

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

CARATTERIZZAZIONE TRAMITE SPETTROSCOPIA NMR
DI DERIVATI PEPTIDICI A CATENA CORTA

Relatore: Professoressa Miriam Mba Blázquez

Laureando: Sergio Corbetta
1187578

Anno accademico 2021/2022

Sommario

1.	SCOPO DELLA TESI.....	1
2.	INTRODUZIONE.....	2
2.1	SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE.....	2
	Proprietà magnetiche del nucleo	2
	Esperimento NMR.....	3
	Sensibilità esperimenti NMR.....	4
	Spostamento chimico.....	4
	Accoppiamento spin-spin, multipletti e sistemi di spin	4
	Esperimenti NMR monodimensionali: ^1H NMR, ^{13}C NMR e DEPT.....	5
2.2	SPETTROSCOPIA NMR BIDIMENSIONALE	6
	COSY.....	8
	HMQC, HSQC E HMBC.....	10
	NOESY	10
2.3	SPETTROMETRIA DI MASSA A IONIZZAZIONE ELETTRORISPRAY (ESI-MS).....	11
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	13
3.1	ANALISI DELLO SPETTRO ESI-MS.....	13
3.2	ANALISI DEGLI SPETTRI ^1H NMR, COSY E NOESY	14
3.3	ANALISI DEGLI SPETTRI ^{13}C NMR, DEPT-135 E HSQC.....	22
4.	CONCLUSIONI.....	27
5.	BIBLIOGRAFIA	28
6.	PARTE SPERIMENTALE	29
7.	APPENDICE.....	30

1. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di Tesi si pone come obiettivo la caratterizzazione completa di un derivato peptidico a catena corta. A tale scopo, saranno utilizzate in sinergia una serie di tecniche strumentali, in particolare spettrometria di massa e risonanza magnetica nucleare mono- e bidimensionale. Il peso molecolare del composto sarà determinato tramite spettrometria di massa, in particolare utilizzando la ionizzazione elettrospray (ESI-MS). Esperimenti NMR 1D e 2D permetteranno invece di confermare la struttura del composto. In particolare, si utilizzeranno i seguenti esperimenti 2D: esperimenti di correlazione omonucleari ^1H - ^1H COSY (COrrrelated SpectroscopY) e ^1H - ^1H NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement SpectroscopY), accoppiati a esperimenti eteronucleari ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence).

2. INTRODUZIONE

2.1 SPETTROSCOPIA DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

La spettroscopia NMR costituisce lo strumento analitico più importante per il chimico organico. Essa può, in un certo senso, essere considerata come una forma di spettroscopia di assorbimento, anche se non ci si riferirà più al concetto di assorbimento, ma si parlerà di picchi o risonanze.

In generale, un grafico che definisce l'intensità di questi picchi in funzione delle frequenze costituisce uno spettro NMR.

In particolare, la spettroscopia NMR si basa sull'interazione di radiazione elettromagnetica delle radiofrequenze con molecole immerse in un campo magnetico.

Proprietà magnetiche del nucleo

Il concetto di spin nucleare descrive l'accoppiamento fra momento angolare intrinseco e momento magnetico del nucleo stesso. Esso può essere descritto dal numero quantico di spin I , il quale può assumere valori interi o semi-interi e determina il numero di orientazioni $(2I+1)$ che il nucleo può assumere in presenza di un campo magnetico esterno.

Affinché un nucleo sia NMR attivo, deve presentare un valore di spin che sia diverso da zero, ma quelli più comunemente studiati sono caratterizzati da un valore di spin uguale a $\frac{1}{2}$ come ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P (nuclei con $I \geq 1$ hanno una distribuzione della carica non sferica).

Per un nucleo con numero quantico di spin $=1/2$ immerso in un campo magnetico esistono due orientazioni possibili che danno luogo ai livelli energetici α e β , chiamati anche stati di spin, a seconda che la sua orientazione sia parallela o antiparallela rispetto al campo (Figura 1). La loro differenza energetica è

$$\Delta E = \frac{h\gamma}{2\pi} B_0,$$

dove h è la costante di Planck, γ è la costante giromagnetica del nucleo e B_0 è il campo magnetico esterno applicato. Dunque si può indurre una transizione di spin applicando una radiazione a una frequenza uguale a quella associata a questa separazione energetica, nota come frequenza di Larmor:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

dove ν è la frequenza di Larmor, γ è la costante giromagnetica del nucleo e B_0 è il campo magnetico esterno applicato.

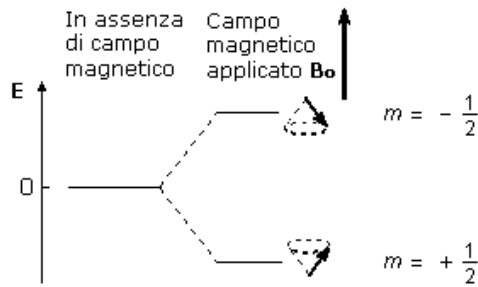


Figura 1-Separazione dei livelli energetici per un nucleo con numero quantico di spin=1/2

In generale, la popolazione dello stato α è maggiore, dunque si crea un vettore di magnetizzazione M_0 lungo l'asse z allineato a B_0 . In condizioni di equilibrio, M_0 precessa attorno all'asse di B_0 . La frequenza del moto di precessione è la frequenza di Larmor.

Differentemente dalle altre tecniche spettroscopiche, la frequenza della transizione non dipende più solo dalla molecola, ma anche dal campo magnetico applicato. Si rendono quindi necessari dei valori di ν e B_0 tali che il loro rapporto sia uguale a $\gamma/2\pi$. In questo caso il sistema si dice “in risonanza” e si parlerà dunque di risonanza magnetica nucleare.

Esperimento NMR

Per quanto riguarda la registrazione di uno spettro NMR, il metodo classico è quello pulsato a Trasformata di Fourier. Il campione da analizzare è posto in una sonda (detta probe), immerso in un campo magnetico omogeneo e irradiato con un impulso di energia delle radiofrequenze ortogonale al campo magnetico.

Di conseguenza, tutti i nuclei di un determinato tipo si ecciteranno e il vettore di magnetizzazione M_0 cambierà direzione dall'asse z al piano xy.

Successivamente avviene il processo di rilassamento, ossia il ripristino delle condizioni di equilibrio con il vettore di magnetizzazione che tende a tornare a direzionarsi lungo l'asse z tramite un moto di precessione attorno a B_0 creando una corrente nella bobina del ricevitore del probe NMR (il ricevitore è nel piano xy, dunque rileva solo la proiezione di M_0 in quel piano). La corrente genererà un segnale in funzione del tempo, caratterizzato da una forma ad onda sinusoidale a decadimento esponenziale (FID). Questo segnale, attraverso la Trasformata di Fourier darà origine allo spettro NMR nel dominio delle frequenze (Figura 3)

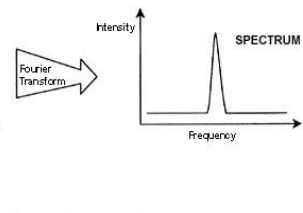
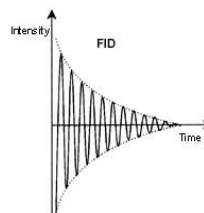
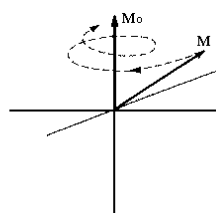
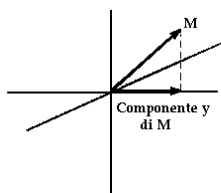
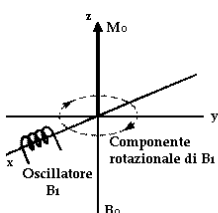


Figura 2-Evoluzione del vettore di magnetizzazione

Figura 3-Trasformata di Fourier

Sensibilità esperimenti NMR

La sensibilità di un esperimento NMR è definita dal rapporto segnale/rumore di un FID (o di uno spettro). Essa può essere migliorata, e dunque incrementato questo rapporto, aumentando il numero di spin del campione (aumentandone quindi la concentrazione).

Altri metodi per migliorare la sensibilità sono l'aumento del numero di scansioni e la diminuzione di temperatura (si riduce il rumore termico e aumenta la polarizzazione degli spin nucleari in accordo con la distribuzione di Boltzmann).

Spostamento chimico

Dall'equazione della frequenza di Larmor apparentemente tutti i nuclei di un determinato tipo (ad esempio tutti i nuclei ^1H) risuonano a una sola frequenza per un dato B_0 . In realtà, la frequenza di risonanza di un nucleo dipende dal suo intorno chimico e, per tanto, nuclei con diversi intorni chimici risuonano a frequenze diverse. L'origine di questa differenze sta nella struttura elettronica della molecola, la densità elettronica intorno al nucleo va a creare campi magnetici locali che si oppongono al campo magnetico applicato, schermano il nucleo di un fattore di schermo σ e per tanto il campo magnetico effettivo "sentito" dal nucleo (B_{eff}) è minore di B_0 . L'equazione di Larmor diventa quindi:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1-\sigma)$$

dove σ è la costante di schermo.

Le differenze nelle frequenze di risonanza di nuclei in intorni chimici diversi vengono definite come spostamenti chimici (*chemical shift*). Essendo lo spostamento chimico una differenza, è necessaria una frequenza di riferimento rispetto alla quale misurare questa differenza. Come sostanza di riferimento per nuclei ^1H e ^{13}C si utilizza il tetrametilsilano (TMS). Queste differenze di frequenza sono estremamente piccole e dipendono inoltre dal valore di campo magnetico applicato B_0 . Per ovviare a questi problemi è stato definito lo spostamento chimico δ espresso in ppm

$$\delta \text{ (ppm)} = (\nu - \nu_{\text{ref}}) / \nu_0$$

dove $(\nu - \nu_{\text{ref}})$ è la differenza di frequenza in Hz tra il nucleo di interesse e la frequenza di riferimento, mentre ν_0 è la frequenza di lavoro dello spettrometro in MHz. L'utilità nell'utilizzo della scala dei chemical shift risiede nel fatto che δ è espresso in ppm ed è dunque indipendente dal campo magnetico.

Accoppiamento spin-spin, multipletti e sistemi di spin

In generale per accoppiamento di spin si intende che l'energia associata a ciascuno spin dipende dallo stato (α o β) di un altro nelle vicinanze. Solitamente questo perde importanza e diventa trascurabile oltre il terzo legame.

La differenza di frequenza (misurata in Hz) tra due picchi è proporzionale alla forza dell'accoppiamento e viene indicata con J , detta *costante di accoppiamento*.

In un multipletto, il numero di picchi è dato dal numero di protoni vicini accoppiati con stesse costanti di accoppiamento; la molteplicità di spin sarà pertanto pari a $n+1$ (n indica il numero di protoni vicini che si accoppiano).

Le intensità relative dei picchi di un multipletto sono dettate dal triangolo di Tartaglia.

Gli spin di una molecola che si accoppiano tra loro vanno a costituire un sistema di spin, che viene isolato da altri per esempio a causa della presenza di un eteroatomo o di carboni quaternari.

Esperimenti NMR monodimensionali: ^1H NMR, ^{13}C NMR e DEPT

L'esperimento NMR al protone rappresenta la più importante e più utilizzata tecnica di spettroscopia NMR.

L'acquisizione avviene sul protone, applicando un impulso di 90° rispetto al campo magnetico e ripetendo più volte questa sequenza, in modo tale da ottenere un miglior rapporto segnale/rumore e migliorare quindi la sensibilità dell'esperimento.

Un'altra tipologia di spettroscopia NMR largamente utilizzata è quella al ^{13}C . Questo tipo di spettroscopia presenta però dei problemi. Per prima cosa il ^{13}C presenta un'abbondanza relativa e un rapporto giromagnetico piuttosto ridotti. Dopodiché, a causa dell'abbondanza dell'isotopo ^1H , i picchi del ^{13}C mostrano chiaramente l'effetto dell'accoppiamento con i protoni.

Per ovviare a questo problema, si ricorre quindi al disaccoppiamento protonico a banda larga (tramite irraggiamento e saturazione dei protoni legati) e ne risulta uno spettro caratterizzato da un picco sottile per ogni atomo di carbonio chimicamente non equivalente presente nel campione.

Una conseguenza del disaccoppiamento protonico è la perdita di correlazione tra il valore dell'integrazione dei picchi e il numero di atomi di carbonio. Questo è dovuto in primo luogo a un processo di rilassamento estremamente variabile per carboni in gruppi funzionali diversi, e in secondo luogo all'aumento di intensità per effetto NOE (*nuclear overhauser effect*) di picchi relativi a carboni legati a protoni.

Dunque per ottenere informazioni riguardo la molteplicità dei segnali di ^{13}C si ricorre agli esperimenti DEPT. Questi sono caratterizzati da un valore variabile di angolo dell'impulso, che viene impostato a 90° per un esperimento e a 135° per l'altro. Nel DEPT 135 vengono rivelati i segnali dei CH_3 e CH come positivi e quelli dei CH_2 come negativi. Nel DEPT 90 invece vengono rivelati solo i gruppi CH . In generale gli esperimenti DEPT non rivelano i carboni quaternari, ma è comunque possibile risalirvi per differenza da un classico spettro ^{13}C (Figura 4).

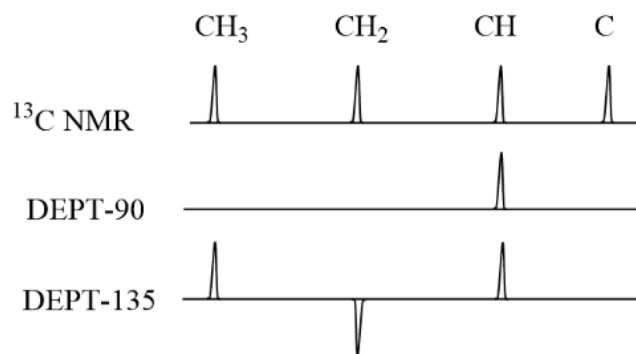


Figura 4-Spettri ^{13}C NMR, DEPT-90 e DEPT-135 messi a confronto

2.2 SPETTROSCOPIA NMR BIDIMENSIONALE

Uno spettro NMR monodimensionale (per esempio al protone) è in realtà un grafico bidimensionale, ma viene definito in questo modo visto che si riferisce a un'unica dimensione rilevante (la frequenza). L'asse delle frequenze è inoltre correlato al tempo di acquisizione del FID attraverso la trasformata di Fourier. Dunque, in un certo senso, si può dire che in un esperimento monodimensionale l'ascissa è espressa in unità di tempo.

