

Egykristály-röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározások a Debreceni Egyetem Kémiai Intézetében

BÉNYEI Attila^{a*}

^aDebreceni Egyetem, Fizikai Kémiai Tanszék, Röntgendiffrakciós Szerkezetvizsgáló Laboratórium, Egyetem tér 1, 4032 Debrecen

1. Bevezetés

Az egykristály-röntgendiffrakció az egyik legnagyobb hatékonyságú szerkezetvizsgáló módszer, jelentősen hozzájárul a kémia és a szerkezeti biológia napjainkban tapasztalható dinamikus fejlődéséhez. Ennek egyik oka hogy az egykristály-röntgendiffrakció abszolút módszer: nem igényel lényegi kémiai információt a vizsgált rendszerről. Sok esetben még az elemösszetétel ismerete sem szükséges a teljes szerkezet sikeres meghatározásához, a vizsgálandó anyagból kell megfelelő egykristályt növeszteni. A méréshez használt kb. 0,3x0,3x0,3 mm-es egykristályban lévő sok-sok millió elemi cella végzi el azt az erősítést, ami lehetővé teszi, hogy a mikrovilág jelenségéről (az elektronsűrűség eloszlása) makroszkópikus eszközökkel (a szórési kép formájában) információkat szerezzünk. Ma az új vegyületek szerkezeti jellemzésének végső próbaköve az egykristály-röntgendiffrakciós szerkezetigazolás. A módszer jelentőségét mutatja az is, hogy a Nemzetközi Krisztallográfiai Unió (International Union of Crystallography) ajánlására 2013 a krisztallográfia éve (International Year of Crystallography, IYCr2013).

A Debreceni Egyetemen (volt Kossuth Lajos Tudományegyetemen) évtizedek óta folyó preparatív kémiai kutatások a 80-as évek végére egyre inkább szükségessé tették a röntgendiffrakciós vizsgálatokat. Ezt felismerve az akkori Kémiai Tanszékcsoporthoz (ma Kémiai Intézet) több pályázatot adott be egy diffraktométer megvásárlására ami végül a T-09252-95. sz. TEMPUS Structural Joint European Project pályázat segítségével sikerült. 1996 decemberében installáltuk az új, Enraf Nonius (ma Bruker-Nonius) gyártmányú, MACH3 típusú négykörös egykristály-röntgendiffraktométert. A készüléket hazai pályázatokból (MTA, OTKA, OMFB stb.) kiegészítettük zártkörű vízhűtővel, folyékony nitrogént használó alacsony hőmérsékletet (90-300K) biztosító Oxford Cryosystem gyártmányú termosztáttal, polarizációs sztereo mikroszkóppal, számítógépekkel és software eszközökkel valamint programozható, egykristály növelésére alkalmas termosztáttal. Mindezek segítségével 1996-ban létrejött az első (és ma is egyedüli) Budapesten kívüli egykristály-röntgendiffrakciós laboratórium hazánkban (<http://puma.unideb.hu/~xray>).

A specializáció segítésére vegyész MSc hallgatók számára a *Röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálat* választható tantárgyat, biológia MSc hallgatók számára a *Fehérjekrisztallográfia* kurzust hirdetjük meg.

Az egykristály-röntgendiffrakciós szerkezet- meghatározás szépsége jelenti egyben a nehézségét is. A Debrecenben

elvégzett szerkezet-vizsgálatok kémiai szempontból nagyon széles területet ölelnek fel: az átmeneti fémek komplexeitől a kis szerves molekulák és cukorszármazékok konfigurációján és konformációján át a hidrogén hidas rendszerek topológiai elemzéséig. Az 1996-2011 években együttműködő partnereinkkel közösen mintegy 60 tudományos közleményt publikáltunk. A kutatásokat hazai és külföldi egyetemekkel (Szeged, Budapest, Veszprém, Texas A and M University, College Station, University of St Andrews, Tokyo Institute of Technology) valamint gyógyszergyárakkal együttműködve végezzük.

Az itt nem tárgyalt kutatási témák közül említésre érdemes a ritkaföldfémek makrociklusokkal alkotott komplexeinek¹ vagy a vízoldható foszfinok guanidinium sóinak és platinafém komplexeinek elemzése² is.

