



Gennaro Pescitelli,
Lorenzo Di Bari,
Piero Salvadori
Dipartimento di Chimica e
Chimica Industriale
Università di Pisa
ripes@dcci.unipi.it

DICROISMO CIRCOLARE UV/VIS DETERMINAZIONE DELLA CONFIGURAZIONE ASSOLUTA DI MOLECOLE ORGANICHE

Il dicroismo circolare è un potente mezzo per l'analisi stereochimica, soprattutto se associato alle moderne tecniche computazionali. Il confronto tra spettri calcolati e sperimentali (in soluzione o allo stato solido) consente l'assegnazione configurazionale di molecole organiche di medie dimensioni.

La caratterizzazione strutturale di un composto organico chirale non può prescindere dalla determinazione della sua configurazione assoluta (CA). La maggior parte delle biomolecole e delle molecole bioattive contiene uno o più centri chirali e i due enantiomeri (ovvero i due stereoisomeri di CA opposta) hanno in generale effetti biologici e farmacologici distinti [1, 2]. Anche a livello normativo, è ormai riconosciuta la necessità di identificare la struttura assoluta di un farmaco chirale e, se possibile, separare e determinare l'attività di tutti i suoi stereoisomeri [3].

Le tecniche utilizzabili per l'assegnazione della CA possono essere divise in due grandi categorie: quelle "relative" e quelle "assolute". Le tecniche relative si basano sul confronto, o sulla relazione chimica, con una sostanza a CA nota. In questa classe rientrano le correlazioni chimiche tramite trasformazioni stereospecifiche e la misura del potere ottico rotatorio da confrontare con il valore della sostanza pura. La spettroscopia NMR, intrinsecamente non in grado di discriminare gli enantiomeri, può essere utilizzata per caratterizzare composti o addotti diastereomerici in cui almeno una porzione abbia stereochimica assoluta nota, e determinare così quella della porzione incognita [4]. Nell'ambito dello sviluppo di nuove molecole, ad esempio nuovi farmaci, è però essenziale disporre di tecniche "assolute", che consentano

cioè di assegnare la CA in assenza di sostanze di riferimento [5]. A questa classe appartiene la diffrattometria ai raggi X in presenza di dispersione anomala (scattering di risonanza). Nonostante il suo indubbio valore, tale tecnica è limitata dalla necessità della presenza di almeno un atomo "pesante" (dallo zolfo in poi), e di analizzare un cristallo di dimensioni e qualità adeguate. Una valida alternativa alla cristallografia è offerta dalle spettroscopie chiroottiche, basate sull'interazione tra radiazione elettromagnetica polarizzata circolarmente (CPL), nel campo UV/Vis, IR oppure NIR, e l'analita chirale.

Tra queste, il dicroismo circolare (CD) rappresenta senz'altro la tecnica più efficiente e versatile [6]. Il segnale CD risulta dall'assorbimento differenziale da parte dell'analita nei confronti della radiazione polarizzata circolarmente sinistra (L-CPL) e destra (R-CPL), generate alternativamente per mezzo di un modulatore foto-elastico (PEM, Fig. 1). Normalizzando l'assorbimento differenziale $\Delta\epsilon$ (spesso misurato come ellitticità θ , in m°) sulla concentrazione c (in $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) e sul cammino ottico b (in cm), si definisce il CD molare (in $\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$) come: $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \Delta A/bc = \theta/(33000bc)$.

Nel campo della radiazione UV/Vis (185-700 nm), si può osservare una banda CD in corrispondenza di ciascuna transizione elettronica dell'analita. Il CD elettronico (ECD) rappresenta dunque la controparte chirale della comune spettroscopia di assorbimento, rispetto alla quale risulta

