Journal of the Korean Magnetic Resonance Society **2023**, *27*, 10-15
DOI 10.6564/JKMRS.2023.27.2.010

Diastereomeric Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition: determination of configuration with the 2D NMR techniques

Hye Jin Jeong*

Department of Chemistry, Colorado State University, Fort Collins, 80523, United States

Received Jun 13, 2023; Revised Jun 18, 2023; Accepted Jun 19, 2023

Abstract The Strain-Promoted Azide–Alkyne Cycloaddition (SPAAC) is a powerful method for synthesizing triazoles, even under physiological conditions, without a copper catalyst. This technique provides an efficient means for everyone to synthesize complex triazole derivatives rapidly. In order to investigate the configuration of triazole derivatives using bicyclo[6.1.0.]-nonyne (BCN) and chiral azide, it is necessary to employ the 2D NMR. Both 1D and 2D NMR (COSY, HSQC, ^{15}N HMBC) are used to analyze the complex triazole product containing cyclooctyne, a diastereomeric product. The stereometric difference of the proton bonded to the same carbon is determined through the HSQC assignment. The intriguing splitting pattern of carbon resonances also reveals their diastereomeric configuration and will aid in further research based on physiological knowledge.

Keywords triazole, COSY, HSQC, HMBC, 2D NMR

서문

Triazole을 포함하는 다양한 생물활성물질들은 의약물질로 사용되어 유기 합성 분야에서 두드러진 연구주제 중 하나이다. 예를 들어, triazole을 모체로 두고 있는 Rufinamide는 새롭게 제안된 항경련제로, 발작으로 인한 외상방지를 목적으로 연구되었다. 뇌의 비정상적인 흥분을 감소시켜 간질의 치료제로 제안되어 저용량 범위에서 흡수율이 높다는 장점을 가지고 있다.[1] Triazole 유도체는 항균, 항암, 항바이러스 등의 의약물질 활성을 가지고 있기 때문에, 관련 합성연구와 구조분석에 대한 요구가 지속적으로 증가하고 있다.[2,3]

Triazole 유도체 합성에는 고전적으로 쉽고 정량적인 copper(Ⅰ)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC)을 이용한 "Click reaction"이 초기에 이용되어졌다 (Fig. 1).[4,5] CuAAC는 단계적으로 설명하면, 첫번째 copper 촉매가 1-phenoxy-2-propyne과 같은 alkyne과 배위 결합 하고 두번째 copper 촉매가 추가 됨에 따라 시그마 결합을 형성하고 azide compound와 가역적으로 배위하여 불안정한 중간체를 형성한 뒤 azido 질소의 친핵성 반응을 통해 탄소-질소 공유결합을 형성하며 세개의 질소가 포함된 고리 화합물을 생성한다. Copper 촉매 없이도 Click reaction은 진행되는데 이것은 strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC)라고 하며 cyclooctyne을 사용하여 수행되었다. 촉매 없이 진행되는 click reaction은 생체분자와 살아있는 세포실험에 적용할 수 있다는 장점을 가지며 bicyclo[6.1.0.]-nonyne (BCN)을 이용하여 CuAAC를 대체하여 광범위한 분야에

* Address correspondence to: **Hye Jin Jeong,** Department of Chemistry, Colorado State University, Fort Collins 80523, United States, Tel:*** - **** - **** E-mail: hyejin@colostate.edu

사용되어진다.[6,7]

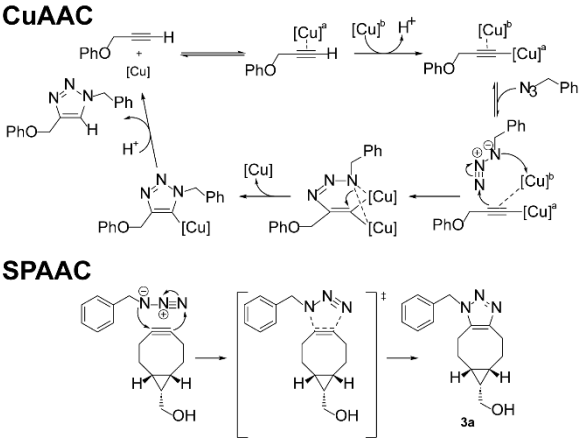


Figure 1. Proposed copper(I) catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and strain-promoted azide alkyne cycloaddition (SPAAC)