L'NMR bidimensionale invece è, almeno a livello teorico, un grafico a tre dimensioni, ma convenzionalmente si omette l'intensità e si considerano due frequenze che vanno quindi a generare un grafico che può essere definito bidimensionale.

In uno spettro bidimensionale, essendo questo riferito a due frequenze, si rendono necessarie due trasformate di Fourier ortogonali fra loro su due assi dei tempi indipendenti, in modo tale da ottenere due assi delle frequenze perpendicolari fra loro.

Se si considera una sequenza a due impulsi (il secondo è quello a 90° , ortogonale a B_0) e si inserisce un tempo di evoluzione tra i due impulsi, si può variare questo intervallo in una serie di esperimenti monodimensionali e sommando i FID risultanti, si ottengono le basi per un esperimento bidimensionale.

Si nota dunque che in questo caso, la magnetizzazione evolve in due intervalli differenti: nel periodo di evoluzione (t_1) e in quello di acquisizione (t_2) (Figura 5). La prima serie di trasformate di Fourier produce il secondo asse delle frequenze ν_2 , invece ruotando i dati di 90° e effettuando un'ulteriore trasformata di Fourier si ottiene il primo asse delle frequenze ν_1 . Dunque in generale in tutti gli esperimenti bidimensionali viene rivelato un segnale durante l'acquisizione in funzione di t_2 che, però, è stato modulato in funzione di t_1 .

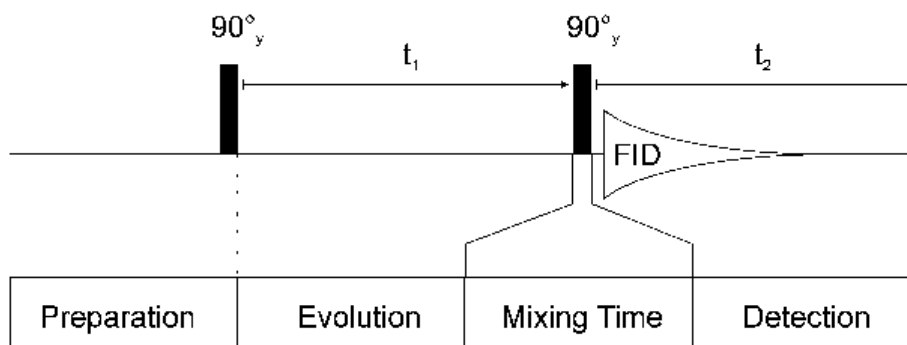


Figura 5-Sequenza di impulsi per un esperimento NMR bidimensionale

Per ottenere informazioni utili è necessario che, nell'esperimento, la magnetizzazione evolva con frequenze diverse durante t_1 e t_2 , in modo tale da ottenere valori di ν_1 e ν_2 differenti, dando origine a picchi fuori diagonale detti "picchi di correlazione".

Sintetizzando dunque il concetto di spettroscopia di correlazione, in uno spettro NMR bidimensionale, ogni picco definisce due frequenze di risonanza, mettendo dunque in correlazione i due nuclei che risuonano a quelle frequenze. Il significato della correlazione dipende dal particolare tipo di esperimento che si sta effettuando.

Nella seguente tabella sono stati riassunti gli esperimenti NMR bidimensionali più importanti con indicato il tipo di correlazione relativo a ciascuno di essi:

Tabella 1-Principali esperimenti NMR bidimensionali

SIGLA	NOME ESTESO	CORRELAZIONE
COSY	COrrelationSpettroscopY	Accoppiamento scalare omo-correlato
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence	accoppiamento scalare etero-correlato ^1H - ^{13}C
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence	accoppiamento scalare etero-correlato ^1H - ^{13}C a lunga distanza
HSQC	Heteronuclear Single Bond Coherence	accoppiamento scalare etero-correlato ^1H - ^{13}C
TOCSY	TOtalCOrrelationSpettroscopY	Accoppiamento scalare omo-correlato a lunga distanza
NOESY	NuclearOverhauserEffectSpettroscopY	Accoppiamento dipolare omo-correlato

COSY (correlazione ^1H - ^1H)

La sequenza di impulsi per un esperimento ^1H - ^1H COSY è data da due impulsi a 90° sul canale del protone, separati da un tempo di evoluzione t_1 , sistematicamente incrementato, e un tempo di acquisizione t_2 . Tuttavia, negli spettrometri più avanzati, le sequenze di impulsi sono regolate da una tecnica di *phase cycling*, ossia una variazione ciclica di fase, nella quale la fase dell'impulso varia in modo regolare per ogni incremento del tempo di evoluzione.

In generale, negli spettri che risultano da questo esperimento, si ottengono dei picchi fuori diagonale, ossia dei picchi di correlazione, solo per i protoni caratterizzati da un significativo accoppiamento spin-spin (Figura 6). Dunque sono proprio questi a fornirmi informazioni utili indicando i protoni accoppiati (sono disposti simmetricamente su entrambi i lati della diagonale). In generale, per l'analisi di uno spettro COSY è necessario individuare i picchi di correlazione (disposti simmetricamente) con coordinate α_1, α_2 e α_2, α_1 . Questi indicano che i protoni con chemical shift α_1 e α_2 accoppiano fra loro.

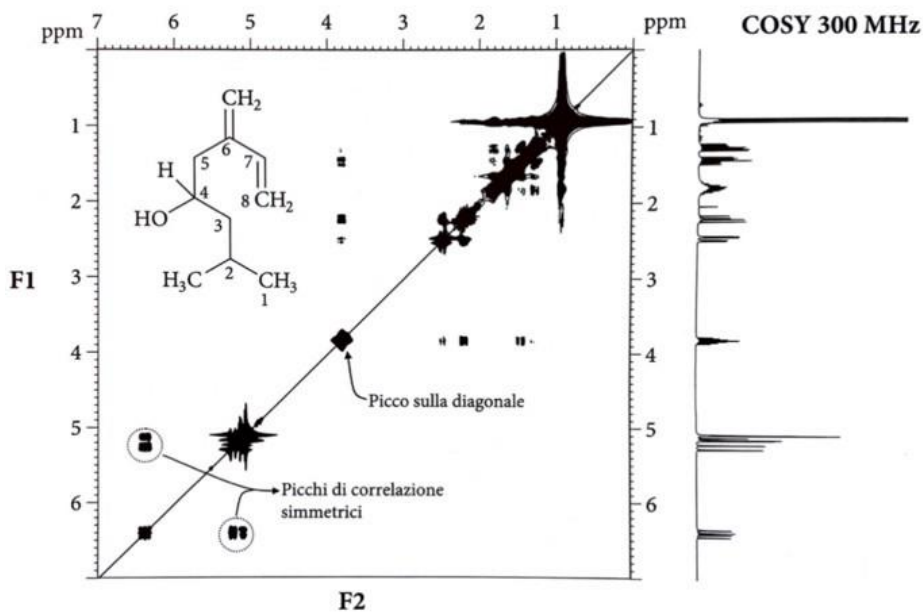


Figura 6-Spettro COSY dell'ipenolo

Un' importante variante nell'esperimento COSY è data dal DFQ COSY (double quantum filtered) nel quale si addiziona un ulteriore impulso immediatamente dopo il secondo in modo da filtrare ed eliminare le transizioni a singolo quanto. In questo modo rimangono solamente le transizioni almeno a doppio quanto, quindi date da sistemi con almeno due spin (minimo sistemi AB o AX) riducendo così i singoletti metilici (Figura 7).

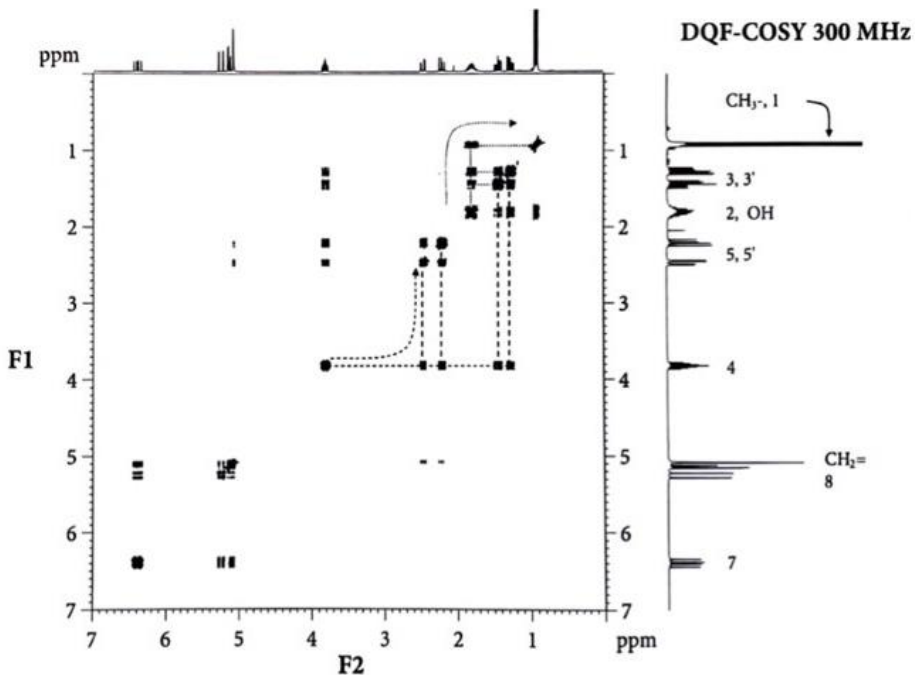


Figura 7-Spettro DFQ-COSY ipenolo

HMQC, HSQC E HMBC (correlazione ^1H - ^{13}C)

Questo esperimento prevede una rivelazione sul canale del protone, dunque sarà il nucleo di ^1H ad essere eccitato e rivelato, ossia quello con il valore di γ maggiore e con conseguente maggiore sensibilità. E' però necessario che vengano soppressi i segnali di protoni non direttamente accoppiati al ^{13}C , e si ricorre quindi a un gradiente a campo pulsato che permette la soppressione di questi segnali senza impiegare cicli di fase aggiuntivi. In generale l'esperimento HMQC, è caratterizzato da una sequenza di 4 impulsi come mostrato nella Figura 8.

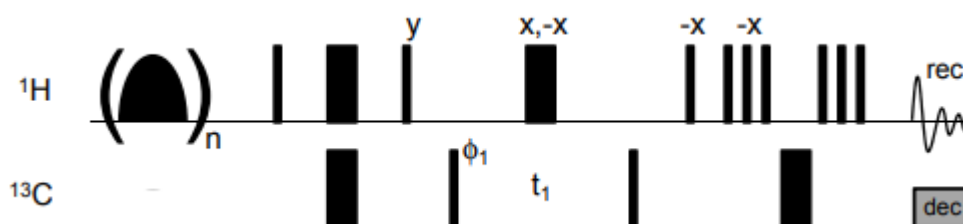


Figura 8-Sequenza di impulsi per un esperimento HMQC

Lo spettro risultante da questo esperimento è dato da un asse F_1 derivante dal tempo di evoluzione incrementale t_1 che costituisce lo spettro del carbonio, e da un asse F_2 derivante dal tempo di acquisizione t_2 che costituisce lo spettro del protone. Un picco di correlazione indica che il protone di frequenza F_2 è legato al nucleo di carbonio di frequenza F_1 .

Lo stesso tipo di informazione può essere ottenuta anche dalla variante a singolo quanto HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), con l'unica differenza che in questo esperimento varia solo la magnetizzazione relativa al ^{13}C (nell'HMQC può variare sia quella relativa al carbonio che quella relativa al protone).

Un importante variante dell'esperimento HMQC è l'esperimento HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) analogo al precedente, ma in grado di rivelare accoppiamenti anche a due o tre legami di distanza, fornendo quindi uno spettro molto dettagliato ed estremamente diagnostico.

NOESY

L'esperimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpettroscopY) ^1H - ^1H è l'analogo bidimensionale dell'esperimento NOE ^1H - ^1H . Questo deriva dal rilassamento incrociato che coinvolge coppie di spin e si basa su un'interazione dipolare tra le suddette.

Il NOE avviene per irraggiamento di un picco corrispondente a un determinato protone e, di conseguenza, i picchi relativi a protoni vicini a quello irraggiato aumentano d'intensità. Dunque l'esperimento NOESY è utile a correlare protoni vicini attraverso lo spazio (solitamente con una distanza fino a circa 4.5 Å).

In generale l'aspetto di uno spettro NOESY è simile al COSY, tant'è che spesso hanno segnali in

comune, ma la differenza principale è data dal fatto che nel NOESY viene applicato uno spin-lock durante il tempo di mescolamento.

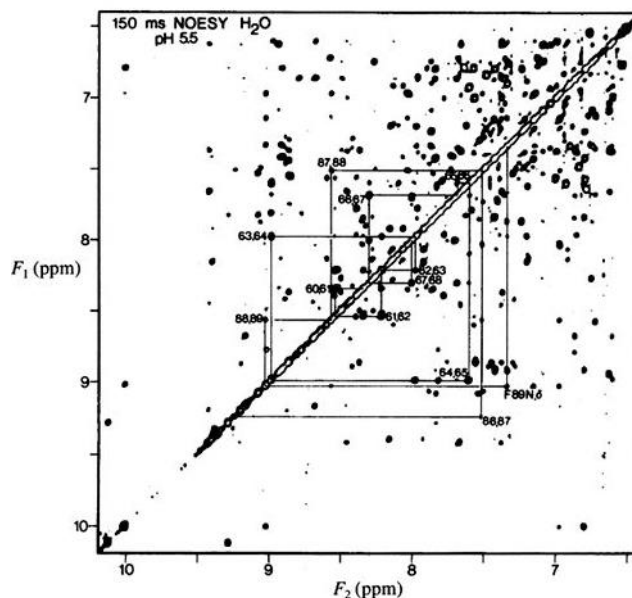


Figura 9-Spettro NOESY Tioredossina

2.3 SPETTROMETRIA DI MASSA A IONIZZAZIONE ELETTROSPRAY (ESI-MS)

La spettrometria di massa è una tecnica analitica utilizzata per identificare sostanze e si basa sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica.

