

Táncoló halogének: fluor atomot tartalmazó, négyyszeresen szubsztituált tiofén származék szerkezetének meghatározása NMR-rel

GÁTI Tamás*

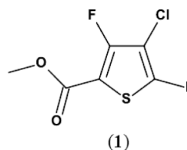
*Servier Kutatóintézet, Záhony utca 7., 1031 Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

Az NMR spektroszkópus számára gyakran különleges kihívást jelentenek a kevés (vagy nem karakterisztikus) hidrogénatomot, de sok heteroatomot és/vagy kvaterner szénatomot tartalmazó molekulák szerkezetének a meghatározása. Ilyenkor a leggyakrabban alkalmazott kétdimenziós homo és heteronukleáris NMR mérésekből (COSY, NOESY, TOCSY, HSQC, HMBC, ^{13}N -HMBC) kapott korrelációk sokszor nem nyújtanak elegendő információt a molekulaszereket egyértelmű meghatározásához. Ilyen esetekben gyakran származékokat képeztünk feltételezve, hogy a kapott reakciótermékben a hidrogénatom hetero/kvaterner szén kedvezőbb aránya lehetővé teszi a molekulaszereket visszafejtését. Ha azonban a szerkezetmeghatározás mindenképpen szükséges, akkor a gyakran nehézkes és drága röntgen vizsgálathoz kell folyamodni. Az NMR mérés technika dinamikus fejlődése eredményeként ma már elérhetők a hűtött NMR mérőfejjel (CryoProbeTM és ProdigyTM) felszerelt NMR spektrométerek ahol a szobahőmérsékletű mérőfejhez képest 4-5-szörös érzékenységnövekedést lehet elérni. Ennek eredményeként az NMR spektroszkópus számára kifinomult, nagyon érzékeny NMR módszerek válnak elérhetővé melyek alkalmazása és értelmezése révén a legtöbb molekulaszereket már megfejthető és ezáltal az egykristály röntgen szerkezetmeghatározás megkerülhető.

2. A feladat

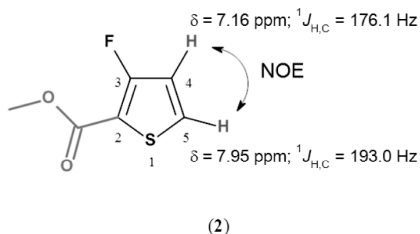
Az analitikai osztályra az alábbi négyyszeresen szubsztituált tiofén származék (1) került szerkezetigazolásra.



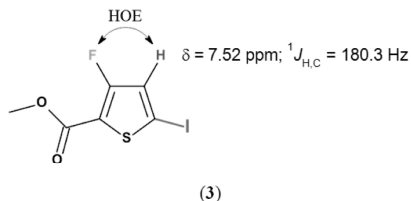
Az elméletileg lehetséges 12 szerkezeti izomer megkülönböztetése hagyományos NMR módszerekkel gyakorlatilag nem lehetséges, mivel az ^1H NMR spektrumban csupán egyetlen metoxi jel van, amely legfeljebb egy korrelációt mutat a HMBC spektrumban a karbonil szénatommal.

A feladat azonban a molekula felépítésének nyomon követése volt, ami első megközelítésre nem tűnt különösen

nehéz problémának. Az első reakciólépés a vásárolt 3-fluor-tiofén molekulán a 2-es helyzetű karboximetil csoport kiépítése volt (2). A három várható lehetséges szerkezeti izomer közül a proton-proton csatolási állandó és az NOE kölcsönhatás alapján egyértelműen igazolni lehetett a 2-es helyzetű kapcsolódást.



A második reakciólépésben a jód atom bevitele történt az 5-ös pozícióba (3). Az ^1H NMR spektrumban eltűnik az egyik sp^2 -es hidrogén jele. A szerkezetigazolás lehetséges pl. F-H HOE (Heteronuclear Overhauser Effect) kísérlettel.



