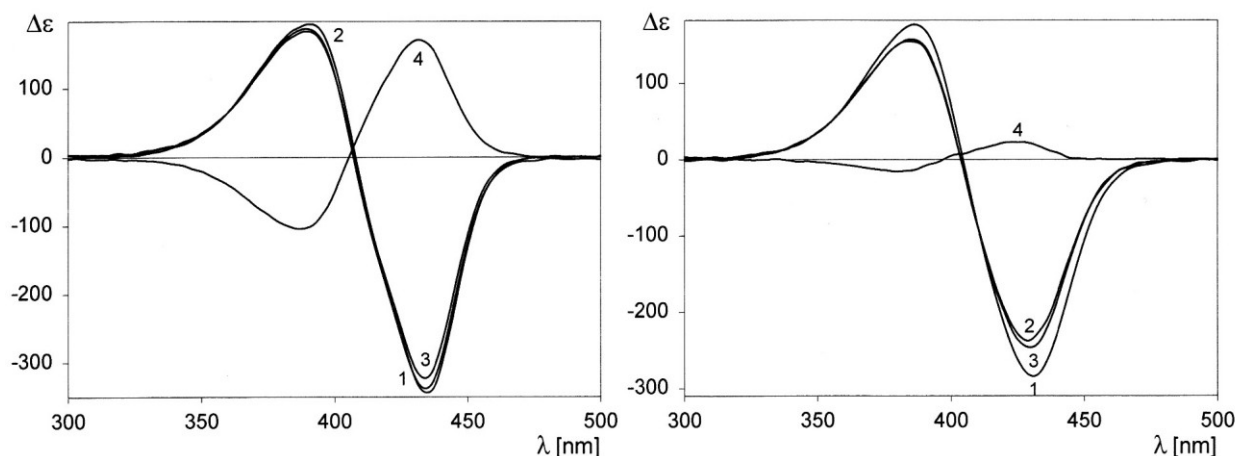


Фигура 12. Конформациите в пропионовите сегменти, изведени от  $^3J$  константи и  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$   $\rho_{\text{Oe}}$  в  $\text{CDCl}_3$  (298 K) на: **А** – ( $\alpha\text{S}$ ,  $\beta'\text{S}$ )-**77**; **Б** – ( $\alpha\text{R}$ ,  $\beta'\text{S}$ )-**78**

Пропионовите киселинни вериги на С-8 и в двата рублина са здраво задържани в енантиомерни фиксирани конформации (неразличими от ЯМР), както е и С-12 веригата в **77**, но тази верига в **78** има различна конформация.

В ЯМР спектрите на **78** се наблюдават за пръв път два комплекта удвоени сигнали (както в смес мезо-изомери) от два бавно превръщащи се конформера. Отнесените към *P*-хиралност сигнали са по-интензивни от тези за *M*-хиралност в съотношение 78:22. В *P*-хиралния конформер на **78** пропионовата киселинна верига с ( $\alpha\text{R}$ )- $\text{CH}_3$  се свързва комфортно със срещуположния дипиринон, но веригата с ( $\beta'\text{S}$ )- $\text{CH}_3$  изпитва стерични затруднения да формира типичната триада Н-връзки поради отблъскване  $\beta'\text{-CH}_3$  / С-10  $\text{CH}_2$ . То отсъства в *M*-хиралния конформер, но в него възниква отблъскване между  $\alpha\text{-CH}_3$  / С-7  $\text{CH}_3$ . Последното е по-силно, което се потвърждава от измерените  $\rho_{\text{Oe}}$  в **78**. Следователно, веригата с

( $\beta'S$ )- $\text{CH}_3$  е загубила конформационно-направляващото си значение и цялостната молекулна форма се определя от ( $\alpha R$ )- $\text{CH}_3$ .



Фигура 13. Кръгов дихроизъм от разтвори в  $\text{CHCl}_3$  (в ляво) и в  $\text{CH}_3\text{OH}$  (в дясно) на ( $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-**36** (спектри 1), ( $\alpha S$ ,  $\alpha'S$ )-енантиомера на **40** (спектри 2), ( $\alpha S$ ,  $\beta'S$ )-**77** (спектри 3) и ( $\alpha R$ ,  $\beta'S$ )-**78** (спектри 4)

Кръговият дихроизъм на **77** и **78** предостави окончателните доказателства за конформационната им предпочетеност. Съгласно изведената вече корелация и ( $\alpha S$ ,  $\beta'S$ )-конфигурацията, **77** съществува в *M*-хирална конформация, докато ( $\alpha R$ ,  $\beta'S$ )-**78** приема преимуществено *P*-хирална конформация, Фигури 11 и 13. Влиянието на полярността на разтворителя е по-малко при **77**, отколкото при **78**, показвайки по-трудното нарушаване системата от шест Н-връзки. По-полярни и протонодонорни разтворители намаляват значително КЕ от **78** благодарение компенсират принос на *M*-хиралната му конформация.

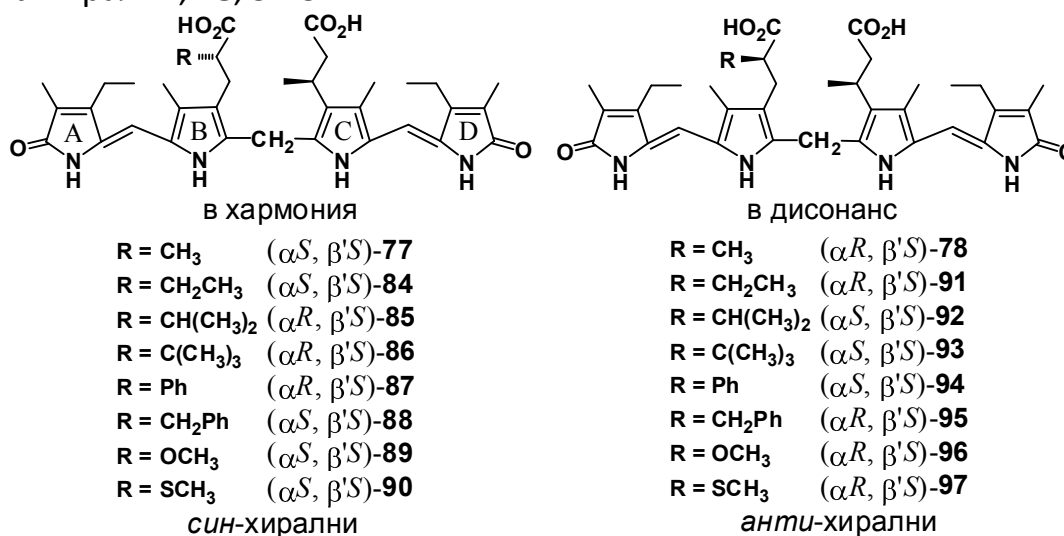
Важността на моделното съединение **78** наложи получаването му по независим начин от оптично чиста ( $\alpha R$ )-метилксантобилирубинова киселина<sup>4</sup> и рацемичен метил  $\beta$ -метилксантобилирубинат<sup>3</sup>, които дадоха неразличим по свойства образец<sup>4</sup> от описания по-рано.<sup>17</sup>

Това изследване не само потвърди факта, наблюдаван при ( $\alpha R$ ,  $\alpha'R$ ,  $\beta S$ ,  $\beta'S$ )-**76**, но с него се уверихме, че  $\alpha\text{-CH}_3$  е по-мощен конформационно-определящ фактор отколкото  $\beta\text{-CH}_3$  в мезобилирубини. Произходът на това преимущество е в по-голямото стерично изискване за свободно пространство на  $\alpha\text{-CH}_3$ , който заместител предпочита да е отдалечен от метилови групи, отколкото стеричното изискване на един  $\beta\text{-CH}_3$  заместител, който предпочита да е отдалечен от С-10 метиленовата група, но е в състояние да се приюти и в близост до нея когато е принуден. В последната ситуация, типичната матрица от вътрешномолекулни водородни връзки е разхлабена, което е причина за променените свойства спрямо мезобилирубина.<sup>17</sup>



## ОТНОСИТЕЛЕН СТЕРИЧЕН РАЗМЕР НА ЗАМЕСТИТЕЛИ УСТАНОВЕН СЪС СПЕКТРОСКОПИЯ НА КРЪГОВ ДИХРОИЗЪМ

Относителният стеричен размер на една  $\alpha$ -група установихме от интензивността на екситонния CD на мезобилирубини с разнообразни  $\alpha$ -заместители и  $\beta'$ -CH<sub>3</sub>, действащи в конкуренция при задоволяване на стеричните си изисквания.<sup>4, 17-19</sup> Конструираните моделни системи или заместителите в тях се групират като *син*-хирални или *анти*-хирални, съобразно вътрешномолекулните им стерични взаимоотношения, независимо от CIP номенклатурното обозначение. Когато конформационно-направляващата насока е еднаква за двата заместителя, както е в **77**, **84-90**, те се означават като *син*-хирални, а когато е противоположна – като *анти*-хирални, **78**, **91-97**.



Синтезите на целевите рублини разчитат на дипиринона ( $\beta S$ )-**43**<sup>7</sup> или на неговия метилов естер (**33**),<sup>3</sup> като пръстени C и D в хибридна кондензация до мезобиливердини, подобна на Схема 1. Всъщност **33** или **43** служат като ковалентно свързани разделящи агенти, които не само осигуряват 100% ее в продуктите, но и доказват абсолютната конфигурация на крайния мезобилирубин. Лявата половина в структурите **84-97** съдържа пръстен A от известен синтон, а за получаване на пръстен B разработихме нови синтетични методи. С цел въвеждане на някои от  $\alpha$ -заместителите (R = CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Ph) бе алкилиран енолатът от подходящ N-незащитен пирол,<sup>15, 18</sup> Схема 3. За въвеждане на *tert*-бутилов и фенилов заместител показахме синтетичната стойност на реактивоспособния хлорометилпирол **99** при алкилиране с него на естерни енолати,<sup>18</sup> Схема 3. Синтезът на необходимите  $\alpha$ -метокси и  $\alpha$ -метилтио пиролпропионати наложи двустадийен подход: 1) хлориране на естерен енолат в монопирол<sup>15</sup>; и 2) нуклеофилно заместване на хлора с метоксиден или метилтиолатен йон,<sup>20</sup> Схема 3.