Affinché questo sia possibile, è necessario che la sostanza venga prima ionizzata. Nella tecnica ESI-MS, la modalità di ionizzazione è quella dell'elettrospray.

In questa tecnica, il campione entra nella sorgente ionica tramite un capillare (con l'estremità tenuta ad alto potenziale) circondato da gas nebulizzante (Figura 10). Quando la soluzione fuoriesce dal capillare si forma un aerosol di goccioline cariche elettricamente. A questo punto, la corrente di gas nebulizzante dirige il flusso verso lo spettrometro. Man mano che il solvente evapora, le goccioline diminuiscono di volume concentrando gli ioni del campione, fino a che si raggiunge un punto critico di repulsione elettrostatica che dà vita all'*esplosione coulombiana*. Gli ioni del campione vengono quindi rilasciati in fase vapore per venire poi focalizzati all'analizzatore da degli specifici orifizi di campionamento.

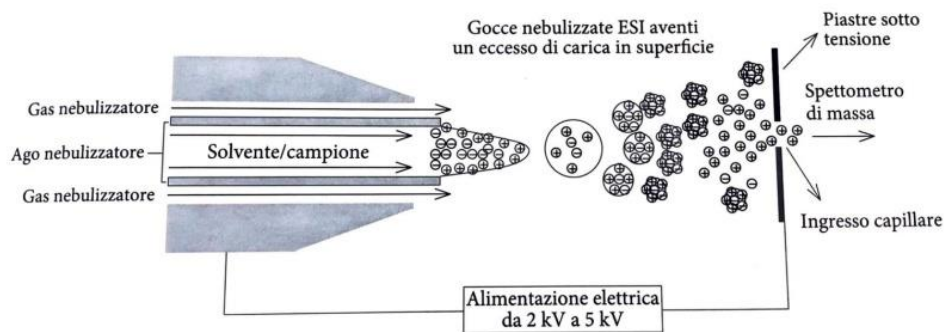


Figura 10-Schema che mostra l'evaporazione del solvente da cui si generano i singoli ioni in uno ESI-MS

La tecnica ESI è un metodo semplice ed efficace, che si presta molto bene all'analisi di peptidi e proteine, alla loro identificazione e alla determinazione della loro massa molecolare. Nel caso delle proteine, spesso si formano ioni a carica multipla che vengono quindi registrati a valori di massa apparente pari a $1/z$.

Risulta inoltre particolarmente adatto alla loro analisi dato che, essendo in generale i peptidi poco volatili, è difficile ricorrere alla più comune ionizzazione per impatto elettronico.

L'elettrospray è anche una tecnica di ionizzazione soft, dunque sarà ben visibile il picco molecolare, utile per determinare comodamente la massa molecolare del composto in esame.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo lavoro di tesi verrà caratterizzato il peptide **1** (Figura 11) tramite ESI-MS e diversi esperimenti di spettroscopia NMR (sia monodimensionali che bidimensionali).

In particolare, si tratta di un pentapeptide costituito da tre differenti amminoacidi, ossia alanina, lisina e fenilalanina, disposti secondo la sequenza Ala-Lys-Phe-Lys-Ala. Il peptide **1** è inoltre stato acetilato nell'estremità N-terminale e amidato nel C terminale.

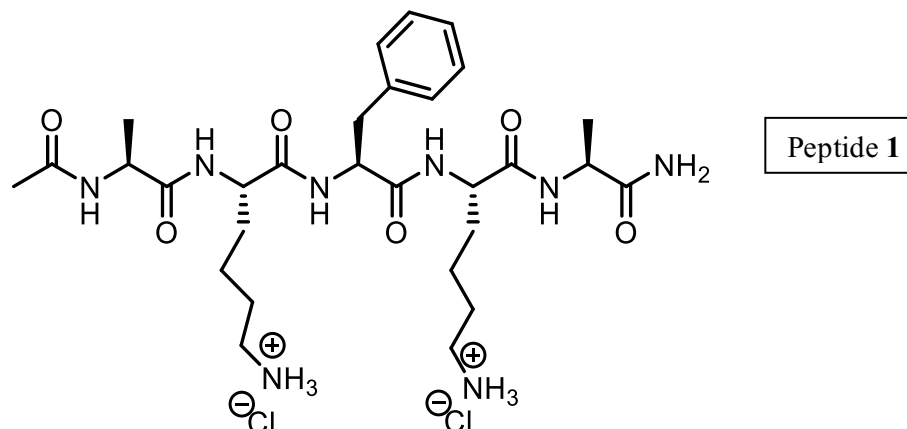


Figura 11-Struttura della catena peptidica

3.1 ANALISI DELLO SPETTRO ESI-MS

Lo spettro di massa del peptide **1** mostra 4 picchi (Figura 12). Il picco a m/z 605.4 è dato dallo ione $[M+H]^+$, mentre il picco a m/z 303.2 è dato dallo ione $[M+2H]^{2+}$. I picchi a m/z 627.3 e m/z 643.3 sono originati rispettivamente dagli addotti con Na^+ ($[M+Na]^+$) e K^+ ($[M+K]^+$).

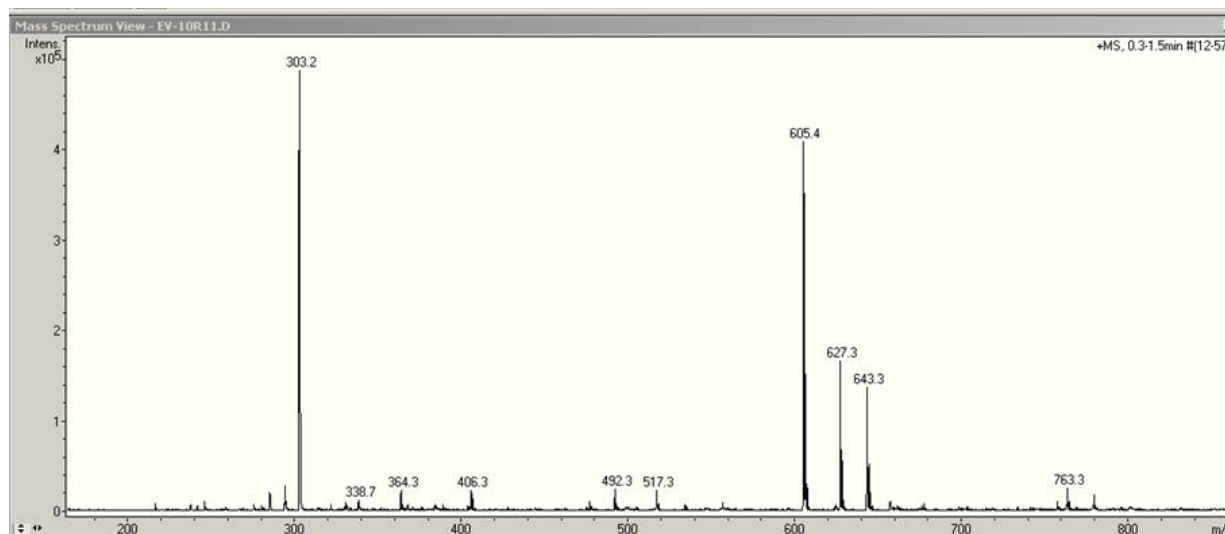


Figura 12- ESI-MS del peptide **1**

3.2 ANALISI DEGLI SPETTRI ^1H NMR, COSY E NOESY

Negli esperimenti NMR, per eseguire una chiara assegnazione, è necessario poter distinguere, in termini di nomenclatura, i diversi atomi che compongono la molecola. In generale, per quanto riguarda gli amminoacidi, è bene usare la nomenclatura standard: la posizione adiacente al carbonio carbonilico e al gruppo amminico è indicata come α . Allontanandosi da questa le posizioni vengono definite con le lettere greche successive (β , γ , δ ed ϵ saranno sufficienti per il peptide **1**) (Figura 12).

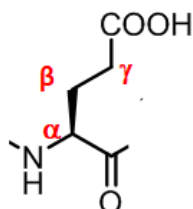


Figura 12-Nomenclatura standard degli amminoacidi

Per quanto riguarda uno spettro ^1H NMR, le assegnazioni avvengono con l'ausilio di alcune tabelle che indicano delle regioni specifiche nelle quali appaiono i protoni di diversi gruppi funzionali. In queste tabelle, le regioni sono indicate prendendo come standard di riferimento il TMS (tetrametilsilano $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$) (Figura 13).

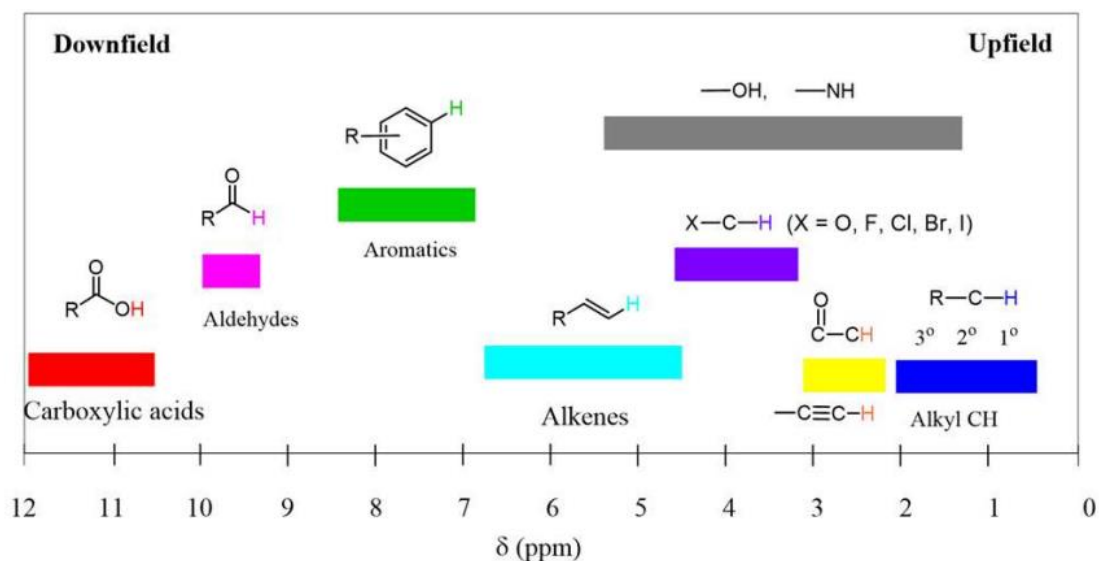


Figura 13-Tabella chemical shift ^1H -NMR

In Figura 14 è riportato lo spettro ^1H -NMR del peptide **1** registrato a 500 MHz in dimetilsolfossido esadeuterato (DMSO-d_6), nel quale è stata estromessa la zona a chemical shift superiori a 9 ppm in quanto priva di segnali diagnostici.

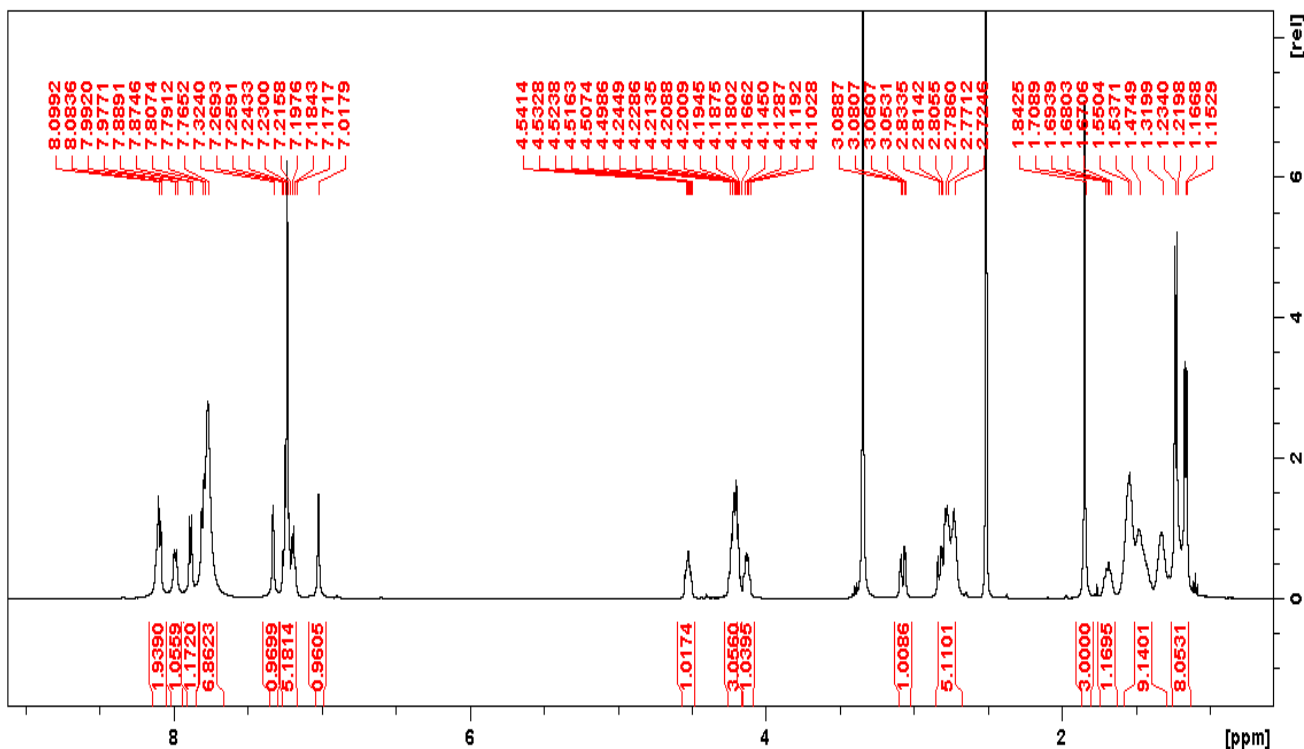


Figura 14-Spettro 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) peptide 1

Nell'analisi dello spettro, si possono subito notare delle regioni principali all'interno delle quali si troveranno dei picchi dovuti a un determinato tipo di protoni. Basandosi sulle informazioni date dallo spettro, in particolare spostamenti chimici, integrali e molteplicità dei segnali è possibile fare subito delle assegnazioni (non verranno considerati i segnali a 2.5 ppm e 3.3 ppm in quanto relativi a, rispettivamente, DMSO e acqua).

