



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Ivona Banović

**NOVI PEPTIDI S α -HIDRAZINOKISELINAMA
KAO KATALIZATORI U MICHAELOVIM
REAKCIJAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Ivona Banović

**NEW PEPTIDES WITH α -HYDRAZINO
ACIDS AS CATALYSTS IN MICHAEL
REACTIONS**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Ivanka Jerić, PhD

Zagreb, 2026.

Zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci, strpljenju i razumijevanju tijekom cijelog razdoblja izrade ove disertacije.

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici, dr. sc. Ivanki Jerić, na stručnom vodstvu, povjerenju, savjetima i kontinuiranoj podršci koja je bila od neprocjenjive važnosti tijekom izrade ove disertacije.

Hvala Matiji na humoru i trenucima koji su olakšavali izazovne dane.

Veliko hvala Lidiji, Danijelu, Ivani, Arbenu, Mateji, Josipi, Barbari i Mladeni na svim kavama, savjetima, riječima ohrabrenja, zajedničkim trenucima i znanju koje su nesebično dijelili. Vaše društvo učinilo je vrijeme provedeno u laboratoriju znatno ugodnijim i ljepšim.

Na kraju, hvala svima što sam se od prvoga dana osjećala kao dio vašeg tima.

Ivona

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	2
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Asimetrična kataliza s peptidnim katalizatorima.....	4
2.2. Asimetrična kataliza u reakcijama formiranja C–C veze	8
2.2.1. Konjugirana adicija aldehida na nitroolefine katalizirana putem enamina	11
2.3. Peptidni katalizatori u reakcijama formiranja C–C veze.....	13
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. Instrumenti, materijali i metode.....	21
3.2. Opći propisi za pripravu katalizatora	22
3.2.1. Opći propis za pripravu α -hidrazinokiselina.....	22
3.2.2. Opći propis za pripravu peptida s ugrađenom α -hidrazinokiselinom.....	23
3.3. Opći propis za reakciju 1,4-adicije aldehida na nitroolefine	24
3.4. Priprava α -hidrazinokiselina.....	25
3.4.1. <i>D</i> -hVal-OH (1)	25
3.4.2. <i>D</i> -hLeu-OH (2).....	25
3.4.3. <i>D</i> -hPhe-OH (3).....	26
3.4.4. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hVal-OH (4)	26
3.4.5. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hLeu-OH (5).....	27
3.4.6. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hPhe-OH (6)	27
3.4.7. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hVal-OMe (7).....	28
3.4.8. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hLeu-OMe (8)	28
3.4.9. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hPhe-OMe (9).....	29
3.4.10. <i>Boc</i> - <i>D</i> -hVal-NH ₂ (10).....	29
3.5. Priprava dipeptida tipa <i>Boc</i> -Pro- <i>D</i> -hXaa- <i>R'</i>	30
3.5.1. <i>Boc</i> -Pro- <i>D</i> -hVal-OH (11)	30

3.5.2. <i>Boc-Pro-D-hVal-OMe</i> (12).....	30
3.5.3. <i>Boc-Pro-D-hVal-NH₂</i> (13).....	31
3.5.4. <i>Boc-Pro-D-hPhe-OH</i> (14).....	31
3.5.5. <i>Boc-Pro-D-hLeu-OH</i> (15).....	32
3.6. Deprotekcija dipeptida tipa Boc-Pro-D-hXaa-R'	33
3.6.1. <i>H-Pro-D-hVal-OH</i> (16).....	33
3.6.2. <i>H-Pro-D-hVal-OMe</i> (17).....	33
3.6.3. <i>H-Pro-D-hVal-NH₂</i> (18).....	34
3.6.4. <i>H-Pro-D-hPhe-OH</i> (19).....	34
3.6.5. <i>H-Pro-D-hLeu-OH</i> (20).....	35
3.7. Priprava tripeptida tipa Boc-Pro-Pro-D-hXaa-R'	35
3.7.1. <i>Boc-Pro-Pro-OH</i> (21).....	35
3.7.2. <i>Boc-Pro-Pro-D-hVal-OMe</i> (22).....	36
3.7.3. <i>Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OMe</i> (23).....	37
3.7.4. <i>Boc-Pro-Pro-D-hPhe-OMe</i> (24).....	38
3.7.5. <i>Boc-Pro-Pro-D-hVal-OH</i> (25).....	38
3.7.6. <i>Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OH</i> (26).....	39
3.7.7. <i>Boc-Pro-Pro-D-hVal-NH₂</i> (27).....	40
3.8. Deprotekcija tripeptida tipa Boc-Pro-Pro-D-hXaa-R'	41
3.8.1. <i>H-Pro-Pro-D-hVal-OMe</i> (28).....	41
3.8.2. <i>H-Pro-Pro-D-hLeu-OMe</i> (29).....	41
3.8.3. <i>H-Pro-Pro-D-hPhe-OMe</i> (30).....	42
3.8.4. <i>H-Pro-Pro-D-hVal-OH</i> (31).....	43
3.8.5. <i>H-Pro-Pro-D-hLeu-OH</i> (32).....	43
3.8.6. <i>H-Pro-Pro-D-hVal-NH₂</i> (33).....	44
3.9. Produkti 1,4-adicije aldehida na nitroolefine	45
3.9.1. 2-etil-3-fenil-4-nitrobutanal (34).....	45
3.9.2. 3-fenil-2-metil-4-nitrobutanal (35).....	46
3.9.3. 2-(2-nitro-1-feniletil)pentanal (36).....	48
3.9.4. 2-(2-nitro-1-feniletil)dekanal (37).....	50
3.9.5. 2-benzil-3-fenil-4-nitrobutanal (38).....	52
3.9.6. 3-(2,4-diklorfenil)-2-etil-4-nitrobutanal (39).....	54
3.9.7. 2-etil-3-(4-klorfenil)-4-nitrobutanal (40).....	56
3.9.8. 3-(4-bromfenil)-2-etil-4-nitrobutanal (41).....	58

3.9.9. 2-etil-3-(4-metoksifenil)-4-nitrobutanal (42).....	60
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	63
4.1. Priprava α-hidrazinokiselina	64
4.2. Priprava i katalitička aktivnost dipeptida tipa H-Pro-D-hXaa-R'	67
4.3. Priprava i katalitička aktivnost tripeptida tipa H-Pro-Pro-D-hXaa-R'	69
4.3.1. <i>Probir reakcijskih uvjeta za katalizatore H-Pro-Pro-D-hVal-OMe, H-Pro-Pro-D-hVal-OH i H-Pro-Pro-D-hVal-NH₂</i>	<i>72</i>
4.4. Istraživanje mehanizma katalitičke aktivnosti.....	77
§ 5. ZAKLJUČAK	86
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi).....	88
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	90
§ 8. ŽIVOTOPIS	XIV



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

NOVI PEPTIDI S α -HIDRAZINOKISELINAMA KAO KATALIZATORI U MICHAELOVIM REAKCIJAMA

Ivona Banović

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Početak novog milenija obilježio je novi pravac istraživanja u asimetričnoj katalizi. Teške metale ili enzime zamjenjuju male i lako dostupne organske molekule koje služe kao katalizatori u sintezi kiralnih centara. U skupini Lewisovih baza posebno mjesto zauzima asimetrična enaminska kataliza gdje su široku uporabu našli peptidi i njihovi derivati. U okviru ovog istraživanja sintetizirani su N-terminalni prolilni dipeptidi i tripeptidi s ugrađenom α -hidrazinokiselinom kao potencijalni katalizatori Michaelove adicije aldehida na α,β -nezasićene nitroolefine. α -Hidrazinokiseline pripravljene su iz L-valina, L-leucina i L-fenilalanina, dok je C-terminalni kraj sadržavao karboksilnu skupinu, metilni ester ili amidnu skupinu. Peptidi su pripremljeni sintezom u otopini te su u reakcijama korišteni u obliku TFA soli. Hidrazinska jedinica omogućuje stvaranje dodatnih vodikovih veza i stabilizaciju konformacije β -okreta, što može pozitivno utjecati na prijelazno stanje i katalitička svojstva. Najbolji katalitički učinak u ispitanoj reakciji postignut je s tripeptidom strukture H-Pro-Pro-D-hVal-OMe, koji je korišten kao katalizator u reakcijama s različitim aldehydima i nitroolefinima. Dobiveni produkti pripravljene su uz izvrsne prinose (do 98 %) i visoku enantioselektivnost (do 86 % ee). Na temelju ispitivanja kinetike reakcije FT-IR spektroskopijom i računalne analize reakcijskog mehanizma predložen je mehanizam Michaelove adicije butanala na nitrostiren katalizirane peptidom H-Pro-Pro-D-hVal-OMe.

(94 stranica, 30 slika, 5 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: asimetrična organokataliza / enaminski međuprodukt / α -hidrazinokiselina / Michaelova 1,4-adicija / peptidi

Mentor: dr. sc. Ivanka Jerić, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

Rad prihvaćen: 27. veljače 2026.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. dr. sc. Davor Margetić



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

NEW PEPTIDES WITH α -HYDRAZINO ACIDS AS CATALYSTS IN MICHAEL REACTIONS

Ivona Banović

Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Croatia

The beginning of the new millennium marked the emergence of a new direction in asymmetric catalysis. Heavy metals and enzymes have increasingly been replaced by small, readily accessible organic molecules that serve as catalysts in the synthesis of chiral centers. Within the class of Lewis bases, asymmetric enamine catalysis has gained particular prominence, with peptides and their derivatives finding widespread application. In this study, N-terminal prolyl dipeptides and tripeptides incorporating an α -hydrazino acid were synthesized as potential catalysts for the Michael addition of aldehydes to α,β -unsaturated nitroolefins. The α -hydrazino acids were prepared from L-valine, L-leucine, and L-phenylalanine, while the C-terminus consisted of a carboxylic acid, methyl ester, or amide group. The peptides were synthesized in solution and employed as their TFA salts in the reactions. The hydrazine moiety enables the formation of additional hydrogen bonds and stabilizes a β -turn conformation, which may favorably influence the transition state and catalytic performance. The best catalytic performance in the investigated reaction was achieved with the tripeptide H-Pro-Pro-D-hVal-OMe, which was used as a catalyst in reactions with various aldehydes and nitroolefins. The desired products were obtained in excellent yields (up to 98%) and with high enantioselectivity (up to 86% ee). Based on kinetic studies using FT-IR spectroscopy and computational analysis, a mechanism for the H-Pro-Pro-D-hVal-OMe-catalyzed Michael addition of butanal to nitrostyrene was proposed.

(94 pages, 30 figures, 5 tables, 87 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: asymmetric catalysis / enamine intermediate / α -hydrazino acid / Michael 1,4-addition

Supervisor: Ivanka Jerić, PhD, Senior Scientist

Thesis accepted: 27 February 2026.

Reviewers:

Dr. Vesna Petrović Peroković, Professor

Dr. Željka Soldin, Professor

Dr. Davor Margetić, Senior Scientist

§ 1. UVOD

Enantiomeri su kemijski identične molekulske vrste koje se odnose kao zrcalne slike i često se uspoređuju s lijevom i desnom rukom. Oni predstavljaju poseban slučaj stereoizomera, a njihova je kiralnost određena prostornim rasporedom atoma u molekuli.¹ Dva enantiomera razlikuju se jedino po smjeru zakretanja polariziranog svjetla. Iako identičnih fizikalnih i kemijskih svojstava, dva enantiomera mogu imati potpuno različita biološka svojstva. Mnoge biomolekule su kiralne, što ukazuje na to da je svojstvo kiralnosti vrlo važno u brojnim prirodnim procesima. Primjer su enzimi u živim sustavima, u čije kiralno aktivno mjesto obično pristaje samo jedan od enantiomera. Primjerice, lijevozakrećući oblik adrenalina jedan je od glavnih hormona koje luči srž nadbubrežne žlijezde. Kada se sintetički adrenalin aplicira pacijentu, (–) oblik ima isto stimulativno djelovanje kao i prirodni hormon. Drugi, (+) oblik ne pokazuje isto djelovanje i blago je toksičan.² U slučaju ibuprofena, lijeka protiv bolova, samo je (*S*)-enantiomer odgovoran za korisne učinke dok (*R*)-enantiomer nije učinkovit.³ Slijedom navedenoga, više je nego jasno koliko je važna priprava enantiomerno čistih spojeva pogotovo kada je riječ o farmaceutskoj industriji. Djelovanje lijekova ovisi o tome koji se enantiomer koristi. Nažalost, današnja je tehnologija daleko od savršenstva prirode, a sintetske metodologije koje smo razvili uglavnom su rijetko učinkovite i enantioselektivne.

Potreba za enantiomerno čistim produktima dovodi asimetričnu sintezu u fokus različitih grana kemijskih istraživanja. U samim začetcima asimetrične sinteze koristili su se katalizatori na bazi metala i biokatalizatori (enzimi).⁴ Tek je nedavno otkriven potencijal malih organskih molekula kao enantioselektivnih katalizatora. Od posebnog su značaja ne samo visoka iskorištenja, već i visoke enantioselektivnosti i diastereoselektivnosti takvih reakcija. U usporedbi s enzimskom i organometalnom katalizom, organokataliza ima nekoliko važnih prednosti: općenito, organokatalizatori se mogu koristiti u širem rasponu otapala i za širi spektar supstrata u usporedbi s enzimima. Osim toga, obično su manje toksični i manje osjetljivi na oksidaciju i vlagu od većine organometalnih reagenasa.⁵ Sposobni su aktivirati različite funkcijske skupine, ne zahtijevaju posebne reakcijske uvjete (npr. inertnu atmosferu), stabilni su na zraku, a prema potrebi vrlo lako podliježu strukturnim modifikacijama. Međutim, veliki nedostatak organokatalizatora je njihova niska katalitička aktivnost, koja često zahtijeva 10 mol % ili više katalizatora po reakciji.⁶⁻⁹

Potaknuta dosad neviđenim interesom za razvoj novih organokatalizatora, organokataliza je do danas postala priznata metodologija, te se smatra trećim stupom asimetrične sinteze uz metalo-katalizirane reakcije i reakcije katalizirane enzimima.¹⁰ Velik broj raznovrsnih istraživanja u ovom relativno novom području organske asimetrične sinteze otvorio je potpuno novi pristup složenoj molekularnoj arhitekturi, pružajući kemičarima novi moćni sintetski alat.¹¹

U posljednjim godinama, peptidi su postali sve popularniji kao asimetrični katalizatori za niz važnih organskih reakcija. Kao visoko modularne molekularne platforme, peptidi su prikladni za raznovrsne modifikacije i transformacije koje olakšavaju njihovu strukturnu i funkcionalnu raznolikost. Inspirirani učinkovitošću i selektivnošću prirodnih enzima, tijekom posljednjih 20 godina razvijeni su mnogi uspješni peptidni katalizatori.

Stereoselektivno stvaranje C–C veza jedna je od najkorisnijih reakcija za izgradnju složenih spojeva iz jednostavnih sintetskih blokova, stoga i ne čudi interes za razvojem peptidnih katalizatora za ove izazovne reakcije. Do danas, dipeptidi i tripeptidi s prolinskom aminokiselinom na N-kraju predstavljaju većinu uspješnih peptidnih katalizatora za aldolne reakcije i konjugirane adicije aldehida i ketona na aktivirane olefine.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ove disertacije je priprava i karakterizacija peptidnih katalizatora koji u svojoj strukturi sadrže neproteinogenu α -hidrazinokiselinu te istraživanje njihova katalitičkog potencijala u reakcijama Michaelove adicije.

Hipoteza istraživanja temelji se na ideji da će α -hidrazinokiselina imati utjecaj na konformaciju peptidnog lanca. Naime, zbog prisutnosti dodatne amino-skupine takvi katalizatori imat će mogućnost formiranja vodikovih veza (donor i akceptor) čime se inducira konformacija β -okreta što se pokazalo ključnim za stabilizaciju peptida u prijelaznom stanju i njegovoj katalitičkoj aktivnosti i selektivnosti.

Provedena istraživanja uključuju:

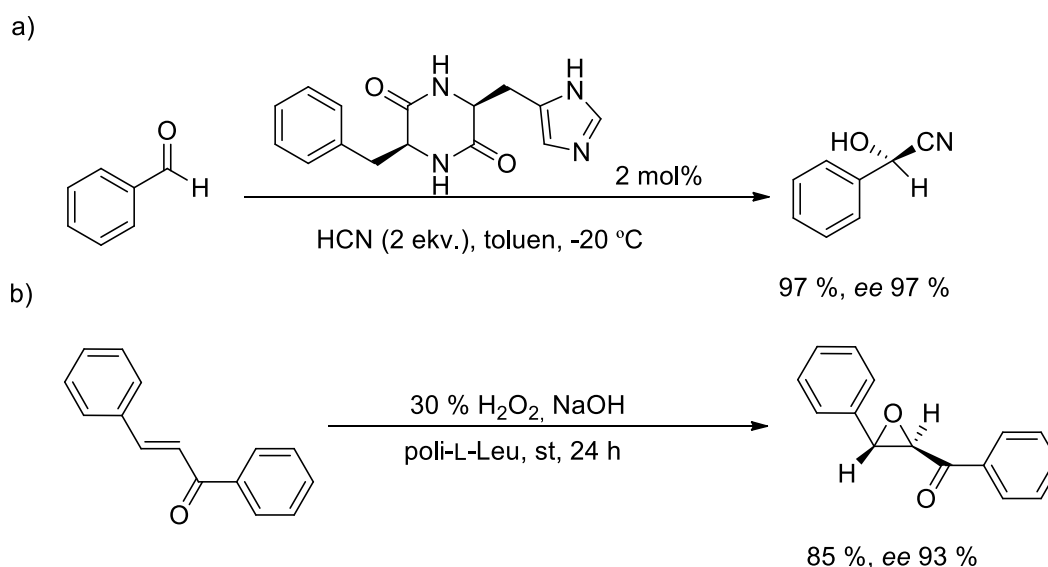
1. optimizaciju metodologije za pripravu optički čistih hidrazinoderivata α -aminokiselina,
2. optimizaciju metodologije za pripravu dipeptida i tripeptida s ugrađenom α -hidrazinokiselinom,
3. ispitivanje katalitičkog potencijala pripremljenih katalizatora u reakcijama Michaelove adicije; probir reakcijskih uvjeta i supstrata,
4. prijedlog reakcijskog mehanizma.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Asimetrična kataliza s peptidnim katalizatorima

Kratki peptidi, koji se sastoje od manje od deset aminokiselina, po strukturnoj složenosti mogu se svrstati negdje između malih rigidnih organokatalizatora, poput prolina i njegovih derivata te visoko složenih enzima. Unatoč brojnim prednostima peptidnih katalizatora, njihova inherentna fleksibilnost često ometa specifične interakcije između katalizatora i supstrata. Ova ograničenja mogu se prevladati uvođenjem neproteinogenih aminokiselina, konformacijskih ograničenja ili donora i akceptora vodikovih veza.¹²

Već početkom 1980-ih objavljeni su prvi primjeri peptida koji u asimetričnoj katalizi ostvaruju visoku enantioselektivnost. Diketopiperazin *ciklo*(Phe-His) pokazao se učinkovitim kao katalizator za adiciju cijanovodika na benzaldehid¹³, dok su se polimeri leucina i alanina pokazali uspješnima kao asimetrični katalizatori za epoksidaciju halkona^{14,15} (Shema 1.).

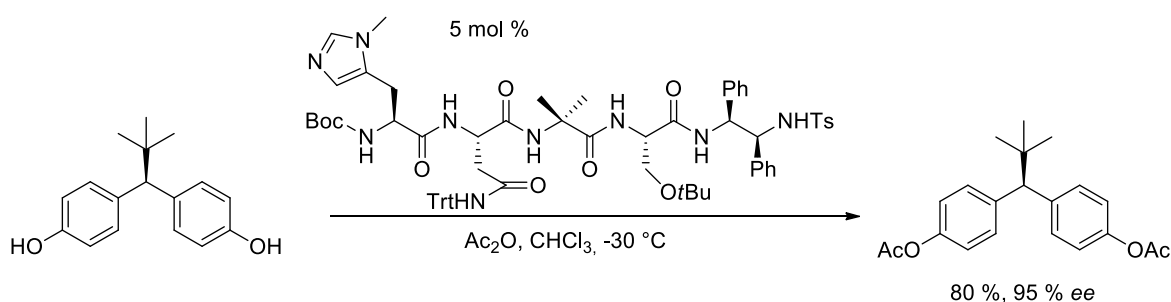


Shema 1. Prvi primjeri uporabe peptida kao katalizatora: a) reakcija adicije cijanovodika na benzaldehid katalizirana diketopiperazinom¹³; b) epoksidacija halkona katalizirana polimerom leucina.¹⁴

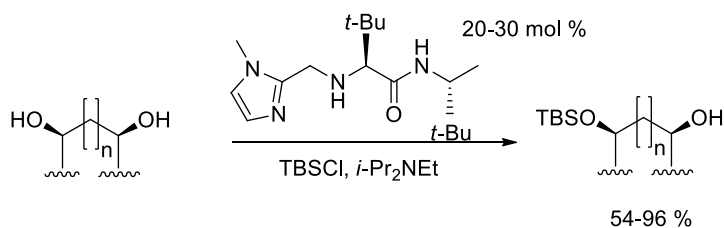
Posljednjih godina, peptidi su postali sve popularniji kao asimetrični katalizatori za niz važnih organskih reakcija, često omogućujući dobivanje željenih produkata u blagim uvjetima

reakcije s visokim prinosima i selektivnostima. Važni primjeri takvih reakcija u kojima su korišteni kratki peptidi s konformacijom β -okreta, koji sadrže metilimidazol jesu primjerice. selektivne acilacije¹⁶⁻¹⁸ (Shema 2.a), reakcije međusobnog spajanja aldehida i acilimina (Stetterove reakcije)¹⁹, sililacije²⁰ (Shema 2.b), sulfonilacije²¹, fosforilacije²², reakcije adicije HCN na imine (Streckerove reakcije)²³, acil-Pictet-Spenglerove reakcije²⁴ (Shema 2.c) i reakcije hidrolize estera.²⁵

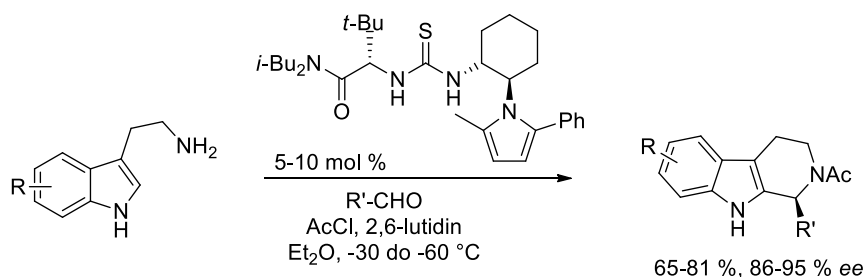
a)



b)



c)



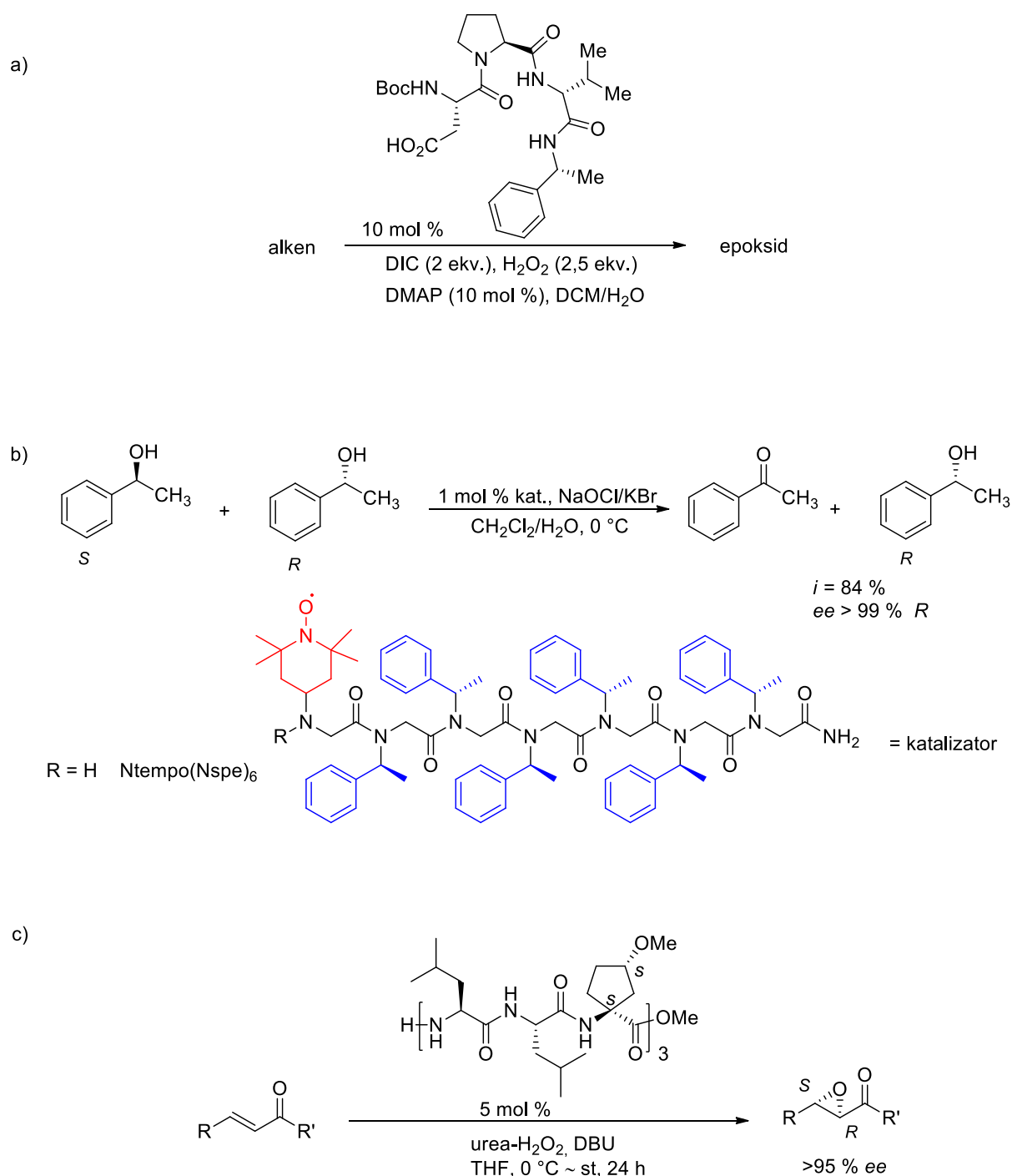
Shema 2. Primjeri reakcija kataliziranih peptidima: a) Desimetrizacija selektivnom acilacijom¹⁸; b) Enantioselektivna sililna zaštita alkohola katalizirana katalizatorom na bazi imidazola²⁰; c) Enantioselektivna Pictet-Spenglerova reakcija katalizirana katalizatorom na bazi tiouree.²⁴

Miller i suradnici 2007. godine koristili su peptide koji sadrže strukturu β -okreta i asparaginsku kiselinu za epoksidaciju cikličkih alkena. Prinosi reakcija bili su 73–99 %, a enantioselektivnost 8–92 % uz količinu katalizatora od 10 mol% (Shema 3.a).²⁶

Godine 2009. Galia Maayan i suradnici pripravili su biblioteku sintetičkih „peptoidnih“ oligomera, helikalne konformacije, koje su koristili za oksidaciju 1-feniletanola (Shema 3.b). U istraživanju usmjerenom na razjašnjavanje ključnih odnosa između strukture i funkcije, otkrili su da enantioselektivnost katalitičkih peptoida ovisi o smjeru asimetričnog okruženja proizašlog iz uzvojnice, položaju katalitičkog centra duž peptoidne okosnice i stupnju konformacijskog uređenja peptoidne uzvojnice. Uz samo 1 mol % katalizatora zabilježene su konverzije 22–86 % i enantioselektivnosti > 99 %. Posebno jakom oksidacijskom aktivnošću istaknuli su se peptoidni katalizatori koji sadrže 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oksilnu (TEMPO) skupinu, o čemu kasnije izvještavaju i Müller i suradnici.

Iste godine Gellman i suradnici izvještavaju o katalizatorima tipa foldamera s aktivnošću aldolaze temeljenom na β -aminokiselinama. β -peptidi su zanimljivi u ovom kontekstu jer stvaraju različite stabilne sekundarne strukture, uključujući uzvojnice, ploče i okrete. Njihove predvidive strukture iskorištene su za inhibiciju mikrobnog rasta, ometanje interakcija između proteina te za mnoge druge primjene.²⁹

Nagano i suradnici 2010. godine dizajnirali su kiralne oligopeptidne katalizatore koji sadrže α -aminokiseline za enantioselektivnu epoksidaciju α,β -nezasićenih ketona (Shema 3.c). Korištenjem 5 mol % katalizatora, postignuti su visoki prinosi i visoka enantioselektivnost.³⁰



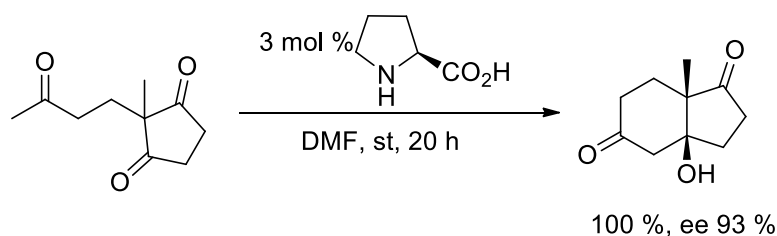
Shema 3. a) Epoksidacija cikličkih alkena katalizirana peptidnim katalizatorom s asparaginskom kiselinom²⁶; b) Oksidacija 1-feniletanola pomoću peptoidnog katalizatora s TEMPO skupinom²⁷; c) Enantioselektivna epoksidacija α,β -nezasićenih ketona oligopeptidnim katalizatorima.³⁰

2.2. Asimetrična kataliza u reakcijama formiranja C–C veze

Stereoselektivno stvaranje C–C veze u reakcijama poput klasične aldolne reakcije, Michaelove adicije, Diels–Alderove reakcije itd., jedna je od najkorisnijih transformacija u području sintetske organske kemije, stoga i ne čudi da su razvijeni različiti organski katalizatori za ove izazovne reakcije.

Prema mehanizmu djelovanja, organokatalizatori se dijele na Lewisove kiseline i baze te Brønstedove kiseline i baze.⁵ U skupini reakcija u kojima su Lewisove baze katalizatori posebno mjesto zauzima asimetrična enaminska kataliza, odnosno elektrofilne supstitucijske reakcije na α -položaju karbonilnih spojeva koje su katalizirane primarnim i sekundarnim aminima preko enaminskog međuprodukta.³⁰

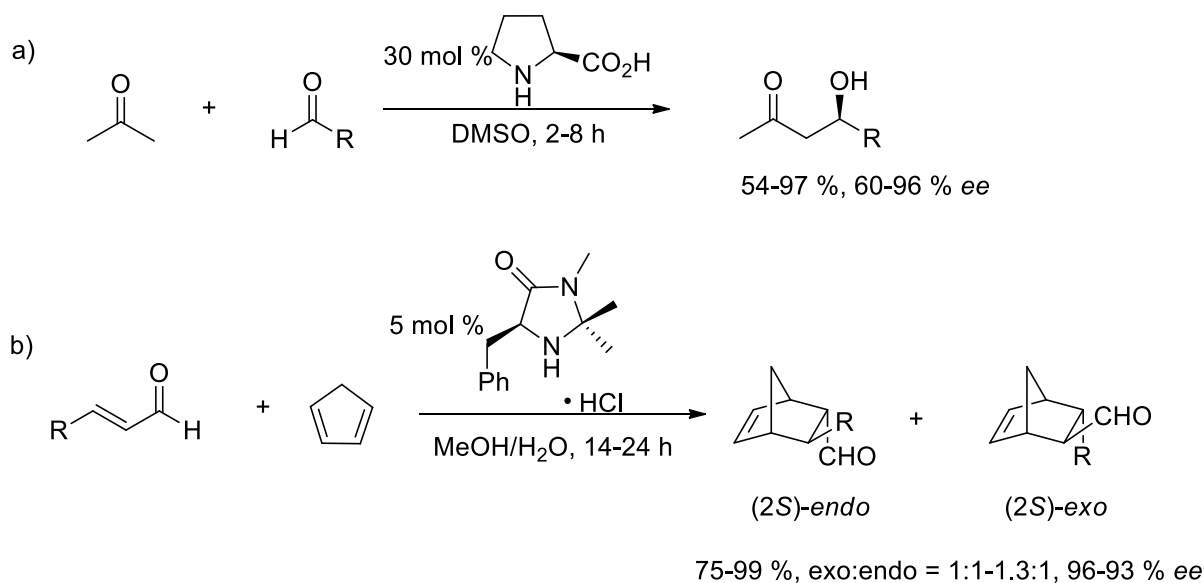
Početkom 1970-ih godina zabilježena je prva katalitička primjena enamina. Bila je to reakcija Robinsonove anelacije akiralnog triketona katalizirana aminokiselinom prolin (Hajos–Parrish³¹–Eder–Sauer–Wiechert³² reakcija). Produkt je dobiven u visokom prinosu i s visokom razinom enantioelektivnosti (Shema 4.).



