

2006-149



**TÜRKİYE BİLİMSEL VE  
TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU**

THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL  
RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

**AKTİF NORBORNEN-HEKZAKLORONORBORNEN KİRAL ESTER,  
ASİT ve ALKOLLERİN ENZİMATİK YÖNTEMLE ELDESİ**

**PROJE NO: TBAG-2454(104T066)**

**Temel Bilimler Araştırma Grubu**  
Basic Sciences Research Grant Committee

Q

2006\_73951

515

**BİYOAKTİF NORBORNEN-HEKZAKLORONORBORNEN KİRAL ESTER,  
ASİT ve ALKOLLERİN ENZİMATİK YÖNTEMLE ELDESİ**

**PROJE NO: TBAG-2454(104T066)**

**PROF. DR. İDRİS MECİDOĞLU AHMEDOV  
ARŞ. GÖR. AYŞEGÜL GÜMÜŞ  
TİMUR KARADAĞ  
ARŞ. GÖR. EMRE YUSUF YAZICIOĞLU**

**Haziran 2006  
ANKARA**

## ÖNSÖZ

Tamamlanan bu projede, norbornen, heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien alkol ve esterlerinin asimetrik sentezi enzimatik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Hedeflenen moleküller yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmiş olup, hepsinin mutlak konfigürasyonları tayin edilmiştir. Proje, Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

Kiral norbornen ve heksakloronorbornen karboksilik asit, ester ve alkol bileşiklerinin asimetrik sentezi literatürde önemli bir yer tutmaktadır. Bu konudaki çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu maddeler özellikle prostaglandin maddelerinin sentezinde anahtar bileşik olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, hedeflenen maddelerin asimetrik sentezi için enzimatik rezolüsyon yöntemi seçilmiştir. Katalitik miktarda kullanılmaları, yüksek enantiyomerik seçiciliğe sahip olmaları ve de çevreyle uyumlu olmaları nedeniyle, enzimler asimetrik sentezde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmada öncelikle heksakloronorbornen ve heksakloronorbomadien karboksilik asit, ester ve alkol türevleri heksaklorosiklopentadienin alil alkol, proparjil alkol ve akrilik asitle Diels-Alder tepkimesi aracılığıyla rasemik olarak sentezlenmiştir. Elde edilen rasemik ürünler çeşitli hidrolaz tipi enzimlerle enzimatik rezolüsyona tabi tutulmuş ve hedef ürünler yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmişlerdir. Ürünlerin mutlak konfigürasyonları, onları deklorlaşma tepkimesiyle kendilerine karşılık gelen norbornen ve norbornadien türevlerine dönüştürmek ve optikçe çevirme açılarını literatürdeki değerleriyle karşılaştırmak vasıtasıyla belirlenmiştir.

### Anahtar Sözcükler

Enzimatik rezolüsyon, heksakloronorbornen, mutlak konfigürasyon, deklorlaşma.

## ABSTRACT

The asymmetric synthesis of norbornene and hexachloronorbornene acid, ester and alcohol derivatives is an important topic in the literature. They are especially used as building blocks in the synthesis of prostaglandins.

In this study, enzymatic resolution approach was chosen for the asymmetric synthesis of the target molecules. Enzymes are widely utilized in asymmetric synthesis since they are used in catalytic amounts, they work with high enantioselectivity and they are compatible with the environment. During the study, racemic hexachloronorbornene and hexachloronorbornadiene acid, ester and alcohol derivatives were first synthesized through the Diels-Alder reaction of hexachlorocyclopentadiene and allyl alcohol, propargyl alcohol and acrylic acid. The resultant racemic products were subjected to enzymatic resolution and the target molecules were obtained in high enantiomeric purity. Their absolute configurations were assigned by converting them to the corresponding norbornene and norbornadiene derivatives via their dechlorination reactions and then comparing their optical rotation values with those in the literature.

### Keywords

Enzymatic resolution, hexachloronorbornene, absolute configuration, dechlorination.

## İÇİNDEKİLER

1. Giriş.....	1
1.1. Konu.....	1
1.2. Amaç.....	2
1.3. Kapsam.....	3
2. Gelişme.....	4
2.1. Rasemik heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien bileşiklerinin sentez çalışmaları.....	4
2.2. Rasemik heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien bileşiklerinin enzimatik kinetik ayırma yöntemiyle enantiyomerlerine ayrılması çalışmaları.....	11
2.3. Enantiyomerce zenginleştirilmiş heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien bileşiklerinin mutlak konfigürasyonlarını belirleme çalışmaları.....	17
3. Sonuç.....	24
4. Referanslar.....	26

## FIGÜRLER

- Figür 1. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 2. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 3. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün IR spektrumu
- Figür 4. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 5. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 6. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın IR spektrumu
- Figür 7. Bisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 8. 1,4,5,6,7,7 -Hekzaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 9. 1,4,5,6,7,7 -Hekzaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 10. 1,4,5,6,7,7 -Hekzaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit'in IR spektrumu
- Figür 11. Metil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboksilat'ın  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

- Figür 12. Metil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboksilat'ın  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 13. 2-Hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 14. 2-Hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 15. 2-Asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 16. 2-Asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 17. 2-Hidroksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 18. 2-Hidroksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 19. 2-Asetoksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 20. 2-Asetoksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 21. Bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien-2-karbaldehit'in  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 22. Trisiklik hemiketal yapının  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu
- Figür 23. Trisiklik hemiketal yapının  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu
- Figür 24. Rasemik (1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın HPLC kromatogramı
- Figür 25. Enantiyomerce zenginleştirilmiş (1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın HPLC kromatogramı



## 1. Giriş

### 1.1. Konu

Hekzaklorosiklopentadienin (HKSPD) Diels-Alder tepkimesi literatürde ayrıntılı olarak incelenmiş ve ilginç özellikler gösterdiği bulunmuştur. Bunlardan ilki HKSPD'in invers Diels-Alder tepkimesine girebilmesidir. Klor atomlarının yüksek indüktif etkisinden dolayı dienin LUMO (en düşük enerjili boş orbital) enerjisi düşmekte ve bu yüzden genelde gözlenenin aksine elektronca zengin dienofillerle daha iyi etkileşerek yüksek verimle tepkimeye girebilmektedir. HKSPD'nin ikinci özelliği de Diels-Alder tepkimesi sırasında sadece *endo* ürün açığa çıkarmasıdır. Bu durum C5 pozisyonundaki klor atomlarının sterik etkisiyle açıklanabilir.<sup>1</sup>

Poliklorlu norbornen türevleri, klor atomlarının çeşitli fonksiyonel gruplara dönüştürülebilmelerinden dolayı son yıllarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir.<sup>2</sup> Yadav ve F. A. Khan tarafından yapılan çalışmalarda tetrakloro-dimetoksi norbornen tipi bileşiklerden yola çıkarak çeşitli ilaç maddeleri **rasemik** olarak sentezlenmiştir.<sup>3-7</sup> Ayrıca Duke ve Wells'in yaptığı çalışmalarda optikçe aktif heksakloronorbornen karboksilik asit türevi, çeşitli biyolojik aktif molekülleri yüksek performanslı sıvı kromatografisinde ayırmak için kullanılmıştır.<sup>8-10</sup>

Bu tür bileşiklerin bir başka özelliği de sıvı amonyak içinde sodyumla kolaylıkla tepkimeye girerek deklorlaşma tepkimesi verebilmeleridir.<sup>11</sup> Bilindiği üzere klorlu organik bileşikler zehirli özelliklere sahip doğaya zararlı maddelerdir. Dolayısıyla HKSPD'nin siklopentadienden farklı olarak gösterdiği özelliklerden ve klor atomlarının işlevlendirilebilmesinden yararlandıktan sonra elde edilen maddeler deklorlaşma tepkimesine sokularak, çeşitli biyoaktif maddeler sentezlenebilmektedir. Proje kapsamında da bu yöntem kullanılarak heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien türevleri enantiyomerce saflaştırıldıktan sonra deklorlaşma tepkimesi aracılığıyla optikçe aktif norbornen ve norbornadien türevlerinin sentezi amaçlanmıştır. Norbornen ve norbornadien türevleri biyolojik olarak çok önemli işleve sahip **prostaglandin** bileşiklerinin sentezinde başlangıç maddeleri olarak kullanılmaktadır.<sup>12-13</sup>

## 1.2. Amaç

Klorlu organik bileşiklerin rasemik sentezi literatürde ayrıntılı olarak ele alındığı halde, asimetric sentezine dair çok az örnek bulunmaktadır. Halbuki Bölüm 1.1.'de bahsi geçen bileşiklerin ilaç sentezinde başlangıç maddeleri olarak kullanılabilmeleri için **enantiyomerce saf olmaları gerekmektedir**. Ayrıca optikçe aktif norbornen tipi bileşikler kiral ligand olarak kullanılmalarından dolayı büyük öneme sahiplerdir.<sup>14</sup> Bu yüzden kapsam bölümünde ayrıntılı olarak anlatılacağı üzere, bu çalışmadaki amaç norbornen, heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien asit, alkol ve ester türevinin enzimatik rezolüsyon yöntemiyle asimetric sentezinin gerçekleştirilmesidir. Enantiyomerce zenginleştirilen bu maddelerin çeşitli ilaç maddelerinin sentezinde kullanılması ve böylelikle akademik bir çalışma düzeyinde kalmayarak endüstride doğrudan uygulama alanı bulması amaçlanmıştır.

