

N-TRİMETİLSİLİL AMİNO ASİT ALKİL ESTERLER KULLANARAK YENİ BİR YÖNTEMLE DİPEPTİT SENTEZİ

Şule PEKYARDIMCI

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Mustafa AKFOYRAZ

Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, yeni bir dipeptit sentezi yöntemi araştırıldı. Önce, çalışma için gerekli olan N-trimetilsilil amino asit alkil esterleri, N-karboksi amino asit anhidritler (NCA) ve N-karbobenzoksi amino asitleri (N-Cbz) ayrı ayrı sentezlendi. Bu aşamadan sonra, dipeptid sentezi iki ayrı yöntemle gerçekleştirildi. Birinci yöntemde susuz şartlarda N-trimetilsilil amino asit alkil esterleri ile, N-karboksi amino asit anhidritleri 0-2 °C ' de kuru benzen içinde reaksiyona sokularak dipeptidler elde edildi. İkinci yöntemde, N-karbobenzoksi amino asit-fosfor oksiklorür anhidritleri ile N-trimetilsilil amino asit alkil esterlerinden çıkılarak trietilamin-tetrahidrofuran (THF) ortamında reaksiyona sokularak N-Cbz dipeptid alkil esterleri elde edildi.

DIPEPTIDE SYNTHESIS BY A NEW METHOD USING N-TRIMETHYLSILYL AMINO ACID ALKYL ESTERS

SUMMARY

A new method has been investigated for the dipeptide synthesis. Starting chemicals, i. e. N-trimethylsilyl amino acid alkyl esters, N-carboxy amino acids, N-carboxy amino acid anhydrides were synthesized individually in our laboratory. Dipeptide synthesis was achieved with two methods. With the first method, N-trimethylsilyl amino acid alkyl and N-carboxy amino acid anhydrides were reacted at 0-2 °C in dry benzene. With the second, N-carbobenzoxy amino acid-phosphorus oxychloride anhydrides have been put into reaction with N-trimethylsilyl amino acid alkyl esters in triethylamin-tetrahydrofuran medium and N-carbobenzoxy amino acid dipeptide alkyl esters were produced.

1.GİRİŞ

Peptidler biyolojik aktif maddeler olarak canlıların temel birimlerini oluşturmaları ve biyokimyasal etkinliklerinin fazla olması nedeniyle bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır (1,2,3,4,5). Peptid molekülleri birbirlerine amit bağları ile bağlanmış amino asit zincirlerinden oluşur. Doğada olduğu gibi laboratuvarlarda da dipeptid sentezi amino asitlerle başlar. Bir amino asitin karboksil grubuyla, diğer amino asitin amino grubu amin bağları vererek dipeptid oluşturur. Reaksiyon, bir amino asitin amino grubunun ikinci bir amino asit ile açılmasına dayanır ve karbonil karbonu üzerinde bir nükleofilik süstitüsüyonu içerir. Bunun için karbonil veya amino

gruplarından birinin daha etkin bir şekilde dönüştürülmesi gerekir. Bunun en klasik örneği karboksilik asitin asit klorüre dönüştürülmesidir. Amino asitler, en az bir amino ve bir karboksil grubu içerdiklerinden, karboksil grubu açılleyici, amino grubu da açıllenen olarak fonksiyon gösterir. Önlem alınmazsa bir çok yan ürün meydana gelebilir. Tek ürün elde etmek ve istenmeyen yan ürünlerin oluşumunu önlemek için, amino gruplarından yalnız birinin, karboksil gruplarından da yalnız birinin reaksiyona girmesi gerekir. Diğer karboksil ve amino gruplarının korunması gerekmektedir. Amino ve karboksil gruplarını koruyucu pek çok sübstitüent keşfedilmiş ve peptid sentezinde yeni ufuklar açılmıştır.