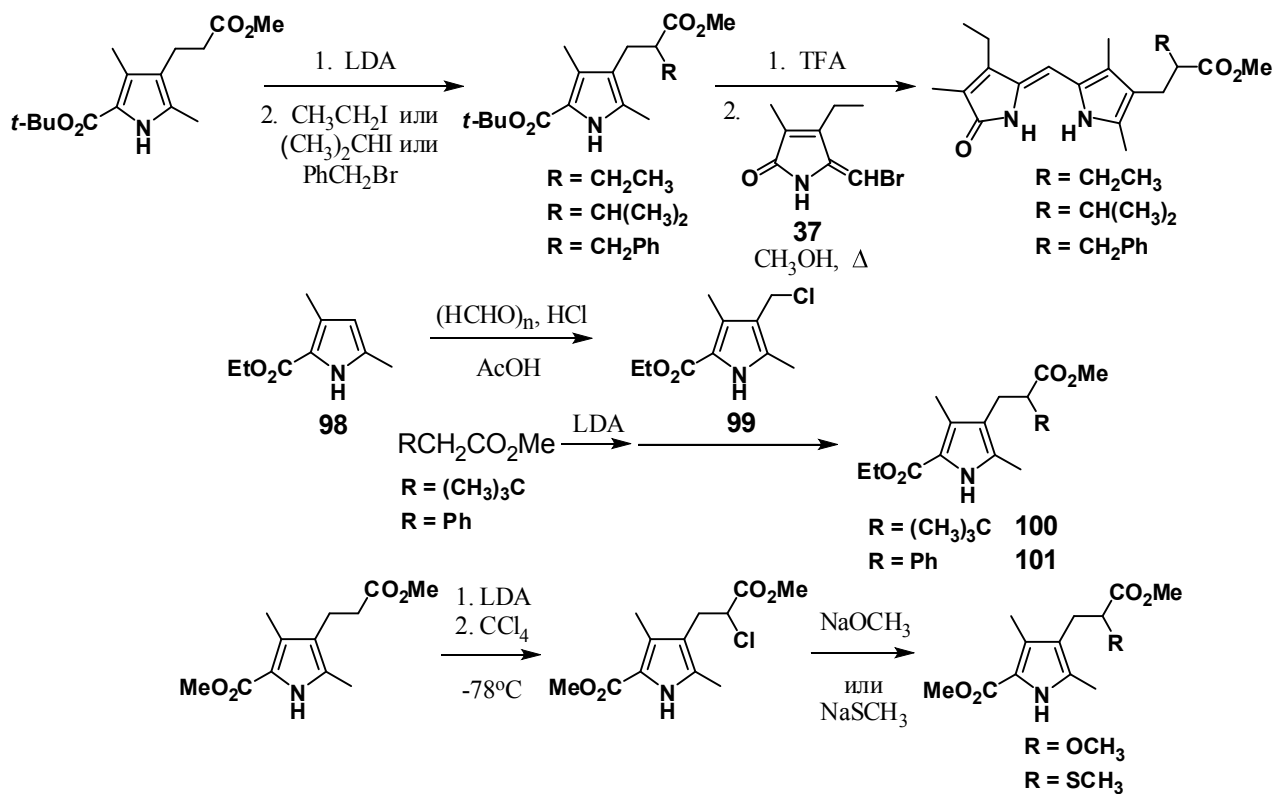
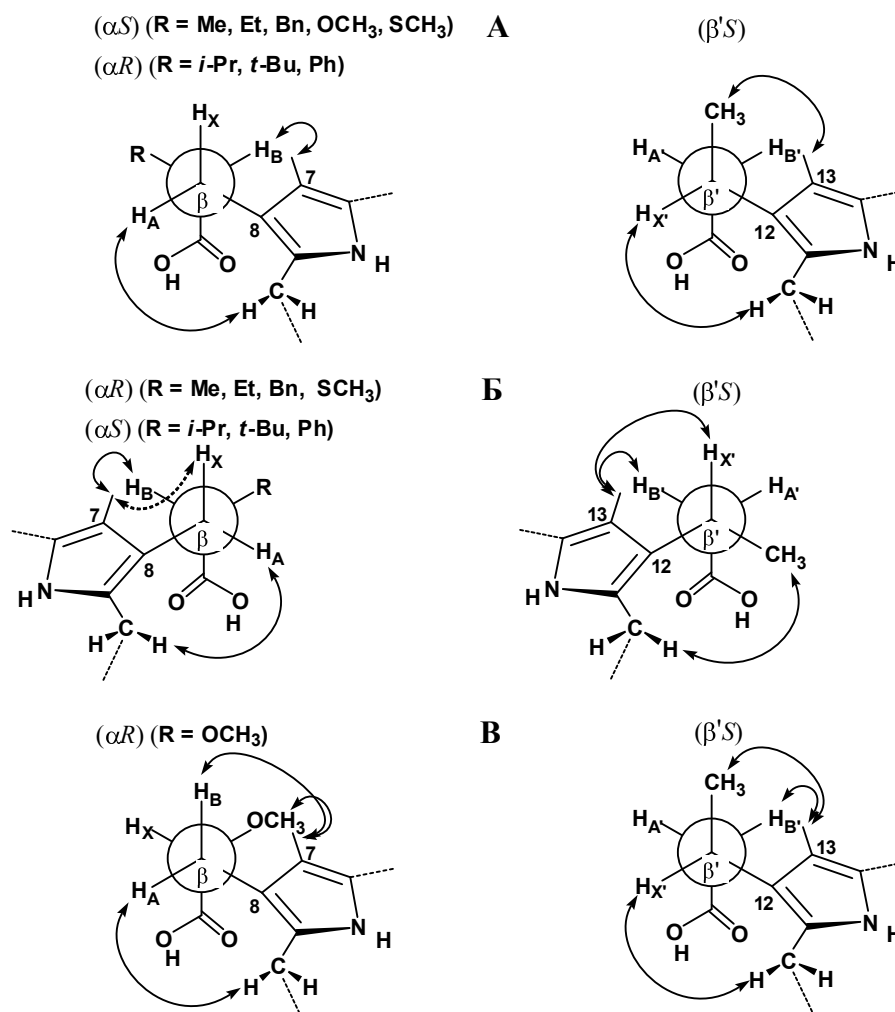


Схема 3

Предвиждайки трудността при хидролиза на стерично запречените естери в последните етапи, синтезите на мезобиливердини бяха разклонени в два потока. В първия бе използвана киселината ( $\beta\text{S}$ )-**43**<sup>7</sup> и  $\alpha$ -заместен естер на дипиринон, който се хидролизира в меки условия. По този поток бяха изолирани **84**, **88-91** и **95-97**. Вторият поток включва стерично запречените естери, които бяха превърнати в киселини в по-драстични условия на стадий стабилните дипиринони. За отстраняване на естера в екстремния,  $\alpha$ -*tert*-бутил съдържащ дипиринон бе приложено нуклеофилно заместване на карбоксилатен йон. Така получените дипиринон карбоксилни киселини бяха хибридно кондензирани с естера ( $\beta\text{S}$ )-**33**,<sup>3</sup> като по този поток бяха синтезирани **85-87** и **92-94**.

Конституцията и стереохимията на всеки от рубините **84-97** бе доказана с комбинирана информация от 1D и 2D ЯМР експерименти. Стойностите на  $^3J$  константите и измерените 1D  $^1\text{H}\{^1\text{H}\}$   $n\text{Oe}$  подкрепят възгледа, че  $\alpha$ - и  $\beta'$ -заместителите са в стерична хармония във всички *син*-хирални **77**, **84-90**, където и двата заместителя изискват предпочитание към *M*-хиралната конформация на пигмента. В тази форма се фиксира локална геометрия на C-8 и C-12 фрагментите, показана във Фигура 14А. В *анти*-хиралните **78**, **91-97**  $\alpha$ -заместителят действа в опозиция на ( $\beta'S$ )- $\text{CH}_3$ , като всеки от тях се стреми да наложи удобната за него спирална конформация, но както в *M*-, така и в *P*- присъства стерично напрежение.

Анализът на данните от ЯМР показва, че с изключение на  $\alpha$ -метокси заместения **96**,  $\alpha$ -групата взема надмощие над по-малко стерично изискващата  $\beta'$ -метилова група. Именно  $\alpha$ -заместителят във веригата на С-8 доминира избора в конформационното равновесие и го измества до различна степен към *P*-спиралност. В тази форма, веригата С-8 се поддържа в огледален образ (от CD) на *син*-хиралните рубини, но остатъкът на С-12 от пропионова киселина в **78**, **91-95** и **97** приема различна локална конформация, с три *син*-клинално разположени водородни атома, Фигура 14Б.

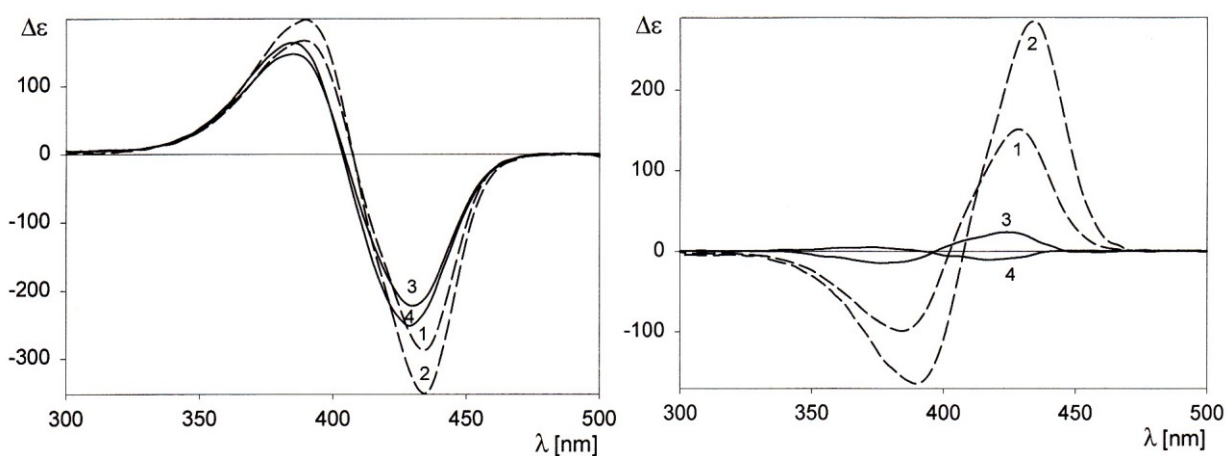


Фигура 14. Сегментите от пропионова киселина в (А): *син*-хиралните **77**, **84-90** в *M*-спирална конформация; (Б): *анти*-хиралните **78**, **91-95** и **97** в *P*-спирална конформация; (В): *анти*-хиралния **96** в *M*-спирална конформация в CDCl<sub>3</sub>. Избрани <sup>1</sup>H{<sup>1</sup>H} nOe са означени със стрелки

Подобно разположение бе изведено за С-8 веригата в  $\alpha$ -метокси заместения **96**, но неговата С-12 верига прилича на установените в *син*-хиралните рубини, съгласувайки се с *M*-спирална молекула, Фигура 14В.

Ниско интензивен комплект сигнали в  $^1\text{H}$  ЯМР спектрите индикира присъствие на *M*-хирален конформер в **78** (22%), **91** (9%), **94** (8%) и **95** (6%).

