Utilizarea carbonaþilor micºti de N-succinimidil la protejarea grupelor amino din amine ºi aminoacizi

ADINA SEGNEANU*, MARIUS MILEA, VALENTIN BADEA, CAROL CSUNDERLIK
Universitatea „Politehnica” Timiºoara, Facultatea de Chimie Industrialã ºi Ingineria Mediului, Piaþa Victoriei, Nr. 2, 300006, Timiºoara, România

In peptide synthesis an important step is the protection of amino function. For this reason it is needed to chose or design the appropriate protecting group. There many demands for a good amino-protecting group including ease of introduction in different amino acids and removal after peptide synthesis, stability under the reaction conditions, minimization of racemisation in chiral amino acids. The amino-protecting group reduces the nucleophilicity of nitrogen atom by conjugation with an electron-accepting group (urethane), by inductive electron withdrawing effect or by steric hindrance [1].

Keywords: amino-protecting group, chiral amino acids, alkoxycarbonylation, nucleophilicity

Grupele protectoare pentru funcþiunea amino prezintã importanþã în diverse etape ale sintezei organice, în special în sinteze de compuºi cu funcþiune mixtã care prezintã grupe aminice ce trebuie protejate. În general, protejarea unei anumite grupe funcþionale se realizeazã prin transformarea acesteia într-un derivat stabil în condiþiile de reacþie a etapelor de sintezã ulterioare ºi care, în final, poate regenera grupa supusã protejãrii, fãrã a afecta structural molecula sintetizatã [2]. Întrucât fiecare structurã este unicã, având atât proprietãþi chimice specifice pentru fiecare din grupele funcþionale existente cât ºi proprietãþi stereochimice distincte, la selectarea unei grupe protectoare este important sã se þinã seama de efectul global al acesteia în etapa de reacþie respectivã [3].

Protejarea grupei amino prin transformarea acesteia într-un carbamat este o metodã accesibilã ºi eficientã, întrucât la hidroliza acestora se formeazã acizii carbamici corespunzãtori, care se deacarboxileazã spontan în mediu neutru sau acid [4]. La protejarea funcþiunii amino din α-aminoacizi cu ajutorul carbonaþilor micºti de tipul alchil- sau arilalchil-*N*-hidroxisuccinimidil are loc eliminarea *N*-hidroxisuccinimidei, o grupã nucleofugã cu caracter slab acid în reacþiile de substituþii nucleofile, care nu influenþeazã grupele funcþionale sensibile la aciditate ºi nici nu conduce la racemizarea centrilor activi [5].

În lucrarea prezentã s-au studiat reacþiile de alcoxicarbonilare ale unor carbonaþi reactivi micºti de *N*-succinimidil cu diverse amine alifatice ºi α-aminoacizi cu formarea grupele protectoare de tip alchil-carbamat.

Partea experimentalã

Reactivi

Tetrahidrofuranul a fost anhidrificat prin distilare de pe sodiu metalic, acetonitonitrilul a fost anhidrificat prin distilare de pe pentaoxid de fosfor, tri-*n*-butilamina a fost uscatã pe hidrurã de calciu ºi distilatã în vid la 15 mmHg, izo-propilamina ºi izo-pentilamina au fost distilate de pe hidroxid de potasiu [6]. Alcoolul metilic a fost anhidrificat prin reflux ºi distilare de pe Mg ºi pãstrat pe site moleculare [9]. Fenilglicina au fost reactiv p.a. Acetatul de etil utilizat la purificarea carbamaþilor a fost reactiv p.a.

Analiza prin *cromatografie în strat subþire* (TLC) s-a efectuat pe plãcuþe de silicagel de $60F_{254}$; tehnica de lucru a fost unidimensionalã (eluent eter etilic). Detectarea s-a efectuat prin iradiere cu luminã UV (λ = 254 nm).