Az utolsó reakciólépés a Cl atom bevitele volt. Itt csak az sp^2 hidrogén jelének eltűnését kellett nyugtázni az ^1H NMR spektrumban, a múltómeget MS spektroszkópia igazolta.

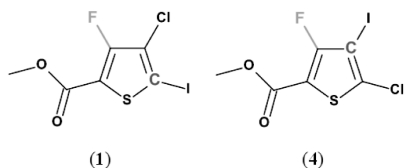
A molekulaszereket helyessége azonban később megkérdőjeleződött, ugyanis a reakciókörülmények között (tetrametil-pirimidin, MgCl_2 , LiCl , hexaklór-étán abszolút THF-ben, -48°C fokon argon atmoszféra alatt) előfordulhat, hogy a halogén atomok helyet cserélnek a molekulában, amit az irodalom „táncoló halogének” jelenségként ír le.¹

3. A probléma

Egy egyszerű protonspektrum felvételével megoldható kérdés helyett így egy komoly szerkezetvizsgálati kihívással

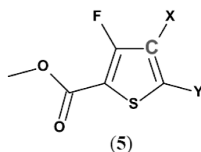
* Tel.: +36 1 8812050 ; e-mail: tamas.gati@servier.com

találtak szemben magunkat, ahol az alábbi két szerkezeti izomer kellett egyértelműen megkülönböztetni egymástól.

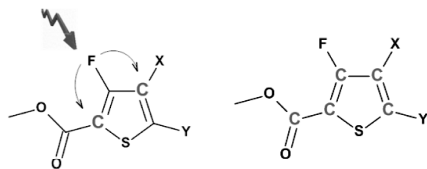


A két illetve három kötéson keresztül C-F csatolási állandók, és a szénatomok kémiai eltolódásai a két izomerben nem különböznek szignifikánsan egymástól, így csupán az NMR paraméterek predikciójára nem hagyatkozhatunk, mindenképpen szükségeses a spektrális bizonyíték. Kiindulásként megállapíthatjuk, hogy az $^1J_{FC}$ csatolás (nagyobb, mint 200 Hz) szignifikánsan különbözik a többi C-F csatolástól, valamint azt, hogy a jód atom diamágneses hatásának (nehézatom effektus) köszönhetően a jód atomhoz kapcsolódó szénatom kémiai eltolódása lényegesen kisebb lesz mint a tiofén többi szénatomjéé (kisebb mint 100 ppm).

Így ha pl. a négyes szénatom kémiai eltolódását meg tudnánk határozni (5) biztosan meg lehetne határozni a molekulaszerkezetet.



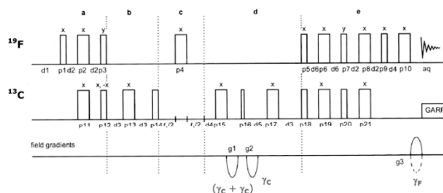
Elméletileg lehetséges NMR módszerek pl. a F-C HOE kísérlet, ahol a F atomot besugározva egy differencia spektrumban intenzitás növekedést észlelünk a hozzá térközelségben lévő 2-es és 4-es szénatomokon, vagy alkalmazhatjuk a klasszikus 2D INADEQUATE mérés technikát (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer Experiment), ahol az összes szén-szén korreláció megjelenik az NMR spektrumban (1. Ábra). Meg kell jegyezni azonban, hogy mindkét módszer rendkívül érzéketlen. Figyelembe véve a molekula rossz oldhatóságát, a kvaterner szénatomok hosszú relaxációs idejét, valamint azt a tényt, hogy a szénatomok jelei dublettékként jelentkeznek még a hűtött mérőfej technológiával is reménytelen, hogy belátható időn belül értékelhető spektrumot kapjunk.



1. Ábra. F-C HOE és 2D INADEQUATE NMR kísérletekből kapható információk.