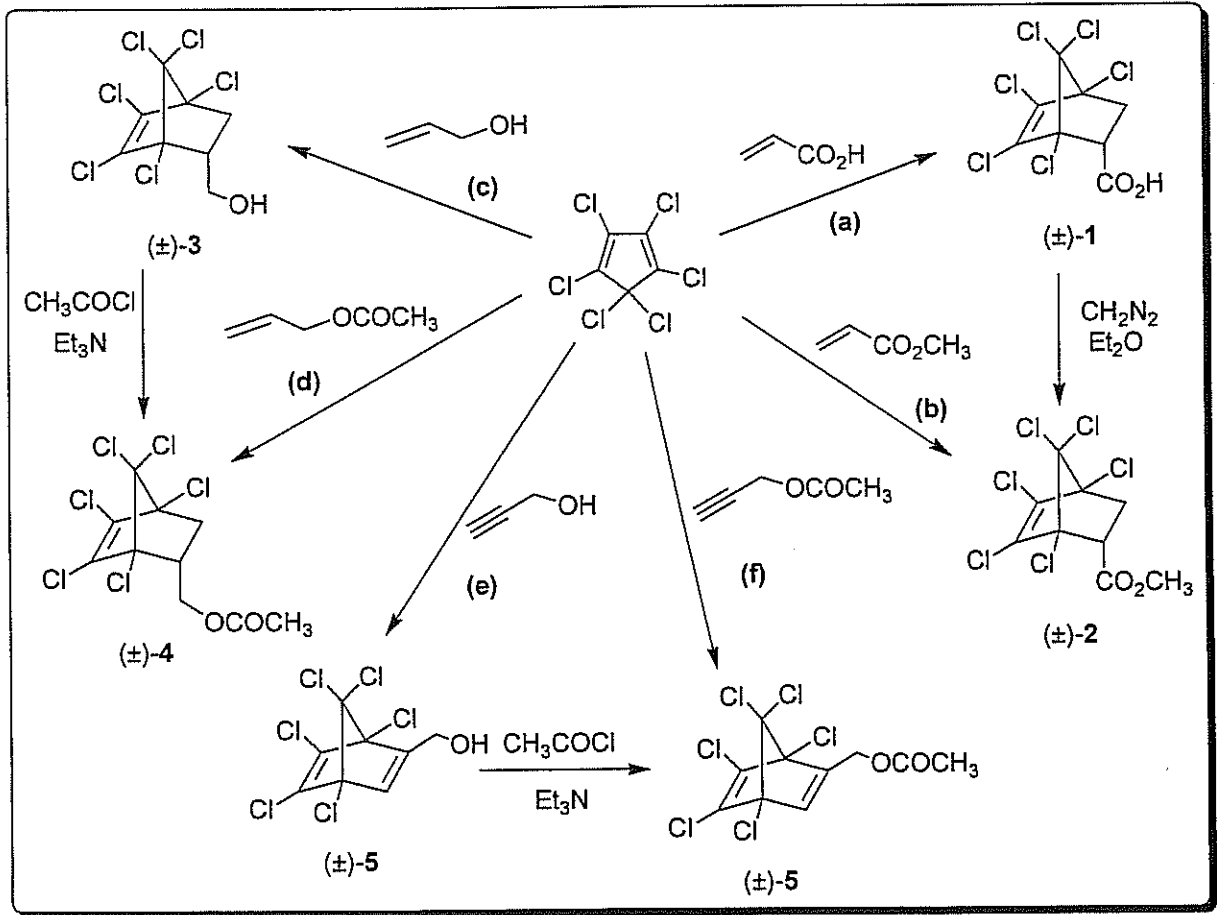
### 1.3. Kapsam

Hedeflenen maddelerin asimetric sentezi sırasında enzimlerin kullanılması planlanmıştır. Bilindiği üzere enzimler doğadaki biyolojik süreçlerde katalizör olarak görev alırlar ve çok yüksek enantiyo-seçiciliğe sahiptirler. Diğer asimetric sentez yöntemlerinde kullanılan kiral ligand taşıyan metal-kompleks katalizörlerinin aksine doğadan elde edildikleri için çevreye zararlı değildirler. Ayrıca tepkime sırasında katalitik miktarlarda kullanılmaları yöntemi cazip kılmaktadır. Bu yüzden, projenin ilk aşamasında rasemik olarak sentezlenmesi planlanan heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien karboksilik asit, ester ve alkol türevleri enzimatik asetil transferi ve enzimatik hidroliz tepkimelerine tabi tutulacaktır. Bu tepkimeler sırasında da bol bulunan ve pahalı olmayan hidrolaz tipi enzimlerin kullanılması planlanmıştır. Hidrolaz tipi enzimler diğerlerine nazaran daha kolay elde edilebildikleri ve etkinlik gösterebilmeleri için herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymadıkları için sentetik organik kimyada en çok kullanılan enzim sınıfıdır. Elde edilen maddelerin karakterizasyonu NMR spektroskopisi yöntemiyle gerçekleştirilecektir. Enantiyomerce zenginleştirilen hedef moleküllerin enantiyomerce saflık derecelerinin ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve polarimetre yardımıyla belirlenmesi planlanmıştır. Hedef moleküllerin mutlak konfigürasyonları ise moleküller deklorlaşma tepkimesine sokularak oluşan norbornen ve norbornadien türevlerinin optikçe çevirme açılarının literatürde var olan değerlerle karşılaştırılarak tayin edilecektir. Böylelikle hem enantiyomerce zenginleştirilen maddelerin mutlak konfigürasyonu tayin edilecek hem de zararlı klorlu bileşiklerden prostaglandinlerin başlangıç maddeleri olan norbornen ve norbornadien tarzı bileşikler enantiyomerce saf bir halde elde edilmiş olacaktır.

## 2. Gelişme

### 2.1 Rasemik heksakloronorbomen ve heksakloronorbornadien bileşiklerinin sentez çalışmaları

Projenin ilk aşamasını, ileriki aşamalarda enzimatik kinetik ayırma yöntemiyle enantiyomerlerine ayrılacak olan çeşitli heksakloronorbomen ve heksakloronorbornadien tipi bileşiklerin rasemik sentezi oluşturmaktadır. Uygulanan yöntem sentetik organik kimyada halkalı bileşiklerin sentezinde sıklıkla kullanılan Diels-Alder yöntemidir. İstenen bileşiklerin sentezi için heksaklorosiklopentadien (HKSP), alil ve proparjil alkol ve onların asetat esterleri ve akrilik asit ve onun metil esteriyile Diels-Alder tepkimesine sokulmuştur. İzlenen yöntem Şema 1'de gösterilmektedir.

