

Determinazione purezza stereoisomerica Nuove metodologie

(M. Tsukamoto, H. B. Kagan, *Adv. Synth. Catal.* 2002, 344.)

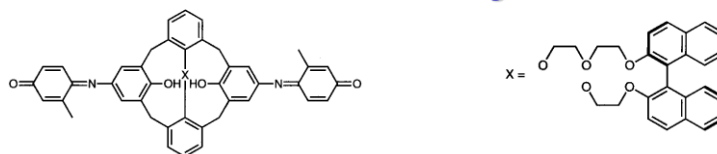
1. Metodi veloci che consentano di valutare un elevato numero di campioni (high-throughput screening in catalisi asimmetrica)
2. Utilizzo di quantità minime di composto

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



1

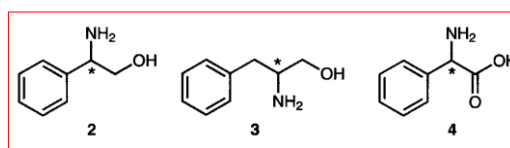
Molecole Host cromogeniche



Molecola host chirale enantiopura (CHM)
colore rosso in EtOH

(CHM).(S)-2

(CHM).(R)-2
blu-viola ($\lambda=650$ nm)



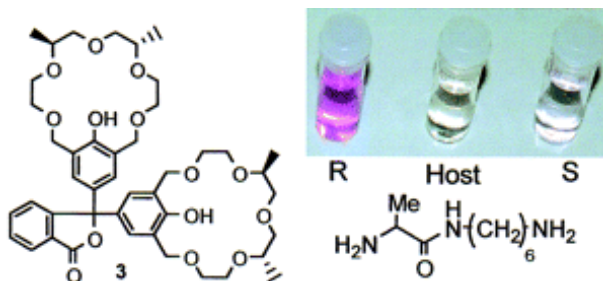
Kubo et al



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

2

Derivato chirale della fenolftaleina in presenza di N-etilpiperidina



[5 + (R)-(n=5 o 6)] **Cambiamento di colore (porpora)**
 [5 + (S)-(n=5 o 6)] **Nessun cambiamento di colore**

Nessun colore con il derivato con n=4

Assegnazione della configurazione assoluta:
 retta di taratura per ee = 0-30% in (S)

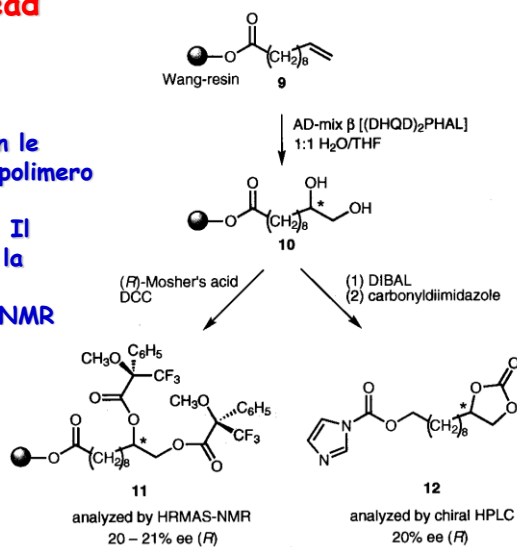
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



3

Misurazione ee on-bead (Berkessel et al.)

Gli ee che si determinano con le molecole ancora ancorate al polimero sono confrontabili con quelle ottenute con metodi classici. Il problema principale riguarda la derivazione e la completa assegnazione dei segnali ^{13}C NMR allo stato solido