Spectrele în infraroºu: au fost înregistrate prin tehnica de lucru în pastilã, respectiv în film ºi în soluþie, iar urmãrirea reacþiilor în timp s-a realizat în cuve termostatate din sticlã cu geamuri de siliciu cu grosimea 0,137 mm cu un spectrofotometru FT-IR 430 Jasco.

Spectrele de rezonanþã magneticã (^{1}H-RMN ºi ^{13}C-RMN) s-au înregistrat la un spectrometru Bruker de 200 MHz. S-a folosit DMSO-d_6 (99,9% atom. %D) + 0,05% TMS (v/v) . Valorile deplasãrilor chimice (δ) în spectrele de ^{1}H-RMN se exprimã în ppm (pentru $CDCl_3$ δ = 7,27 ppm), iar constantele de cuplare (J) se exprimã în Hz.

Mod de lucru

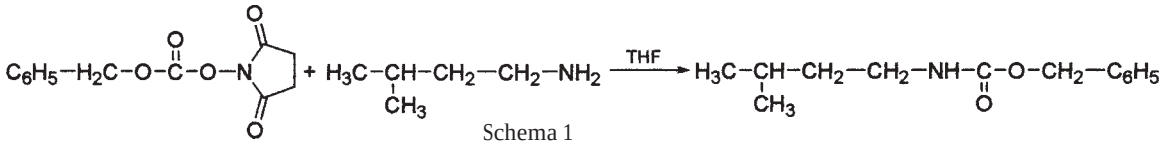
Reacþii de alcoxicarbonilare la amine alifatice

Studiul IR al reacþiei benzil-N-succinimidilcarbonat cu izopentilaminã

În literaturã sunt descrise mai multe reþete pentru reacþii de alcoxicarbonilare ale benzil-*N*-succinimidilcarbonatului cu diverse amine [8].

Reacþia de alcoxicarbonilare a izopentilaminei (0,029 mL, 0,25 mmoli) cu benzil-*N*-succinimidilcarbonat (0,062 g, 0,25mmoli) (schema 1) a fost studiatã prin spectroscopie de FT-IR, la un raport molar de 1:1, în mediu de tetrahidrofuran anhidru (10 mL) cu scopul de a urmãrii evoluþia în timp a reactanþilor ºi stabilirea timpului optim de reacþie (fig. 1).

În figura 1, spectrul nr. 1 corespunde soluþiei de benzil-*N*-succinimidilcarbonat în tetrahidrofuran. După adãugarea aminei, în spectrul nr. 2 se poate observa apariþia unor benzi, a cãror poziþie ºi intensitate rãmâne constantã, corespunzãtoare $\nu_{c=o}$ la aproximativ 1726, respectiv 1684



Schema 1

* email: s_adinaelena@yahoo.com , tel. (+40) 0256 404232

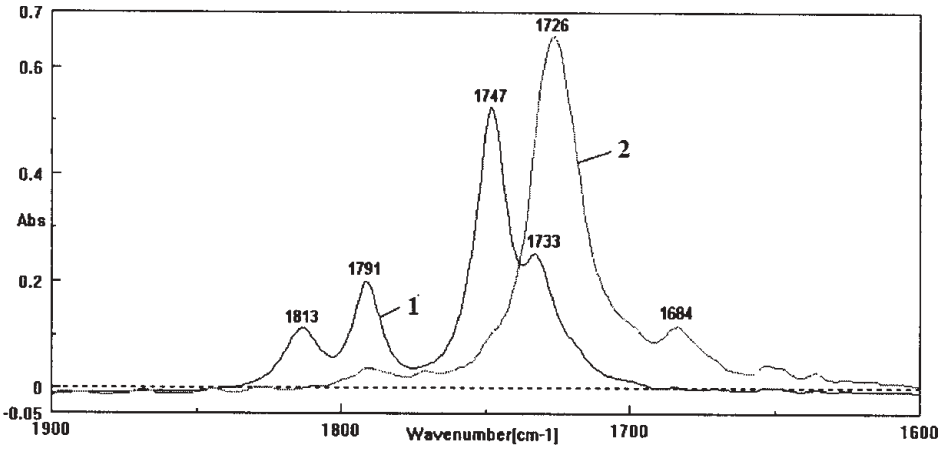


Fig. 1. Studiul reacţiei dintre benzil-N-succinimidilcarbonat (ZOSu) şi izopentilaminã