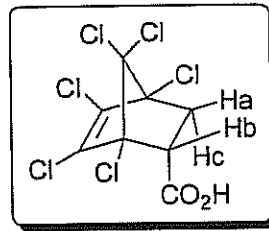


Şema 1

Şema 1'de görüldüğü gibi heksaklorosiklopentadien ile akrilik asidin Diels-Alder katılma tepkimesi, reaktiflerin 1:1 oranında ve çözücü olarak asetik asit kullanılarak 10 saat geri soğutma altında gerçekleştirilmiş ve rasemik ürün 1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboksilik asit ( $\pm$ )-1 % 97 verim ile elde edilmiştir. Aynı tepkime koşullarında, akrilik asit yerine metil akrilat kullanıldığında elde edilen metil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboxilat ( $\pm$ )-2 bileşiğinin veriminin % 40-45'e düştüğü gözlemlenmiştir. Verimin düşük olmasının nedeni, metil akrilatın tepkime ortamında polimerleşmesidir. Polimerleşmenin oluşmasını önlemek için inhibitör olarak eklenen hidrokinon'un miktarı artırılmış, buna rağmen polimerleşmenin önüne geçilememiştir. Bu sebepten dolayı, ( $\pm$ )-2 maddesinin yüksek verimle elde edilmesini sağlamak için Şema 1'de gösterildiği gibi (a) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde daha önce yüksek verimle elde edilen ( $\pm$ )-1 bileşiği, diazometan ile tepkimeye sokularak ( $\pm$ )-2 bileşiği yüksek verimle elde edilmiştir (% 95). Her iki bileşik de hekzan çözücüsü içerisinde üçer defa rekristalize edilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünlerin yapı tayinleri  $^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  spektroskopisi yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir.

( $\pm$ )-1 bileşiğinin sentezi için izlenen deney prosedürü aşağıdaki gibidir:

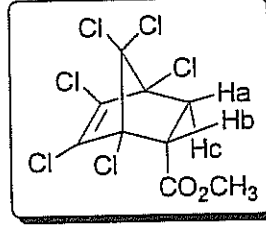
2.7 g HKSP, 1.0 g akrilik asit ve birkaç kristal hidrokinon ile 10 mL asetik asit içerisinde çözülerek 10 saat geri soğutma altında ısıtılmıştır. Tepkime karışımı oda sıcaklığına getirildikten sonra, tepkimeye girmeyen başlangıç maddelerinin karışımı ve çözücü olarak kullanılan asetik asit vakum distilasyonu ile ayrılmış ve 3.29 g (% 97), erime noktası 178 °C olan ( $\pm$ )-1 bileşiği elde edilmiştir. ( $\pm$ )-1 maddesinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  verileri aşağıda gösterilmektedir:



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.50 (dd, 1H, Hc,  $J = 4.8$  ve  $12.5$  Hz)  
2.82 (dd, 1H, Ha,  $J = 8.5$  ve  $12.5$  Hz)

3.68 (dd, 1H, Hb,  $J = 4.5$  ve  $8.5$  Hz)  
 $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 15.1, 31.0, 77.0, 78.8, 110.0, 137.2, 137.8, 181.0.

( $\pm$ )-2 maddesinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  verileri aşağıdaki gibidir:



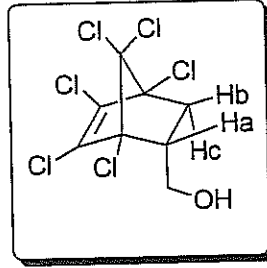
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.55 (dd, 1H, Hc,  $J = 4.2$  ve  $12.7$  Hz)  
2.67 (dd, 1H, Ha,  $J = 9.0$  ve  $12.7$  Hz)  
3.60 (dd, 1H, Hb,  $J = 4.2$  ve  $9.0$  Hz)  
3.70 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{O-}$ )

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 12.5, 25.3, 50.5, 75.0, 77.1, 105.0, 106.0, 136.0, 136.5,  
176.0.

Daha sonra pojede gösterildiği gibi 1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol ( $\pm$ )-3 ve (1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il)metil asetat ( $\pm$ )-4 elde etmek için hekzaklorosiklopentadien ile alil alkolün Diels-Alder tepkimesi incelenmiştir. Bilindiği üzere hekzaklorosiklopentadien ile alil alkolün 1:1.5 oranında 130-140 °C sıcaklıkta ve 8 saat süresinde % 60-70 verimle ( $\pm$ )-3 bileşiği elde edilmiştir. ( $\pm$ )-3 bileşiğinin verimini arttırmak amacıyla literatürden farklı olarak aşağıdaki yöntem kullanılmıştır:

5.46 g HKSP ve 1.74 g alil alkol karşımı havası alınmış kapalı tüpte 10 saat süreyle, 140-145 °C sıcaklıkta tutulmuştur. Daha sonra kapalı tüp oda sıcaklığına getirilerek açılmış ve tepkimeye girmeyen başlangıç maddeleri vakum distilasyonu ile ayrılmıştır. Geriye kalan siyah renkli yağmsı madde üç defa soğuk metanolde rekristalize edilerek 4.8 g (% 85),

erime noktası 167 °C olan beyaz (±)-3 kristalleri elde edilmiştir. (±)-3 maddesinin <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C-NMR verileri aşağıdaki gibidir:



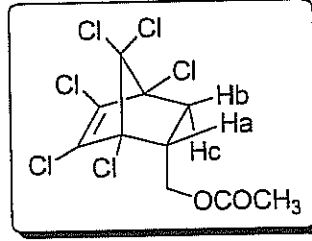
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.92 (dd, 1H, Hc, *J* = 4.2 ve 12.8 Hz)  
2.66 (dd, 1H, Hb, *J* = 8.8 ve 12.8 Hz)  
3.06 (m, 1H, Ha, *J* = 4.2, 5.9, 7.6 ve 8.8 Hz)  
3.50 (dd, 1H, -CH<sub>2</sub>O-, *J* = 7.6 ve 11.2 Hz)  
3.80 (dd, 1H, -CH<sub>2</sub>O-, *J* = 5.9 ve 11.2 Hz)

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 38.7, 49.4, 62.5, 79.1, 81.4, 103.0, 130.2, 132.4.

Aynı koşullarda alil asetat esteri ile hek zaklorosiklopentadienin tepkimesi sonucu (±)-4 bileşiği % 40-45 verimle elde edilmiştir. Verimin az olmasının sebebi tepkime ortamında alil asetatın polimerleşmesidir. Bu sebeple (±)-4 bileşiği, yüksek verimle elde edilmiş (±)-3 alkolünün trietilamin ortamında asetil klorür ile asetillenmesi sonucu % 80-90 verimle elde edilmiştir (Yöntem (c)):

3.3 g (±)-3 maddesi ve 1 mL trietilamin 10 mL diklorometanda çözülmüş, oda sıcaklığında üzerine 1 g asetil klorür damla damla eklenmiştir. Karışım diklorometan içinde 5-6 saat süre ile oda sıcaklığında karıştırılmış ve 1 saat geri akışı sağlanmıştır. Karışım 10-15 mL su ile hidroliz edilip, organik faz MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuştur. Çözümü vakumda ayrıldıktan sonra geriye kalan madde silika jel üzerinde kolon kromatografisi ile saflaştırılmış ve % 90 verimle (±)-4 maddesi elde edilmiştir.

(±)-4 maddesinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri aşağıdaki gibidir:



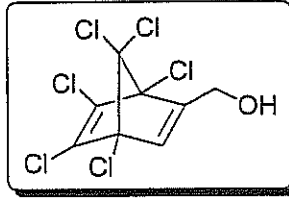
$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 1.86 (dd, 1H, Hc,  $J = 4.1$  ve  $12.5$  Hz)  
2.00 (s, 3H, -CH<sub>3</sub>)  
2.61 (dd, 1H, Hb,  $J = 8.9$  ve  $12.5$  Hz)  
3.80 (m, 1H, Ha)  
3.93 (dd, 1H, -CH<sub>2</sub>O-,  $J = 6.1$  ve  $11.7$  Hz)  
4.06 (dd, 1H, -CH<sub>2</sub>O-,  $J = 5.8$  ve  $11.7$  Hz)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 21.1, 38.5, 46.4, 62.7, 78.9, 81.3, 102.9, 130.5, 132.3, 170.8.

Bu bölümün son kısmında rasemik 2-hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien (±)-5 ve 2-asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien (±)-6 sentezlemek için hekzaklorosiklopentadien ile proparjil alkolün Diels-Alder tepkimesi incelenmiştir. Bu tepkimenin başlangıç maddelerinin karışımının kapalı tüpte  $170^\circ\text{C}$ 'de 6 saat süreyle ısıtılması sonucu (±)-5 maddesi % 80-85 verimle elde edilmiştir. Bu maddeyi saflaştırmak için vakum distilasyonu uygulanmıştır (kaynama noktası:  $130-131^\circ\text{C}$  [1 mm Hg] ; erime noktası:  $86-87^\circ\text{C}$ ).