2. Abszolút konfiguráció meghatározása

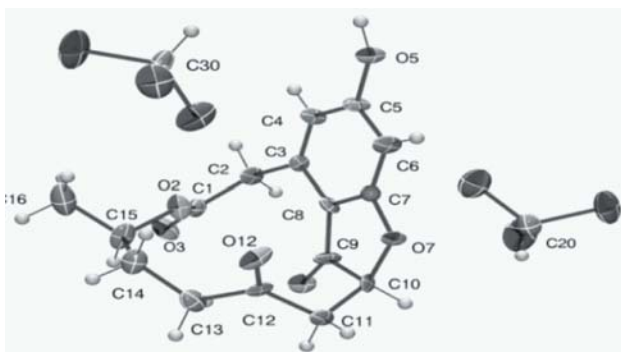
Az optikai aktivitás és a kiralitás a kémia egyik fontos jelensége. Az abszolút konfiguráció egyértelmű meghatározásának máig egyetlen, széles körben alkalmazható módszere az egykristály-röntgendiffrakció. Spektroszkópiai módszerekkel (CD, NMR shift reagensek) is tehetünk összehasonlításokat egy-egy vegyületcsaládon belül. Már vannak olyan, a cirkuláris dikroizmust és a kvantumkémiai számításokat ötvöző módszerek, amikkel – pl. a szilárd fázisban röntgendiffrakcióval felderített szerkezet és a Cotton effektus ismeretében - javaslatot lehet tenni az abszolút konfigurációra, de ezek alkalmazhatósága korlátozott. Az egykristály-röntgendiffrakciós módszer jelentős redménye volt, hogy vele sikerült igazolni a D cukrok lebontásával nyert (+) gliceraldehyd (*R*) konfigurációját. Az abszolút konfiguráció röntgendiffrakciós ab initio meghatározása azon alapul, hogy ha pontosan megmérjük a (*hkl*) és (*-h-k-l*) reflexiók (Friedel párok) intenzitását az eltérésekből következtetni tudunk az abszolút konfigurációra. Ahhoz, hogy ezt a kicsiny eltérést biztonsággal detektálni tudjuk a szerkezetben nehéz atomnak (a mi készülékünk esetén legalább foszfor vagy kén) kell lennie.

2.1. Egy metabolit abszolút szerkezete.

Ez a projekt kitűnően példázta az egykristály-röntgendiffrakció hatékonyságát abszolút konfiguráció és ismeretlen szerkezet meghatározásában. Német kutatókkal együttműködve³ egy *Fungus Curvularia sp.* gombából kinyert metabolit szerkezete volt kérdéses. A problémát nehezítette, hogy csak minimális anyagmennyiség állt rendelkezésünkre és az előzetesen elvégzett ¹H NMR

*Tel.: 36 52 512 900/22486; fax: 36 52 512 915; e-mail: benyei.attila@science.unideb.hu

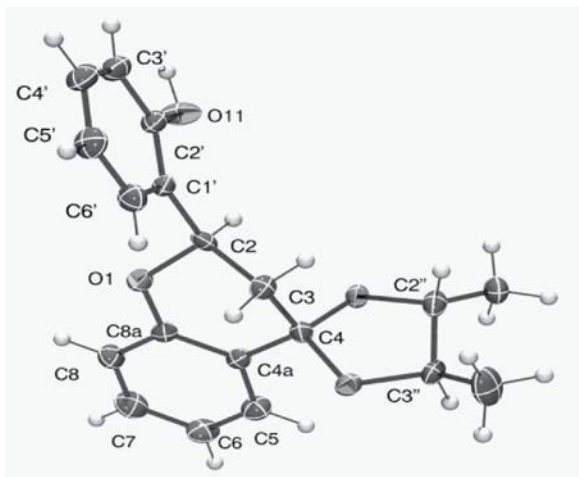
mérések csak annyit valószínűsítettek, hogy a szerkezetre tett feltételezés helytelen. A kutatócsoportunknak azonban szerencséje volt! Az NMR csőből néhány szép kristály vált ki, mint kiderült az anyag kloroform szolvátjának formájában. A néhány nap alatt elvégzett diffrakciós vizsgálat egyértelműen tisztázta a szerkezetet (1. ábra), a királis centrumok korábban feltételezettől eltérő, C10(*S*), C15(*R*) konfigurációját és természetesen a további NMR mérések eredményei is magyarázhatóvá váltak. Külön előny, hogy a röntgendiffrakciós szerkezetet felhasználva a CD vizsgálatokat felhasználó kvantumkémiai számítások is ellenőrizhetőek lettek.