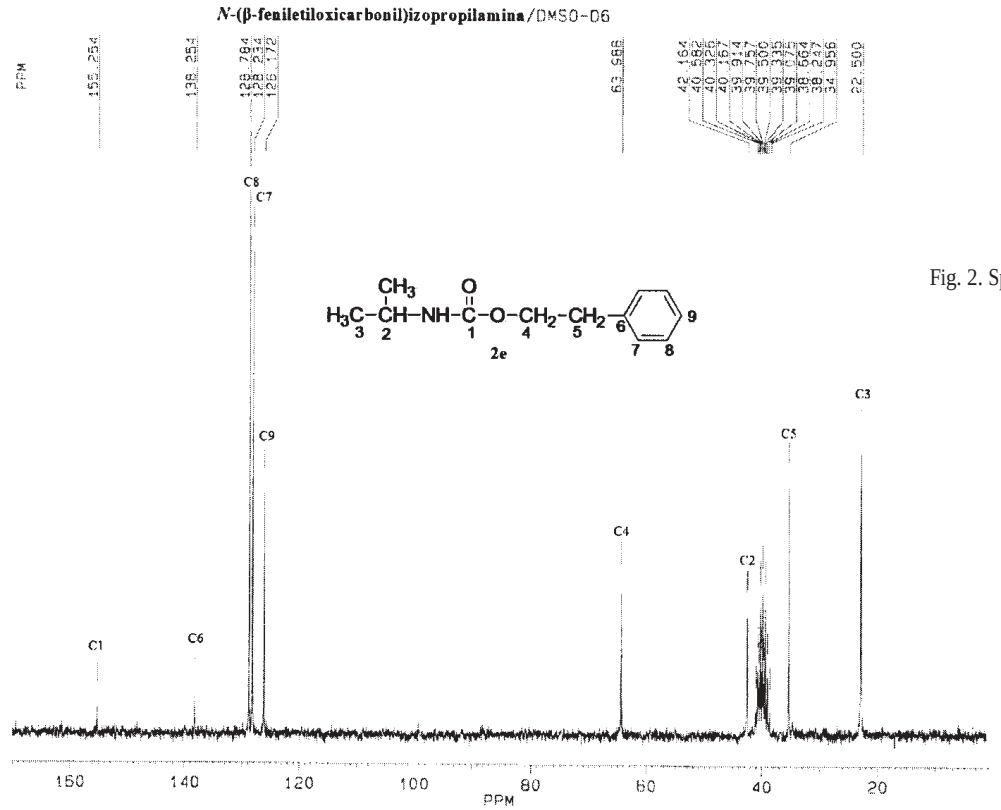
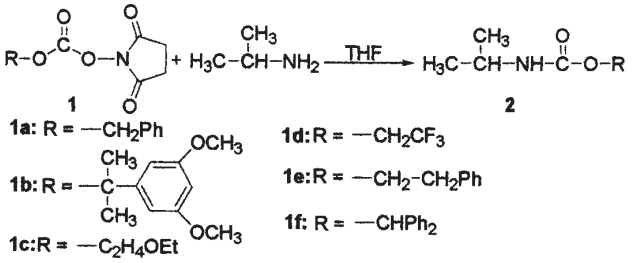


Fig. 2. Spectrul ^{13}C-RMN al compusului 2e

cm^{-1} atribuite carbamatului şi dispariţia benzilor corespunzãtoare $\nu_{c=o}$ la aproximativ 1813, 1891 şi respectiv 1747 cm^{-1} atribuite carbonatului mixt. Cele douã benzi ce corespund $\nu_{c=o}$ din carbamat în soluţie la 1726 şi 1648 cm^{-1} sunt regãsite şi în spectrul de FT-IR efectuat în pastilã pentru *N*-(benziloxicarbonil)izopentilaminã izolat la 1723, 1707 cm^{-1}.