(±)-5 maddesinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri aşağıdaki gibidir:

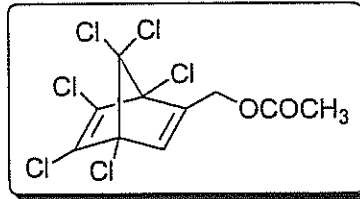


$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.50 (s, 1H, OH)  
4.40 (AB sistemi, 1H,  $J = 16$  Hz)  
4.50 (AB sistemi, 1H,  $J = 16$  Hz)  
6.60 (s, 1H, CH=)

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 59.4, 83.1, 85.2, 115.5, 134.2, 137.4, 138.7, 151.8.

2-Asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'i (±)-6 elde etmek için Şema 1'de gösterilen (a) ve (b) yöntemlerinin ikisi de kullanılmıştır. Hekzaklorosiklopentadien ve proparjil asetatın 170-175 °C'deki Diels-Alder tepkimesi sonucu (±)-6 bileşiği % 50-55 verimle elde edilmiştir. Bunun üzerine izlenen (e) yöntemiyle, (±)-6 maddesi (±)-5'ten başlanarak % 95 verim ile sentezlenmiştir. (±)-6 bileşiğinin saflaştırılmasında kolon kromatografisi kullanılmıştır (EtOAc:Hek= 1:5).

(±)-6 maddesinin  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$ -NMR verileri aşağıdaki gibidir:



$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)  
4.75 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>)  
6.55 (s, 1H, CH=)

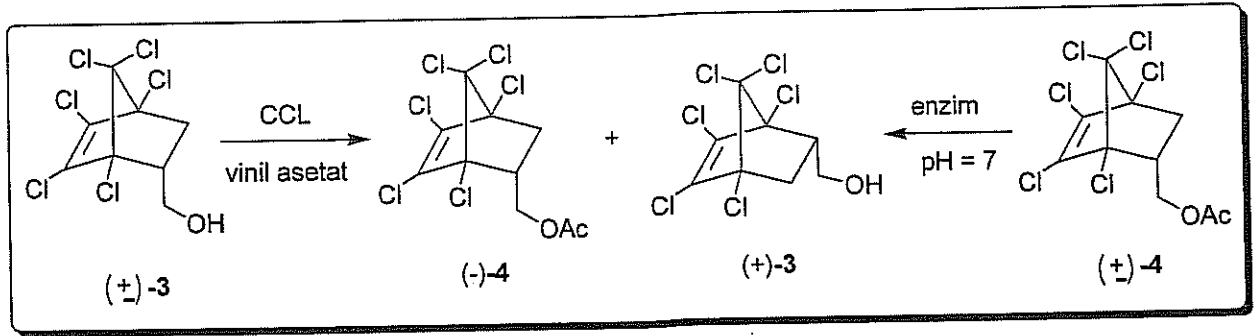
$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 21.1, 59.5, 83.2, 85.2, 115.6, 137.1, 137.6, 138.5,  
147.4, 169.9.

Tüm NMR verileri, sentezlenen bileşiklerin tamamının *endo* izomerleri olduğunu ve enzimatik tepkimelerde kullanılacak kadar saf olduğunu göstermiştir.

## 2.2 Rasemik heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien bileşiklerinin enzimatik kinetik ayırma yöntemiyle enantiyomerlerine ayrılması çalışmaları

Projenin bu bölümü, ilk aşamada rasemik olarak sentezlenen, heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien türevlerinin (1-6) enzimatik kinetik ayırma yöntemi kullanılarak enantiyomerce saflaştırılma çalışmalarını içerir. Bunun için çeşitli hidrolaz tipi enzimler (lipaz ve esterazlar) değişik tampon çözeltilerinde denenerek optimum koşullar saptanmış ve elde edilen ürünlerin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle enantiyosaflik dereceleri belirlenmiştir.

Bu yöntemle önce ( $\pm$ )-2-*endo*-hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo-[2.2.1]hept-5-en, ( $\pm$ )-3 ve ( $\pm$ )-2-*endo*-asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo-[2.2.1]hept-5-en, ( $\pm$ )-4'ün rezolüsyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun için Şema 2'de görüldüğü gibi, ( $\pm$ )-3 alkolüne asetil transferi ve ( $\pm$ )-4 esterinin hidrolizi şeklinde iki yaklaşım denenmiştir.



Şema 2

Uygulanan birinci yaklaşımda, ( $\pm$ )-4 esterinin pH=7 fosfat tamponunda çeşitli enzimlerle (PLE, HLE, PPL) hidrolizi denenmiştir. Önce substrat/enzim oranı 1:1'den 1:0,5'e kadar değiştirilerek tarama testleri yapılmış ve elde edilen olumlu sonuçlar üzerine enzimlerin katalitik miktarda (1:0,08 ile 1:0,02 arası) kullanılmasına karar verilmiştir. Kimyasal dönüşümler ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiş ve % 50 dönüşümler 20 ile 100 saat arasında elde edilmiştir. Bütün deneyler (+)-3 alkolüyle (-)-4 esterini vermiştir. Ürünler kolon kromatografisi ile ayrılmış ve yapılan HPLC analizleri sonucu (-)-4 esterinin % 94 ile % 98 arasında değişen bir enantiyomerik fazlalığa sahip olduğu

bulunmuştur. (+)-3 alkolünün enantiyosafliğının ise % 65 ile % 83 arasında yer aldığı gözlenmiştir. Sonuçlar Tablo-1'de gösterilmektedir.

(±)-3 alkolünün rezolüsyonu için ise asetil transferi yöntemi uygulanmış ve asetil kaynağı olarak vinil asetat kullanılmıştır. Denenen çeşitli enzimler arasında en iyi sonucu CCL enziminin verdiği tespit edilmiştir. % 50 dönüşüm 168 saatte elde edilmiş ve ürünler kolon kromatografisi ile ayrılmıştır. HPLC analizi sonucu elde edilen asetoksi ürünün % 97, alkol ürününün ise % 79 enantiyomerik fazlalığa sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar Tablo-1'de gösterilmektedir.

**Tablo-1**

Substrat	Enzim	Substrat:Enzim Oranı	Zaman (saat)	Ester	Verim (%) <sup>a</sup>	E.e. (%) <sup>b</sup>	Alkol	Verim (%)	E.e. (%)
(±)-3	CCL	1:0.02	168	(-)-4	39	97	(+)-3	30	79
(±)-4	PLE	500 mg:100µL	23	(-)-4	49	98	(+)-3	22	65
(±)-4	HLE	1:0.08	20	(-)-4	40	98	(+)-3	15	83
(±)-4	PPL	1:0.08	100	(-)-4	47	94	(+)-3	35	72

<sup>a</sup> Kimyasal verim değerleri (%) saflaştırılmış ester miktarı üzerinden hesaplanmıştır .

<sup>b</sup> E.e., enantiyomerik fazlalığı temsil etmekte olup HPLC'de Chiralcel OD-H kiral kolon yardımıyla hesaplanmıştır.

Sıcaklığın enzim aktivitesi üzerine olan etkisini incelemek için de oda sıcaklığı dışında 15 °C ve 30 °C'de çeşitli ölçümler yapılmıştır. Bunun için (±)-4 esterinin hidroliz tepkimesi temel alınmış ve hem tepkime süresi hem de enantiyoseçicilik yönünden en iyi sonuçları veren PLE enzimi kullanılmıştır. Her iki sıcaklıkta da enzim aktivitesinin oda sıcaklığına nazaran düştüğü gözlenmiştir. 15 °C'de % 50 dönüşüme ulaşılması bir haftayı geçmiş, dolayısıyla tepkime hızında görünür düzeyde bir düşüş meydana gelmiştir. Bu sıcaklıkta enantiyoseçicilik de asetoksi ürün üzerinden % 45'e düşmüştür. 30 °C'de ise tepkime hızının arttığı gözlenmiş fakat buna bağlı olarak enantiyoseçicilikte yine bir düşüş olmuştur (asetoksi ürününde % 53 enantiyomerik fazlalık).