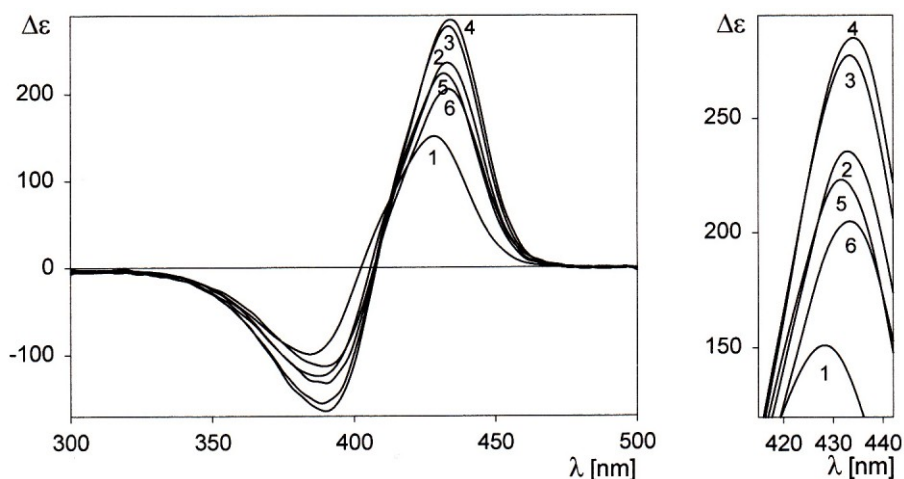
При запазване на вътрешномолекулното водородно свързване в неполярни разтворители, всички *син*-хирални рубини показват интензивен отрицателен екситонен куплет. Амплитудата му  $A$  (дефинира се като  $A = \Delta\epsilon^{\max}(\lambda_1) - \Delta\epsilon^{\max}(\lambda_2)$ , където  $\lambda_1 > \lambda_2$ ) нараства с увеличаване на стеричния размер на  $\alpha$ -заместителя, например в  $\text{CHCl}_3$ ,  $\alpha$ -*tert*-бутил съдържащия **86** има  $A = -550.7$ . Абсолютната стойност е по-голяма отколкото измерената от **77** ( $A = -505.4$ ) или от **36** ( $A = -523.7$ ), разкривайки непълно конформационно разделяне в тези два мезобилирубина, Фигура 15.



Фигура 15. Ляво: CD на *син*-хиралните ( $\alpha S, \beta'S$ )-**77** ( $\alpha\text{-CH}_3$ , спектри 1 и 3) и ( $\alpha R, \beta'S$ )-**86** ( $\alpha\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ , спектри 2 и 4); Дясно: CD на *анти*-хиралните ( $\alpha R, \beta'S$ )-**78** ( $\alpha\text{-CH}_3$ , спектри 1 и 3) и ( $\alpha S, \beta'S$ )-**93** ( $\alpha\text{-C}(\text{CH}_3)_3$ , спектри 2 и 4) в хлороформ (пунктирани линии) и метанол (непрекъснати линии)

Положителните екситонни куплети (в неполярни разтворители) от *анти*-хиралните **78**, **91-95** и **97** доказват, че  $\alpha$ -заместителят доминира ( $\beta'S$ )-метиловата група при избора на *P*-хирална конформация, но ( $\beta'S$ )- $\text{CH}_3$  доминира  $\alpha\text{-OCH}_3$  групата в **96**, който прояви отрицателен куплет.

Котоновите ефекти от **84-97** са по-слаби в полярни разтворители, особено в тези, които са способни да нарушават мотива вътрешномолекулни Н-връзки. Разтворителят влияе по-силно върху конформационната хомогенност на *анти*-хиралните рубини, където водородните връзки не са комплементарни, Фигура 15. Затова анализът на CD от *анти*-хиралните **78**, **91-97** беше проведен използвайки само данните от неполярни разтворители, Фигура 16 и Таблица 1.



Фигура 16. Кръгов дихроизъм на *анти*-хиралните **78** (спектър 1), **91** (спектър 2), **92** (спектър 3), **93** (спектър 4), **94** (спектър 5) и **95** (спектър 6) в  $\text{CHCl}_3$

Таблица 1 Относителен стеричен размер на функционални групи от амплитуди на екситонен CD (A) в **78**, **91-97**.

Функционална група ( $\alpha$ -R)	CD A <sup>a</sup>		Конформационни A-стойности <sup>b</sup>	Относителен стеричен размер <sup>b</sup> от	
	$\alpha, \beta'$ -анти-хирални	$\alpha, \beta'$ -син-хирални		A-стойности	CD A-стойности
CH <sub>3</sub>	+273.8	-498.8	1.74	1.00	1.00
OCH <sub>3</sub>	-339.1	-463.3	0.75	0.43	1.24
CH <sub>2</sub> Ph	+354.3	-486.2	1.76	1.01	1.29
Ph	+378.5	-558.7	2.87	1.65	1.38
CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	+394.8	-530.5	1.79	1.03	1.44
SCH <sub>3</sub>	+424.8	-507.7	1.00	0.57	1.55
CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	+470.8	-533.5	2.21	1.27	1.72
C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	+475.3	-587.5	4.90	2.82	1.74

<sup>a</sup> Усреднени стойности на амплитудите на екситонните куплети в хексан,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ , и  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; <sup>b</sup> Литературни данни от динамичен ЯМР;

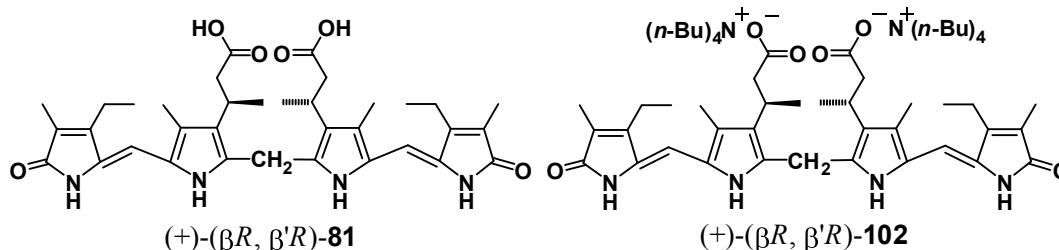
<sup>c</sup> От CD амплитуди, некоригирани за *M*-спирален конформер, наблюдаван с <sup>1</sup>H ЯМР когато R = CH<sub>3</sub> (22 %), CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (9 %), Ph (8 %) и CH<sub>2</sub>Ph (6 %).

За оценка на относителния стеричен размер на  $\alpha$ -заместителя използвахме CD амплитудите A от *анти*-хиралните мезобилирубини. В тях

равновесието  $M \rightleftharpoons P$  се контролира от по-силното челно отблъскване  $\alpha$ -R / C-7 CH<sub>3</sub> в *M*-хирален мезобилирубин (по-слабо при R = OCH<sub>3</sub>), отколкото ( $\beta'$ S)-CH<sub>3</sub> / C-10 CH<sub>2</sub> в *P*-хирален рубин. Съгласно CD, относителният стеричен размер е: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> > CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> > SCH<sub>3</sub> > CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> > Ph > CH<sub>2</sub>Ph > CH<sub>3</sub> > OCH<sub>3</sub>.<sup>18, 19</sup> Този порядък не отговаря напълно на реда на относителния стеричен размер, базиран на конформационни *A*-стойности: C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> > Ph > CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> > CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> > CH<sub>2</sub>Ph > CH<sub>3</sub> > SCH<sub>3</sub> > OCH<sub>3</sub>. *A*-Стойностите се дефинират като термодинамичното предпочитание на един заместител R да заеме екваториалното спрямо аксиално разположение в циклохексан. Несъответствията бяха отдадени на различен тип стерични взаимодействия: *странично* отблъскване между аксиален R и 3,5-CH<sub>2</sub> в циклохексанов скелет и *челно* отблъскване в мезобилирубинов скелет. Дължината на връзката C <sub>$\alpha$</sub> -R придобива по-голямо значение в по-малко подвижния билирубинов конформационен модел, както се показва от  $\alpha$ -SCH<sub>3</sub> заместителя. От разглеждането не може да се изключи частична скелетна деформация и в двата конформационни модела при най-обемистите *i*-Pr и *t*-Bu групи.

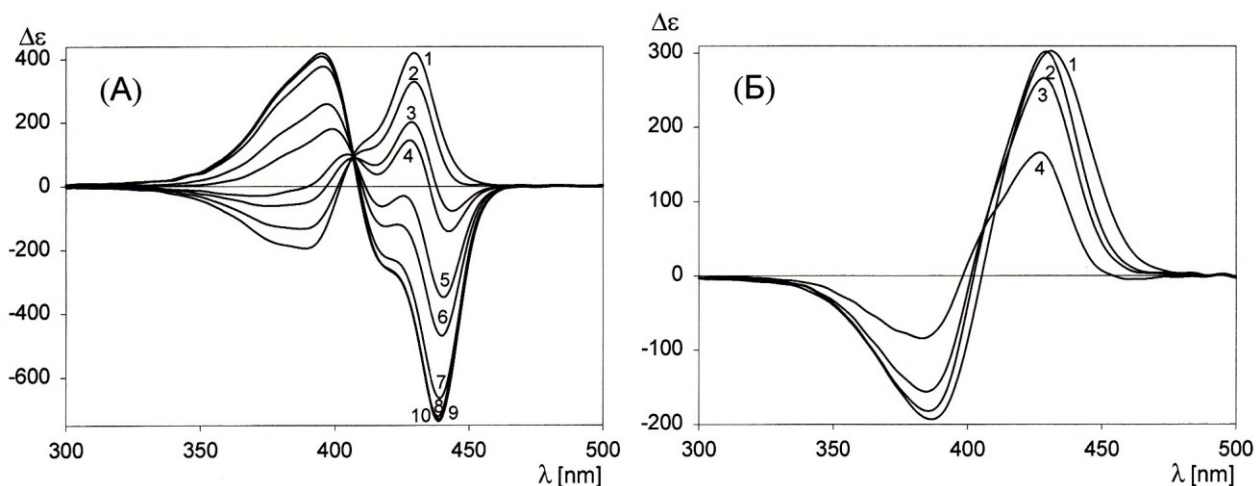
### ВЛИЯНИЕ НА АЛИФАТНИ АМИНИ ВЪРХУ КОНФОРМАЦИЯТА НА БИЛИРУБИНИ

В процеса на изследванията се натъкнахме на необичаен пример за обръщане на екситонната хиралност при смяна на разтворителя.



Характерната за ( $\beta R$ ,  $\beta' R$ )-диметилмезобилирубин XIII $\alpha$  (**81**, енантиомер на **36**) положителна екситонна хиралност преминава в отрицателна при прибавяне на алифатни амини и  $\alpha$ ,  $\omega$ -диаминоалкани.<sup>21, 22</sup>

В неполярни разтворители, всички използвани амини, добавени в достатъчно количество, предизвикват инверсия на CD от **81**, Фигура 17. Екситонният куплет е неимоверно интензивен в някои случаи, например **81** в бензен + *i*-PrNH<sub>2</sub>, има  $A = -1279.0$ , която е удвоена стойност в сравнение с положителния куплет в неутрален бензен. В метанол се наблюдава само значително отслабване на KE, а в DMSO – промените са към прогресивно засилващ се положителен екситонен куплет, който отговаря на конфигурацията и KE от **81** в неутрални разтвори.