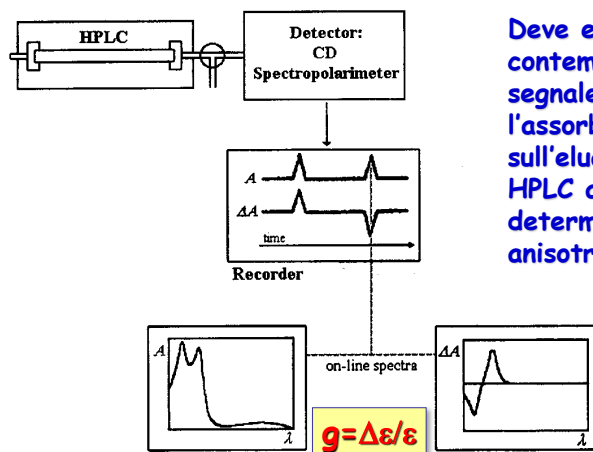
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



4

Sfruttamento delle proprietà chirottiche

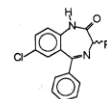
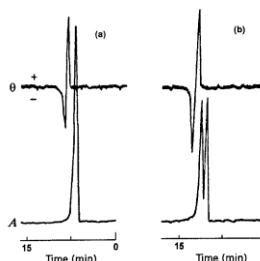
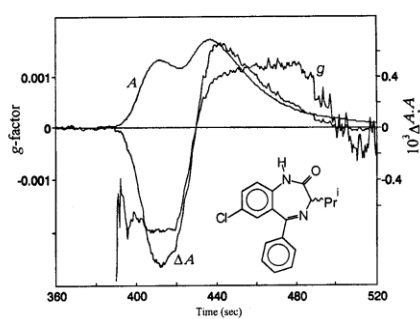
Uso combinato di polarimetria, dicroismo circolare (CD) e cromatografia liquida su fase achirale (HPLC)



Deve essere misurato contemporaneamente il segnale CD ($\Delta\epsilon$) e l'assorbimento UV (ϵ) sull'eluato dopo una colonna HPLC achirale per determinare il fattore g di anisotropia ($g = \Delta\epsilon/\epsilon$).

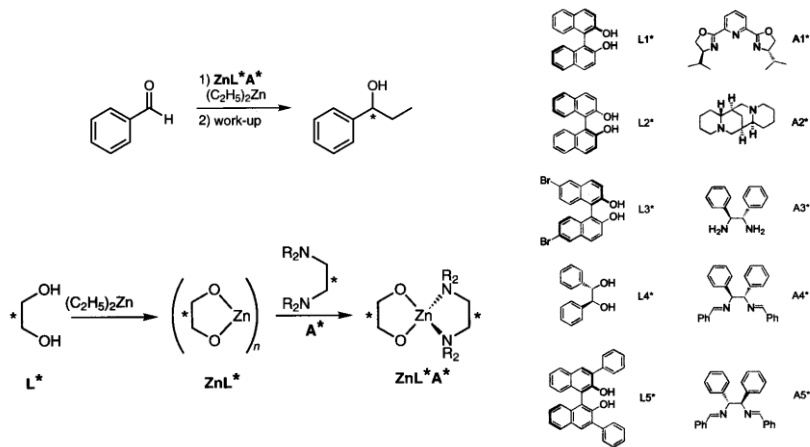


Fattore g di anisotropia ($g = \Delta\epsilon/\epsilon$)



Super High-Throughput Screening

Dicroismo circolare (CD) e cromatografia liquida su fase achirale (HPLC)



(Mikami et al.; Reetz et al.)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



7

Il fattore g deve essere lineare rispetto all' ee e indipendente dalla concentrazione

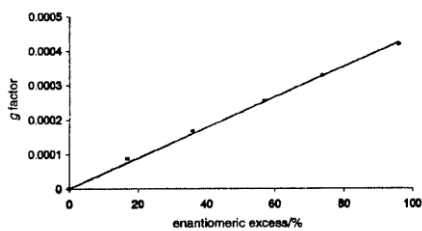


Figure 1. Linear dependency of g factor and % ee for (*S*)-1-phenylpropanol (1).