In particolare, nella zona a spostamenti chimici più elevati (Figura 15) è possibile distinguere i doppietti dei protoni ammidici intorno tra 8.15 e 7.80 ppm e il multipletto relativo ai cinque protoni aromatici tra 7.25 e 7.15 ppm. I 6 protoni relativi agli NH₃ delle catene delle lisine appaiono come un singoletto largo a circa 7.75 ppm e i protoni ammidici del C terminale a 7.32 e 7.01 ppm.

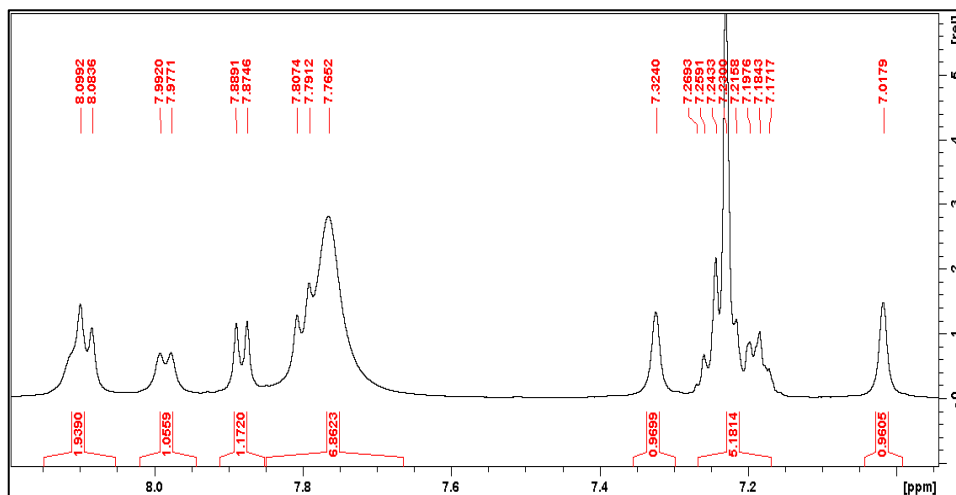


Figura 15-Ingrandimento regione 8.2-6.9 ppm spettro 1H NMR

Nella zona tra 4 e 4.5 ppm sono presenti i segnali dovuti ai cinque protoni legati ai C $_{\alpha}$ degli amminoacidi. Si tratta in particolare di tre segnali, dove il più deschermato è dovuto all'H $_{\alpha}$ della fenilalanina (deschermato dall'anello aromatico).

Tra 2,60 e 3,20 ppm (Figura 16) saranno presenti i segnali dovuti ai protoni delle catene laterali deschermati dalla presenza di gruppi elettron attrattori. Qui ci si aspetta di trovare i due protoni in β della fenilalanina e i quattro protoni ϵ delle due lisine. In particolare, i due protoni metilenici in β della fenilalanina essendo adiacenti ad un centro chirale, sono diastereotopici e dunque accoppiano tra di loro con una costante di accoppiamento geminale (2J) e accoppiano anche con il protone legato al C $_{\alpha}$ con una costante di accoppiamento vicinale (3J), originando dunque un sistema di spin ABX. Uno dei protoni β dà un segnale a 3.08 ppm, l'altro origina il segnale a 2.81 ppm, parzialmente sovrapposto al multipletto dei protoni ϵ delle lisine. I restanti protoni in posizione β , γ e δ delle lisine, non essendo deschermati, appaiono sotto 1.7 ppm, mentre il metile del gruppo acetile dà un singoletto a 1.843 ppm. Per quanto riguarda i due doppietti, visibili a circa 1.2 ppm, saranno relativi ai protoni dei CH $_3$ in β delle due alanine.

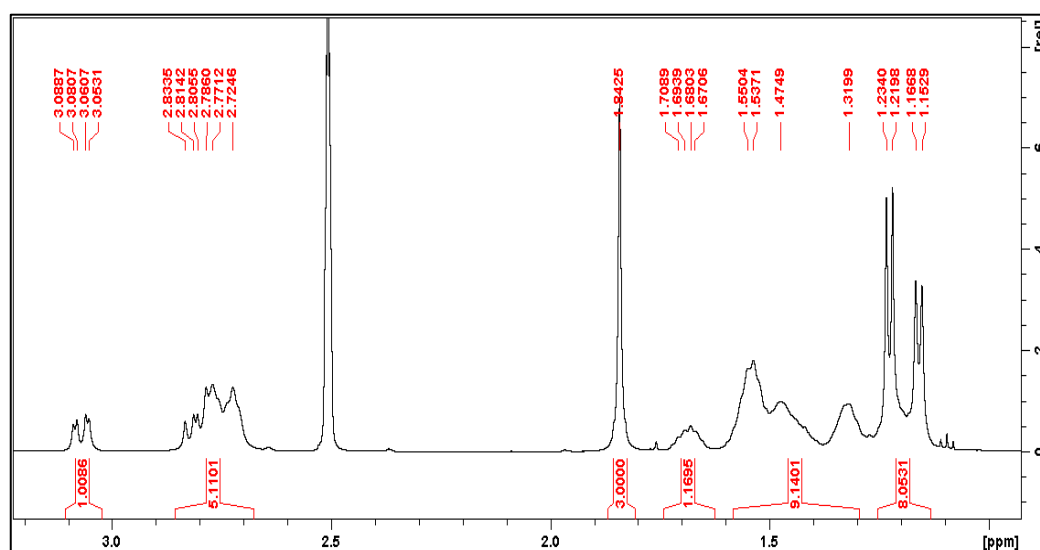


Figura 16-Ingrandimento regione $\delta < 3.2$ ppm spettro 1H NMR

Tabella 2-Tabella di assegnazione 1H-NMR

<i>Chemicalshift (ppm)</i>	<i>Molteplicità</i>	<i>Costante di accoppiamento (Hz)</i>	<i>Integrale</i>	<i>Assegnazione</i>
8.091	d	$^3J=7.8$	2	2*NH ammidico
7.985	d	$^3J=7.45$	1	NH ammidico
7.882	d	$^3J=7.25$	1	NH ammidico
7.807-7.765	m		7	NH ammidico 2*NH ₃ Lys
7.324	s		1	NH ₂ terminale
7.269-7.172	m		5	H aromatici Phe
7.018	s		1	NH ₂ terminale
4.541-4.499	m		1	H _α Phe
4.245-4.166	m		3	H _α
4.145-4.103	m		1	H _α
3.070	dd	$^3J=4.0$ $^2J=13.95$	1	H _β Phe (diasterotopico)
2.833-2.725	m		5	H _β Phe (diasterotopico) 4H _ε Lys
1.843	s		3	acetile
1.709-1.671	m		1	H _β Lys (diasterotopico)
1.550-1.475	m		9	H Lys
1.194	dd	$^3J=7.1$ $^3J=6.95$	8	2*CH ₃ β Ala H Lys

In conclusione, l'analisi dello spettro ¹H-NMR è risultata utile per fare delle prime assegnazioni e distinzioni, ma non è sufficiente per determinare tutti i segnali. In particolare, non permette di assegnare i protoni ammidici degli amminoacidi e di distinguere i protoni legati ai carboni α delle Lys e Ala.

A questo punto risulta utile implementare l'analisi del peptide **1** con degli esperimenti bidimensionali.

Passando quindi all'analisi dello spettro COSY, l'esperimento mostra la correlazione tra chemical shift di protoni accoppiati scalarmente, permettendo dunque di riconoscere i diversi sistemi di spin. Questo risulta molto utile dal momento che ogni amminoacido presenta un sistema di spin indipendente, e la possibilità di identificarlo consente di fare delle distinzioni tra i segnali e di ottenere delle conferme per quanto riguarda i segnali già assegnati.

In Figura 17 è riportata la struttura del peptide **1** con indicati gli accoppiamenti attesi nello spettro COSY.

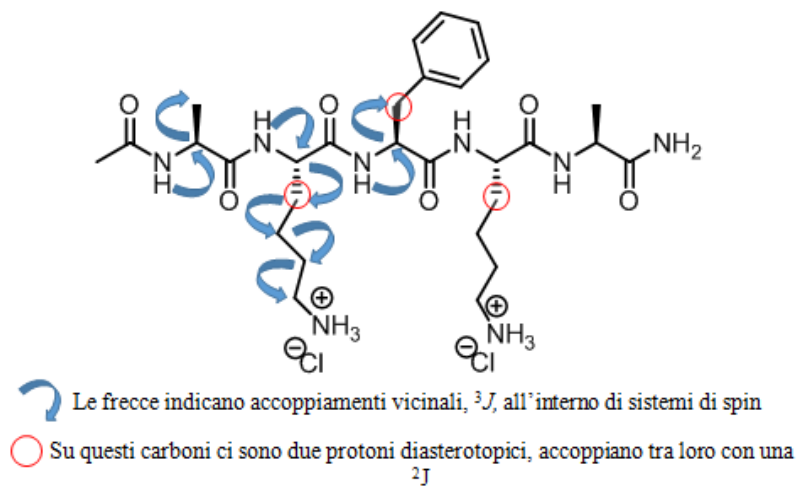


Figura 17-Accoppiamenti attesi nello spettro COSY

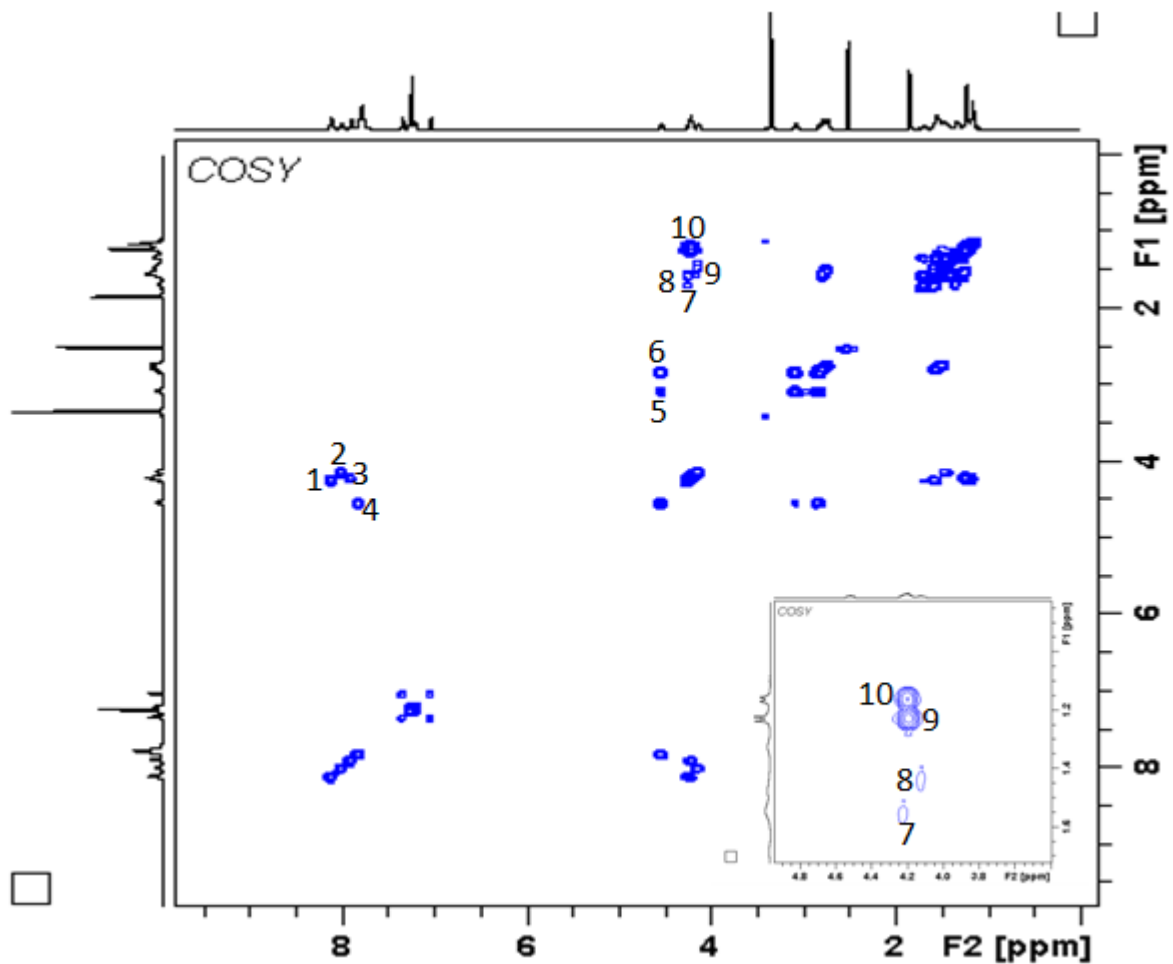


Figura 18-Spettro COSY (500 MHz, DMSO-d6) del peptide 1

Ci si aspetta dunque di osservare l'accoppiamento tra i protoni α e i protoni diastereotopici β di Phe (sistema ABX) che permetterà di assegnare inequivocabilmente i segnali di questo sistema. Una volta noto questo segnale è possibile riconoscere anche il protone ammidico della Phe, in quanto

dovranno mostrare un picco di correlazione.

