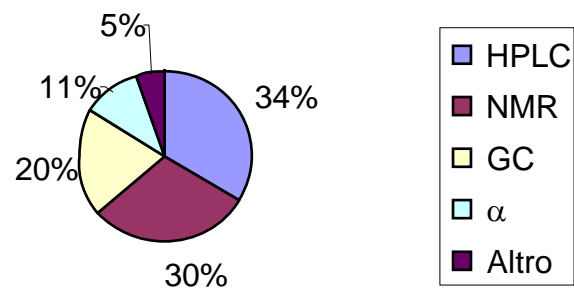
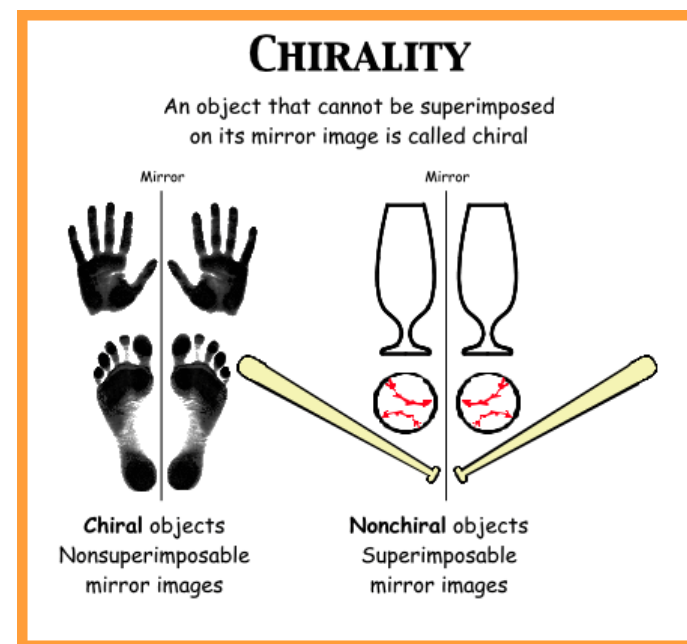


ANALISI STEREOCHIMICA DI UNA REAZIONE



Derivatizzazione Chimica
HPLC
GC
Spettroscopia NMR



ELEMENTI DI SIMMETRIA E CHIRALITA' DELLE MOLECOLE

Elementi di simmetria	Operazioni
Asse di Rotazione C_n ($n = 1, 2, 3, \dots, \infty$)	Rotazione attorno all'asse di $360/n$ gradi
Piano di simmetria s	Riflessione attraverso il piano
Centro di inversione i	Inversione delle coordinate (x,y,z a $-x, -y, -z$)
Asse di roto-riflessione S_n ($n = 4, 6, \dots$)	Rotazione attorno all'asse di $360/n$ gradi combinata con una riflessione attraverso il piano perpendicolare all'asse (se $n = 1$, $S_1 = s$; se $n = 2$, $S_2 = i$)

ELEMENTI DI SIMMETRIA E CHIRALITA' DELLE MOLECOLE

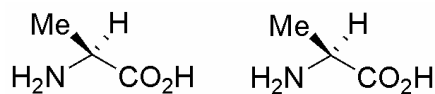
Una molecola che possiede **solo** assi di rotazione (C_n) è **chirale**.

Una molecola che possieda **almeno** un asse di roto-riflessione (S_n) è **achirale**.

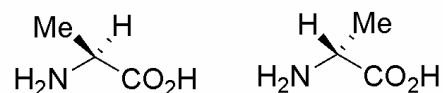
Una netta distinzione si ha fra **diastereoisomeri** ed **enantiomeri**. Diastereoisomeri: no immagini speculari e proprietà chimico-fisiche diverse.

Enantiomeri: si immagini speculari e medesime proprietà salvo non ci si trovi in un ambiente chirale.

Due **enantiomeri** (isomeri opposti) sono **eterochirali** avendo proprietà diverse come geometria e simmetria. Due molecole sovrapponibili invece, (due enantiomeri identici) si dicono **omomeri** (stesso isomero).



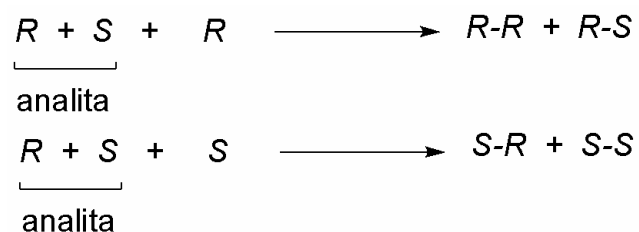
Omomeri e omochirali



Enantiomeri e eterochirali

DERIVATIZZAZIONE CHIMICA

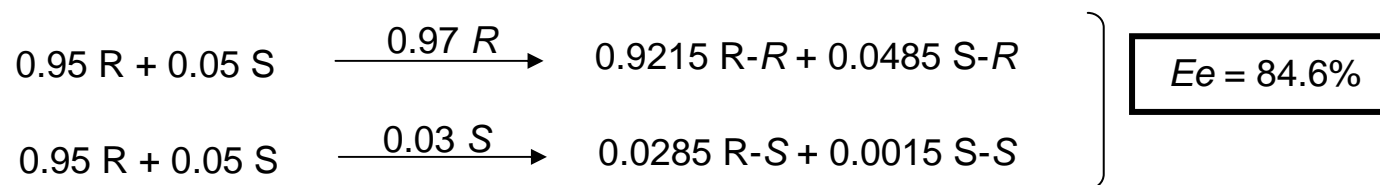
Per determinare eccessi enantiomerici, una possibilità è quella di sintetizzare dei derivati diastereoisomerici impiegando reagenti chirali in forma enantiomericamente pura.