SPAAC를 이용한 triazole 유도체의 합성은 짧은 시간내에 간단한 반응 조건으로 정량적인 반응이 진행되며 최근 연구에서는 바이오 마커와 연결하여 형광현미경을 이용한 분석도 진행되어졌다.[8,9] 이전 연구에서는 파라수소를 이용한 signal amplification by reversible exchange (SABRE)를 통해 triazole 유도체의 합성을 실시간 관찰하며 메커니즘 연구에 기반을 다졌다.[10] 하지만, triazole 합성 후 BCN구조와 결합된 생성물의 구조는 해석의 어려움을 가지고 있다. 그래서, 단백질과 같은 질량이 크고 복잡한 분자구조도 분석해 낼 수 있는 2D NMR을 통해[11,12] 분자 비대칭성을 가지고 있는 azide를 포함한 부분 입체 이성질체 생성물의 분석을 조사하였다.
2D NMR의 이점은 복잡한 유기물질의 구조분석에 있다. Spiranic carbon을 포함하는 부분 입체 이성질체의 구조확인에 Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC)와 Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy(NOESY)을 이용하거나,[13] 전립선암 치료에 사용되는 항안드로겐 약물인 bicalutamide analog의 부분 입체 이성질체의 분석에도 사용이 되어졌다.[14]
이와 같은 2D NMR분석법의 이점을 이용하여, 본 논문에서는 2차원 핵자기공명분광법 (COSY, HSQC, HMBC)을 사용하여 SPAAC를 통한 triazole 유도체의 부분 입체 이성질체의 구조를 설명하고자 한다. 해당 연구는 이후 click reaction을 이용하여 합성된 생물활성을 가지는 복잡한 triazole 구조 해석에 중요한 해석의 근거가 될 것이다.

실험방법

Synthesis of 3a- Methanol에 녹인 ((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-un-9-yl) methanol (**2**, 24 mg, 0.16 μmol) 용액을 benzyl azide (**1a**, 21mg, 0.16 μmol) acetonitrile/water (3:1)용액에 첨가 후 실온에서 2시간 동안 교반 시킨다. 반응이 끝난 혼합물은 감압 응축기를 이용하여 용매를 제거하고 methylene chloride 5 mL를 첨가하여 용해한다. 5 mL의 증류수를 사용하여 용액을 세척하고 magnesium sulfate를 사용하여 용액을 건조 한 뒤 다시 한번 감압 응축기를 사용하여 용매를 제거한다. 결합혼합물을 컬럼 크로마토그래피를 사용 분리 정제한다. (ethyl acetate, R_f = 0.4). 수득률: 45 mg (100%)

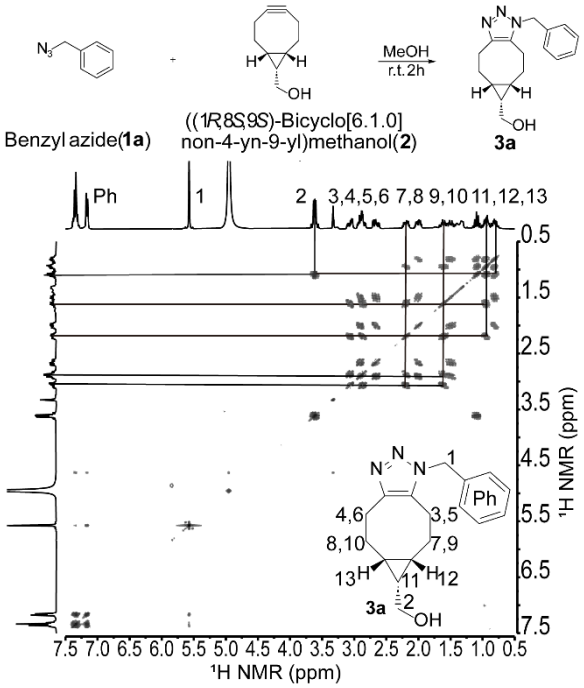
Synthesis of 3b and 3c-
((1*R*,8*S*,9*S*)-Bicyclo[6.1.0]non-4-un-9-yl) methanol (**2**, 20 mg, 0.13 μmol) 을 녹인 methanol 용액을 (*S*)-3-azido-1,2,-propandiol (**1b**, 16mg, 0.13 μmol) methanol (1 mL)용액에 추가하여 실온에서 2시간 동안 교반 해준다. 반응 혼합물은 감압 응축기를 이용하여 용매를 제거하고 결과 혼합물은 methylene chloride 5 mL를 사용하여 용해한다. 5 mL의 증류수를 사용하여 유기용액을 세척하고, magnesium sulfate를 사용하여 수분을 제거 후 유기용매를 감압 응축기를 사용하여 제거한다. 최종 생성 혼합물을 컬럼 크로마토그래피로 확인한다. (ethyl acetate, R_f = 0.1). 수득률: 36 mg (99%)