Registrazione automatizzata e veloce dei valori di ee

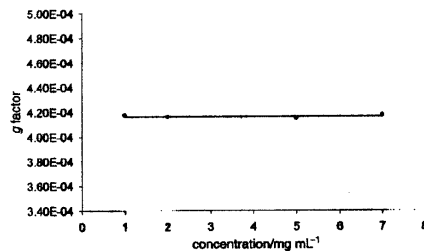


Figure 2. Linear dependency of g factor and concentration for (*S*)-1-phenylpropanol (1).

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



8

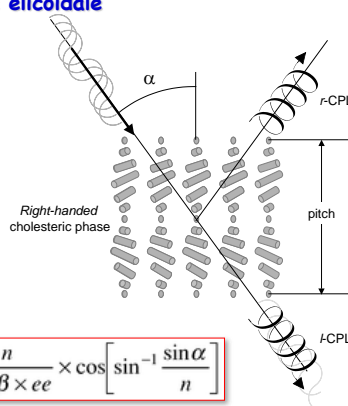
Cristalli Liquidi indicatori colorati di eccesso enantiomerico

La piccola quantità di enantiomero in eccesso induce un cambiamento nella fase nematica che diventa nematica chirale o colesterica, con un passo elicoidale:

$p = (c \times \beta \times ee)^{-1}$ dove c = concentrazione in peso, %
 β = potere torcente elicoidale

La fase colesterica indotta, orientata da una superficie di vetro ricoperta di una poliimmide, può riflettere luce di lunghezza d'onda $\lambda(\alpha)$ con l'angolo di luce incidente (α) relativo alla luce normale alla superficie.

$\lambda(\alpha)$ è proporzionale alla passo dell'elica e all'indice di rifrazione del mezzo (n).



$$\lambda(\alpha) = n \times p \times \cos[\sin^{-1}(\sin \alpha / n)] = \frac{n}{c \times \beta \times ee} \times \cos \left[\sin^{-1} \frac{\sin \alpha}{n} \right]$$

L'induzione di colore è possibile quando $\lambda(\alpha)$ è nella regione del visibile

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



9

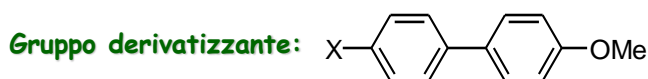
Cristalli Liquidi indicatori colorati di eccesso enantiomerico



Viene determinato l'ee dopo derivatizzazione, per farlo diventare un dopante, e con l'opportuno cristallo liquido

Cristallo liquido

E7 = Unità cianobifeniliche con sostituenti alcossi in para



(B. Feringa, 20

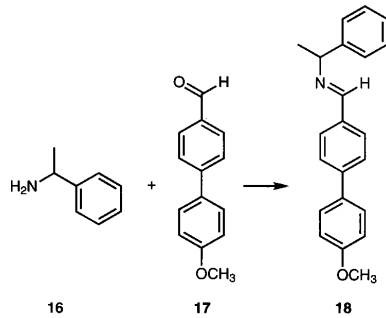
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



10

Cristalli Liquidi

indicatori colorati di eccesso enantiomerico



Dipendenza dalla concentrazione

E7 + (S)-18
varia dal rosso (10%) al viola (19%)

Ee = 100%:

E7 + (S)-18 (100%) = viola (c=19%)

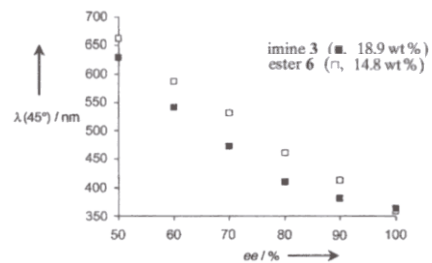
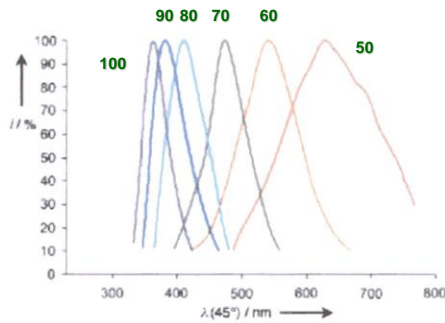
Ee = 50% (75% (S) e 25% (R)):