Nello specifico, tutti gli accoppiamenti osservati sono illustrati nella Tabella 3.

I picchi di correlazione 4, 5, 6 e 12 ci permettono identificare tutti i protoni del sistema di spin della fenilalanina. Partendo dai due doppietti dei protoni metilici delle alanine, i picchi di correlazione 10 e 11 ci indicano che i due H α delle due alanine sono nel multipletto a 4.24-4.17 ppm, insieme all'H α di una delle lisine (picco di correlazione 8). Questi H α hanno picchi di correlazione con i corrispondenti protoni ammidici (picchi 1 e 3) che ci permettono di dire che le due alanine e una delle lisine danno un segnale NH a circa 8.08 (2H) e un altro a 7.88 (1H), anche se non è possibile nessuna assegnazione più specifica. L'H α della lisina restante dà un multipletto tra 4.15-4.10 ppm (picco di correlazione 9) e il suo NH da un doppietto a 7.99 ppm (picco di correlazione 2), tuttavia non possiamo determinare se si tratta della lisina in posizione 2 o 4 della catena peptidica.

Tabella 3-Tabella di assegnazione dei picchi di correlazione COSY

<i>Picco</i>	<i>Coordinata F₁</i> <i>(ppm)</i>	<i>Coordinata F₂</i> <i>(ppm)</i>	<i>Correlazione</i>
1	4.20	8.09	NH-H α
2	4.11	7.97	NH-H α
3	4.20	7.88	NH-H α
4	4.50	7.80	NH-H α Phe
5	3.07	4.53	H α -H β Phe
6	2.80	4.53	H α -H β Phe
7	1.69	4.23	H α -H β Lys
8	1.55	4.23	H α -H β Lys
9	1.44	4.13	H α -H β Lys
10	1.21	4.21	H α -H β Ala
11	1.15	4.21	H α -H β Ala
12	2.80	3.01	H β -H β Phe
13	1.55	2.78	H ϵ -H δ Lys

Tuttavia, non è ancora possibile fare la assegnazione completa dei picchi per i protoni ammidici e protoni α delle due lisine e delle due alanine. A questo punto si può ricorrere a un ulteriore esperimento di correlazione che può risultare utile nelle assegnazioni, ossia il NOESY.

Il NOESY mostra dei picchi di correlazione tra protoni che sono vicini nello spazio, di conseguenza molti picchi saranno presenti anche nel COSY. Può quindi essere comodo sovrapporre gli spettri e concentrarsi sulle correlazioni esclusive del NOESY, in modo da dedurre quali sono i protoni vicini nello spazio, ma che non accoppiano.

In Figura 19 sono illustrati le correlazioni più importanti attese nello spettro e dalle quali si possono ricavare informazioni strutturali.

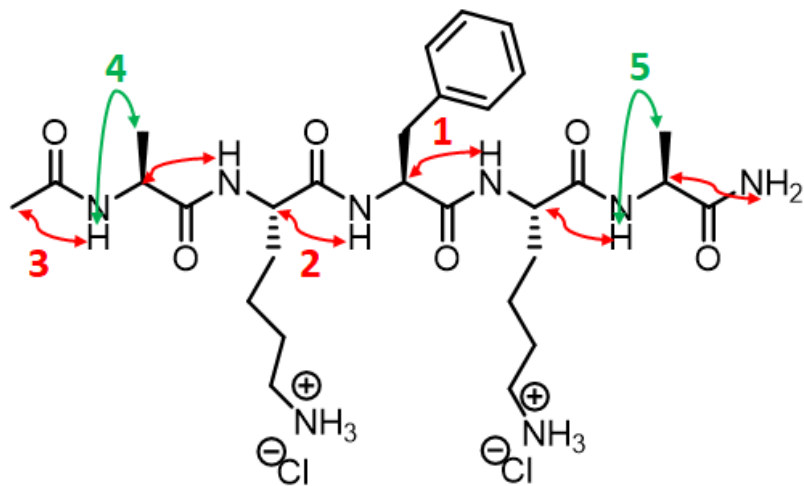


Figura 19- Correlazioni attese nello spettro NOESY

Grazie a questo esperimento sarà dunque possibile riconoscere, nello spettro ^1H , i protoni ammidici e differenziare i segnali dovuti a due amminoacidi uguali. A questo proposito, sarà utile identificare gli amminoacidi del peptide **1** con un indice, in modo da poterli distinguere, come indicato in Figura 20.

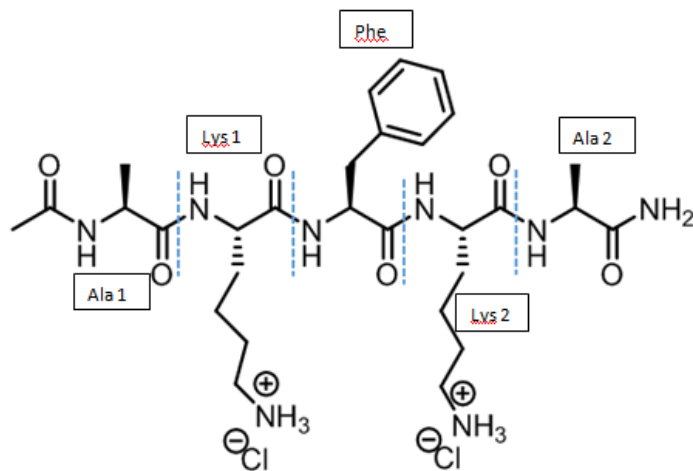


Figura 20-Peptide 1

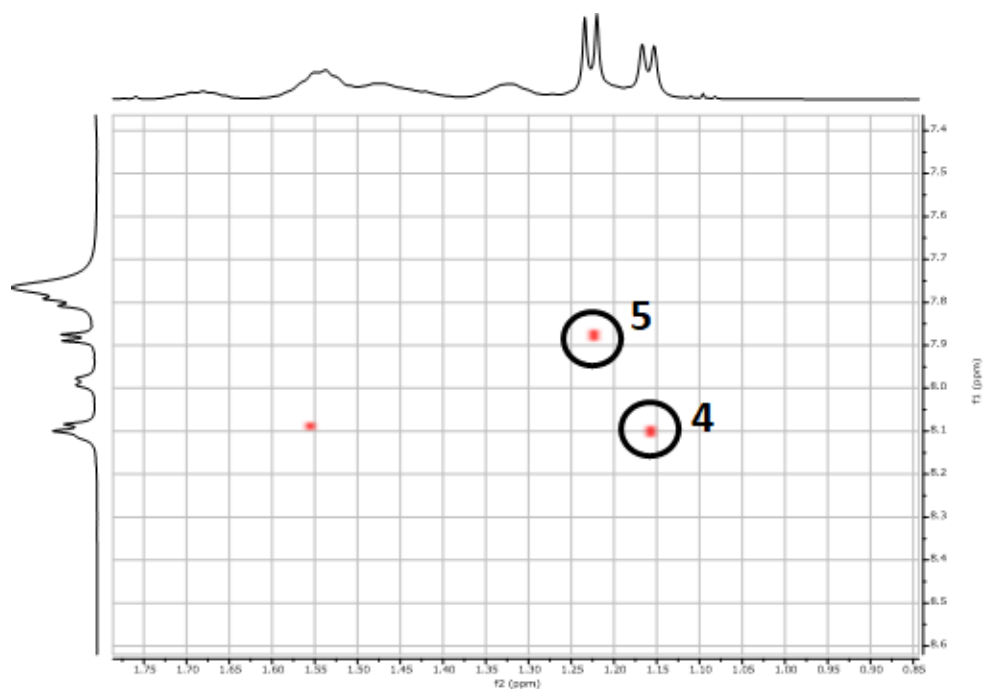
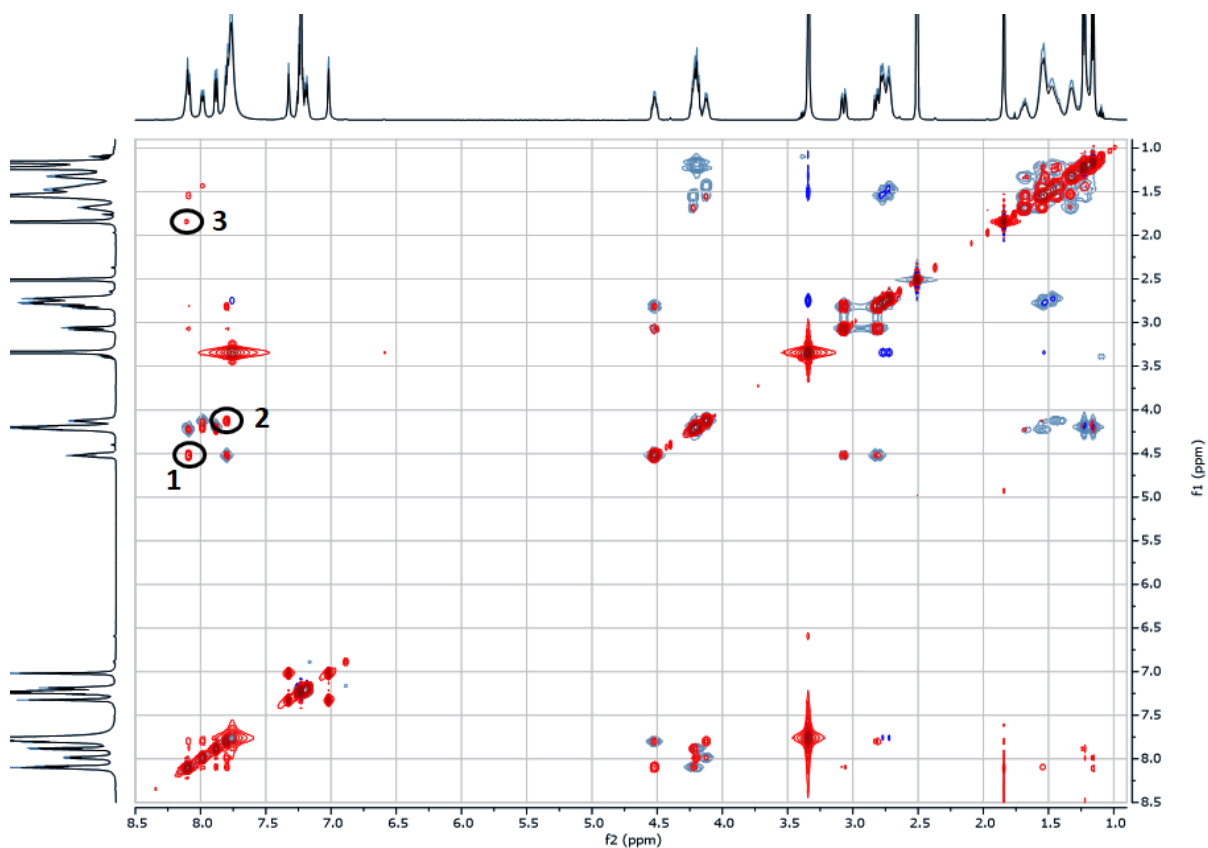


Figura 21-Ingrandimenti dello spettro NOESY (500 MHz, DMSO-d6) peptide 1

Per quanto riguarda l'assegnazione dei picchi relativi alle ammidi nello spettro ^1H NMR, si può osservare come il segnale di area 2 a 8.11 ppm sia dato dal protone ammidico di Ala₁ (correlazione con CH₃ terminale, picco di correlazione 3) e dal protone ammidico di Lys₂ (correlazione con CH_α Phe, picco di correlazione 1).

Per il doppietto di area 1 a 7.88 ppm si può dedurre, dal picco di correlazione 5, che sia dato dal protone ammidico di Ala₂. Per esclusione, il doppietto di area 1 a 7.98 ppm, è dato invece dal protone ammidico di Lys₁.

L'H α della Lys₁ è dato dal segnale a 4.13 ppm (picco di correlazione 2) e, di conseguenza, si può dedurre che L'H α della Lys₂ appare nel multipletto a 4.23 ppm insieme agli H α delle due alanine.

I picchi di correlazione 4 e 5 ci permettono assegnare il doppietto a 1.21 ppm al metile di Ala 2 e il doppietto a 1.15 ppm al metile di Ala1

Tabella 4-Tabella di assegnazione dei picchi di correlazione NOESY

<i>Picco</i>	<i>Coordinata F₁</i> <i>(ppm)</i>	<i>Coordinata F₂</i> <i>(ppm)</i>	<i>Correlazione</i>
1	8.09	4.51	NH Lys ₂ -H α Phe
2	7.77	4.12	NH Phe- H α Lys ₁
3	8.09	1.84	NH Ala ₁ -CH ₃ terminale
4	8.09	1.16	NH Ala ₁ - H β Ala ₁
5	7.88	1.22	NH Ala ₂ - H β Ala ₂

3.3 ANALISI DEGLI SPETTRI ¹³C NMR, DEPT-135 E HSQC

Lo spettro ¹³C NMR (Figura 22), ha permesso, attraverso l'analisi degli spostamenti chimici, di poter differenziare diverse regioni, nelle quali saranno presenti i segnali dovuti ai carboni di un determinato gruppo funzionale. L'utilizzo, in sinergia al ¹³C-NMR, dell'esperimento DEPT-135 (Figura 23) permette di riconoscere il tipo di carbonio, in modo da rendere più immediata l'assegnazione.

In particolare, tra 174.5 e 169.9 ppm si possono notare i carboni carbonilici delle ammidi; i carboni aromatici danno invece tre segnali relativi ai CH tra 129.7 e 126.7 ppm, mentre il segnale del carbonio aromatico quaternario cade a 138 ppm; i carboni α invece, danno origine a cinque segnali tra 54 e 48 ppm; infine, sotto i 40 ppm, sono presenti i segnali dovuti ai carboni alifatici delle catene. In questa zona è possibile distinguere due segnali di CH₂ molto de schermate a 39.14 e 37.79 ppm, date dal C β della fenilalanina e i C ϵ delle lisine. A 22.89, si nota il metile del gruppo acetile terminale. A 18.81 e 18.17 si notano invece i metili in β delle due alanine.

Nell'assegnazione non verrà considerato il segnale più intenso a 39 ppm, in quanto relativo al solvente (DMSO-d₆).