Shema 4. Hajos–Parrish–Eder–Sauer–Wiechert reakcija^{31,32}

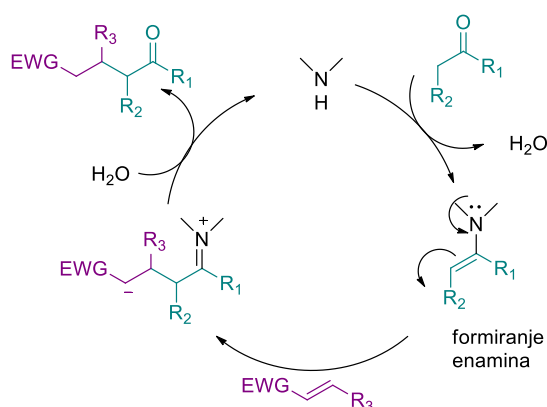
Puni zamah razvoju asimetrične katalize dala su istraživanja njemačkog znanstvenika Benjamina Lista i škotskog znanstvenika Davida MacMillana 2000. godine. Njihova neovisna otkrića pokazala su da aldehidi ili ketoni mogu biti aktivirani uporabom malih organskih molekula kao katalizatora za asimetrične transformacije. List je objavio da aminokiselina L-prolin katalizira intermolekularne enantioselektivne aldolne reakcije aktiviranjem acetona putem enamina (Shema 5.a).³³ U isto vrijeme MacMillan i suradnici objavili su uspješan iminijev tip katalize asimetrične Diels–Alderove reakcije korištenjem kiralnog imidazolidinona

(Shema 5.b).³⁴ Do danas je pripremljen i u brojnim organokatalitičkim reakcijama uspješno korišten velik broj analoga prolina.



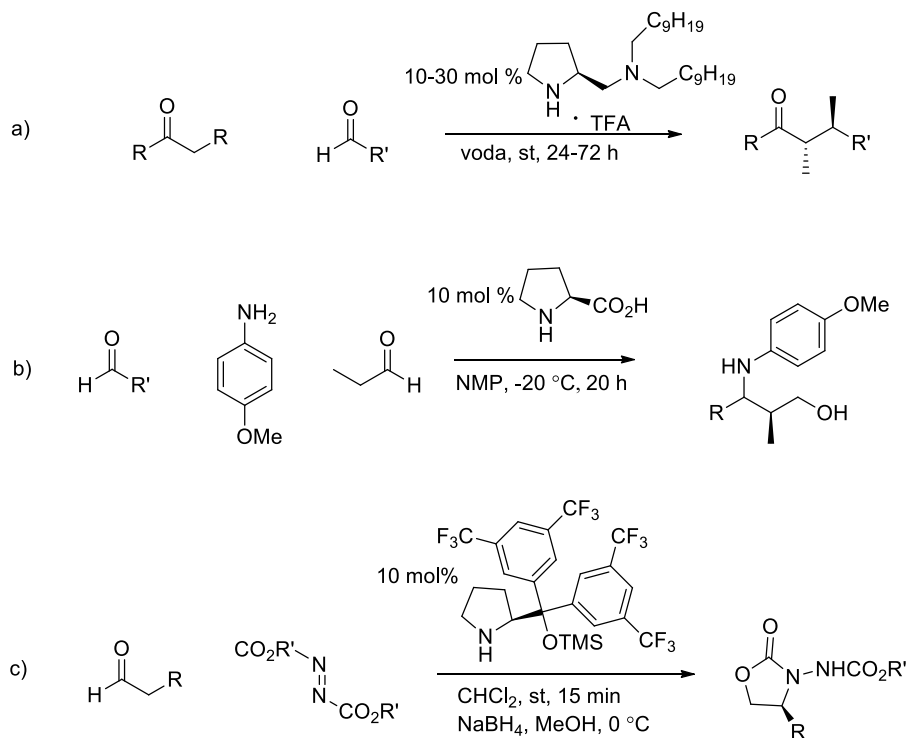
Shema 5. a) Asimetrična aldolna reakcija katalizirana prolinom³³; b) Diels-Alderova reakcija katalizirana imidazolidinonom.³⁴

U enaminskom katalitičkom ciklusu aldehid ili keton reagira s katalizatorom, pri čemu nastaje enamin čija je HOMO orbitala više energije od HOMO orbitale karbonilnog spoja, stoga nastali enamin napada elektrofil pri čemu nastaje imin. Hidrolizom imina se oslobađa produkt adicije, a katalizator se regenerira (Shema 6.).



Shema 6. Aktivacija enamina sekundarnim aminom; EWG = elektron odvlačeća skupina (engl. *electron-withdrawing group*)

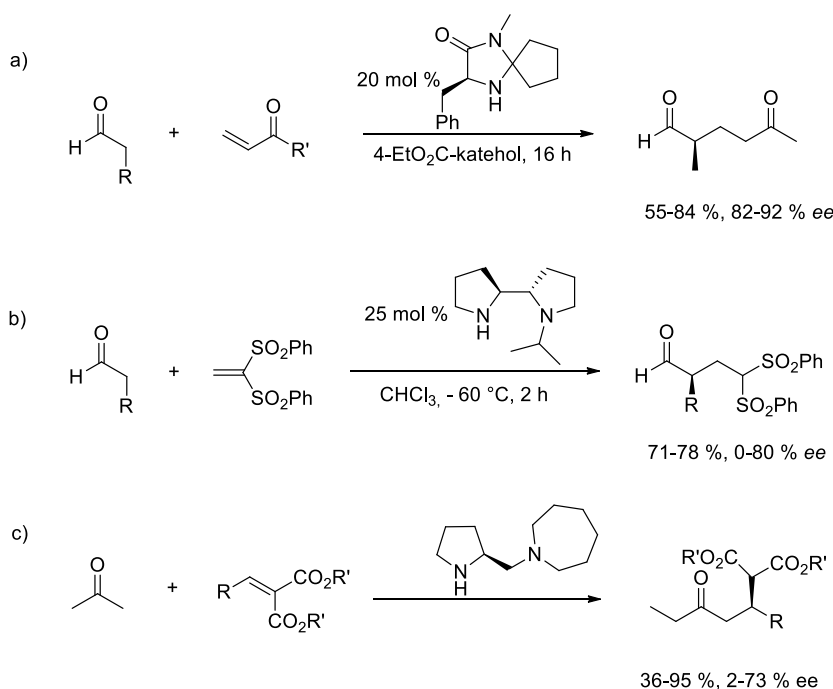
Primjeri organokatalitičkih reakcija koje uključuju aktivaciju enaminom su aldolna, Mannichova, Michaelova i hetero Michaelova reakcija kao i α -funkcionalizacija karbonilnih spojeva (Shema 7.).³⁰



Shema 7. Primjeri organokatalitičkih reakcija koje uključuju aktivaciju enaminom: a) aldolna reakcija³⁵; b) trikomponentna Mannichova reakcija³⁶; c) α -aminacija aldehida.³⁷

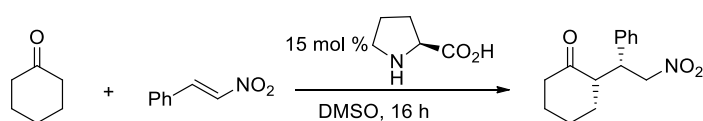
2.2.1. Konjugirana adicija aldehida na nitroolefine katalizirana enaminima

Reakcija konjugirane adicije nukleofila na β -položaj α,β -nezasićenih spojeva od iznimne je važnosti u organskoj sintezi. Posljednjih godina pripremljeni su mnogi katalizatori za reakcije između aldehida ili ketona i različitih Michaelovih akceptora, poput nitrostirena³⁸, enona³⁹ i vinil sulfona⁴⁰ ili alkiliden malonata⁴¹ (Shema 8.).



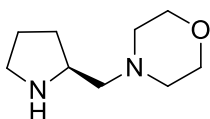
Shema 8. Primjeri enaminom katalizirane konjugirane adicije između aldehida ili ketona i različitih Michaelovih akceptora: a) enona³⁹; b) vinil-sulfona⁴⁰ i c) alkiliden-malonata⁴¹

Trans- β -nitrostiren može se ponašati kao reaktivni elektrofil zbog čega je izvrstan Michaelov akceptor. Prvi primjer ovakve reakcije proveden je između cikloheksanona i nitrostirena uz aminokiselinu L-prolin kao katalizator. Michaelov adukt dobiven je s visokim prinosom (94 %) i visokom dijastereoselektivnošću (d.r. > 20:1). Međutim, enantioselektivnost je ostala niska (*ee* 23 %) unatoč molarnom postotku katalizatora od 15 mol % (Shema 9.).³⁸

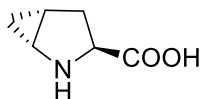


Shema 9. Prolinom katalizirana 1,4-adicija cikloheksanona na nitrostiren³⁸

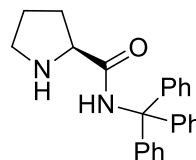
Korisnija od adicije ketona na nitroolefine je reakcija adicije aldehida kojom dobiveni kiralni γ -nitroaldehidi mogu biti važni gradivni blokovi za daljnje transformacije u npr. kiralne piperidine⁴¹⁻⁴⁵, γ -butirolaktone⁴⁶, γ -aminokiseline^{44,47} ili tetrahidropirane⁴⁸. Navedena reakcija pokazala se i kao ključan korak u razvoju dominoreakcija.⁴⁹⁻⁵¹ Shodno tome, cilj mnogih istraživačkih skupina postaje pronalaženje što efikasnijeg organokatalizatora za navedenu reakciju. Preliminarna istraživanja u ovom području proveo je 2001. godine Barbas reakcijom 1,4-adicije aldehida na aromatske nitroolefine uporabom piperidinskog katalizatora funkcionaliziranog piperidinom uz enantioselektivnost od 78 %.⁴² Međutim, nedostacima poput niske katalitičke aktivnosti i vrlo uskog spektra supstrata još uvijek se nije doskočilo. Osim toga, reakcije traju dugo i zahtijevaju veliki suvišak aldehida (do 10 ekv.) kako bi se smanjila mogućnost odvijanja neželjenih paralelnih reakcija (Slika 1.).

Barbas, 2001.⁴²

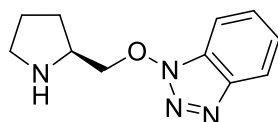
20 mol %
42-96 %
dr = 6:1-49:1
56-78 % *ee*

Yu, 2014.⁵²

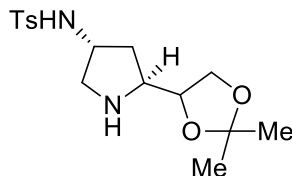
5 mol %
88-99 %
dr = 97/3
94-98 % *ee*

Wang, 2014.⁵³

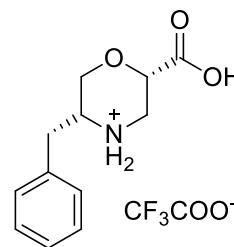
10 mol %
79-93 %
dr = 57/43-99/1
89-99 % *ee*

Pavan Kumar, 2017.⁵⁴

20 mol %
69-95 %

Castán, 2018.⁵⁵

10 mol %
98-100 %

Vaghi, 2023.⁵⁶

1-5 mol %
38-95 %

dr = 6:4-85:15
74-93 % ee

dr = 98/2
75-97 % ee

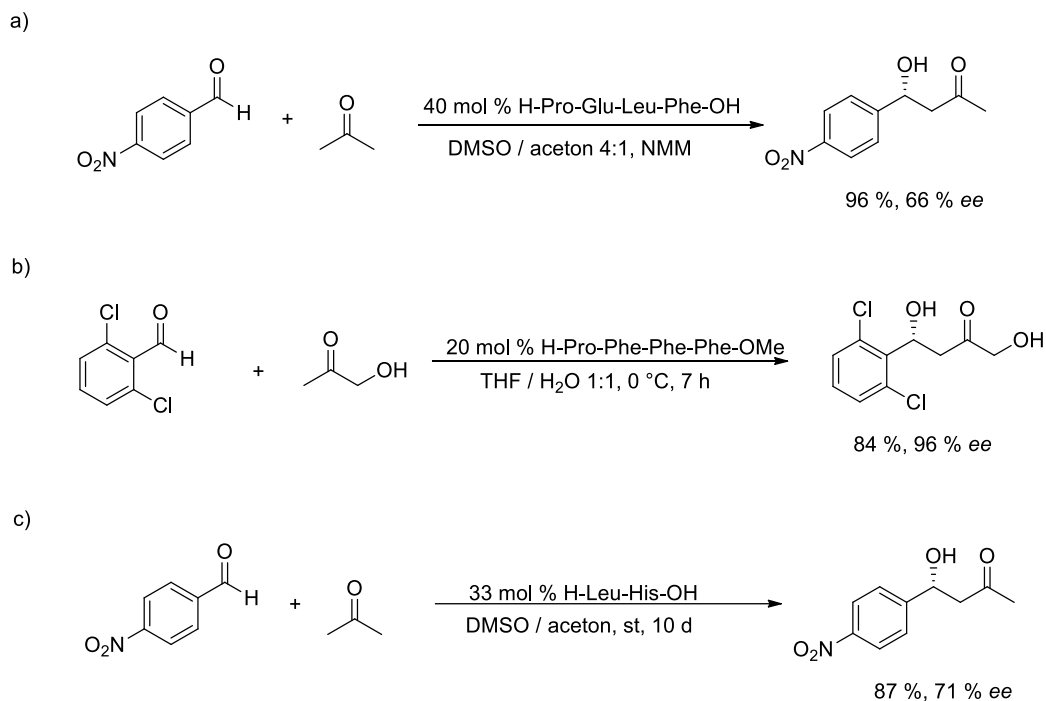
dr = 89-99 %
35-99 % ee

Slika 1. Primjeri katalizatora razvijenih za reakciju konjugirane adicije aldehida na nitroolefine

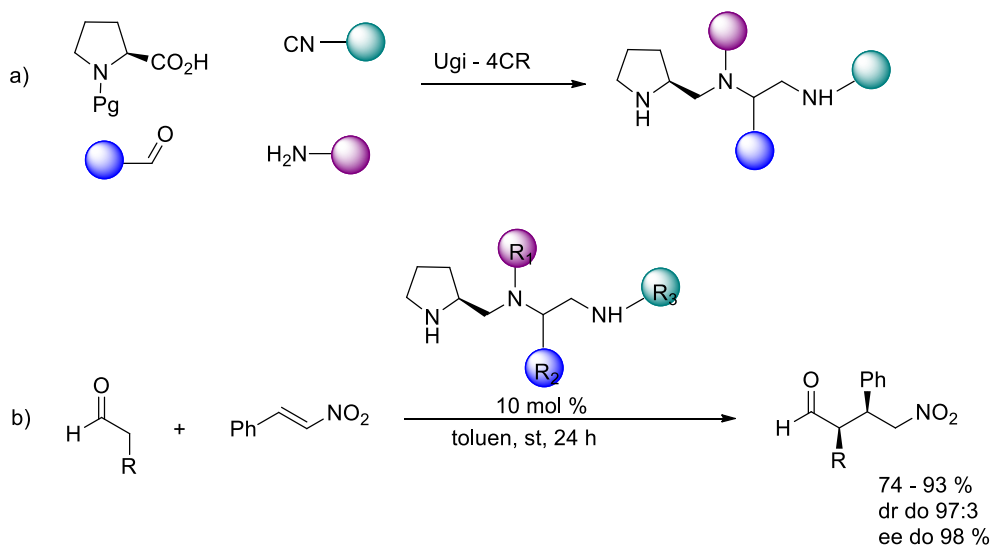
2.3. Peptidni katalizatori u reakcijama formiranja C-C veza

Uzimajući u obzir važnost enaminske katalize, velika je pažnja posvećena peptidnim katalizatorima za jednu od najvažnijih reakcija za stvaranje ugljik-ugljik veza, asimetričnu aldolnu reakciju. Iako se prolin i njegovi derivati mogu primijeniti kao organokatalizatori za ovu transformaciju, priroda koristi enzim aldolazu tipa I za ovaj zadatak. U oba slučaja, mehanizam se temelji na formiranju enaminskog međuprodukta. Kombiniranjem najboljih svojstava ovih dvaju sustava, mnoge istraživačke skupine usmjerile su svoj rad na razvoj peptidnih katalizatora za asimetrične aldolne reakcije. Predstavljani su brojni kratkolančani peptidi koji sadrže sekundarnu aminoskupinu na N-terminusu (Shema 10. a i b).⁵⁷⁻⁵⁹ Također su poznati primjeri određenih aldolnih reakcija kataliziranih peptidima s primarnim aminima na N-terminusu (Shema 10. c).⁶⁰⁻⁶²

Paixão i suradnici 2013. godine pripravili su nove prolilne peptid-peptoidne hibridne katalizatore uporabom četverokomponentne Ugijeve reakcije (Shema 11.a). Generička sekvenca katalizatora bila je Pro-N-R₁-Xaa-NHR₃, pri čemu je Xaa = Gly (R₂ = H) ili Aib (R₂ = Me), a R₁ i R₃ alkilni ili aminokiselinski supstituenti. Tijekom pripreme katalizatora izmjenjivale su se amino-, okso- i izocijanidne komponente. Katalizatori su ispitani u reakciji asimetrične adicije aldehida na nitroolefine, gdje je većina katalizatora pokazala visoku enantio- i diastereoselektivnost (Shema 11.b).⁶³ Do danas, dipeptidi i tripeptidi s prolinom na N-kraju predstavljaju većinu uspješnih peptidnih katalizatora za aldolne reakcije i konjugirane adicije aldehida i ketona na aktivirane olefine.



Shema 10. Primjeri aldolnih reakcija kataliziranih peptidima: a) i b) Peptidi sa sekundarnim aminom na N-terminusu^{57,58}; c) Peptid s primarnim aminom na N-terminusu⁶¹.



Shema 11. a) Višekomponentna strategija za dobivanje novih prolilnih peptid-peptoidnih hibridnih katalizatora; b) Asimetrična Michaelova reakcija katalizirana peptid-peptoidnim hibridom⁶³

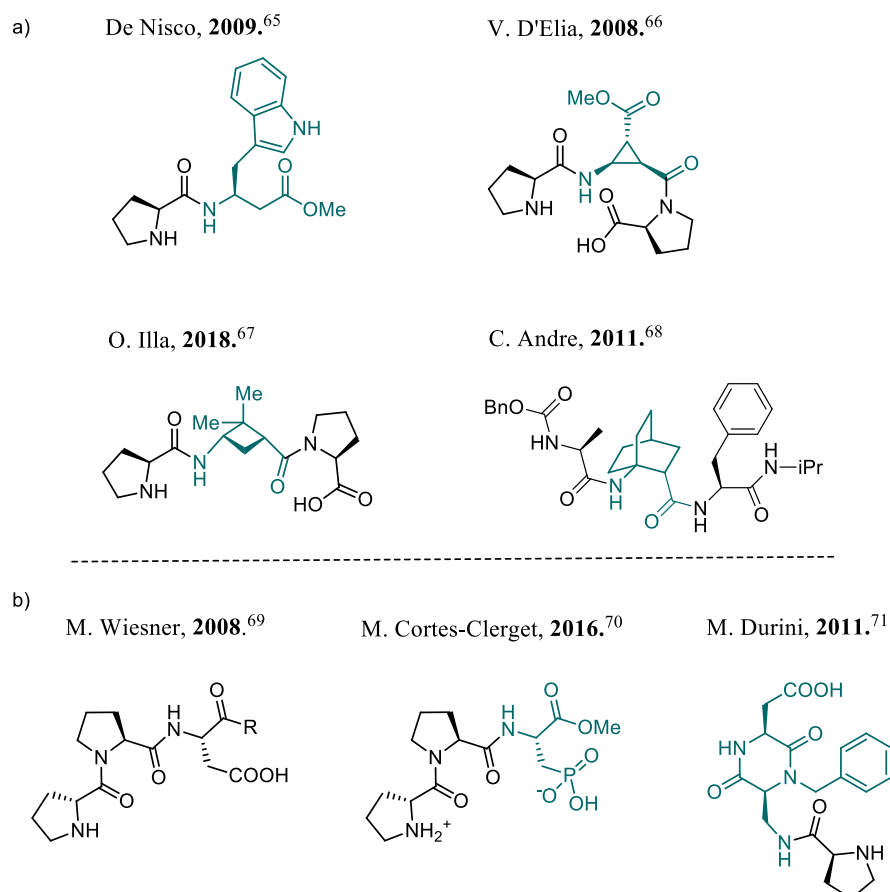
Ova istraživanja općenito pokazuju da kratki peptidi mogu funkcionirati kao asimetrični katalizatori, ali niska katalitička aktivnost ostaje glavni problem u većini primjera jer fleksibilnost peptida često otežava specifične interakcije između katalizatora i supstrata. Sintetskom izazovu doskočilo se uvođenjem neproteinogenih aminokiselina ili donora i akceptora vodikovih veza u strukturu peptida. Dobiveni su peptidni katalizatori sa strukturno ograničenim konformacijama i funkcijskim skupinama koje mogu djelovati zajedno kako bi formirale precizne nekovalentne interakcije sa supstratima.⁶⁴ Primjerice, De Nisco i suradnici dizajnirali su Pro-dipeptide s različitim β -aminokiselinama na drugoj poziciji te utvrdili da katalizator Pro- β^3 -Trp-OMe (Slika 2.a) sa slobodnim indolnim bočnim lancem daje najbolje rezultate u aldolnoj reakciji između 4-nitrobenzaldehida i cikloheksanona.⁶⁵ Raznolike neproteinogene aminokiseline korištene su za rigidifikaciju kratkih peptidnih katalizatora. Primjerice, tripeptidi s uključenom β -aminociklopropilkarboksilnom kiselinom (β -Acc)⁶⁶, *cis*-ciklobutanskom γ -aminokiselinom (*cis*- γ -Cbaa)⁶⁷ ili 2-aminobiciklo[2.2.2]oktanskom karboksilnom kiselinom (Aboc) katalizirali su aldolnu reakciju između acetona i 4-nitrobenzaldehida s visokom enantioselektivnošću (Slika 2.a).⁶⁸

Na temelju racionalnog dizajna i primjene kombinatorne sinteze, Wennemers i suradnici identificirali su peptide tipa Pro-Pro-Xaa-NH₂ s konformacijom β -okreta kao učinkovite enaminske katalizatore za aldolnu reakciju i reakcije konjugirane adicije (Slika 2.b).⁶⁹ Istraživanja primarne sekvence otkrila su da stereogeni N-terminalni Pro-centar kontrolira enantioselektivnost, dok preostale aminokiseline omogućuju visoku katalitičku učinkovitost. Međutim, prisutnost kiselih bočnih lanaca, poput Asp ili Glu, pokazala se ključnom za koordinaciju i orijentaciju supstrata. Na temelju ovih saznanja Wennemers i suradnici uspješno su optimizirali strukturu katalizatora za zahtjevnije reakcije konjugirane adicije α,β -disupstituiranih nitroolefina i sterički ometanih β,β -disupstituiranih nitroolefina.⁶⁹

Lecouvey i suradnici dodatno su proširili ovaj koncept pripremom tripeptida s fosfonskom kiselinom na C-terminalnom ostatku (Slika 2.b) te su otkrili da je monodeprotonirani oblik katalizatora bio najučinkovitiji u asimetričnoj konjugiranoj adiciji aldehida na nitroolefine.⁷⁰

Piarulli i suradnici istražili su učinke konformacijskih ograničenja i stereokemije na učinkovitost prolinskih katalizatora koristeći seriju diastereomernih diketopiperazina (Slika

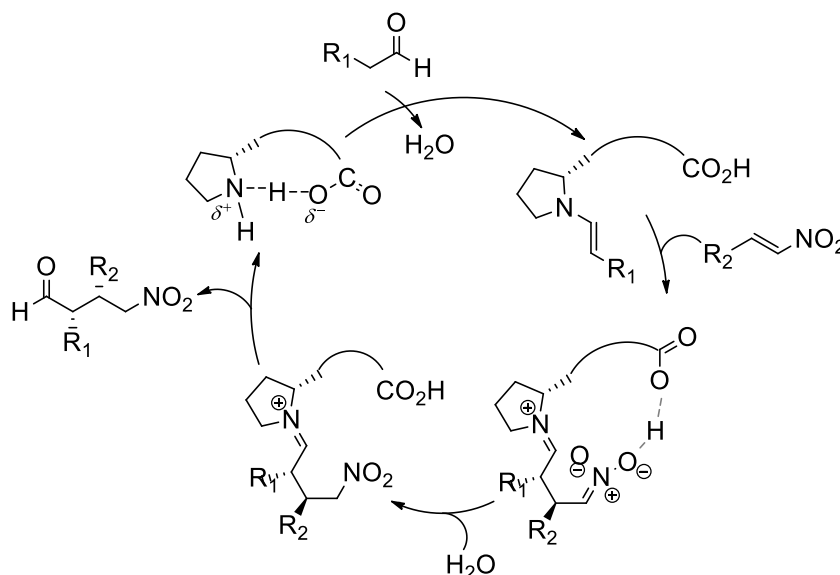
2.b). Utvrđeno je da diketopiperazini s pridruženim D-Pro ostatkom pokazuju bolju selektivnost od onih s L-Pro. Taj je trend zabilježen za nekoliko različitih supstrata.⁷¹



Slika 2. Odabrani primjeri kratkih peptidnih katalizatora za: a) aldolnu reakciju^{65,66,67,68} i b) reakciju konjugirane adicije^{69,70,71}

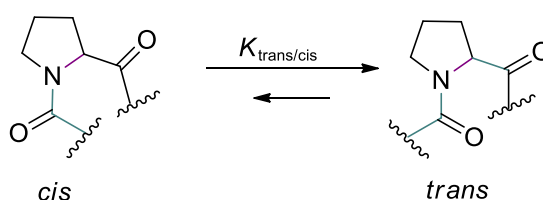
Wennemers i suradnici su 2018. godine objavili istraživanje vezano uz konformaciju visoko reaktivnog i stereoselektivnog peptidnog katalizatora H-D-Pro-Pro-Glu-NH₂. Autori su utvrdili da se tripeptid u osnovnom stanju nalazi u konformaciji β -okreta, dodatno stabiliziranoj pomoću triju vodikovih veza koje se kooperativno formiraju između funkcijskih skupina unutar tripeptida. Nasuprot tome, konformacija enamina je znatno fleksibilnija. Kao glavni ključ za prelazak između rigidnosti i fleksibilnosti peptidnog katalizatora pokazala se COOH skupina u bočnom lancu ostatka glutaminske kiseline, koja djeluje kao poklopac koji se može otvarati i

zatvarati (Shema 12.). Iz navedenog proizlazi da se peptidni katalizator može prilagoditi strukturnim zahtjevima međuprodukata i prijelaznih stanja u katalitičkom ciklusu. Ova saznanja mogu objasniti robusnost i visoku reaktivnost peptidnog katalizatora, koja nadmašuje onu drugih organokatalizatora temeljenih na sekundarnim aminima.⁷²



Shema 12. Uloga bočnog lanca glutaminske kiseline u regulaciji konformacije peptidnog katalizatora..

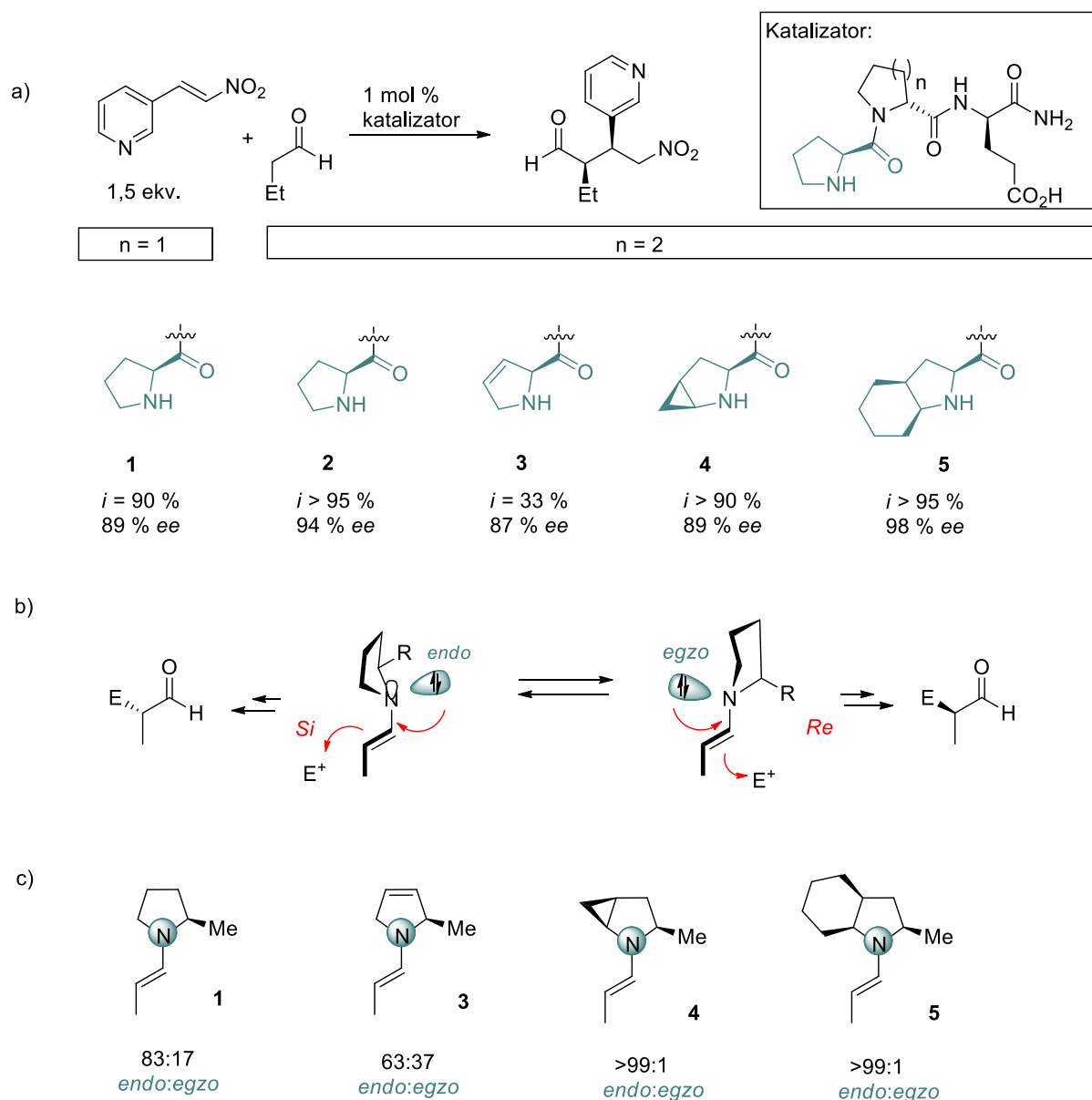
Ista grupa utvrdila je da omjer *trans/cis* tercijarne amidne veze ima značajan utjecaj na stereokemijski ishod reakcija kataliziranih peptidima tipa H-Pro-Pro-Xaa-NH₂ (Slika 3.). Rezultati su pokazali kako veća enantioselektivnost postoji u svim ispitanim otapalima s većim omjerom *trans/cis* konformera katalizatora. Studija na peptidnom katalizatoru H-D-Pro-Pro-Glu-NH₂ pokazala je da supstituenti na C γ konfiguriranom 4S u srednjem položaju usmjereni prema aktivnom mjestu imaju značajan utjecaj na katalitičku učinkovitost tako što povećavaju *trans/cis* omjer Xaa-Pro amidne veze.⁷³



Slika 3. *trans/cis* ravnoteža amidne veze Xaa-Pro⁷³

Vrlo vrijednima pokazale su se reakcije stereoselektivnog, organokatalitičkog formiranja C–C veza koje toleriraju N-heterocikličke strukture jer su ti motivi česti u brojnim kiralnim bioaktivnim spojevima. Međutim, takve transformacije vrlo su izazovne jer N-heterociklički motivi mogu ometati katalitičku reakciju. Wennemersova i suradnici predstavili su peptid H-Oic-D-Pip-D-Glu-NH₂ (Oic = oktahidroindol-2-karboksilna kiselina) koji katalizira reakcije konjugirane adicije između aldehida i nitroolefina koji sadrže širok raspon različitih N-heterocikličkih motiva. Konformacija ovog peptidnog katalizatora bila je prilagođena do te mjere da je dovoljno robusna prema supstratima koji sadrže vrlo zahtjevne funkcijske skupine, različite vrste kemijskih veza te nezaštićene i zasićene N-heterocikličke spojeve. Kao rezultat, dobiveni su sintetski γ -nitroaldehidi s različitim N-heterocikličkim motivima u visokim prinosima i stereoselektivnostima uz samo 0,1 – 2 mol % katalizatora (Shema 13.a). Rezultati također ukazuju na to da je za postizanje visoke stereoselektivnosti od velikog značaja bila *endo*-piramidalizacija enaminskih intermedijera. Enamini s *endo*-piramidaliziranim dušikom, kod kojih se nevezna orbitala (n) nalazi na istoj strani kao i C α supstituent katalizatora, reagiraju brže od enamina s *egzo*-piramidaliziranim dušikom (Shema 13.b i c).⁷⁴

Wennemers i suradnic 2022. godine izvjestili su da su se prethodno navedeni katalizatori pokazali vrlo uspješnima i u reakcijama između aldehida supstituiranih heteroaromatskim supstituentima i nitroolefina. Alkilni supstituenti na N-terminalnom prolinu katalizatora pokazali su se ključnima za postizanje visokih prinosa (61–95 %) i enantioselektivnosti (89–98 % *ee*).⁷⁵

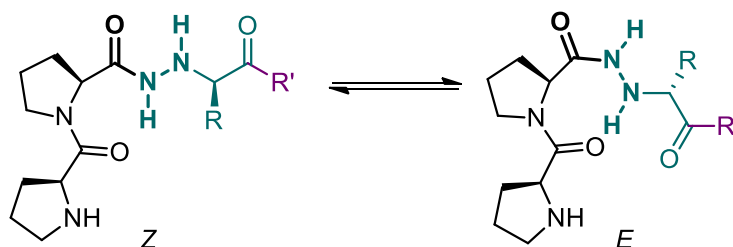


Shema 13. a) Reakcija konjugirane adicije butanala i (*E*)-3-(2-nitrovinil)piridina katalizirana peptidnim katalizatorima 1–5; b) Utjecaj *endo/egzo*-piramidalizacije enaminskog dušika na stereokemijski ishod reakcije; c) *Endo/egzo* omjeri enamina⁷⁴

Iz prethodno navedenih primjera više je nego jasno kako peptidi kao katalizatori predstavljaju izvanredan primjer kako se biološki inspirirani dizajn može primijeniti za rješavanje izazova u modernoj kemijskoj sintezi. Njihova prilagodljivost, sposobnost finog podešavanja reaktivnosti kroz izbor aminokiselina te mogućnost postizanja visoke stereoselektivnosti čine ih idealnim alatima za kompleksne reakcije, uključujući one s funkcionalno osjetljivim supstratima poput N-heterocikličkih spojeva. Ovi katalizatori

dokazuju da precizno dizajnirani molekularni sustavi mogu spojiti reaktivnost, selektivnost i održivost, otvarajući vrata za razvoj novih sintetskih strategija u farmaceutskoj znanosti i znanosti o materijalima.