Se il reattivo non è enantiomericamente puro ottengo tutti 4 gli stereoisomeri, falsando il rapporto iniziale.

E_e analita = **90%**

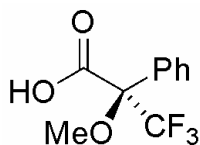
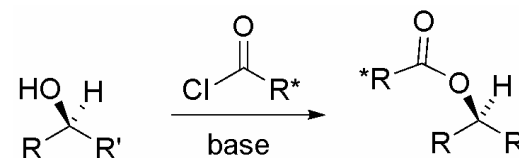
E_e reattivo = **94%**



DERIVATIZZAZIONE CHIMICA

Alcoli ed Ammine

Generalmente si derivatizzano in esteri, ammidi, carbammati, uree, carbonati chirali. Un agente derivatizzante molto utilizzato è l'acido di **Mosher**, oppure il suo cloruro:



Acido di **Mosher**: acido α -metossi, α -fenil, α -trifluorometil acetico (**MTPA**). Non avendo protoni in α al carbonile non è soggetto a racemizzazione. E' commercializzato in entrambi gli enantiomeri. La miscela diastereoisomerica derivante può essere facilmente analizzata via GC, HPLC ed ^1H , ^{19}F , ^{13}C -NMR.

Il riconoscimento diventa sempre più complesso man mano che lo stereocentro si allontana dal carbonio in α al derivato del Mosher. Sono molto costosi ma si utilizzano in piccole quantità.

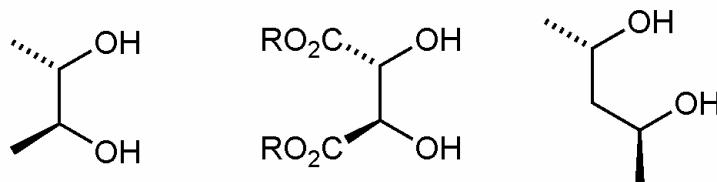
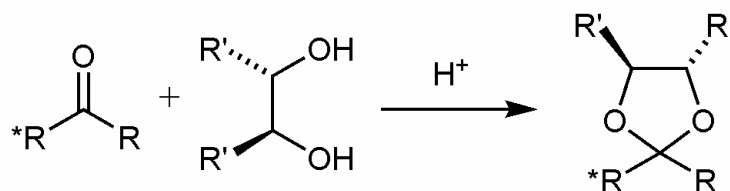
J.A. Dale, D.L. Dull, H.S. Mosher, *J.Org.Chem.* **1969**, 34, 2543.

J.A. Dale, H.S. Mosher, *J.Am.Chem.Soc.* **1973**, 95, 512.

DERIVATIZZAZIONE CHIMICA

Carbonili

Generalmente i carbonili vengono trasformati in acetali ciclici (5 e 6 termini) impiegando dei dioli enantiomericamente puri.



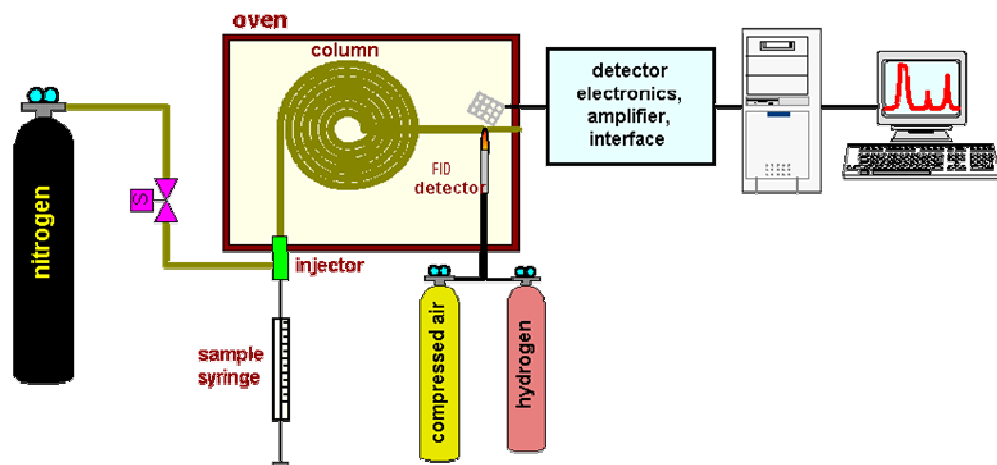
Molto utilizzati sono il 2,3-butandiolo, i derivati dell'acido tartarico ed il 2,4 pentadiolo.

Diossolano: acetale ciclico a 5 termini;

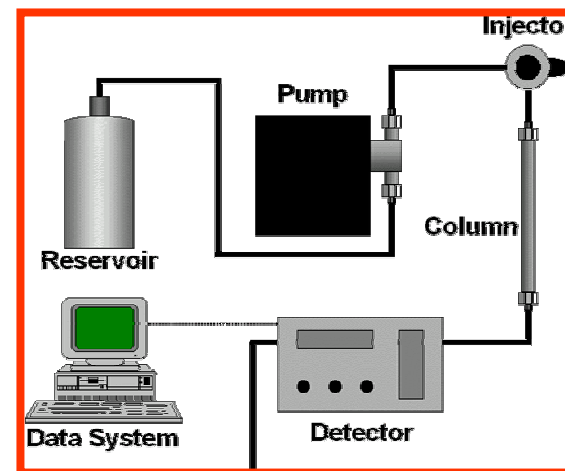
Diossano: acetale ciclico a 6 termini.