1.1. AMİNO GRUPLARININ KORUNMASI

Bu işlem, amino gruplarının nükleofilliğini azaltan sübstitüentler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu amaçla amino grubu açılleenir. Bunun için en etkin grup karbobenzoksi (N-Cbz) grubudur (6). Diğer alkoksi karbonil gruplarına örnek olarak t-bütoksi karbonil (7) ve trifenilmetil (8,9) grupları verilebilir.

1.2. KARBOKSİL GRUPLARININ KORUNMASI

Bunun için en yaygın yöntem ester oluşturmaktır. En çok metil, etil, benzil, p-nitrofenil, p-metoksibenzil, tersiyer bütül, siklo pentil ve trimetilsilil esterleri kullanılmaktadır (10,11,12).

1.3. YAN ZİNCİR GRUPLARININ KORUNMASI

Aspartik asit ve glutamik asit gibi iki karboksil grubu içeren amino asitlerin her iki karboksil grubunun da korunması gerekir. Bunlar genellikle esterleştirilerek korunurlar. Sisteinin tiyo grubunun da peptid sentezi sırasında korunması gerekmektedir. Bunun için sisteinin Na tuzu, sıvı amonyak içinde benzil klorürle reaksiyona sokulur. Arginindeki guanidin grubu nitrolanarak, histidinin imidazol grubu da sıcak amonyak içinde, benzil klorürle reaksiyona sokularak korunur.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Dipeptid sentezi gerekli çıkış maddeleri olan N-karboksi amino asit anhidritlerinin (13,14,15), amino asit ester hidroklorürlerinin (16),

N-karbobenzoksi amino asitlerin (11,12,17) ve elde edilen dipeptit alkil esterlerin erime noktaları tayini "Büchi" kapiler erime noktası cihazı kullanılarak yapılmıştır. Erime ve kaynama noktaları yardımıyla tanınmasında güçlük çekilen maddelerin IR spektrumları, "Hitachi 215" spektrofotometresi ile NaCl plakaları arasında veya "Perkin Elmer 337" spektrofotometresi ile KBr disk yöntemi uygulanarak alınmıştır. Bu çalışmada iki ayrı yöntemle dipeptit sentezi yapılmıştır.

2.1. NCA YÖNTEMİ

Susuz şartlarda 0-2 °C' da N-karboksi amino asit anhidrit (NCA) kullanarak yapılmıştır. Genel yöntem şöyledir. İçinde 10 ml kuru benzen bulunan 50 ml'lik rodajlı bir balona 0,1 molar N-trimetilsilil amino asit alkil esteri konur. Devamlı olarak karıştırılan sisteme eşdeğer miktarda NCA ilave edilir. Jel kıvamına gelen bu karışıma 30 ml etanol konur, 15 dakika daha karıştırılır. Jel halindeki ham ürün vakumda konsantre edilip, 5 ml 1N NaOH ilave edilerek dipeptidin ester ucu hidroliz edilir (18). Daha sonra nötralleşinceye kadar asetik asit ilave edilir ve tekrar konsantre edildikten sonra uygun çözücüde kristallendirilir.

2.2. FOSFOR OKSİKLORÜR YÖNTEMİ

250 ml'lik rodajlı bir balona 50 ml susuz THF ve 0,05-0,01 Molar N-karbobenzoksi amino asit (N-Cbz) konur. Reaksiyon kabı -15 °C 'e kadar soğutulur. Karışıma %0,05-0,01 Molar trietilamin konur. Daha sonra eşdeğer miktarda N-trimetilsilil amino asit alkil esteri ile trietilaminin THF' daki çözeltisi damla damla ilave edilir. Sıcaklık -10°C' da tutularak 20 dakika daha karıştırılır. Daha sonra suyla hidroliz edilip, uygun koşullarda saflaştırılır.

3. BULGULAR

Literatür ve deneysel çalışmalarımıza göre N-trimetilsilil (N-TMS) amino asit türevleri uygun açılleyici bileşiklerle çok kolay reaksiyon verirler (18,19). Bu çalışmada N-TMS amino asit alkil esterleri yanında iki yöntemle dipeptit sentezi yapılmıştır. Birinci yöntemde susuz şartlarda NCA ve N-TMS amino asit alkil esterlerinden çıkılarak iki dipeptit sentezlenmiştir. Sonuçlar çizelge 1' de verilmiştir.