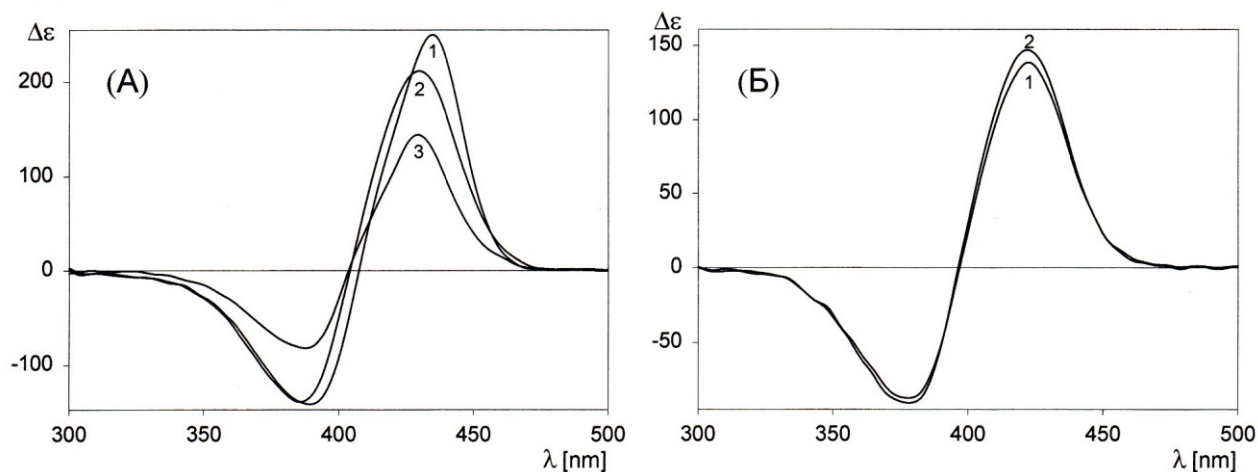
Фигура 17. Кръгово-дихроични спектри на **81** в (А): хексан с добавен  $\text{Et}_2\text{NH}$  в молно съотношение амин : **81** 0 (крива 1), 16 (2), 24 (3), 32 (4), 48 (5), 80 (6), 160 (7), 1600 (8), 16000 (9), 80000 (10) и (Б): метанол с добавен  $\text{Et}_2\text{NH}$  в молно съотношение амин : **81** 0 (крива 1), 1600 (2), 16000 (3), 80000 (4)

Вторичните амини въздействат най-силно върху CD на **81**, следвани от първичните, а с най-слаб ефект са третичните, което корелира с базичността на амините. Изводът се потвърждава от незначителното влияние на  $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$  и  $\text{NH}_3$ . Алифатните амини с къси, неразклонени вериги са по-ефективни при инверсията на CD, отколкото амините с по-дълги вериги. Дължината на веригата не оказва влияние след 1-аминохексан.  $\alpha$ ,  $\omega$ -Диаминоалканите са по-ефективни за CD инверсия, отколкото нормалните моноамини със същата дължина на веригата, като оптималната дължина за максимално въздействие бе намерена при 1,8-диаминооктана.

Обръщането на екситонната хиралност от амини бе проследено също в ( $\alpha R$ ,  $\alpha' R$ )-**40** и потвърдено в аналози съдържащи карбоксилна киселина. При отсъствие на  $\text{COOH}$  група, екситонната хиралност се запазва в разтвори на амини, както бе наблюдавано при диестера **64** и тетрапиролите **42**, **47** и **48**.

Изходният пункт при обяснението на феномена е киселинно-основна реакция. Свойствата на получения от нея дикарбоксилатен йон от **81** бяха изучени върху изолирана бис-(тетра-*n*-бутил)амониева сол **102**. Тя не показва обръщане на екситонния куплет в органични разтворители и във водни буфери, Фигура 18. Интензивните KE от **102** доказват, че структурните и стереохимични елементи, които са основни за алостеричния модел и за произтичащия от него CD в **36**, **40** и аналозите им,

продължават да са отговорни за екситонния CD, когато карбоксилните групи са йонизирани.



Фигура 18. Кръгово-дихроични спектри на бис-(тетра-*n*-бутил)амониевата сол **102** в: (А) хлороформ (спектр 1), метанол (спектр 2) и DMSO (спектр 3); и в: (Б) 0.1 М фосфатен буфер с рН = 7.40 (спектр 1) и рН = 8.60 (спектр 2)

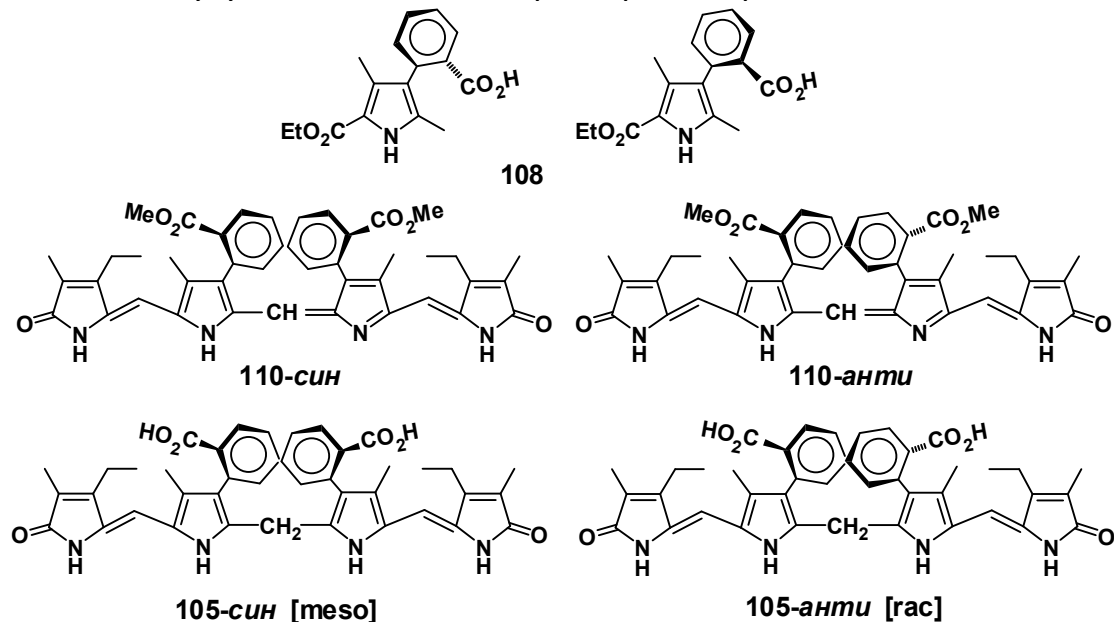
Алостеричният модел предвижда предпочетена *P*-хирална конформация при ( $\beta R$ ,  $\beta'R$ )-конфигурация на **81**, поради минималните стерични отблъсквания между  $\beta$ ,  $\beta'$ -CH<sub>3</sub> и C-10 CH<sub>2</sub>.<sup>3</sup> Обръщането на CD ефектите в присъствие на амини свидетелства за противоположен по знак торзионен ъгъл между кръстосаните електрични диполни моменти на прехода и, следователно, за инверсия към *M*- на молекулната хиралност. В нея са налице напълно различни стерични взаимодействия, които бяха недвусмислено доказани с 1D nOe от разтвори съдържащи амини. Спектрите характеризират типични, плоски дипиринони в *син*-конформация и показват пространствена близост между  $\beta$ ,  $\beta'$ -CH<sub>3</sub> и C-10 CH<sub>2</sub>, както и между  $\beta$ ,  $\beta'$ -CH и C-7, C-13 CH<sub>3</sub>, присъща на *M*-хиралност. За реализиране на тази неблагоприятна конформация предположихме формиране на по-плътно прилягащи йонни двойки в комплекса (дикарбоксилат - амониеви катиони), отколкото в солта **102** (с непроменен CD). Протонираният, солватиран амин може да се вмъкне в матрицата Н-връзки поддържащи конформацията, при което се въвеждат нови несвързващи стерични взаимодействия. Те действат в противовес на съществуващите от  $\beta$ ,  $\beta'$ -CH<sub>3</sub> и превъзможват конформационното им предпочитание.<sup>21, 22</sup>

### АТРОПИЗОМЕРИ В ХИРАЛЕН АНАЛОГ НА БИЛИРУБИНА

С трите региоизомерни мезобилирубина, чиито C-8, C-12 остатъци от пропионова киселина са заменени с бензоени киселини, изследвахме



влиянието на конформационното имобилизиране и отдалечеността на COOH върху свойствата на тези тетрапироли.<sup>23, 24</sup> Ключовите градивни елементи синтезирахме чрез циклизация на подходящ 3-арилпентан-2,4-дион за въвеждане на *орто*-карбоксифенилов заместител,<sup>23</sup> или чрез реакция на Сузуки – за *мета*- и *пара*-карбоксифениловите заместители.<sup>24</sup>

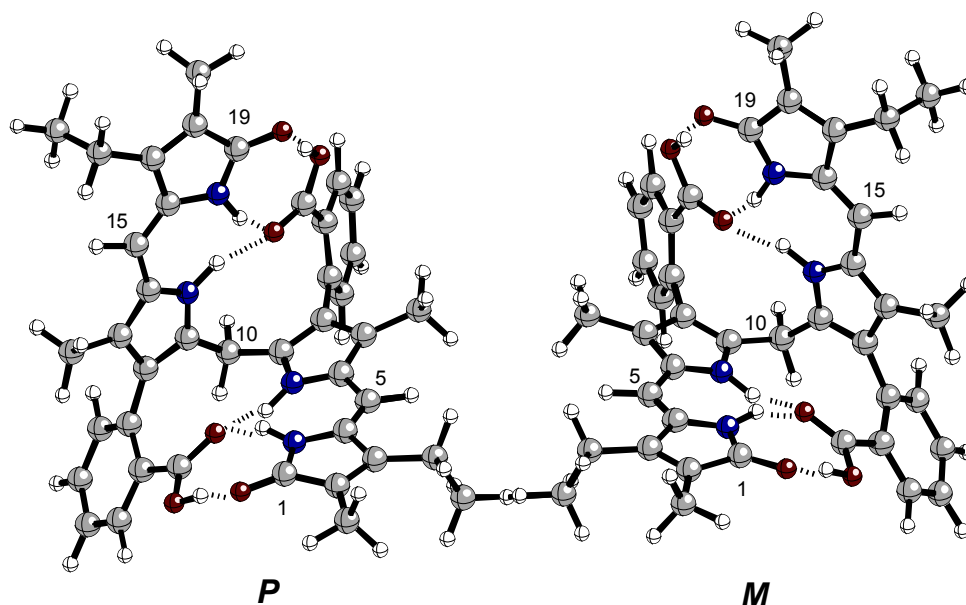


В редица *орто*-бензоени киселини от тази серия, но не и в *мета*- или *пара*-изомерите, беше открита атропизомерия дължаща се на затруднено въртене около връзката пирол-фенил. Присъствието на хирална ос в монопиrola **108** и негови производни се проявява в ЯМР в наблюдаваните диастереотопни, естерни CH<sub>2</sub> протони. В съответния дипиринон, репортерът 3-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> е отдалечен и не показва това влияние, но етиловият естер на остатъка от бензоена киселина го демонстрира. Опитите за разделяне на енантиомерите с класически методи бяха неуспешни.

В тетрапиролите присъстват две хирални оси, поради което са възможни конформационни диастереомери, означени със *син*- и *анти*-. Локалната конфигурация около връзката пирол-фенил в тези съединения се проявява в удвояване на ЯМР сигналите им. Двата диастереомера във вердина **110** са в съотношение 60:40. От негов динамичен ЯМР бе изчислена бариера за превръщането *анти* ⇌ *син* от 89 kJ.mol<sup>-1</sup> – твърде ниска за да се изолират атропизомери.