1. Ábra. A Curvulone A.2CHCl₃ szerkezet.

2.2. Ismert kiralitás centrumra vonatkoztatott konfiguráció

Ha a szerkezetben nincs nehéz atom, de valamely kiralitás centrum konfigurációját ismerjük, akkor az ismeretlen konfigurációt erre vonatkoztatva adhatjuk meg. A transz-*Pterocarpán* előállításánál során egy köztitermék⁴ (-)-(*R,R*)-2,3-butándiollal reagáltatva a képződött ketál szerkezetének meghatározása (2. ábra) lehetővé tette a C2 atom (*R*) konfigurációjának egyértelmű azonosítását. A röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás további CD vizsgálatokhoz^{5,6} fontos kiindulási pontot adott.

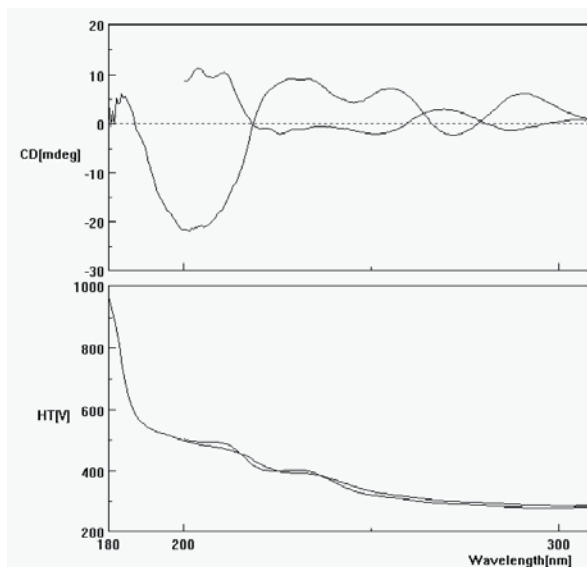


2. Ábra. Relatív konfiguráció meghatározása: C2(*R*), mivel C2'(*R*) és C3''(*R*).

2.3. Racém konglomerátum képződése

Nagyon érdekes jelenség hogy egyes esetekben racém elegy konglomerátum formájában kristályosodik, vagyis a két enantiomer külön-külön képez makroszkopikus kristályokat.

Napjaink egyik intenzív kutatási területe a kiralitás létrejötté akirális környezetben. Ennek egyik példája a racém konglomerátum képződése. A krisztallográfia nyelvén ez azt jelenti, hogy a racém elegy a királis molekulák számára megengedett 65 tércsoport valamelyikében kristályosodik és csak az egyik enantiomer vagy annak a tércsoport szimmetriája által megengedett részlete van az aszimmetrikus egységben. A tiszta enantiomerek makroszkopikus kristályai külön-választhatóak. Az utóbbi 2 évben több olyan anyagot is találtunk, amelyeknél ez a viszonylag ritkának tartott jelenség tapasztalható volt. A tercier amino effektus vizsgálata során⁶⁻⁹ azt tapasztaltuk, hogy egy vegyület (6,7,8,8a-tetrahidrodibenzo[*e,g*]pirrolo[1,2-*a*]azocin-9,9(10*H*)-dikarbonitril) röntgendiffrakciós szerkezete arra utalt, hogy az anyag racém konglomerátum.



3. Ábra. CD effektus racém konglomerátum egyetlen kristályán illetve egy másik kristályból készített oldaton mérve. Az elporított anyagból készült oldat nem mutat effektust.