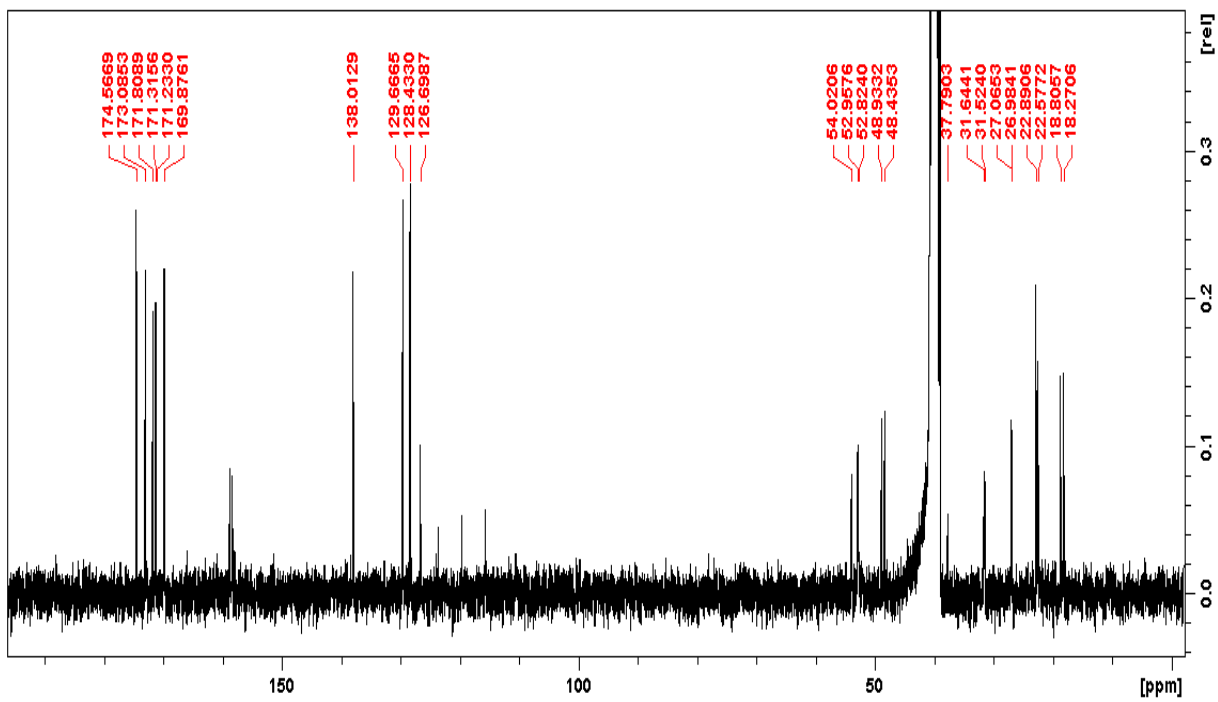


Figura 22-Spettro ^{13}C -NMR (300 MHz, DMSO-d_6) peptide 1

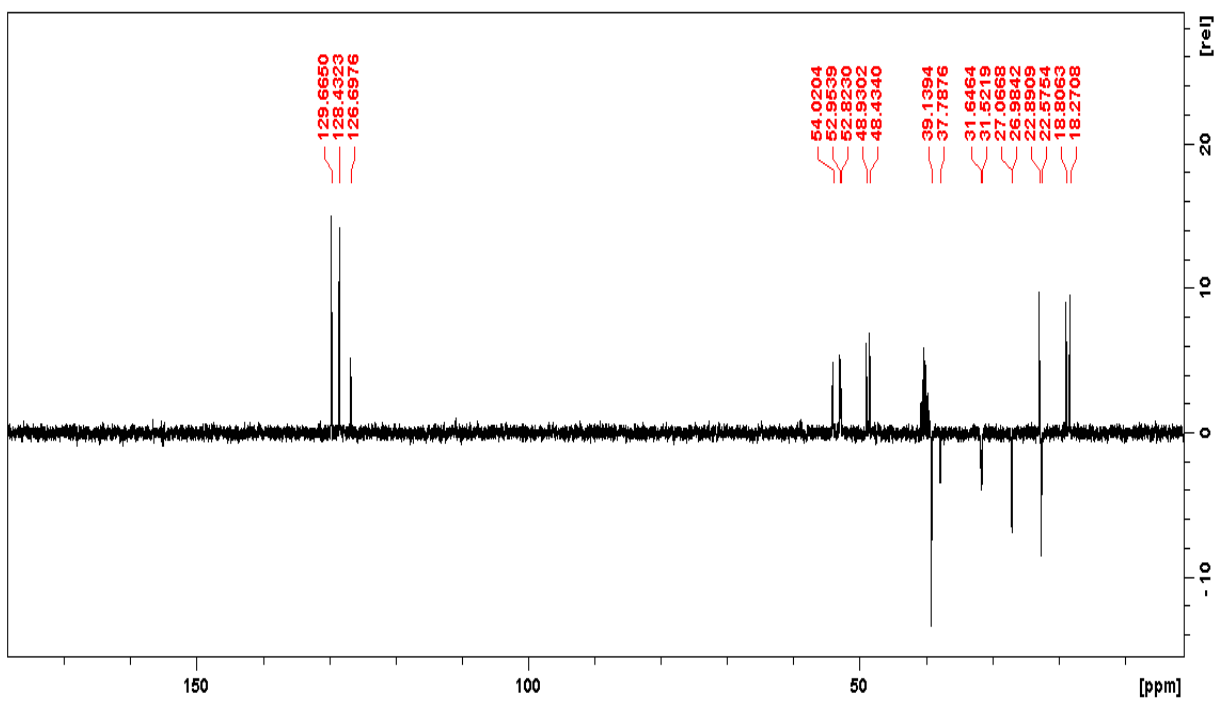


Figura 23-Spettro DEPT 135 (300 MHz, DMSO-d_6) peptide 1

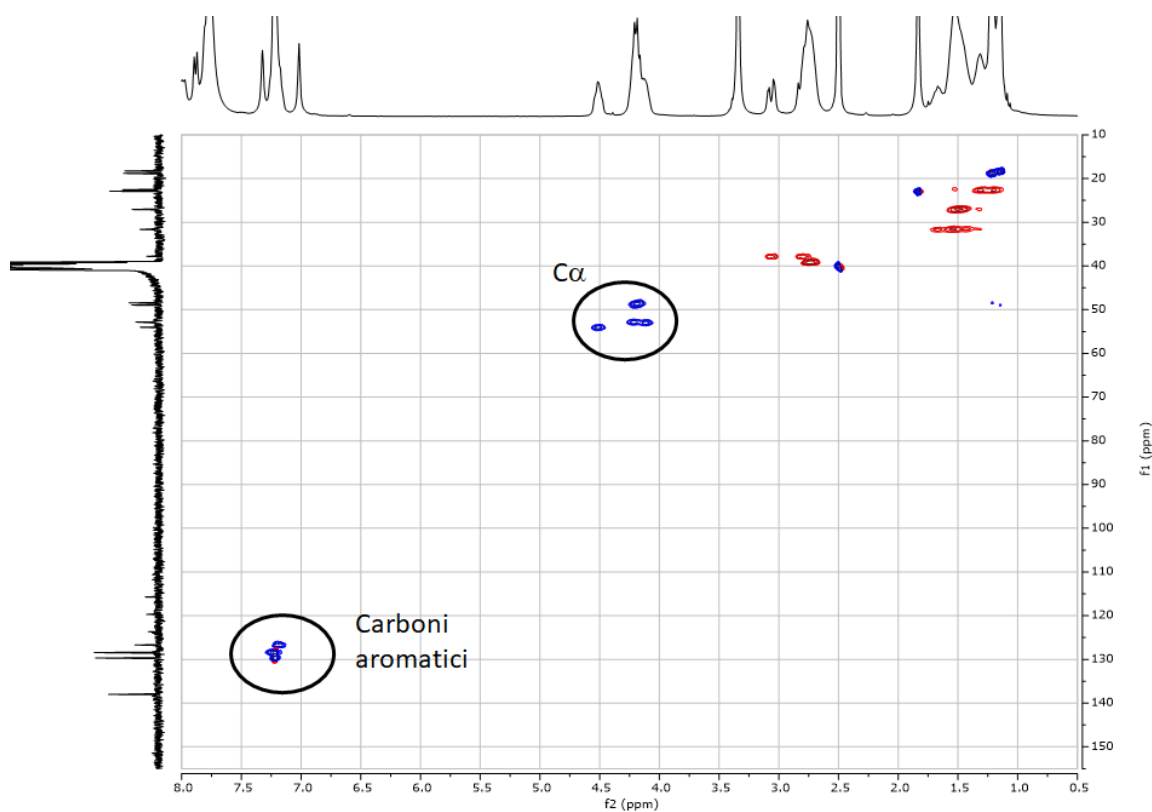
Tabella 5-Tabella di assegnazione ^{13}C -NMR

Chemical shift (ppm)	Carbonio	Segnale DEPT	Assegnazione
174.567	C	/	C=O
173.085	C	/	C=O
171.809	C	/	C=O
171.316	C	/	C=O
171.233	C	/	C=O
171.876	C	/	C=O
138.013	C	/	Aromatico
129.666	CH	Positivo	Aromatico
128.433	CH	Positivo	Aromatico
126.698	CH	Positivo	Aromatico
54.021	CH	Positivo	C_α
52.957	CH	Positivo	C_α
52.824	CH	Positivo	C_α
48.933	CH	Positivo	C_α
48.435	CH	Positivo	C_α
39.139	CH_2	Negativo	2* C_ϵ Lys
37.790	CH_2	Negativo	C_β Phe
31.644	CH_2	Negativo	C_β Lys
31.524	CH_2	Negativo	C_β Lys
27.065	CH_2	Negativo	C_δ Lys
26.984	CH_2	Negativo	C_δ Lys
22.891	CH_3	Positivo	Acetile
22.577	CH_2	Negativo	2* C_γ Lys
18.806	CH_3	Positivo	C_β Ala
18.271	CH_3	Positivo	C_β Ala

L'assegnazione può essere confermata e completata attraverso l'analisi di uno spettro bidimensionale. In particolare, in questo caso, si ricorrerà a una tecnica di accoppiamento scalare

etero-correlato che mette in correlazione i nuclei di ^1H con i nuclei di ^{13}C che accoppiano tra loro con una 1J (saranno visibili anche segnali dati da accoppiamenti 2J , ma saranno molto meno intensi). Dal momento che l'esperimento HSQC correla tra loro due nuclei differenti, non saranno presenti cross peaks sulla diagonale. Gli unici protoni che non presenteranno picchi di correlazione saranno, logicamente, quelli ammidici. Anche i carboni quaternari non mostreranno alcuna correlazione. L'assegnazione dei segnali nello spettro HSQC permettono di confermare le assegnazioni fatte negli spettri precedenti, in particolare nel ^1H -NMR e nel ^{13}C -NMR.

In Figura 24 è riportato lo spettro HSQC insieme a gli ingrandimenti di alcune zone.



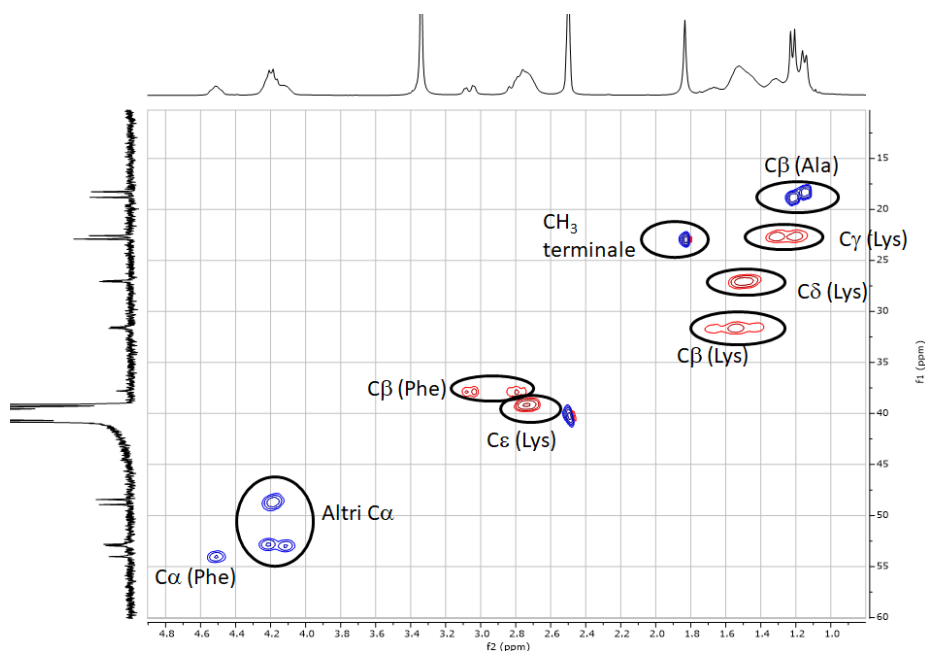


Figura 24- Spettro HSQC (300 MHz, DMSO-d6) del peptide 1, ingrandimenti di regioni

Tabella 6-Tabella di assegnazione cross peaks HSQC

<i>Coordinata F₁</i>	<i>Coordinata F₂</i>	<i>Accoppiamento</i>
7.18	126.71	CH aromatico
7.21	128.51	CH aromatico
7.23	196.63	CH aromatico
4.51	54.04	CH _α Phe
4.12	53.16	CH _α Lys ₁
4.21	52.76	CH _α Lys ₂ /Ala
4.15	48.71	CH _α Lys ₂ /Ala
3.07	37.81	CH _{2β} Phe
2.78	37.82	CH _{2β} Phe
2.73	39.02	CH _{2ε} Lys
1.83	22.94	CH ₃ iniziale
1.54	31.63	CH _{2β} Lys
1.49	27.01	CH _{2δ} Lys
1.52	22.51	CH _{2γ} Lys
1.25	22.50	CH _{2γ} Lys
1.16	18.32	CH ₃ Ala ₁
1.22	18.84	CH ₃ Ala ₂

4. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo lavoro di tesi era la caratterizzazione del peptide **1** tramite esperimenti di spettroscopia NMR e ESI-MS. In particolare sono stati utilizzati esperimenti monodimensionali e bidimensionali, che, utilizzati in sinergia, hanno permesso l'assegnazione di tutti i segnali relativi allo spettro al protone e al carbonio.