Само *анти*-диастереомерът на рубина **105** може да приеме типичната, сгъната конформация, позволяваща и двете *o*-CO<sub>2</sub>H групи да са свързани чрез вътрешномолекулни водородни връзки, както бе показано с ММ изчисления и сравнения със *син*-**105**, както и с *мета*- и *пара*-изомерите, Фигура 19. Мезобилирубинът *анти*-**105** и диметилвият му естер са C<sub>2</sub> симетрични и показват еквивалентни C-10 CH<sub>2</sub> протони, докато

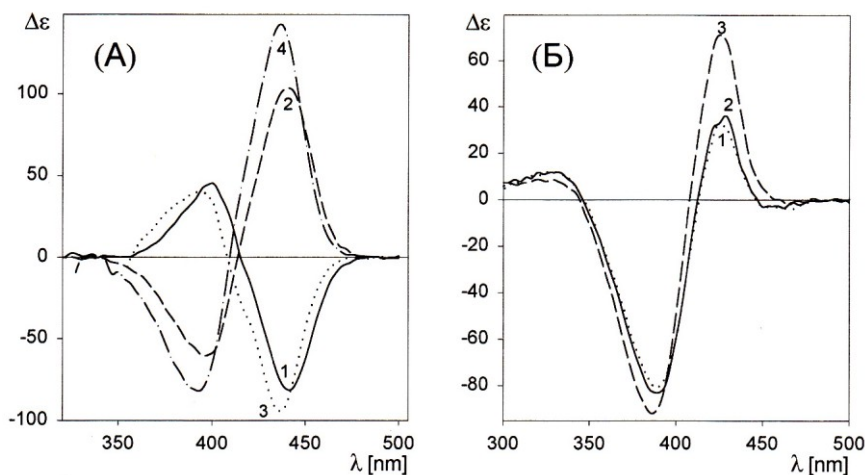
в *син*-изомерите (с равнина на симетрия) тези протони са анизохронни и от интензивността им бе оценено количеството на всеки атропизомер. Съотношението *анти:син* варира от 100:0 в неполярни разтворители до 35:65 в DMSO.<sup>23</sup>



Фигура 19. Най-стабилните, изчислени с ММ конформации на *анти-105*

Атропизомерната хомогенност на **105** в неполярен разтворител е наложена от вътрешномолекулното Н-свързване, чието отслабване в полярен разтворител води до поява на *син*-изомера. Само в най-полярните разтворители преобладава *син-105*, в който поне едната карбоксилна група не участва във вътрешномолекулни Н-връзки. Диметилвият естер на **105** също показва променливо с разтворителя количество *син*-изомер, но той присъства дори в неполярните разтворители, тъй като Н-свързването няма доминираща роля в стабилизацията на *анти*-изомера.

Абсорбционните спектри в UV-vis областта на рубина **105**, както и на вердина **110** указват, че хромофорите не са деформирани от *орто*-карбоксифениловата група и не са спрегнати с нея, което подкрепя почти ортогоналното разположение на пиროловия и фенилов пръстен. Екситонното взаимодействие в **105** се илюстрира с индуцирания му CD, който се генерира от рацемичен атропизомер в присъствие на добавен оптично активен агент, Фигура 20. Алкалоидите хинин и цинхонидин индуцират отрицателни екситонни куплети в **105**. Те показват селективност за свързване с *M*-хиралната пигментна конформация. Предпочетено свързване на *P*-хиралната конформация се осъществява от човешки серумен албумин.



Фигура 20. Индуциран CD в **105**: (А) в  $\text{CHCl}_3$  от алкалоидите: цинхонидин (спектър 1), цинхонин (спектър 2), хинин (спектър 3) и хинидин (спектър 4); (Б) от човешки серумен албумин във водни буфери: фосфатен с рН 7.42 и 8.02(спектри 1 и 2) и TRIS с рН 7.40 (спектър 3)

Амплитудите и положението на КЕ в индуцирания CD в **105** са много добре съпоставими с тези в билирубина при същите условия. От сравнението следва, че конформационната селекция и молекулната форма на билирубин и **105** са подобни при образуване на комплекси с хирални амини и албумин.<sup>23, 24</sup>

### СТЕРЕОХИМИЯ НА ХИРАЛНИ МЕЗОБИЛИВЕРДИНИ

Пространствената форма на биливердина в най-стабилната (4Z, 10Z, 15Z, *син*, *син*, *син*) конфигурация е известна от литературни данни. Конформацията му се описва с лява (*M*-) или дясна (*P*-) спирала с малка стъпка, превръщаща се една в друга през бариера от около  $42 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

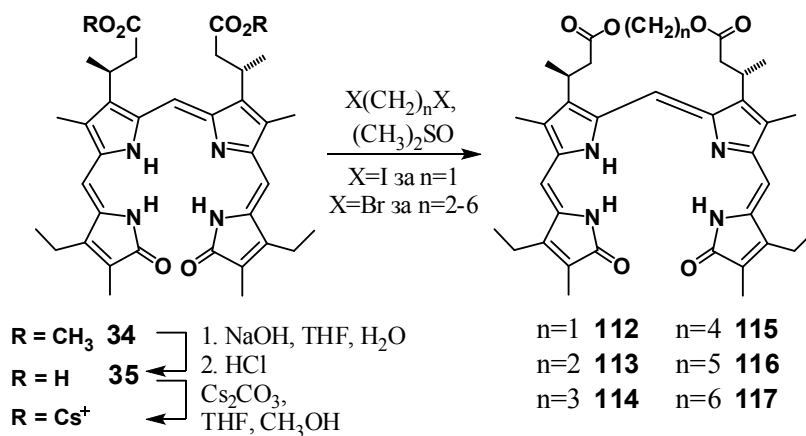
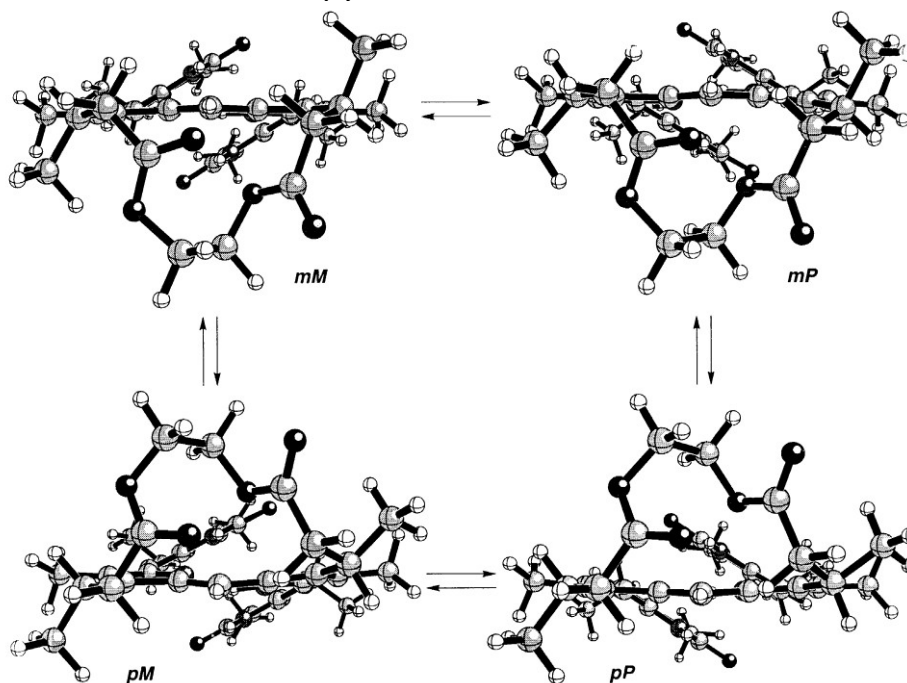


Схема 4

Хироптичните характеристики на енантиомерно обогатената биливердинова спирала са също известни. Стереохимичните последици от присъствието на хирални центрове, в непосредствена близост до спиралния хромофор, изследвахме в серия макроциклични естери на ( $\beta S$ ,  $\beta' S$ )-диметилмезобиливердин XIII $\alpha$  (**35**).<sup>25</sup> Естерите **112-117** бяха синтезирани от дицезиевата сол на **35** и дийодометан или  $\alpha$ ,  $\omega$ -дибромалкани в оптимизирани условия за избягване на междумолекулна реакция, Схема 4.

Абсорбционните спектри на **112-117** свидетелстват за типичен, недеформиран вердинов хромофор, какъвто е той в отворения естер **34**. Диметилвият естер **34** показва положителен КЕ във видимата област и поинтензивен отрицателен КЕ в близката UV област, които съответстват на излишък от *P*-спиралната конформация. Когато карбоксилните киселини са скачени заедно чрез верига  $-(CH_2)_n-$  в цикличните естери, изборът на спиралността се обуславя от броя ( $n$ ) метиленови групи. Съгласно CD, *P*-спиралната конформация е предпочетена при  $n=1$  (**112**),  $n=5$  (**116**) и  $n=6$  (**117**), а *M*-спиралната – при  $n=2$  (**113**),  $n=3$  (**114**) и  $n=4$  (**115**). Във всички случаи предпочетеността не е голяма, съдейки по CD амплитудите, които са само 5-10% от максималните за вердини. Следователно,  $\beta$ ,  $\beta'$ -хиралните центрове са неефективни за спирална диастереоселекция при вердини, в пълна противоположност на рубините.



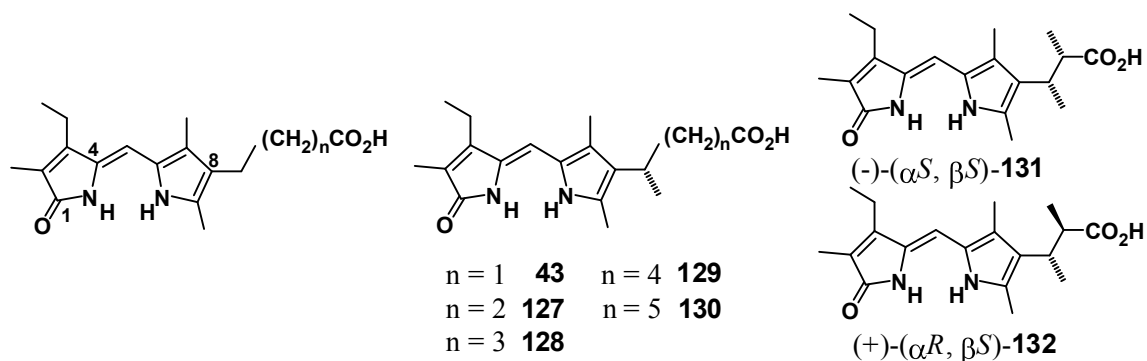
Фигура 21. Стабилни конформации от MM изчисления на **113** ( $n=2$ ), погледнати от  $-O(CH_2)_2O-$  към  $C-10 -CH=$

Малки разлики в енергията на *M*- и *P*- конформациите на **34** и **112-117** бяха намерени от MM изчисления. При молекулното моделиране се

отчете възможността и естерният мост да приема една от двете енантиомерни *m*- или *p*-конформации, както е илюстрирано във Фигура 21. Изчисленията показаха, че инверсия на хромофорната *M*- / *P*-спиралност е осъществима, но обръщане спиралността на естерния  $O(CH_2)_nO$ - пръстен не е допустимо.

