



University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Gabrijel Zubčić

STABILITY AND REARRANGEMENTS OF *N*-CENTERED RADICALS RELEVANT FOR SYNTHESES OF BIOACTIVE COMPOUNDS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors

Associate Professor Davor Šakić, PhD

Professor Valerije Vrčec, PhD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Gabrijel Zubčić

**STABILNOST I PREGRAĐIVANJE
N-RADIKALA RELEVANTNIH ZA SINTEZE
BIOAKTIVNIH SPOJEVA**

DOKTORSKI RAD

Mentori

Izv. prof. dr. sc. Davor Šakić
Prof. dr. sc. Valerije Vrčec

Zagreb, 2025

SUMMARY

The main goal of this doctoral thesis was to investigate the rearrangement reactions in which nitrogen centered radicals participate. Specific goals of this thesis were to investigate nitrogen centered radicals in the context of the Hofmann–Löffler–Freitag (HLF) reaction, namely, to explain the regioselectivity, investigate the propagation cycle, determine the rate limiting step, utilize the reaction for the generation of pharmaceutically relevant compounds, and compute stabilities of nitrogen centered radical. In this thesis, *N*-chloro derivatives as radical precursors were synthesized using existing methods, and new method was developed for the synthesis of *N*-bromo derivatives. A methodology was developed for the *in-situ* generation and trapping of nitrogen centered radicals and its carbon counterparts using the phenylbutylnitron (PBN) spin trap and subsequent investigation of the resulting adducts *via* electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Laser flash photolysis (LFP) method was used to directly detect the transient species generated after laser excitation. Nuclear magnetic resonance (NMR) methods were employed in order to analyze complex product mixtures. Quantum-chemical methodology was developed and employed to obtain a quantitative description of the thermodynamic and kinetic properties of the HLF reaction. Additionally, kinetic modelling was done.

Using LFP, NMR, and EPR spectroscopy, in combination with density functional theory (DFT) calculations and kinetic modelling, the HLF reaction profile was monitored, and all significant intermediate radicals and products were identified in this light-induced radical generation and subsequent chain reaction. It is claimed that major regioselective product of the HLF reaction is kinetically controlled in the hydrogen atom transfer (HAT) step as the thermodynamic preference for the formation of one product over the other is lost due to the second step of the cycle being highly exothermic. When both radical intermediates have similar stability, the observed regioselectivity can be attributed to a rearrangement reaction exclusive to the C₆-radical where it rearranges to a more stable C₂-radical. When positions are non-equal, NMR analysis of the product mixture revealed the presence of four major products. These four products are amine, imine, C₆- and C₅-chlorinated products. Amine and imine are products of a “self-reaction” of nitrogen radicals (termination) and is the probable reason why many synthetic chemists block the C₂-position in their synthetic works and why the HLF reaction proceeds only in certain solvents in high yields. Kinetic modelling of the HLF reaction showed that its kinetics are pseudo first order with respect to the second step. Thus, it is proposed that the rate limiting step of the HLF reaction is the halogen atom transfer (XAT) step. Additionally, it was proposed that by adding halogen sources, typically used as chlorinating agents the propagation cycle can be interrupted and terminated. Finally, it was demonstrated that the HLF reaction is a viable method for late-stage functionalization (LSF) in the synthesis of pharmaceuticals. We used HLF reaction as a route for preparing bicyclic rings from *N*-chlorinated macrocyclic lactams. Interplay of different experimental and theoretical techniques have provided a deeper insight into the fundamental aspects of the HLF reaction, and results will be used for better utilization in future synthesis.

Keywords: Nitrogen centered radicals, chain reaction, Hofmann–Löffler–Freitag (HLF) reaction, regioselectivity, rate limiting step, self-reaction.