NMR experiments- NMR을 이용한 구조

분석은 1D의 ^{1}H, ^{13}C, 2D의 COSY, HSQC, ^{15}N HMBC을 이용하여 기록하였다. Bruker Avance Ⅲ 300MHz NMR 분광기, TCI cryoprobe가 장착된 Bruker Avance Ⅲ HD 850 MHz를 이용하였다. 10 mg의 **3a**와 **3b**를 methanol-d_4 0.5 mL (^{1}H NMR: δ 4.89 ppm, ^{13}C NMR: δ 49 ppm)에 녹여 샘플을 준비하였다.

실험결과

Benzyl azide와 BCN의 SPAAC를 통한 **3a**의 생성은 100%의 수득률을 보이며 COSY 스펙트럼 (Fig. 2)을 통해 쉽게 구조 분석이 가능하다. 5.5 ppm 의 benzylic proton 은 H-2 와 구분되게 다른 수소와 영향을 받지 않는다. H-2 의 상관관계는 H-11 로 이어지며, H-11 은 0.8 ppm 의 H-12,13 과 연결된다. H-12 는 H-7,9 와 H-13 은 H-8,10 과의 상관관계를 분명하게 보여주고 있다. H-3,5 와 H-4,6 도 각각



이웃한 H-7,9 와 H-8,10 과의 연결로

Figure 2. COSY spectrum of **3a**; Correlation between H-2 and H-11, Correlation between H-7, H-9, H-3, and H-5

3a 의구조 분석은 수소 간의 상관관계를 분석하여 분명하게 보여준다.

하지만 (*S*)-3-azido-propane-1,2-diol 을 이용한 SPAAC 반응은 **3a** 보다 복잡한 구조의 **3b**,**3c**를 생성한다. Azide와 BCN의 접근이 한 방향으로만 이루어지는 것이 아니라 양방향에 진행됨에 따라 부분 입체 이성질체 구조를 고려한 생성물 **3b**, **3c** 의 구조를 추가적인 2D NMR 분석을 바탕으로 설명 가능하다 (Fig. 3).