E7 + (S)-18 (50%) = rosso (c=9.5%)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



11



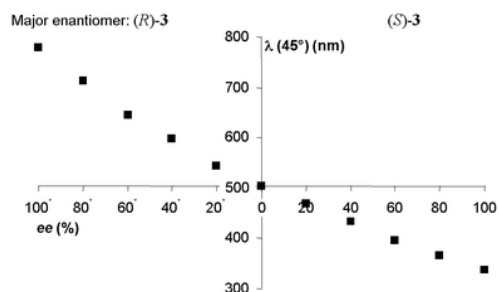
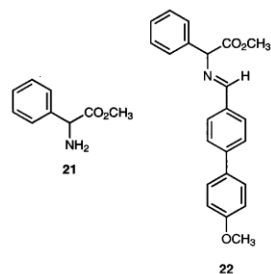
Utilizzabile per ee > 50%;
Non discrimina quale è l'enantiomero in eccesso

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



12

Cristalli Liquidi: metil fenil glicina come ausiliare chirale dopante



E7 + 18.5% di [(S)-22 + (?) -22]

(S)-22 : (?) -22 = 3:1

Per ee= 100 rosso
 Per ee= 0 giallo
 Per ee= -100 viola

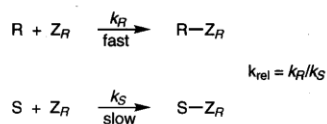
Metodo veloce e bastano microgrammi di composto
 Adatto allo screening di nuovi catalizzatori

(Feringa et al.,

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

13

Risoluzione cinetica



Per una reazione di primo ordine in substrato e catalizzatore:

$$s = \frac{\ln[(1-ee_{sm})(1-c)]}{\ln[(1+ee_{sm})(1-c)]} \quad s = \frac{\ln[1-c(1+ee_{\text{prod}})]}{\ln[1-c(1-ee_{\text{prod}})]}$$

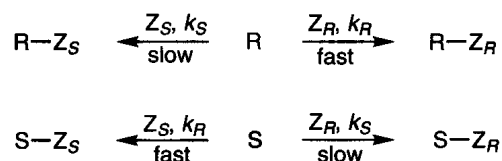
Si può utilizzare la risoluzione cinetica per determinare l'eccesso enantiomerico e la rotazione specifica massima di un composto chirale.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



14

Consideriamo l'analisi di un piccolo campione di sostanza (R + S) e lo facciamo reagire con un reagente racemo Z_S e Z_R .



Fattore di stereoselettività $s = k_R/k_S = [R-Z_R + S-Z_S] / [S-Z_R + R-Z_S]$

$$ee(\%) = \frac{(y-1)(s+1)}{(y+1)(s-1)} \times 100$$

$$y = [R-Z_R + S-Z_R] / [R-Z_S + S-Z_S]$$

con $[Z_R + Z_S] \gg [R + S]$

Si costruisce una retta di taratura



$$ee(\%) = \frac{(y-1)(s+1)}{(y+1)(s-1)} \times 100$$

$$s = [R-Z_R + S-Z_S] / [S-Z_R + R-Z_S]$$

$$y = [R-Z_R + S-Z_R] / [S-Z_S + R-Z_S]$$

Per l'analita enantiopuro
Per l'analita racemo

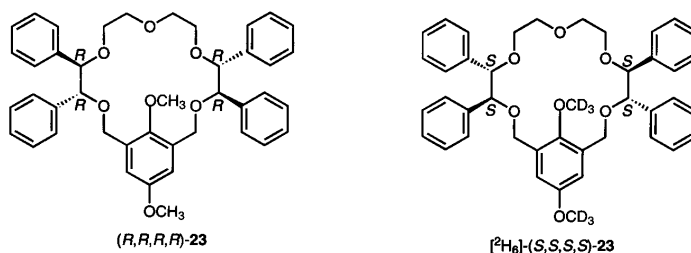
$$\begin{array}{l}
 s=y \\
 y=1
 \end{array}$$

Queste relazioni sono valide anche per reagenti pseudo-racemi, in cui uno dei due reagenti viene modificato in posizione remota in modo da non modificare significativamente la reattività.