SAŽETAK

Uvod

Dušikovi radikali su izrazito reaktivne vrste i kao takvi u tragovima sudjeluju u lančanim reakcijama. Pokazuju visok stupanj kemoselektivnosti i sudjeluju u različitim vrstama reakcija kao što su intra/intermolekulska odcjepljenja vodikovog atoma, intra/intermolekulske supstitucijske reakcije i intra/intermolekulske adicije na dvostruke veze. Pored toga, poznato je da dušikovi radikali sudjeluju u samoreakcijama koje daju produkte dimerizacije i/ili disproporcioniranja. Stabilnost dušikovitih radikala može se opisati izodezmičkim reakcijama u kojima sudjeluju dušikovi radikali s amonijakom te mjerenjem reakcijske entalpije, tj. radikalske stabilizacijske energije (eng. *radical stabilisation energies*, RSE) takve reakcije. Korištenjem tih reakcija mogu se izraditi RSE ljestvice koje pružaju praktičan način dobivanja informacija o njihovoj stabilnosti i procjeni reaktivnosti u odnosu na druge radikale. Postoje mnoge metode za generiranje dušikovitih radikala, među kojima se njihovo fotokemijsko ili toplinsko generiranje iz *N*-haloamina koristi za sintezu pirolidina. Ova reakcija, poznata kao Hofmann–Löffler–Freitagova reakcija, prva je otkrivena sintetska metodologija koja uključuje dušikove radikale, a otkrio ju je Hofmann 1879 (1). Lančani radikalski mehanizam HLF reakcije sastoji se od intramolekulskog prijenosa atoma vodika (HAT) kao prvog koraka propagacijskog ciklusa i prijenosa atoma halogena (XAT) kao drugog koraka. Regioselektivnost i definiranje najsporijeg koraka HLF reakcije nedovoljno su istraženi. Nejasno je zašto HLF reakcija u pojedinim otapalima stvara produkte u visokim prinosima, dok je u drugim otapalima iskorištenje reakcije vrlo nisko te je potrebno blokirati C2-poziciju supstrata kako bi reakcija dala pirolidinske produkte. Konačno, ostaje neistraženo može li se HLF reakcija iskoristiti za sintezu bickličkih sustava iz makrocikličkih sustava.

Materijali i metode

Modelni sustavi su sintetizirani iz komercijalno dostupnih spojeva nakon čega je uslijedilo pročišćavanje produkata kromatografijom na stupcu. Tankoslojna kromatografija (TLC) u odgovarajućem sustavu otapala služila je za praćenje tijeka reakcije. TLC mrlje promatrane su osvijetljavanjem ultraljubičastim (UV) svjetlom na valnoj duljini od 254 nm. Ukoliko TLC mrlje nisu bile vidljive nakon osvijetljavanja UV svjetlom, detektirane su uporabom komore s jodom.

NMR spektri reakcijske smjese dobiveni su na NMR spektrometru Varian Inova 400 nakon čega su podaci uneseni i obrađeni u programu MestreNova 11.0.4.

Elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) je provedena korištenjem EPR spektrometra Bruker ELEXSYS E500 sa šupljim rezonatorom ER4122SHQE. Budući da ovaj rezonator sa šupljinom nema optički prozor za osvijetljenje, izvor svjetla je montiran ispod šupljine, a svjetlost je dolazila kroz dno EPR cjevčice. Dekonvolucija EPR spektara i simulacija pojedinačnih spektara radikalskih specija rađene su pomoću modula EasySpin u programskom paketu MATLAB. Vizualizacija EPR spektara napravljena je pomoću web stranice VisualEPR.

Mjerenja tranzijentne apsorpcijske spektroskopije (TAS) provedena su laserskom pulsnom fotolizom (LPF). Apsorpcijski spektri otopina mjereni su UV-Vis spektrofotometrom (Varian UV/VIS spektrofotometar Cary 4000) u području valnih duljina od 200 do 500 nm. Apsorpcijski spektri otopina uzoraka su snimani prije i nakon propuhivanja dušikom te tijekom i nakon mjerenja laserskom pulsnom fotolizom kako bi se pratila fotostabilnost spojeva te izbjeglo pobuđivanje laserom nastalih fotoprodukata.

Instrumentacija za LFP uključivala je niz vremenski usklađenih uređaja, a mjerenje se odvijalo pomoću računala. Kao izvor pobude uzorka koristio se nanosekundni pulsni Nd:YAG laser (Quantel, Q-smart 450, trajanje pulsa 6 ns, pulsiranje 10 Hz, maksimalne energije do 450 mJ na 1064 nm) uz ostale valne duljine pobude od 532 nm, 355 nm i 266 nm. Detekcija se odvijala pomoću spektrometra (LP980, Edinburgh Instruments) koji kao izvore zračenja koristi ksenonsku lampu (mogućnost pulsnog rada) i halogenu lampu (pogodniju za veće vremenske skale od ms do s u spektralnom području > 300 nm), monokromator i detektor fotomultiplikator.