### ОПТИЧНО АКТИВНИ ДИПИРИНОНИ

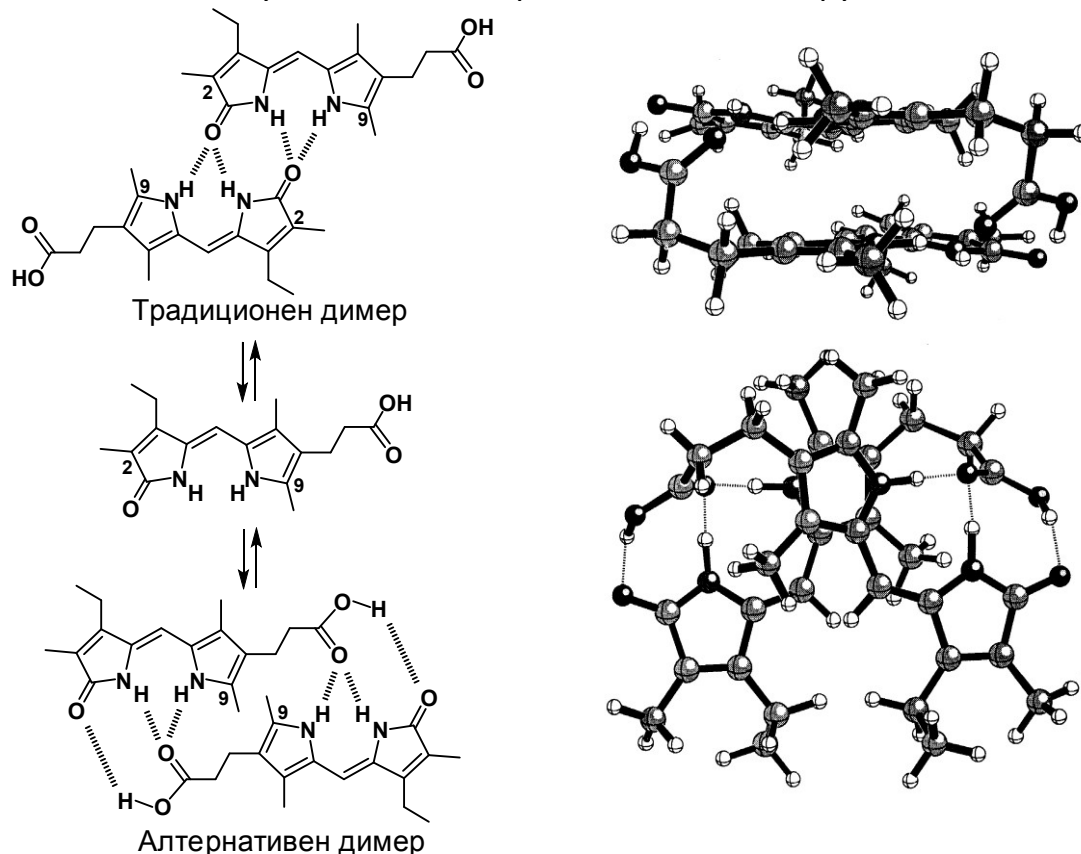
Хромофорът в един типичен дипиринон е плосък, с интензивна абсорбция около 400 nm от  $\pi \rightarrow \pi^*$  електронен преход. Пертурбацията му от отдалечен хирален център не е предизвиквала интерес преди изследванията ни върху група дипиринони, поради нечувствителност на самостоятелните хромофори. В редица енантиомерно чисти дипиринони, съдържащи верига с карбоксилна група на С-8, наблюдавахме атипични ЯМР и хироптични характеристики, за съгласуването на които предложихме нов тип димеризация в дипиринони.<sup>7, 14</sup>



Хомологираните на С-8 ксантобилирубинови киселини са известни от работи на други автори. Хиралните хомологирани аналози на **43** (**127-130**) получихме от оптично чистия пирол **31**, чиято киселинна верига бе удължена с итеративни процедури.<sup>7</sup> Киселините **131** и **132** произлизат от естерите им **71** и **72**.<sup>14, 16</sup>

Основните структурни мотиви на дипиринона: 1) предпочетена лактамна форма; 2) (*Z*)-конфигурация на двойната връзка С-4 / С-5; 3) планарна *син*-конформация, способстват за формиране на димери. Присъствието им в разтвор и в кристално състояние е било потвърждавано нееднократно и за някои съединения е била установена константата на димеризация. В литературата планарните димери, които нарекохме "традиционен тип", се представят поддържани от четири междумолекулни Н-връзки, Фигура 22. Тези димери се характеризират в ЯМР спектри със силно деекранирани NH протони. В ясен контраст, ахиралните дипиринон карбоксилни киселини (хомолози на **19**) и оптично активните киселини **43**, **127-132**, но не и техните естери, притежават значително екранирани NH протони. ЯМР спектрите показват също

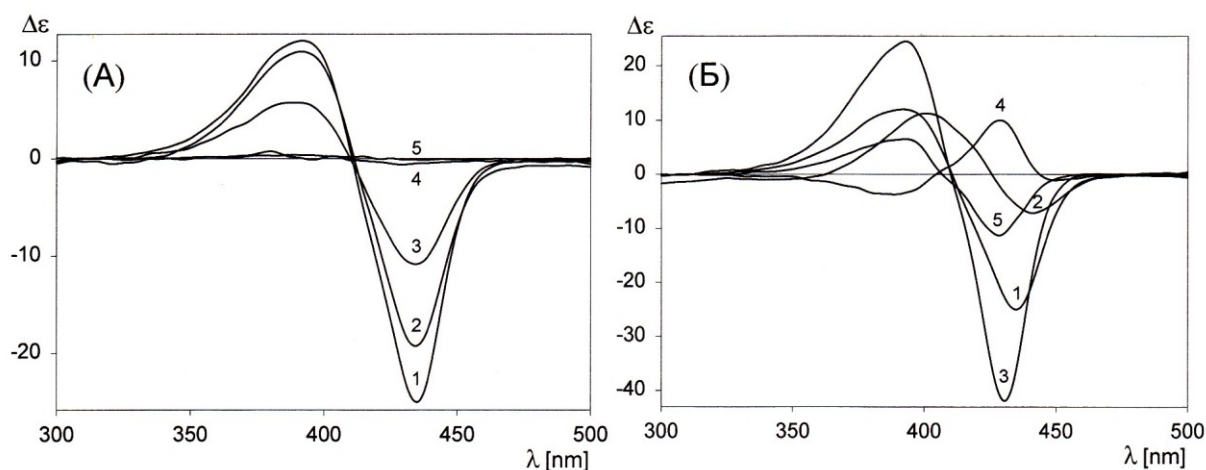
имобилизиране на страничните киселинни вериги. Една дипиринон карбоксилна киселина има потенциал за водородно свързване между киселинната и лактамната група, както е показано в "алтернативния тип" димер на Фигура 22. Той се оказва (ММ) енергетично неизгоден поради отблъскване между двете копланарни С-9 метилови групи.



Фигура 22. В ляво: възможни стилове на димеризация на ксантобилирубинова киселина (**19**), които не съответстват на експерименталните данни. В дясно: новият тип 3D димер (ММ) на **19**, погледнат отстрани и отгоре, чийто електрични диполни моменти на прехода в мономера са в *P*-спирална формация

Киселините **43** и **127-132** показват необичайно високи стойности на оптично въртене и интензивен, двузначен кръгов дихроизъм, Фигура 23. Съответните метилови естери проявяват много слаби КЕ, характерни за пертурбиран от хирален елемент електронен преход. Интензивният CD от екситонен произход в киселините не може да произлиза от "традиционния" (каквото се образува при естерите) или "алтернативен" тип димери, в които хромофорите са копланарни. Оптичната активност на **43** и **127-132** се дължи на *междумолекулно* екситонно взаимодействие. То възниква в подредена по нов тип 3D димерна структура, в която дипириноните са разположени един над друг в дясно спирална или ляво

спирална хирална ориентация. Двете ориентации са изоенергийни при ахиралните дипиринони, но са диастереомерни, с различна енергия, в **43** и **127-132**, Фигура 22.<sup>7, 14</sup> С подреждането в пространствени димери се избягва напрежението между С-9 метиловите групи в "алтернативния" планарен димер и се обяснява екранирането на NH протоните намиращи се над (под)  $\pi$ -системата.



Фигура 23. Кръгов дихроизъм на: (А) дипиринон карбоксилната киселина **43** в  $\text{CCl}_4$  (спекър 1),  $\text{C}_6\text{H}_6$  (спекър 2),  $\text{CHCl}_3$  (спекър 3),  $\text{CH}_3\text{CN}$  (спекър 4) и  $\text{CH}_3\text{OH}$  (спекър 5); (Б) **43** (пропионова верига, спекър 1), **127** (бутанова, спекър 2), **128** (пентанова, спекър 3), **129** (хексанова, спекър 4) и **130** (хептанова, спекър 5) в  $\text{CCl}_4$

Мономерите се поддържат в достатъчна близост и в хирална ориентация от междумолекулни Н-връзки. Те са податливи на влияние от разтворителя, което е видно от по-голямата чувствителност на CD от **43**, **127-132**, отколкото от мезобилирубините, към промяна на полярността на разтворителя. Димерите се разрушават по-лесно в по-полярни разтворители и компонентните хромофори могат да се отдалечат, докато в билирубини, дори в полярни разтворители, съществува вероятност за принос към CD от некомпенсирана хирална конформация. Беше установено намаляване интензивността на CD от **131** при разреждане, както се очаква при равновесие мономер  $\rightleftharpoons$  димер, където  $\Delta\epsilon$  на мономера може да се пренебрегне.

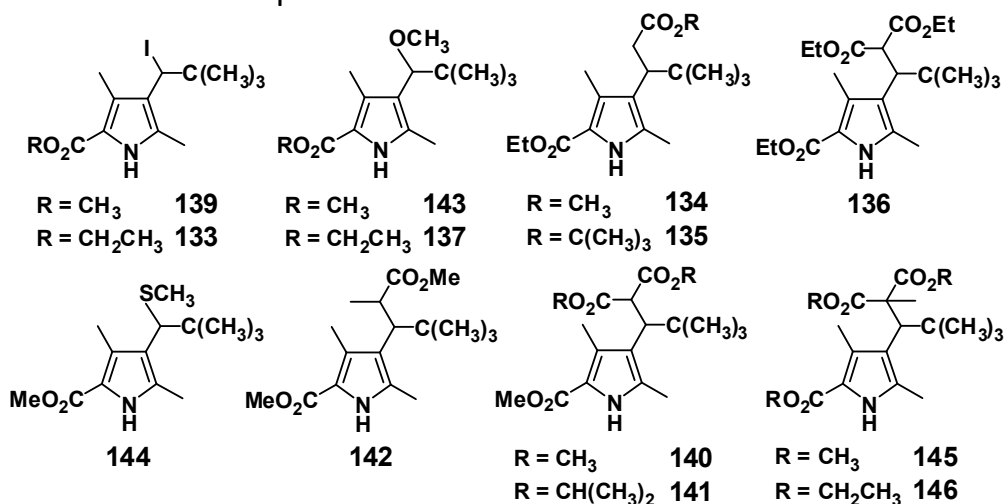
От съответствието между знака на CD куплета и екситонната хиралност следва, че водородните връзки придържат двата хромофора в **43**, **127**, **128** и **130-132** в *M*-спирална ориентация, а в **129** – в *P*-спирална ориентация. Причината за избора е в стеричното пречене между метиловата група при хиралния център от единия дипиринон и С-9  $\text{CH}_3$  от

другия, което бе показано с ММ изчисления.<sup>7</sup> Те разкриха също, че 3D димерите могат да поберат като в капсула ароматна молекула – гост.

