ANALIZZATORI DI CHIRALITÀ (S) E DI AMMINA (S): CHEMOSENSORI E SPETTROSCOPIA NMR ^{19}F DA BANCO

Yanchuan Zhao, Lily Chen, Timothy M. Swagera

Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Tecnologiy, Cambridge, Massachusetts 02139, USA

Introduzione

Sia molecole naturali che sintetiche spesso esibiscono naturalmente la chiralità. È stato riscontrato che ciò ha importanti implicazioni nell'attività biologica e nel metabolismo di queste molecole. Ad esempio, nella struttura di una molecola di un farmaco chirale ci sono due forme enantiomeriche (figura 1), mentre da una parte può rivelarsi molto vantaggioso, dall'altra può avere un effetto minore o assente o in alcuni casi persino un effetto dannoso. [1] Ciò è stato esemplificato dall'avvertimento del caso di studio degli anni '50 sulla talidomide. Questo farmaco è stato introdotto per la sua forte efficacia nell'alleviare la nausea mattutina per le donne incinte, tuttavia, in seguito si è scoperto che poteva dare tragici effetti collaterali teratogeni, con conseguenti bambini nati con arti mancanti o deformati, problemi respiratori e diminuzione dell'aspettativa di vita. [2]

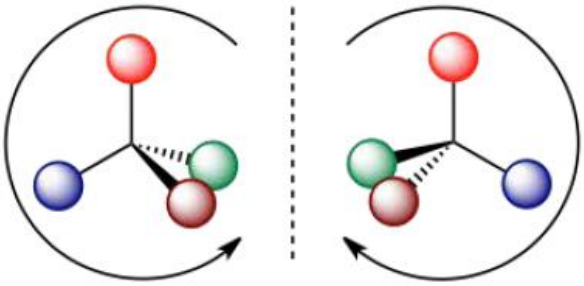


Figura 1: rappresentazione degli enantiomeri

La talidomide è stata venduta come racemo, conteneva entrambi gli enantiomeri in un rapporto 50:50. Successive indagini hanno rivelato che solo l'enantiomero (R)-(+) della talidomide era sicuro, mentre l'enantiomero (S)-(-) aveva gravi effetti tossici e teratogeni. Oggigiorno, quasi il 75% dei nuovi farmaci che entrano nel mercato sono composti da un unico enantiomero piuttosto che una miscela racemica, e la proporzione di farmaci a singolo enantiomero è in rapida crescita. [3] Pertanto, la rapida identificazione e differenziazione dei composti chirali è sempre più importante per la chimica sintetica, medica e biologica.

Sebbene non sia risolvibile senza derivativizzazione chimica, la spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR) è stata utilizzata per discriminare gli enantiomeri. Anche con la preparazione aggiuntiva del campione, l'NMR ha dimostrato di offrire un'alternativa a basso costo, semplice e rapida alla cristallografia a raggi X o alla cromatografia chirale. Tuttavia, dato il costo iniziale, le spese operative significative, lo spazio e l'energia

consumati per mantenere una tecnologia NMR ad alto campo e superconduttiva tradizionale, questa potente tecnica è significativamente sottoutilizzata a questo proposito.

Un approccio pubblicato di recente, [4] utilizza complessi fluorinati metallo-ligando per determinare la chiralità di varie ammine mediante ^{19}F NMR.

Il ligando crea un ambiente chirale, in cui il legame di ammine enantiomeriche crea complessi diastereomerici "statici" sulla scala temporale NMR con spostamenti NMR ^{19}F distinti e caratteristici.

Il progetto molecolare di un chemosensore (vedi figura 2) in grado di produrre un segnale rilevabile nella scala temporale NMR non è semplice. Il sistema deve essere progettato strategicamente per includere: (a) un ambiente stericamente ristretto per consentire la discriminazione delle dimensioni; mentre (b) il legame deve essere abbastanza forte da generare un complesso statico sulla scala temporale NMR; e (c) il segnale risultante deve essere sufficientemente risolto per consentire una facile quantificazione.