Çizelge I

Dipeptid	E.n.(°C)	E.n.(°C/lit.)	verim (%)
L-Leucyl-Glisin	243	246	45
DL-iso-leucyl-glisin metil ester	176	180	30

ELDE EDİLEN DİPEPTİTLERİN SAFLAŞTIRILMASI

L-Leucyl -glisin: Elde edilen ham ürün 20 ml etil alkol ile karıştırılıp süzüldü. 10 saat kristallenmek üzere buzlukta bekletildi. Trompta süzülüp 2 kez etil asetatta kristallendirildi ve 50 °C'da etüvde kurutuldu.

DL-iso-leucyl-glisin metil ester: Jel halindeki ham ürün eterle ekstrakte edildikten sonra eter buharlaştırıldı. Metil alkol-eter karışımından tekrar kristallendirildi.

İkinci yöntemde N-TMS amino asit alkil esterleri fosfor oksiklorür yanında reaksiyona sokularak N-Cbz dipeptid alkil esterleri elde edildi. Sonuçlar çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge II

N-Cbz dipeptid alkil ester	E.n.(°C)	E.n.(°C/lit.)	verim (%)
Glisil-DL-alanin metil ester	172	172	65
Glisil-DL-valin-metil ester	95	94	60
DL-alanil-glisin etil ester	78	79	70
DL-valil-DL-valin metil ester	84	86	82
DL-valil -glisin etil ester	142	141	75
L-fenilalanil-DL-metiyonin etil ester	93	96	80
Glisil-DL-fenilalanin etil ester	89	92	82
Glisil-glisin metil ester	82	82	78
Glisil-DL-leucin etil ester	49	52	85
L-alanil-DL-alanin etil ester	110	112	65

ELDE EDİLEN DİPEPTİTLERİN SAFLAŞTIRILMASI

N-Cbz Glisil-DL-alanin metil ester: Ham ürün eterle ekstrakte edildi. Eter su banyosunda uzaklaştırılıp, metil alkolden kristallendirildi.

N-Cbz Glisil-DL-valin-metil ester: Yağimsı ürün etil asetatla ekstrakte edildi. Etil asetat uçurulduktan sonra, ürün etil alkolden kristallendirildi.

N-Cbz DL-Alanil-glisin etil ester: Sarı renkli bir tabaka halindeki ham ürün trompta süzülüp, alkol-su karışımından kristallendirildi.

N-Cbz DL-valil-DL-valin metil ester: Beyaz renkli ham ürün, trompta süzülüp soğuk suyla yıkandı. Etil alkolden kristallendirildi.

N-Cbz DL-valil-glisin etil ester: Sarı renkli yağimsı ham ürün eterle ekstrakte edilerek alındı. İki kez etil asetatla kristallendirildi.

N-Cbz L-Fenilalanil-DL-metiyonin etil ester : Ham ürün eterle ekstrakte edilerek alınıp etil asetatla kristallendirildi.

N-Cbz glisil-L- fenilalanil etil ester: Yağimsı ham ürün 3 kez etil asetatla ekstrakte edilip, soğuk suyla yıkandı. Vakumda etil asetat uzaklaştırıldıktan sonra petroleteri-benzenden kristallendirildi.

N-Cbz glisil-glisin metil ester: Beyaz renkli ham ürün trompta süzülüp, soğuk suyla yıkandıktan sonra etil alkolden kristallendirildi.