estremamente più sensibile nei confronti della struttura molecolare. Non solo infatti gli spettri CD di due enantiomeri hanno tutte le bande di segno opposto, ma l'aspetto globale dello spettro (posizione e intensità relative delle bande) è largamente determinato dalla conformazione molecolare. Compito dello spettroscopista è dunque quello di estrarre l'informazione contenuta nello spettro registrato. Nel caso particolare dell'assegnazione della CA, sono possibili diversi livelli di analisi, che vanno dal confronto spettrale tra sostanze simili, all'interpretazione di una o più bande tramite metodi semplificati [6, 7], fino al calcolo completo dello spettro CD con sofisticati metodi quanto-meccanici, che l'odierno sviluppo informatico ha reso possibile per molecole sempre più complesse. L'assegnazione della CA può quindi basarsi sul confronto tra lo spettro CD registrato sulla sostanza in esame e quello calcolato a partire da una certa geometria molecolare, la cui CA è assunta arbitrariamente: se le bande sperimentali e calcolate combaciano in segno, la CA corretta è quella assunta. La scelta del metodo di calcolo si basa in genere sul miglior compromesso tra costo computazionale ed efficienza. In particolare, il metodo TDDFT (Time-Dependent Density Functional Theory) [8], consente di prevedere gli spettri di assorbimento e ECD di una molecola organica di medie dimensioni (10-20 atomi pesanti) con buona accuratezza e in tempi ragionevoli [9], e rappresenta una metodologia sempre più utilizzata per la determinazione della CA [10].

Come per qualsiasi previsione computazionale di proprietà molecolari, è cruciale la geometria di input usata nel calcolo. In generale, l'assegnazione della CA presuppone la conoscenza della conformazione molecolare. Normalmente deriverà anch'essa da una procedura computazionale, ovvero un'ottimizzazione di geometria, ad esempio eseguita col metodo DFT. La geometria così ottenuta può quindi essere confrontata con dati sperimentali. Nel caso più comune di misura spettroscopica in soluzione, il confronto più immediato è con i dati NMR sensibili alla struttura tridimensionale, ad esempio gli effetti Overhauser (NOE) e gli accoppiamenti scalari J (soprattutto $^3J_{HH}$ e $^3J_{CH}$) [11].

Per molecole flessibili in soluzione, è evidente che le geometrie di input considerate devono rappresentare l'intero insieme conformazionale presente alla temperatura d'esercizio (normalmente, quella ambiente) e nel solvente usato. È pertanto richiesta un'estesa analisi conformazionale tanto a livello computazionale quanto sperimentale. Inoltre, il calcolo TDDFT deve essere effettuato su tutti i conformeri sufficientemente popolati a temperatura ambiente, in grado perciò di contribuire allo spettro CD. Lo spettro registrato equivale infatti alla somma dei contributi di ciascuna specie presente in soluzione, e pertanto gli spettri CD calcolati per i vari conformeri vanno pesati per la rispettiva popolazione (secondo la distribuzione di Boltzmann) e sommati per fornire uno spettro medio da confrontare con quello sperimentale.

Vediamo un esempio di applicazione di calcoli ECD relativi a spettri misurati in soluzione. I derivati pirrolici **1a,b** sono stati sintetizzati in forma racemica, e quindi risolti tramite HPLC enantioselettiva, per essere impiegati come antinfiammatori (inibitori selettivi della COX-2) [12]. Lo spettro CD di **1a,b** mostrato in Fig. 2 è stato misurato direttamente on-line durante l'eluzione cromatografica, arrestandone il flusso in corrispondenza di ciascun picco, tramite un rivelatore CD accoppiato all'HPLC [13]. La struttura di **1a,b** consente di prevedere una certa flessibilità conformazionale dovuta alle rotazioni intorno ai legami semplici evidenziati in blu. La conformazione molecolare è stata studiata tramite scansioni delle energie torsionali con un metodo semi-empirico e successive ottimizzazioni DFT. Si ottengono per **1a** quattro conformeri popolati a temperatura ambiente, mostrati in Fig. 3. Anche lo studio NMR (effetti NOE e variazioni del chemical shift di OH con la temperatura) fornisce risultati in accordo con le strutture ottimizzate.

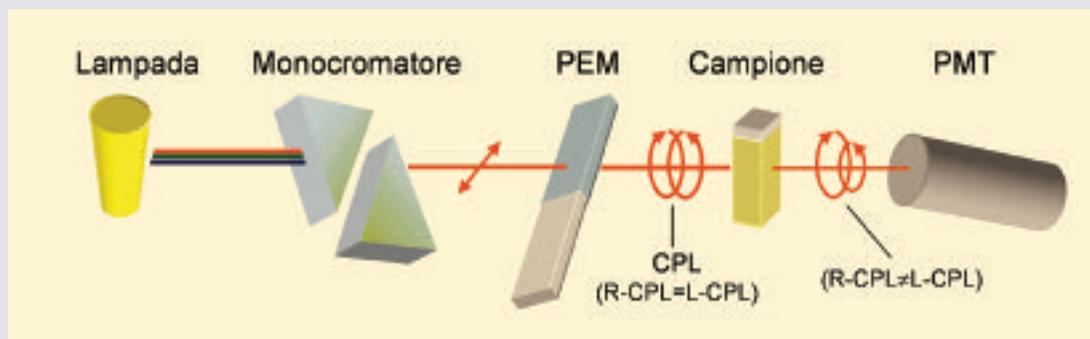


Fig. 1 - Schema di uno strumento CD (spettropolarimetro). PMT, fotomoltiplicatore; per i restanti acronimi, vd. il testo