IR (cm^{-1}): 3354m, 3090s, 3066s, 3034s, 1782u, 1723i, 1707i, 1650u, 1608u.

CSS (eluent diclorometan) (Rf %): 0,73 pentru carbamat şi 0,82 pentru carbonat mixt.



Schema 2. Reacţia generalã de alcoxicarbonilare α *i*-propilaminei cu carbonaţii micşti de succinimidil

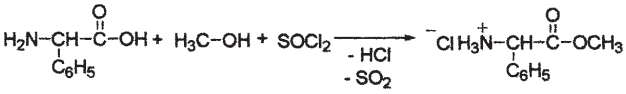
Reacţii de alcoxicarbonilare a izopropilaminei cu alchil- şi arilalchil-N-succinimidilcarbonaţi (2a-2f)

La o soluţie de carbonat mixt (0,421g, 1,689 mmoli) în 10 ml THF se adaugã amina (0,14 mL, 1,689 mmoli) şi este pãstratã sub agitare la temperatura camerei 24 h. Solventul este apoi evaporat la vid, iar reziduu este preluat cu acetat de etil (5 mL), apoi spãlat cu apã (3 mL). Stratul organic se spalã cu soluţie saturatã de $NaHCO_3$ (3mL), apã (3mL) şi soluţie saturatã de NaCl (3mL), apoi se usucã pe Na_2SO_4 anhidru. Dupã filtrare solventul se evaporã la vid [8] (schema 2).

Reacţii de protejare a grupei amino din α-aminoacizi cu carbonaţi micşti de succinimidil

Esterificarea aminoacidului

Reacţia de esterificare a fenilglicinei (schema 3) s-a realizat printr-o reacţie într-o singurã etapã cu metanol şi clorurã de tionil, obţinându-se clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei cu randament aproape cantitativ [7].



Schema 3. Esterificarea fenilglicinei

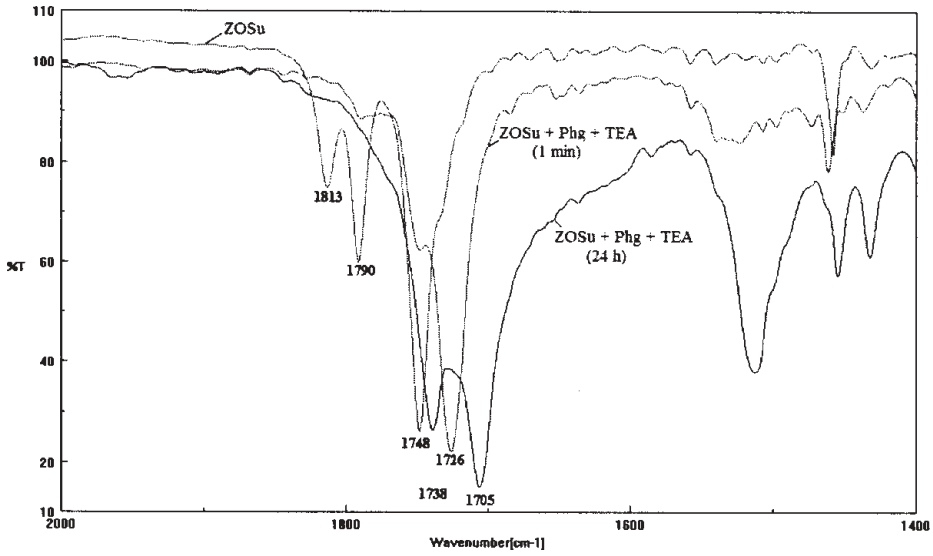


Fig. 3. Studiul reacţiei dintre benzil-N-succinimidilcarbonat şi clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei (ZOSu+Phg+TEA)