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

GC-Cromatografia



Cromatografia liquida HPLC

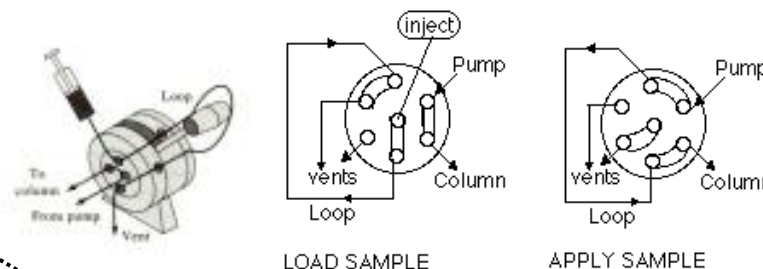


Per i diastereoisomeri si esegue una cromatografia classica, per gli enantiomeri occorre utilizzare tecniche in cui o la fase mobile o quella **stazionaria** è chirale.

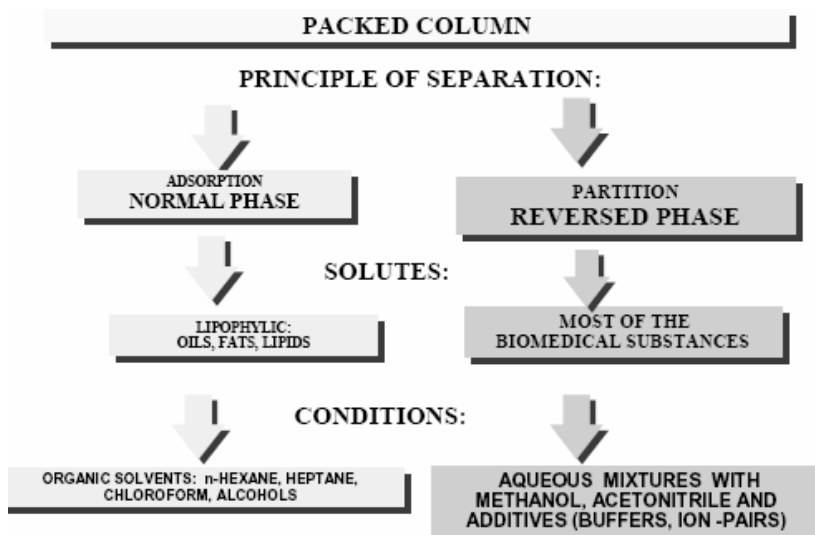
TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Fase diretta o inversa??

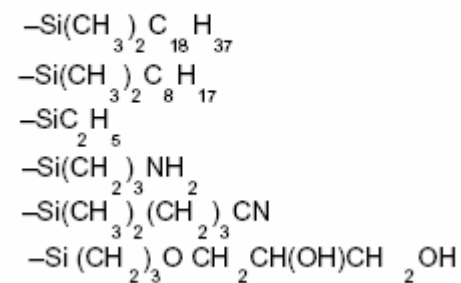
Il Loop



Colonne a Fase Diretta e Fase Inversa

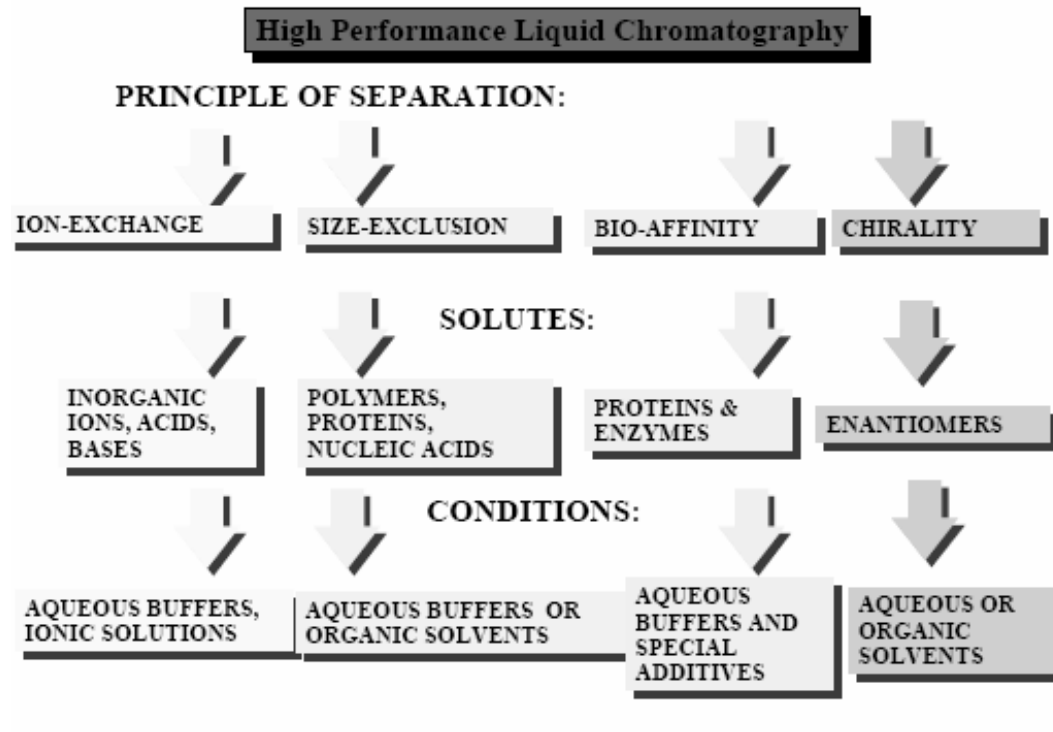


Functionality



TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Tipi fasi stazionarie



- * Ligand exchange
- * π -Donor π -acceptor (Pirkle)
- * Chiral Host-guest (cyclodextrin)
- * Immobilized proteins
- * Immobilized polysaccharides

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Interazioni fase stazionaria-analita

Due molecole stanno interagendo fra loro quando si perturbano vicendevolmente.