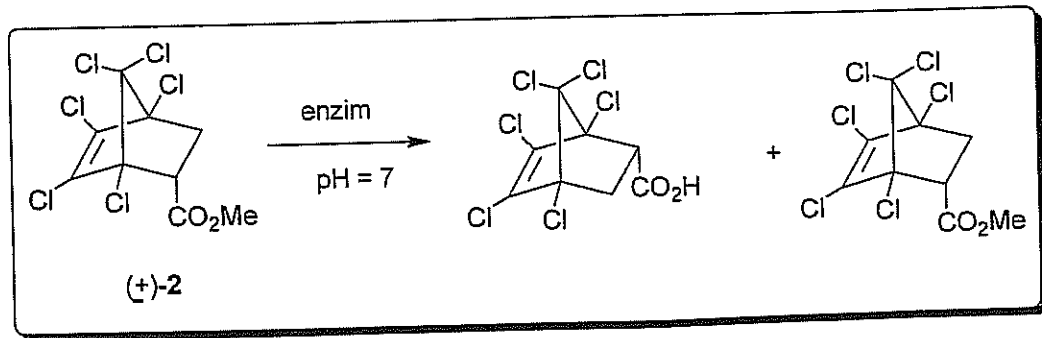
(±)-4 esterinin hidrolizinin genel prosedürü aşağıdaki gibidir:

500 mg (±)-4 esteri, 50 mL pH 7,00 fosfat tamponu içine konulmuş ve karışıma 40 mg HLE (40 mg PPL veya 100 µL PLE) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında karıştırılmış ve dönüşüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. % 50 dönüşüm sağlandığında karışımın etil asetat ile ekstraksiyonu yapılmış, MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve düşük basınçta yoğunlaştırılmıştır. Ürünler kolon kromatografisi ile (EtOAc:hekzan, 1:2) saflaştırılmıştır.

(±)-3 alkolüne asetil transfer tepkimesinin prosedürü aşağıdaki gibidir:

500 mg (±)-3'ün 5 mL vinil asetat içindeki çözeltisine 10 mg CCl eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında karıştırılmıştır. % 50 dönüşüm sağlandığında karışım süzölmüş ve vinil asetat düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Ürünler kolon kromatografisi ile (EtOAc:hekzan, 1:2) saflaştırılmıştır.

Bu aşamadan sonra akrilik asit ve akrilik asit metil esterinin heksaklorosiklopentadien ile olan Diels-Alder katılma ürünlerinin ((±)-1 ve (±)-2) enzimatik rezolüsyonu üzerinde yoğunlaşmıştır. Burada izlenen strateji ise, bir önceki aşamadan farklı olarak, karboksilik asitlerin enzim ortamında anhidrit oluşturmasının güçlüğü dolayısıyla, (±)-2 esterinin uygun pH ortamında hidrolizi şeklinde olmuştur (Şema 3).



Şema 3

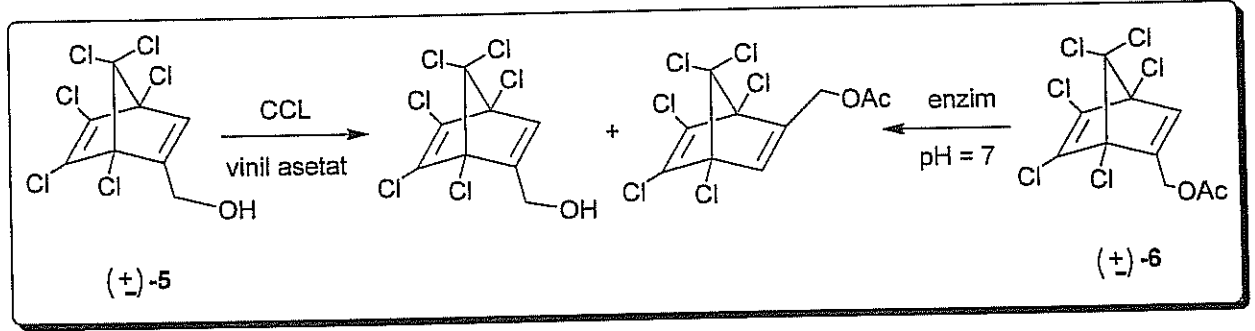
(±)-2 esterinin hidrolizi için ilk önce pH 7,00 fosfat tamponunda çeşitli enzimler (PLE, CCL, PPL ve HLE) oda sıcaklığında, katalitik miktarlarda (1:0.08 substrat:enzim oranı) denenmiştir. Bu denemelerde tepkime hızının yavaş olduğu ve iki hafta sonunda dahi %50 dönüşümün gerçekleşmediği gözlenmiştir. 2 esterinin enantiyomerik fazlalığının da buna bağlı olarak % 3 ile % 5 arasında olduğu bulunmuştur. Bu bulgular üzerine enzim miktarını artırılmasına karar verilmiş ve CCL enzimi 1:1 enzim:substrat oranında kullanılmıştır. Buna rağmen enantiyoseçicilikte bir artış gerçekleşmemiş ve 2 esterinin enantiyomerik fazlalığı % 4 olarak bulunmuştur.

Bilindiği gibi enzim aktivitesini etkileyen başlıca etmenlerden biri de ortamın pH'ıdır. Bu yüzden pH değerini 7,00 den 8,00 çıkartarak bu değerinde çeşitli denemeler yapılmıştır. Bunun için de CCL enzimi ile PLE enzimi katalitik miktarlarda denenmiştir. Bu denemelerde enantiyoseçicilikte bir miktar artış sağlansa da (% 7-8 enantiyomerik fazlalık), istenilen değerlere ulaşamamıştır.

(±)-2 esterinin hidrolizinin genel prosedürü aşağıdaki gibidir:

250 mg (±)-2 esteri, 25 mL pH 7,00 (veya 8,00) fosfat tamponu içine konulmuş ve karışıma 20 mg HLE (20 mg PPL, 20 mg CCL veya 50 µL PLE) eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında karıştırılmış ve dönüşüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. % 50 dönüşüm sağlandığında karışım asitlendirilmiş, etil asetat ile ekstraksiyonu yapılmış, MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve düşük basınçta yoğunlaştırılmıştır. Ürünler kolon kromatografisi ile (EtOAc:hekzan, 1:1, + %1 HOAc) saflaştırılmıştır.

Bu bölümün son kısmında ise projenin ilk aşamasında rasemik olarak sentezlenen (±)-2-hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo-[2.2.1]hepta-2,5-dien ((±)-5) ve (±)-2-asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo-[2.2.1]hepta-2,5-dien ((±)-6) bileşiklerinin enzimatik rezolüsyonu incelenmiştir. Bunun için de Şema 3'te gösterildiği gibi (±)-5 alkolüne enzim ortamında asetil transferi ve (±)-6 esterinin enzim ortamında hidrolizi şeklinde iki metot uygulanmıştır (Şema 4).



**Şema 4**

(±)-6 hidrolizi için pH 7,00 fosfat tamponu ortamında çeşitli enzimler (PLE, PPL, PL) 1:1 ile 1:0,5 arası substrat:enzim oranlarında denenmiş ve PLE ve PPL enzimlerinin verdiği olumlu sonuçlar üzerine bu enzimlerin katalitik miktarda kullanılmasına karar verilmiştir. 500 mg substrat: 100 µL (veya 40 mg) enzim oranlarında kullanıldığında % 50 dönüşüm 4 ve 10 saatte elde edilmiştir. Ürünler kolon kromatografisiyle ayrılmış ve enantiyosaflik dereceleri HPLC yardımıyla bulunmuştur. (+)-5 alkolü % 75 ile 79 enantiyomerik fazlalık değerlerinde elde edilirken, (-)-6 esteri % 73 ve 90 enantiyomerik fazlalıkla elde edilmiştir. Yapılan sıcaklık ve pH analizlerinin de enantiyoseçiciliği arttırmadığı gözlenmiştir. Ayrıntılı sonuçlar Tablo 2'de gösterilmiştir.