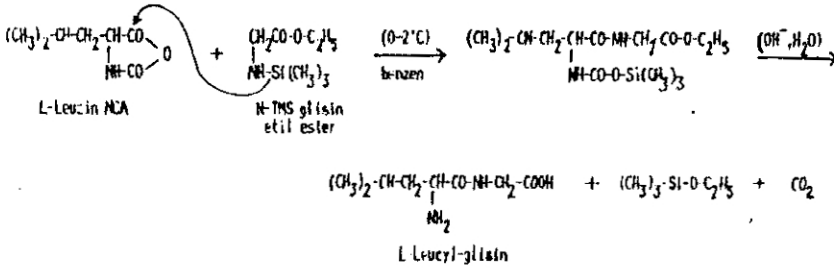
N-Cbz glisil-DL-leucin etil ester: Krem renkli yağimsı ürün etil asetat ile ekstrakte edildi. Çözücü uçurulup etil asetat-petroleterinden kristallendirildi.

N-Cbz L-alanil-DL-alanin etil ester: Sarımtırak katı haldeki ham ürün trompta süzüldükten sonra soğuk suyla yıkandı ve 3 kez etil asetatla kristallendirildi.

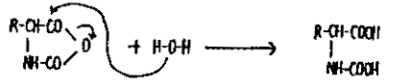
4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Kullandığımız N-karboksi amino asit anhidritleri önemli açılleyici bileşikler olduklarından N-TMS amino asit alkil esterleriyle kolayca reaksiyona girerek dipeptid türevlerini oluştururlar (18,19,20). Reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekilde yürümektedir.

Ş. PEKYARDIMCI, M. AKPOYRAZ/N-TRİMETİSİLİL AMİNO ASİT ALKİL ESTERLER KULLA.



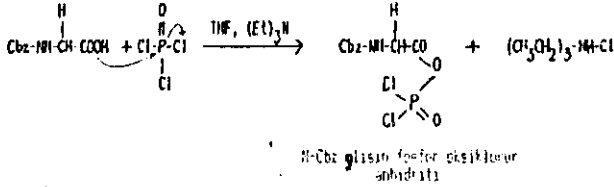
Deneysel bölümde kısaca verilen NCA yönetimi düşük verimlidir ve saflaştırma işlemlerinde çeşitli güçlükler olmuştur. L-Leucyl-glisin %25 ve DL- izoleucyl glisin metil esteri %35 gibi düşük verimlerle elde edilmiştir. Bunun en önemli nedeni hidroliz anında rasemlenme sonucu yan ürünlerin oluşmasıdır. NCA yöntemiyle elde edilen dipeptid türevindeki karboksi koruyucu grubunun dipeptitten uzaklaştırılması için bazik ortamda hidroliz yapılmıştır. Böyle bir ortamda peptid yapısındaki asimetrik C atomundaki H iyonunun kolayca uzaklaştığı ve bunun sonucu olarak rasemik ürünlerin oluştuğu literatürde belirtilmektedir (21). Ayrıca, dipeptidin saflaştırma işlemlerinin uzun olması ve en önemlisi kullanılan NCA'ların ortamdaki eser miktardaki nemden bile etkilenecek polipeptid oluşturması verimi düşüren faktörlerdir. Leuchs anhidritleri de denilen NCA'ların anhidrit grubu nükleofilik hücumu karşı çok duyarlıdır. Bunlar sulu ortamda kolayca hidrolizlenir.



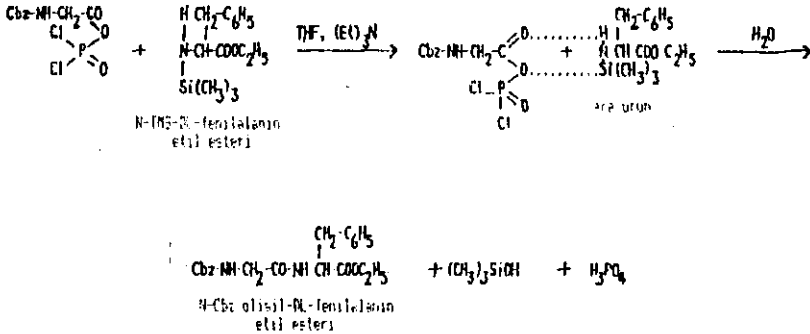
Bu şekilde oluşan karbamik asit türevleri çok kararsızdır. Amino asitleri oluşturmak üzere oda sıcaklığında CO₂ kaybederler. Bunlar da yeni bir nükleofil olarak hareket eder ve bu şekilde devam ederek polipeptid oluşur.