U svjetlu ovih istraživanja željeli smo ispitati učinak neproteinskih, produljenih okosnica α -hidrazinokiselina smještenih na C-terminalnom položaju peptida. Hidrazinski derivati α -aminokiselina mogu se dobiti iz β -aminokiselina zamjenom β -atoma ugljika dušikom. Glavna razlika između sekundarnih amidnih i hidrazidnih veza jest pojava Z/E izomerije te činjenica da je Z/E ravnoteža hidrazida određena ne samo steričkim čimbenicima (kao što je slučaj kod amidnih veza), već i elektronskim odbijanjem između nesparenih elektronskih parova kisika i dušika u Z -formi.^{76–78} Stoga tripeptidi općenite strukture Pro-Pro-hXaa (hXaa = α -hidrazinokiselina) sadrže dvije veze podložne *trans/cis* izomerizaciji, što omogućuje formiranje različitih sekundarnih struktura i visoku konformacijsku prilagodljivost peptida (Slika 4.). Kako bismo istražili učinke takvih modifikacija na sekundarnu strukturu i katalitičku učinkovitost, pripremili smo malu skupinu H-Pro-Pro-D-hXaa peptida i testirali ih u reakciji konjugirane adicije aldehida na nitroolefine.



Slika 4. Z/E ravnoteža hidrazidne veze u tripeptidima općenite strukture H-Pro-Pro-D-hXaa

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Instrumenti, materijali i metode

NMR spektri snimljeni su na Bruker 600 spektrometru, pri frekvencijama 600,13 MHz (^1H) i 150,92 MHz (^{13}C) te na Bruker 300 spektrometru pri frekvencijama 300,13 MHz (^1H) i 75,47 MHz (^{13}C). Spektri spojeva snimljeni su u deuteriranim otapalima DMSO, CDCl_3 i MeCN pri sobnoj temperaturi. Kemijski pomaci (δ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS) u ppm vrijednostima. Konstante sprege (J) izražene su u hercima (Hz). ^1H spektri prikazani su kako slijedi: ^1H NMR (frekvencija spektrometra, otapalo): δ kemijski pomak / ppm (asignacija). Signali multipliciteta NMR signala označeni su kao: s (singlet), bs (broad singlet), d (dublet), dd (dublet dubleta), t (triplet), m (multiplet).

Spektri masa (MS) snimljeni su na Agilent Technologies 1200 HPLC sustavu spojenom s DAD detektorom (Diode Array Detector) i spektrometrom mase s trostrukim kvadrupolom. Korištena je ionizacija elektroraspršenjem (ESI, eng. *Electrospray ionisation*). Spektri su snimani u pozitivnom (ESI+) i negativnom (ESI-) načinu rada. Kao mobilna faza korištena je smjesa metanola i 0,1 %-tne vodene otopine mravlje kiseline (1:1), protoka 0,1 mL/min. Za MS/MS spektre korišten je dušik kao kolizijski plin.

Za snimanje infracrvenih spektara (IR) korišten je interferometar VECTOR tvrtke Bruker. IR spektri reaktanata i alikvota reakcijske smjese snimani su ATR tehnikom pomoću MIRacle ATR nosača tvrtke Pike Technologies čiji je refleksijski element kombinacija kristala dijamanta i ZnSe. Spektri su snimani u području između 4000 cm^{-1} i 600 cm^{-1} uz razlučivanje od 4 cm^{-1} , a rezultat su uprosječivanja 32 snimke.

Reakcije su praćene tankoslojnom kromatografijom (TLC) provedenom na pločicama silikagela Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck; Darmstadt, Germany). UV-aktivni spojevi detektirani su pod UV svjetlom na 254 nm, a ostali korištenjem ninhidrina i otopine kalijeva permanganata uz zagrijavanje nakon čega im je određen retencijski faktor (R_f). Otopina kalijeva permanganata pripremljena je otapanjem kalijeva permanganata (6 g) i kalijeva karbonata (40 g) u vodi (600 mL) uz dodatak 10 %-tne otopine NaOH (5 mL).

Konačni produkti pročišćeni su brzom (flash) tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela Kieselgel 60 F254 (0,040 – 0,063 mm) (Merck). Mobilna faza dana je za svaki spoj. Visokodjelotvorna tekućinska kromatografija (HPLC) provedena je na LC-40 Shimadzu instrumentu, na kolonama s kiralnim selektorom. Uvjeti razdvajanja dani su uz svaki spoj.

Sve kemikalije upotrebene u sintezi bile su analitičke čistoće, a otapala korištena u radu pročišćena prema standardnim propisima. Polazni spojevi su komercijalno dostupne supstance.

Imena spojeva dobivena su iz programa Chem Draw 12.0 i ne slijede nužno IUPAC-ova pravila.

Enantiomerni omjeri (e.r.) produkata određeni su na Shimadzu LC-40 HPLC sustavu s DAD detektorom. Za kiralnu separaciju korištene su kolone tipa: Lux LC (amiloza tris(5-kloro-2-metilfenilkarbamate)), IB N-3 (celuloza tris(3,5-dimetilfenilkarbamate)) i IC-3 (celuloza tris(3,5-diklorofenilkarbamate)).

Dijastereomerni omjeri (d.r.) produkata određeni su iz NMR spektara.

3.2. Općeniti propisi za pripremu katalizatora

3.2.1. Općeniti propisi za pripremu α -hidrazinokiselina

Propis A: Priprava nezaštićene α -hidrazinokiseline

Sve α -hidrazinokiseline pripremljene su prema modificiranoj literaturnoj proceduri a njihova je karakterizacija u skladu s literaturnim podacima.⁷⁹ U prvom koraku L-aminokiselina je otopljena u H₂SO₄ koncentracije 2,5 mol dm⁻³ (1,3 mL/mmol) te je dodan KBr (3,5 ekv.). Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C te je polako dokapana otopina NaNO₂ (1,3 ekv.). Miješanje je nastavljeno na 0 °C 1 sat, a zatim na sobnoj temperaturi preko noći. Dobivena α -bromokiselina ekstrahirana je s EtOAc (50 mL) i isprana vodenom otopinom NaHCO₃ te osušena s bezvodnim MgSO₄. Hidrazin hidrat NH₂NH₂·H₂O (3 ekv.) dodan je direktno u otopinu α -bromokiseline u etil-acetatu nakon čega je reakcija nastavljena na temperaturi 60 °C u ultrazvučnoj kupelji kroz 1 sat. Produkt dobiven u obliku bijele krutine je odfiltriran, osušen i kao takav korišten u daljnjim reakcijama.

Propis B: Priprava N^β -zaštićene α -hidrazinokiseline (N^β -Boc-D-hXaa-OH)

α -hidrazinokiselina (3 g) je otopljena u smjesi otapala MeCN : H₂O : NaOH koncentracije 1 mol dm⁻³ u omjeru 2 : 1 : 1,5. Reakcijska smjesa je ohlađena na 0 °C te je dokapan di-*tert*-butil-dikarbonat (Boc₂O; 1 ekv.). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa je djelomično uparena, a pH-vrijednost ostatka podešena na 2–3 dodatkom 10 %-tne otopine limunske kiseline. Smjesa je potom ekstrahirana s EtOAc-om (3×50 mL), isprana zasićenom otopinom NaCl i vodom. Otapalo je upareno, a produkti pročišćeni brzom kromatografijom na stupcu silikagela.

Propis C1: Priprava N^β -Boc-D-hXaa-OMe; funkcionalizacija C-terminusa

N^β -Boc-D-hXaa-OH otopljena je u suhom CH₂Cl₂ uz dodatak nekoliko kapi apsolutnog DMF-a. U otopinu je dodan *N*-metilmorfolin (NMM; 2 ekv.), benzotriaz-1-oksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat (BOP; 1,4 ekv.), 1-hidroksibenzotriazol (HOBt; 1,4 ekv.) te nakon 45 min suhi MeOH u suvišku. Reakcija je nastavljena na sobnoj temperaturi preko noći. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a produkti proočišćeni brzom kromatografijom na stupcu silikagela.

Propis C2: Priprava N^β -Boc-D-hXaa-NH₂; funkcionalizacija C-terminusa

N^β -Boc-D-hXaa-OH je otopljena u suhom CH₂Cl₂ uz dodatak nekoliko kapi suhog DMF-a. U otopinu je dodan NMM (2 ekv.). Otopina je ohlađena na 0 °C te je dodan izobutil-klorformijat (ClCOOiBu; 1,1 ekv.), a nakon 45 min otopina amonijaka (1,2 ekv.; $w(\text{NH}_3) = 0,25\%$). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo je djelomično upareno, a reakcijska smjesa ekstrahirana s EtOAc-om (3 × 50 mL), isprana zasićenom vodenom otopinom NaCl i destiliranom vodom. Produkt je pročišćen brzom kromatografijom na stupcu silikagela.

3.2.2. Općeniti propisi za pripravu peptida s ugrađenom α -hidrazinokiselinom

Propis D: Priprava dipeptida *H-Pro-D-hXaa-R'* (*H-Pro-D-hLeu-OH*; *H-Pro-D-hPhe-OH*; *H-Pro-D-hVal-OH*, *H-Pro-D-hVal-OMe*; *H-Pro-D-hVal-NH₂*)

Boc-L-Pro-OH otopljen je u suhom DCM-u. U otopinu je dodan NMM (2 ekv.). Otopina je ohlađena na 0 °C te je dodan ClCOOiBu (1,1 ekv.). Nakon 45 minuta dodan je TFA×D-hXaa-

R' (1 ekv.). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo je upareno, a produkt pročišćen brzom tekućinskom kromatografijom.

Propis E: *Priprava tripeptida tipa H-Pro-Pro-D-hXaa-R'*

Boc-L-Pro-L-Pro-OH otopljen je u suhom DCM-u (10 mL). U otopinu je dodan NMM (2 ekv.). Otopina je ohlađena na 0 °C te je dodan ClCOOiBu (1,1 ekv.). Nakon 45 minuta dodan je TFA×D-hXaa-R' (1 ekv.). Miješanje je nastavljeno na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo je upareno, a produkt pročišćen brzom tekućinskom kromatografijom

Propis F1: *Uklanjanje Boc zaštite*

Zaštićenju kiseline ili peptidu dodana je vodena otopina trifluoroctene kiseline, TFA : H₂O = 9 : 1 (1–2 mL). Reakcijska smjesa je miješana oko 40 minuta, uz praćenje TLC-om, pri sobnoj temperaturi. TFA je uparena uz dodatak toluena, a produkti sušeni na vakuumskoj pumpi.

Propis F2: *Uklanjanje esterske zaštitne skupine*

Peptid zaštićen metilnim esterom otopljen je u sustavu THF : H₂O = 1 : 5. U tako priređenu otopinu dodan je LiOH (10 ekv.). Reakcija je nastavljena na sobnoj temperaturi preko noći. THF je uparen, a pH-vrijednost ostatka otopine podešena je na 2–3 dodatkom 10 % otopine limunske kiseline. Produkt je ekstrahiran s EtOAc. Spojeni organski slojevi sušeni su bezvodnim natrijevim sulfatom. Otapalo je upareno, a produkt pročišćen brzom tekućinskom kromatografijom.

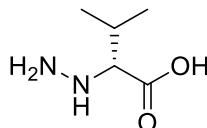
3.3. Općeniti propisi za reakciju 1,4-adicije aldehida na nitroolefine

Propis G: za 5 mol % TFA×Pro-Pro-D-hVal-OMe

NMM (20 µL; 200 µmol; 0,05 ekv.) otopljen je u toluenu (10 mL). Tako pripremljena otopina dodana je katalizatoru (9,1 mg; 20 µmol; 0,05 ekv.). Nakon dodatka odgovarajućeg aldehida (1,2 mmol; 3 ekv.) i nitroolefina (0,40 mmol; 1 ekv.) reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi, a napredak reakcije praćen je TLC-om. Po završetku reakcije otapalo je upareno, a produkt pročišćen brzom tekućinskom kromatografijom (sustav otapala je dan za svaki spoj).

3.4. Priprava α -hidrazinokiselina

3.4.1. *D-hVal-OH* (**1**)



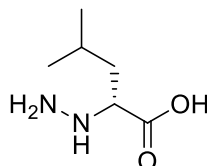
Spoj **1** pripravljen je prema općenitom propisu **A**. Iz L-valina (3,00 g) dobiven je produkt **1** u obliku bijele krutine (1,28 g; 38 %).

$R_f = 0,24$ (EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 7 : 1 : 1 : 1)

¹H NMR (300 MHz, D₂O), δ / ppm: 3,49 (m, 1H; α Val), 2,25 – 2,12 (m, 1H; β Val), 1,00 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H; γ, γ' Val).

¹³C NMR (75 MHz, D₂O), δ / ppm: 147,7 (CO Val), 72,1 (α Val), 29,5 (β Val), 19,0 (γ, γ' Val).

3.4.2. *D-hLeu-OH* (**2**)

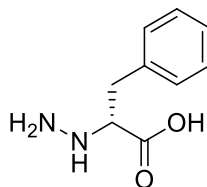


Spoj **2** pripravljen je prema općenitom propisu **A**. Iz L-leucina (3,00 g) dobiven je produkt **2** u obliku bijele krutine (1,90 g; 55 %).

$R_f = 0,21$ (EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 7 : 1 : 1 : 1)

¹H NMR (300 MHz, D₂O), δ / ppm: 3,65 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H; α Leu), 1,80 – 1,59 (m, 3H; β, γ Leu), 0,95 (d, $J = 6,3$ Hz, 6H; δ, δ' Leu)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O), δ / ppm: 177 (CO, Leu), 64,5 (α Leu), 25,5 (β Leu), 23,4 (γ Leu), 23,3 (δ, δ' Leu).

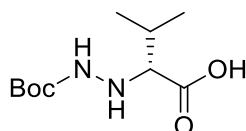
3.4.3. *D*-hPhe-OH (**3**)

Spoj **3** pripravljen je prema općenitom propisu **A**. Iz L-fenilalanina (3,00 g) dobiven je produkt **3** u obliku bijele krutine (2 g; 61 %).

$R_f = 0,22$ (EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 7 : 1 : 1 : 1)

¹H NMR (300 MHz, D₂O), δ / ppm: 7,43–7,18 (m, 5H; H_{ar} Phe), 3,88 (t, $J = 6,3$ Hz, 1H; α Phe), 3,19 (m, 1H; β Phe), 3,11 (m, 1H; β Phe)

¹³C NMR (75 MHz, D₂O), δ / ppm: 179,1 (CO Phe), 135,7, 132,1, 131,5, 131,2 (CH_{ar} Phe), 64,3 (α Phe), 38,3 (β Phe).

3.4.4. *Boc*-*D*-hVal-OH (**4**)

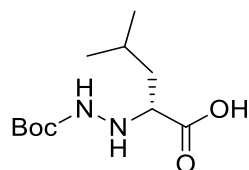
Spoj **4** pripravljen je prema općenitom propisu **B**. Iz *D*-hVal-OH (500 mg) dobiven je produkt u obliku bijele krutine (367 mg; 42 %).

$R_f = 0,60$ (EtOAc : PE : AcOH = 10 : 5 : 0,5)

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ / ppm: 8,15 (s, 1H; Boc-NH), 3,32 (br, s, 1H; α Val), 2,38 – 2,25 (m, 1H; β Val), 2,00 (s, 1H; NH), 1,39 (s, 9H; CH₃ Boc), 0,91 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H; γ , γ' Val).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆), δ / ppm: 175,2 (CO Val), 156,8 (CO Boc), 79,2 (C Boc), 69,0 (α Val), 29,9 (β Val), 28,60 (CH₃ Boc), 19,0 (γ , γ' Val).

MS-ESI: m/z 231 [M-H]⁺; m/z 131 [M-Boc]⁺; m/z 255 [M+Na]⁺

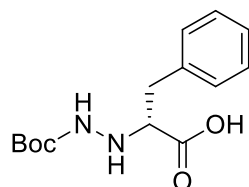
3.4.5. *Boc-D-hLeu-OH* (**5**)

Spoj **5** pripravljen je prema općenitom propisu **B**. Iz D-hLeu-OH (500 mg) dobiven je produkt **5** u obliku bijele krutine (522 mg; 62 %).

$R_f = 0,22$ (PE : EtOAc : AcOH = 7 : 5 : 0,5)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 8,10 (s, 1H; NH), 3,40 (br, s, 1H; α Leu), 1,77 – 1,72 (m, 2H; β , β' Leu), 1,60 – 1,40 (m, 1H, γ -Leu), 1,38 (s, 9H; CH₃ Boc), 0,87 (dd, $J = 10,4, 6,6$ Hz, 6H; δ ; δ' Leu).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 175,0 (CO Leu), 156,4 (CO Boc), 78,5 (C Boc), 61,0 (α Leu), 40,0 (β Leu), 28,1 (CH₃ Boc), 24,3 (γ Leu), 22,6 (δ , δ' Leu).

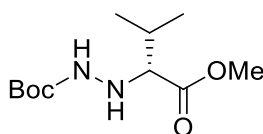
3.4.6. *Boc-D-hPhe-OH* (**6**)

Spoj **6** pripravljen je prema općenitom propisu **B**. Iz D-hPhe-OH (500 mg) dobiven je produkt u obliku bijele krutine (431 mg; 56 %).

$R_f = 0,20$ (PE : EtOAc : AcOH = 7 : 5 : 0,5)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 8,27 (s, 1H; NH), 7,25 – 7,18 (m, 5 H; H_{ar} Phe), 3,68 (br, s, 1H; α Phe), 3,33 (m, 2H; β , β' Phe), 1,37 (s, 9H; CH₃ Boc).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 173,3 (CO Phe), 156,0 (CO Boc), 137,7, 129,5, 127,8, 126,2 (CH_{ar} Phe), 78,5 (C Boc), 63,8 (α Phe), 36,0 (β Phe), 28,1 (CH₃ Boc).

3.4.7. *Boc-D-hVal-OMe (7)*

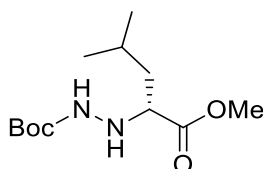
Spoj **7** pripremljen je prema općenitom propisu **C1**. Iz Boc-D-hVal-OH (100 mg) dobiven je produkt **7** u obliku žutog ulja (101,8 mg; 64 %).

$R_f = 0,58$ (EtOAc : PE = 1 : 1)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 3,75 (s, 3H; OCH_3), 3,45 (d, $J = 5,3$ Hz, 1H; α Val), 2,10 – 1,98 (m, 1H; β Val), 1,45 (s, 9H; Boc); 1,00 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H; γ, γ' Val).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 173,9 (CO Val), 156,3 (CO Boc), 80,5 (C Boc), 69,5 (α Val), 52,1 (CH_3OCH_3), 30,1 (β Val), 19,1 (γ, γ' Val).

MS-ESI: m/z 269 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z 516 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$

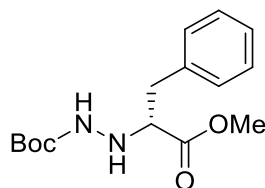
3.4.8. *Boc-D-hLeu-OMe (8)*

Spoj **8** pripremljen je prema općenitom propisu **C1**. Iz Boc-D-hLeu-OH (100 mg) dobiven je produkt **8** u obliku žutog ulja (82 mg; 51 %).

$R_f = 0,44$ (EtOAc : PE = 1 : 2)

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 7,65 (s, 1H; NH), 3,77 (s, 3H, OCH_3), 3,42 (br, s, 1H; α Leu), 1,82–1,75 (m, 2H; β, β' Leu), 1,31 – 1,25 (m, 1H; γ Leu), 1,37 (s, 9H; CH_3 Boc), 0,87 (d, $J = 6,6$ Hz, 6H; δ, δ' Leu).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 172,9 (CO Leu), 156,6 (CO Boc), 80,3 (C Boc), 59,7 (α Leu), 39,2 (β Leu), 28,3 (CH_3 Boc), 23,9 (γ Leu), 22,7 (δ, δ' Leu).

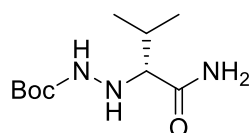
3.4.9. *Boc-D-hPhe-OMe* (**9**)

Spoj **9** pripravljen je prema općenitom propisu **C1**. Iz Boc-D-hPhe-OH (100 mg) dobiven je produkt **9** u obliku žutog ulja uz iskorištenje 77 %.

$R_f = 0,32$ (PE : EtOAc = 2 : 1)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 7,30 – 7,23 (m, 6H; H_{ar} Phe, Boc-NH), 3,96 (br s; 1H; α Phe), 3,71 (s, 3H; OCH_3 Phe), 2,94 – 3,09 (m, 2H; β , β' Phe), 2,64 (s, 1H; NH), 1,47 (s, 2H; Boc), 1,42 (s, 7H; Boc).

$^{13}\text{C NMR}$ (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 173,4 (CO, Phe), 136,6, 129,2, 128,7, 127,0 (CH_{ar} Phe), 52,1 (OCH_3), 37,1 (β Phe), 28,4 (CH_3 Boc).

3.4.10. *Boc-D-hVal-NH₂* (**10**)

Spoj **10** pripravljen je prema općenitom propisu **C2**. Iz Boc-D-hVal-OH (100 mg) dobiven je produkt **10** u obliku bijele krutine uz iskorištenje 36 %.

$R_f = 0,58$ (EtOAc : PE ; 7 : 1)

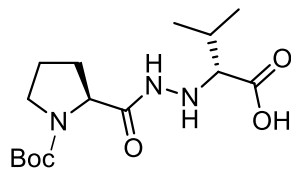
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 7,27 (s, 1H; NH Val), 3,29 (d, $J = 5,0$ Hz, 1H), 2,11 – 2,00 (m, 1H), 1,45 (s, 9H), 1,04 (dd, $J = 11,0, 7,0$ Hz, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 175,2 (CO, Val), 156,5 (CO, Boc), 71,1 (α , Val), 28,3 (CH_3 , Boc), 18,4 (γ , γ' Val).

MS-ESI: m/z 131,1 $[\text{M-Boc}]^+$; m/z 254,2 $[\text{M+Na}]^+$

3.5. Priprava dipeptida tipa Boc-L-Pro-D-hXaa-R'

3.5.1. Boc-Pro-D-hVal-OH (**11**)

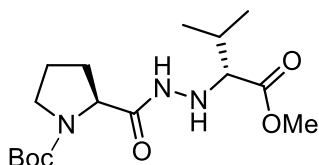


Spoj **11** pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-OH (158 mg; 0,73 mmol) i D-hVal-OH (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 70 : 20 : 2 : 2 ($R_f = 0,47$) dobiven u obliku ulja (151 mg; 63 %)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 8,28 (br s, 0,6H), 7,57 (br s, 0,4H), 4,77 (br s, 1H), 4,21 (br s, 1H), 3,77 (s, 3H), 3,48 – 3,22 (m, 3H), 3,38 – 1,80 (m, 5H), 1,45 (s, 9H), 1,05 – 0,94 (m, 6H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 173,0, 172,9, 155,5, 80,5, 69,1, 58,8, 51,7, 47,0, 30,0, 29,9, 28,4, 24,6, 18,9, 18,6, 18,4.

3.5.2. Boc-Pro-D-hVal-OMe (**12**)



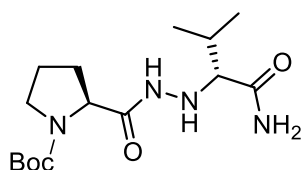
Boc-Pro-D-hVal-OMe pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-OH (82 mg; 0,38 mmol) i TFA×D-hVal-OMe (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu EtOAc : PE = 10 : 1 ($R_f = 0,49$) dobiven u obliku žutog ulja (85 mg; 65 %)

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 8,28 (br s, 0,6H), 7,57 (br s, 0,4H), 4,77 (br s, 1H), 4,21 (br s, 1H), 3,73 (br s, 3H), 3,47 – 3,22 (m, 3H), 2,36 – 1,80 (m, 5H), 1,45 (s, 9H), 1,05 – 0,95 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 173,0, 173, 156, 81, 69,1, 58,8, 51,7, 47,0, 30, 29,9, 28,4, 24,6, 18,9, 18,6, 18,4.

MS-ESI: m/z 342 $[\text{M}-\text{H}]^+$; m/z 244 $[\text{M}-\text{Boc}]^+$; m/z 366 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; m/z 709 $[2\text{M}-\text{Na}]^+$

3.5.3. Boc-Pro-D-hVal-NH₂ (**13**)

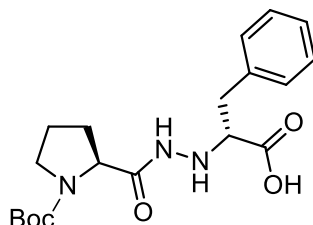


Boc-Pro-D-hVal-NH₂ pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-OH (73 mg; 0,34 mmol) i TFA×D-hVal-NH₂ (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu EtOAc : AcOH : EtOH = 70 : 2 : 2 (R_f = 0,51) dobiven u obliku bijele krutine uz iskorištenje (65 mg; 58 %).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 8,71 (brd, 0,7H), 7,86 (br d, 0,3H), 7,07 (br d, 1H), 5,73 (br d, 1H), 4,65 (br s, 1H), 4,20 (ddd, J = 11,1, 7,9, 2,8 Hz, 1H), 3,45 – 3,11 (m, 3H), 2,12-2,01 (m, 2H), 1,97 – 1,79 (m, 3H), 1,44 (s, 9H), 1,08 – 1,01 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 172,5, 172,4, 155,9, 80,8, 70,9, 70,8, 58,6, 53,5, 47,3, 30,3, 30,1, 28,5, 24,7, 19,4, 18,5.

3.5.4. Boc-Pro-D-hPhe-OH (**14**)



Boc-Pro-D-hPhe-OH pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-OH (153 mg; 0,71 mmol) i D-hPhe-OH (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu

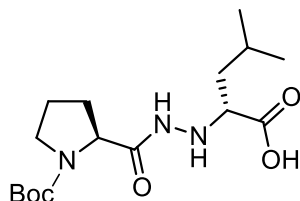
EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 70 : 20 : 2 : 2 ($R_f = 0,50$) dobiven u obliku bijele krutine (146 mg; 54 %).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 7,26 – 6,93 (m, 6H), 4,14 (br s, 1H), 3,82 (br s, 1H), 3,55 – 2,93 (m, 4H), 2,23 – 1,63 (m, 4H), 1,38 (br s, 9H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 173,5, 172,8, 155,4, 137,8, 134,4, 130,6, 129,0, 128,7, 58,6, 55,6, 47,1, 45,3, 36,3, 30,2, 30,1, 28,2, 24,7, 22,3.

MS-ESI: m/z 278 [M-Boc+H]⁺; m/z 376 [M-H]⁺; m/z 378 [M+H]⁺; m/z 400 [M-Na]⁺; m/z 753 [2M-H]⁺

3.5.5. Boc-Pro-D-hLeu-OH (15)



Boc-Pro-D-hLeu-OH pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-OH (158 mg; 0,73 mmol) i H-D-hLeu-OH (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 70 : 20 : 2 : 2 ($R_f = 0,48$) dobiven u obliku žutog ulja (158 mg; 63 %).

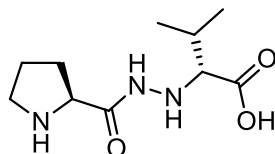
¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 7,95 (br s, 1H), 4,67 (br s, 1H), 4,10 (br s, 1H), 3,42 – 3,09 (m, 3H), 2,33 – 2,11 (m, 2H), 2,10 – 1,72 (m, 5H), 0,96 – 0,81 (m, 6H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 173,5, 172, 5, 155,7, 80,3, 69,4, 57,8, 46,6, 45,3, 29,5, 28,5, 24,7, 23,4.

MS-ESI: m/z 342 [M-H]⁺; m/z 244 [M-Boc+H]⁺; m/z 344 [M+H]⁺; m/z 685 [2M-H]⁺; m/z 687 [2M+H]⁺

3.6. Deprotekcija dipeptida tipa Boc-Pro-D-hXaa-R'

3.6.1. *H-Pro-D-hVal-OH* (**16**)

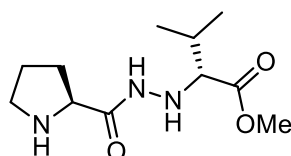


Spoj **16** dobiven je uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **11** prema općenitom propisu **F1**.
Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 9,85 (br s, 1H), 3,96 (dd, $J = 8,4, 6,8$ Hz, 1H), 3,35 – 3,27 (m, 1H), 2,80 – 2,74 (m, 2H), 2,18–2,09 (m, 1H), 1,96 – 1,76 (m, 4H), 0,96 – 0,80 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 175,1, 171,3, 59,9, 51,3, 45,4, 29,8, 28,4, 23,5, 18,8.

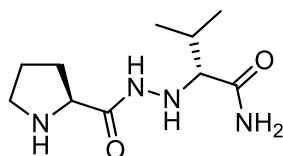
3.6.2. *H-Pro-D-hVal-OMe* (**17**)



Spoj **17** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **12** po općenitom propisu **F1**.
Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 9,01 (br s, 1H), 4,13 (dd, $J = 8,5$ Hz, 7,1 Hz, 0,6H), 4,10 – 4,05 (m, 0,4H), 3,77 – 3,59 (m, 3H), 3,31 – 3,09 (m, 3H), 2,27 – 2,16 (m, 1H), 2,03 – 1,72 (m, 4H), 0,99 – 0,79 (m, 6H).

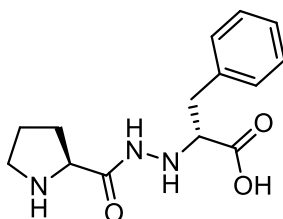
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO), δ / ppm: 172,4, 170,5, 59,3, 57,7, 51,4, 45,6, 45,3, 29,5, 29,3, 29,1, 28,1, 23,4, 23,2, 18,8, 18,7.

3.6.3. *H-Pro-D-hVal-NH₂* (**18**)

Spoj **18** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **13** po općenitom propisu **F1**.
Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ / ppm: 9,37 (br s, 0,6H), 7,98 (s, 0,4H), 7,07 (d, $J = 19,3$ Hz, 0,6H), 6,03 (br d, 0,4H), 6,44 (br d, 0,4H), 6,34 (br s, 0,6H), 4,38 – 4,18 (m, 1H), 3,44 – 3,33 (m, 3H), 3,22 – 3,15 (m, 1H), 2,40 – 2,27 (m, 1H), 2,08 – 1,90 (m, 4H), 1,04 – 0,95 (m, 6H).

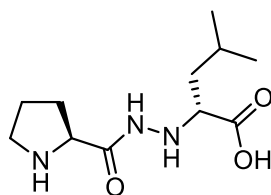
¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ / ppm: 174,7, 174,6, 172,2, 172,1, 67,5, 60,0, 58,3, 58,0, 48,6, 29,5, 29,4, 28,8, 28,5, 23,8, 23,6, 21,9, 18,7, 18,4, 18,3.

3.6.4. *H-Pro-D-hPhe-OH* (**19**)

Spoj **19** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **14** po općenitom propisu **F1**.
Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

¹H NMR (600 MHz, CD₃CN), δ / ppm: 7,40 – 6,68 (m, 6H), 4,14, 3,97 (br d, 1H), 3,32 – 2,61 (m, 4H), 2,20 – 1,97 (m, 1H), 1,87 – 1,63 (m, 4H).

¹³C NMR (151 MHz, CD₃CN), δ / ppm: 175,3, 172,1, 171,4, 134,6, 130,5, 130,44, 130,1, 129,9, 129,8, 129,6, 129,4, 62,1, 60,5, 60,0, 59,3, 47,6, 47,3, 47,0, 30,9, 30,4, 29,6, 25,1, 25,0, 24,8.

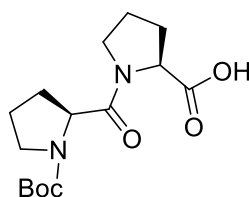
3.6.5. *H-Pro-D-hLeu-OH* (**20**)

Spoj **20** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **15** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 7,30 (br s, 1H), 4,10 (dd, $J = 8,5, 7,0$ Hz, 1H), 3,30 – 3,19 (m, 2H), 3,18 – 3,09 (m, 1H), 2,43 – 2,26 (m, 1H), 2,25 – 2,11 (m, 1H), 2,04 – 1,76 (m, 5H), 0,96 – 0,75 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6), δ / ppm: 170,5, 59,4, 57,8, 45,6, 45,3, 29,5, 28,2, 24,5, 23,4, 23,3.

3.7. Priprava tripeptida tipa Boc-Pro-Pro-D-hXaa-R'

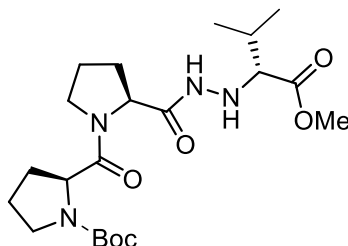
3.7.1. *Boc-Pro-Pro-OH* (**21**)

Boc-Pro-Pro-OH pripravljen je prema propisu **D1** iz Boc-L-Pro-OH (187 mg; 0,87 mmol) i H-L-Pro-OH (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala EtOAc : EtOH : AcOH : H₂O = 70 : 20 : 2 : 2 ($R_f = 0,51$) dobiven u obliku bijele krutine (197 mg; 73 %). Pripravljeni dipeptid koristit će se kao gradivni element u sintezi tripeptida.