Konformacijski prostor za sve lokalne minimume i sedlaste točke prvog reda na plohi potencijalne energije istražen je korištenjem Conformer–Rotamer Ensemble Sampling Tool—CREST, uz optimizaciju na semiempirijskoj XTB-gfn2 razini. Dobivene strukture ponovno su optimizirane metodom teorije funkcionala gustoće (DFT) korištenjem B3LYP/6-31G(d) metode. Za svaku strukturu sa stabilnom valnom funkcijom izvršen je izračun frekvencije kako bi se identificirali strukturni minimumi i sedlaste točke prvog reda na plohi potencijalne energije. Sedlaste točke prvog reda imaju jednu imaginarnu frekvenciju. Iz svih struktura konformera koje su sedlaste točke prvog reda provedeno je pretraživanje intrinzične reakcijske koordinate (IRC) te su posljednje točke optimizirane dajući tako predreakcijski intermedijarni kompleks i postreakcijski intermedijarni kompleks. Time se definira struktura sedlaste točke prvog reda kao struktura prijelaznog stanja koja povezuje minimume na strani reaktanata i produkata. „*Single point*“ energije dobivene su korištenjem dvostruko hibridne metode RO-B2PLYP na G3MP2 baznom skupu uz D3 disperzijsku korekciju i univerzalnim kontinuiranim modelom solvatacije (SMD) s acetonitrilom kao otapalom. Toplinske korekcije slobodne energije izvedene su iz izračuna frekvencije pod uvjetima od 298,15 K i 1 atm.

Izračuni EPR parametara napravljeni su korištenjem B3LYP funkcionala i mješovitog baznog skupa: EPR-III za atome ugljika, vodika i kisika, def2-QZVP za atom sumpora i 6-31G(d) za atom dušika. Za točne izračune g -faktora i hiperfinih konstanti (hfc) potreban je mali bazni set na N -atomu. Kada se koristi veći bazni set za atom dušika, npr. EPR-III ili def2-QZVP, dobiveni rezultati sustavno podcjenjuju hfc . Svi proračuni su obavljani na Gaussian verziji 16.C01 korištenjem servisa naprednog računanja (klasteri Isabella i Supek). Spektri elektronskih prijelaza izračunati su u plinovitoj fazi i u otapalu s vremenski ovisnom CAM-B3LYP/TZVP/PCM metodom na molekularnoj geometriji optimiziranoj na B3LYP/TZVP razini teorije. Kako bi se objasnio entropijski učinak prisutnosti molekula otapala oko otopljene tvari, korišten je "stanični model" (2). Ovaj model je predložen kako bi se eksplicitno procijenio učinak gubitka translacijskih stupnjeva slobode u otopini na Gibbsovu aktivacijsku energiju u bimolekulskoj reakciji (ili reakciji višeg reda molekularnosti).

Provedeno je kinetičko modeliranje reakcijskih puteva. Kompletan matematički model, koji je uključivao sve moguće korake reakcije, rezultirao je sustavom nelinearnih diferencijalnih jednačini koji je bio izuzetno složen, te su uvedene aproksimacije za analitičko rješavanje.

Rezultati

Uspješno su primijenjene postojeće sintetske procedure te su razvijene nove za sintezu odabranih sustava. To je dokazano iskorištenjima i NMR analizom. Metoda otplinjavanja ciklusima zamrzavanje-otplinjavanje-odmrzavanje na vakuum liniji je uspješno uspostavljena. Učinkovitost uklanjanja kisika korištenjem ciklusa zamrzavanje-otplinjavanje-odmrzavanje dokazana je širinama linija izmjerenih EPR-om. Eksperimentalne širine linija manje od 0,4 Gaussa dokazale su da je u otopinama bilo prisutno vrlo malo kisika, što je važno za sprječavanje reakcija oksidacija