NCA yönteminde arzu edilen verime ulaşamayınca 2. bir yöntem geliştirildi. Bu yöntemde N-Cbz amino asitler ile N-TMS amino asit alkil esterleri fosfor oksiklorür yanında reaksiyona sokularak N-Cbz dipetid alkil esterleri elde edilmiştir.

Ş. PEKYARDIMCI, M. AKPOYRAZ/N-TRİMETİSİLİL AMİNO ASİT ALKİL ESTERLER KULLA.



Oluşan N-Cbz glisin-fosfor oksiklorür anhidriti reaksiyon ortamından alınmadan N-TMS-DL-fenilalanin etil esteri ile reaksiyona sokulur.



Ara üründe görüldüğü gibi anhidritteki C ve P arasındaki O köprüsündeki elektron bulutunun Si üzerine kayması sonucu karbonil karbonundaki elektron yoğunluğu iyice azalır. Bu olay peptid oluşumunu hızlandırır. Reaksiyon sonunda ortama su ilave edilerek, yan ürün oluşumuna meydan verilmeden trimetil siloksan ve fosforik asit kolayca ayrılır.

Bu yöntem, birinci yöntem (NCA ile N-TMS amino asit alkil esterlerinden dipeptid sentezi) göre daha başarılıdır. Bunun sonucu olarak çizelge 2'de gösterildiği gibi verimler oldukça yüksektir.

KAYNAKLAR

- [1]. A. White, P. Handler, E. L. Smith. R. 1. Hill. R. Lehman. "Principles of biochemistry" (1978).
- [2]. K. D. Kopple "Peptides and Aminoacids" W .A. Benjamin inc. New York. (1966).
- [3]. M. Bodanszky and M. A. Ondetti, "Peptides Synthesis" New York, (1966).
- [4]. N. V. Bagawan "Biochemistry" J. B. Lippineott Company. (1978).
- [5]. A. Lehninger. "Principles in Biochemistry" 2nd ed. (1974).
- [6]. M. Bergmann and L. Zervas. Chem. Ber. 65, 1192 (1932).
- [7]. M. Bergmann, L. Zervaz and Ross, J. Biol. chem, 244, 11, (1935).
- [8]. E. Schröder and K. Lübke. "The Peptides" Vol. 1, Academic Press. (1965).
- [9]. D.T. Elmore. "Peptides and Proteins" Cambridge Uni. Press. (1968).
- [10]. M. Kausher, M. A. Ondetti and M. Bodanszky, "Peptide Synthesis" 2nd ed. New York, (1976).
- [11]. Org. Synthesis, Coll. Vol. 2. 310 (1960).
- [12]. J. J. Mayer. M. E. Furey and L. J. Greenberg, Tetrahedron Letters. 16. 1584 (1972).
- [13]. M. Brenner and W. Huber. Hel. Chim. Acta. 36, 1109 (1953)
- [14]. Y. Go and H. Tanî, J. Prakt. Chem. 14. 510 (1939).
- [15]. W. E. Hanby, S. G. Waley and J. Watson, J. Chem. Soc. 3, 3239 (1950).
- [16]. R. B. Woodward and G. Sehramm, J. AM. Cham. Soc. 69, 1551 (1947).

Ş. PEKYARDIMCI, M. AKPOYRAZ/N-TRİMETİSİLİL AMİNO ASİT ALKİL ESTERLER KULLA.

[17]. Gattermann, Wieland "Organic Chemistry" 276 (1965).

[18]. H. R. Kricheldorf, Justus Ann. Chem. 763, 17 (1972).

[19]. A. C. Farting, J. Chem. Soc. 3. 3213 (1950).

[20]. A. C. Farting, J. Chem. Soc. 3. 3218 (1950).

[21]. E. Schröder and K. Lübke "The Peptides" Völ. 1 Academic Press, New York, (1968).