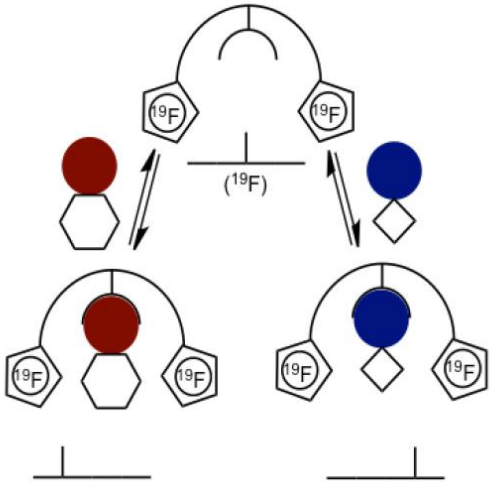
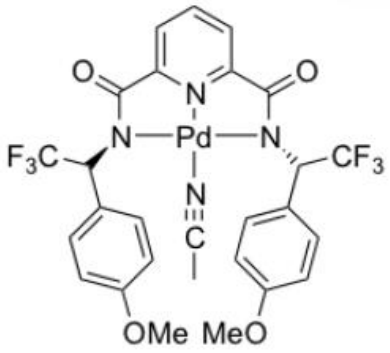


Figura 2: rappresentazione schematica di un chemosensore che monitora il cambio nello shift chimico del 19F.

Il fluoro-19 è un nuclide eccellente per produrre segnali rilevabili nella spettroscopia NMR perché: (a) i nuclei sono molto ricettivi e hanno un'elevata sensibilità per la spettroscopia NMR, (b) l'abbondanza del fluoro-19 naturalmente 100%, (c) le risonanze sono tipicamente ben risolte grazie a un intervallo di shift chimici estremamente ampio (cioè, +250 e -300 ppm) e risonanze naturalmente acute. [5]

Qui descriviamo il design molecolare di tali complessi di palladio a tenaglia (schema 1) e l'estensione di questo metodo di risparmio sui costi al rilevamento NMR da banco, per offrire uno strumento di quantificazione della chiralità delle ammine accessibile e conveniente. L'NMR da banco mostra efficacia nella differenziazione degli enantiomeri delle ammine chirali, nel rilevamento simultaneo di più ammine chirali e nella stimolazione del rapporto enantiomerico (er) e dell'eccesso enantiomerico (ee).



Schema 1: complessi di palladio a tenaglia con sonde al fluoro

Identificazione e differenziazione delle ammine chirali

La Figura 3 mostra l'identificazione di diverse ammine chirali utilizzando il complesso di palladio a tenaglia (figura 1) e la spettroscopia NMR ^{19}F. Dopo la complessazione con ciascuna delle ammine chirali, viene prodotta una risonanza NMR ^{19}F caratteristica diversa (i picchi sono doppietti dovuti all'accoppiamento con l'H adiacente sul braccio pendente del ligando). Gli enantiomeri di α-metilbenzilammina (figura 3a-c) e α-tilbenzilammina (figura 3d-f) possono essere chiaramente differenziati in miscele racemiche.