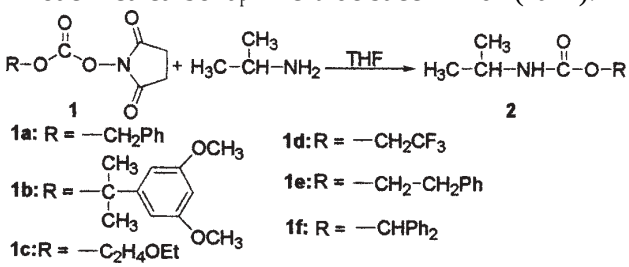
Într-un balon cu două gâturi prevăzut cu un agitator magnetic se introduc 20 mL (495 mmoli) alcool metilic se răcesc la -5°C într-o baie de gheaţă şi sare, după care se adaugă în picurături 8,5 mL (72,7 mmoli) clorură de tionil, menţinând răcirea şi agitând puternic. După adăugarea clorurii de tionil, în aceleaşi condiţii, se adaugă, în porţiuni mici, 10 g (66,2 mmoli) fenilglicină. După adăugarea întregii cantităţi de aminoacid se menţine agitarea cu încălzirea masei de reacţie până la 40°C timp de 1 h. La răcire se obţine un precipitat, care este filtrat şi apoi uscat. Timpul de reacţie aproximativ este de 3 h. Se obţine 12,2 g produs alb (η = 95,73 %). Compusul a fost caracterizat prin punct de topire (187,5- 189,5°C) şi spectroscopie de IR

IR (cm^{-1}, pastilă KBr): 3460s, 3407u, 2981u, 2958u, 2855i, 2700s, 2621m, 2361s, 2034s, 1742i, 1579m, 1509m, 1494u, 1459s, 1430, 778m, 738i, 696i, 668s.

Studiul reacţiei dintre benzil-N-succinimidilcarbonat (ZOSu) şi clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei (3a)

S-a considerat că alcoxicarbonilarea clorhidraţilor esterilor metilici ai aminoacizilor cu carbonaţii reactivi de succinimidil ar trebui să se desfăşoare în condiţii similare cu obţinerea carbamaţilor din amine alifatice. Reacţia dintre benzil-*N*-succinimidilcarbonat (ZOSu) şi clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei în prezenţa tri-*n*-butilaminei (T*n*BA), la un raport molar al reactanţilor de 1:1:1, în mediu de tetrahidrofuran a fost urmărită prin spectroscopie de FT-IR în scopul urmăririi evoluţiei în timp a reactanţilor, produşilor de reacţie şi determinarea timpului optim de perfectare a sintezei (fig. 3). Primul spectru înregistrat (ZOSu) este pentru soluţia de benzil-*N*-succinimidil-carbonat în tetrahidrofuran. Deoarece, clorhidratul esterului metilic se dizolvă în soluţia de benzil-*N*-succinimidilcarbonat (Z-OSu) în tetrahidrofuran doar în prezenţa aminei, următorul spectru de IR înregistrat a fost după un minut de la adăugarea tri-*n*-butilaminei. Se poate observa că are loc dispariţia benzii de la 1813 şi scăderea benzilor de la 1790 şi 1748, atribuite carbonatului mixt precum şi apariţia benzii de la 1726 cm^{-1}. După 24 h, de la amestecarea reactanţilor, în spectrul de FT-IR se constată că banda de la 1790 a dispărut complet şi au apărut benzile la 1738, 1705 cm^{-1} corespunzătoare carbamatului, benzi care nu se mai modifică în timp (după încă 72 h de reacţie). Din acest motiv, se consideră că reacţia de alcoxi-carbonilare a clorhidratului esterului metilic al fenilglicinei cu carbonaţii micşti de succinimidil are loc în 24 h, la temperatura camerei.

Reacţia generală de protejare a grupei amino din α-aminoacizi cu carbonaţi micşti de succinimidil (4a-4f):



Schema 4. Reacţia de alcoxicarbonilare cu clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei

Rezultate şi discuţii

Reacţii de alcoxicarbonilare la amine

Studiul reacţiei benzil-*N*-succinimidilcarbonat cu izopentilamină prin spectroscopie de FT-IR a condus la concluzia că reacţia este perfectată imediat după adăugarea aminei în masa de reacţie.