Uygulanan ikinci yöntemde ise, (±)-5 alkolüne enzim ortamında asetil transferi yapılmış ve asetil kaynağı olarak vinil asetat kullanılmıştır. Denenen enzimler arasında CCL enzimi olumlu sonuçlar vermiş ve 1:0,02 substrat:enzim oranında denenmiştir. % 50 dönüşüm 6 saatte elde edilmiş ve ürünler kolon kromatografisiyle ayrılmıştır. (-)-5 alkolü % 42 kimyasal verimle ve % 90 enantiyomerik fazlalıkla elde edilirken, (+)-6 esteri % 47 kimyasal verimle ve % 81 enantiyomerik fazlalıkla elde edilmiştir. Ayrıntılı sonuçlar Tablo 2'de gösterilmektedir.

**Tablo-2**

Substrat	Enzim	Substrat:Enzim Oranı	Zaman (saat)	Ester	Verim (%)	E.e (%)	Alkol	Verim (%)	E.e (%)
(±)-5	CCL	1:0.02	6	(+)-6	47	81	(-)-5	42	90
(±)-6	PLE	500 mg:100µL	4	(-)-6	45	90	(+)-5	22	79
(±)-6	PPL	1:0,08	10	(-)-6	40	73	(+)-5	35	75

(±)-6 esterinin hidrolizinin genel prosedürü aşağıdaki gibidir:

500 mg (±)-6 esteri, 50 mL pH 7,00 fosfat tamponu içine konulmuş ve karışıma 100 µL PLE eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında karıştırılmış ve dönüşüm ince tabaka kromatografisi ile takip edilmiştir. % 50 dönüşüm sağlandığında karışımın etil asetat ile ekstraksiyonu yapılmış, MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve düşük basınçta yoğunlaştırılmıştır. Ürünler kolon kromatografisi ile (EtOAc:hekzan, 1:5) saflaştırılmıştır.

(±)-5 alkolüne asetil transfer tepkimesinin prosedürü aşağıdaki gibidir:

500 mg (±)-5'in 5 mL vinil asetat içindeki çözeltilisine 10 mg CCl eklenmiş ve çözelti oda sıcaklığında karıştırılmıştır. % 50 dönüşüm sağlandığında karışım süzölmüş ve vinil asetat düşük basınç altında buharlaştırılmıştır. Ürünler kolon kromatografisi ile (EtOAc:hekzan, 1:6) saflaştırılmıştır.



### 2.3 Enantiyomerce zenginleştirilmiş heksakloronorbornen ve heksakloro norbornadien bileşiklerinin mutlak konfigürasyonlarını belirleme çalışmaları

Projenin üçüncü bölümü, ikinci aşamada enzimatik kinetik ayırma yöntemi kullanılarak enantiyomerce zenginleştirilmiş heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien türevlerinin (1-6)  $\alpha$  ve  $[\alpha]^{25}_D$  değerlerinin ölçülmesi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yardımıyla ölçülmüş olan enantiyomerce zenginlik derecelerinin (% e.e.) spektropolarimetre cihazıyla ölçülen değerlerle karşılaştırılması çalışmalarını içerir. Ayrıca, enantiyomerce zenginleştirilmiş bazı enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının belirlenmesi için, onların deklorlaşma tepkimeleri gerçekleştirilmiştir.

Bu doğrultuda, önce enantiyomerce zenginleştirilmiş (+)-2-*endo*-hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo-[2.2.1]hept-5-en, (+)-3 ve (-)-2-*endo*-asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-heksakloro bisiklo-[2.2.1]hept-5-en, (-)-4'ün düzlem polarize ışığı çevirme açılarının ölçümü üzerinde yoğunlaşmıştır.

Optikçe çevirme değerleri 20 °C'de, 1 dm uzunluğundaki hücrelerde, Bellingham and Stanley P20 polarimetre cihazıyla, 589 nm dalgaboyunda ışık kullanılarak ölçülmüş ve çözeltiler hazırlanırken, bileşikler Metanol'de çözülmüştür. Elde edilen optikçe çevirme açılarından ( $\alpha$ ), çözeltilerin derişimleri hesaba katılarak, spesifik çevirme açıları ( $[\alpha]^{25}_D$ ) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 3'te gösterilmektedir.

Tablo-3

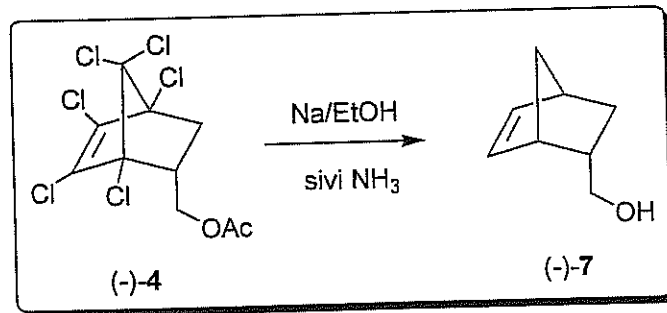
Bileşik	E.e. (%) <sup>a</sup>	C (Derişim) <sup>b</sup>	$[\alpha]^{25}_D$	Mutlak Konfigürasyon
(+)-3	79	2,50	+6,7	1R,2S,4S
(+)-3	65	2,03	+5,5	1R,2S,4S
(+)-3	83	1,10	+7,1	1R,2S,4S
(+)-3	72	3,12	+6,1	1R,2S,4S
(-)-4	97	1,53	-1,5	1S,2R,4R
(-)-4	98	2,39	-1,5	1S,2R,4R
(-)-4	98	0,97	-1,5	1S,2R,4R
(-)-4	94	1,44	-1,4	1S,2R,4R

<sup>a</sup> Bu enantiyomerik fazlalıklara sahip enantiyomerlerin, hangi enzimlerle elde edildikleri projenin ikinci gelişme raporunda verilmiştir.

<sup>b</sup> C, derişim değerleri  $c = m(\text{mg}) / [V(\text{mL}) \times 10]$  formülüyle hesaplanmıştır.

Tablo 3'teki  $[\alpha]^{25}_D$  değerleri, e.e. değerleriyle karşılaştırıldığında, sonuçların birbiriyle hayli uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bundan sonra, enantiyomerce zenginleştirilmiş bu enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının belirlenmesi için, (-)-4 enantiyomeri deklorlaşma tepkimesine sokularak Şema 5'te gösterildiği gibi, konfigürasyonu literatürde bilinen, norbornen türevine dönüştürülmüştür. Deklorlaşma tepkimesi sırasında, beklenmedik bir şekilde, ester grubu da hidroliz olmuş ve doğrudan nornornen-alkol türevi elde edilmiştir.



Şema 5

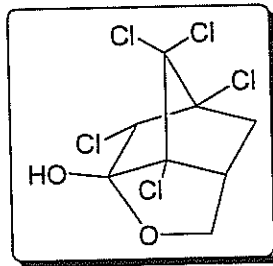
Deklorlaşma tepkimesi için izlenen deney prosedürü aşağıdaki gibidir:

12 mL mutlak Etanol/eter (1:1) içinde çözünen 510 mg (-)-4, 0,6 g metalik Sodyum'un 30 mL sıvı amonyak içindeki çözeltisine, Argon atmosferi altında, 20 dakika boyunca damla damla eklenmiştir. Oluşan karışım 20 dakika daha karıştırılmış ve ardından çözelti renksiz oluncaya kadar yavaş yavaş katı  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eklenmiştir. Ortamdaki amonyak, çözültiden  $\text{N}_2$  gazı geçirilerek uzaklaştırılmış ve karışıma buzlu su eklenmiştir. Ardından karışım 2N HCl ile asitlendirilmiş ve eterle ekstraksiyonu yapılmıştır (3x50 mL). Organik faz sırasıyla doymuş  $\text{NaHCO}_3$  (3x50 mL), tuz çözeltisi (2x50 mL) ile yıkanmış,  $\text{MgSO}_4$  üzerinde kurutulmuş ve ardından düşük basınçta çözücüsü uçurulmuştur. Ardından bileşik kolon kromatografisi (EtOAc:Hekzan= 1:2) ile saflaştırılmıştır (0,12 g, % 70 verim).