Interazioni attrattive: si creano degli aggregati transienti distereoisomerici stabilizzati da interazioni deboli legate ad effetti sterici, elettronici, di coordinazione con metalli di transizione, trasferimenti da carica e fenomeni di inclusione. Riconoscimenti molecolari possono essere legati anche alla presenza di interazioni **non-leganti: repulsive**.

Le interazioni fra CSP (*chiral stationary phase*) ed analita si distinguono in ***single-point interactions e multipoint interactions***.

Single-point Interactions: legami a ponte idrogeno, dipolo-dipolo;

Multipoint interactions: interazioni tipo p-stacking.

Importanti sono anche effetti di **diffusione/inclusione** dell'enantiomero dell'analita in una certa matrice chirale della CSP.

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

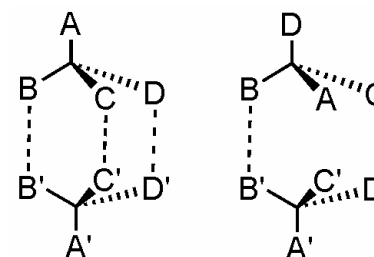
Interazioni fasi stazionaria-analita

La regola dei tre punti: una situazione di “**riconoscimento di chiralità**” richiede un minimo di tre interazioni simultanee fra fase stazionaria chirale ed analita. Ed almeno una delle tre interazioni deve essere strettamente influenzata dalla stereochimica dell’analita stesso.

Interazioni steriche:

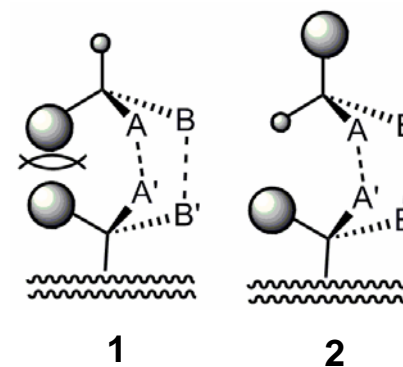
Le interazioni **steriche** sono dovute a gruppi voluminosi che diminuiscono le interazioni attrattive. Il primo enantiomero **(1)** è meno affine alla fase stazionaria del secondo **(2)** in seguito all’interazione sterica mostrata nello schema.

soluto



fase staz.

soluto



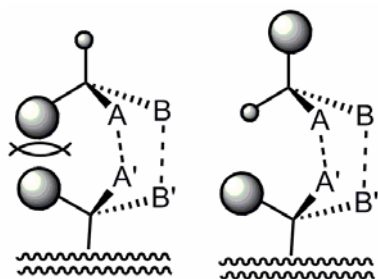
fase staz.

W.H. Pirkle, T.C. Pochapski, *Chem.Rev.* **1989**, *89*, 347.

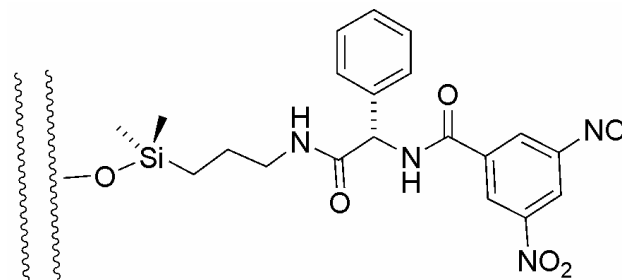
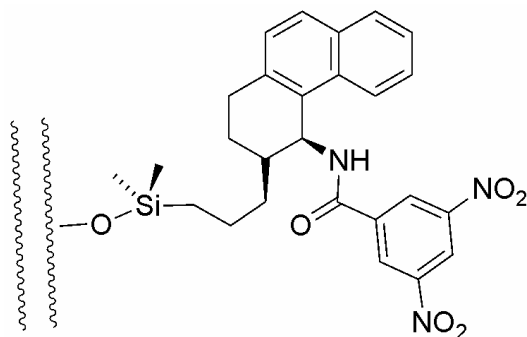
TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne Pirkle: Interazione fasi stazionaria - analita

Interazioni dipolo-dipolo



In seguito alle interazioni stabilizzanti fra i dipoli delle molecole, l'analita **2** perde l'interazione fra A ed A' che poteva essere stabilizzante o meno. Nasce così una diversa energia di interazione fra le due possibili disposizioni. Quindi non si deve considerare necessariamente l'interazione fra due tetraedrici diversamente sostituiti.



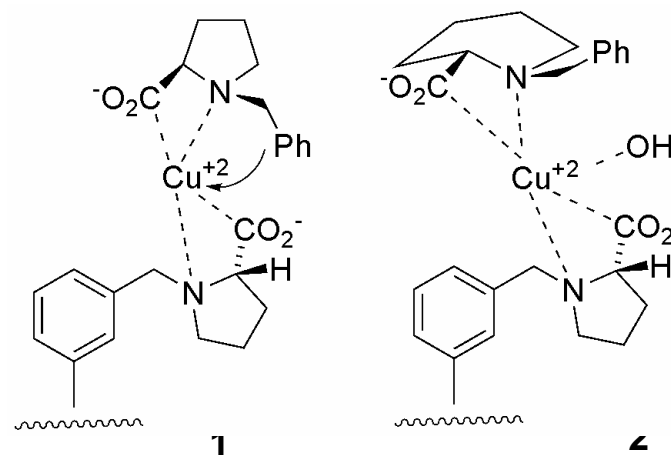
TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne LEC: Interazione fasi stazionaria - analita

Cromatografie a scambio di legante (LEC): queste fasi stazionarie hanno alla base la formazione di equilibri di scambio fra complessi metallici di agenti complessanti chirali: generalmente aminoacidi. La selettività è legata alle energie relative di formazioni dei vari complessi.