Risoluzione cinetica + Spettrometria di massa (Host-Guest Chemistry)

Riconoscimento di ammine primarie da parte di eteri corona
AA + HOST (2 equiv)



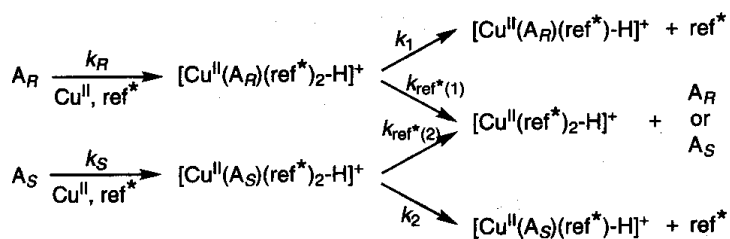
Relazione lineare tra l'ee dell'ammino acido e l'intensità del picco FAB-MS
per fenil glicina, acido aspartico, asparagina e valina (errore del 5%)

(Sawada et al.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

17

Risoluzione cinetica + Spettrometria di massa (complessi di rame (II)- ee di ammino acidi)



ref* = ammino acido chirale di riferimento (tirosina, triptofano)

Rapporto di abbondanza relativa:
$$R = \frac{[\text{Cu}^{\text{II}}(A)(\text{ref}^*)\text{-H}]^+}{[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{ref}^*)_2\text{-H}]^+}$$

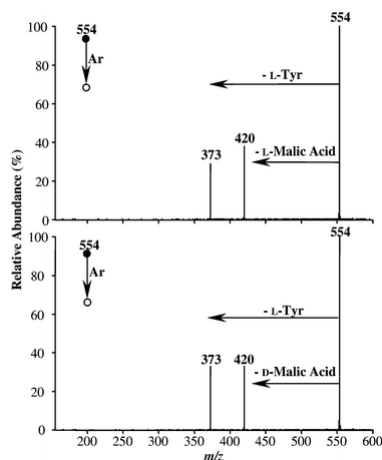
Cook

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

18

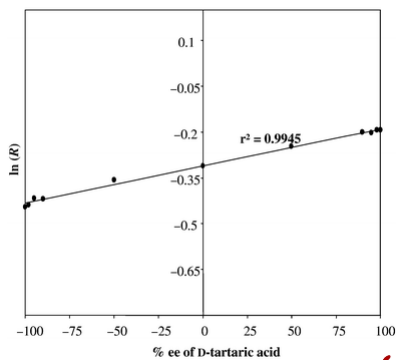
Elevata accuratezza, usato anche con idrossiacidi (Co(II))

Rapporto di abbondanza relativa: $R = [\text{Co}^{\text{II}}(\text{A})(\text{ref}^*) - \text{H}]^+ / [\text{Co}^{\text{II}}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+$



Curva di calibrazione per l'acido tartarico usando L-tyrosine come riferimento

$$\ln R = a \cdot (\%ee) + b$$



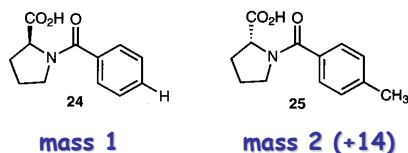
Riconoscimento chirale di idrossiacidi

$$R_{\text{chiral}} = R_R / R_S = \frac{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{A}_R)(\text{ref}^*) - \text{H}]^+ / [\text{Co}^{\text{II}}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+}{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{A}_S)(\text{ref}^*) - \text{H}]^+ / [\text{Co}^{\text{II}}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+}$$