(-)-4 bileşiğinin mutlak konfigürasyonunun belirlenmesi için, elde edilen (-)-7 norbornen türevinin optikçe çevirme açısı, literatürde verilen değeriyle karşılaştırılmıştır. Bunun için, (-)-7 türevi % 95 Etanol içinde çözülmüş ve spesifik çevirme açısı ( $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ ) - 72 olarak ölçülmüştür. Literatürde (1R,2S,4S)-(7) bileşiği bu çevirme açısına sahiptir ve buradan yola çıkılarak (-)-4 enantiyomerinin mutlak konfigürasyonunun (1S,2R,4R) olduğu bulunmuştur.<sup>15</sup> Bunun sonucu olarak da, (+)-3 enantiyomerinin mutlak konfigürasyonunun (1R,2S,4S) olduğu bulunur.

(-)-4 esterinin deklorlaşma tepkimesi sırasında az miktarda da olsa bir yan ürün elde edilmiştir. Bu ürünün NMR analizi ile yapılan karakterizasyonu neticesinde moleküldeki alkol grubunun molekül içi halkalaşma tepkimesine girerek trisiklik bir hemiketal ürünü oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Bu ürünün  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri aşağıdaki gibidir:



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 2.05 (s, 1H, Hc, OH)  
2.48 (dd, 1H,  $\text{CH}_2$ , *endo*,  $J = 2.3$  ve  $13.1$  Hz)  
2.68-2.74 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ , *ekzo*)  
2.85-2.88 (m, 1H, CH)  
3.76 (d, 1H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $J = 8.6$  Hz)  
4.16 (dd,  $\text{CH}_2\text{O}$ ,  $J = 4.2$  ve  $8.6$  Hz)  
4.51 (d, 1H,  $\text{CHCl}$ ,  $J = 3.0$  Hz)

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm: 38.3, 47.2, 69.3, 71.4, 74.3, 81.9, 95.1, 95.5.

Proje kapsamında enantiyomerce saflaştırılması planlanan *endo*-1,4,5,6,7,7-hekzakloro bisiklo[2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit ve onun metil esteri üzerine yapılan enzimatik çalışmalar, Bölüm 2.2'de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. (-)-2 esterinin enantiyomerik fazlalığı % 3 ile % 8 arasında bulunmuştur. Enzim:substrat oranının ve tepkime ortamının pH değerinin değiştirilmesi de enantiyomerik fazlalığın istenilen değerlere ulaşmasını sağlamamıştır.

(-)-2 esterinin optikçe çevirme açısı  $20^\circ\text{C}$ 'de, 1 dm uzunluğundaki hücrelerde, Bellingham and Stanley P20 polarimetre cihazıyla, 589 nm dalgaboyunda ışık kullanılarak ölçülmüş ve çözeltiler hazırlanırken, bileşikler Metanol'de çözülmüştür. Bu enantiyomerin mutlak konfigürasyonu ise deklorlaşma tepkimesine sokmaya gerek kalmaksızın, literatürde bulunan değeriyle karşılaştırılarak bulunmuştur.<sup>16</sup> Bunun sonucunda (-)-2 enantiyomerinin mutlak konfigürasyonunun (1S,2R,4R) olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir.

**Tablo 4.**

Bileşik	E.e. (%)	C (Derişim)	$[\alpha]^{25}_D$	Mutlak Konfigürasyon
(-)-2	3	1,56	-0,4	1S,2R,4R
(-)-2	7	2,03	-1,0	1S,2R,4R
(-)-2	8	1,95	-1,2	1S,2R,4R

Bu aşamanın son kısmında ise, 2. aşamada enantiyomerce zenginleştirilen 2-hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo-[2.2.1]hepta-2,5-dien (5) ve 2-asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo-[2.2.1]hepta-2,5-dien (6) bileşiklerinin optikçe çevirme açıları ölçülmüş, bu değerler enantiyomerik fazlalık değerleriyle karşılaştırılmış ve elde edilen enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının belirlenmesi için onların deklorlaşma tepkimeleri gerçekleştirilmiştir.

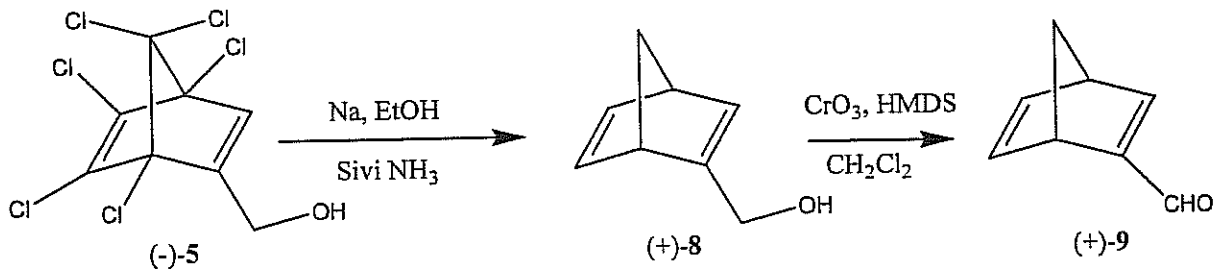
Optikçe çevirme değerleri 20 °C'de, 1 dm uzunluğundaki hücrelerde, Bellingham and Stanley P20 polarimetre cihazıyla, 589 nm dalgaboyunda ışık kullanılarak ölçülmüş ve çözeltiler hazırlanırken, bileşikler Kloroform'da (CHCl<sub>3</sub>) çözülmüştür. Elde edilen optikçe çevirme açılarından ( $\alpha$ ), çözeltilerin derişimleri hesaba katılarak, spesifik çevirme açıları ( $[\alpha]^{25}_D$ ) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 5'te gösterilmektedir.

**Tablo-5**

Bileşik	E.e. (%)	C (Derişim)	$[\alpha]^{25}_D$	Mutlak Konfigürasyon
(-)-5	90	1,66	- 7,1	1S,4R
(+)-5	79	2,12	+ 6,2	1R,4S
(+)-5	75	1,96	+ 5,9	1R,4S
(+)-6	81	1,33	+ 4,1	1R,4S
(-)-6	90	2,53	- 4,6	1S,4R
(-)-6	73	2,02	- 3,6	1S,4R

Tablo 5'teki  $[\alpha]_D^{25}$  değerleri, e.e. değerleriyle karşılaştırıldığında, sonuçların birbiriyle hayli uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Bundan sonra, enantiyomerce zenginleştirilmiş bu enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının belirlenmesi için, (-)-5 enantiyomeri deklorlaşma tepkimesine sokularak Şema 5'te gösterildiği gibi, norbornen-alkol türevine dönüştürülmüştür. Bu norbornen türevi de Krom(VI) oksit ve Hekzametildisilokzan ile Dikolorometan içinde yükseltgenerek, mutlak konfigürasyonu literatürde bilinen norbornen-aldehit türevi elde edilmiştir (Şema 6).<sup>17</sup>



Şema 6

Dekloraşma tepkimesi için izlenen deney prosedürü aşağıdaki gibidir:

24 mL mutlak Etanol/eter (1:1) içinde çözünen 1,46 g (-)-5, 2,05 g metalik Sodyum'un 80 mL sıvı amonyak içindeki çözeltisine, Argon atmosferi altında, 20 dakika boyunca damla damla eklenmiştir. Oluşan karışım 20 dakika daha karıştırılmış ve ardından çözelti renksiz oluncaya kadar yavaş yavaş katı NH<sub>4</sub>Cl eklenmiştir. Ortamdaki amonyak, çözeltiden N<sub>2</sub> gazı geçirilerek uzaklaştırılmış ve karışıma buzlu su eklenmiştir. Ardından karışım 2N HCl ile asitlendirilmiş ve eterle ekstraksiyonu yapılmıştır (3x50 mL). Organik faz sırasıyla doymuş NaHCO<sub>3</sub> (3x50 mL), tuz çözeltisi (2x50 mL) ile yıkanmış, MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve ardından düşük basınçta çözücüsü uçurulmuştur. Ardından bileşik kolon kromatografisi (EtOAc:Hekzan= 1:5) ile saflaştırılmıştır (0,40 g, % 72 verim).