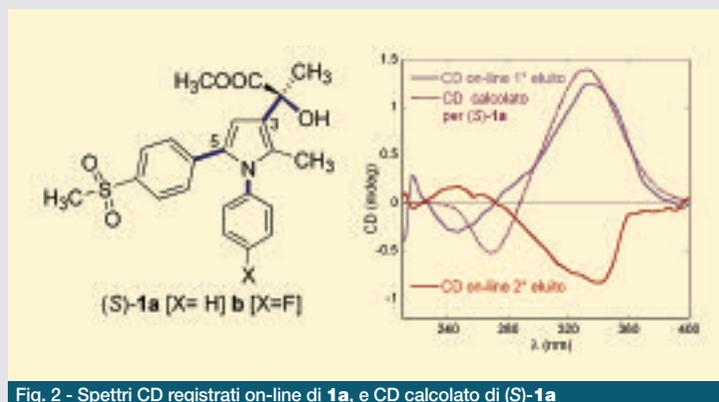


Fig. 2 - Spettri CD registrati on-line di **1a**, e CD calcolato di (S)-**1a**

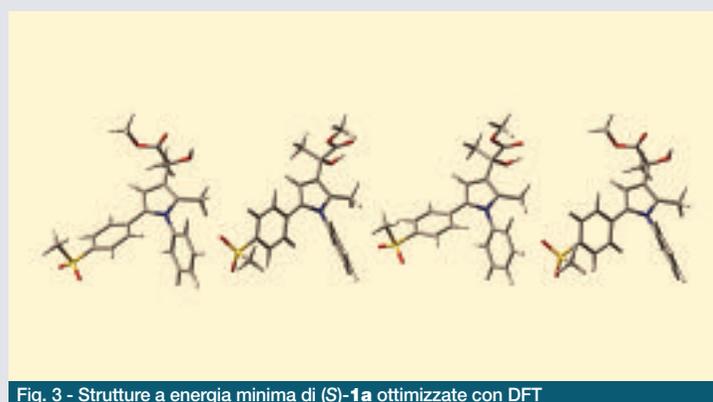


Fig. 3 - Strutture a energia minima di (S)-**1a** ottimizzate con DFT

Gli spettri CD calcolati su queste ultime con CA assunta arbitrariamente (S), con il metodo TDDFT, presentano un'evidente variabilità nella forma, posizione e segno delle bande; è chiaro allora che trascurare anche uno solo dei contributi condurrebbe ad un grave errore procedurale. Lo spettro medio calcolato secondo la distribuzione di Boltzmann (usando le energie relative stimate con il DFT), per la CA **1a**-(S) (Fig. 2), presenta un andamento in ottimo accordo con lo spettro CD registrato on-line per il primo enantiomero eluito, in termini di posizione e intensità relativa delle bande. Pertanto è possibile per **1a** la seguente assegnazione: 1° eluito \leftrightarrow CA (S). Lo stesso risultato si può estendere a **1b**, che presenta profilo cromatografico, spettro CD registrato on-line, e dati NMR del tutto simili a **1a** [12].

I punti critici di una procedura come quella sopra descritta, riassunta nello Schema (in azzurro), sono molteplici. Anzitutto, è necessario che l'analisi strutturale identifichi correttamente tutte le specie chimiche che maggiormente contribuiscono allo spettro sperimentale; inoltre, la loro energia relativa (nel solvente dell'analisi sperimentale) deve essere predetta con precisione nell'ottimizzazione di geometria DFT. Infine, poiché il calcolo degli strati eccitati con il metodo TDDFT rappresenta il passaggio lento, la presenza di troppi minimi energetici può allungare i tempi di calcolo fino a renderlo impraticabile.