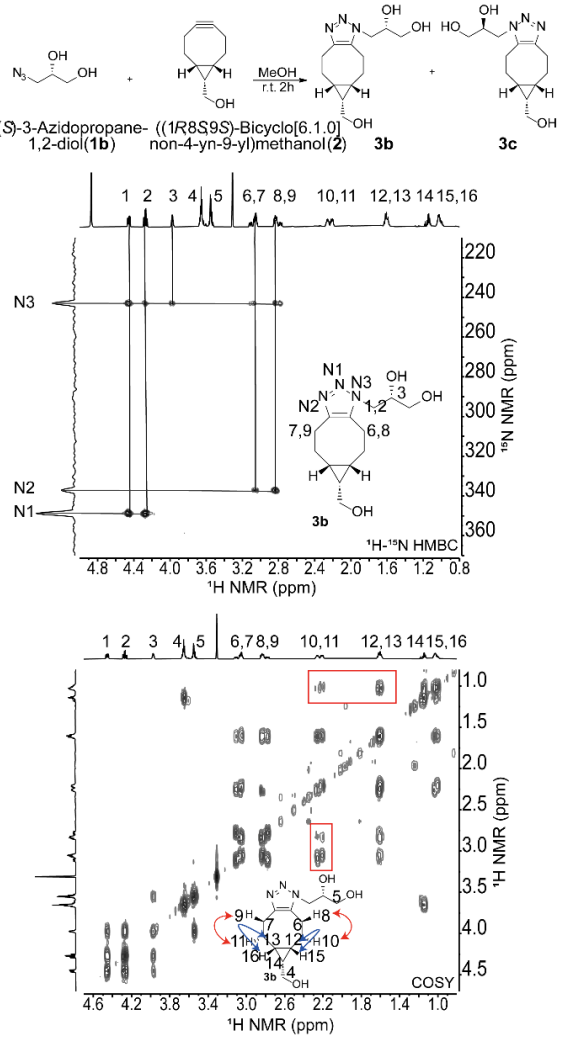


Figure 3. ^{1}H-^{15}N HMBC and COSY spectra of **3b**

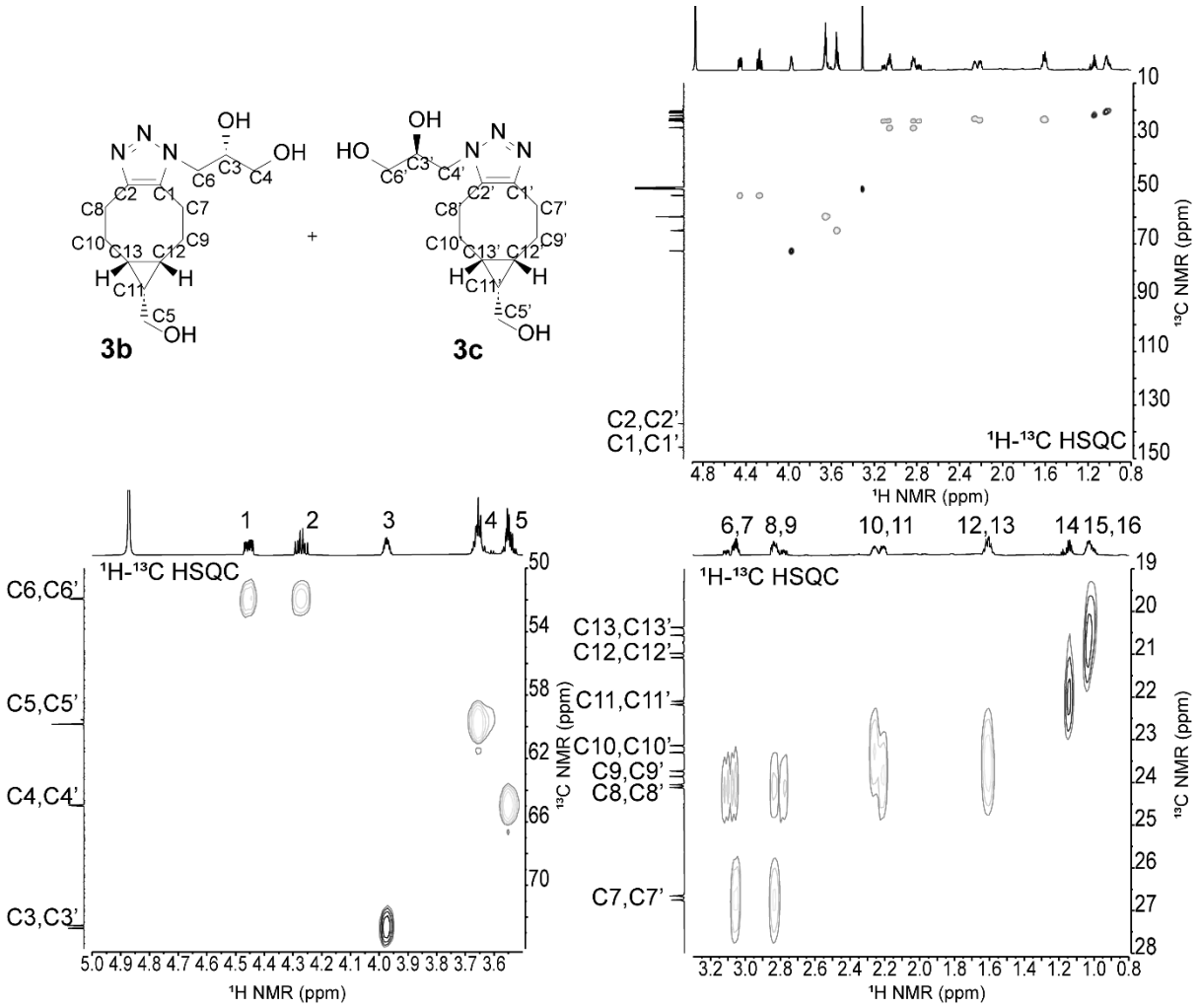


Figure 4. ^{1}H-^{13}C HSQC spectra of **3b** and **3c**

^{1}H−^{15}N HMBC 스펙트럼에서는 propanediol 구조에 해당되는 H−1,2,3 과 cyclooctyne 의 H−6,7 과 8,9 의 상관관계를 triazole 의 질소와 일치시켜 구조를 확인해 볼 수 있다. N3 은 이웃한 H−1,2,3,6,8 과 N2 는 H−7,9 와 N1 은 H−1,2 와 ^{3}J 커플링을 보이고 있다. H−6,7,8,9 와 H−10, H−11 의 상관관계에서 앞쪽으로 나와있는 H−8,9 와 아래쪽으로 내려가 있는 H−10,11 의 상관관계가 같은 위치에 있는 H−8,9 와 H−12,13 보다 낮은 세기를 보여주며 구체적이 구조 분석의 근거를 제시해 준다. 이러한 차이는 H−15,16 과 같은 방향의 H−12,13 과 반대 방향의 H−10,11 세기의 차이에서도 보여준다. 서로 다른 방향의 상관 관계 세기가 현저하게 낮게 보여 진다. SPAAC 에 의한 triazole 유도체 **3b** 의 부분 입체 이성질체 구조는 ^{1}H−^{13}C HSQC 의 스펙트럼에서 특징을 명확하게 보인다 (Fig. 4). 