^1H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 4,53 – 4,45 (m, 1H), 4,43 – 4,38 (m, 1H), 3,70 – 3,24 (m, 4H), 2,14 – 1,68 (m, 8H), 1,32 (s, 9H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 174,2, 174,0, 173,0, 172,8, 154,6, 153,6, 79,9, 79,8, 59,9, 59,9, 57,7, 57,6, 47,3, 47,2, 46,9, 46,7, 30,1, 29,3, 28,5, 28,4, 27,5, 27,3, 25,1, 25,0, 24,2, 23,6.

3.7.2. Boc-Pro-Pro-D-hVal-OMe (22)

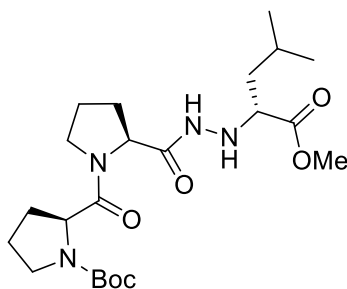


Boc-Pro-Pro-D-hVal-OMe pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-Pro-OH (167 mg; 0,48 mmol) i $\text{TFA} \times \text{D-H}_2\text{N-NH-Val-OMe}$ (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $\text{EtOAc} : \text{EtOH} = 7 : 1$ ($R_f = 0,46$) dobiven u obliku žutog ulja (145 mg; 59 %).

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 4,57 – 4,12 (m, 2H), 3,75 – 3,67 (m, 3H), 3,77 – 3,37 (m, 4H), 3,34 – 3,22 (m, 1H), 2,46 – 1,69 (m, 9H), 1,51 – 1,35 (m, 9H), 1,08 – 0,88 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 173,5, 173,3, 173,2, 173,0, 172,8, 171,7, 171,4, 170,8, 170,4, 170,3, 168,7, 167,9, 155,1, 154,9, 154,5, 153,6, 80,5, 80,2, 79,7, 79,6, 79,4, 69,8, 69,6, 69,4, 69,3, 69,2, 60,2, 60,1, 58,5, 58,4, 58,3, 58,2, 58,1, 57,8, 57,7, 57,6, 56,4, 55,9, 52,1, 51,9, 51,8, 51,7, 47,1, 47,1, 47,0, 46,9, 46,7, 46,5, 31,6, 31,5, 30,4, 30,3, 30,0, 30,0, 29,9, 29,8, 29,5, 29,4, 29,3, 29,3, 28,7, 28,5, 28,4, 26,9, 26,7, 26,6, 25,4, 25,4, 25,3, 24,8, 24,7, 24,3, 23,6, 22,0, 21,9, 20,7, 19,7, 19,6, 19,3, 19,1, 19,0, 19,0, 18,9, 18,7, 18,6, 18,6.

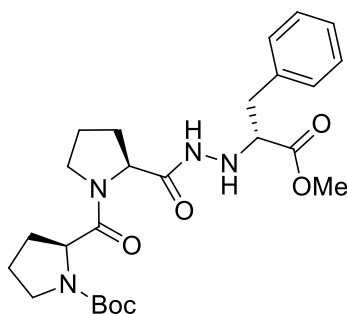
3.7.3. Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OMe (23)



Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OMe pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-Pro-OH (80 mg; 0,26 mmol) i TFA×D-H₂N-NH-Leu-OMe (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala EtOAc : PE = 7 : 1 (R_f = 0,48) dobiven u obliku žutog ulja (17 mg; 14 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 8,94, 8,39 (br d, 1H), 5,06 – 4,36 (m, 3H), 3,94 – 3,95 (m, 1H), 3,72, 3,69 (s, 3H), 3,65 – 3,52 (m, 2H), 3,49 – 3,36 (m, 1H), 2,26 – 1,60 (m, 11H), 1,45, 1,40 (s, 9H), 0,93 – 0,86 (m, 6H).

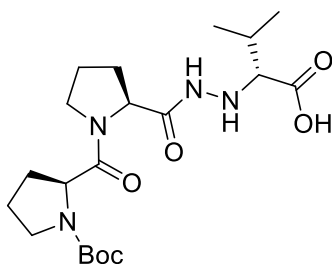
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 173,7, 172,8, 172,6, 154,6, 153,7, 79,7, 72,9, 71,2, 58,9, 58,4, 57,8, 57,7, 52,5, 47,1, 47,0, 46,8, 46,6, 37,9, 37,6, 30,3, 29,8, 29,4, 29,2, 28,7, 28,6, 28,1, 27,9, 27,3, 25,4, 25,3, 25,0, 24,5, 24,2, 23,6, 23,3, 23,2, 21,4, 19,2, 19,0.

3.7.4. *Boc-Pro-Pro-D-hPhe-OMe* (**24**)

Boc-Pro-Pro-D-hPhe-OMe pripravljen je prema propisu **D** iz *Boc-Pro-Pro-OH* (61 mg; 0,19 mmol) i $\text{TFA} \times \text{D-H}_2\text{N-NH-Phe-OMe}$ (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $\text{EtOAc} : \text{PE} = 7 : 1$ ($R_f = 0,53$) dobiven u obliku žutog ulja uz iskorištenje (19 mg; 21 %).

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 8,25 (br d, 1H), 7,41 – 7,05 (m, 5H), 4,76 (br s, 1H), 4,28 – 4,09 (m, 1H), 3,99 – 3,74 (m, 3H), 3,70 (s, 3H), 3,57 – 3,22 (m, 3H), 3,15 – 3,02 (m, 1H), 3,00 – 2,90 (m, 1H), 2,40 – 0,70 (m, 17H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 172,6, 171,5, 136,4, 129,1, 128,6, 127,0, 80,9, 71,9, 63,8, 52,0, 47,0, 37,0, 28,4, 27,9, 19,0.

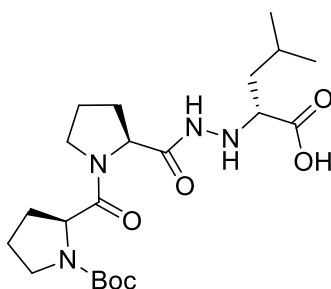
3.7.5. *Boc-Pro-Pro-D-hVal-OH* (**25**)

Boc-Pro-Pro-D-hVal-OH pripravljen je prema propisu **F2** iz *Boc-Pro-Pro-D-hVal-OMe* (73 mg; 0,17 mmol). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $\text{EtOAc} : \text{EtOH} : \text{AcOH} = 70 : 70 : 4$ ($R_f = 0,57$) dobiven u obliku bijele krutine (48 mg; 66 %)

$^1\text{H NMR}$ (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 5,24 – 4,91 (br s, 1H), 4,59 – 4,29 (m, 2H), 3,79 – 3,27 (m, 5H), 2,30 – 1,73 (m, 9H), 1,47 – 1,33 (m, 9H), 1,14 – 0,89 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 173,0, 171,9, 167,7, 167,4, 159,6, 157,3, 155,0, 154,7, 153,9, 80,3, 80,1, 79,8, 60,6, 59,4, 59,0, 58,8, 58,6, 58,4, 57,9, 47,3, 47,1, 47,0, 46,9, 46,8, 32,0, 31,9, 31,7, 31,6, 30,6, 30,3, 29,8, 29,5, 29,3, 28,7, 28,6, 28,5, 26,7, 26,5, 26,3, 25,5, 25,3, 24,8, 24,7, 24,5, 23,8, 22,8, 22,3, 20,1, 20,1, 19,9, 19,8, 19,5, 19,1, 18,8, 17,8, 17,6.

3.7.6. Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OH (26)

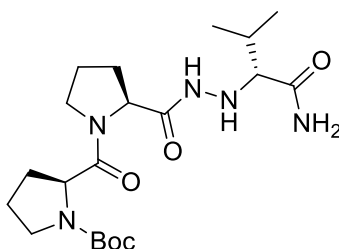


Boc-Pro-Pro-D-hLeu-OH pripravljen je prema propisu **D** iz Boc-Pro-Pro-OH (162 mg; 0,52 mmol) i $\text{D-H}_2\text{N-NH-Leu-OH}$ (1 ekv.). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala $\text{EtOAc} : \text{EtOH} : \text{AcOH} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 20 : 2 : 2$ ($R_f = 0,42$) dobiven u obliku žutog ulja (162 mg; 71 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ / ppm 9,04 (br s, 1H), 4,63 – 4,28 (m, 2H), 3,66 – 3,25 (m, 5H), 2,30 – 1,71 (m, 11H), 1,45 – 1,33 (m, 9H), 0,98 – 0,84 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3), δ / ppm 172,9, 172,4, 168,0, 154,5, 79,7, 79,1, 58,0, 47,2, 46,9, 46,7, 39,8, 30,1, 29,3, 29,2, 28,5, 28,4, 25,2, 25,0, 24,1, 23,6, 23,1, 21,8, 20,7.

MS-ESI: m/z 439,3 $[\text{M-H}]^+$; m/z 441,3 $[\text{M+H}]^+$

3.7.7. Boc-Pro-Pro-D-hVal-NH₂ (27)

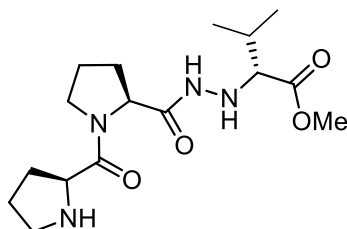
Boc-Pro-Pro-D-hVal-NH₂ pripravljen je prema propisu **C2** iz Boc-Pro-Pro-D-hVal-OH (500 mg; 1,18 mmol). Spoj je nakon čišćenja kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala EtOAc : EtOH : AcOH = 70 : 2 : 2 ($R_f = 0,52$) dobiven u obliku bijelog praha uz (200 mg; 47 %).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 4,94–4,36 (m, 2H), 3,96–3,87 (m, 1H), 3,77–3,40 m, 4H), 2,41–1,79 (m, 9H), 1,51–1,34 (m, 9H), 1,03–0,88 (m, 6H).

¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃), δ / ppm: 173,1, 172,9, 171,9, 171,7, 171,4, 155,2, 154,6, 153,6, 128,5, 80,5, 80,4, 80,2, 80,1, 79,8, 73,6, 73,4, 72,9, 68,6, 60,1, 59,7, 58,5, 58,1, 58,0, 57,8, 47,2, 47,1, 46,9, 46,7, 31,9, 31,6, 31,5, 31,2, 30,1, 29,7, 29,4, 29,2, 28,4, 28,4, 28,3, 28,2, 28,0, 27,8, 26,6, 25,3, 25,2, 24,8, 24,3, 24,2, 23,6, 23,5, 22,4, 20,0, 18,9.

3.8. Deprotekcija tripeptida tipa Boc-Pro-Pro-D-hXaa-R'

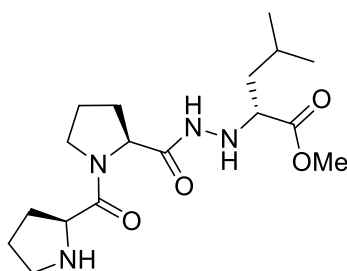
3.8.1. H-Pro-Pro-D-hVal-OMe (28)



Spoj **28** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **22** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (600 MHz, toluen- d_8), δ / ppm: 11,37 (brd, 0,5H), 9,71 (br d, 0,5H), 8,12 (br d, 1H), 6,11 (br s, 2H), 4,56 – 4,36 (m, 2H), 3,52 (s, 1,5H), 3,45 (s, 1,5H), 3,44 – 3,40 (m, 1H), 3,33 – 3,26 (m, 1H), 3,22 – 3,05 (m, 1H), 2,93 – 2,88 (m, 2H), 2,06 – 1,99 (m, 1H), 1,96 – 1,28 (m, 8H), 1,05 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 1,02 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,98 (d, $J = 6,8$ Hz, 3H), 0,96 – 0,94 (m, 3H).

3.8.2. H-Pro-Pro-D-hLeu-OMe (29)

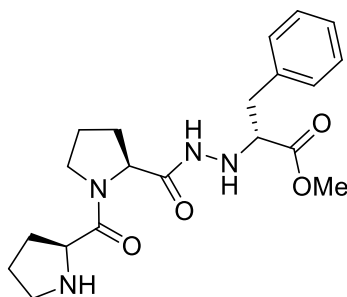


Spoj **29** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **23** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 8,92 – 8,55 (m, 1H), 4,15 – 3,84 (m, 2H), 3,68, (br s, 3H), 3,65 – 3,52 (m, 3H), 3,49 – 3,36 (m, 2H), 2,16 – 1,55 (m, 11H), 0,89 – 0,76 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 175,9, 172,8, 172,6, 170,6, 59,2, 58,6, 57,8, 57,7, 56,8, 52,7, 47,5, 47,1, 46,6, 45,9, 37,9, 37,6, 30,7, 30,3, 29,8, 29,2, 25,4, 25,3, 24,5, 24,2, 23,6, 23,3, 21,4, 19,7, 19,5.

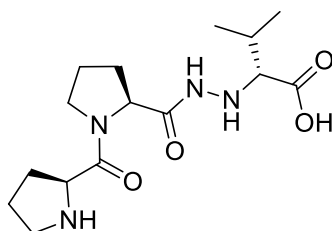
3.8.3. *H-Pro-Pro-D-hPhe-OMe* (**30**)



Spoj **30** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **24** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 7,57 – 7,12 (m, 5H), 4,85 – 4,57 (m, 2H), 3,68 (br s, 3H), 3,57 – 3,05 (m, 5H), 3,08 – 2,82 (m, 2H), 2,35 – 1,65 (m, 8H).

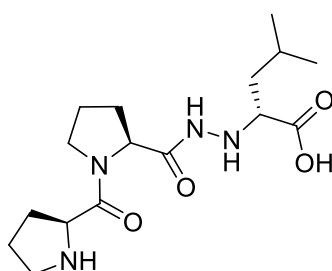
^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 177,5, 172,6, 171,5, 170,8, 136,4, 135,7, 129,7, 129,1, 128,6, 128,3, 127,0, 126,9, 63,8, 55,4, 52,0, 47,0, 46,7, 37,0, 31,6, 30,5, 29,8, 28,6, 27,9, 24,5, 24,2, 21,7, 21,3.

3.8.4. H-Pro-Pro-D-hVal-OH (**31**)

Spoj **31** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **25** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (600 MHz, CD_3CN), δ / ppm: 10,95 – 10,10 (m, 2H), 4,62 – 4,45 (m, 1H), 4,45 – 4,28 (m, 1H), 3,72 – 3,45 (m, 3H), 3,44 – 3,30 (m, 2H), 2,54 – 2,36 (m, 1H), 2,09 – 1,94 (m, 8H), 1,09 – 1,05 (m, 1H), 0,99 – 0,95 (m, 3H), 0,92 (d, $J = 6,6$ Hz, 2H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3CN), δ / ppm: 167,5, 166,1, 160,3, 160,1, 59,8, 59,2, 59,1, 58,7, 58,5, 46,9, 46,2, 46,1, 44,4, 30,7, 29,0, 28,7, 28,3, 28,2, 27,1, 25,5, 24,4, 24,3, 24,0, 23,9, 22,7, 19,3, 18,5, 18,4, 18,3.

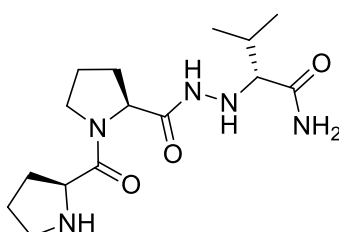
3.8.5. H-Pro-Pro-D-hLeu-OH (**32**)

Spoj **32** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **26** po općenitom propisu **F1**. Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 8,85 – 8,75 (m, 1H), 4,54 – 4,28 (m, 1H), 3,95 – 3,75 (m, 1H), 3,66 – 3,45 (m, 5H), 2,30 – 1,85 (m, 8H), 1,80 – 1,35 (3H), 0,98 – 0,84 (m, 6H).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 177,3, 172,5, 170,4, 69,6, 59,7, 51,2, 47,5, 46,8, 46,7, 46,0, 40,8, 30,5, 30,1, 29,3, 29,2, 25,2, 25,0, 24,7, 24,1, 23,6, 23,1, 21,8, 21,7, 21,3, 20,7.

3.8.6. H-Pro-Pro-D-hVal-NH₂ (**33**)



Spoj **33** dobiven je, uklanjanjem Boc zaštitne skupine iz spoja **27** po općenitom propisu **F1**.
Produkt je dobiven u obliku smeđeg ulja i u kvantitativnom prinosu.

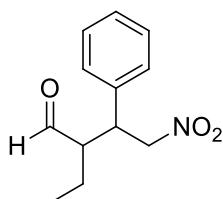
^1H NMR (600 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 4,82 – 4,65 (m, 2H), 3,62 – 3,37 (m, 5H), 2,41 – 1,39 (m, 11H), 0,96 – 0,88 (m, 6H).

^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD), δ / ppm: 176,4, 172,9, 171,7, 170,4, 59,7, 58,6, 58,1, 57,8, 47,2, 46,2, 46,1, 31,9, 31,8, 31,5, 29,7, 29,5, 27,8, 24,8, 24,2, 23,9, 22,3, 21,9, 20,6, 18,8.

3.9. Produkti 1,4-adicije aldehida na nitroolefine

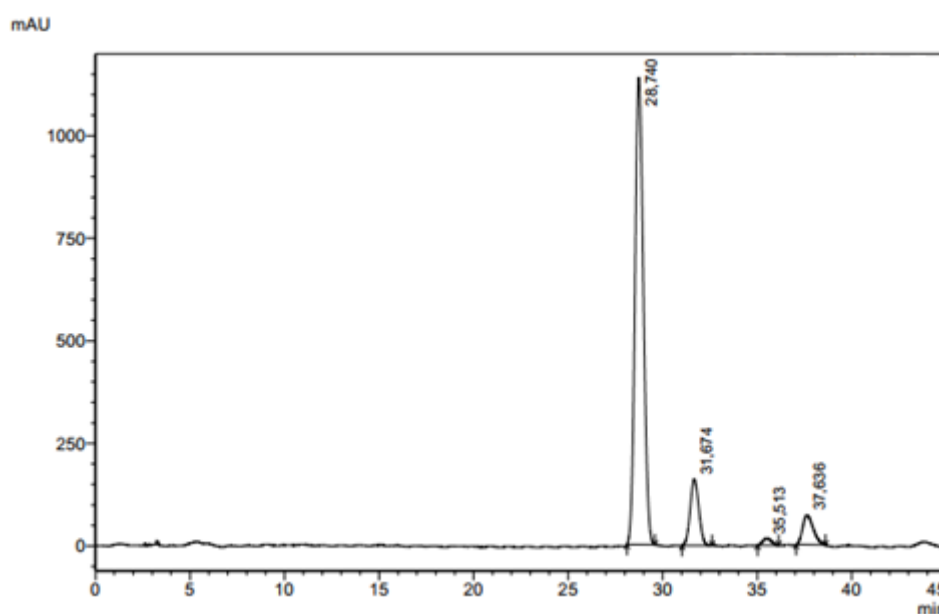
Dijastereoselektivni omjeri određeni su ^1H NMR spektroskopijom, a enantiomerni pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti.⁸⁰

3.9.1. 2-etil-3-fenil-4-nitrobutanal (**34**)



Spoj **34** je pripravljen iz nitrostirena (0,40 mmol) i butanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,49$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (80 mg; 90 %).

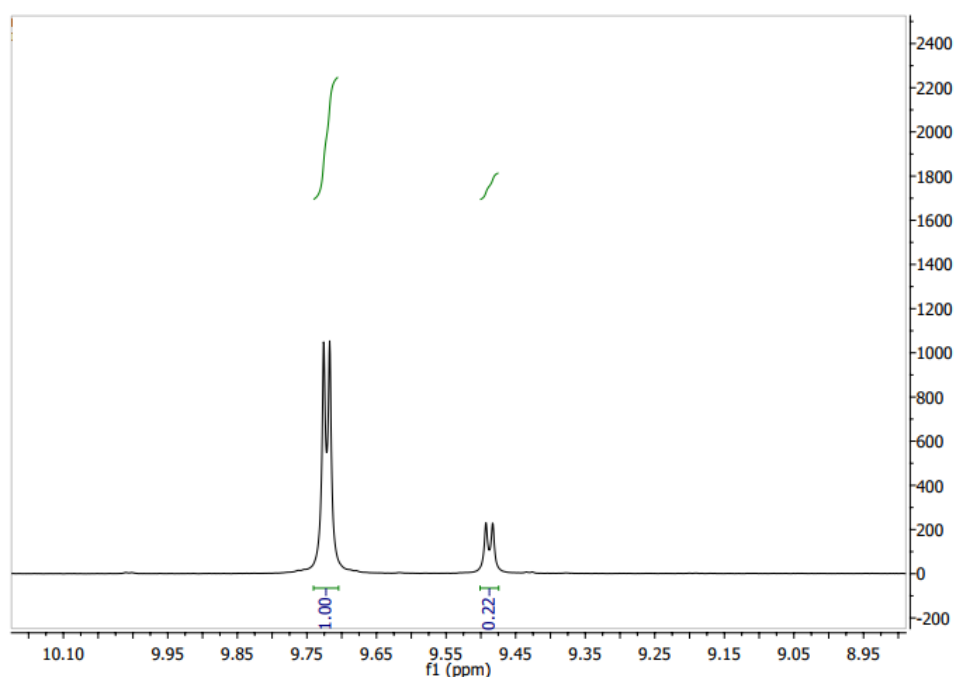
Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 93 : 7 e.r. $t_{R1} = 28,7$ min (većinski), $t_{R2} = 37,6$ min (manjinski) (Slika 5.).



Slika 5. HPLC kromatogram produkta **34**. Uvjeti: [Lux LC Column (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 99 : 1, protok 1 mL/min, $\lambda = 205$ nm.

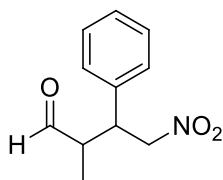
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9.72 (d, $J = 2.6$ Hz, 0,82H; CHO), 9,49 (d, $J = 2.9$ Hz, 0,18H; CHO), 7,40 – 7,28 (m, 3H; Ph), 7,22 – 7,14 (m, 2H; Ph), 4,76 – 4,63 (m, 2H; CH_2NO_2), 3.79 (td, $J = 9.7, 5.2$ Hz, 1H; CHPh), 2.74 – 2.62 (m, 0,82H; CHCHO), 2.62 – 2.53 (m, 0,18H; CHCHO), 1.57 – 1.45 (m, 2H; CH_2CH_3), 0.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 0,54H; CH_3), 0.84 (t, $J = 7.5$ Hz, 2,46H; CH_3).

Dijastereomerni omjer: 82:18



Slika 6. Dio ^1H NMR spektra produkta **34**

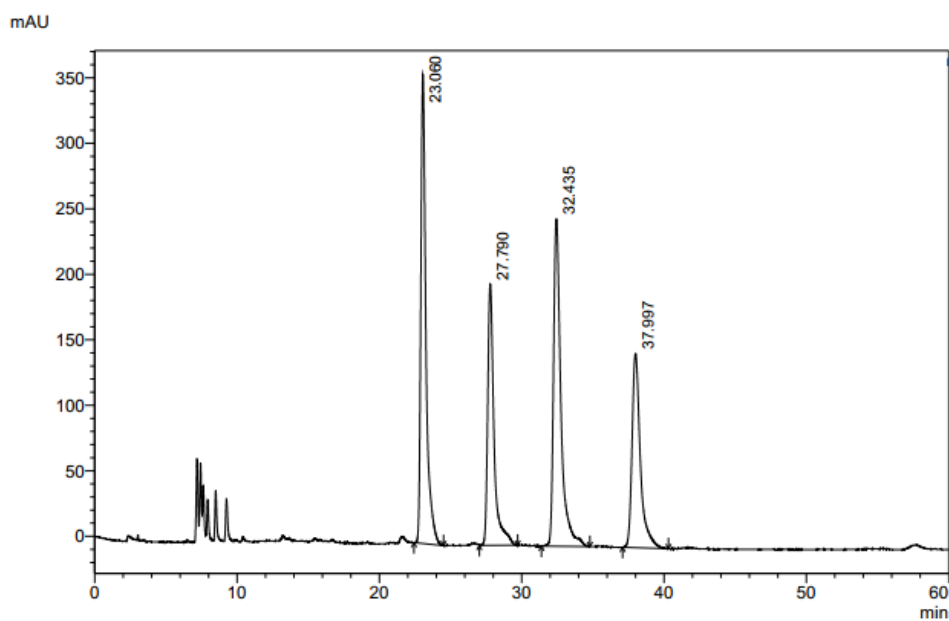
3.9.2. 3-fenil-2-metil-4-nitrobutanal (**35**)



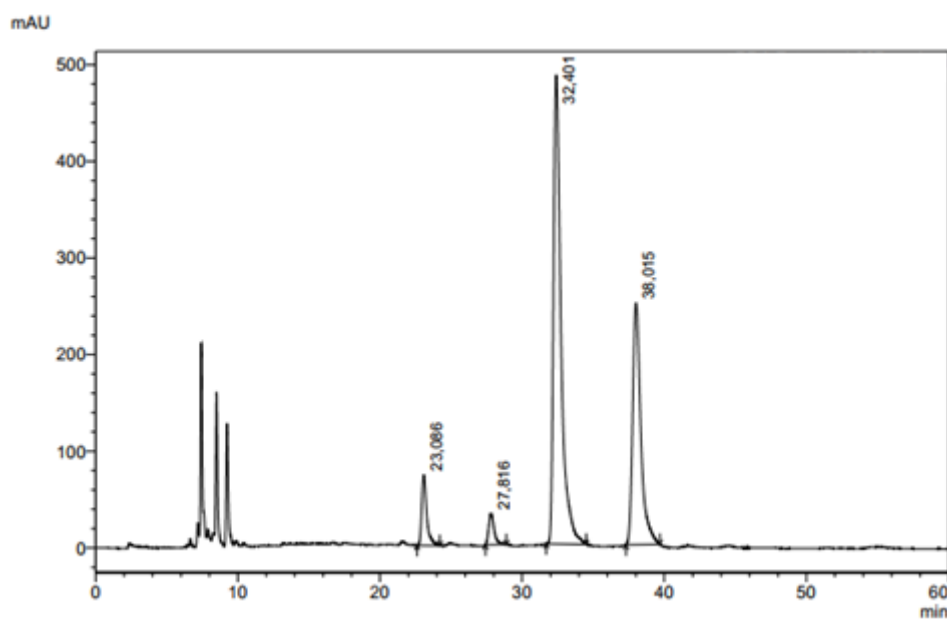
Spoj **35** je pripremljen iz nitrostirena (0,40 mmol) i propanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 5 : 1 ($R_f = 0,50$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (76 mg; 92 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 9 : 91 e.r. $t_{R1} = 23,1$ min (manjinski), $t_{R2} = 32,4$ min (većinski) (Slika 7.).

a)



b)

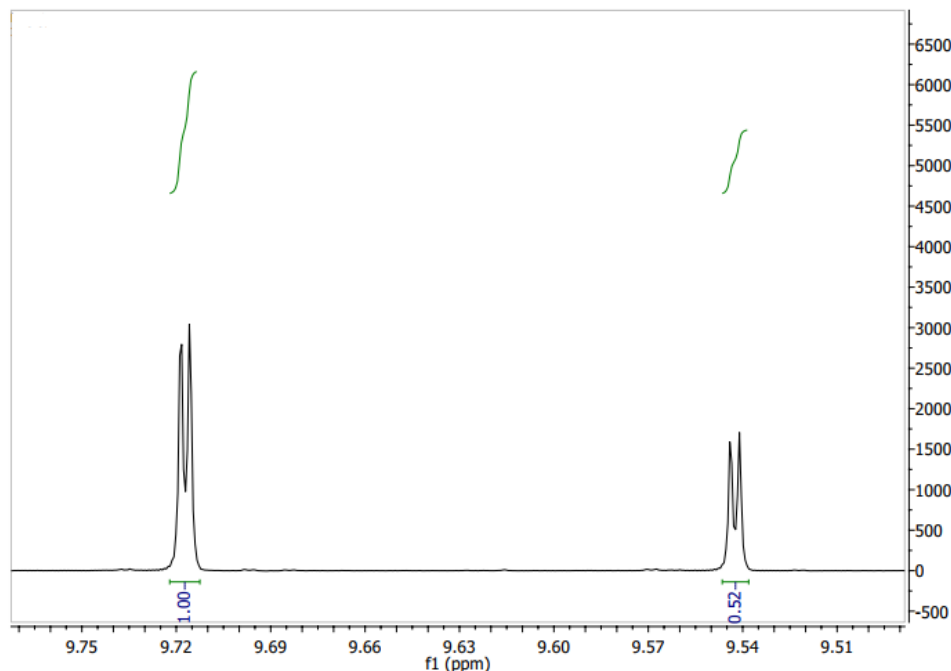


Slika 7. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **35**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **35**. Uvjeti: [Chiralpak IB N-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 90:10, protok 1 mL/min, $\lambda = 207$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,72 (d, $J = 1,7$ Hz, 0,66 H; CHO), 9,54 (d, $J = 1,7$ Hz, 0,34 H; CHO), 7,37 – 7,32 (m, 3H; Ph), 7,23 – 7,15 (m, 2H; Ph), 4,82 – 4,75 (m, 1,32 H;

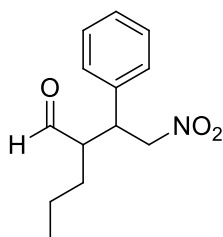
CH₂NO₂), 4,68 (dd, $J = 12,7, 9,3$ Hz, 0,68 H; CH₂NO₂), 3,86 – 3,78 (m, 1H; CHPh), 2,84 – 2,74 (m, 1H; CHCHO), 1,22 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 1,00 (d, $J = 7,3$ Hz, 2H).

Dijastereomerni omjer: 66:34 (Slika 8.)



Slika 8. Dio ¹H NMR spektra produkta **35**

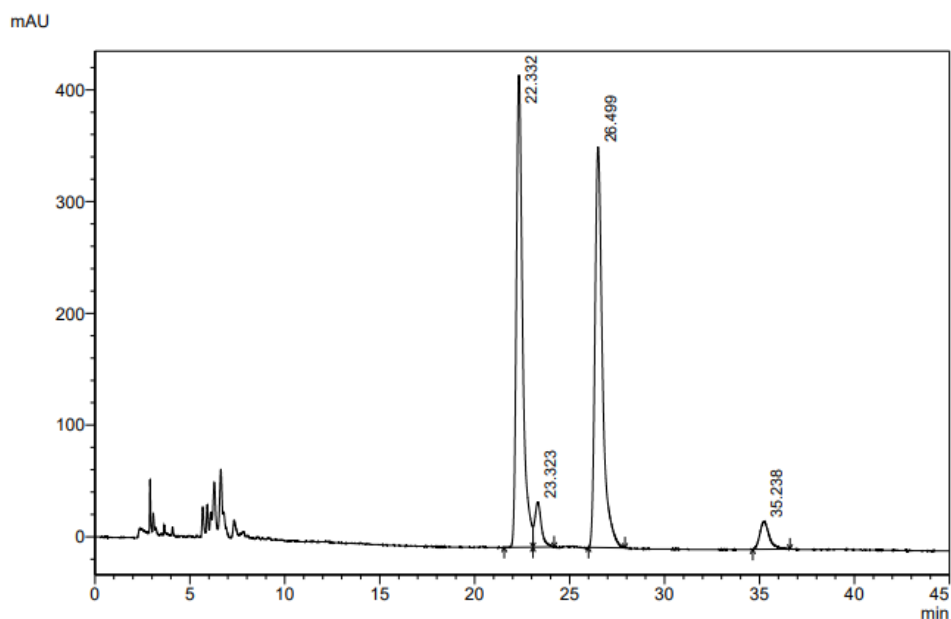
3.9.3. 2-(2-nitro-1-feniletil)pentanal (**36**)



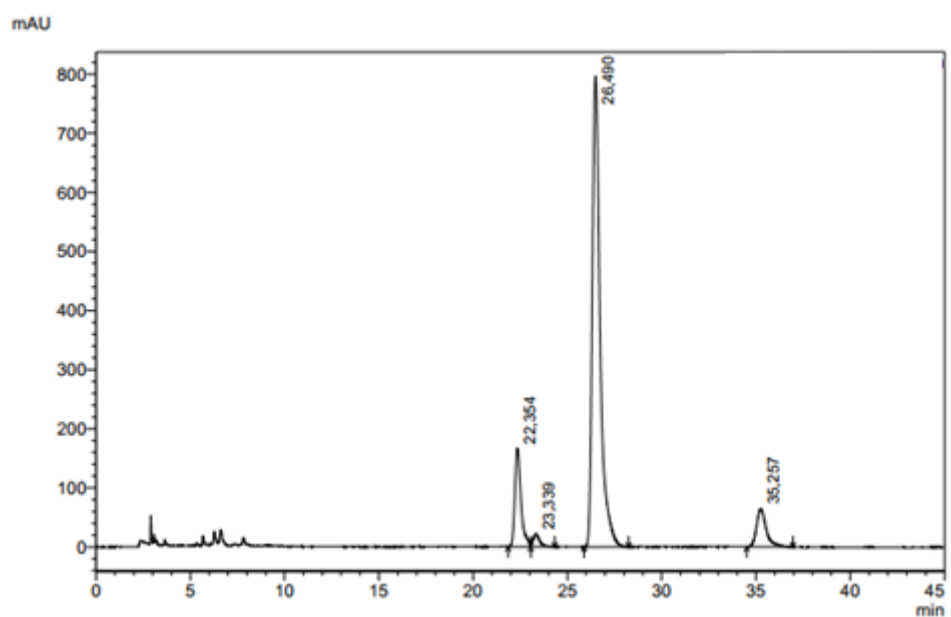
Spoj **36** je pripremljen iz nitrostirena (0,40 mmol) i pentanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,44$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (76 mg; 81 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 86 : 14 e.r. $t_{R1} = 22,4$ min (manjinski), $t_{R2} = 26,5$ min (većinski) (Slika 9.).

a)



b)

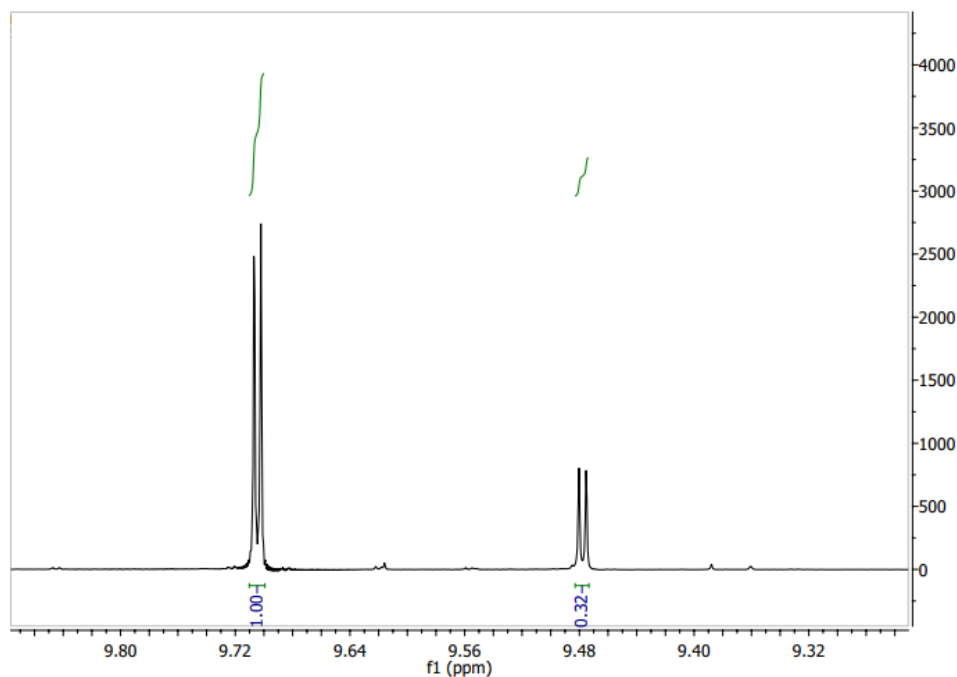


Slika 9. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **36**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **36**. Uvjeti: [Chiralpak IB N-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 95:5, protok 1 mL/min, $\lambda = 205$ nm

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,70 (d, $J = 2,8$ Hz, 0,76 H; CHO), 9,48 (d, $J = 3,0$ Hz, 0,24 H; CHO), 7,35 (m, 3H; Ph), 7,17 (dd, $J = 5,3, 3,3$ Hz, 2H; Ph), 4,78 (dd, $J = 24,4, 7,6$ Hz, 1H), 4,67 (ddd, $J = 22,4, 12,8, 7,4$ Hz, 1H), 3,77 (td, $J = 9,6, 5,2$ Hz, 1H), 2,71 (ddd, $J = 12,5,$

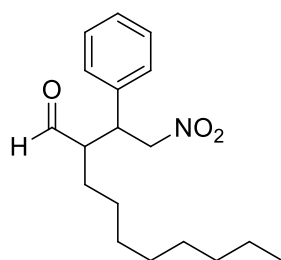
6,2, 3,0 Hz, 1H), 2,66 – 2,61 (m, 1H), 1,51 – 1,44 (m, 1H), 1,39 – 1,29 (m, 3H), 1,18 (ddd, $J = 7,3, 5,4, 2,9$ Hz, 1H), 0,93 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H), 0,80 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H).