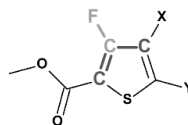
4. A megoldás

Az érzékeny fluor atommag jelenléte és az inverz detektálás eredményeként elérhető érzékenység növekedés indokolja a ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J (C-C)-ADEQUATE NMR pulzusszekvencia alkalmazását (Adequate sensitivity Double Quantum Spectroscopy), amely az NMR laborokban már régóta használt és a Bruker standard pulzusszekvencia könyvtárában is megtalálható ^1H , ^{13}C (1,1)-ADEQUATE $^{2\ 19}\text{F}$, ^{13}C megfelelője (2. Ábra).



2. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J (C-C)-ADEQUATE NMR pulzusszekvencia.

A mérés során a mágneszettség egy kötéson keresztül a fluor atomhoz kapcsolódó szénatomra tevődik, majd erről a szénatomról ugyancsak egy kötéson keresztül ^{13}C - ^{13}C korreláció létesül (kettős kvantum átmenet) majd, a detektálás több lépést követően az érzékenyebb fluor atomon történik. Ennek a módszernek az alkalmazásával tehát meg lehet határozni C-2 és C-4 kémiai eltolódását és így a molekula szerkezete is egyértelműen elődönthető (3. Ábra). A mérés eredményessége ugyancsak függ az $^1J_{CC}$ csatolási állandó aktuális értékének helyes becslésétől.



3. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J (C-C)-ADEQUATE NMR kísérletből kapható információ.

Ahhoz, hogy a pulzusszekvencia ^{19}F atommagra alkalmazható legyen, ki kell számolni a dekódoló gradiens nagyságát a $^{19}\text{F}/^{13}\text{C}$ magpárra. Figyelembe véve a mágneszettséget kódoló és dekódoló gradiensek helyét a pulzusszekvenciában az alábbi egyenletet kell megoldani:

$$G_1 \cdot (\gamma_C + \gamma_F) + G_2 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (\gamma_F) = 0$$

ahol G_1 és G_2 mágneszettséget kódoló gradiensek; G_3 : dekódoló gradiens [%]; γ_C : ^{13}C rezonancia frekvenciája [Hz]; γ_F : ^{19}F rezonancia frekvenciája [Hz].

$$\gamma_F / \gamma_C = 3,7398$$

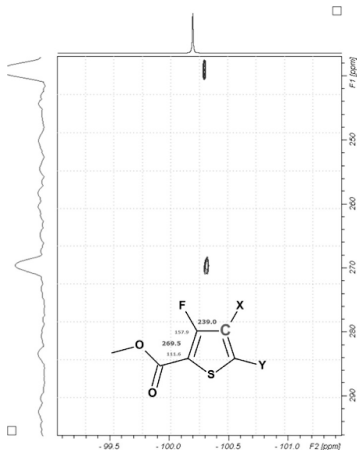
A kódoló G_1 és G_2 gradienseket az ^1H detektált pulzusszekvenciában alkalmazott értéken hagyva G_3 gradiens 62,62%-nak adódik.

$$78,4 \cdot (\gamma_C + \gamma_C) + 77,4 \cdot (\gamma_C) + G_3 \cdot (3,7398 \cdot \gamma_C) = 0$$

Mivel a ^{19}F atommag kémiai eltolódása viszonylag nagy tartományban változhat (C-F kötés esetén kb. 400 ppm), a G_x dekodoló gradiens értékét érdemes mindig a mérendő ^{19}F atommag frekvenciájának figyelembevételével meghatározni, azaz a γ_x/γ_C arányt ne a táblázatokban megtalálható giromágneses állandókból számoljuk! Szükséges esetben a G_x dekodoló gradiens értéke, az első tizedesében több értékkel is eltérhet, ami ^{13}C - ^{13}C korreláción alapuló extrém érzékenlen mérés esetében kritikus lehet a sikeres mérés szempontjából.