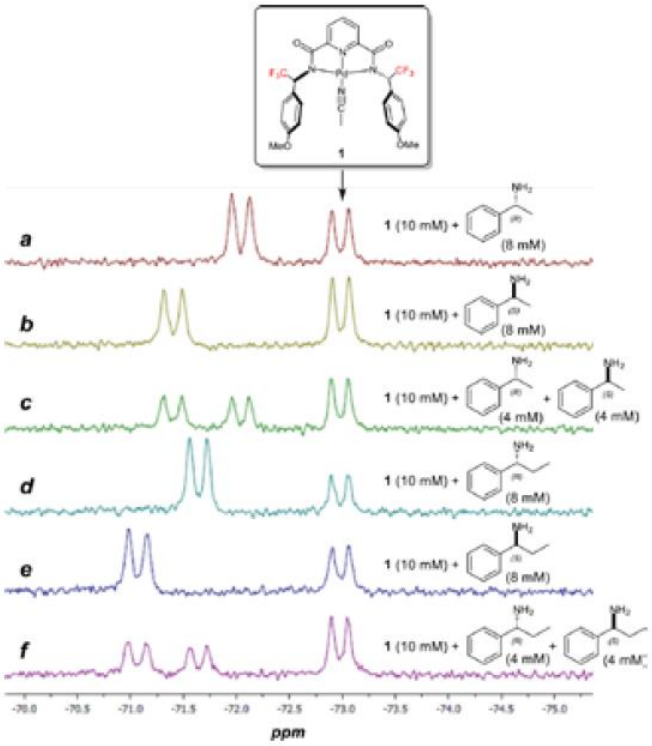


Figura 3: complessi a tenaglia di palladio con sonde al fluoro

Rilevamento simultaneo di più ammine chirali

Come mostrato nella Figura 4a e 4b, oltre alle semplici coppie enantiomeriche, è anche possibile rilevare simultaneamente più enantiomeri utilizzando il complesso nello schema 1. Ogni enantiomero dà origine a una risonanza allo stesso valore di ppm del singolo spettro degli enantiomeri, consentendo una semplice identificazione di ciascun picco. Combinando i quattro analiti (entrambi gli enantiomeri di ciascuna delle due

ammine chirali) si ottengono picchi sovrapposti, come mostrato nella Figura 4c. Anche se i singoli picchi non sono facilmente identificabili, lo spettro indica chiaramente la presenza di più specie. Utilizzando uno strumento di adattamento dei picchi (disponibile nella maggior parte dei software di elaborazione NMR [6]) i picchi sovrapposti possono essere deconvoluti, consentendo l'identificazione di ogni singolo picco come mostrato nella Figura 4d.

Per confronto, la figura 4e mostra uno spettro NMR ad alto campo dello stesso campione della figura 4c. Com'era prevedibile, mentre entrambi gli spettri contengono le stesse informazioni quantitative, lo spettro NMR a 400 MHz mostra una migliore dispersione dei picchi rispetto allo spettro a 60 MHz.

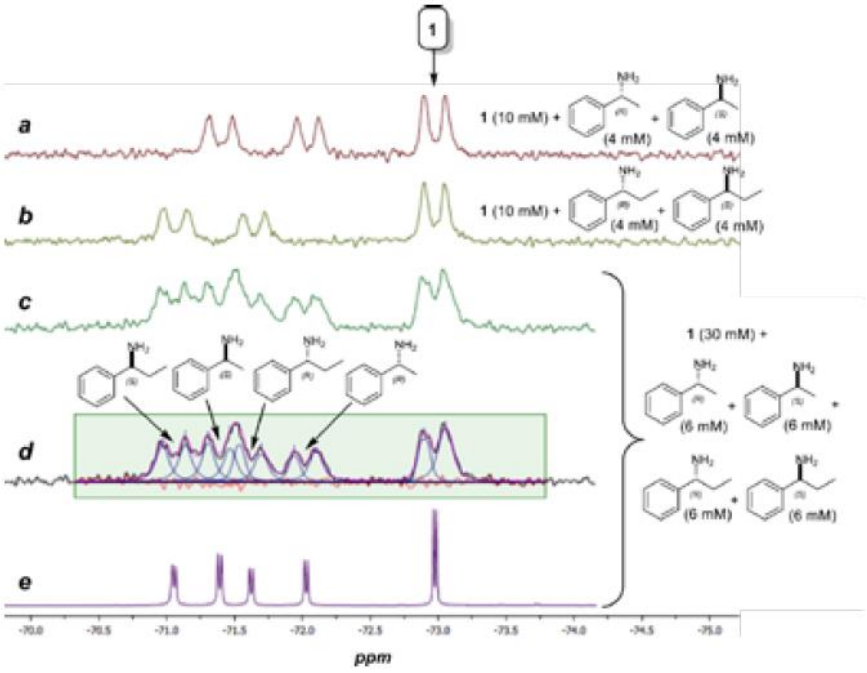
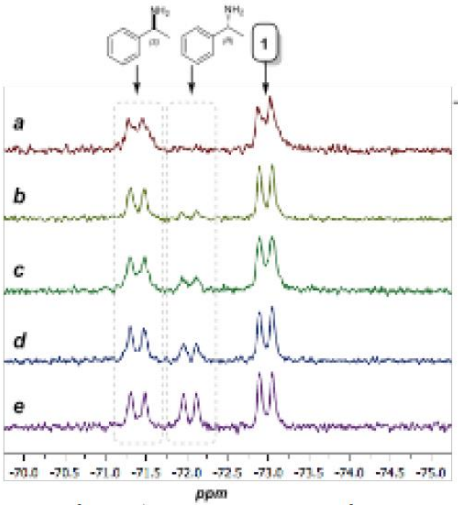