### АТРОПИЗОМЕРИЯ В МОНОПИРОЛИ

В градивни елементи за екстремно стерично запречен мезобилирубин наблюдавахме затруднено въртене около проста въглерод-въглеродна връзка. Противно на многобройните изследвания върху атропизомерия около  $sp^2 - sp^2$  C-C връзка, в литературата не се срещат често примери за затруднено въртене около  $sp^3 - sp^2$  C-C връзка, каквото възниква когато *tert*-бутилов заместител е разположен на бензилна позиция между две метилови групи на пирилов пръстен. В пирилови системи са известни само няколко случая на атропизомерия от биариллов тип. Съобщените от нас конфигурационно стабилни атропизомери<sup>26</sup> и относително стабилни атропизомери,<sup>27</sup> с техните термодинамични и кинетични параметри на превръщане, са първите примери за монопириולי със затруднено въртене около  $sp^3$  (алкил) –  $sp^2$  (пириол) C-C връзка.

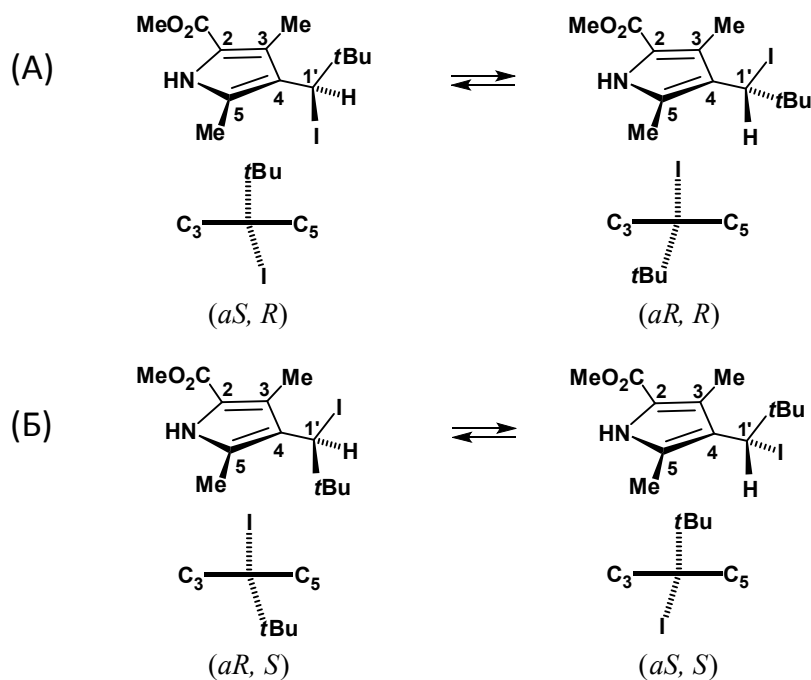
Описаният отдавна йодид **133** използвахме за синтез на съединенията **134-137** с нарастващ размер на единия от заместителите при хиралния център.<sup>27</sup> С цел придаване на желани свойства за следващото атропизомерно обогатяване и разделяне, синтезирахме и йодида **139**, който алкилира гладко пропионатен или малонатен анион до **140-142**. Солволиза на **133** или **139** в метанол или реакция с метантиол даде етерите **137**, **143** и тиоетера **144**.<sup>27</sup> Още по-силно стерично запречените **145** и **146** синтезирахме също чрез алкилиране с йодидите на метилмалонатни естери.<sup>26</sup>



Въпреки привидната чистота на йодидите **133** и **139**, ЯМР спектрите им установиха смеси от две изомерни съединения. Диастереоизомерията им се проявява поради присъствие на втори елемент на хиралност – ос на хиралност, съвпадаща с връзката C-4 / C-1', Фигура 24. Всички производни съединения показаха също, че са смеси, като диастереомерното



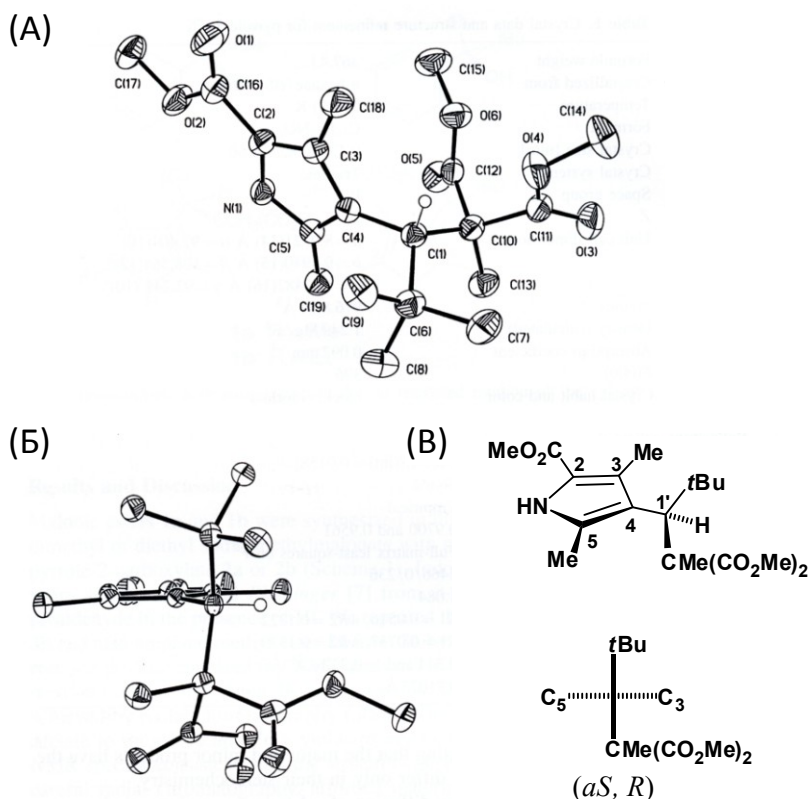
съотношение след синтез е в границите 65:35 до 88:12, а равновесното съотношение варира между 65:35 и 70:30.



Фигура 24. Стереизомерите на **139**, където се различават две атропизомерни двойки (А и Б) и две двойки енантиомери

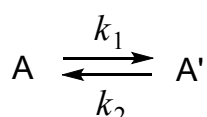
Препаративното разделяне на атропизомерите във всяко от съединенията **133-137** и **139-146** има специфични особености, в зависимост от физичните им свойства и от кинетичната им стабилност. При повечето съединения от този тип се удаде изолирането на високо обогатени на един атропизомер фракции, които използвахме за изследване кинетиката на взаимно атропизомерно превръщане с динамичен ЯМР. При кинетично лабилните **134**, **135**, **137** и **143** разделяне не можа да се постигне, а при **142** – само единият му диастереомер даде подходяща фракция за кинетични изследвания.

От рентгеноструктурния анализ на кинетично стабилния при нормални условия **145** следва, че термодинамично предпочетения диастереомер е [(*aR*, *S*)+(*aS*, *R*)], Фигура 25. Структурата доказва почти перпендикулярното разположение на връзките до *tert*-бутиловата група и метилмалонатния фрагмент спрямо пироловата равнина. Стеричното претрупване при хиралния център води до съществено удължаване на химични връзки и отваряне на валентни ъгли около него.



Фигура 25. (А) и (Б) Структура на термодинамично предпочетения атропизомер **145**; (В) Стерео-формула с произволно избрана (*R*)-конфигурация на C-1' и проекция показваща (*aS*)-конфигурация на хиралната ос, съгласно рентгеноструктурния анализ

Процесът на взаимно превръщане на атропизомерите в **133-137**, **139-146**, както е показано на Фигура 24 за **139**, се описва с динамично равновесие за изомеризация:

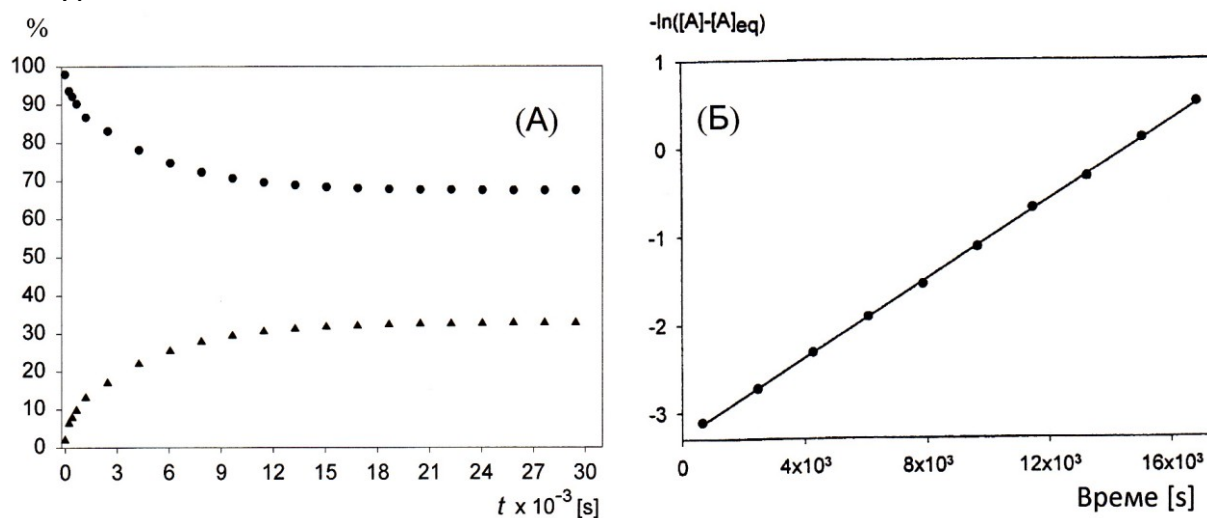


За изчисление на скоростните константи  $k_1$  и  $k_2$  използвахме уравнението, изведено от израза за скорост на обратима мономолекулна реакция:

$$\ln \frac{[A]_0 - [A]_{\text{eq}}}{[A] - [A]_{\text{eq}}} = (k_1 + k_2)t$$

където  $[A]_0$  е началната (в  $t = 0$ ) концентрация на обогатения атропизомер,  $[A]_{\text{eq}}$  е неговата равновесна концентрация и  $[A]$  е концентрацията му в момент  $t$ . От линейната функция  $-\ln([A] - [A]_{\text{eq}})$  спрямо времето получихме сумата на скоростните константи ( $k_1 + k_2$ ). Отношението им  $k_1/k_2$  изчислихме от равновесната константа. Концентрациите  $[A]$  и  $[A']$  се определят от интегралната интензивност на съответните  $^1\text{H}$  ЯМР сигнали, които се следят през фиксирани интервали време при строго

контролирана температура. Равновесните концентрации се намират от интензивността на сигналите, когато ЯМР спектрите не се променят повече с времето. Типичен комплект данни от динамичен ЯМР е показан на Фигура 26.