Cu^{2+} e Ni^{2+} sono i metalli più utilizzati, in presenza di molecole bifunzionali chelanti e chirali.

Fra gli aminoacidi chelanti più efficaci c'è la prolina. Le interazioni steriche del complesso **1** impediscono la complessazione di una molecola di H_2O (fase mobile).



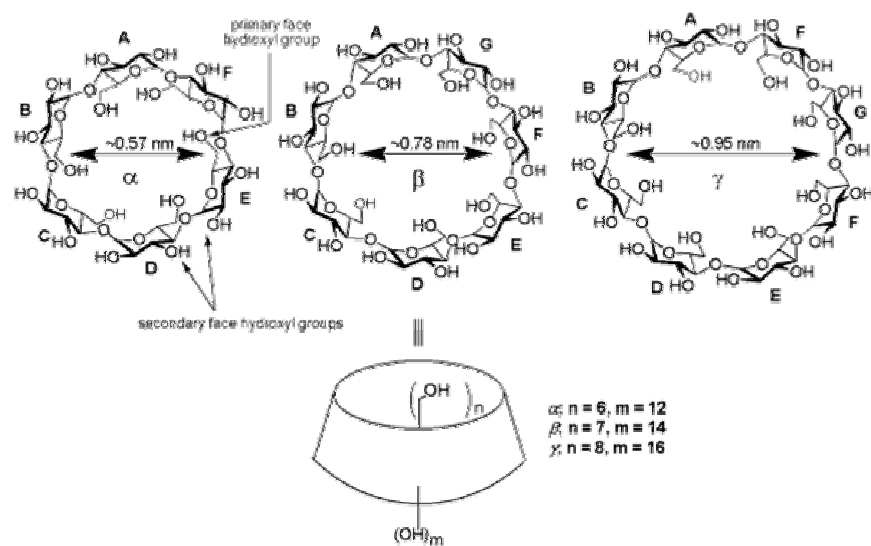
E quindi tale addotto sarà quello più trattenuto dalla colonna. Sono colonne molto utilizzate per la separazione di α -aminoacidi. Sono efficaci per il riconoscimento di analiti chelanti e non richiedono derivatizzazioni particolari degli stereoisomeri.

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne Chiral cavity phase

Sono degli oligomeri ciclici del **glucosio** con giunzioni a, 1-4 e numero variabile di monomeri. Assumono una forma di tino (toroide) con una cavità centrale che presenta un ambiente idrofobico chirale. **Ciclo a = 6 glu, ciclo b = 7 glu, ciclo g = 8 glucosi**. Questi sono legati alla superficie della silice grazie a degli spaziatori.

Per aumentare la loro stabilità termica, generalmente sono derivatizzate: $-OH \Rightarrow -OR$.



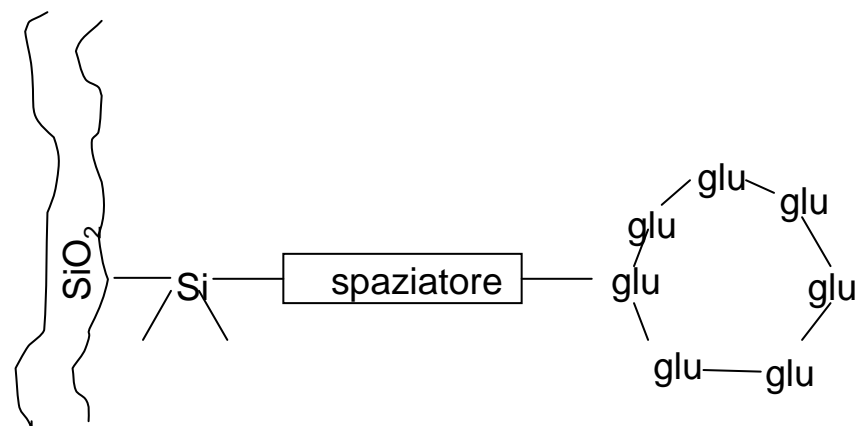
S. Li, W.C. Purdy, *Chem.Rev.* **1992**, 92, 1457

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne Chiral Cavity Phase

Le ciclodestrine ricadono nella famiglia delle CSP che sfruttano il concetto di **Host-Guest complexation**.

Mentre in HPLC si utilizzano tutti i tipi di fase stazionaria elencati, in GC le **ciclodestrine (CD)** sono le uniche utilizzate. Sono relativamente costose da preparare e hanno un tempo di utilizzo mediamente lungo.

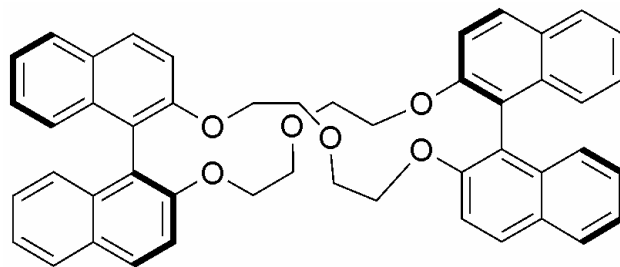


E. Engeldinger, et. al *Chem.Rev.* **2003**, 103, 4147

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne Chiral cavity phase

Altra classe di CSP di tipo Host-Guest sono quelle a base di eteri corona chrali. Anche in questo caso la loro efficacia si basa su interazioni di inclusione selettive all'interno delle cavità. Effetti elettronici π - π sono alla base del loro funzionamento.