Figura 4. a-c) Spettri NMR ^{19}F a 60 MHz (64 scansioni) del complesso nello schema 1 con miscele di ammine chirali. d) Risultati di adattamento del picco dello spettro 4c (nero = spettro effettivo; blu = picchi simulati; magenta = somma dei picchi simulati; rosso = errore residuo). e) Spettro NMR ^{19}F a 400 MHz (64 scansioni) dello stesso campione dello spettro 4c.

Stima del rapporto enantiomerico (er) e dell'eccesso enantiomerico (ee)

A causa della natura intrinsecamente quantitativa della spettroscopia NMR, la concentrazione di ciascuna specie presente nel campione può essere stimata integrando direttamente i picchi NMR. [7] La Figura 5 mostra gli spettri del complesso nello schema 1 con una serie di miscele di (R)-α -metilbenzilammina e (S)-α-metilbenzilammina con differenti rapporti enantiomerici. Integrando i due picchi di ammine enantiomeriche e confrontando le loro aree si ottiene una stima del rapporto enantiomerico (er) e dell'eccesso enantiomerico (ee), come mostrato nella figura 5.



Entry	Actual er (S:R)	Est'd er (S:R)	Actual ee (%)	Est'd ee (%)
a	90:10	93:7	80%	86%
b	80:20	84:16	60%	68%
c	70:30	75:25	40%	50%
d	60:40	69:31	20%	38%
e	50:50	53:47	0%	6%

Figura 5: Stima di er ed ee utilizzando ^{19}F NMR. A sinistra: pectra NMR ^{19}F a 60 MHz (64 scansioni) del complesso nello schema 1 (circa 10 mM in CDCl3) con (R)-α-metilbenzilammina e (S)-α-metilbenzilammina (circa 8 mM totali). A destra: valori er e ee effettivi e stimati.

Usando i valori integrali relativi come stima approssimativa, i valori er ottenuti con questo metodo sono corretti entro il 10% (S) e i valori ee ottenuti con questo metodo sono corretti entro il 20%. Questo metodo richiede l'acquisizione di un solo spettro NMR e può fornire molto rapidamente una buona stima dell'er ed ee di un campione in un paio di minuti. Se si desidera una maggiore precisione, è possibile costruire una curva di calibrazione come mostrato nella figura 6. Questo metodo può tenere conto in modo più accurato di qualsiasi errore nella misurazione. I valori er ed ee stimati ottenuti con il metodo sopra riportato mostrano una relazione lineare con i valori er ed ee effettivi. Ciò consente di regolare ulteriormente la stima iniziale verso un valore più accurato.