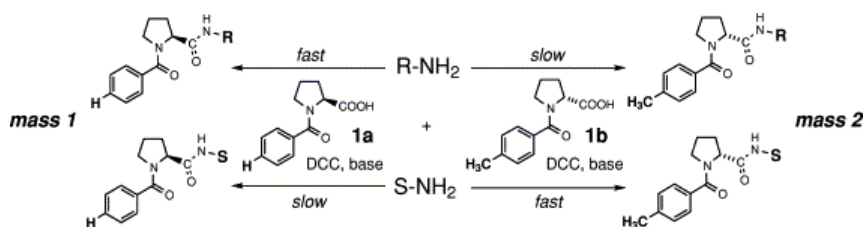
A	Ref*	$\frac{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{ref}^*)(\text{A}) - \text{H}]^+}{[\text{Co}^{\text{II}}(\text{ref}^*)_2 - \text{H}]^+}$	R_{chiral}
D-Tartaric acid	L-Tyr	0.823	1.29
L-Tartaric acid		0.640	
D-Malic acid	L-Tyr	1.11	1.43
L-Malic acid		0.775	
R-Mandelic acid	L-Ala	1.00	1.00
S-Mandelic acid		1.02	
R-Mandelic acid	L-3-Phenyllactic acid	0.175	0.81
S-Mandelic acid		0.216	
D-3-Phenyllactic acid	L-Pro	0.168	1.29
L-3-Phenyllactic acid		0.130	
D-3-Phenyllactic acid	L-Phe-d ₅	0.0226	0.67
L-3-Phenyllactic acid		0.0337	
R-Citramalic acid	L-Tyr	5.81	1.35
S-Citramalic acid		4.30	

^a R_{chiral} is defined in eqn. 2. ^b CID activation level is optimized in each experiment and then kept constant for the measurement of enantiomers.

**Risoluzione cinetica + "mass-tagged" pseudo racemic compounds
(M.G. Finn et al.)**



$$ee(\%) = \frac{(y-1)(s+1)}{(y+1)(s-1)} \times 100$$



A priori si deve determinare il valore di s e anche il fattore di correzione per la ionizzazione

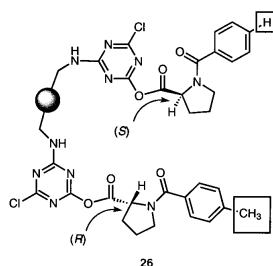
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



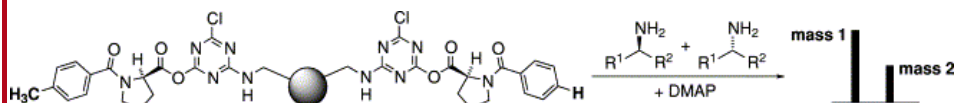
21

**Risoluzione cinetica + "mass-tagged" pseudo racemic compounds
su polistirene derivatizzato**

(M.G. Finn et al.)



**0.80 mmol/g agente acilante pseudo-racemico (largo eccesso) + ammina
e e incognito**



Analisi ESI-MS diretta (MeOH) sul prodotto dopo rimozione del solvente

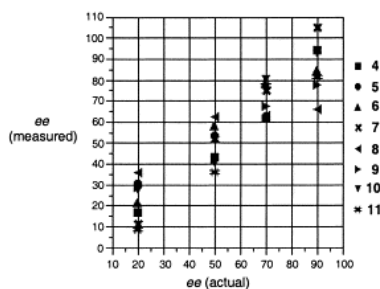
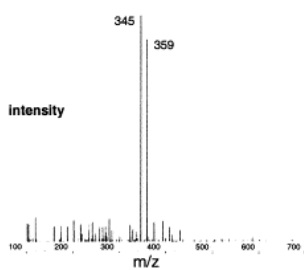
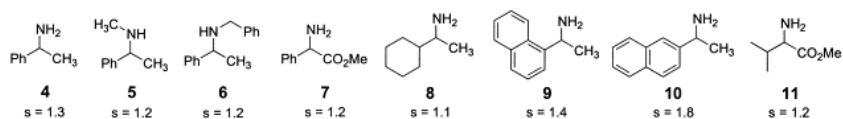
accuratezza 10%