모든 탄소 피크의 분리는 150−10 ppm 전반에서 보여준다. C1, C2 는 수소와의 접점이 없는 triazole 의 aromatic ring 에 포함되어 있으며 H−1,2,3,4,5 도 각각의 연결된 탄소의 위치를 확인해주지만 카이랄성을 가지는 H−3 과 연결된 C3, C3'의 차이가 두드러지게 보인다. 28−19 ppm 사이의 cyclooctyne ring 의 탄소들의 분리는 부분 입체 이성질체의 특징을 설명해주면 수소−탄소의 상관관계에 해당되는

수소에 2 배의 탄소 피크가 **3b**, **3c** 각 위치에 해당되는 연결을 설명하고 있다.

고찰

본 연구는 변형 촉진 azide 와 alkyne 의 고리 첨가반응을 이용한 triazole 유도체의 합성과 구조분석에 대한 연구를 조사하였다. Benzyl azide 와 BCN 고리 첨가 반응은 이성질체의 생성을 염두에 두지 않고 간단한 COSY 2D NMR 스펙트럼을 이용해서 설명이 가능하였다. 하지만 카이랄성을 포함한 azide 의 결합은 BCN 의 양 방향에서 접근함에 따라 부분 입체 이성질체의 형성을 예상할 수 있게 하며, 3 종류의 2D NMR 스펙트럼 (COSY, HSQC, HMBC)를 이용하여 구조의 자세한 설명을 가능하게 한다. COSY 를 통해 동일탄소에 결합된 두종류의 수소의 ^{3}J 커플링을 세기의 차이로 설명할 수 있었다. 동일 방향의 이웃한 수소끼리 강한 상관관계를 형성한다고 이야기할 수 있다. 탄소의 분리된 피크는 HSQC 를 통해 두종류의 부분 입체 이성질체의 존재 가능성을 증명해 주는 근거가 되었다.