Un approccio del tutto differente, nel quale gli ostacoli legati alla flessibilità strutturale in soluzione sono rimossi, è possibile prendendo in considerazione lo stato solido cristallino. Da un lato, la struttura allo stato cristallino è univoca e determinabile sperimentalmente tramite diffrazione ai raggi X (a meno degli atomi di idrogeno). Dall'altro, lo spettro CD può essere registrato su campioni microcristallini previo mescolamento con un sale quale KCl o KBr, e pressione a ~ 10 t per ottenere una pasticca trasparente, del tutto analoga a quelle impiegate nella spettroscopia IR [14]. In questo modo, lo spettro risulta determina-

to da un'unica specie chimica la cui struttura tridimensionale, a meno della sua CA, è nota con precisione. Pertanto, effettuando il calcolo TDDFT sulla geometria determinata ai raggi X (assumendo anche in questo caso una CA arbitraria), si può pervenire all'assegnazione della CA nella condizione ideale in cui il dato sperimentale e quello calcolato si riferiscono esattamente alla stessa geometria molecolare.

I pregi di siffatta metodologia TDDFT/CD allo stato solido (ss-CD/TDDFT) risiedono, oltre che nell'ottimo accordo generalmente osservato tra spettro sperimentale e calcolato, nell'enorme riduzione dei tempi di calcolo e delle possibili fonti di errore rispetto al caso, visto in precedenza, relativo allo stato in soluzione. Infatti, oltre a saltare l'intero passaggio dell'analisi conformazionale, si esegue il calcolo TDDFT su una singola struttura (V. Schema, verde). Il campo di applicabilità della procedura allo stato solido comprende tutti i composti organici che possano essere cristallizzati, anche privi di elementi pesanti, purché dotati di spettro CD significativo, ovvero contenenti uno o più gruppi cromofori. In questo senso, essa risulta complementare alla assegnazione della CA basata sulla diffrazione anomala.

È preferibile che il composto non sia polimorfo o, in alternativa, è necessario che il campione misurato sia di morfologia nota. Un ulteriore punto critico risiede nei possibili artefatti spettrali spesso presenti negli spettri CD misurati allo stato solido. Essi sono principalmente dovuti a imperfezioni nell'ottica strumentale che si accoppiano a effetti dicroici di porzioni anisotrope presenti nel campione; possono però essere minimizzati da un'attenta preparazione della pasticca, e comunque essere rivelati tramite opportuni accorgimenti nelle misure [15]. Infine, poiché lo spettro CD calcolato si riferisce ad una singola molecola isolata, quello sperimentale non deve risentire delle interazioni intermolecolari nel cristallo. Nelle 11 classi di simmetria non-centrosimmetriche permesse per composti chirali enantiopuri, le interazioni tra

molecole all'interno del cristallo possono infatti dar luogo a segnali CD intrinseci dello stato solido. Questi ultimi tuttavia sono di solito riconoscibili confrontando gli spettri CD registrati allo stato solido e in soluzione, laddove le interazioni intermolecolari scompaiono.

La metodologia ss-CD/TDDFT sopra descritta è stata messa a punto di recente in collaborazione con le Università di Paderborn (Germania) e Debrecen (Ungheria) ed applicata per determinare la CA di diversi composti di origine naturale [16]. Un esempio di applicazione, che consente anche il raffronto diretto con la procedura in soluzione, riguarda i due alcaloidi **2** e **3** (macropodumine B e C) di origine vegetale [16k].