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



22

High-Throughput Screening di Ammine



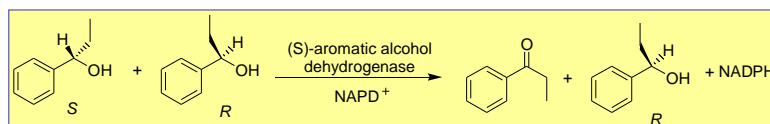
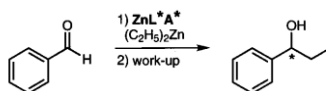
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



23

Metodi Enzimatici

Si sfrutta la specificità di un enzima per uno degli enantiomeri che viene trasformato in maniera completamente selettiva



La formazione di NADPH viene monitorata via UV, si può determinare la velocità iniziale dell'ossidazione che è linearmente correlata all' ee dell'alcol benzilico

Accuratezza del 10%,
metodo molto veloce (100 campioni in 30 minuti)

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



24

Risoluzione cinetica + Fluorescenza (Shair et al.)

Reaction microarrays

(adattamento delle tecniche di DNA microarray per la misurazione di ee.s)

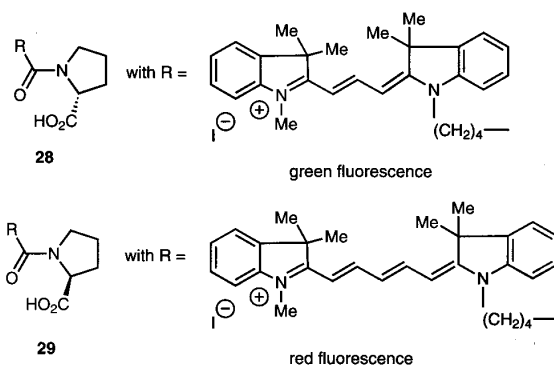
Deteminazione ee di ammino acidi

1. Una lastra di vetro funzionalizzata con gruppi NH_2 viene fatta reagire in punti precisi con *N*-Boc amminoacidi.
2. Le rimanenti funzioni NH_2 vengono acetilate.
3. Deprotezione della funzione *N*-Boc

Si ottengono serie di macchie contenenti 10^{-11} moli di AA

Tutto il processo è automatizzato

Le funzioni amminiche degli amminoacidi vengono derivatizzate con dei reagenti fluorescenti pseudo-enantiomerici derivati dalla prolina



Le diverse macchie vengono fatte reagire con un eccesso di reagente pseudo-racemo. Nella reazione di coupling si osserva una risoluzione cinetica parallela in ogni macchia sulla lastra nelle quali vengono consumate quantità non uguali di reagente fluorescente pseudo-racemo.

Il fluoroforo in 28 fornisce un'emissione verde (532 nm) mentre quello in 29 un'emissione rossa (635 nm).
Se le due emissioni sono della stessa intensità si osserva un colore giallo

$$ee(\%) = \frac{(y-1)(s+1)}{(y+1)(s-1)} \times 100$$

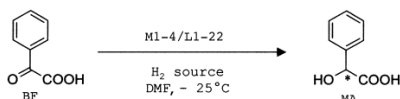
y= rapporto di intensità di fluorescenza misurato
s= deve essere determinato preventivamente con campioni con ee noti

Si hanno velocemente informazioni sull'ee e sulla configurazione assoluta dell'amminoacido supportato

Accuratezza ± 10%, applicato a 15.552 campioni contemporaneamente



Risoluzione cinetica + Immunoassay Sintesi enantioselettiva dell'acido mandelico



Metal library:

M1 : [RuCl₂(p-cym)₂]
M2 : [RuCl₂(benz)₂]
M3 : [RhCl₂(Cp)₂]
M4 : [IrCl₂(Cp)₂]