S-au efectuat reacţii de protejare a grupei amino din izopropilamină cu ajutorul carbonaţilor micşti de *N*-succinimidil: benzil-*N*-succinimidilcarbonat (1a), α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenzil-*N*-succinimidilcarbonat (1b), 2-etoxietil-*N*-succinimidilcarbonat (1c), 2,2,2-trifluoroetil-*N*-succinimiilcarbonat (1d), β-feniletil-*N*-succinimidil-carbonat (1e) şi difenilmetil-*N*-succinimidilcarbonat (1f) cu formarea de *N*-izopropilcarbamaţilor de alchil corespunzători (sub formă de uleiuri). Rezultatele sunt prezentate în tabelul 1.

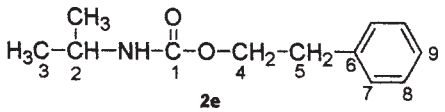
Tabelul 1

REACŢII ALE CARBONAŢILOR MICŞTI CU AMINE

Compus	η (%)	CSS	IR (cm^{-1})
2a	90,1	0,69	3328, 1721, 1706, 1686, 1652
2b	87,9	0,65	3313, 1771, 1712, 1647, 1607
2c	89,1	0,78	3327, 1723, 1699, 1656
2d	80,7	0,75	3312, 1756, 1725, 1656, 1610
2e	95,8	0,73	3327, 1683, 1652, 1603
2f	84,6	0,70	3367, 1723, 1692, 1656, 1603

Analiza prin spectrometrie de ^{1}H-RMN şi ^{13}C-RMN a produşilor 2e şi 2f a demostrat faptul că s-au obţinut produşii puri.

N-(β-Feniletiloxicarbonil)izopropilamina (2e)



2e

Tabelul 2

REACÞII ALE CARBONAÞILOR MIC ªTI CU α-AMINOACIZI

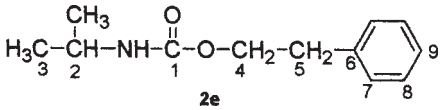
Compus	η (%)	CSS	IR (cm^{-1})
3a	87,7	0,36	3338, 1737, 1727, 1705, 1660, 1602
3b	67,7	0,47	3297, 1768, 1744, 1681, 1659, 1651, 1605
3c	90,7	0,53	3333, 1745, 1721, 1603
3d	69,8	0,59	3343, 1745, 1713, 1679, 1601
3e	79,1	0,77	3342, 1750, 1723, 1702, 1603,
3f	81,2	0,70	3359, 1738, 1697, 1603

^{1}H-RMN (DMSO-D6): 7,26m, 7,00d, 4,17m, 3,61q, 2,86t, 1,05d.

^{13}C-RMN (DMSO-D6): 155,2(C_1), 138,2(C_6), 128,7(C_8), 128,2(C_7), 126,1(C_9), 66,2(C_4), 42,1(C_2), 34,9(C_5), 22,5(C_3).

În spectrul de ^{13}C-RMN realizat pentru compusul 2e se regãseºte semnalul de la 155 ppm, care corespunde carbonului carbonilic de tip carbamat, ceea ce demonstrează obþinerea *N*-(β-feniletiloxicarbonil) izopropilamina (fig. 2).

N-(Difenilmetiloxicarbonil)izopropilamina (2f)



2e

^{1}H-RMN (DMSO-D6): 7,36m, 6,68s, 3,61m, 3,37s, 1,06d.

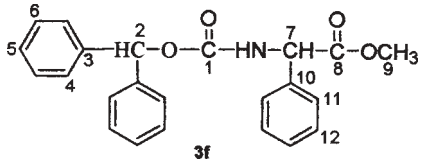
^{13}C-RMN (DMSO-D6): 154,4(C_1), 141,3(C_5), 128,2(C_7), 127,6(C_6), 126,4(C_8), 75,6(C_4), 42,3(C_2), 22,4(C_3).