Nehéz atom hiányában az abszolút konfigurációt nem tudtuk meghatározni, de cirkuláris dikroizmus módszerrel is igazoltuk (3. ábra) feltételezésünket. Egyetlen kristályt szilárd formában mérve adott CD effektust, egy másik kristályt feloldva ellentétes effektust kaptunk míg a teljes mintából készült oldat nem forog. Vízoldható foszfán ligandumok esetén is találtunk racém konglomerátumot, ekkor az abszolút konfigurációt is meg tudtuk határozni. Érdekes módon ezek a vegyületek is aminszármazékok voltak. A kristályosítási körülmények hatásának részletes vizsgálatától reméljük, hogy jobban megértjük a racém konglomerátumok képződését.

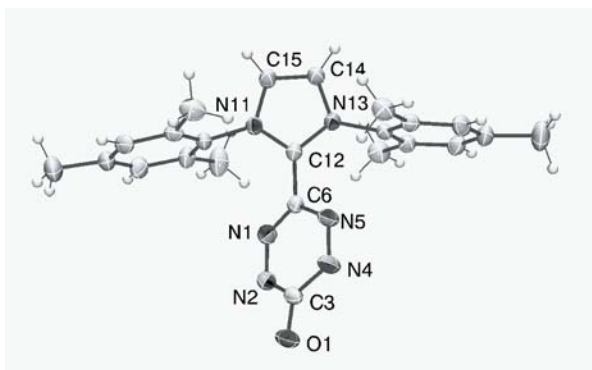
3. Váratlan szerkezetek

A kémia összehasonlításra alapuló tudomány: összevetjük a különböző funkciós csoportok reaktivitását az adott körülmények között. A kapott ismereteket felhasználva próbáljuk megjósolni az új reakciók termékének szerkezetét és ezt igazoljuk az ugyancsak összehasonlításra alapuló a spektroszkópiai módszerekkel. Ez az esetek nagy részében sikeres is, de mindig vannak váratlan reakciók vagy a kapott termék új szerkezeti elemet tartalmaz. Az egykristály-röntgendiffrakció mint független és abszolút

módszer lehetővé teszi a termékek szerkezetének igazolását. Saját tapasztalatainkkal egyezik más kristallográfusok véleménye: az esetek 5-8%-ában a feltételezett szerkezet hibás voltát bizonyítja a röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás és még érdekesebb új anyagot állítottunk elő!

3.1. Egy új vegyületcsalád: kinoidális tetrazinok

N-heterociklusos karbéneket reagáltatva 3,5-bisz(3',5'-dimetilpirazolil)-tetrazinnal szervesen karbonát sók jelenlétében érdekes, új tulajdonságú anyagokat¹⁰ kaptunk: kinoidális tetrazinokat (4. ábra). A röntgendiffrakcióval meghatározott szerkezettel általában összhangban voltak a spektroszkópiai eredmények de nem magyaráztak egy érdekes megfigyelést: a tetrazin és az imidazol gyűrűk a szilárd fázisban nem koplánarisak.



4. Ábra. Kinoidális tetrazin struktúra.

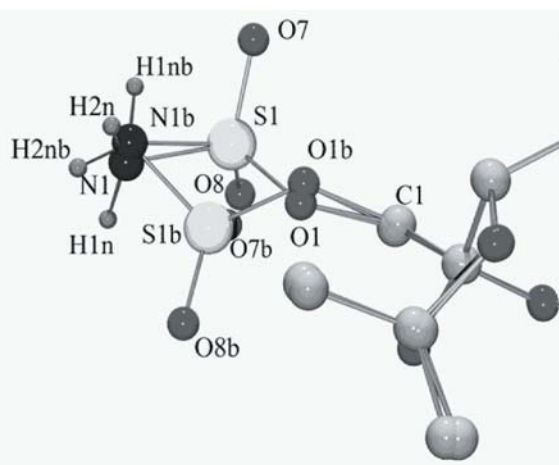
A különböző oldószerekben felvett UV-VIS spektrumok erős polaritás függést mutatnak ami konjugációra utal. A szintézist elvégeztük az N11 és N13 pozíciókban különböző, kisebb és nagyobb térkitöltésű szubsztituenst tartalmazó származékokkal¹¹ és a röntgendiffrakcióval meghatározott szilárd fázisú szerkezetek minden esetben mutatták a gyűrűk kifordulását 18-42°-al ami viszont a konjugáció megszűntét jelzi. A jelenség magyarázata hogy a kristályban a molekulák között fellépő kölcsönhatások konformáció változást okoznak.