5. A mérési eredmények interpretálása

A 4. Ábrán a kb. 10 mg / 0,6 ml DMSO- d_6 koncentrációjú minta CryoProdigyTM mérőfejen mért ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J /(C-C)-ADEQUATE spektruma látható. A mérési idő kb. 1 órát (48 sor, 32 felvétel/inkrementum, 2 mp relaxációs várakozási idő) vett igénybe. Az F2 tengelyen a ^{19}F kémiai eltolódás skála [ppm] (a detektált atommag) található. Figyeljük meg, hogy a kalibráció után a korrelációk nem közvetlenül a ^{19}F jellel egy oszlopban vannak, hanem attól kisebb kémiai eltolódásnál, ami a ^{13}C atommag izotóp effektusával magyarázható. Az F2 tengely projekcióján az 1D ^{19}F NMR spektrum van feltüntetve, ahol 99%-ban a ^{12}C izotóp melletti fluor atom szingulett jele látható, azonban esetünkben a kb. 1%-ban jelen lévő ^{13}C izotóp melletti fluor atomról indul a kísérlet, ami a szatellit jelek átlagánál, a diamágneses eltolódás miatt a szingulett jeltől kisebb kémiai eltolódásnál jelentkezik (izotóp effektus).



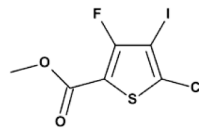
4. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J /(C-C)-ADEQUATE NMR spektrum.

Az F1 tengely ún. kettős kvantum skála, a két ^{13}C atommag kémiai eltolódásának összege található [ppm]. A spektrumban megjelenő korrelációkat a fluor atomhoz közvetlenül kapcsolódó szénatom (C-3) kémiai eltolódásának valamint a mellette lévő szénatomok kémiai eltolódásának összegeként kell értelmezni. A két korreláció a spektrumban tehát $\delta_{C_3} + \delta_{C_2}$ illetve $\delta_{C_3} + \delta_{C_4}$ (4. Ábra). C-2 ill. C-3 kémiai eltolódásai az előzmények alapján ismertek és a kettő összegét felhasználhatjuk a spektrum kalibrálásához is.

A másik korreláció egy egyszerű kivonás eredményeként adja a

$$\begin{aligned} \delta_{C_4} &= \delta_x - \delta_{C_3} \\ \delta_{C_4} &= 239,0 - 157,9 = 81,1 \text{ ppm} \end{aligned}$$

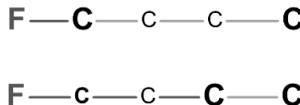
C-4 kémiai eltolódását. A 100 ppm alatt érték egyértelmű spektrális bizonyítéka, hogy a reakcióban a két halogén atom megcserélődött és így a helyes molekulaszervezet:



(4)

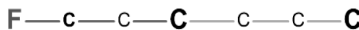
6. További lehetőségek

Az (1,1) ADEQUATE² pulzusszekvenciával a fluor atomhoz képest két kötés távolságra lehet ^{13}C - ^{13}C korrelációkat meghatározni. Ennek a módszernek léteznek távolható korreláción alapuló módosításai is: az (1,n) ill. (n,1) ADEQUATE² NMR kísérletek (az 1 egy kötésen keresztüli, az n távolható csatolást jelez), ahol 4 kötésen keresztüli információ nyerhető ki a molekulából (5. Ábra).

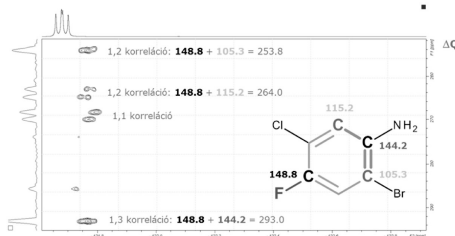


5. Ábra. (1,n) ill. (n,1) ADEQUATE NMR kísérletből nyerhető információ.

Elméletileg lehetséges még az (n,n) ADEQUATE pulzusszekvencia is ahol akár 6! kötésen keresztüli korrelációk segíthetnek a molekulaszervezet felderítésében.



6. Ábra. (n,n) ADEQUATE NMR kísérletből nyerhető információ.



7. Ábra. ^{19}F detektált 2D-(F-C)-HSQC- J /(C-C)-ADEQUATE NMR spektrum.