Reacþii ale carbonaþilor micºti cu α-aminoacizi

Pe baza studiului de FT-IR efectuat asupra reacþiei dintre benzil-N-succinimidilcarbonat (ZOSu) ºi clorhidratul esterului metilic al fenilglicinei s-a efectuat reacþii de protejare a grupei amino din clorhidratul esterului metilic al feniglicinei cu carbonaþi micºti de succinimidil ºi s-au obþinut următorii compuºi: esterul metilic al *N*-(benziloxicarbonil)fenilglicinei (**3a**), esterul metilic al *N*-(α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenziloxicarbonil)fenilglicinei (**3b**), esterul metilic al *N*-(2-etoxietiloxicarbonil) fenilglicinei (**3c**), esterul metilic al *N*-(2,2,2-trifluoro-etiloxicarbonil) fenilglicinei (**3d**), esterul metilic al *N*-(β-feniletiloxicarbonil)fenilglicinei (**3e**) ºi esterul metilic al *N*-(difenilmetiloxicarbonil)fenilglicinei (**3f**). Produºii au fost obþinuþi sub formã de uleiuri.

Rezultatele sunt prezentate în tabelul 2.

Compusul 3f a fost caracterizat ºi prin spectroscopie de ^{1}H-RMN ºi ^{13}C-RMN.



3f

^{1}H-RMN(DMSO): 7,39d, 6,7s, 5,29d, 3,6s, 3,38s.

^{13}C-RMN(DMSO): 171(C_8), 155(C_1), 141(C_3), 136(C_{10}), 128,4(C_{11}), 128, 2(C_6), 127,7(C_{12}), 127,4(C_4), 126,5(C_5), 76,6(C_2), 57,9(C_7), 52(C_9).

Spectrul de ^{1}H-RMN al esterului metilic al *N*-(difenilmetiloxicarbonil)fenilglicinei, produsul 3f, (fig. 4) evidenþiazã prezenþa semnalelor de la (δ 7,39) corespunzãtor protonilor a (d, 15H), (δ 6,7) pentru protonii b (s, 1 H), (δ 5,29) pentru protonii c (d, 1H), (δ 3,6) pentru protonii d (s, 3H) ºi (δ 3,38) pentru protonii e (s, 1H).