M. Okamoto, K.-I. Takahashi, T. Doi. J. Chromatogr. A **675**: 244-247 (1994).

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne CSP

CSP derivate da Proteine: sono catene proteiche vere e proprie di origine amminoacidica (animali e umane) che, dopo purificazione vengono immobilizzate su silice. Un esempio è la **BSA** (*bovine serum albumin*) che, presente nel sangue dei bovini, ha la funzione di trasportatore veicolare.

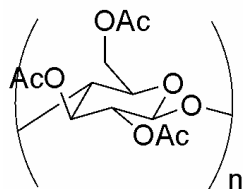
Presentano numerosissimi punti di interazione e questo rende difficile razionalizzare l'interazione selettiva delle stesse con due stereoisomeri. Sono molto utilizzate anche se presentano alcune limitazioni significative: fra queste si evidenzia una scarsa stabilità alle alte temperature ed alle condizioni di pH diverse da quelle fisiologiche.

- S. Allenmark, B. Bomgren, H. Boren. *J. Chromatogr.* **264**: 63-68 (1983).
S. Andersson, R.A. Thompson, S. Allenmark. *J. Chromatogr.* **591**: 65-73 (1992).
S. Allenmark. *Chirality* **5**: 295-299 (1993)

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Colonne: Helical Polymer Phase

Fasi stazionarie a polimeri elicoidali: sono polimeri della cellulosa e generano interazioni multiple attrattive con fenomeni di inclusione. La chiralità di queste fasi stazionarie deriva anche dai ripiegamenti elicoidali della macromolecole coinvolte. Fra le più utilizzate: cellulosa ed amilosio.



Sono state fra le prime CSP utilizzate, ma presentano numerosi svantaggi come una scarsa resistenza meccanica, elevata polarità, presenza di grandi cavità. Successive derivatizzazioni hanno comportato la protezione dei vari gruppi OH (**CTA-I:** cellulosa triacetato).

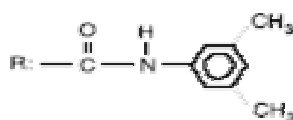
Recentemente hanno avuto grande diffusione le CTA-II dove carbammati variamente sostituiti hanno soppiantato i gruppi acetato.

I fenomeni che sono alla base del riconoscimento molecolare sono complessi e si pensa siano una combinazione di interazioni di ponte H, trasferimenti di carica e fenomeni di inclusione.

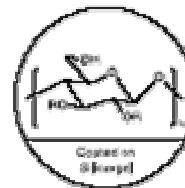
TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Analisi di una reazione stereoselettiva: Helical polymer phase

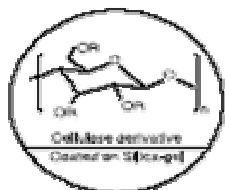
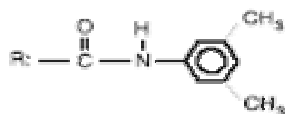
CHIRALPAK® AD™



CHIRALCEL® OA



CHIRALCEL® OD™



CHIRALPAK® AS™



Chiral side chain
S configuration

TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Diastereoisomeri

Eq. di **Karplus** protoni **vicinali** (cicloesani sostituiti):

$$(\phi = 0^\circ-180), J_{ax-ax} = 8-10 \text{ Hz};$$

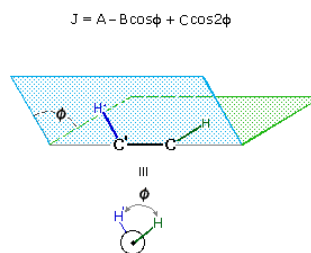
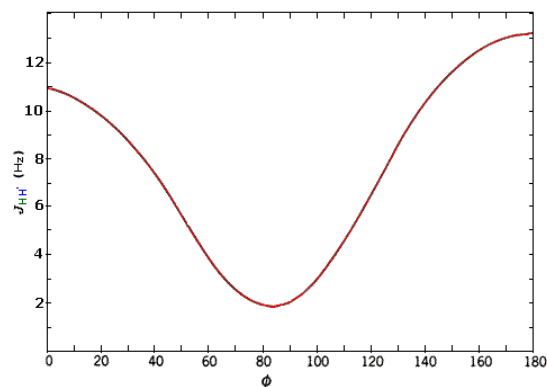
$$(\phi = 80^\circ), J_{eq-eq} = 2-3 \text{ Hz};$$

$$(\phi = 30^\circ), J_{eq-ax} = 6-7 \text{ Hz};$$

Eq. di **Karplus** protoni **geminali**:

$$J = 12-18 \text{ Hz (cicloesani)};$$

$$J = 0-3 \text{ Hz (ciclopropani)}$$

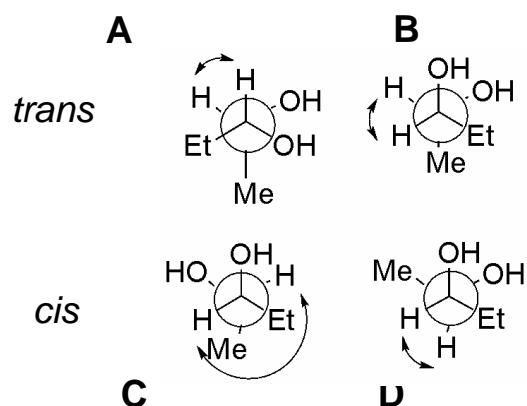
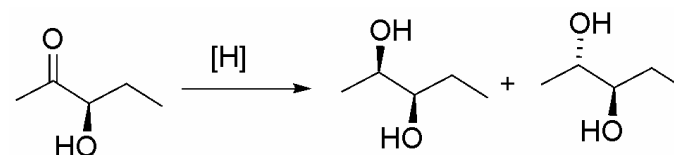


Martin Karplus
Michigan State University

TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Diastereoisomeri

Consideriamo la riduzione di un chetone avente uno stereocentro in α . Si può pensare ad un eccesso del *trans* per motivi di ingombro sterico. Il rapporto diastereomerico (rd) sarà generalmente basso non avendo un sistema rigido.