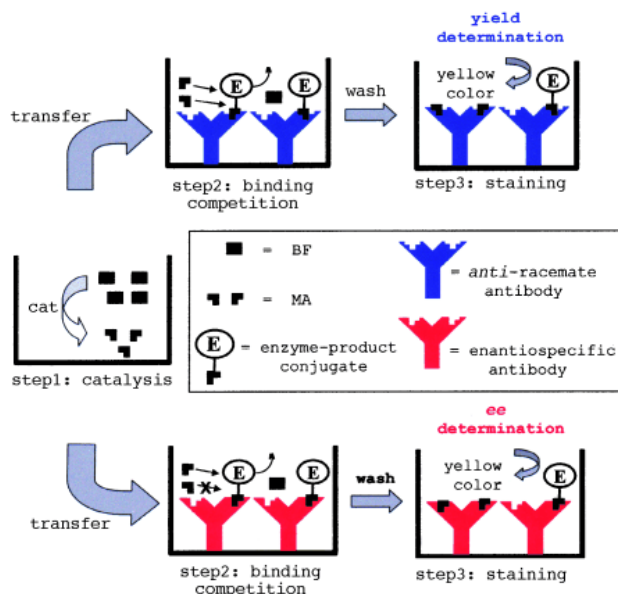
Ligand library:

L	R	R'
1	H	H
2	CF ₃ SO ₂	H
3	C ₆ F ₅ SO ₂	H
4	4-CF ₃ C ₆ H ₄ SO ₂	H
5	2,4,6-CH ₃ C ₆ H ₂ SO ₂	H
6	4-CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂	H
7	C ₆ F ₅ SO ₂	H
8	CF ₃ CO	H
9	C ₆ H ₅ CO	H
10	4-CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂	4-CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂
11	C ₆ H ₅ CH ₂ CO ₂	C ₆ H ₅ CH ₂ CO ₂
12	H	H
13	CF ₃ SO ₂	H
14	C ₆ F ₅ SO ₂	H
15	4-CH ₃ C ₆ H ₄ SO ₂	H
16	2,4,6-CH ₃ C ₆ H ₂ SO ₂	H
17	4-CF ₃ C ₆ H ₄ SO ₂	H
18	CF ₃ SO ₂	CF ₃ SO ₂
19	CH ₃ SO ₂	CH ₃ SO ₂
20	H	H
21	CF ₃ SO ₂	H
22	H	H

L1 to L11
L12 to L19
L20, 21
L22

(Mikowssli et al.)



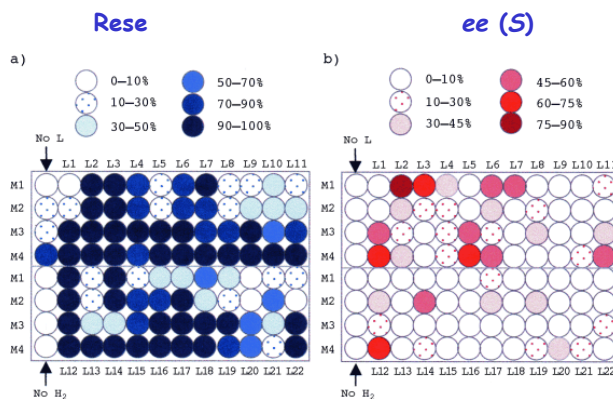


Anticorpi monoclonali enantiospecifici legano selettivamente l'(S)-acido mandelico provocando una diminuzione nell'assorbanza che è correlabile all'*ee*.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



29



Screening of the catalyst library for the reduction of BF to (S)-MA.: Yields and *ee* values are presented in a color-coded format (blue for yields and red for *ee*).

Catalyses were performed in DMF using HCOOH/TEA as hydrogen source and 1.6 % of chiral catalyst (metal/ligand ratio 1:1.2 in DMF) at room temperature for 14 h.

The control experiments without hydrogen source or without ligand are given in the left rows.

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA



30

Correlazione analisi HPLC/EIA