A fenti NMR kísérleteket ismert szerkezetű molekulán optimaltam. A 7. Ábrán az 1-amino-2-brom-4-fluór-5-klórbenzol (1,n)-ADEQUATE spektrumban egyértelműen azonosíthatók a két (1,2) illetve az (1,3) korrelációk.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Tatai Jánosnak és Vasas Attilának a pulzusszekvencia optimalásához szükséges vegyületeket.

Hivatkozások

- Schnürch, M.; Spina, M.; Khan, A. F.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1046-1057.
- Berger, S.; Braun, S. *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2004**, 593-600.

Halogen dancing: Structure determination of Fluorine Containing tetra substituted thiophene derivative

Structure determination of small molecules can be very challenging, especially in those molecules where the ratio of hydrogen and hetero/quaternary carbon atoms is low. In these cases the most commonly utilized 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC, NOESY, TOCSY) do not provide sufficient information to determine the unambiguous molecular structure. In many cases the chemist are asked to form derivatives, where the hydrogen hetero/quaternary ratio is better, thus the structure can be solved, but mostly the complicated and expensive X-ray experiment has to be carried out. However, the introduction of very sensitive cooled NMR probeheads (CryoProbe™ and Prodigy™) allows the NMR spectroscopist to apply sophisticated, extreme sensitive NMR experiments and hence to determine the structure of molecules possessing few informative hydrogen atoms.

In this work the structure determination of a tetra substituted thiophene derivative is reported (1), which had one fluorine atom. The differentiation of the twelve possible structural isomers by traditional one- and two-dimensional NMR methods is impossible since there is only one methoxy group in the molecule, resulting one signal in the ¹H NMR spectrum, which gives one correlation with the carbonyl carbon atom in the HMBC spectrum. Fortunately not this was the task, but to track the formation of the desired tetra substituted structure from the bought starting material: 3-fluoro-thiophene. In the first reaction step the introduction of the carboxymethyl group was carried out (2) where three possible structural isomers can be formed. Based on the vicinal proton-proton coupling constant, and the NOE interaction between the sp² hydrogens the expected connection in position C-2 was proved. In the second reaction step the iodine derivative was formed (3). In the ¹H NMR spectrum one of the two sp² hydrogens disappears. The structure identification can be based on F-H heteronuclear Overhauser experiment, or on the value of the direct proton-carbon coupling constant which is characteristically high in case of SCH groups (ca. 190 Hz). The last reaction step was the connection of the chlorine atom. The remaining sp² proton signal disappeared from the ¹H NMR spectrum; furthermore the molecular weight was also confirmed by MS spectroscopy, so the analytical department approved the correct substitution order of the molecule. Later however, the structure of the desired compound was questioned, because under certain reaction conditions (tetramethyl-pyrimidine, MgCl, LiCl, hexachloro-ethane in abs. THF at -48 °C under argon atmosphere) the swap of halogen atoms can happen. This phenomenon is described as "halogen dancing" in the literature. What seemed to be an easy structure identification problem turned to be a very challenging structure determination task where (1) and (4) had to be unequivocally differentiated. In the two compounds, the two and three bond C-F coupling constants and the chemical shifts of the carbon atoms are not differing characteristically, hence the prediction of the NMR parameters is not sufficient, spectral evidence is necessary in order to differentiate the two compounds. Certainties what can be used during the structure determinations are: the one bond C-F coupling constant is larger than 200 Hz,