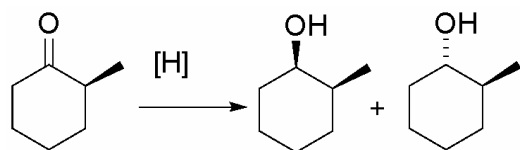


Queste sono le conformazioni più stabili con gli ossidrili in gauche per ponti-H.

La conformazione *cis* ha una J più alta perché in **C** i due H hanno un angolo di 180° . Previsioni più corrette si eseguono su sistemi ciclici rigidi.

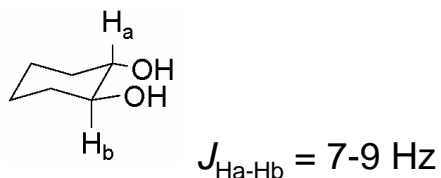
TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Diastereoisomeri



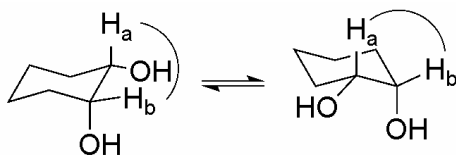
Per il prodotto *trans*, il conformero più stabile ha i due sostituenti equatoriali e quindi i due H vicinali saranno assiali.

trans



La costante dell'isomero *trans* è maggiore indipendentemente da quale sia la conformazione più stabile del *cis*.

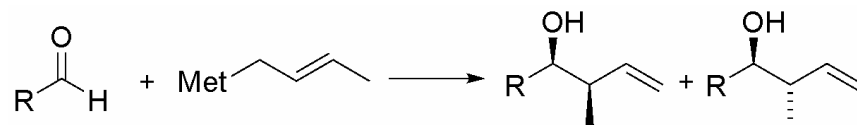
cis



$$J_{H_a-H_b} = 2-3 \text{ Hz}$$

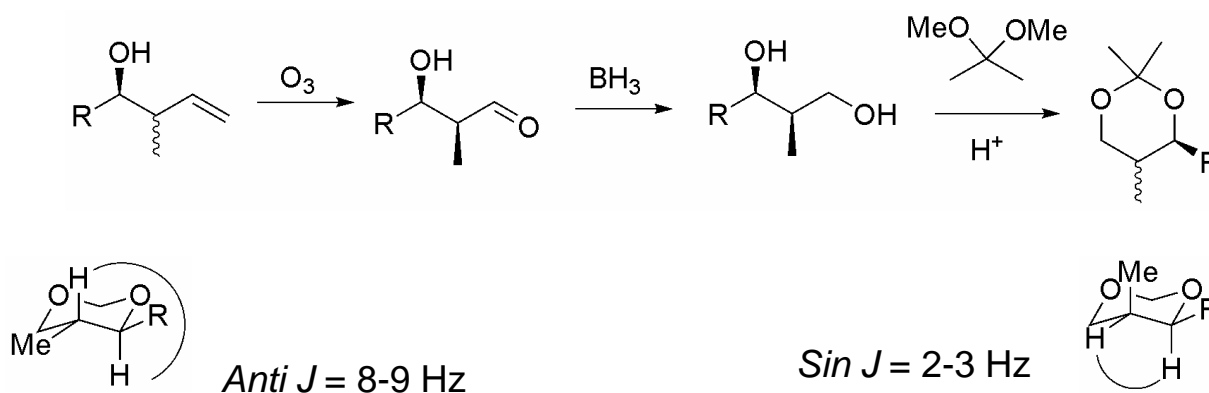
TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Diastereoisomeri



La configurazione relativa dei due stereocentri non possono essere determinata direttamente tramite NMR: strutture acicliche. Ogni conformazione possibile di un certo isomero avrà una propria J . Con un rapido interscambio fra le varie conformazioni, si otterrà una J che deriva dalla media pesata delle varie conformazioni.

Si può ottenere una specie ciclica??



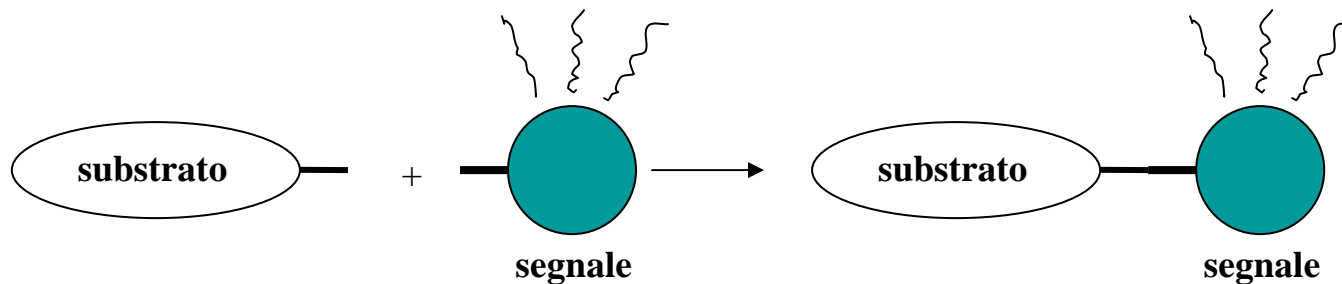
TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Enantiomeri