Dijastereomerni omjer: 76:24 (Slika 10.)



Slika 10. Dio ^1H NMR spektra produkta **36**

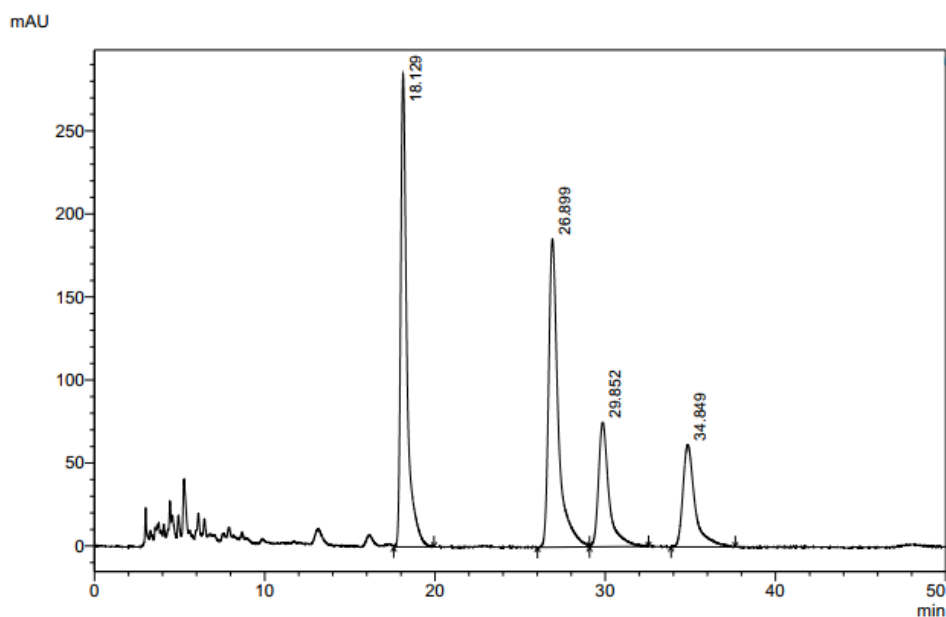
3.9.4. 2-(2-nitro-1-feniletil)dekanal (**37**)



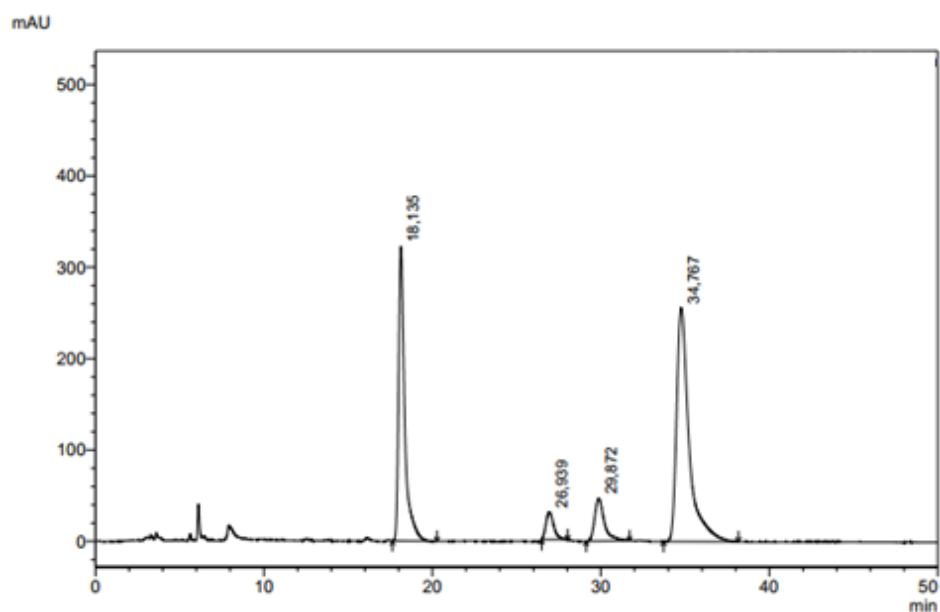
Spoj **37** je pripremljen iz nitrostirena (0,40 mmol) i dekanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brзом tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 5 : 1 ($R_f = 0,40$), spoj je izoliran u obliku svijetlo žutog ulja (101 mg; 79 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 87 : 13 e.r. $t_{R1} = 26,9$ min (manjinski), $t_{R2} = 18,1$ min (većinski) (Slika 11.).

a)



b)

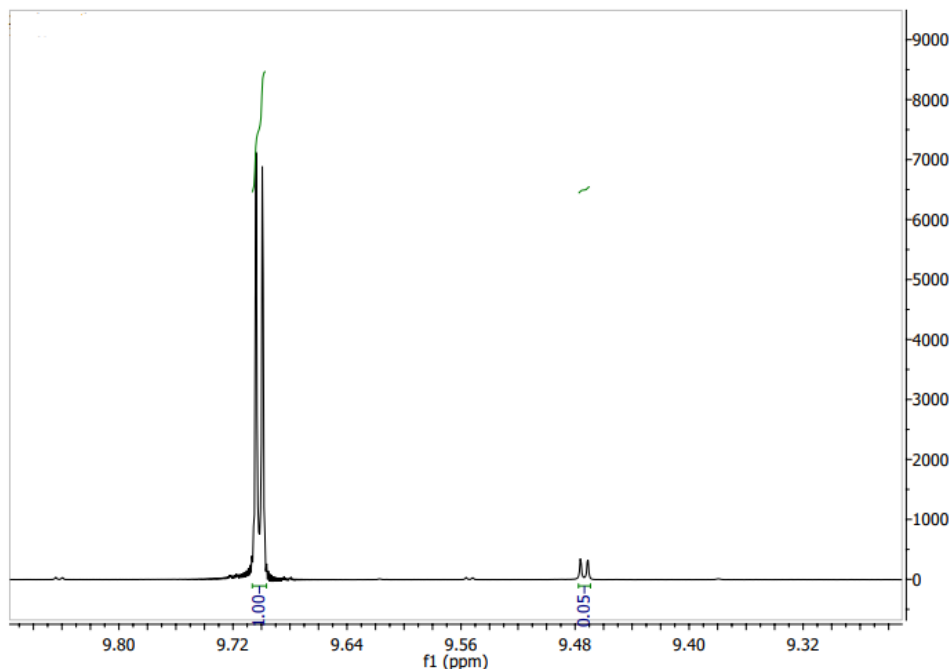


Slika 11. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **37**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **37**. Uvjeti: [Daicel Chiralpack IC-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 95:5, protok 1 mL/min, $\lambda = 205$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,70 (d, $J = 2,7$ Hz, 0,95H; CHO), 9,47 (d, $J = 3,1$ Hz, 0,05H; CHO), 7,36 – 7,28 (m, 3H; Ph), 7,17 (dd, $J = 7,1, 1,4$ Hz, 2H; Ph), 4,70 (dd, $J = 12,8, 5,1$ Hz, 1H; CH_2NO_2), 4,64 (dd, $J = 12,8, 9,7$ Hz, 1H; CH_2NO_2), 3,77 (td, $J = 9,7, 5,1$ Hz, 1H; CHPh), 2,72 – 2,67 (m, 1H; α CHO), 1,48 (m, 1H; β CHO), 1,42 – 1,35 (m, 1H; β CHO), 1,29

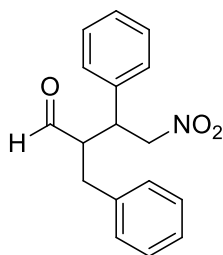
– 1,22 (m, 4H; γ , δ CHO), 1,20 – 1,12 (m, 8H; ϵ , ζ , η , θ CHO), 0,85 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H; CH_3 CHO).

Dijastereomerni omjer: 95:5 (Slika 12.)



Slika 12. Dio ^1H NMR spektra produkta **37**

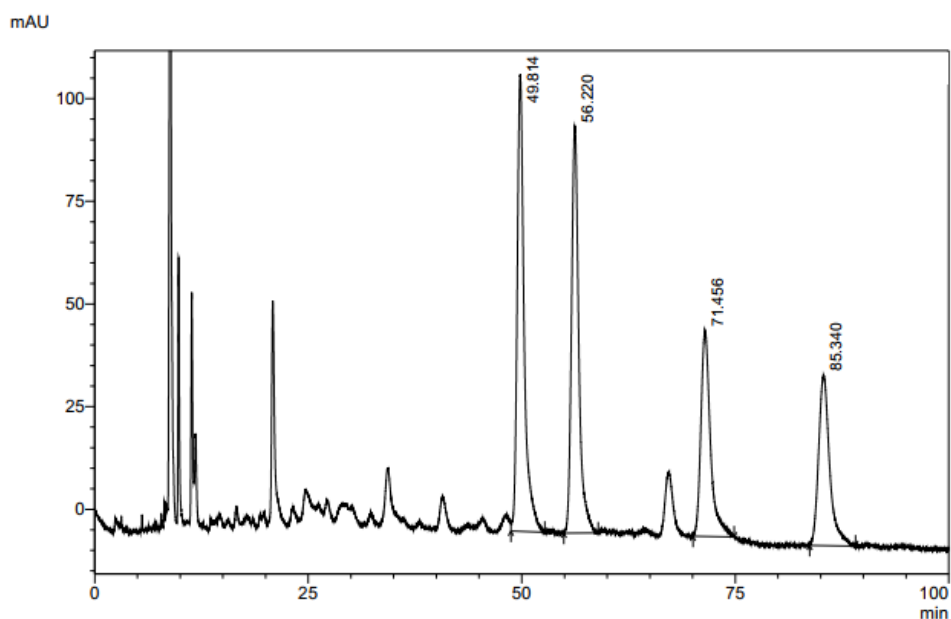
3.9.5. 2-benzil-3-fenil-4-nitrobutanal (**38**)



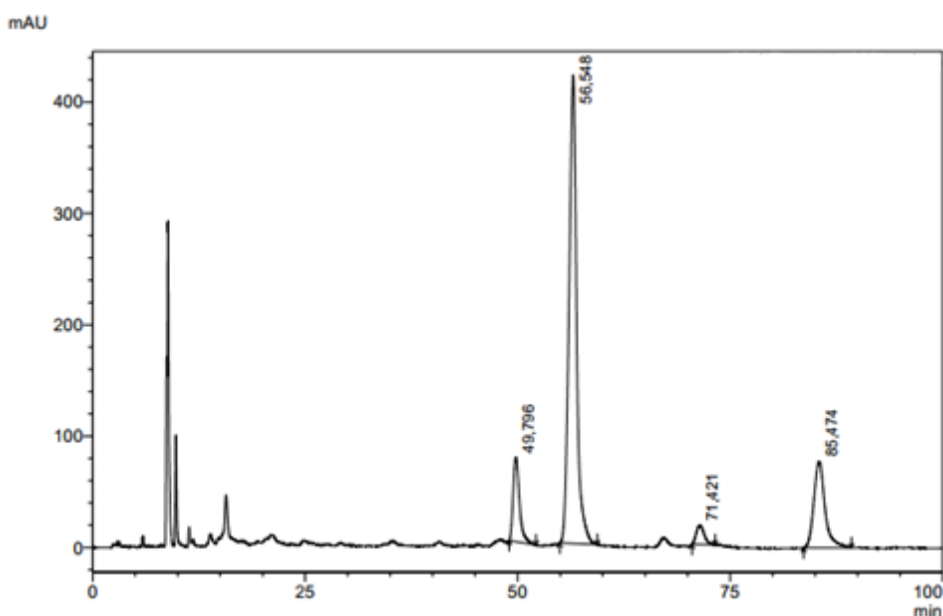
Spoj **38** je pripremljen iz nitrostirena (0,40 mmol) i 3-fenilpropanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,59$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (97 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 88 : 12 e.r. $t_{R1} = 49,8$ min (manjinski), $t_{R2} = 56,5$ min (većinski) (Slika 13.).

a)



b)

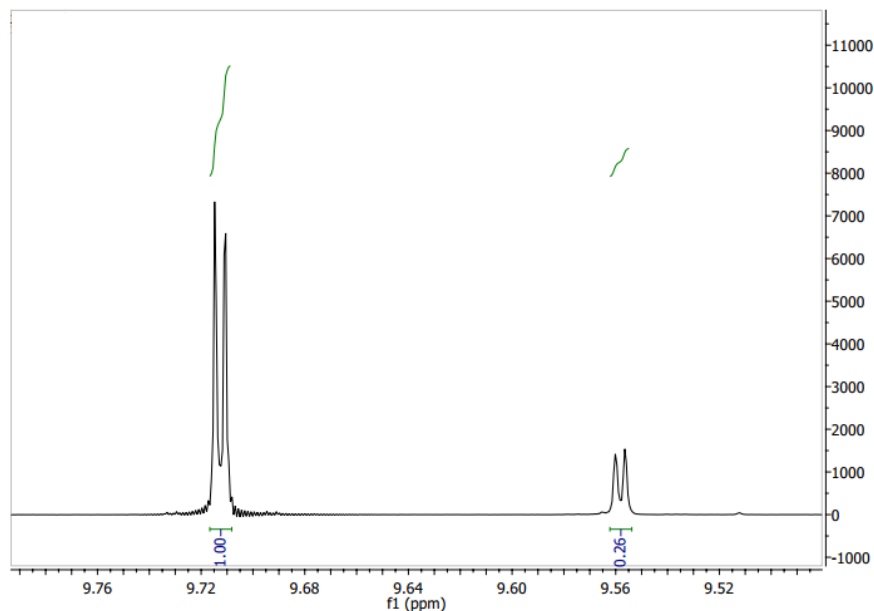


Slika 13. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **38**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **38**. Uvjeti: [Chiralpak IB N-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 93:7, protok 1 mL/min, $\lambda = 204$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,71 (d, $J = 2,3$ Hz, 0,79H; CHO), 9,56 (d, $J = 2,2$ Hz, 0,21H; CHO), 7,39 – 7,17 (m, 8H, Ph), 7,04 – 7,01 (m, 2H; Ph), 4,87 (dd, $J = 13,1, 6,4$ Hz, 0,21H; CH_2NO_2), 4,80 (dd, $J = 13,1, 8,9$ Hz, 0,21H; CH_2NO_2), 4,75 – 4,68 (m, 1,58H; CH_2NO_2), 3,82 (td, $J = 8,9, 5,8$ Hz, 1H; CHPh), 3,11 (tdd, $J = 9,0, 5,5, 2,3$ Hz, 0,79H; CHCHO),

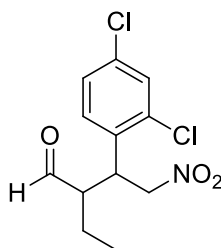
3,05 (ddd, $J = 7,8, 5,4, 2,3$ Hz, 0,21H; CHCHO), 3,01 (dd, $J = 13,8, 8,7$ Hz, 0,21H; CH₂Ph), 2,88 (dd, $J = 13,8, 5,8$ Hz, 0,21H; CH₂Ph), 2,81 – 2,72 (m, 1,58H; CH₂Ph).

Dijastereomerni omjer: 79:21 (Slika 14.)



Slika 14. Dio ¹H NMR spektra produkta **38**

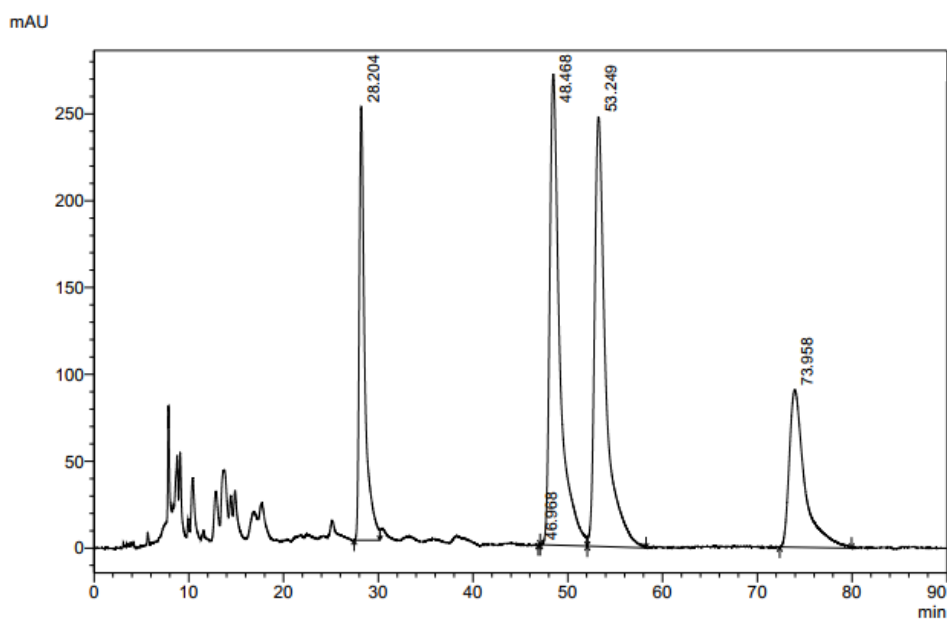
3.9.6. 3-(2,4-diklorfenil)-2-etil-4-nitrobutanal (**39**)



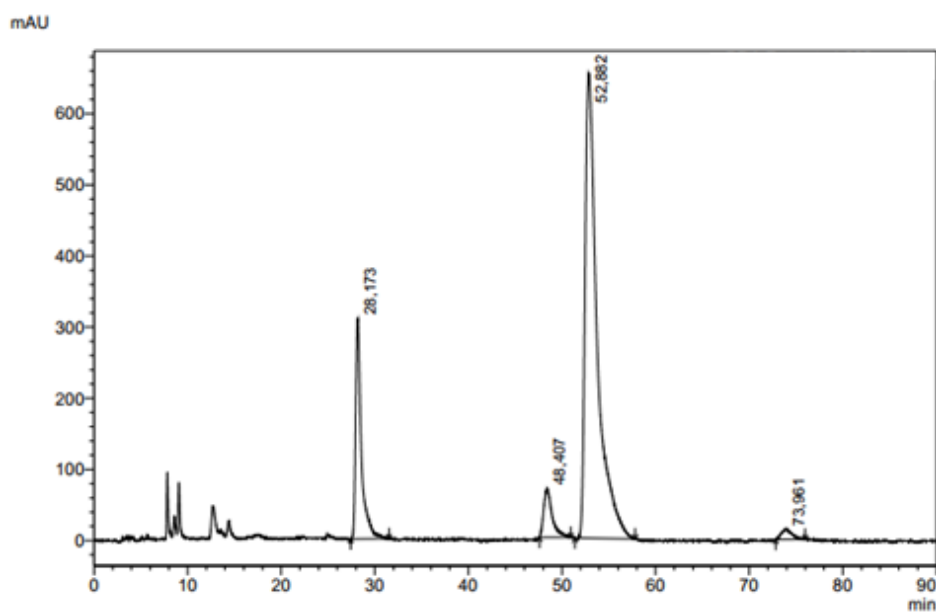
Spoj **39** je pripravljen iz (*E*)-2,4-diklor-1-(2-nitrovinil)benzena (0,40 mmol) i butanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,51$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (97 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 93:7 e.r. $t_{R1} = 48,4$ min (manjinski), $t_{R2} = 52,9$ min (većinski) (Slika 15.).

a)



b)

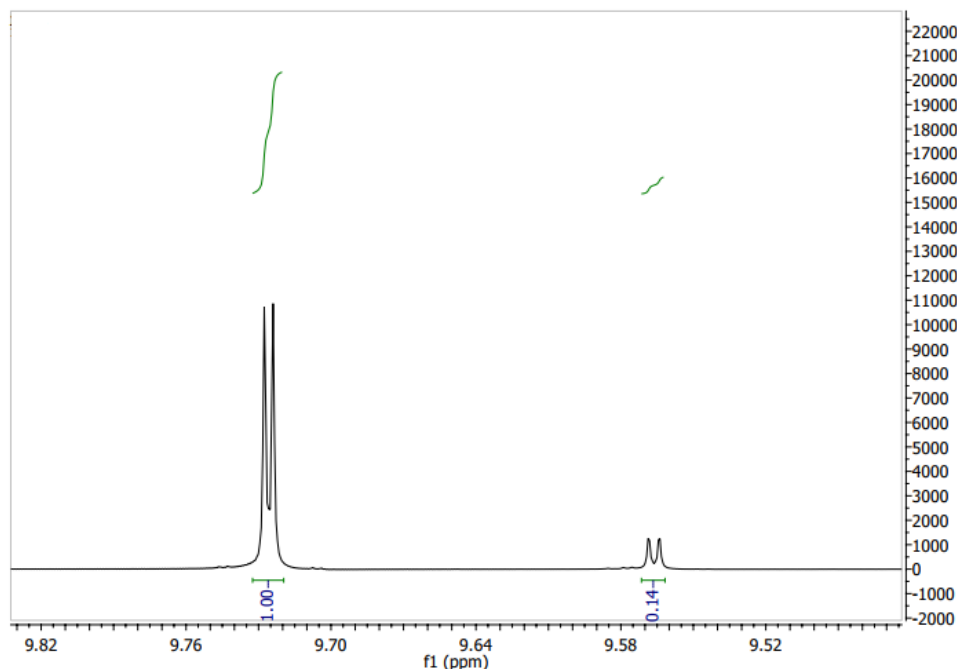


Slika 15. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **39**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **39**. Uvjeti: [Daicel Chiralpack IC-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 97:3, protok 1 mL/min, $\lambda = 202$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,73 (d, $J = 2,1$ Hz, 0,88H; CHO), 9,57 (d, $J = 2,6$ Hz, 0,12H; CHO), 7,44 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H; Ph), 7,28 – 7,25 (m, 1H; Ph), 7,17 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H; Ph), 4,85 (dd, $J = 13,1, 9,2$ Hz, 1H; CH_2NO_2), 4,68 (dd, $J = 13,1, 4,5$ Hz, 1H; CH_2NO_2), 4,41 (d, $J = 6,2$ Hz, 0,12H; CHPh), 4,30 (td, $J = 9,4, 4,4$ Hz, 0,88H; CHPh), 2,93 (m, 0,88H;

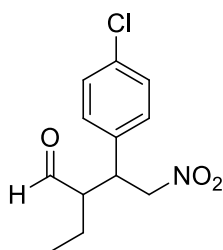
CHCHO), 2,77 (m, 0,12H; CHCHO), 1,75 – 1,71 (m, 0,24H; CH₂CH₃), 1,60 – 1,53 (m, 1,76H; CH₂CH₃), 0,99 (t, $J = 7,5$ Hz, 0,36H; CH₃), 0,88 (t, $J = 7,5$ Hz, 2,64H; CH₃).

Dijastereomerni omjer: 88:12 (Slika 16.)



Slika 16. Dio ¹H NMR spektra produkta **39**

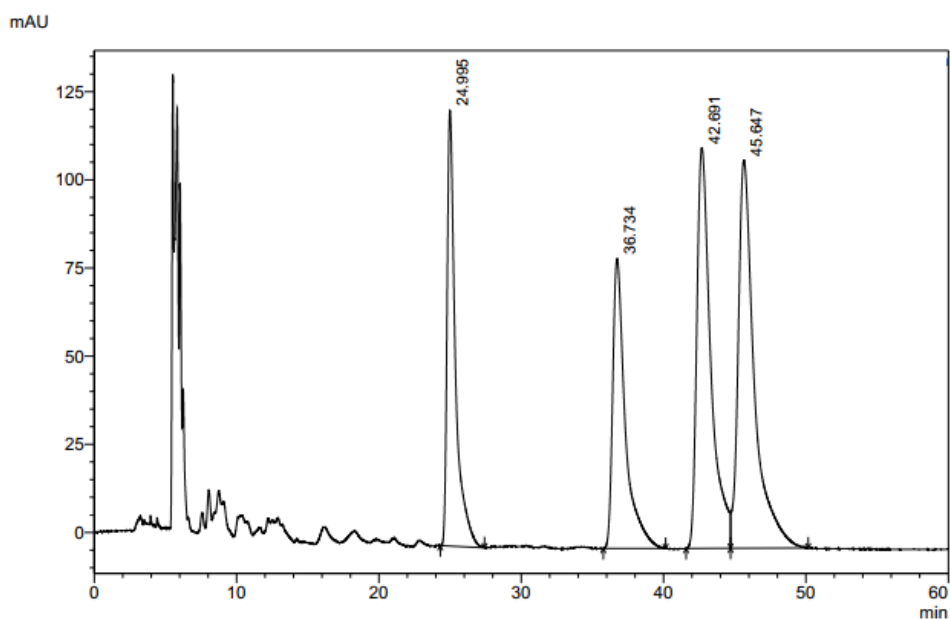
3.9.7. 2-etil-3-(4-klorofenil)-4-nitrobutanal (**40**)



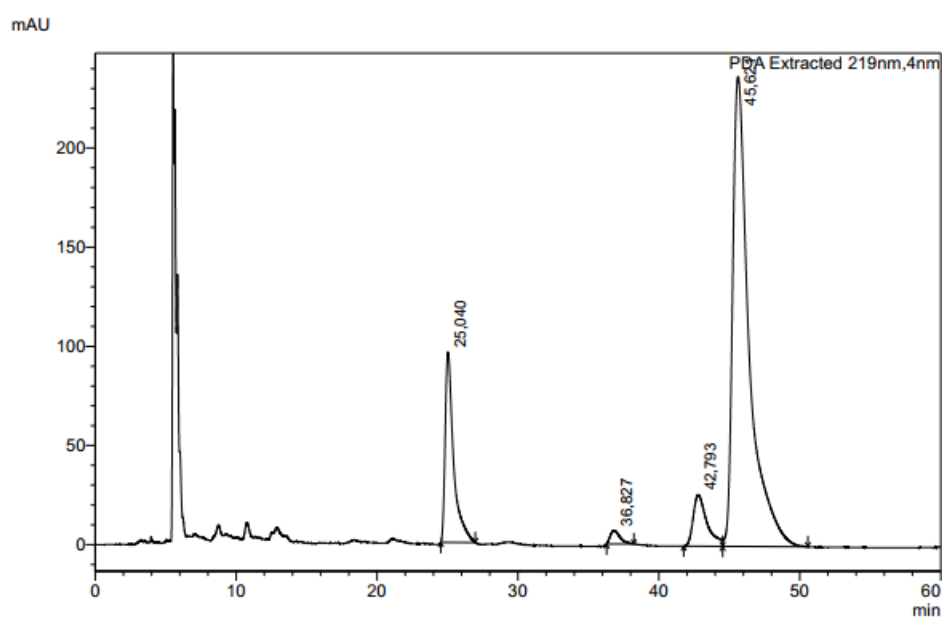
Spoj **40** je pripravljen iz (*E*)-1-klor-4-(2-nitrovinil)benzena (0,40 mmol) i butanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,44$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (89 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 92:8 e.r. $t_{R1} = 42,8$ min (manjinski), $t_{R2} = 45,6$ min (većinski) (Slika 17.).

a)



b)

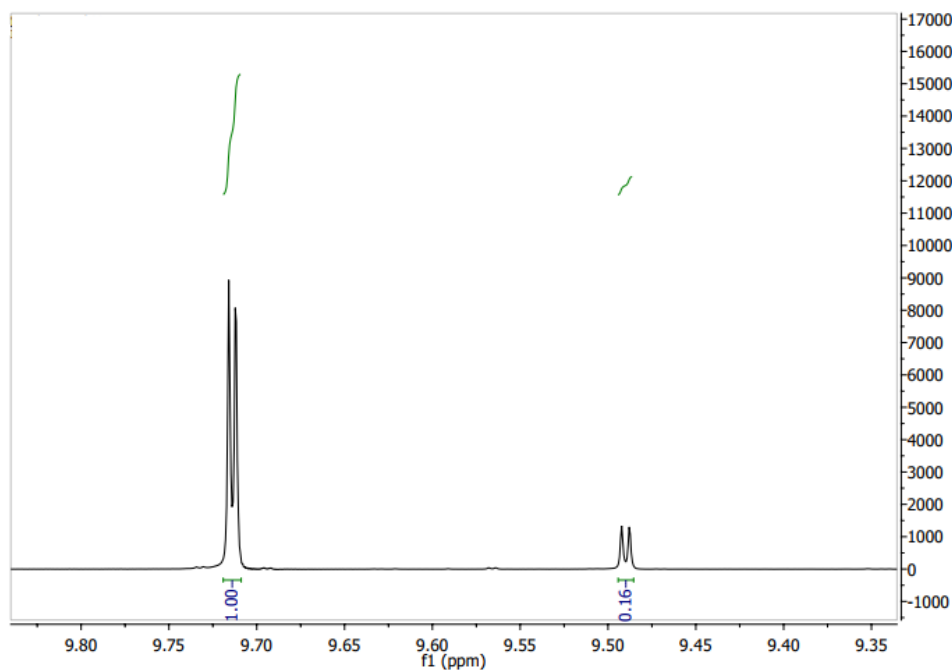


Slika 17. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **40**; b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **40**. Uvjeti: [Daicel Chiralpack IC-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 93:7, protok 1 mL/min, $\lambda = 219$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,71 (d, $J = 2,3$ Hz, 0,86H; CHO), 9,49 (d, $J = 2,6$ Hz, 0,14H; CHO), 7,34 – 7,30 (m, 2H; Ph), 7,15 – 7,12 (m, 2H; Ph), 4,79 (dd, $J = 13,0, 5,8$ Hz, 0,14H; CH_2NO_2), 4,72 (dd, $J = 12,8, 4,7$ Hz, 0,86H; CH_2NO_2), 4,60 (dd, $J = 12,8, 10,0$ Hz, 1H; CH_2NO_2), 3,78 (td, $J = 9,9, 4,7$ Hz, 1H; CHPh), 2,70 – 2,64 (m, 0,86H; CHCHO), 2,62 – 2,56

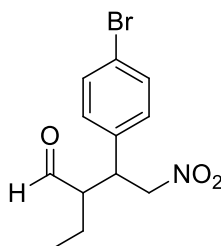
(m, 0,14H: CHCHO), 1,58 – 1,44 (m, 2H; CH₂CH₃), 1,00 (t, $J = 7,5$ Hz, 0,42H; CH₃), 0,84 (t, $J = 7,5$ Hz, 2,58H; CH₃).

Dijastereomerni omjer: 86:14 (Slika 18.)