Фигура 26. (А) Промени на  $^1\text{H}$  ЯМР интензивността на С-3  $\text{CH}_3$  сигналите с времето; (Б) функцията  $-\ln([A] - [A]_{\text{eq}})$  от времето за йодида **133** при 313 К от интегриране на сигналите от С-1' протона

Скоростните константи  $k$ , усреднени от четири двойки сигнали в началния стадий на изомеризацията, се използват за изчисление на свободната енергия на активация ( $\Delta G^\ddagger$ ) съгласно уравнението:

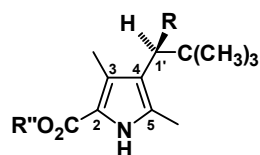
$$\Delta G^\ddagger = RT \left( 23.76 - \ln \frac{k}{T} \right)$$

Изчислените параметри за атропизомеризацията в достъпните изомерно обогатени пироли са обобщени в Таблица 2. Тези данни корелират с дължините на връзките до хиралния С-1' център и стеричния размер на вариращия заместител при него.<sup>26, 27</sup> Метокси групата е недостатъчно голяма за да се постигне обогатяване на единия диастереомер в **137** и **143**. Метилтио групата едва успява да упражни достатъчно стерично запречване, но заместване с йоден атом води до високи ротационни бариери. Метиленовата група на С-1' в **134** и **135** е твърде малка за да забави атропизомеризацията. По-обемистата 2-метилпропионатна група в **142** се оказва по-малко ефективна от йоден атом за повишаване бариерата за ротация, но остатъците от малоновии естери са значително по-ефективни. Метилмалоновият остатък предизвиква непреодолимо стерично запречване при стайна температура, водещо до стабилни атропизомери.

Таблица 2 Кинетични и термодинамични параметри за атропизомеризацията в пироли.<sup>a</sup>

Съединение	$T$ [K]	$k_1 \times 10^5$	$k_2 \times 10^5$	$\Delta G_1^\ddagger$	$\Delta G_2^\ddagger$	$\Delta G^\circ$
<b>144</b>	273	1.58	3.78	91.8	89.8	2.0
<b>142</b>	313	10.16	10.75	100.8	100.7	0.1
<b>133</b>	313	9.39	17.78	101.0	99.3	1.7
<b>139</b>	313	7.21	15.14	101.7	99.7	2.0
<b>140</b>	313	2.26	4.16	104.7	103.1	1.6
<b>136</b>	313	1.74	3.45	105.4	103.6	1.8
<b>141</b>	313	1.60	3.18	105.6	103.8	1.8
<b>146</b>	383	0.38	0.84	134.4	131.8	2.6
<b>145</b>	383	0.37	0.79	134.5	132.0	2.5

<sup>a</sup> Скоростните константи  $k$  са в [ $s^{-1}$ ] и енергиите – в [ $kJ \cdot mol^{-1}$ ].



Бариерата за въртене нараства в порядъка заместители R:  $OCH_3 < CH_2CO_2R' < SCH_3 < CH(CH_3)CO_2Me \approx I < CH(CO_2R')_2 < CH_3C(CO_2R')_2$ . Малоновите естери с бариери около  $105 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  изомеризират лесно при стайна температура. За термична стабилност е необходим четвъртичен вицинален въглероден атом в R, както в стабилните атропизомери с бариери около  $130 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ .

## ИЗВОДИ

Получените при разработването на дисертационния труд резултати имат научно-фундаментален характер. Те могат да се използват при следващи стереохимични изследвания върху олигопироли с приложение на конформационен анализ и електронен кръгов дихроизъм.

1. Предложен е конформационен модел за мезобилирубинови производни съдържащи хирални центрове, с който се предсказва изместване на динамичното равновесие. Цялостната 3D молекулна форма в тези производни се контролира от вътрешномолекулни стерични въздействия от разстояние. Първостепенно значение в този модел се отнежда на конформационно-стабилизиращата роля на вътрешномолекулните водородни връзки.

2. Открити са синтетични методи за получаване на два възлови монопирила в енантиомерно чиста форма. Прилагането на подходящи химични модификации в тези две съединения води до редица предшественици на хомохирални ди- и тетрапироли. Разработени са нови и са усъвършенствани синтетични превръщания в химията на пироли, дипиринони и тетрапироли. Съществените приноси сред тях са реакциите на естерни енолати от N-незащитени пироли с разнообразни електрофили и окислителната кондензация на два различни дипиринона.

3. Абсолютната конфигурация на четири монопирила е установена с рентгеноструктурен анализ. От него следва абсолютната конфигурация на голям брой потомствени на монопиролите оптично активни аналози на ксантобилирубиновата киселина, мезобиливердина и мезобилирубина.

4. Проведен е детайлен конформационен анализ на хирални мезобилирубени, мезобиливердини и дипиринони чрез изчисления с метода на молекулната механика и динамика. Резултатите от тях съответстват на основните изводи от предложения модел за конформационен контрол чрез алостерично въздействие. Конформационното предпочитание на изследваните съединения е доказано експериментално с резултатите от модерни ЯМР методи и от спектроскопия на кръгов дихроизъм.

- Доказано е, че две метилови групи на  $\alpha$ ,  $\alpha'$ - или на  $\beta$ ,  $\beta'$ -хирални центрове в мезобилирубин XIII $\alpha$  изместват в значителна степен конформационното равновесие  $M \rightleftharpoons P$ . Струпване на повече конформационно-направляващи групи не е съпроводено с повишена диастереоселекция. Доказано е, че **M**-хиралният билирубинов конформер

се характеризира с отрицателна екситонна хиралност в кръговия дихроизъм.

- Доказана е важността на вътрешномолекулното водородно свързване при контрола на хиралността на билирубинови конформери. Мезобилирубини без значителна конформационна стабилизация от вътрешномолекулни водородни връзки са конформационно хетерогенни, от което следва ниска интензивност на кръговия им дихроизъм.

- Установено е, че заместител на  $\alpha$ -хирален център в остатъка от пропионова киселина има по-високи стерични изисквания от същия заместител на  $\beta$ -хирален център. Използвайки кръгов дихроизъм е оценен относителният стеричен размер на групи, които насочват в противоположни посоки конформационното равновесие в  $\alpha$ ,  $\beta'$ -заместени мезобилирубини.

- Установено е, че екситонната хиралност се обръща в присъствие на амини.

5. Изведена е корелация между абсолютна конфигурация, предпочетена молекулна хиралност (екситонна хиралност) и знаци на кръгово-дихроичните ефекти в хирални мезобилирубини.

6. Определена е връзката между стереохимия и кръгово-дихроични ефекти в циклични естери на мезобиливердин XIII $\alpha$ .

7. Предложен е нов тип 3D димерни структури при хомолози на ксантобилирубиновата киселина. Хиралните представители от този клас се характеризират с интензивен кръгов дихроизъм вследствие на екситонно взаимодействие от междумолекулен произход.

8. Установена е атропизомерия в мезобилирубини съдържащи остатъци от *орто*-бензоена киселина. Доказана е атропизомерия в пиролови съединения, която възниква поради затруднено въртене около  $sp^3 - sp^2$  въглерод-въглеродна връзка. С подходящи методи са изолирани индивидуални атропизомери от този тип, чиито кинетични параметри на изомеризация са установени.

## ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Lightner, D. A.; Person, R. V.; Peterson, B. R.; Puzicha, G.; Pu, Y.-M.; Boiadjiev, S. E. *Proc. SPIE - Int. Soc. Opt. Eng.* **1991**, *1432 (Biomolecular Spectroscopy II)*, 2-13. Conformational Analysis and Circular Dichroism of Bilirubin, the Yellow pigment of Jaundice.
2. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 607-655. Optical Activity and Stereochemistry of Linear Oligopyrroles and Bile Pigments.
3. Boiadjiev, S. E.; Person, R. V.; Puzicha, G.; Knobler, C.; Maverick, E.; Trueblood, K. N.; Lightner, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10123-10133. Absolute Configuration of Bilirubin Conformational Enantiomers.
4. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2551-2564. An Enantiomerically Pure Bilirubin. Absolute Configuration of ( $\alpha R$ ,  $\alpha' R$ )-Dimethylmesobilirubin-XIII $\alpha$ .
5. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *SYNLETT*, **1994**, 777-785. Synthetic Strategies for Understanding Bilirubin Stereochemistry.
6. Boiadjiev, S. E.; Pfeiffer, W. P.; Lightner, D. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14547-14564. Synthesis and Stereochemistry of Bilirubin Analogs Lacking Carboxylic Acids.
7. Boiadjiev, S. E.; Anstine, D. T.; Lightner, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8727-8736. Intermolecular Hydrogen Bonding in  $\pi$  Facial Dipyrinone Dimers as Molecular Capsules.
8. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *J. Heterocyclic Chem.* **2000**, *37*, 863-870. On the Aggregation of Bilirubins using Vapor Pressure Osmometry.
9. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3603-3615. Enantioselection in Bilirubin Analogs with Only One Propionic Acid Group.
10. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2535-2550. Intramolecular Hydrogen Bonding and its Influence on Conformation. Circular Dichroism of Chiral Bilirubin Analogs.
11. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Chirality*, **1997**, *9*, 604-615. Exciton Chirality of Bilirubin Homologs
12. Boiadjiev, S. E.; Anstine, D. T.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1945-1964. Conformational Analysis of an Optically Active Bilirubin Dimethyl Ester and Bis-*N*, *N*-Dimethyl Amide by Circular Dichroism, NMR and Molecular Dynamics.

13. Boiadjiev, S. E.; Person, R. V.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 491-510. Synthesis, Intramolecular Hydrogen Bonding and Conformation of Optically Active Bilirubin Amides. Analysis by Circular Dichroism and NMR.
14. Boiadjiev, S. E.; Anstine, D. T.; Maverick, E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 2253-2270. Hydrogen Bonding and  $\pi$ -Stacking in Dipyrrinone Acid Dimers of Xanthobilirubic Acid and Chiral Analogs.
15. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *SYNLETT* **1997**, 1277-1278.  $\alpha$ -Halogenation of Ester Enolates Containing N-Unprotected Pyrrole Nucleus.
16. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1309-1322. Stereocontrol of Bilirubin Conformation.
17. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2115-2129. Stereogenic Competition in Bilirubin Conformational Enantiomerism.
18. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11328-11339. Steric Size in Conformational Analysis. Steric Compression Analyzed by Circular Dichroism Spectroscopy.
19. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Chirality* **2000**, *12*, 204-215. Relative Steric Size of SCH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, and CH<sub>3</sub> Groups from Circular Dichroism Measurements.
20. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6220-6228. Altering the Acidity and Solution Properties of Bilirubin. Methoxy and Methylthio Substituents.
21. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 378-383. Chirality Inversion in a Molecular Exciton.
22. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Chirality* **2001**, *13*, 251-257. Chirality Inversion in the Bilirubin Molecular Exciton.
23. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7411-7421. Atropisomerism in Linear Tetrapyrroles.
24. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7591-7604. Novel Benzoic Acid Congeners of Bilirubin.
25. Boiadjiev, S. E.; Anstine, D. T.; Lightner, D. A. *Tetrahedron:Asymmetry*, **1995**, *6*, 901-912, Synthesis and Stereochemistry of Optically Active Biliverdin Cyclic Esters.
26. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Monatsh. Chem.* **2002**, *133*, 1469-1480. Stable Monopyrrole Atropisomers.
27. Boiadjiev, S. E.; Lightner, D. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1721-1732. Atropisomerism in Monopyrroles.