Lo spettro di massa ha permesso di confermare il peso molecolare del composto.

Per quanto riguarda l'assegnazione dei picchi nello spettro $^1\text{H-NMR}$, è stato possibile completare la caratterizzazione grazie all'ausilio dello spettro COSY e dello spettro NOESY. Se il primo è stato utile per identificare i sistemi di spin di ogni singolo amminoacido (e quindi riconoscere gli accoppiamenti caratteristici di un determinato protone), il secondo ha permesso l'assegnazione dei protoni ammidici e la distinzione fra i segnali dovuti rispettivamente ai protoni delle due lisine e ai protoni delle due alanine.

A proposito dell'assegnazione dei picchi nello spettro $^{13}\text{C-NMR}$, è stato possibile identificare i diversi tipi di carbonio presenti nella molecola, anche grazie all'ausilio dell'esperimento DEPT 135. L'esperimento HSQC è invece risultato utile sia per l'assegnazione dei segnali nello spettro del carbonio, ma anche come conferma nell'assegnazione dello spettro al protone.

Dunque si può constatare come, per tutta la caratterizzazione, la spettroscopia bidimensionale sia imprescindibile al fine di ottenere delle informazioni sicure e non equivocabili sull'interpretazione degli spettri.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Bryce, D. L. *Identificazione spettrometrica di composti organici*; Casa editrice Ambrosiana, Rozzano (MI) (2016)
2. Bruice, P. Y., *Chimica Organica*; EdiSES, Napoli (2018)
3. https://nmr.chem.ucsb.edu/docs/Bruker_NMR_Manuals/user_manual_topspin_ts40.pdf; accesso in rete 05/11/2022
4. Gunter, H., *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*; John Wiley and Sons (1995)
5. Ernst, R. R.; Bodenhausen; G., Wokaun A., *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*; Clarendon Press, Oxford (1987)

6. PARTE SPERIMENTALE

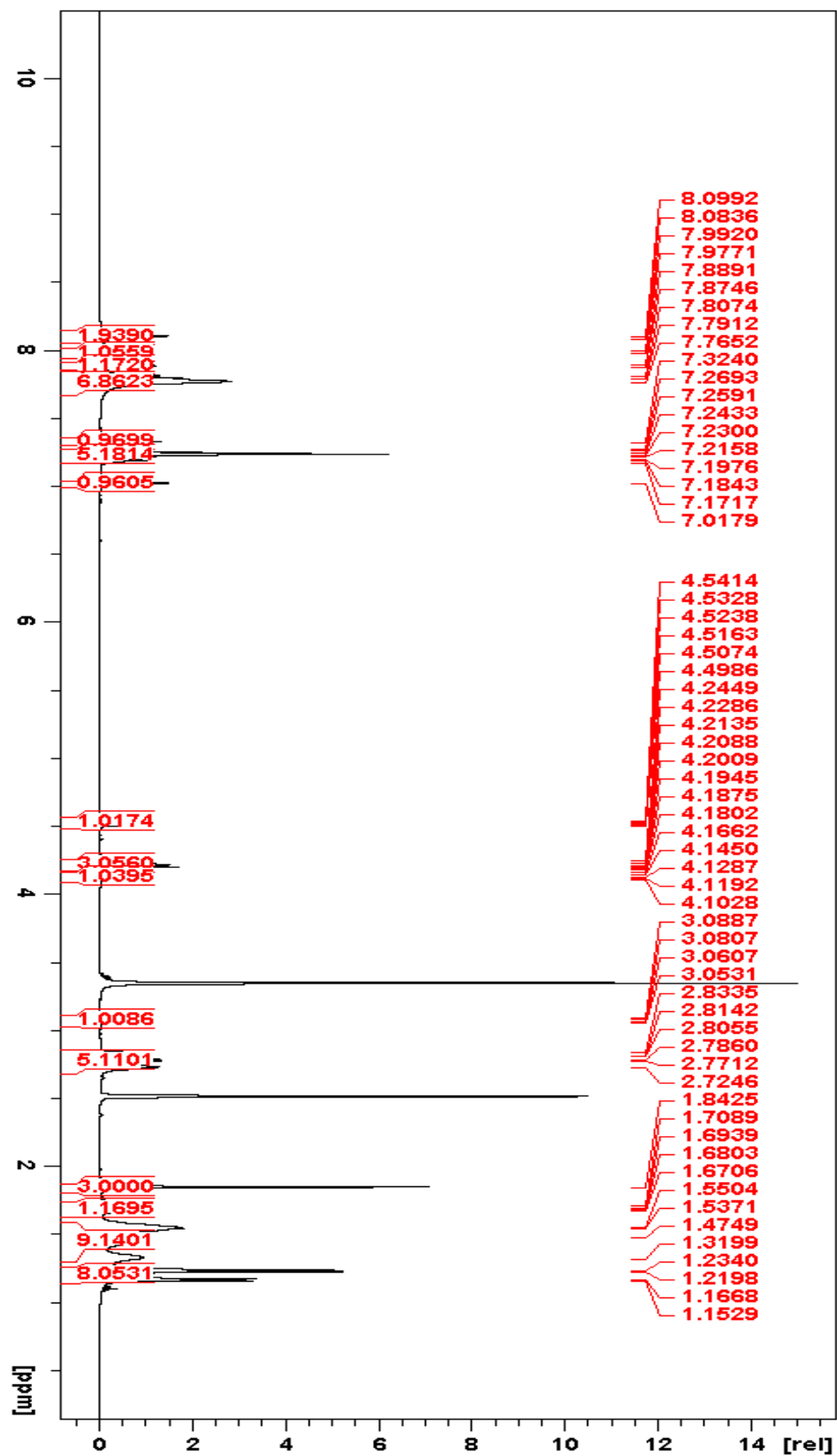
Tutti gli spettri NMR sono stati acquisiti a temperatura ambiente (298 K) utilizzando DMSO (99,9 % d₆, Sigma Aldrich) come solvente. Gli spettrometri Bruker® Avance 300 operante alla frequenza di 300 MHz (9.4 T) per lo spettro del protone e 75 MHz per lo spettro del carbonio e Bruker® Avance 500 operante alla frequenza di 500 MHz per il protone e 126 MHz per il carbonio. Gli spettri 2D-NMR sono stati registrati utilizzando lo strumento Bruker® Avance 500. I valori di chemical shift espressi in (ppm) sono stati assegnati utilizzando come riferimento interno la frazione parzialmente deuterata del solvente.

Nell'analisi dei risultati la molteplicità di un segnale è indicata come: s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), dd (doppietto di doppietti), dt (doppietto di tripletti) q (quartetto) e m (multipletto).

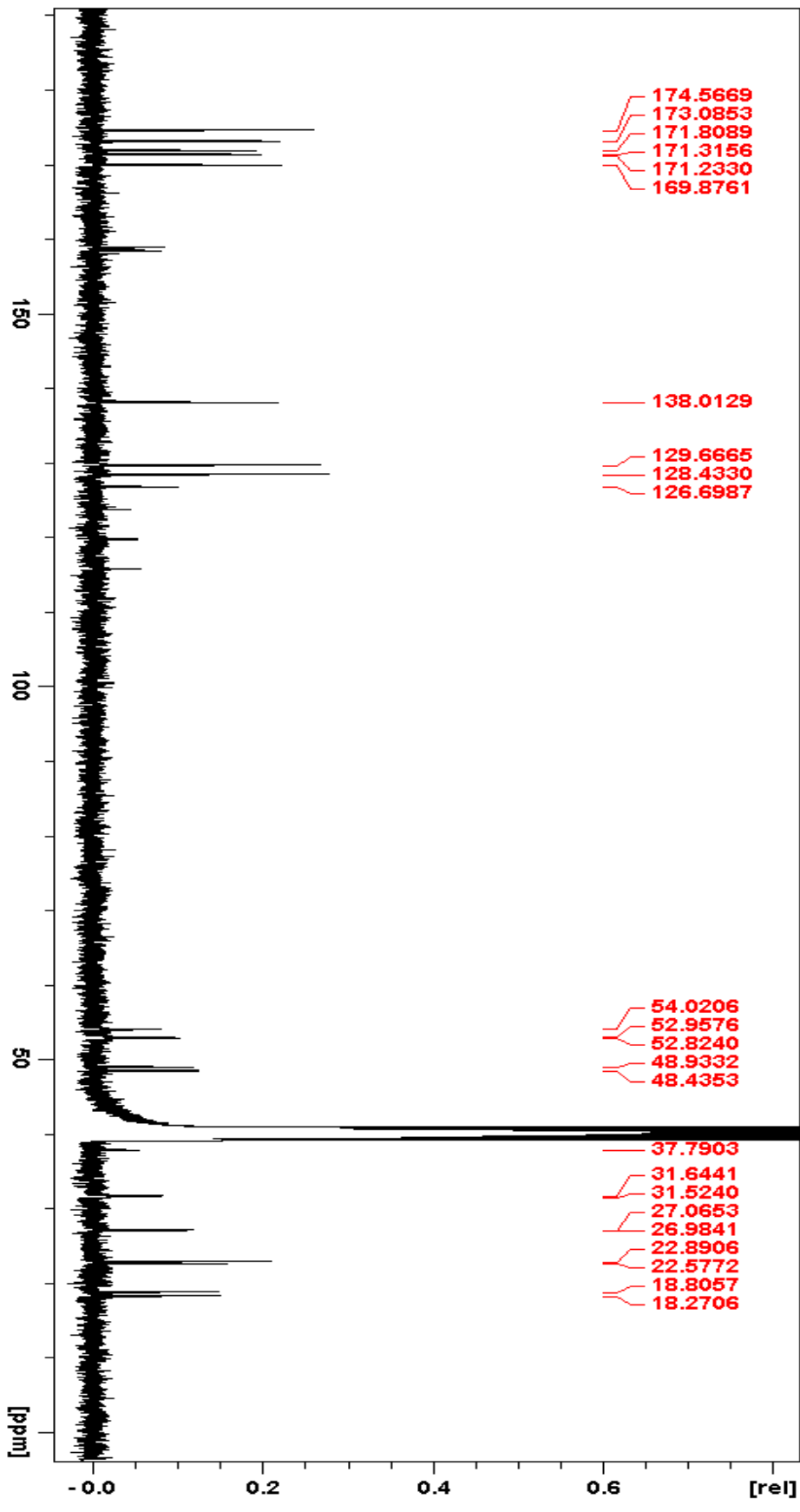
I programmi utilizzati per l'elaborazione degli spettri sono "MestreNova" e "Bruker TopSpin 3.6.2".