Slika 18. Dio ¹H NMR spektra produkta **40**

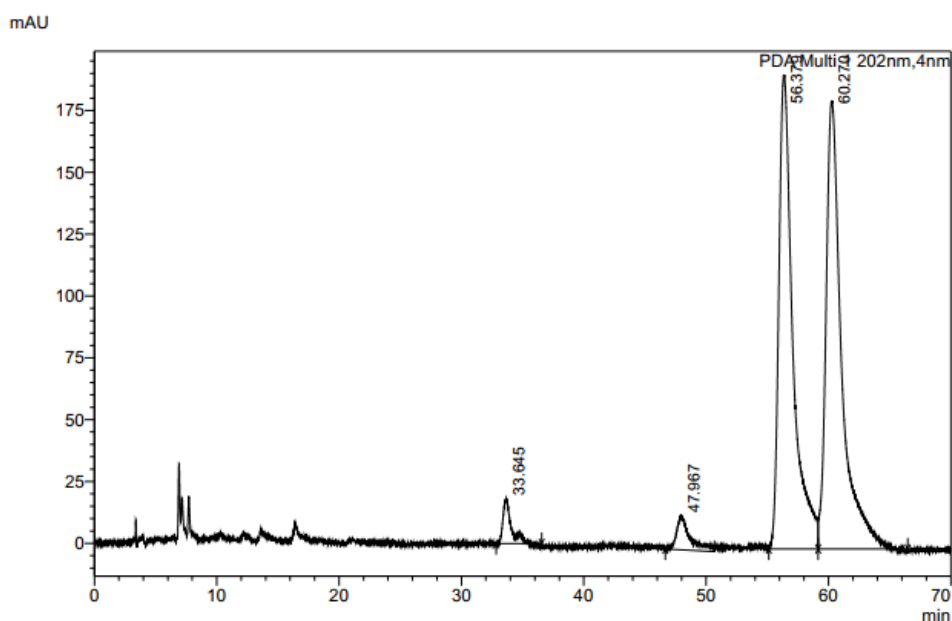
3.9.8. 3-(4-bromofenil)-2-etil-4-nitrobutanal (**41**)



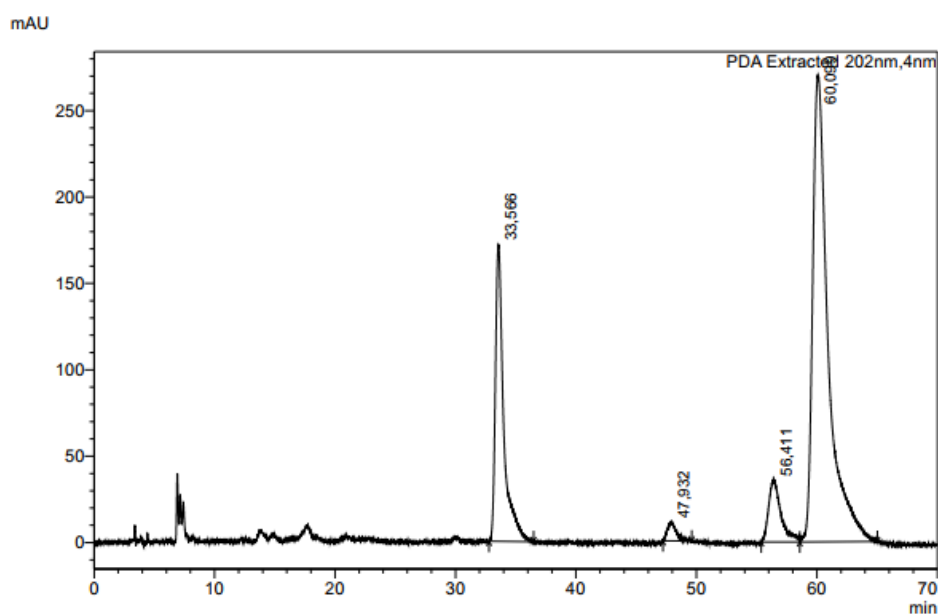
Spoj **41** je pripravljen iz (*E*)-1-brom-4-(2-nitrovinil)benzena (0,40 mmol) i butanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,44$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (89 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. 92:8 e.r. $t_{R1} = 33,6$ min (manjinski), $t_{R2} = 47,9$ min (većinski) (Slika 19.).

a)



b)

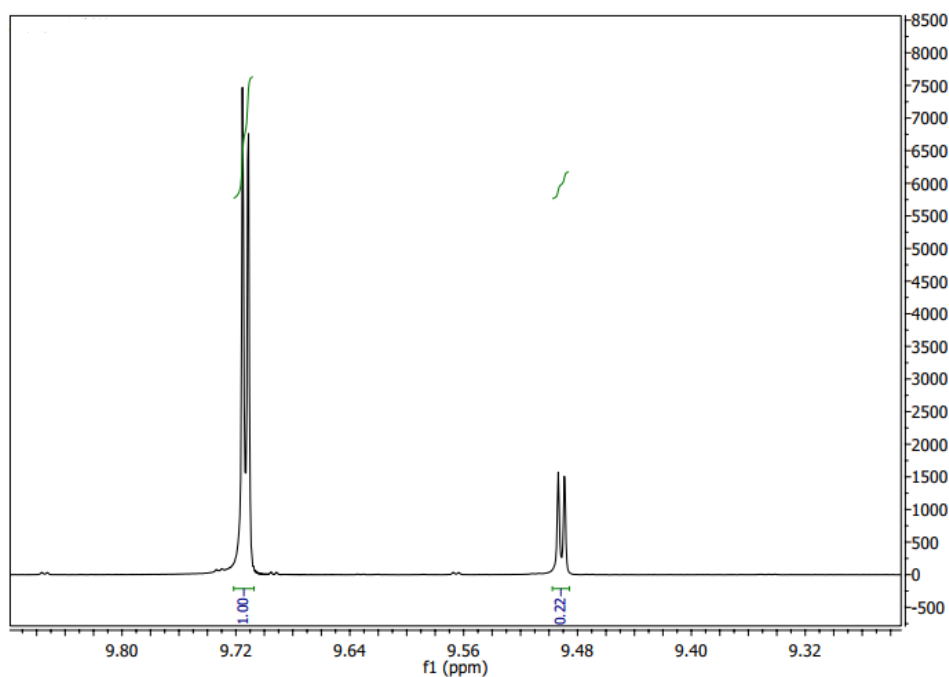


Slika 19. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **41** b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **41**. Uvjeti: [Daicel Chiralpack IC-3 (25 cm × 0,46 cm)], heksan:izopropanol 95:5, protok 1 mL/min, $\lambda = 202$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,71 (d, $J = 2,4$ Hz, 0,82H; CHO), 9,49 (d, $J = 2,6$ Hz, 0,18H; CHO), 7,48 (d, $J = 8,4$ Hz, 1,64H; Ph), 7,46 (d, $J = 8,5$ Hz, 0,36H; Ph), 7,07 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H; Ph), 4,79 (dd, $J = 13,0, 5,8$ Hz, 0,36H; CH_2NO_2) 4,72 (dd, $J = 12,8, 4,7$ Hz, 1,64H;

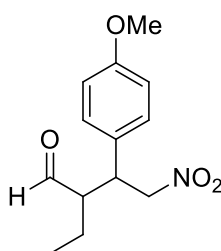
CH₂NO₂), 4,60 (dd, $J = 12.8, 9.9$ Hz, 1H; CH₂NO₂), 3,77 (td, $J = 9.9, 4.6$ Hz, 1H; CHPh), 2,67 (m, 0,82H; CHCHO), 2,58 (dtd, $J = 8.7, 4.9, 2.5$ Hz, 0,18H; CHCHO), 1,57 – 1,45 (m, 2H; CH₂CH₃), 1,00 (t, $J = 7.5$ Hz, 0,54H; CH₃), 0,84 (t, $J = 7.5$ Hz, 2,46H; CH₃).

Dijastereomerni omjer: 82:18 (Slika 20.)



Slika 20. Dio ¹H NMR spektra produkta **41**

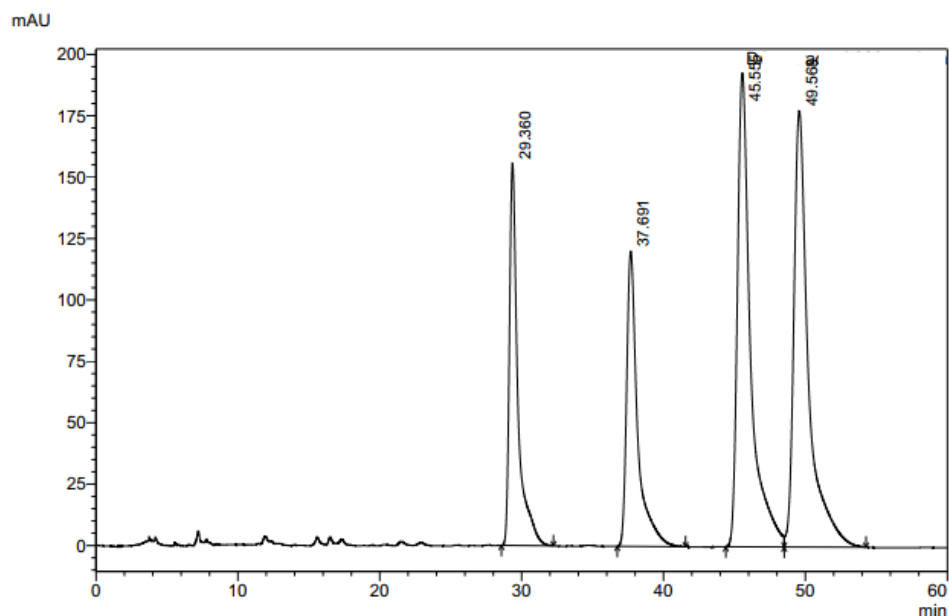
3.9.9. 2-etil-3-(4-metoksifenil)-4-nitrobutanal (**42**)



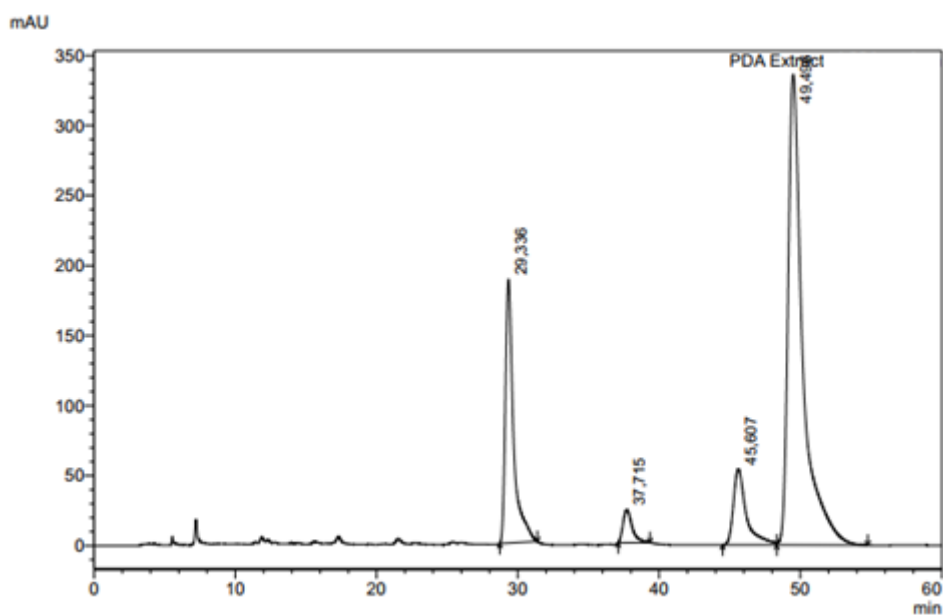
Spoj **42** je pripravljen iz (*E*)-1-metoksi-4-(2-nitrovinil)benzena (0,40 mmol) i butanala (3 ekv.) prema općenitom propisu G. Nakon pročišćavanja brzom tekućinskom kromatografijom u sustavu otapala PE : EtOAc = 3 : 1 ($R_f = 0,41$), spoj je izoliran u obliku svijetložutog ulja (84 %).

Enantiomerni omjer određen je pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: 88:12 e.r. $t_{R1} = 45,6$ min (manjinski), $t_{R2} = 49,5$ min (većinski) (Slika 21.).

a)



b)

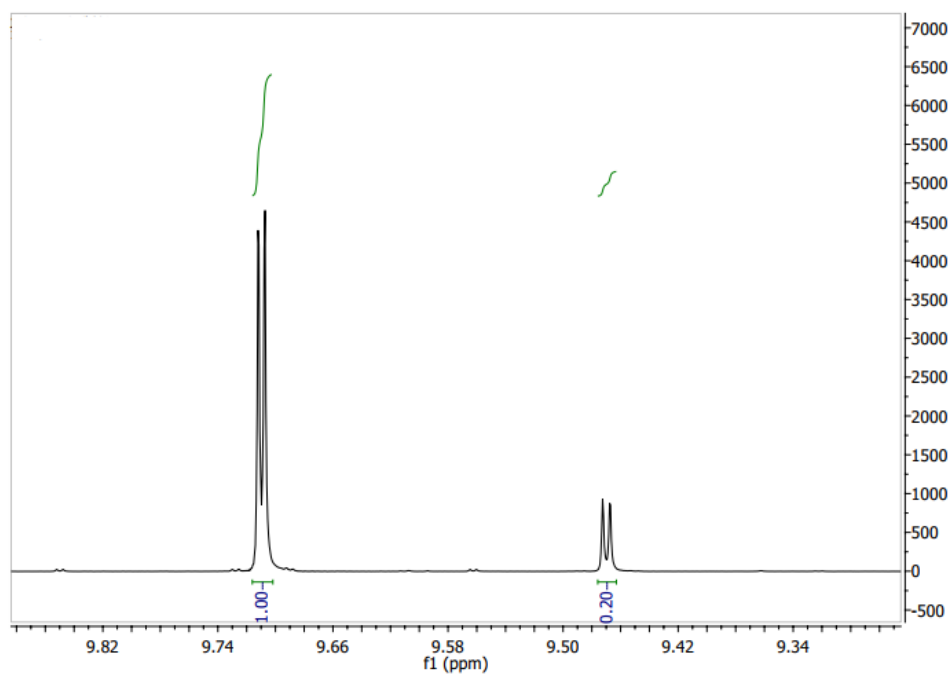


Slika 21. a) HPLC kromatogram racemičnog produkta **42** b) HPLC kromatogram enantioselektivnog produkta **42**. Uvjeti: [Daicel Chiralpack IC-3 (0,46 cmI.D. x 25 cmL)], heksan:izopropanol 85:15, protok 0,8 mL/min, $\lambda = 202$ nm.

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ / ppm: 9,71 (d, $J = 2,7$ Hz, 0,83H; CHO), 9,47 (d, $J = 3,0$ Hz, 0,17H; CHO), 7,09 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H; Ph), 6,88 – 6,83 (m, 2H; Ph), 4,78 (dd, $J = 12,8, 5,9$ Hz,

0,17H; CH₂NO₂), 4,73 – 4,67 (m, 1H; CH₂NO₂), 4,58 (dd, $J = 12,5, 9,9$ Hz, 0,83H; CH₂NO₂), 3,78 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H; OCH₃), 3,74 (td, $J = 9,9, 4,8$ Hz, 1H; CHPh), 2,63 (m, Hz, 0,83H; CHCHO), 2,55 – 2,51 (m, 0,17H; CHCHO), 1,56 – 1,45 (m, 2H; CH₂CH₃), 0,98 (t, $J = 7,5$ Hz, 0,51H; CH₃), 0,83 (t, $J = 7,5$ Hz, 2,49H; CH₃).

Dijastereomerni omjer: 83:17 (Slika 22.)

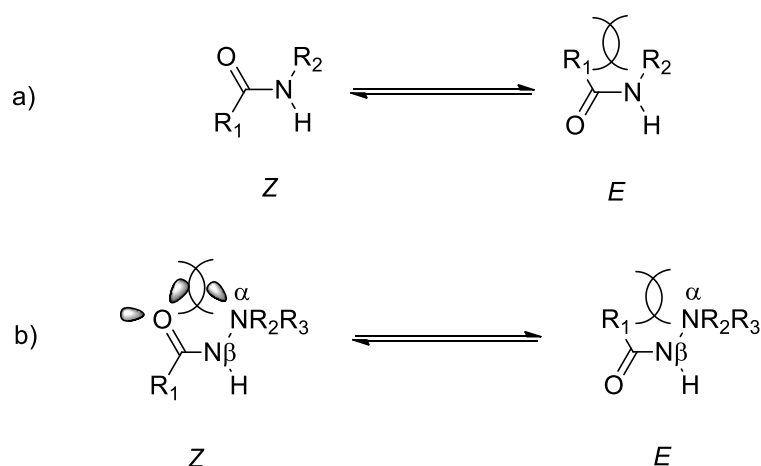


Slika 22. Dio ¹H NMR spektra produkta **42**

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

Budući da dosadašnja istraživanja kratkih peptidnih katalizatora ne bilježe sustavno istraživanje uloge neproteinogenih (nekanonskih) aminokiselina u podešavanju njihove katalitičke funkcije, odlučili smo poblizje ispitati utjecaj α -hidrazinokiselina dobivenih iz triju odabranih hidrofobnih aminokiselina, valina, leucina i fenilalanina.

Kod klasičnih amidnih veza *Z*-izomer (*trans*) znatno je stabilniji od *E*-izomera (*cis*), što je posljedica steričkog ometanja između supstituenata u *E*-izomeru (Slika 23.a). Slična *Z/E* izomerizacija pojavljuje se i kod hidrazidnih veza, što je otkriveno još 1970-ih godina. Međutim, tada su se zaključci uglavnom temeljili na promjeni polariteta otapala u NMR analizama i usporedbi sa steričkim efektima poznatima iz amidnih sustava. Nedostatke takvog pristupa prvi je uočio Knapp, koji je ukazao na to da na ravnotežu između *Z* i *E* izomera kod hidrazida, osim steričkih faktora, utječe i odbijanje između slobodnih elektronskih parova kisika i dušika koje se javlja u *Z*-izomeru (Slika 23.b). Ova su saznanja kasnije primijenjena na proučavanje konformacija pseudopeptida građenih od hidrazino- i α -aminokiselina.^{81,82}



Slika 23. a) *Z/E* ravnoteža kod primarnih amida; b) *Z/E* ravnoteža hidrazidne veze

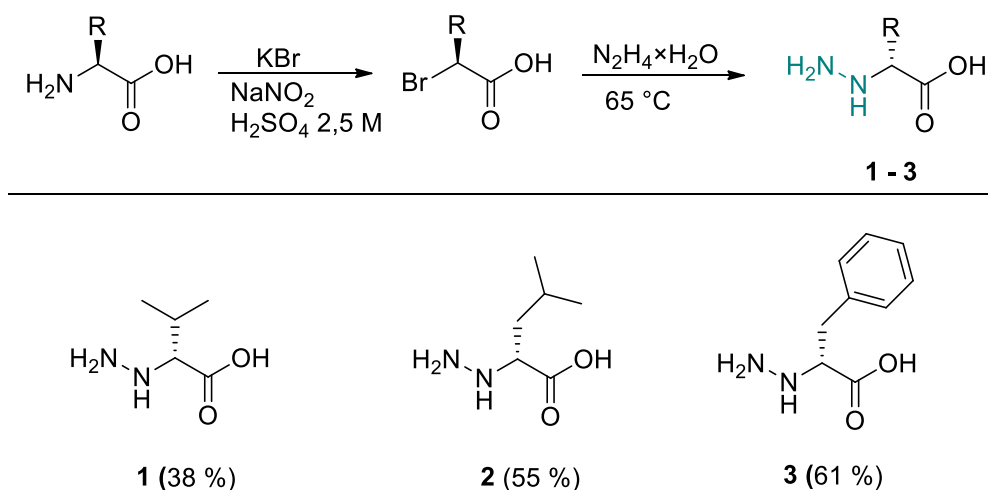
Schnitzer i Wennemers zamijenili su α -aminokiselinu analogom β^3 -aminokiseline u peptidnom katalizatoru H-D-Pro-Pro-Glu-NH₂ te pokazali da učinak na konformaciju i katalitičku učinkovitost ovisi o mjestu zamjene. Dok su zamjene na srednjem i C-terminalnom položaju bile prihvatljive, modifikacija na N-terminusu značajno je narušila stereo-selektivnost.⁸³ Zbog

toga smo prilikom razvoja peptidnih katalizatora odlučili ugraditi α -hidrazinokiselinu na C-terminalni kraj te smo pripremili malu seriju tripeptida opće strukture H-Pro-Pro-D-hXaa-R. Pripremljeni tripeptidi sadrže dvije veze koje mogu pokazivati izomeriju: Pro-Pro vezu i hidrazidnu vezu između Pro i hXaa, što omogućuje stvaranje različitih sekundarnih struktura. Odabrali smo hidrofobne aminokiseline valin, leucin i fenilalanin kako bismo isključili utjecaj polarnih bočnih lanaca i usredotočili se na ulogu hidrazidnih skupina u interakciji između katalizatora i supstrata. Budući da i funkcijska skupina na C-terminusu može utjecati na vezanje i orijentaciju supstrata, pripremili smo tripeptide s esterskom, kiselinskom i amidnom krajnjom skupinom.

U okviru ove doktorske disertacije istražili smo potencijal dipeptida i tripeptida s α -hidrazino kiselinom kao katalizatora u reakciji 1,4-adicije aldehida na nitroolefine. Sukladno iznesenim ciljevima istraživanja u raspravi su predloženi rezultati kroz tri zasebne cjeline. Istraživanje u prvoj cjelini „*Priprava derivata hidrazinokiselina*“ uključuje dizajn supstrata koji će poslužiti kao prekursori u sintezi kroz preostale dvije cjeline. U drugoj cjelini „*Dipeptidi i njihova katalitička aktivnost*“ opisan je sintetski put pripreme *dipeptida tipa* Pro-D-hXaa-R' i njihova katalitička aktivnost na modelnoj reakciji 1,4-adicije butanala na nitrostiren. Kroz treću cjelinu „*Tripeptidi i njihova katalitička aktivnost*“ opisan je sintetski put pripreme tripeptida tipa Pro-Pro-D-hXaa-R' čija je katalitička aktivnost provjerena na već spomenutoj modelnoj reakciji. Nakon prikupljanja rezultata napravljeno je optimiranje uvjeta i probir supstrata.

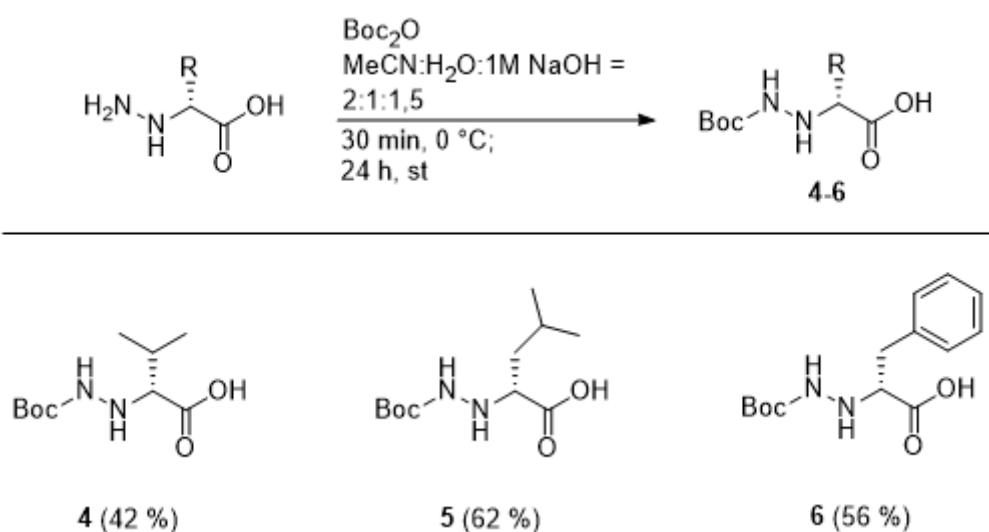
4.1. Priprava α -hidrazinokiselina

Za dobivanje nezaštićenih α -hidrazinokiselina korištena je metoda nukleofilne supstitucije α -bromokiselina. Sinteza se provodi u dva koraka. Prvi korak uključuje diazotaciju amino-skupine L-aminokiseline i prevođenje u α -bromokiselinu u kiselim uvjetima uz NaNO_2 i KBr. Drugi korak uključuje nukleofilnu supstituciju α -bromokiseline hidrazinom. Reakcija se odvija $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmom te dolazi do inverzije konfiguracije. Reakcija je provedena na $60\text{ }^\circ\text{C}$ u ultrazvučnoj kupelji kroz sat vremena, a iskorištenja reakcija kreću se u rasponu 30–60 % (Shema 14.). Premda je u literaturi u nekim slučajevima zabilježena nepotpuna konverzija, prvenstveno kod sterički manje zahtjevnih bočnih lanaca, α -hidrazinoderivati valina, leucina i fenilalanina dobiveni su optički čisti.



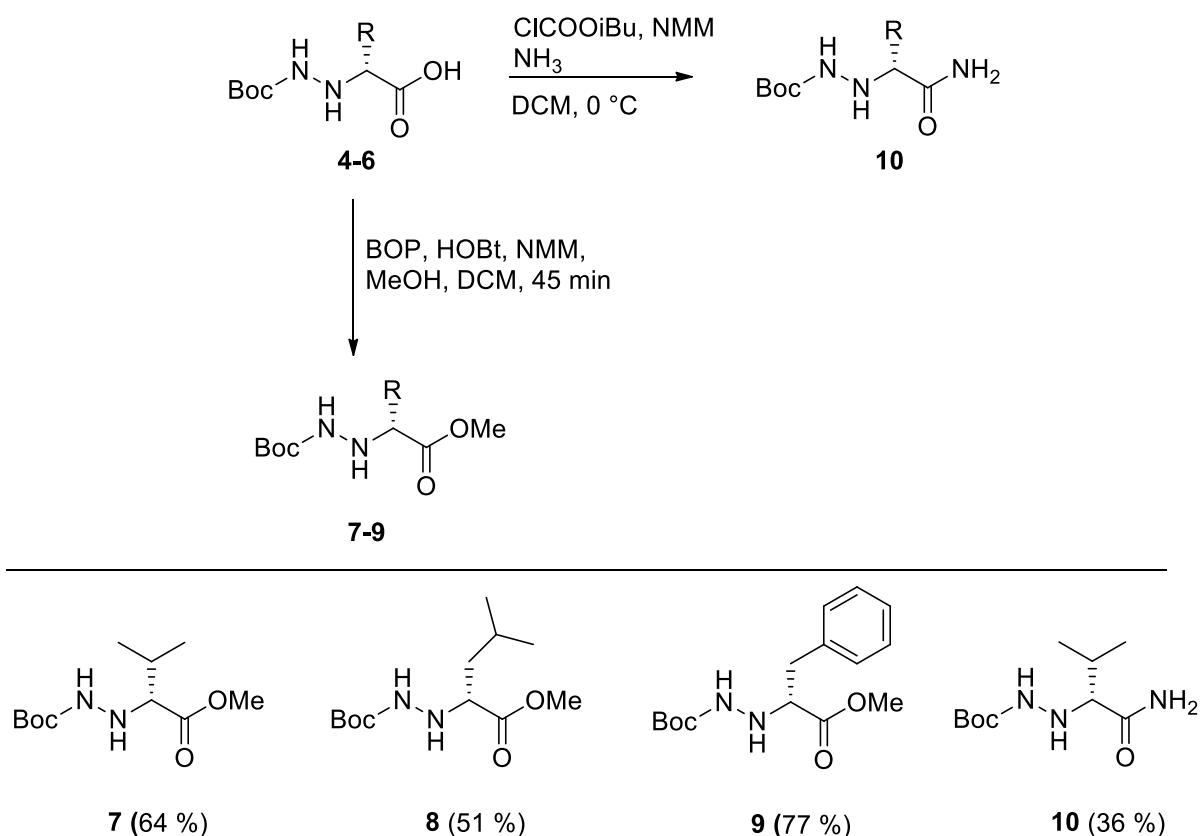
Shema 14. Priprava optički čistih hidrazino-derivata α -aminokiselina

Ovaj sintetski pristup omogućava naknadno uvođenje zaštitnih skupina na N^β položaj α -hidrazinokiselina. Na taj način pripremljene su α -hidrazinokiseline s Boc zaštitnom skupinom na N^β atomu **4-6** (Shema 15.). Uvođenje Boc zaštitne skupine na N^β atom provodi se korištenjem di-*tert*-butil dikarbonata u baznim uvjetima. Glavne prednosti Boc zaštitne skupine su stabilnost u neutralnim i blago kiselim uvjetima te jednostavno uklanjanje pomoću TFA ili HCl u organskom otapalu što omogućuje nastavak sinteze nakon zaštite. Boc zaštitna skupina omogućila je daljnju kontroliranu funkcionalizaciju hidrazinoderivata α -aminokiselina.



Shema 15. Priprava α -hidrazinokiselina s Boc zaštitnom skupinom na N^β atomu

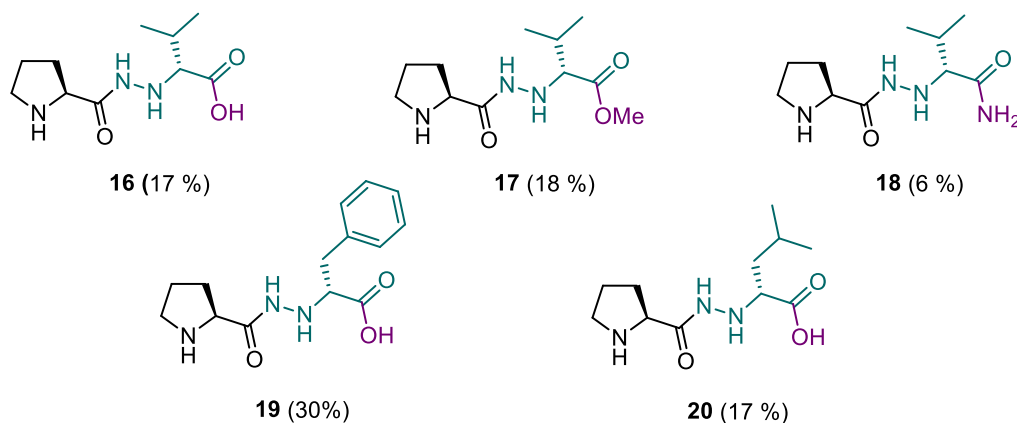
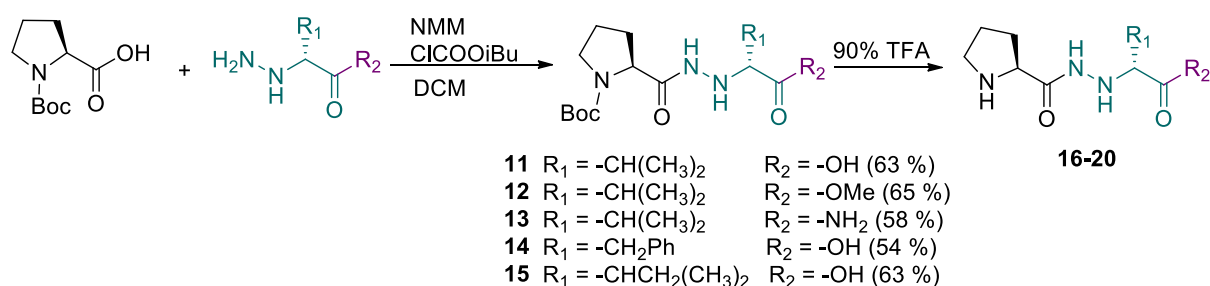
U pripravljenim hidrazinoderivatima α -aminokiselina funkcionaliziran je karboksilni kraj esterifikacijom i amidacijom. Reakcija esterifikacije provedena je uz aktivacijske reagense BOP i HOBt te uz alkohol metanol u suvišku čime su dobiveni produkti **7-9** u prinosima od 51–77 %. U procesu amidacije za aktivaciju karboksilne skupine korištena je metoda mješovitog anhidrida, a kao aminokomponenta korištena je 25 %-tna otopina amonijaka. Dobiven je produkt **10** u prinosu 36 % (Shema 16.).



Shema 16. Funkcionalizacija α -hidrazinokiselina na C-terminusu

4.2. Priprava i katalitička aktivnost dipeptida tipa H-Pro-D-hXaa-R'

Za sintezu dipeptida tipa H-Pro-D-hXaa-R' korišteni su standardni postupci opisani u literaturi. Prije kondenzacije prolina s prethodno pripremljenim i deprotektiranim hidrazinoderivatima α -aminokiselina, aminoskupina prolina zaštićena je Boc zaštitnom skupinom, dok je karboksilna skupina aktivirana metodom mješovitog anhidrida. Reakcija je provedena u organskom otapalu pri sobnoj temperaturi. Boc zaštićeni dipeptidi **11–15** dobiveni su u prinosima 54–65 %. Po završetku sinteze svi Boc zaštićeni dipeptidi su deprotektirani 90 %-tnom TFA te izolirani kao TFA soli **16–20** u kvantitativnom prinosu (Shema 17.).



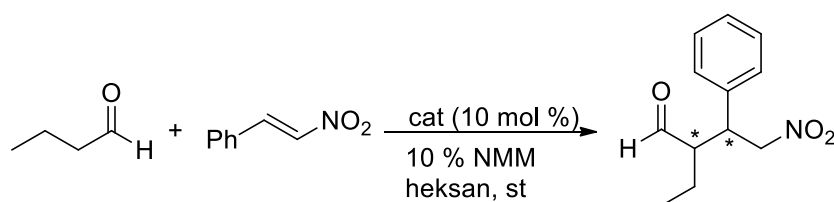
Shema 17. Priprava dipeptida tipa H-Pro-D-hXaa-R' uklanjanjem Boc-zaštite s prolina

Dipeptidi **16–20** testirani su kao katalizatori u reakciji konjugirane adicije između butanala i nitrostirena. Prinosi ispitane reakcije bili su niski do umjereni, a enantioselektivnost slaba (Tablica 1.). Razloge slabe katalitičke aktivnosti dipeptida možemo tražiti u njihovoj strukturnoj jednostavnosti. Naime, dipeptidi se sastoje od samo dvije aminokiseline, što znači da imaju manju sposobnost oblikovanja stabilnih konformacija koje su potrebne za učinkovitu katalizu, a nedostatak intramolekulskih interakcija smanjuje njihovu sposobnost stabilizacije

prijelaznih stanja tijekom reakcije. Zbog manjka intramolekularnih interakcija dipeptidi mogu biti nedovoljno strukturno definirani što može dovesti do slabije kontrole nad reaktivnošću pogotovo kada je riječ o preciznom pozicioniranju reaktanata u katalitičkom kompleksu. Osim toga, kod dipeptida katalitička aktivnost većinom ovisi o jednoj funkcijskoj skupini, dok kod peptida s većim brojem aminokiselina mogu postojati dodatne funkcijske skupine koje djeluju sinergijski, što poboljšava katalitičku aktivnost i selektivnost.