결론

NMR 분광기를 사용하여 **3a**−**3c** 의 구체적인 구조를 설명하고 그 근거를 2D NMR 스펙트럼의 상관성을 이용하여 증명하였다. 카이랄성이 없는 반응물(**3a**)의 SPAAC 는 부분 입체구조 이성질체 여부를 고려할 필요가 없지만 반응물들의 양방향 접근을 통한 부분 입체구조 이성질체의 형성을 **3b**,**3c** 의 NMR 스펙트럼을 통해 보여주고 있다. 단순한 ^{13}C NMR 의 분리된 스펙트럼은 해석의 오류를 불러올 수 있었지만, 상호 의존적인 2D NMR 스펙트럼의 해석은 부분 입체 이성질체의 구조분석을 가능하게 해주었다. 또한, 이성질체의 탄소 피크의 높이 차이는 고리형성 반응의 위치선택성이 동일한 비율로 진행되었음을 짐작하게 한다. 비록, 수소를 이용한 구조 분석에서 입체구조 이성질체의 가능성을 짐작하기는 어려웠지만, 이웃한 동일 방향의 수소들의 상관관계를 자세한 구조 분석을 통해 설명하였다. ^{1}H NMR 스펙트럼에서 보여지는 부분 입체이성질체의 차이를 Nuclear Overhauser Effect (NOE)를 이용하여 분석한 결과는 이전에도 보고되었지만,[15] ^{1}H NMR 에서도 구분할 수 없는 실험결과는 2D NMR 의 도입이 필수적이라고 보여진다. 입체구조의 분석을 COSY, HSQC, HMBC 를 도입해 작은 입체구조의 차이를 구체적으로 설명할 수 있기 때문이다. 이를 통해 SPAAC 를 이용한 triazole 유도체뿐만 아니라 보다 복잡한 구조의 의약물질의 합성, 구조분석에 2D NMR 을 이용한 접근이 입체 이성질체 사이의 구조적 상관관계를 설명하는 후속연구에서도 큰 도움이 될 것이라 결론지어졌다.

감사의 글

이 작품은 교육 과학 기술부에 의해 투자 한국 연구 재단을 통해 기초 과학 연구 프로그램 (NRF−2021R1A6A3A14046029)에서 보조금에 의해 지원되었다.

References

1. M. Bialer, S. I. Johannessen, H. J. Kupferberg, R. H. Levy, P. Loiseau, and E. Perucca, *Epilepsy Res.* **43**, 11 (2001)
2. M. Chen, S. Lu, G. Yuan, S. Yang, and X. Du, *Heterocycl. Commun.* **6**, 421 (2000)
3. E. A. Sheremet, R. I. Tomanov, E. V. Trukhin, and V. M. Berestovitskaya, *Russ. J. Org. Chem.* **40**, 594 (2004)

4. H. C. Kolb, M. G. Finn, and K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40**, 2004 (2001)
5. N. J. Agard, J, M. Baskin, J. A. Prescher, A. Lo, and C. R. ertozzi, *ACS Chem. Biol.* **130**, 11486 (2008)
6. K. Adachi, T. Meguro, Y. Sakata, K. Igawa, K. Tomooka, T. Hosoya, and S. Yoshida, *Chem. Commu.* **56**, 9823 (2020)
7. J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. Hendriks, F. P. Rutjes, J. C. van Hst, D. J. Lefeber, P. Friedl, and F. L. van Delft, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 9422 (2010)
8. M. Chen, Y. Li, R. Han, Q. Chen, L. Jiang, and X. Luo, *Sensors and Actuators B: Chemical*. **363**, 131810 (2022)
9. J. Liu, M. A. A. Abdullah, L. Yang, and J. Wang, *Anal. Chem.* **92**, 647 (2020)
10. H. J. Jeong, S. Min, J. Baek, J. Kim, J. Chung, and K. Jeong, *ACS Measurement Science Au* **3**, 134 (2023)
11. S-R. Choi, S. K. Kim, J. Choi, and J-H. Lee, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **26**, 46 (2022)
12. E. Kim and H-K. Cheong, *J. Kor. Magn. Reson. Soc.* **21**, 131 (2017)
13. J. L. C. Sousa, A. M. S. Silva, I. Alkorta, and J. Elguero, *MRC* **57**, 512 (2019)
14. W. Li, D. J. Hwang, D. Cremer, H. Joo, E. Kraka, J. Kim, C. R. Ross, V. Q. Nguyen, J. T. Dalton, and D. D. Miller, *Chirality* **6**, 578 (2009)
15. D. X. Hu, P. Grice, and S. V. Ley, *JOC* **77**, 5198 (2012)