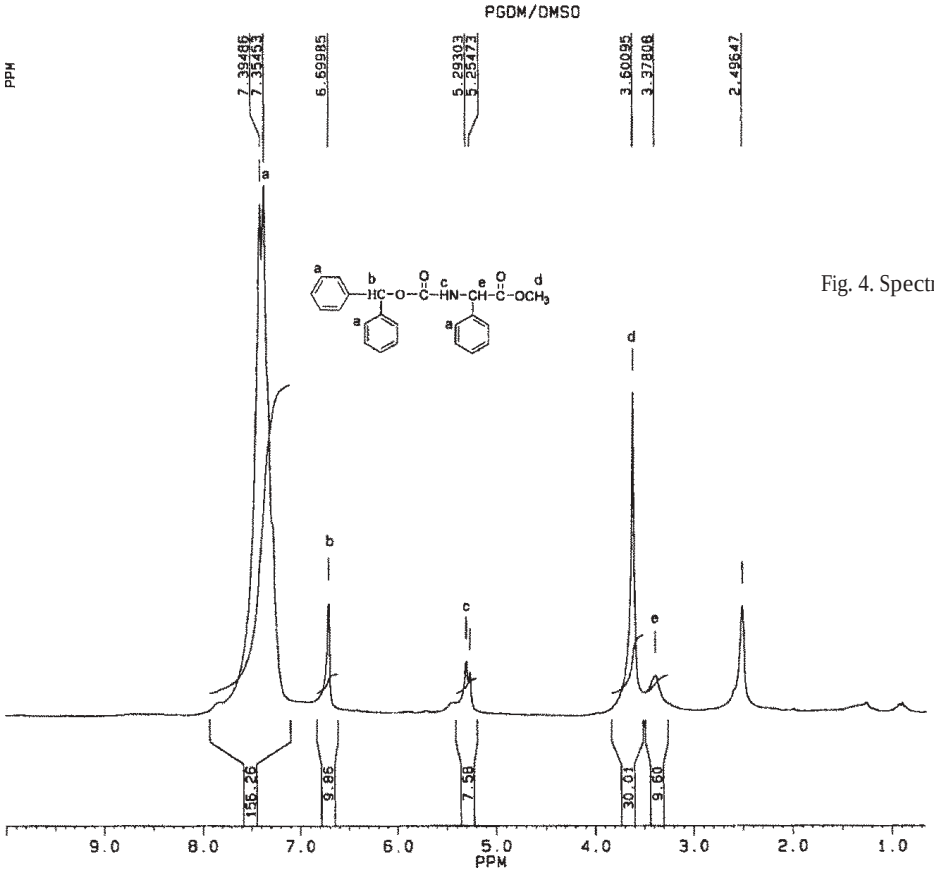


Fig. 4. Spectrul de ^{1}H-RMN al compusului **3f**

Concluzii

S-au sintetizat cu randamente bune, ºase carbamaþi de *N*-izopropil cu alchil ºi alchil-aril carbonaþi micºti de *N*-succinimidil, printre care ºi grupe protectoare cunoscute: grupa benzil sau grupa α,α-di-metil-3,5-dimetoxibenzil. Faþã de metoda din literaturã, care preciza cã timpul de reacþie este cuprins între 1-24 h, în urma observaþiilor experimentale s-a efectuat un studiu de IR, care a relevat faptul cã în cazul reacþiile de alcoxicarbonilare în cazul benzil-*N*-succinimidilcarbonat cu aminele alifatice timpul de reacþie a fost minim. Urmãrirea reacþiilor prin cromatografie în strat subþire a permis, de asemenea, determinarea mometului final al reacþiei.

Utilizarea carbonaþii organici reactivi de succinimidil drept agenþi de protejare a grupei amino din α-aminoacizilor a fost demostratã prin efectuarea a ºase reacþii cu clorhidratul esterului metilic al feniglicinei. S-a realizat unu studiu de monitorizare prin FT-IR care a permis determinarea timpului de reacþie. Reacþiile de alcoxicarbonilare la α-aminoacizi au decurs în condiþii blânde, cu randamente ridicate. Produºii au fost caracterizaþi prin spectroscopie de FT-IR, cromatografie în strat subþire ºi prin spectroscopie de ^{1}H-RMN ºi ^{13}C-RMN.

Bibliografie

1.GREENE, T., WUTS, P.G.M, Protective groups in organic synthesis, Wiley New York, 1999

2.PILLAI, R.V.N., Photoremovable Protecting Groups in Organic Synthesis, Synthesis, International Journal of Methods in Synthetic Organic Chemistry, 1980 , nr. 1, p. 1

3.KOCIENSKI, P.J., Protecting Groups, Ed. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1994

4.NORBERT SEWARD, HANS-DIETER JAKUBKE, Peptide: Chemistry and Biology, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co.,Weinheim, 2002

5. SHAIKH, A. G., SIVARAM, S., Organic Carbonates, American Chemical Society, Chemical Reviews, **96**, nr. 3, 1996, p. 951

6.AMAGO, W.F., PERRIN, D.D., Purification of Laboratory Chemicals, fourth edition, Butterworth-Heinamann, Oxford, 1996

7.BRENER, M., HUBER W., Helv. Chim. Acta, 36(5), 1953, 1109

8.HATTORI, K., SAJIKI, H., HIROTA, K., Tetrahedron, 2000, 56, p. 8433

9.*** Organic Synthesis, **2**, Wiley New York, 1955, p. 167

Intrat în redacþie: 15.02.2007