Vodeći se pretpostavkom da su veći peptidi sličniji enzimima daljnje istraživanje usmjerili smo prema tripeptidima tipa Pro-Pro-D-hXaa-R'.

Tablica 1. Katalitička aktivnost dipeptida u reakciji konjugirane adicije između butanala i nitrostirena

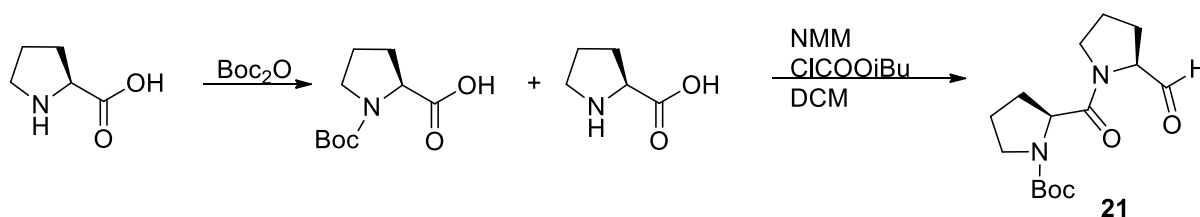


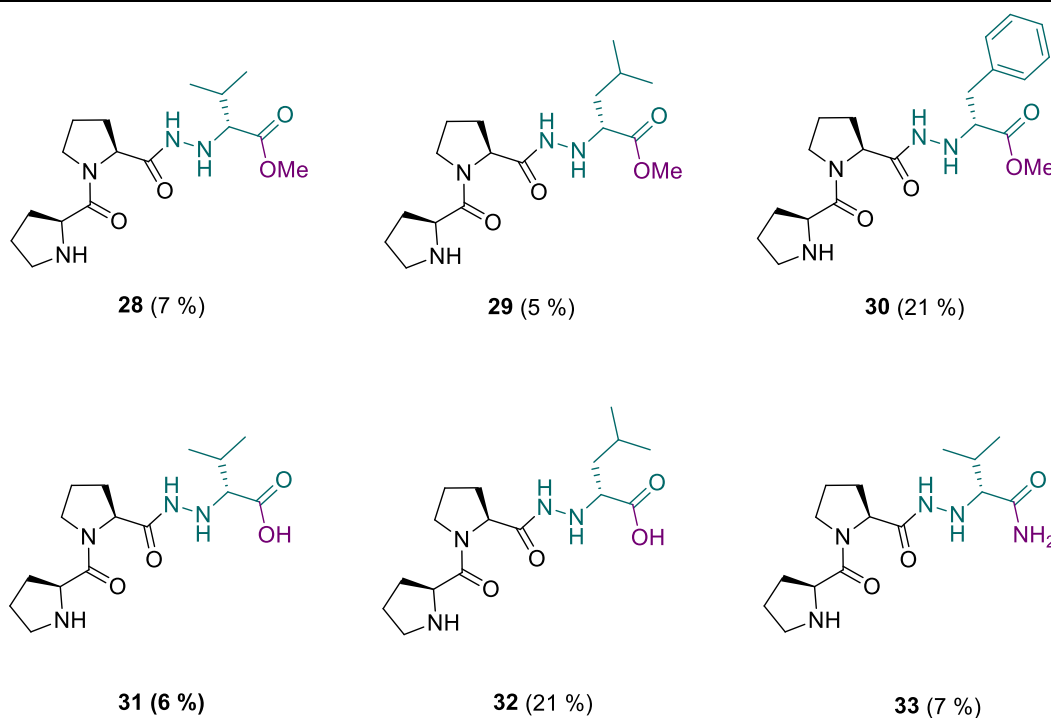
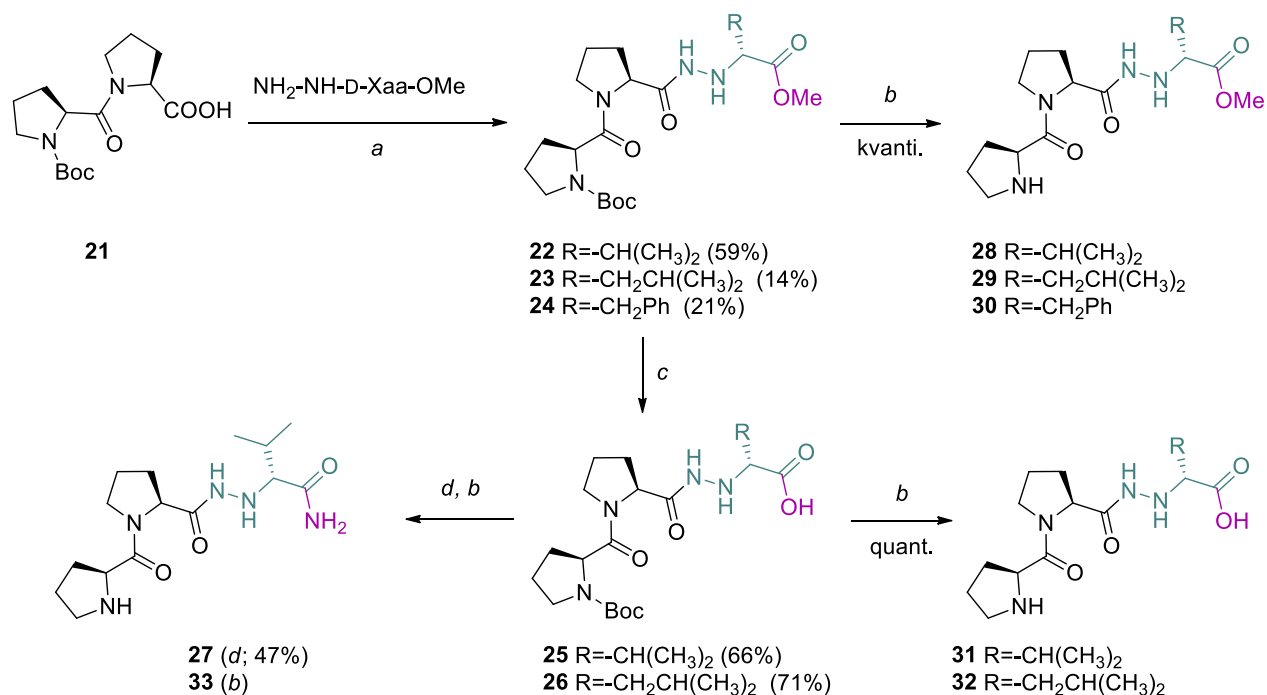
Katalizator	Iskorištenje (%) ^b	e.r. ^c	d.r. ^d
16	22	60:40	79:21
17	41	63:37	88:12
18	66	64:36	74:26
19	71	59:41	78:22
20	69	64:36	83:17

^aReakcije su provedene s 0,75 mmol butanala i 0,25 mmol nitrostirena u 1 mL heksana, pri sobnoj temperaturi, tijekom 24 sata (10 mol % kat-TFA, 10 mol % NMM). ^bIzolirani prinosi. ^cOdređeno HPLC analizom korištenjem kiralne stacionarne faze. ^dOdređeno ¹H NMR analizom.

4.3. Priprava i katalitička aktivnost tripeptida tipa H-Pro-Pro-D-hXaa-R'

Za pripravu tripeptida tipa H-Pro-Pro-D-hXaa-R' koristili su se klasični, literaturom opisani postupci. Tripeptidi **21–27** pripremljeni su kondenzacijom prethodno pripremljenog i aktiviranog dipeptida Boc-Pro-Pro-OH (**21**) i α -hidrazinokiselina. Za aktivaciju je kao i kod pripreme dipeptida korištena metoda mješovitog anhidrida. Tripeptid **23** pripremljen je iz tripeptida **22** procesom deesterifikacije u bazičnom mediju. Tripeptid **24** pripremljen je iz tripeptida **23** procesom amidacije uz aktivacijske reagense BOP i HOBt te otopinu amonijaka. Svi postupci pripreme provedeni su u organskome otapalu pri sobnoj temperaturi. Dobiveni produkti u svakom stupnju reakcije praćeni su tankoslojnom kromatografijom uz detekciju UV svjetlom te otopinama ninhidrina i kalijeva permanganata, kao i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Čišćenje je provedeno brzom tekućinskom kromatografijom na koloni silikagela u odgovarajućim sustavima otapala. Strukture dobivenih katalizatora potvrđene su analitičkim metodama poput ^1H i ^{13}C NMR i spektrometrije masa. Po završetku sinteze svi tripeptidi su deprotektirani 90 %-tnom TFA te izolirani kao TFA soli **28–33** (Shema 18.).





Shema 18. Priprava tripeptida tipa H-Pro-Pro-D-hXaa-R'

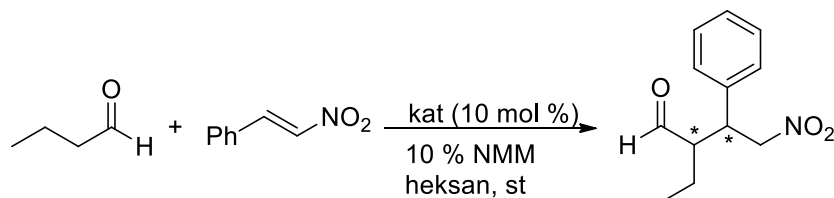
Prvo ispitivanje katalitičkog potencijala tripeptida provedeno je korištenjem reakcije konjugirane adicije između butanala i nitrostirena kao modelnog sustava. Svi analizirani

tripeptidi pokazali su katalitičku aktivnost, dajući produkte u prinosima od 62 do 91 %. Najveću učinkovitost pokazali su tripeptidi koji sadrže α -hidrazinovalin (**28**, **31** i **33**; Tablica 2.).

Analiza enantioselektivnosti tripeptidnih estera (**28**, **29**, **30**) s različitim α -hidrazinokiselinama na trećem položaju u odabranoj modelnoj reakciji otkrila je da derivat α -hidrazinovalina (**28**) postiže najvišu enantioselektivnost (81:19 e.r.), dok derivat α -hidrazinofenilalanina (**30**) pokazuje najnižu (58:42 e.r.). Nadalje, usporedba tripeptidnih kiselina (**29** i **31**) pokazala je da tripeptid s α -hidrazinovalinom (**29**) postiže bolju enantio- i diastereoselektivnost u modelnoj reakciji.

Dodatno, tripeptidi α -hidrazinovalina (**28**, **31** i **33**), unatoč razlikama u C-terminalnim skupinama, pokazali su slične razine enantio- i diastereoselektivnosti. Ovi rezultati jasno su pokazali da slijed H-Pro-Pro-D-hVal pruža optimalne prinose te najbolje enantio- i diastereoselektivnosti, neovisno o C-terminalnoj skupini. Stoga su u daljnjoj optimizaciji reakcijskih uvjeta odabrani tripeptidi temeljeni na D-hVal strukturi.

Tablica 2. Katalitička aktivnost tripeptida u reakciji konjugirane adicije između butanala i nitrostirena



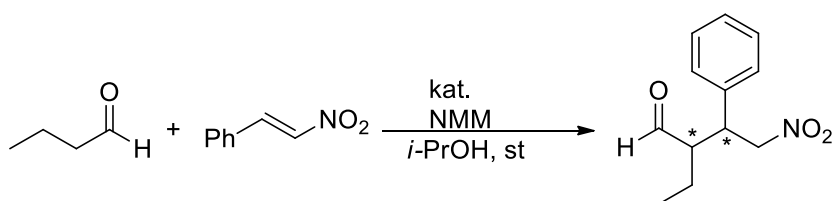
Katalizator	Iskorištenje (%) ^b	e.r. ^c	d.r. ^d
28	91	81:19	61:39
29	86	80:20	56:44
30	75	58:42	55:45
31	91	85:15	62:38
32	62	80:20	59:41
33	90	84:16	75:25

^aReakcije su provedene s 0,75 mmol butanala i 0,25 mmol nitrostirena u 1 mL heksana, pri sobnoj temperaturi, tijekom 24 sata (10 mol % kat-TFA, 10 mol % NMM). ^bIzolirani prinosi. ^cOdređeno HPLC analizom korištenjem kiralne stacionarne faze. ^dOdređeno ¹H NMR analizom.

4.3.1. Probir reakcijskih uvjeta za katalizatore *H-Pro-Pro-D-hVal-OMe*, *H-Pro-Pro-D-hVal-OH* i *H-Pro-Pro-D-hVal-NH₂*

Optimizacija količine katalizatora provedena je izvođenjem reakcije u *i*-PrOH s 0,5, 1, 5 i 10 mol % katalizatora. Najbolji rezultati, uzimajući u obzir reaktivnost, enantioselektivnost i diastereoselektivnost, postignuti su pri korištenju 5 mol % katalizatora (Tablica 3.).

Tablica 3. Utjecaj količine katalizatora na ishod asimetrične 1,4-adicije aldehida na nitroalkene katalizirane katalizatorima **28**, **31** i **33**.



Katalizator	Katalizator (mol %)	Vrijeme (dani)	Iskorištenje (%) ^b	e.r. ^c	d.r. ^d
 28	0,5	5	22	77:23	75:25
	1	5	88	80:20	84:16
	5	1	96	82:18	84:16
	10	1	91	84:16	80:20
 31	0,5	14	65	78:22	93:7
	1	14	19	78:22	88:12
	5	1	90	84:16	88:12
	10	1	81	84:16	85:12
 33	0,5	24 h	91	78:22	79:21
	1	24 h	92	73:27	85:25
	5	2 h	91	83:17	72:28
	10	1 h	82	81:19	70:30

^aSve reakcije provedene su s 0,4 mmol nitrostirena i 1,2 mmol butanala u 1 mL *i*-PrOH-a uz ekvimolarnu količinu NMM u odnosu na katalizator tijekom 72 sata. ^bPrinos izoliranog produkta. ^cOdređeno HPLC analizom korištenjem kiralne stacionarne faze. ^dOdređeno analizom ¹H NMR spektara.

Nakon optimizacije količine dodanog katalizatora optimizirani su otapalo, temperatura reakcije i koncentracija supstrata (Tablica 4.). Reakcije katalizirane spojevima **28** i **31** provedene u alkoholima pokazale su povećanu reaktivnost, ali i smanjenu enantioselektivnost (unos 1–3 i 15–17). Prijelaz na nepolarna otapala doveo je do duljeg vremena reakcije, ali i poboljšane enantioselektivnosti. Produljenje vremena reakcije moglo bi se objasniti lošijom topljivošću katalizatora u nepolarnim otapalima. Katalizator **28** pokazao je najbolju učinkovitost u toluenu, pri čemu je produkt dobiven s 97 % iskorištenja, uz enantiomerni omjer (e.r.) 93:7 i diastereomerni omjer (d.r.) 82:18 (Tablica 4., unos 8).

Katalizator **31** dao je produkt s enantiomernim omjerom 92:8 u diklorometanu, kloroformu i toluenu (unos 19, 20 i 22), pri čemu je najveća konverzija (93 %) postignuta u toluenu. Katalizator **33** pokazao je visoku katalitičku aktivnost u svim otapalima, neovisno o njihovoj polarnosti, s najnižom konverzijom u heksanu (78 %, unos 32) i najvišom u toluenu (98 %, unos 31). Najbolja enantioselektivnost postignuta je u diklorometanu i kloroformu (e.r. 93:7, unos 28 i 29), iako uz nešto niži prinos (88 %). Općenito, reakcije katalizirane spojem **33** napredovale su brže u usporedbi s reakcijama kataliziranim spojevima **28** i **31**.

Budući da su sva tri katalizatora pokazala visoku učinkovitost, bilo je moguće odabrati jedan za daljnja istraživanja. Iako njihova strukturna sličnost objašnjava sličnu katalitičku aktivnost, iznenađuje činjenica da C-terminalna skupina nema značajan utjecaj na katalitičku učinkovitost. U pogledu reaktivnosti, katalizatori **28** i **31** pokazali su različite učinke ovisno o polarnosti otapala, dok je katalizator **33** bio konzistentan u oba medija. S druge strane, stereoselektivni rezultati bili su usporedivi za sva tri katalizatora, neovisno o vrsti otapala.

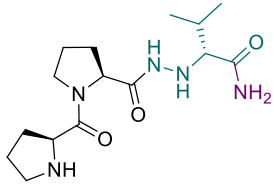
Uzimajući u obzir sintetsku dostupnost, za daljnju optimizaciju i istraživanje odabran je katalizator **28**. Povećanje ekvivalenata butanala na 10 (Tablica 4, unos 9) i smanjenje na 1 (Tablica 4, unos 10) produljilo je trajanje reakcije i negativno utjecalo na prinos, diastereoselektivnost i enantioselektivnost. Negativan utjecaj na prethodno navedene parametre imalo je i povećanje koncentracije nitrostirena na $0,8 \text{ mol dm}^{-3}$ (Tablica 4, unos 11), a u slučaju kada je koncentracija nitrostirena smanjena na $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$ produkt je nastao u tragovima i nije ga bilo moguće izolirati (Tablica 4, unos 12).

Snižavanje temperature reakcije na $0 \text{ }^\circ\text{C}$ značajno je usporilo reakciju, no nije utjecalo na prinos i stereoselektivnost (Tablica 4., unos 13). Na kraju, izvođenje reakcije u atmosferi argona nije dovelo do poboljšanja stereoselektivnosti, ali je rezultiralo smanjenjem prinosa (Tablica 4, unos 14).

Tablica 4. Utjecaj otapala, temperature i koncentracije supstrata na ishod asimetrične 1,4-adicije aldehida na nitroalkene katalizirane katalizatorima **28**, **31** i **33**.

$$\text{R-CH}_2\text{-CHO} + \text{R}'\text{-CH=CH-NO}_2 \xrightarrow[\text{5 mol \% NMM, 1 mL otapala}]{\text{5 mol \% 28, 31, 33}}$$

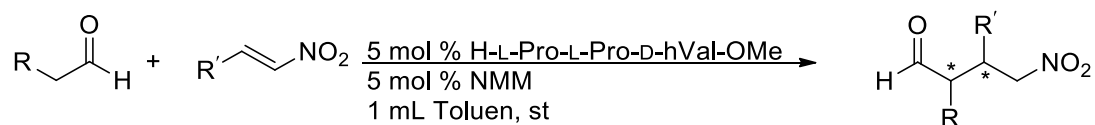
Katalizator	Unos	Otapalo	Vrijeme (h)	Prinos (%) ^b	e.r. ^c	d.r. ^d
<p>28</p>	1	Metanol	5	26	80:20	84:16
	2	Etanol	5	72	82:18	72:28
	3	<i>i</i> -Propanol	5	96	83:17	83:17
	4	Acetonitril	10	74	78:22	82:16
	5	CH ₂ Cl ₂	16	77	88:12	83:17
	6	CHCl ₃	16	76	90:10	84:16
	7	THF	16	85	87:13	75:25
	8	Toluen	16	97	92:8	82:18
	9	Heksan	16	63	86:14	76:24
	10	Toluen ^e	36	85	93:7	85:15
	11	Toluen ^f	16	64	92:8	78:22
	12	Toluen ^g	14 dana	tragovi	₋ ^h	₋ ^h
	13	Toluen ⁱ	5 dana	97	94:6	75:25
	14	Toluen ^j	16	70	92:8	68:32
<p>31</p>	15	Metanol	5	62	82:18	88:12
	16	Etanol	5	75	84:16	86:14
	17	<i>i</i> -Propanol	5	90	84:16	88:12
	18	Acetonitril	5	62	79:21	90:10
	19	CH ₂ Cl ₂	16	60	92:8	84:16
	20	CHCl ₃	16	26	93:7	86:14
	21	THF	16	73	87:13	68:32
	22	Toluen	16	93	92:8	87:13
	23	Heksan	16	77	84:16	81:19
24	Metanol	2	93	77:23	83:17	

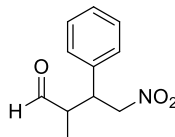
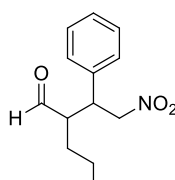
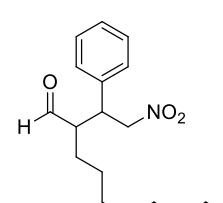
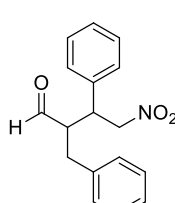
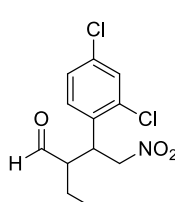
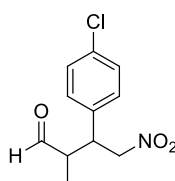
 <p style="text-align: center;">33</p>	25	Etanol	2	91	82:18	83:17
	26	<i>i</i> -Propanol	2	91	82:18	72:28
	27	Acetonitril	8	91	84:16	82:18
	28	CH ₂ Cl ₂	5	88	93:7	88:12
	29	CHCl ₃	5	87	93:7	90:10
	30	THF	5	86	89:11	77:23
	31	Toluen	5	98	93:7	88:12
	32	Heksan	5	78	84:16	75:25

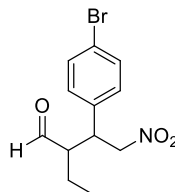
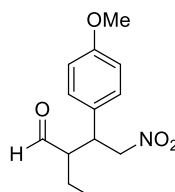
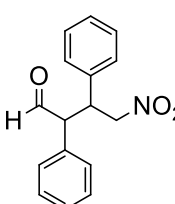
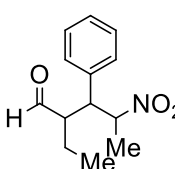
^aSve reakcije provedene su s 0,40 mmol nitrostirena, 1,2 mmol butanala u 1 mL otapala uz 5 mol % ekvivalenata NMM-a na sobnoj temperaturi. ^bPrinos izoliranog produkta. ^cOdređeno HPLC analizom korištenjem kiralne stacionarne faze. ^dOdređeno pomoću ¹H NMR analize. ^eReakcija je provedena s 10 ekvivalenata butanala. ^fKoncentracija nitrostirena iznosila je 0,8 M. ^gKoncentracija nitrostirena iznosila je 0,04 M. ^hNije određeno. ⁱReakcija provedena na 0 °C.

Nakon što smo uspostavili optimalne reakcijske uvjete, ispitali smo opseg konjugirane adicije između aldehida i nitroolefina u prisutnosti 5 mol % katalizatora **28**. Većina reakcija odvijala se u vremenskom okviru od 16 do 24 sata, pri čemu su gotovo svi eksperimenti rezultirali visokim iskorištenjem (76–97 %). Najviši prinosi (97 %) zabilježeni su u unosima 4 i 5. Najniži prinosi i najsporije reakcije opaženi su s dekanalom, koji predstavlja izazovan Michaelov donor (Tablica 5., unos 3), te s 4-metoksinitrostirenom, slabim Michaelovim akceptorom (Tablica 5., unos 8). Najveće enantioselektivnosti postignute su u unosima 5, 6 i 7 u kojima su fenilne skupine *trans*-β-nitrostirena supstituirane elektron-odvlačćim skupinama što ih čini izuzetno dobrim Michaelovim akceptorima. Međutim, opažene diastereoselektivnosti su općenito umjerene. Najveća diastereoselektivnost, ali i najniža enantioselektivnost zabilježena je u unosu 2 gdje je kao Michaelov donor korišten pentanal, a kao Michaelov akceptor *trans*-β-nitrostiren. Konačno, najbolji rezultati kada je riječ o prinosu i selektivnosti postignuti su u unosu 5 između butanala i 2,4-dikloronitrostirena.

Tablica 5. Utjecaj supstrata na ishod asimetrične 1,4-adicije aldehida na nitroalkene katalizirane katalizatorom **28**



Unos	Produkt	Vrijeme (h)	Iskorištenje (%) ^b	e.r. ^c	d.r. ^d
1		16	92	91:9	66:34
2		16	81	81:19	76:24
3		24	79	87:13	95:5
4		16	97	88:12	79:21
5		16	97	93:7	88:12
6		16	89	92:8	86:14

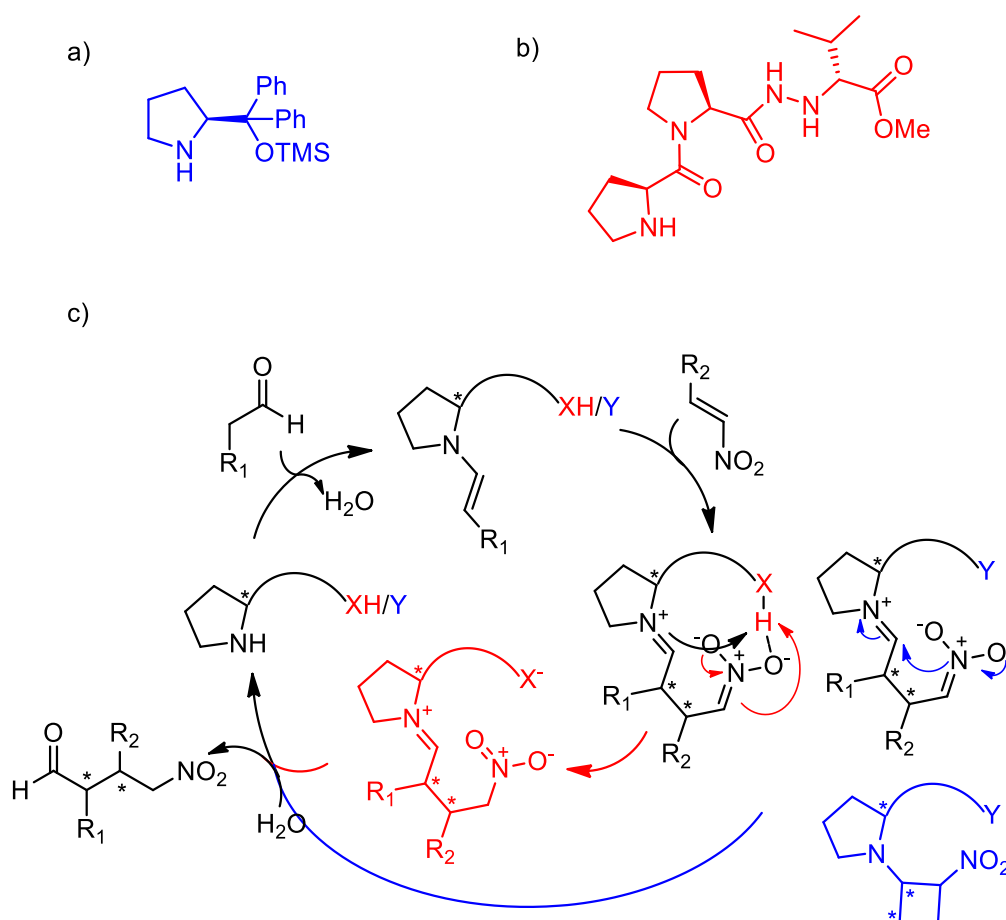
7		16	76	92:8	82:
8		24	84	88:12	83:17
9		14 dana	tragovi	-	-
10		-	-	-	-

^aSve reakcije provedene su s 0,40 mmol nitroalkena, 1,2 mmol aldehida u 1 mL toluena uz 5 mol % katalizatora **28** i 5 mol % ekvivalenata NMM-a na sobnoj temperaturi. ^bPrinos izoliranog produkta. ^cOdređeno HPLC analizom korištenjem kiralne stacionarne faze. ^dOdređeno pomoću ¹H NMR analize.

4.4. Istraživanje mehanizma katalitičke aktivnosti

Sveobuhvatne mehanističke i konformacijske analize tripeptida H-D-Pro-Pro-Glu-NH₂, dizajniranog u Wennemersovoj grupi, iznimno aktivnog i stereoselektivnog katalizatora za konjugiranu adiciju aldehida na nitroetilen i β-monosupstituirane nitroolefine, podupiru mehanizam preko enamina, pri čemu karboksilna skupina ima ključnu ulogu. Bočni lanac karboksilne kiseline sudjeluje u stabilizaciji prevladavajuće konformacije katalizatora u osnovnome stanju. Ta se interakcija gubi tijekom nastajanja enamina, čija fleksibilnija konformacija omogućuje prihvata dolaznog nitroolefina i stvaranje C–C veze. Tijekom reakcije enamina s nitroolefinom, iminium-nitronatni međuprodukt prolazi intramolekulsku protonaciju karboksilnom skupinom, čime nastaje iminijev ion. Ova saznanja pokazuju da karboksilna skupina ne služi samo kao donor protona, već i znatno pridonosi konformacijskim promjenama katalizatora tijekom reakcije.

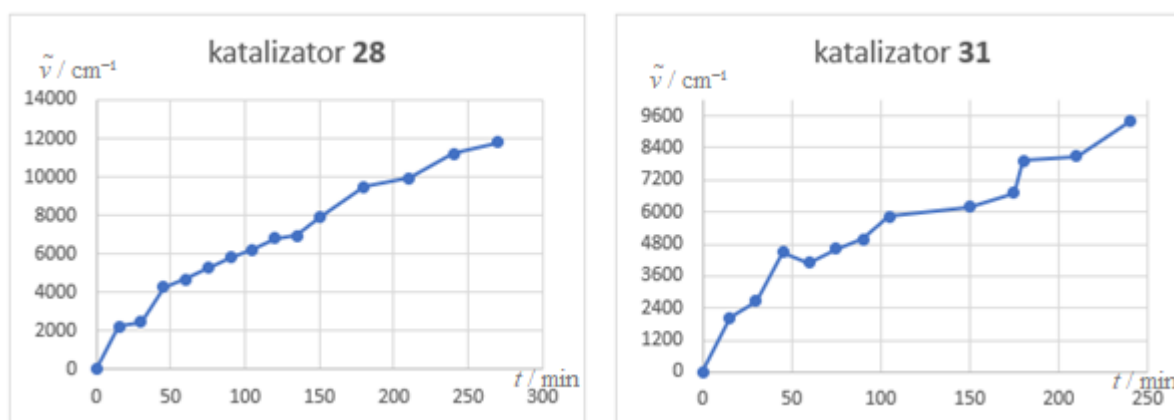
Ipak, prisutnost karboksilne kiseline nije nužna, što potvrđuju vrlo učinkoviti katalizatori poput difenilprolinol-trimetilsilil-etera (tzv. *Hayashi-Jørgensenov katalizator*) (Slika 24.a)⁸⁴, kao i neki tripeptidi koji nemaju karboksilnu skupinu (Slika 24.b). Za takve primjere predložen je alternativni mehanizam, u kojem se nitronatni međuproduct veže stvaranjem C–C veze, pri čemu su ciklobutan i 1,2-oksazin *N*-oksidni međuproducti identificirani kao odmarajuće stanje katalizatora (Slika 24.c). Kod ove vrste katalizatora dodatak katalitičke količine organske kiseline dodatno povećava njihovu učinkovitost.



Slika 24. a) Hayashi-Jørgensen katalizator⁸⁴ b) Peptidni katalizator bez karboksilne skupine c) Mehanizam katalize katalizatora koji u strukturi sadrže karboksilnu skupinu (crveno) i oni bez karboksilne skupine (plavo).

S obzirom na prethodno navedeno, bilo bi za očekivati da će katalizator s C-terminalnom kiselinom biti učinkovitiji od estera, osim ako je ključ katalitičke aktivnosti u peptidnoj okosnici koja je ista kod svih katalizatora. Stoga smo proveli inicijalno ispitivanje kinetike reakcije

katalizirane tripeptidima **29** i **31**. Reakcija između butanala i nitrostirena korištena je kao modelna reakcija, a njezin tijek praćen je FT-IR spektroskopijom kao neinvazivnom metodom praćenja. Reakcije su provođene u prisutnosti svakog od navedenih katalizatora u toluenu pri sobnoj temperaturi i pratio se porast apsorbancije na 1554 cm^{-1} , karakteristične za istežanje N–O veze produkta. Ovo preliminarno istraživanje pokazalo je vrlo slične krivulje konverzije reaktanata u produkte, što upućuje na sličan mehanizam katalize kod dva promatrana katalizatora, a toj pretpostavci u prilog ide i njihova usporediva učinkovitost u polarnim i nepolarnim otapalima (Slika 25.). Naime, protično okruženje ubrzava reakciju u slučaju katalizatora koji nemaju intramolekulsku karboksilnu skupinu, dok u slučaju katalizatora koji sadrže intramolekulsku karboksilnu skupinu, protično okruženje ne utječe na brzinu reakcije. Zajednička karakteristika ova dva katalizatora jest da njima katalizirane reakcije brže napreduju u polarnim otapalima (Tablica 4.), iako uz nešto slabiju stereoselektivnost u usporedbi s reakcijama u nepolarnim otapalima.

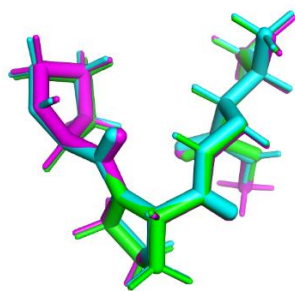


Slika 25. Krivulje konverzije reaktanata u produkte uz katalizatore **28** i **31**.