7. APPENDICE

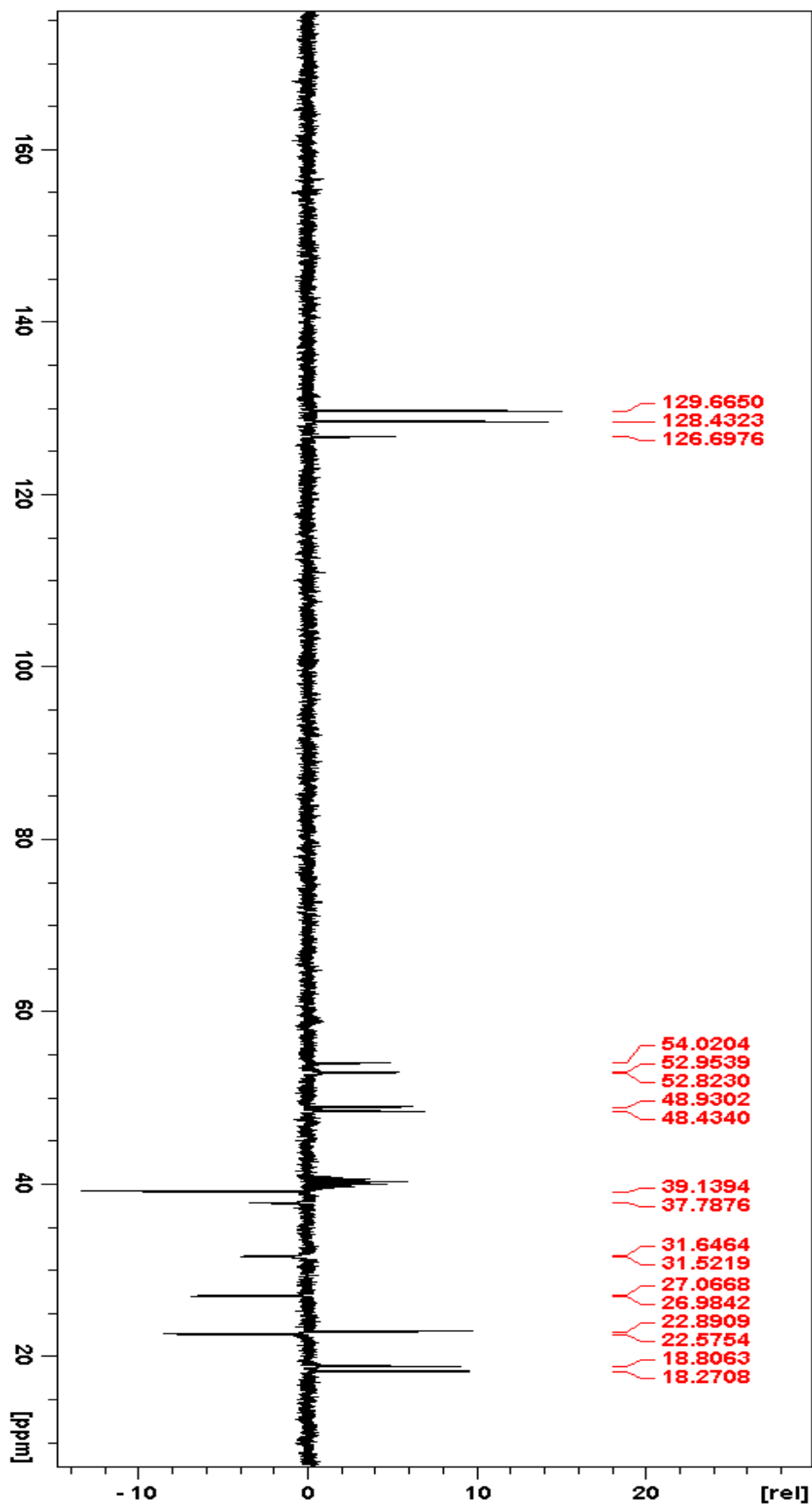
Spettro $^1\text{H-NMR}$



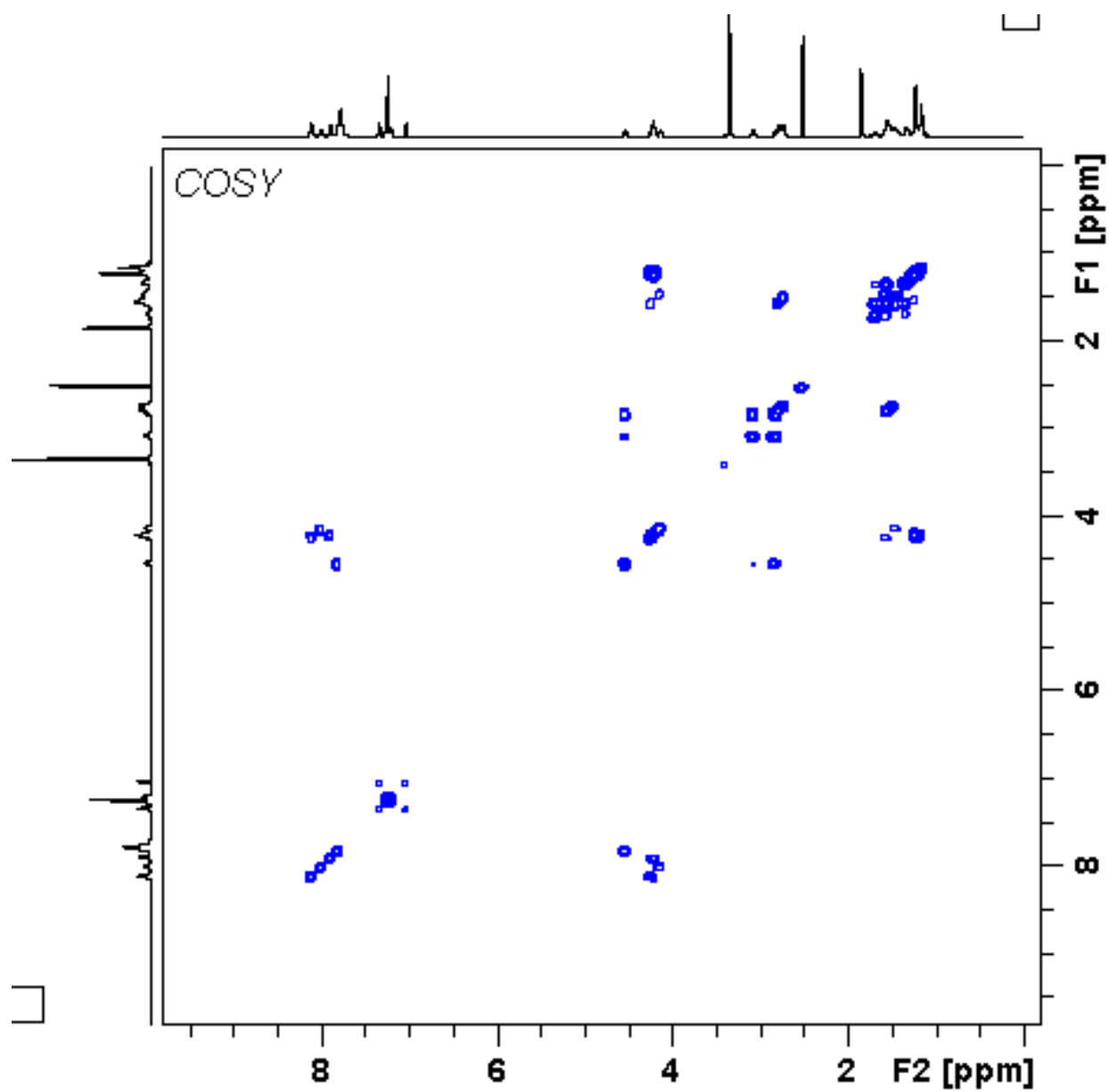
Spettro ¹³C-NMR



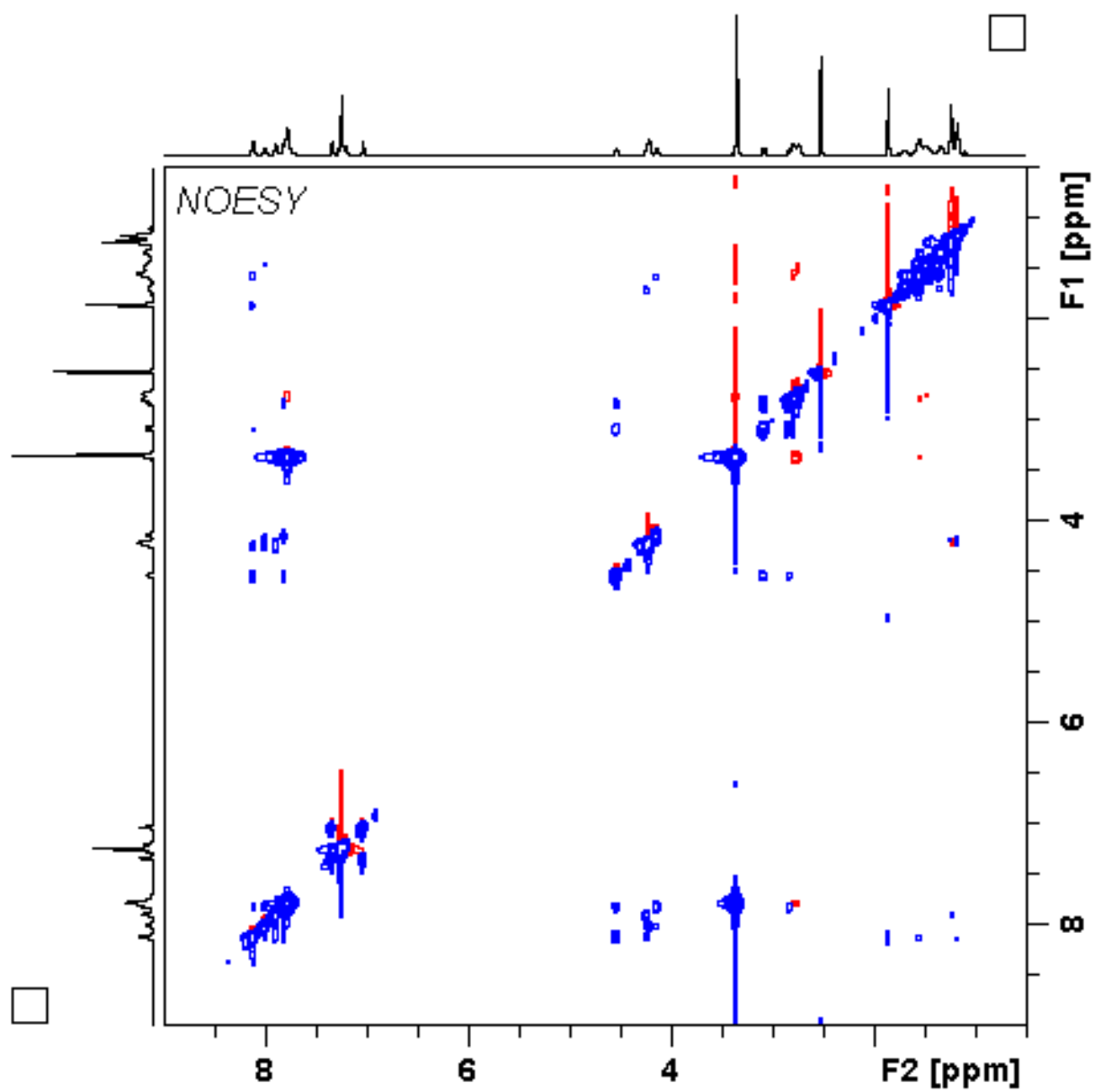
Spettro DEPT 135



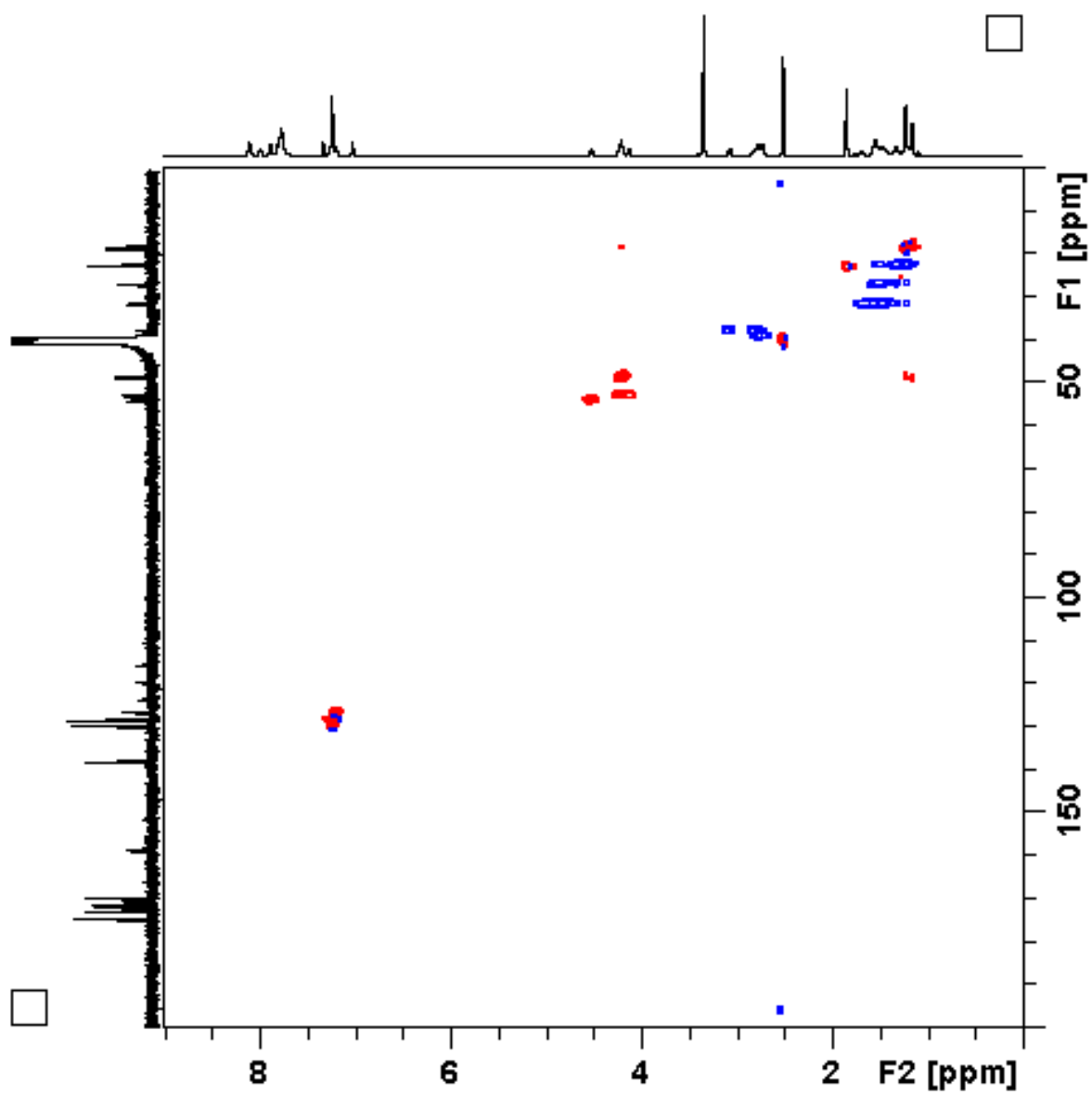
Spettro ^1H - ^1H COSY



Spettro ^1H - ^1H NOESY



Spettro ^{13}C - ^1H HSQC



Ringraziamenti

Ci sarebbero molte persone da ringraziare per l'aiuto e il supporto che mi hanno dato in questi anni.

In primis tutta la mia famiglia:

Ai miei genitori, per avermi incoraggiato anche nei momenti più difficili, per avermi sempre supportato e non avermi mai fatto pesare gli insuccessi. Mi avete sempre aiutato a credere in me e spinto a dare il massimo, e per questo il grazie più grande è per voi.

A mio nonno per avermi sempre incoraggiato, per aver prima sofferto e poi (soprattutto) gioito insieme a me in tutto questo percorso.

Grazie ai miei fratelli (e coinquilini) Daniela, Fabio e il "fratello aggiuntivo" Pietro per avermi sopportato anche nei momenti in cui non ero facile da sopportare.

Grazie a Sara per essermi stata vicina in ogni momento di questi anni, per avermi aiutato a superare momenti di sconforto che sembravano insuperabili e per essere il sostegno di cui troppo spesso ho bisogno. Grazie anche per avermi "aspettato", anche se credo che questa sia la rivincita dalla maturità.

Grazie a mia zia Federica, per avermi aiutato moltissimo, per la casa, per i sushi e per essere il mio punto di riferimento a Padova.

Grazie a tutti i miei amici e in particolare ai miei compagni di avventura Andrea, Matilde e Silvia per aver condiviso in questi anni, momenti di svago e di fatica, ma sempre insieme.

Infine grazie alla professoressa Mba per la disponibilità, la pazienza e la passione che è riuscita a dare e trasmettere, guidandomi nella stesura di questa tesi.