4. Polimorfia kutatások

Legújabbban a kutatási témánkat kiegészítettük a polimorfia (vagy polimorfizmus) jelenségének vizsgálatával. Számos anyagról – köztük gyógyszeripari hatóanyagokról – ismert, hogy a kristályosítási körülményektől függően a szilárd fázis szerkezete (tércsoport, elemi cella, a molekulák elrendeződése és konformációja) különböző lehet, azaz több polimorf formában léteznek. A különböző formák eltérő tulajdonságot, szint, oldódási sebességet, biológiai elérhetőséget és aktivitást, akár különböző ízt mutatnak. Ennek megfelelően a polimorfia a csokoládétól a pigmenteken át a gyógyszerekig a mindennapjainkat is jelentősen befolyásoló jelenség. A polimorfok vizsgálatának alapvető eszköze a röntgendiffrakció, a pormintáról készült felvétel. Gyógyszerész hallgatók számára hirdetjük a *Gyógyszerhatóanyagok polimorfizmusa* választható tárgyat és több gyógyszergyárral van kapcsolunk a polimorfia kutatásban.

4.1. Szulfonamid polimorfok

A szulfonamidokról ismert, hogy könnyen képeznek polimorfokat¹² mivel különböző hidrogénkötés-mintázatokat¹³ tudnak alkotni. Ezért nem volt meglepő, hogy egy szulfonamid cukorszármazék két különböző kristályformában is előállítható volt (5. ábra) amikben az C1-O1 kötés körüli elfordulás 2 illetve 3 hidrogén híd létrejöttét tette lehetővé és ez tükröződik az eltérő olvadáspontokban. A jelenség érdekessége, hogy a polimorfok közötti átjárást egyik irányból sem sikerült elérni vizes alkoholból való átkristályosítással, az oldat enyhe melegítésével sem! Csak a szintézis lépéseinek módosításával sikerült egyik polimorf helyett a másikat előállítani. Ez a példa is igazolja, hogy a hidrogénkötések hálózata még poláris oldószerben is dimer vagy oligomer formában tartja az anyagokat.



5. Ábra. Szulfonamid polimorfok.

5. További tervek

Az elmúlt 15 év eredménye, hogy Debrecenben meghonosodott és mindennapi segédeszköz lett az egykristály-röntgendiffrakciós szerkezet-meghatározás. Ezeket a kutatásokat széleskörű együttműködésben végezzük. A továbblépést a kis molekulák területén a polimorfia vizsgálata jelenti. Ugyanakkor elindultunk a fehérjekristallográfiai kutatások megteremtésének irányába is. A Röntgendiffrakciós Laboratórium és több más kutatócsoport részvételével létrejött a Szerkezeti Biológia és Molekuláris Felismerés Műhely (<http://www.structbiol.uni.deb.hu>). Folyamatosan pályázunk egy új, CCD detektoros diffraktométer megvásárlására, ami egyrészt a ma már elavult készülék kiváltását, másrészt fehérje kristályok diffrakciós vizsgálatát is lehetővé teszi.

Köszönetnyilvánítás

Köszönet az együttműködő kutatócsoportoknak, hallgatóknak és kutatóknak a mérésekhez szükséges anyagokért. Jelenlegi kutatásaink az EU támogatásával, az Európai Szociális Alap részfinanszírozásával valósulnak meg a TÁMOP-4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 projekt keretében. Köszönet a bírálók hasznos észrevételeiért.