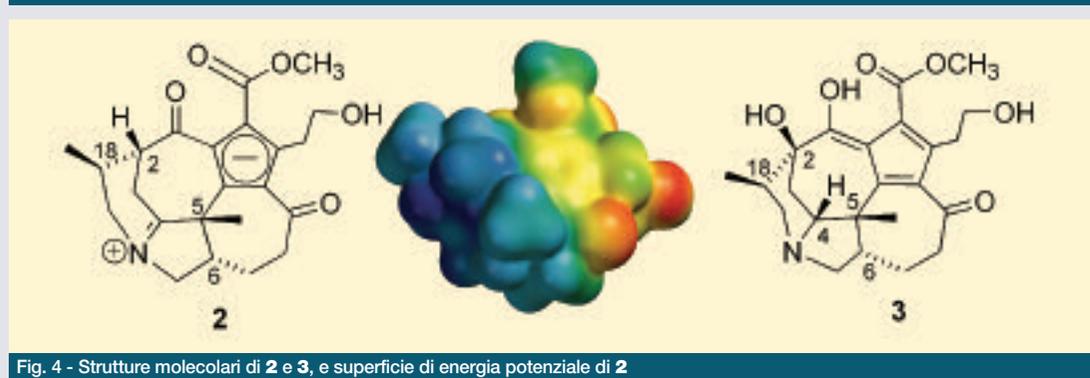
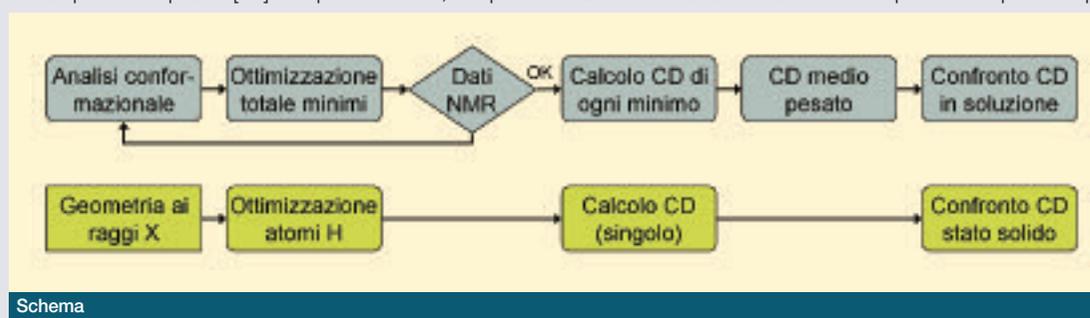


Fig. 4 - Strutture molecolari di **2** e **3**, e superficie di energia potenziale di **2**

Il composto **2**, di cui era stata determinata la struttura (ma non la CA) ai raggi X, presenta uno scheletro praticamente unico tra i prodotti naturali: uno zwitterione (Fig. 4) costituito da un anione ciclopentadienilico e un imminio. Seguendo il tipico schema applicativo della metodologia ss-CD/TDDFT, della geometria dello stato solido sono stati ottimizzati i soli atomi di idrogeno con il metodo DFT. La struttura così ottenuta è stata sottoposta al calcolo TDDFT, che ha fornito un ottimo risultato in termini di accordo con lo spettro CD registrato su una pasticca di **2** in KCl (V. Fig. 5), e ha consentito l'assegnazione della CA quale (2*R*,5*S*,6*S*,18*S*)-**2**. Dell'analogo composto **3** non era invece nota la struttura ai raggi X, e si è quindi sfruttata la procedura relativa allo stato in soluzione. L'analisi conformazionale tramite meccanica molecolare, seguita da ottimizzazioni DFT, ha fornito diversi minimi energetici popolati a 25 °C. I calcoli TDDFT sulle quattro strutture più stabili hanno condotto ad uno spettro medio teorico sufficientemente in accordo con quello sperimentale (Fig. 5), in modo da assegnare la CA quale (2*S*,4*R*,5*S*,6*S*,18*S*)-**3**. Va evidenziato che nel caso dei due composti analoghi **2** e **3**, il metodo ss-CD/TDDFT porta ad un accordo migliore con il dato sperimentale, e quindi ad una assegnazione più sicura della CA, con un notevole risparmio (ca. 4 volte e mezzo) di tempo computazionale.

In conclusione, le più moderne applicazioni del dicroismo circolare nell'UV/Vis permettono l'assegnazione configurazionale di molecole organi-

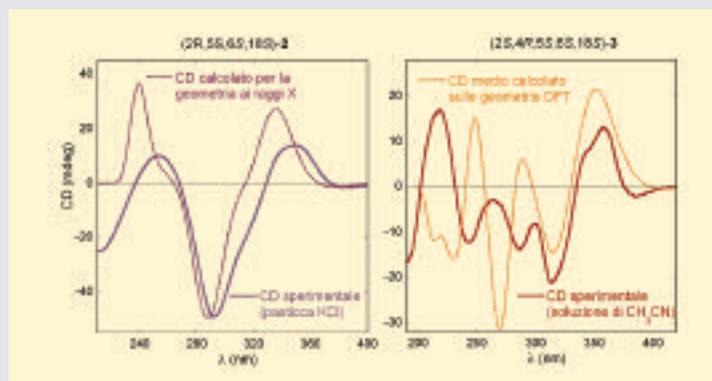


Fig. 5 - Spettri CD sperimentali e calcolati di **2** e **3**

che di medie dimensioni in maniera veloce ed affidabile. È possibile prevedere che l'ulteriore sviluppo informatico consentirà di estendere metodologie simili a quelle descritte a molecole via via più complesse, fino, se possibile, all'applicazione nell'analisi conformazionale di piccole (bio)macromolecole. Infatti, l'impiego tuttora più diffuso dell'ECD è nel campo dello studio della struttura secondaria di polipeptidi e acidi nucleici, un contesto in cui l'analisi è ancora di natura prevalentemente empirica [17].