Za bolji uvid u mogući mehanizam djelovanja peptidnih katalizatora reakcije 1,4-adicije analizirane su njihove konformacije pomoću molekuskog modeliranja u suradnji s dr. sc. Ivanom Nikšić-Franjić. Računalna analiza konformacija tripeptida provedena je korištenjem programa CREST (*Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool*)⁸⁵, a reoptimizacija je provedena korištenjem DFT računa (teorija funkcionala gustoće) koristeći program Gaussian 16, revizija C.01.⁸⁶ Ovaj pristup pokazao se učinkovitim u istraživanju mehanizama organokatalitičkih asimetričnih adicija aldehida na nitroolefine kod sličnih tripeptida koji sadrže glutaminsku kiselinu. Učinak otapala toluena modeliran je implicitno koristeći SMD

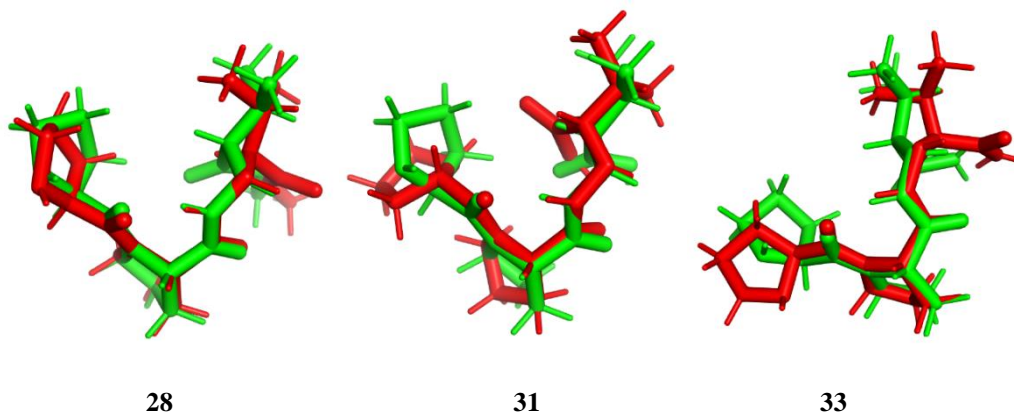
model⁸⁷, a svi lokalni minimumi potvrđeni su izračunom pozitivnih harmonijskih vibracijskih frekvencija. Dobivene strukture lokalnih minimuma tripeptida korištene su za proučavanje mehanizama reakcije.

Tripeptidni katalizatori **28**, **31** i **33** pokazali su visoku konformacijsku fleksibilnost, a razlike u stabilnosti njihovih najstabilnijih konformera su zanemarive. Svi tripeptidi imaju vrlo slične najstabilnije konformacije, pri čemu hidrazidna skupina ima važnu ulogu u stabilizaciji strukture vodikovim vezama. Duljine tih veza kreću se između 1,8 i 2,0 Å. Preklapanje najstabilnijih konformera prikazano na Slici 26. pokazuje vrlo male strukturne razlike. Promjene na perifernim funkcijskim skupinama ne dovode do značajnih konformacijskih promjena, što je u skladu sa sličnom katalitičkom učinkovitošću.

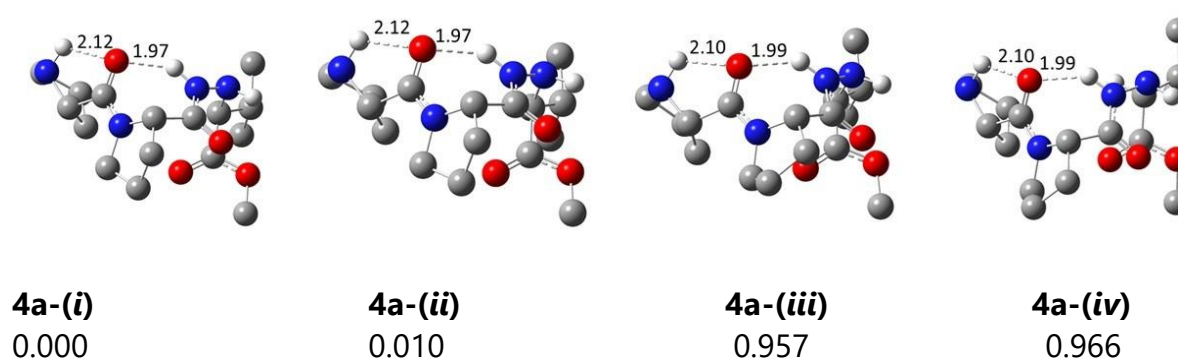


Slika 26. Strukturno preklapanje najstabilnijih konformera tripeptida. **28**: magenta, **31**: zelena, **33**: cijan.

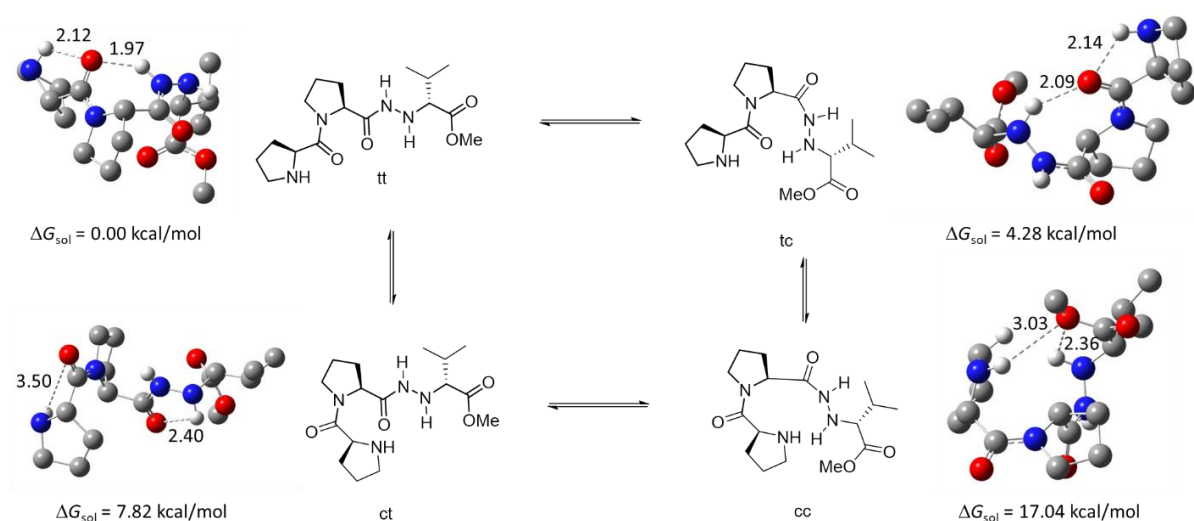
S druge strane, kod najnestabilnijih konformacija uočene su različite orijentacije amidnih, esterskih i karboksilnih skupina u odnosu na najstabilnije konformere. U tim su slučajevima te skupine usmjerene prema van, što smanjuje mogućnost stvaranja vodikovih veza. Također su zabilježene razlike u orijentaciji prolinskog prstena (Slika 27.).



Slika 27. Preklapanje najstabilnijih (zelenih) i najnestabilnijih (crvenih) struktura tripeptida. Nakon toga detaljnije je proučen odabrani katalizator **28**. H-Pro-Pro-D-hVal-OMe ima 235 različitih konformera s energijom do 6 kcal/mol većom od najstabilnijeg, a budući da svaki konformer ima različite stupnjeve slobode rotacije, dobiveno je ukupno 762 rotamera. Najstabilniji konformeri reoptimizirani su DFT izračunima, a strukture četiriju konformera s najnižom energijom prikazane su na Slici 28, zajedno s relativnom Gibbsovom energijom solvatacije u odnosu na najstabilniji. Konformeri imaju vrlo slične strukture i stabilizirani su putem dviju vodikovih veza između triju centara (engl. *bifurcated or three-centered hydrogen bonds*) između karbonilne skupine Pro¹, NH atoma vodika Pro¹ i hidrazidnog NH^β atoma vodika s prosječnim udaljenostima 2,1 i 1,9 Å, a razlike u Gibbsovim energijama solvatacije su unutar kemijske pogreške točnosti od 1 kcal/mol (Slika 28.). Važno je napomenuti da svi konformeri imaju *trans-trans* (tt) orijentaciju amidne i hidrazidne skupine, a *cis* strukture nisu detektirane. Kako bismo isključili mogućnost sudjelovanja *cis* konformacija u mehanizmu reakcije, optimizirane su strukture u tc (Pro-Pro *trans*, hidrazid *cis*), ct (Pro-Pro *cis*, hidrazid *trans*) i cc (obje *cis*) orijentaciji te su uspoređene relativne Gibbsove energije u toluenu (Slika 29.). Kao što se i očekivalo, redoslijed Gibbsovih energija je: tt < tc < ct < cc, što ukazuje na to da su *cis* izomeri manje stabilni zbog nedostatka izostanka stabilizacije vodikovim vezama.



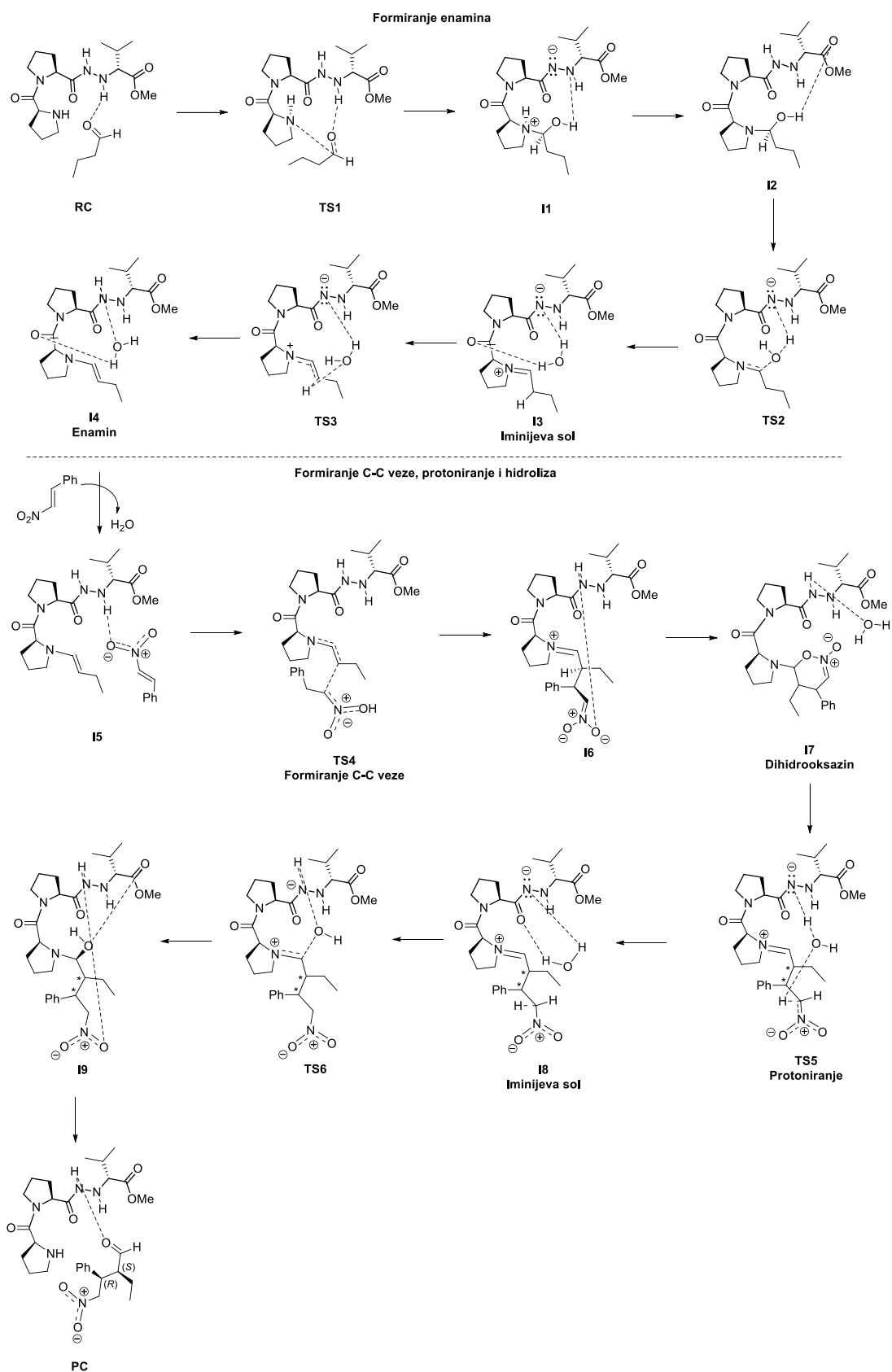
Slika 28. Četiri konformera tripeptida **28** s najnižom energijom u toluenu i razlike Gibbsove energije u odnosu na najstabilniji konformer (u kcal/mol). Nepolarni atomi vodika izostavljeni su radi jasnoće, a vodikove veze su prikazane isprekidanim linijama i duljina u Å.



Slika 29. *Cis–trans* konformeri tripeptida **28** i relativne Gibbsove energije solvatacije. Napolarni atomi vodika izostavljeni su radi jasnoće, a vodikove veze su prikazane isprekidanim linijama i duljina u Å.

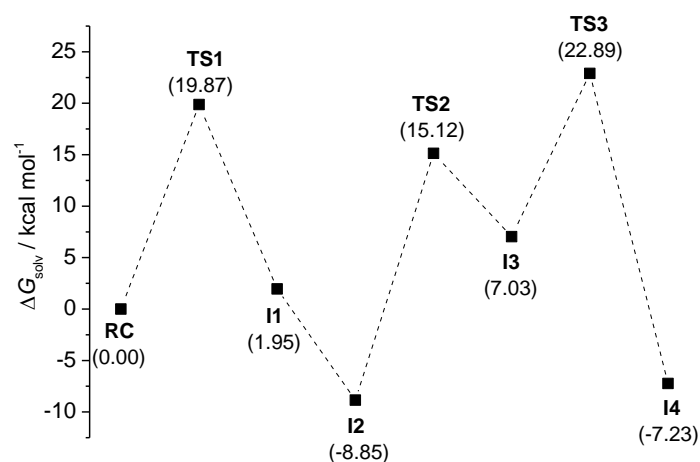
Stoga je za studije reakcijskog mehanizma razmatran samo *trans–trans* izomer za pripravu početnih međuprodukata i struktura prijelaznog stanja. Vjerojatni put adicije butanala na β -nitrostiren kataliziran katalizatorom **28** prikazan je u Shemi 19 (reaktantski kompleks, prijelazno stanje, međuprodukt i produkti kompleksa označeni su skraćenicama RC, TS, I i PC). Profil slobodne energije za organokatalitički ciklus prikazan je na Slici 4, a vrijednosti ΔG izračunate su s obzirom na ukupnu Gibbsovu slobodnu energiju reaktantskog kompleksa koju tvore **28** i β -nitrostiren.

Rezultati potvrđuju da brzinu reakcije diktira korak protonacije TS6, iako je stereoselektivnost katalitičkog ciklusa prvenstveno kontrolirana stvaranjem C–C veze (TS4). Za usporedbu, ista prijelazna stanja bila su ključna za određivanje kinetike i stereokemije reakcija aldehida s nitrostirenom kataliziranih tripeptidima koji sadrže kiselinsku skupinu ili diarilprolinol-silil-eter. Važno je napomenuti kako rezultati pokazuju da tripeptidni katalizator s neproteinogenom aminokiselinom, iako nema kiseli bočni lanac, može poslužiti kao učinkovit katalizator za Michaelove adicije aldehida na nitroolefine.

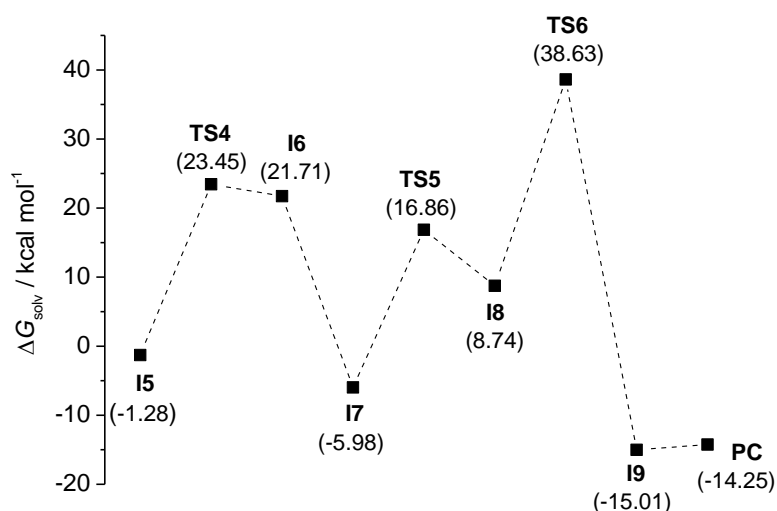


Shema 19. Pretpostavljeni mehanizam Michaelove adicije katalizirane hidrazidnim tripeptidom

a) formiranje enamina



b) formiranje C–C veze; protoniranje i hidroliza



Slika 30. Profili slobodne energije za reakciju konjugirane adicije butanala i β -nitrostirena kataliziranu s tripeptidom **28** u toluenu: (a) stvaranje enamina i (b) stvaranje C-C veze, protoniranje i hidroliza

Buduća istraživanja trebaju ići u smjeru detaljne NMR karakterizacije katalizatora, pokušaja sinteze enaminskog međuprodukta i njegove NMR karakterizacije. Naime, premda je studija reakcijskog mehanizma provedena samo s *trans–trans* konformerom katalizatora **28** koji se pokazao energetski najstabilnijim, NMR spektar katalizatora **28** u toluenu ukazuje na prisutnost

barem dva konformera, Izomerizacija amidne i hidrazidne veze može se dogoditi tijekom reakcijskog ciklusa, pa su potrebni eksperimentalni dokazi, da bi se moglo pristupiti eventualnom utvrđivanju predloženog reakcijskog puta.

.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ove disertacije osmišljena je nova skupina tripeptida s ugrađenom α -hidrazinokiselinom za katalizu konjugirane adicije aldehida na nitroolefine. Istraživanja su uključivala optimizaciju metodologije za pripremu optički čistih α -hidrazinokiselina, pripremu i ispitivanje katalitičkog potencijala dipeptida i tripeptida s α -hidrazinokiselinom smještenom na C-terminalnom kraju na odabranoj modelnoj reakciji.

Probir i optimiranje strukture dovelo je do tripeptidnih katalizatora **28**, **31** i **33** s D-hVal i različitim C-terminalnim skupinama, koji su se pokazali učinkovitim za enantioselektivnu konjugiranu adiciju aldehida na nitroolefine. Za daljnja istraživanja odabran je tripeptidni katalizator **28** s C-terminalnom esterskom skupinom za koji su optimirani reakcijski uvjeti. U prisutnosti 5 mol % tripeptida **28**, širok raspon supstrata podvrgnut je 1,4-adiciji, pri čemu su ostvareni visoki prinosi (76–97 %), umjerene do visoke diastereoselektivnosti (66:34–95:5) te visoke enantioselektivnosti (do 93:7). Ovi rezultati potvrđuju učinkovitost peptida s α -hidrazinokiselinom kao katalitičkih sustava u asimetričnoj sintezi. Istraživanje mehanizma reakcije provedeno je kombinacijom kinetičkih eksperimenata i molekuskog modeliranja. Praćenje napretka reakcije IR spektroskopijom i usporedba učinka katalizatora **28** i **31** pokazali su da terminalna karboksilna skupina katalizatora ne sudjeluje izravno u katalitičkom ciklusu. Umjesto toga, ključna katalitička uloga pripisuje se hidrazidnoj skupini, čija konformacijska fleksibilnost i sposobnost stabilizacije prijelaznih stanja omogućuju visoku reaktivnost i selektivnost. Računalna analiza konformacije katalizatora **28** u toluenu pokazala je veliku konformacijsku fleksibilnost tripeptida i identificirala trans–trans konformaciju katalizatora kao najstabilniju. Temeljem toga napravljena je studija reakcijskog mehanizma i predložen put adicije butanala na β -nitrostiren kataliziran tripeptidom **28**. Pokazano je da brzinu reakcije diktira korak protonacije dok je stereoselektivnost katalitičkog ciklusa kontrolirana stvaranjem C–C veze. Važno je istaknuti da je tripeptid **28** učinkovit iako ne posjeduje slobodnu karboksilnu skupinu niti je kiselina dodana kao katalizator u promatranim reakcijama.

Dobiveni rezultati imaju šire implikacije za dizajn novih peptidnih katalizatora. Disertacija postavlja temelje za buduća istraživanja usmjerena na proširenje opsega reaktivnosti peptida na druge Michaelove-donore (poput ketona, malonata, nitroalkana) i Michaelove-akceptore (uključujući α,β -nenasićene aldehide i ketone te β -disupstituirane nitroolefine). Nadalje,

peptidni katalizatori mogli bi se primijeniti i u zahtjevnijim transformacijama, poput enantioselektivne α -alkilacije aldehida i višestupanjskih kaskadnih reakcija, čime se dodatno ističe njihova važnost u suvremenoj organskoj sintezi.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

δ	kemijski pomak
AcOH	octena kiselina
Aib	aminoizobutanska kiselina
Asp	L-asparaginska kiselina
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
BOP	benzotriazol-1-iloksi-tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
DCM	diklormetan
DIC	diizopropilkarbodiimid
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	deuterirani dimetilsulfoksid
d.r.	dijastereomerni omjer
<i>ee</i>	enantiomerni višak
e.r.	enantiomerni omjer
ekv.	ekvivalent
ESI	elektrosprej ionizacija (engl. <i>electrospray ionization</i>)
EtOAc	etil-acetat
EtOH	etanol
Glu	L-glutaminska kiselina
Gly	L-glicin
haa	hidrazinokiselina
His	L-histidin
hLeu	hidrazinoleucin
hPhe	hidrazinofenilalanin
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HOMO	najviša popunjena molekulska orbitala
hVal	hidrazinovalin
hXaa	α -hidrazinokiselina

i-PrOH	izopropanol
IR	infracrvena spektroskopija (engl. <i>IR spectroscopy</i>)
<i>J</i>	konstanta sprege
Leu	L-leucin
Me	metil
MeCN	acetonitril
MeOH	metanol
MS	spektrometrija masa (engl. <i>mass spectrometry</i>)
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetska rezonanca (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OMe	metoksi skupina
PE	petroleter
Ph	fenil
Phe	L-fenilalanin
Pg	zaštitna skupina (engl. <i>protecting group</i>)
Pro	L-prolin
<i>R_f</i>	retencijski faktor
RT	sobna temperatura
<i>t</i>	vrijeme
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
<i>t_R</i>	vrijeme retencije
Trp	L-triptofan
Val	L-valin
Xaa	Općeniti zapis aminokiseline

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994.
2. L. G. Wade, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2017.
3. A. M. Evans, *Clinical Rheumatology* **20** (2001) 9–14.
4. D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed.* **29** (1990) 1320–1367.
5. J. Seayad, B. List, *Org. Biomol. Chem.* **3** (2005) 719–724.
6. E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto, *Comprehensive Asymmetric Catalysis*, Springer Verlag, Heidelberg, 1999.
7. D. W. C. MacMillan, *Nature* **455** (2008) 304–308.
8. P. Melchiorre, M. Marigo, A. Carlone, G. Bartoli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 6138–6171.
9. A. Dondoni, A. Massi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 4638–4660.
10. B. List, Y. W. Yang, *Science* **313** (2006) 1584–1586.
11. E. Marqués-López, R. P. Herrera, M. Christmann, *Nat. Prod. Rep.* **27** (2010) 1138–1167.
12. A. J. Metrano et al., *Chem. Rev.* **120** (2020) 11479–1161
13. J. I. Oku, S. Inoue, *Chem. Commun.* (1981) 229–230.
14. S. Julia, J. Masana, J. C. Vega, *Angew. Chem. Int. Ed.* **19** (1980) 929–931
15. D. R. Kelly, S. M. Roberts, *Biopolymers* **84** (2006) 74–105.
16. C. A. Lewis, S. J. Miller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 5616–5619.
17. C. A. Lewis, J. Merkel, S. J. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (2008) 6007–6011.
18. C. A. Lewis, A. Chiu, M. Kubryk, J. Balsells, D. Pollard, C. K. Esser, J. Murry, R. A. Reamer, K. B. Hansen, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 16454–16455.
19. S. M. Mennen, J. D. Gipson, Y. R. Kim, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 1654–1655
20. Y. Zhao, J. Rodrigo, A. H. Hoveyda, M. L. Snapper, *Nature* **443** (2006) 67–70
21. K. W. Fiori, A. L. A. Puchlopek and S. J. Miller, *Nat. Chem.* **1** (2009) 630–634
22. B. R. Sculimbrene, A. J. Morgan, S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 11653–11656.
23. P. Vachal, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **124** (2002) 10012–10014.
24. M. S. Taylor, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 10558–10559.
25. E. Delort, T. Darbre, J. L. Reymond, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 15642–15643.

26. (a) G. Peris, C. E. Jakobsche and S. J. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 8710–8711;
(b) C. E. Jakobsche, G. Peris and S. J. Miller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **47** (2008) 6707–6710
27. G. Maayan, M. D. Ward and K. Kirshenbaum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106** (2009) 13679–13684
28. C.E.Müller, R. Hrdina, R. C. Wende and P. R. Schreiner, *Chem.–Eur. J.*, **17** (2011) 6309–6313
29. M. M. Müller, M. A. Windsor, W. C. Pomerantz, S. H. Gellman and D. Hilvert, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **48** (2009) 922–925.
30. S. Mukherjee, J. W. Yang, S. Hoffmann, B. List, *Chem. Rev.* **107** (2007) 5471–5569.
31. Z. G. Hajos, D. R. Parrish, *J. Org. Chem.* **39** (1974) 1615–1621.
32. U. Eder, G. Sauer, R. Weichert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **10** (1971) 496–497.
33. B. List, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 2395–2396.
34. K. A. Ahrendt, C. J. Borths, D. W. C. MacMillan, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4243–4244.
35. N. Mase, Y. Nakai, N. Ohara, H. Yoda, K. Takabe, F. Tanaka, C. F. Barbas, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 734–735.
36. W. Notz, F. Tanaka, S. Watanabe, N. S. Chowdari, J. M. Turner, R. Thayumanavan, C. F. Barbas, *J. Org. Chem.* **68** (2003) 9624–9634.
37. J. Franzen, M. Marigo, D. Fielenbach, T. C. Wabnitz, A. Kjaersgaard, K. A. Jorgensen, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 18296–18304.
38. B. List, P. Pojarliev, H. J. Martin, *Org. Lett.* **3** (2001) 2423–2425.
39. T. J. Peelen, Y. G. Chi, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 11598–11599.
40. S. Mosse, A. Alexakis, *Organic Letters* **7** (2005) 4361–4364.
41. J. M. Betancort, K. Sakthivel, R. Thayumanavan, F. Tanaka, C. F. Barbas, *Synthesis* 2004, 1509–1512.
42. J. M. Betancort, C. F. Barbas, *Org. Lett.* **3** (2001) 3737–3740.
43. J. Wang, H. Li, B. S. Lou, L. S. Zu, H. Guo, W. Wang, *Chem. Eur. J.* **12** (2006) 4321–4329.
44. S. L. Zhu, S. Y. Yu, D. W. Ma, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 545–584.
45. N. Ruiz, E. Reyes, J. L. Vicario, D. Badia, L. Carrillo, U. Uria, *Chem. Eur. J.* **14** (2008) 9357–9365.

46. C. Palomo, S. Vera, A. Mielgo, E. Gomez-Bengoa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 5984–5987.
47. Y. Chi, L. Guo, N. A. Kopf, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 5608–5609.
48. S. Belot, A. Massaro, A. Tenti, A. Mordini, A. Alexakis, *Org. Lett.* **10** (2008) 4557–4560.
49. D. Enders, C. Wang, J. W. Bats, *Angew. Chem. Int. Ed.* **47** (2008) 7539–7542.
50. D. Enders, M. R. M. Huttl, G. Raabe, J. W. Bats, *Adv. Synth. Cat.* **350** (2008) 267–272.
51. D. Enders, M. R. M. Huttl, J. Runsink, G. Raabe, B. Wendt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 467–470.
52. H. Yu, M. Liu, S. Han, *Tetrahedron*, **70** (2014) 8380–8384.
53. Wang, Y.; Ji, S.; Wei, K.; Lin, J., *RSC Adv.* **4** (2014) 30850–30856.
54. T. P. Kumar, M. A. Sattar, S. S. Prasad, K. Haribabu, C. S. Reddy, *Tetrahedron-asymmetry* **28** (2017) 401–409.
55. A. Castán, R. Badorrey, J. A. Gálvez, P. López-Ram-de-Víu and M. D. Díaz-de-Villegas, *Org. Biomol. Chem.* **16** (2018) 924–932
56. F. Vaghi, G. Facchetti, I. Rimoldi, M. Bottiglieri, A. Contini, M. L. Gelmi and R. Bucci, *Front. Chem.* **11** (2023) 1233097
57. Z. Tang, Z. H. Yang, L. F. Cun, L. Z. Gong, A. Q. Mi, Y. Z. Jiang, *Org. Lett.* **6** (2004) 2285–2287
58. J. Kofoed, J. Nielsen, J. L. Reymond, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13** (2003) 2445–2447.
59. J. C. Yan, L. Wang, *Chirality* **21** (2009) 413–420.
60. W. B. Zou, I. Ibrahim, P. Dziedzic, H. Sunden, A. Cordova, *Chem. Commun.* (2005) 4946–4948.
61. S. B. Tsogoeva, S. W. Wei, *Tetrahedron Asymm.* **16** (2005) 1947–1951.
62. A. Cordova, W. B. Zou, P. Dziedzic, I. Ibrahim, E. Reyes, Y. M. Xu, *Chem. Eur. J.* **12** (2006) 5383–5397.
63. A. F. de la Torre, D. G. Rivera, M. A. B. Ferreira, A. G. Corrêa, M. W. Paixão, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 10221–10232.
64. Metrano, A. J. et al., *Chem. Rev.* **120** (2020) 11479–1161
65. M. De Nisco, S. Pedatella, H. Ullah, J. H. Zaidi, D. Naviglio, Ö. Özdamar, R. Caputo, *J. Org. Chem.* **74** (2009) 9562–9565.
66. V. D’Elia, H. Zwicknagl, O. Reiser, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 3262–3265.

67. O. Illa, O. Porcar-Tost, C. Robledillo, C. Elvira, P. Nolis, O. Reiser, V. Branchadell, R. M. Ortuño, *J. Org. Chem.* **83** (2018) 350–363.
68. C. André, B. Legrand, C. Deng, C. Didierjean, G. Pickaert, J. Martinez, M. C. Averlant-Petit, M. Amblard, M. Calmes, *Org. Lett.* **14** (2012) 960–963.
69. M. Wiesner, J. D. Revell, H. Wennemers, *Angew Chemie - Int Ed.* **47**(10) (2008) 1871–1874.
70. M. Cortes-Clerget, O. Gager, M. Monteil, J.-L. Pirat, E. Migianu-Griffoni, J. Deschamp, M. Lecouvey, *Adv. Synth. Catal* **358** (2016) 34–40.
71. M. Durini, F. A. Sahr, M. Kuhn, M. Civera, C. Gennari, U. Piarulli, *Eur. J. Org. Chem.* (2011) 5599–5607.
72. C. Rigling, J. K. Kisunzu, Jo. rg Duschmale, D. Haussinger, M. Wiesner, M. O. Ebert, H. Wennemers, *J Am Chem Soc.*, **140** (34) (2018) 10829–10838
73. T. Schnitzer, H. Wennemers, *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 15356–15362
74. J. S. Möhler, T. Schnitzer, H. Wennemers, *Chem A European Journal* **26** (2020) 15623–15628
75. J. S. Möhler, L. K. Beiersdörfer, B. S. Masina, P. Wechsler, H. Wennemers, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **365** (19) (2022) 3354–3359
76. S. Knapp, B. H. Toby, M. Sebastian, K. Krogh-Jespersen, J. A. Potenza, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 2490–2498
77. A. Cheguillaume, A. Salaün, S. Sinbandhit, M. Potel, P. Gall, M. Baudy-Floch, P. Le Grel, *J. Org. Chem.* **66** (2001) 4923–4929
78. S. Acherar, A. Salaün, P. Le Grel, B. Le Grel, B. Jamart-Grégoire, *Eur J Org Chem*, (2013) 5603–5613.
79. R. Moumne, S. Lavielle, P. Karoyan, *J. Org. Chem.* **71** (2006) 3332–3334
80. M. Wiesner, M. Neuburger, H. Wennemers, *A European Journal* **15** (2009.) 10103–10109
81. P. Le Grel, A. Salaün, C. Mocquet, B. Le Grel, T. Roisnel, M. Potel, *J. Org. Chem.* **76** (2011) 8756–8767
82. S. Knapp, B. H. Toby, M. Sebastian, K. Krogh-Jespersen, J. A. Potenza, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 2490–2497.
83. T. Schnitzer, H. Wennemers, *Helvetica Chimica Acta* **102** (2019) e1900070.
84. Y. Hayashi, S. Ogasawara, *Org. Synth.* **94** (2017), 252–258.
85. P. Prach, et al., *J. Chem. Phys.*, **160** (11) (2024) 114110

86. Gaussian 16, R.C., M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. V. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. J. Bearpark, J. J. Heyd, E. N. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. P. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, *Gaussian, Inc., Wallingford CT*, 2016
87. A.V. Marenich,, C.J. Cramer, D.G. Truhlar,. *J. Phys. Chem. B*, **113**(18) (2009) 6378–6396

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivona Banović

Datum rođenja: 19. 07. 1987.

Mjesto rođenja: Vinkovci

Obrazovanje

- **2016.** – **danas** Poslijediplomski doktorski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- **2010.** – **2012.** Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- **2006.** – **2010.** Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Radno iskustvo

- **2015.** – **danas** nastavnik kemije u X. gimnaziji Ivan Supek

Publikacije

Banović, Ivona; Nikšić-Franjić, Ivana; Jerić, Ivanka Effect of α -Hydrazino Acids on the Performance of H-Pro-Pro-Xaa Catalysts in the Conjugate Addition of Aldehydes to Nitroolefins ChemistrySelect, 11 (2026), 11; e72987, 7. doi: 10.1002/slct.72987