and the chemical shift of the carbon atom which is connected to the iodine atom has the lowest value due to the shielding effect of the bulky iodine atom. Thus, if somehow the chemical shift of C-4 can be determined in compound (5) the molecular structure could be given. Possible NMR methods are for e.g. the F-C HOE experiment where by irradiating the F atom one can record signal intensity enhancement in the difference spectrum on the carbon atoms which are in the vicinity of the fluorine atom. The ultimate 2D INADEQUATE experiment could be also applied, where all carbon-carbon connections can be obtained (Fig. 1.), however both methods are extremely insensitive. Taking into consideration the bad solubility of the molecule, the long relaxation time of the quaternary carbon atoms, and the fact that the signals appear as doublet in the carbon spectrum due to the coupling with the fluorine atom, it was not possible to record the aforementioned experiments in reasonable time, not even with the cryoprobe technologies. The presence of the sensitive ¹⁹F atom in the molecule, and the possibility of the application of the more sensitive inverse detection method suggested the utilization of ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-¹J(C-C)-ADEQUATE pulse sequence (Fig. 2.). In this experiment the magnetization is transferred by one-bond from ¹⁹F to ¹³C, and then from ¹³C to the neighbouring ¹³C (double quantum coherence), the detection is on the more sensitive nucleus after many back magnetization transfer steps. By utilizing this experiment C-2 and C-4 can be determined, thus the molecular structure can be given (Fig. 3.). In order to be able to apply the pulse sequence on ¹⁹F nucleus, the decoding gradient has to be calculated on ¹⁹F/¹³C nuclei pair. Taking into consideration the positions of the coding and decoding gradients in the pulse sequence this equation has to be solved: $G_1(\gamma_C + \gamma_C) + G_2(\gamma_C) + G_3(\gamma_F) = 0$, where G_1 and G_2 are the coding gradients, G_3 is the decoding gradient in [%] respectively; γ_C and γ_F are the resonance frequencies of ¹³C and ¹⁹F respectively. γ_F / γ_C is 3,7398. If we keep the values of G_1 and G_2 from the ¹H version G_3 results 62.62%, 78.4 ($\gamma_C + \gamma_C$) + 77.4 (γ_C) + G_3 (3,7398 · γ_C) = 0. Since the chemical shift range of ¹⁹F is large (in case of C-F ca. 400 ppm, in case of heteroatom connection ca. 900 ppm), the value of the G_3 decoding gradient should be always calculated by applying the actual γ_F / γ_C ratio, and should not be calculated from the gyromagnetic ratio given in the literature. In extreme cases G_3 can differ in the first decimal value which can be crucial in such an insensitive ¹³C-¹³C correlation experiment. On Fig. 4. the ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-¹J(C-C)-ADEQUATE spectrum of a ca. 10 mg / 0.6 ml DMSO-*d*₆ sample can be seen. It was recorded on a CryoProdygo probehead, the experiment time was ca. one hour (48 rows, 32 scans/increment, 2 sec. relaxation delay). Note, that after the calibration of the spectrum the correlations are not aligned with the ¹⁹F signal, but they can be observed slightly upfield, which is due to isotope shift of ¹³C! The F1 axis is a so called double quantum scale, i.e. the sum of two carbon atoms can be read. The correlations appear in the spectrum should be interpreted as the sum of the carbon atom connected to fluorine atom (C-3) and the neighbouring carbon atom, i.e. the two correlations are $\delta_{C_3} + \delta_{C_2}$ and $\delta_{C_3} + \delta_{C_4}$. C-2 and C-3 have been determined before, thus the sum can be used for the calibration of the double quantum axis. The other correlation gives the chemical shift of C-4: $\delta_{C_4} = 239,0 - 157,9 = 81,1$ ppm. The low chemical shift unequivocal spectral proof that the two halogen atoms have swapped in the reaction, thus the correct molecular formula is (4).

Further applications of the ¹⁹F detected ADEQUATE NMR experiment should be considered. It is possible to get information through four bond connection in the molecules by applying (1,n)-ADEQUATE and (n,1)-ADEQUATE pulse sequences, where n corresponds to long-range 1 to one-bond correlation. It is even possible to establish 6-bond-correlation in a molecule by the utilization of (n,n)-ADEQUATE experiment. On Fig. 7. the ¹⁹F detected 2D-(F-C)-HSQC-²J(C-C)-ADEQUATE can be seen of 1-amino-2-bromo-4-fluoro-5-chlorobenzene. The two (1,2) correlations and the (1,3) correlation are highlighted on the spectrum.