Ringraziamenti: Si ringraziano Karsten Krohn (Univ. Paderborn), Sándor Antus e Tibor Kurtán (Univ. Debrecen), Wen Zhang (2ª Univ. Medica Militare, Shanghai) e i loro collaboratori.

Bibliografia

- [1] M. Eichelbaum *et al.* (Eds.), *Stereochemical Aspects of Drug Action and Disposition*, Springer, 2003.
- [2] H. Canera *et al.*, *Drug Discov. Today*, 2004, **9**, 105.
- [3] EMEA, Investigation of chiral active substances, 1993, 3CC29a.
- [4] J.M. Seco *et al.*, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 17.
- [5] S. Allenmark, J. Gawronski (Eds.), Special Issue on Determination of Absolute Configuration, *Chirality*, 2008, **20**, 605.
- [6] N. Berova *et al.* (Eds.), *Circular Dichroism: Principles and Applications*, 2nd Ed., Wiley-VCH, 2000.
- [7] N. Berova *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 914.
- [8] a) M.A.L. Marques *et al.* (Eds.), *Time-Dependent Density Functional Theory*, Springer, 2006; b) J.C. Cramer, *Essentials of Computational Chemistry*, 2nd Ed., Wiley, 2004.
- [9] a) C. Diedrich, S. Grimme, *J. Phys. Chem. A*, 2003, **107**, 2524; b) T. Crawford, *Theor. Chim. Acta*, 2006, **115**, 227.
- [10] Per alcune applicazioni recenti: a) J. Frelek *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 6732; b) E. Giorgio *et al.*, 2007, **19**, 434; c) K. Matsumoto *et al.*, *Chem. Asian J.*, 2007, **2**, 1031; d) P.J. Stephens *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2508; e) P.J. Stephens *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 4707; g) Y. Ding *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 9010; h) G. Bringmann *et al.*, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 515; i) S. Tartaglia *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 4865; j) G. Pescitelli *et al.*, *Chirality*, 2008, **20**, 393.
- [11] G. Bifulco *et al.*, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 3744.
- [12] L. Di Bari *et al.*, *Tetrahedron Asymm.*, 2006, **17**, 3430.
- [13] P. Salvadori *et al.*, HPLC-CD: Stereochemical Analysis at Work, in rif. [6], cap. 38, p. 797.
- [14] R. Kuroda *et al.*, *Chirality*, 2000, **12**, 269.
- [15] R. Kuroda *et al.*, *Rev. Sci. Instr.*, 2001, **72**, 3802.
- [16] a) H. Hussain *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 292; b) K. Krohn *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 1123; c) K. Krohn *et al.*, *Chirality*, 2007, **19**, 464; d) H. Hussain *et al.*, *Tetrahedron Asymm.*, 2007, **18**, 925; e) K. Krohn *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 3206; f) J. Dai *et al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 4845; g) Z. Hassan *et al.*, *Tetrahedron: Asymm.*, 2007, **18**, 2905; h) T. Kurtán *et al.*, *Chirality*, 2008, **20**, 379; i) W. Zhang *et al.*, *Chem. Eur. J.*, 2008, **14**, 4913; j) W. Zhang *et al.*, *J. Nat. Prod.*, 2008, **71**, 961; k) Y.-W. Guo *et al.*, *Chirality*, 2008, in stampa.
- [17] a) G.D. Fasman (Ed.), *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, 1996; b) S.M. Kelly, N.C. Price, *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2000, **1**, 349; c) N.J. Greenfield, *Methods Enzymol.*, 2004, **383**, 282.

ABSTRACT

UV/Vis Circular Dichroism: Determination of the Absolute Configuration of Organic Compounds

CD is a powerful tool for stereochemical analysis, especially when associated with modern computational techniques. The comparison between calculated and experimental spectra (in solution or in the solid state) allows the configurational assignment of medium-size organic compounds.