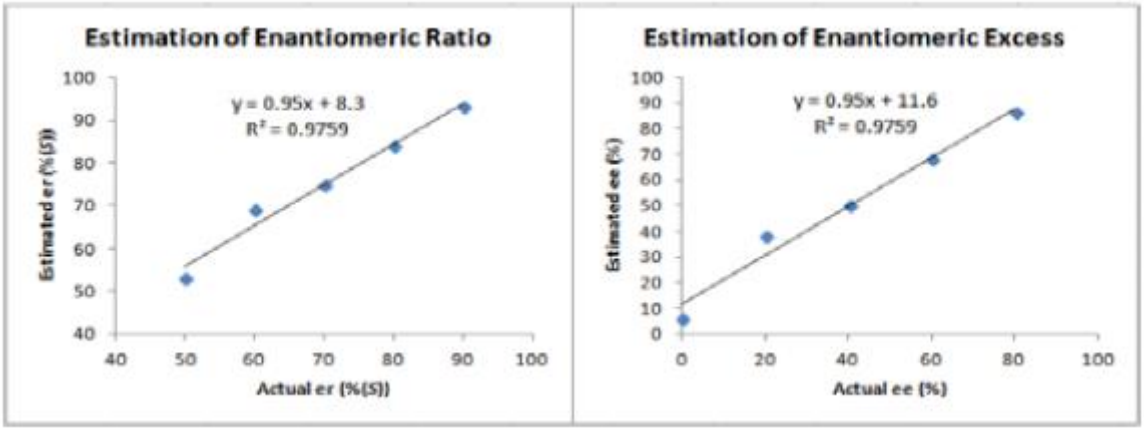


Figura 6: Curve di calibrazione ottenute dai dati visualizzati in figura 5, che mostrano la relazione lineare tra i valori er e ee effettivi e stimati.

Conclusioni

L'ingombro compatto, il basso costo e la facilità d'uso dello spettrometro da banco NMReady lo rendono adatto come analizzatore per il rilevamento della chiralità NMR ^{19}F delle ammine se abbinato a questi chemosensori in palladio dal design intelligente. Il metodo di rilevamento NMR ^{19}F mostrato in questa nota

applicativa consente l'identificazione, la differenziazione e la quantificazione di più ammine chirali senza derivativizzazione elaborata. In combinazione con la spettroscopia NMR da banco, questo metodo chemosensoriale ha il potenziale per accelerare i progressi nella chimica sintetica e medicinale facilitando la rapida determinazione della purezza enantiomerica.

Dettagli sperimentali

Per la Figura 3, il complesso dello schema 1 (circa 10 mM) e diverse ammine chirali (circa 8 mM) sono state sciolte in CDCl3, per un volume totale del campione di ca. 0,5 mL. Gli spettri NMR ^{19}F (64 scansioni) sono stati acquisiti su uno spettrometro 60 MHz NMReady.

Per la Figura 4c-e, il complesso nello schema 1 (circa 30 mM) e quattro ammine (circa 6 mM) sono stati sciolti in CDCl3, per un volume totale del campione di ca. 0,5 mL. Gli spettri NMR ^{19}F (64 scansioni) sono stati acquisiti su uno spettrometro NMReady e uno spettrometro Bruker a 400 MHz. L'adattamento del picco è stato eseguito in MestReNova utilizzando parametri standard.

Per la Figura 5, il complesso nello schema 1 (circa 10 mM), (R)-α-metilbenzilammina e (S)-α-metilbenzilammina (circa 8 mM totali) sono stati sciolti in CDCl3, per un volume totale del campione di ca. 0,5 mL. Gli spettri NMR ^{19}F (64 scansioni) sono stati acquisiti su uno spettrometro NMReady. I picchi sono stati integrati in MestReNova. Il rapporto enantiomerico (er) è stato calcolato normalizzando l'area totale dei due picchi di α-metilbenzilammina a 100. L'eccesso enantiomerico (ee) è stato calcolato dall'er.

Ringraziamenti

Yanchuan Zhao, Lily Chen e Timothy M. Swager del Massachusetts Institute of Technology hanno eseguito la procedura sperimentale e hanno redatto questa nota applicativa. La tecnica chemosensing ^{19}F NMR descritta è stata supportata da una sovvenzione GM095843 del National Institutes of Health (NIGMS).

Bibliografia

[1]Solomons, T.W.G.; Fryhle, C. B.; Organic Chemistry, 7th Ed., Wiley: New York, 1998.

[2] 'What's happened to Thalidomide babies?' http://www.bbc.com/news/magazine-15536544 (accessed Aug 2017)

[3]Agranat, I; Caner, H.; Caldwell, J. Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1, 753.

[4]Zhao, Y; Swager, T. M. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 3221.

[5]Yu, J.-X.; Hallac, R. R.; Chiguru, S.; Mason, R. P. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 2013, 70, 25–49.

[6]Mestrelab MNova software, www.mestrelab.com

[7]Giraudeau, P. Magn. Reson. Chem. 2017, 55, 61.