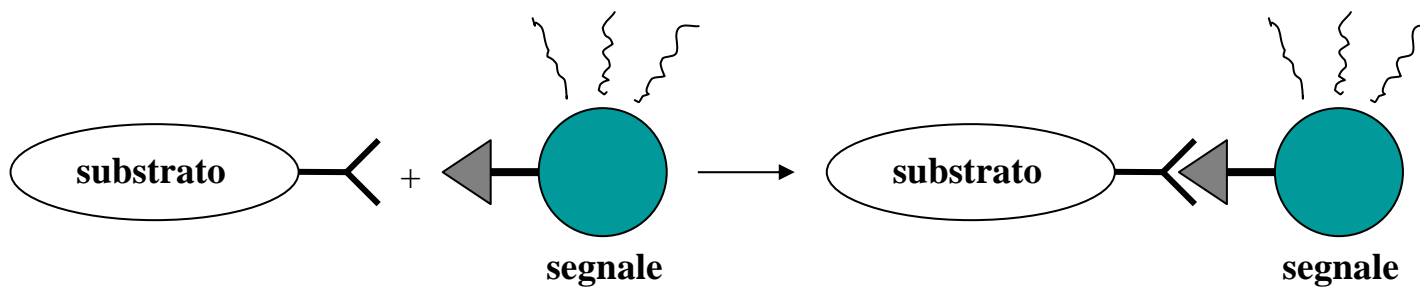
Per la separazione di enantiomeri all'NMR vi sono numerose strategie, fra queste:

1. **Derivatizzazione** \Rightarrow **Diastereoisomeri**
2. **Reattivi di Shift chirali**

Metodi di derivatizzazione: LEGAME COVALENTE



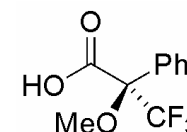
Metodi di derivatizzazione: LEGAME NON-COVALENTE



TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Enantiomeri

Derivatizzazione: Valgono i medesimi criteri visti per la derivatizzazione per HPLC. Inoltre qualora il composto in analisi non sia noto, si cerca anche di derivatizzarlo ad un composto noto per poter poi paragonare i valori dei poteri rotatori ottici specifici riportati in



letteratura (**Correlazione Chimica**). Molto usati sono i derivati del *Mosher*. I gruppi CF₃ e OMe all'NMR forniscono dei singoletti diagnostici al fine di apprezzare anche minime differenze di CS.

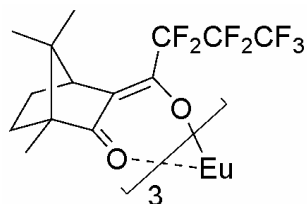
La formazione di derivati impiegando l'acido di Mosher, consente di avere delle utili informazioni anche sulla struttura dello stereoisomero in questione, soprattutto nel caso di alcoli ed ammine secondarie.

TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Enantiomeri

Reattivi di Shift chirali: Sono dei complessi di metalli (generalmente lantanidi) con leganti chirali. Sono stati introdotti nel 1969 da Hinckley e provocano lo shift dei segnali del composto in questione tramite interazioni deboli con quest'ultimo senza intervenire sulla frequenza del campo magnetico applicato. L'uso di interazioni non-covalenti ha numerosi vantaggi fra i quali: semplicità procedurali, nessuna reazione di formazione di nuovi legami, uso di minime quantità di analita, facilità di recupero del composto analizzato.

I leganti chirali utilizzati derivano dalla canfora e l'uso dei lantanidi è dettato dalle loro possibilità di accettare molti elettroni e dal fatto di essere paramagnetici.



Eu(hbp)

Per esempio l'eurobio (III) è complessato con tre leganti derivanti dalla canfora e può accettare altre specie coordinanti. **Chiral Recognition.**

C.C. Hinckley, *J.Am.Chem.Soc.* **1969**, *91*, 5160.

H. Tsukube, S. Shinoda, *Chem.Rev.* **2002**, *102*, 2389.

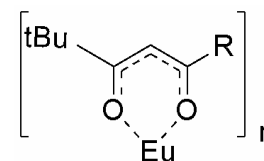
TECNICHE SPETTROSCOPICHE

Spettroscopia NMR: Enantiomeri

Ovviamente durante la complessazione si può verificare anche la dissociazione di uno dei 3 leganti canforilici. L'analita trovandosi in ambienti chirali forma dei complessi diastereomerici che possono avere stabilità e conformazioni diverse per dissimili interazioni steriche ed elettroniche tanto che i nuclei degli enantiomeri saranno influenzati in modo diverso dal campo elettrico generato da tutti gli elettroni dell'eurobio. I reattivi chirali di shift (**atomo di Eurobio**), interagiscono principalmente con gruppi basici e coordinanti come: carbonili, alcoli, eteri, ammine....

Queste analisi si effettuano impiegando reattivi di shift anidri, con soluzioni molto diluite di analita. Il complesso si aggiunge progressivamente all'interno del tubo NMR quantità crescenti di reattivo di shift e misurandone via-via l'effetto. Le condizioni ottimali per l'utilizzo di questi reattivi sono eccessi enantiomerici del 40-60% (errore 2%) mentre per la misurazione di eccessi enantiomerici più elevati (ee = 90%), si hanno errori molto più elevati (10%).

Possono essere utilizzati anche per la interpretazione degli spettri e per l'assegnazione dei segnali. I nuclei più vicini al centro di interazione con l'eurobio verranno "shiftati" maggiormente. Per questi utilizzi si usano anche complessi di Eu achirali.



Eu(dpm)₃ R=tBu

Eu(fod)₃ R=CF₂CF₂CF₃