u radikalskom ciklusu. Za detekciju radikalskih specija koristi se EPR spektroskopija uz metodu *in situ* generiranja tih specija i stvaranje stabilnih adukata uz pomoć *N-tert*-butil- α -fenilnitronske spinske stupice. Dobiveni spektri su dekonvoluirani na spektre individualnih specija, te je postignuta reproducibilnost mjerenja u smislu podudaranja *g*-faktora i *hfc* vrijednosti sličnih radikalskih adukata detektiranih u različitim mjerenjima na različitim sustavima (*N*-kloro i *N*-bromo derivati) i u različitim otapalima. Rezultati su potvrdili radikalski put, detektiran je novi radikalski adukt (C_2 -radikal) čime je prošireno razumijevanje postojećih EPR istraživanja HLF reakcije. NMR mjerenja su provedena uspješno budući da se analiza pokazala u skladu s literaturno dostupnim podacima. LFP metoda se pokazala prikladnom za direktnu detekciju radikalskih intermedijera nakon ekscitacije laserom. Naime, vremena poluživota detektiranih dušikovih i ugljikovih radikala odgovaraju literaturnim podacima. Kvantno-kemijskom računima objašnjeni su svi eksperimentalni rezultati.

Zaključci

Korištenjem NMR, LFP i EPR spektroskopije u kombinaciji s DFT izračunima, proučavan je profil HLF reakcije i identificirani su radikalski intermedijeri i produkti. Primarna hipoteza je da je uočena regioselektivnost pod kinetičkom kontrolom budući da ne postoji termodinamička pokretačka sila za stvaranje C_6 -funkcionaliziranog produkta u odnosu na C_5 -funkcionalizirani produkt. Alternativna hipoteza tvrdi da se uočena regioselektivnost može pripisati dodatnoj reakciji pregradnje koja je vezana isključivo uz C_6 radikal. Kroz dodatni 1,5-HAT korak, C_6 radikal se transformira u stabilniji C_2 -radikal. Postojanje C_2 -radikala eksperimentalno je dokazano ne samo pomoću EPR spektroskopije, već analizom nusprodukata u sintetskim reakcijama, gdje su pronađeni imini i aldehidi kao razgradni produkti reakcija kojima podliježe C_2 -radikal. NMR analiza smjese produkata ukazuje na prisutnost četiri glavna produkta. Utvrđeno je da su ova četiri produkta amin, imin, C_6 - i C_5 -klorirani produkti. Amin je produkt samoreakcije dušikovih radikala, dok imin može nastati i samoreakcijom i daljnjim pregrađivanjima C_2 -radikala. Reaktivnost C_2 -pozicije je razlog zašto neke istraživačke skupine u svojim sintetskim postupcima blokiraju C_2 -poziciju sterički ili funkcionalizacijom.

Kinetičko modeliranje HLF reakcije daje snažne dokaze u prilog tome da postoje dvije različite i dobro definirane radikalsko-lančane reakcije na koje se primjenjuje Bodensteinova aproksimacija zajedno s aproksimacijom dugog lanca i aproksimacijom koja se odnosi na koncentracije nositelja lanca. Ove dvije radikalsko-lančane reakcije vode do dva različita produkta te imaju zajedničku ravnotežnu koncentraciju dušikovih radikala. Nadalje, dobiven je matematički izraz na temelju kojeg se tvrdi da HLF reakcija slijedi kinetiku pseudo prvog reda s obzirom na drugi korak te da je brzina propagacijskog ciklusa određena drugim korakom. Na temelju ovog se tvrdi da je drugi korak najsporiji korak u reakciji. Dodatno, predloženo je da dodavanje izvora halogena, koji se obično koriste kao sredstva za kloriranje može interferirati s XAT korakom propagacijskog ciklusa, terminirajući sam ciklus.

Konačno, pokazalo se da je HLF reakcija dobra metoda za kasnu funkcionalizaciju lauro-laktama. U ovakvim konformacijski ograničenim makrocikličkim sustavima dušikovi radikali su pokazali smanjenu stabilnost. S druge strane, ugljikovi radikali, posebno oni koji su susjedni karbonilnim ili aminskim skupinama, pokazali su povećanu radikalsku stabilnost, uz značajne iznimke u visoko konformacijski ograničenim strukturama poput 2-azetidinona. Računalno modeliranje pokazuje da su barijere za 1,5- i 1,6-HAT *egzo* procese s karbonilnom skupinom izvan manjeg prstena

najpovoljnije. Izračunato je da se reakcije 1,4-HAT *endo*-tipa odvijaju uz nižu barijeru u usporedbi s egzo-tipom.

Ključne riječi: Dušikovi radikali, lančana reakcija, Hofmann–Löffler–Freitag (HLF) reakcija, regioselektivnost, korak koji određuje brzinu reakcije, samoreakcija