Hivatkozások

1. Tircsó, G.; Bényei, A.; Brücher, E.; Kis, A.; Király, R. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 4951–4962.
2. Kathó, Á.; Bényei, A.; Joó, F.; Sági, M. *Adv.Synth. Catal.*, **2002**, *344*, 278-282.
3. Dai, J.; Krohn, K.; Flörke, U.; Pesticelli, G.; Kerti G.; Papp, T.; Kövér, E.K.; Bényei, A.C.; Draeger, S.; Schulz, B.; Kurtán, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6928–6957.
4. Kiss, L.; Kurtán, T.; Antus, S.; Bényei, A. *Chirality*, **2003**, *15*, 558-563.
5. Kurtán, T.; Borbás, A.; Szabó, Z.B.; Lipták, A.; Bényei, A.; Antus, S. *Chirality*, **2004**, *16*, 244-250.
6. Kurtán, T.; Baitz, G.E.; Majer, Z.; Bényei, A.; Antus, S. *JCS Perkin. Trans. I*, **2002**, 888-894.
7. Polonka-Bálint, A.; Saraceno, C.; Ludányi, K.; Bényei, A.; Mátyus, P. *Synlett*, **2008**, 2846-2850.
8. Földi, A. A.; Ludányi K.; Bényei, A.; Mátyus, P. *Synlett*, **2010**, 2109-2113.
9. Dunkel, P.; Túrós, G.; Bényei, A.; Ludányi K.; Mátyus, P. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 2331-2339.
10. Bostai, B.; Novák, Z.; Bényei, A.; Kotschy, A. *Organic Lett.*, **2007**, *9*, 3437-3439.
11. Bényei, A. ; Bostai, B.; Kotschy, A., még nem publikált eredmények.
12. Bernstein, J. *Polymorphism in Molecular Crystals*; Clarendon Press: Oxford, **2002**; pp 241–249.
13. Adsmo, D.A.; Grant, D.J.W. *J. Pharm. Sci.*, **2001**, *90*, 2058-2077.

Single Crystal X-ray Diffraction Studies at the Institute of Chemistry, University of Debrecen

Single crystal X-ray diffraction is an independent absolute method which works even with minimal chemical information. The Laboratory for X-ray Diffraction was established in 1996 at the University of Debrecen as the first single crystal X-ray diffraction laboratory in Hungary outside Budapest. Our main mission is single crystal structure determination (<http://puma.unideb.hu/~xray>) for academic and industrial partners in Hungary. Several hundreds of structures were determined, and more than 60 papers were published in the last 15 years.

A metabolite, *Curvulone A* (Figure 1) was extracted in minimal amount from *Fungus Curvularia sp.* As crystalline chloroform solvates were formed in the NMR tube, the absolute configuration could be determined unambiguously³ as C10(S) and C15(R) in contrast with earlier suggestions. Circular dichroism methods combined with quantumchemical calculations for determining the absolute configuration were validated, too.

Configuration of chiral centers can also be determined using X-ray diffraction method when there is at least one known chiral center in the structure. This was observed⁴ in the case of a ketal of a *Pterocarpan* skeleton derivative (Figure 2). Reference points for CD measurements in case of other compounds^{5,6} were also given by diffraction studies.

Racemic conglomerates are homochiral macroscopic crystals of the enantiomers. Studying the tertiary amino effect⁷⁻⁹ it was

observed that 6,7,8,8a-tetrahydrodibenzo-[e,g]pyrrolo[1,2-a]azocine-9,9(10*H*)-dicarbonitril forms racemic conglomerates. Independent CD measurements proved the observation (Figure 3) by giving Cotton effect for one chosen crystal, opposite effect by dissolving another crystal and no effect when the bulk solid was dissolved and measured. Further studies are planned to understand how pure enantiomers are formed via crystallization under achiral conditions.

By reacting N-heterocyclic carbenes with 3,5-bis(3',5'-dimethylpyrazolyl)-tetrazine in the presence of inorganic carbonates¹⁰ a new compound class, quinoidal tetrazines are formed (Figure 4).

Polymorphic forms of pharmaceuticals are also studied at the Laboratory for X-ray Diffraction. It is well known, that sulphonamides are forming polymorphs^{12,13} and it was observed by us, too (Figure 5). The difference in the melting points of the two forms is the result of different hydrogen bond patterns. In this case interconversion of polymorphic forms could not be achieved by recrystallizing the compound from wet alcohol. This indicates that hydrogen bonds are not broken completely even in polar solvents.

The future plans of the Laboratory for X-ray Diffraction at the University of Debrecen include submitting proposals for a new diffractometer equipped with a CCD detector which will make it possible to test and measure protein crystals, too.