Yükseltgenme tepkimesi içinse izlenen prosedür aşağıdaki gibidir:

2,00 g CrO<sub>3</sub> ile 3,24 g Hekzametildisilokzan içeren bir karışım 1 saat boyunca 60°C'de Argon atmosferinde karıştırılmıştır. Tepkime balonu 25 °C'ye soğutulmuş ve karışımın üzerine 10 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> eklenmiştir. 1,22 g (+)-8 bileşiği 5 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> içinde çözülmüş ve 0 °C'de damla damla karışıma eklenmiştir. Oluşan karışım, 0 °C'de 25 dakika karıştırılmış, 50 mL eterle seyreltilmiş, ve sırayla 0,1 N HCl (3x50 mL), doymuş NaHCO<sub>3</sub> (3x50 mL) ve doymuş tuz çözeltisiyle (2x50 mL) ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen çözelti MgSO<sub>4</sub> üzerinde kurutulmuş ve düşük basınçta çözücüsü uçurulmuştur. Ardından bileşik kolon kromatografisi (EtOAc:Hekzan= 1:5) ile saflaştırılmıştır (0,67 g, % 56 verim).

(-)-5 enantiyomerinden elde edilen (+)-9 bileşiğinin spesifik çevirme açısı, literatürdeki değeriyle karşılaştırıldığında, bileşiğin (1S,4R) mutlak konfigürasyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Bunun sonucunda da, (-)-5 enantiyomerinin mutlak konfigürasyonunun da (1S,4R) olduğu bulunmuştur. (+)-5, (-)-6 ve (+)-6 bileşiklerinin mutlak konfigürasyonlarının da, böylelikle, sırasıyla, (1R,4S), (1S,4R) ve (1R,4S) olduğu belirlenmiş olur.

### 3. Sonuç

Projenin amaç kapsamında ayrıntılı bir şekilde belirtilen, optikçe aktif norbornen, heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien karboksilik asit, ester ve alkol bileşiklerinin asimetrik sentezine, bu çalışma sonucunda başarıyla ulaşılmış bulunmaktadır. Hedeflenen bileşikler enzimatik rezolüsyon yöntemiyle yüksek enantiyomerik fazlalıklarda elde edilmiştir ve çalışma sırasında uygulanan yöntem, optimizasyon çalışmaları yapıldığı takdirde endüstriye uygulanabilir niteliktedir.

Projenin genel bir değerlendirmesi yapıldığında;

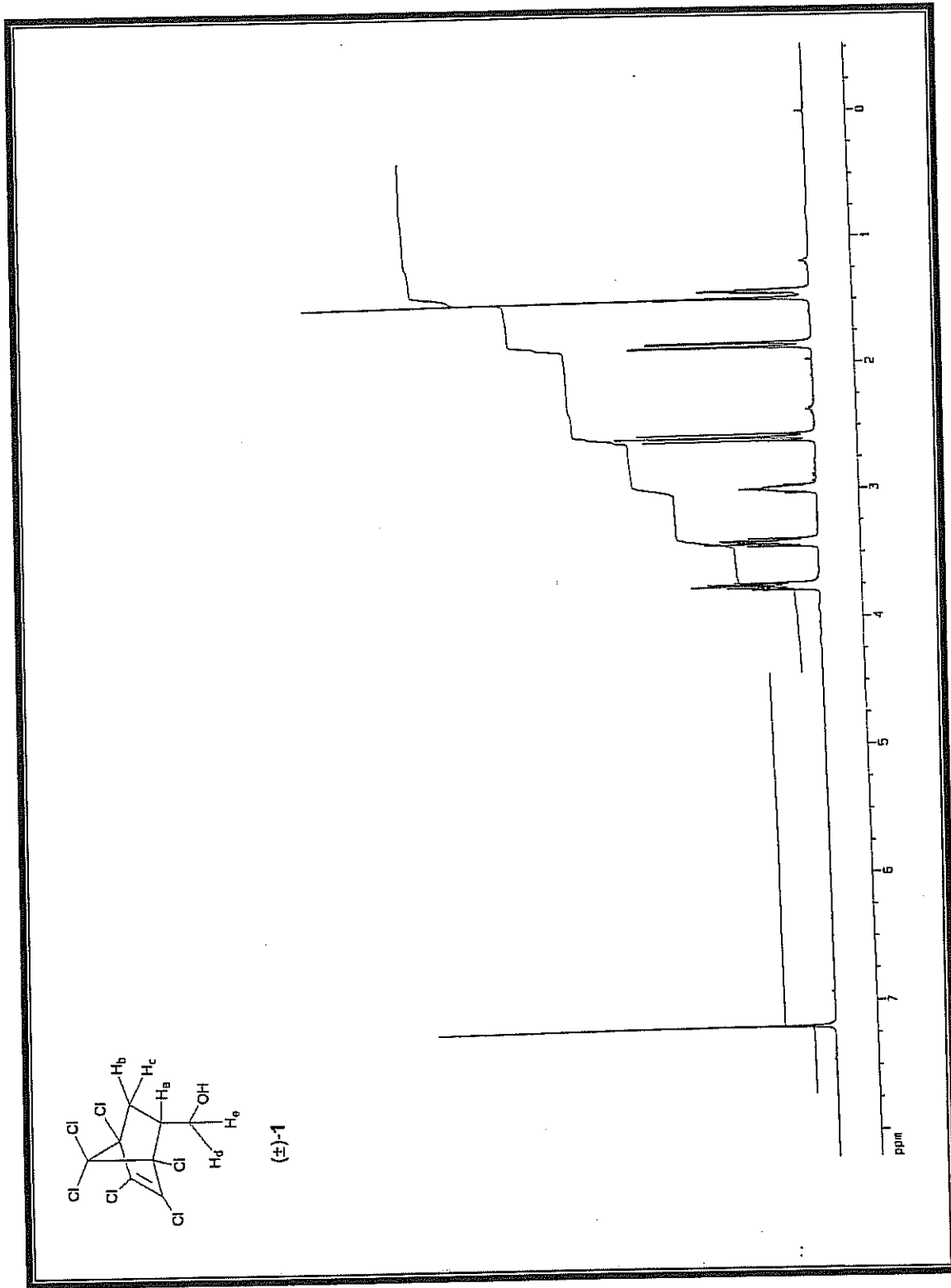
- Enantiyomerce zenginleştirilen heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien bileşikleri oldukça kolay temin edilebilen ve ucuz heksaklorosiklopentadien, alil alkol, akrilik asit ve proparjil alkolden başlanarak Diels-Alder tepkimesiyle yüksek verimle elde edilebilmektedir.
- Rasemik olarak sentezlenen heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien karboksilik asit, alkol ve esterleri enzimatik hidroliz ve enzimatik asetil transferi yöntemiyle enantiyomerce zenginleştirilmişlerdir. Bunun için pahalı olmayan hidrolaz tipi enzimler kullanılmış ve sonuç ürünler yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmişlerdir. Sadece heksakloronorbornen karboksilik asit türevi ve onun metil esterinin enantiyomerce saflığı çok çeşitli koşullar denendiği halde istenen düzeye ulaşamamıştır. Elde edilen bileşiklerin enantiyomerce saflık dereceleri yüksek performanslı sıvı kromatografisinde kiral kolon yardımıyla belirlenmiş ve bileşiklerin optikçe çevirme açılarının da bulunan değerlerle uyum içinde olduğu gözlenmiştir.
- Enantiyomerce zenginleştirilen heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien türevleri deklorlaşma tepkimesine tabi tutularak kendilerine karşılık gelen çeşitli norbornen ve norbornadien türevleri elde edilmiştir. Elde edilen bu bileşiklerin optikçe çevirme açıları literatürdeki değerlerle karşılaştırılmış ve mutlak konfigürasyon tayini gerçekleştirilmiştir. Böylelikle çok önemli biyolojik aktiviteye sahip olan prostaglandin bileşiklerin başlangıç maddeleri enantiyomerce saf halde elde edilmiştir.
- Çalışma sırasında kullanılan enzimlerin katalitik miktarda kullanılmaları, çevreyle uyumlu olmaları ve sonuç ürünlerin çok yüksek enantiyomerik saflıkta elde edilmiş olması, çalışmanın akademik düzeyde kalmayıp endüstride uygulamaya konabileceğinin göstergesidir.



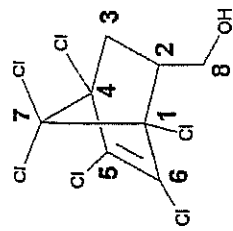
Bu çalışmanın ilk sonuçları 2005 yılı içerisinde Tetrahedron:Asymmetry dergisinde (2005, 16, 2315) yayımlanmıştır.<sup>18</sup>

#### 4. Referanslar

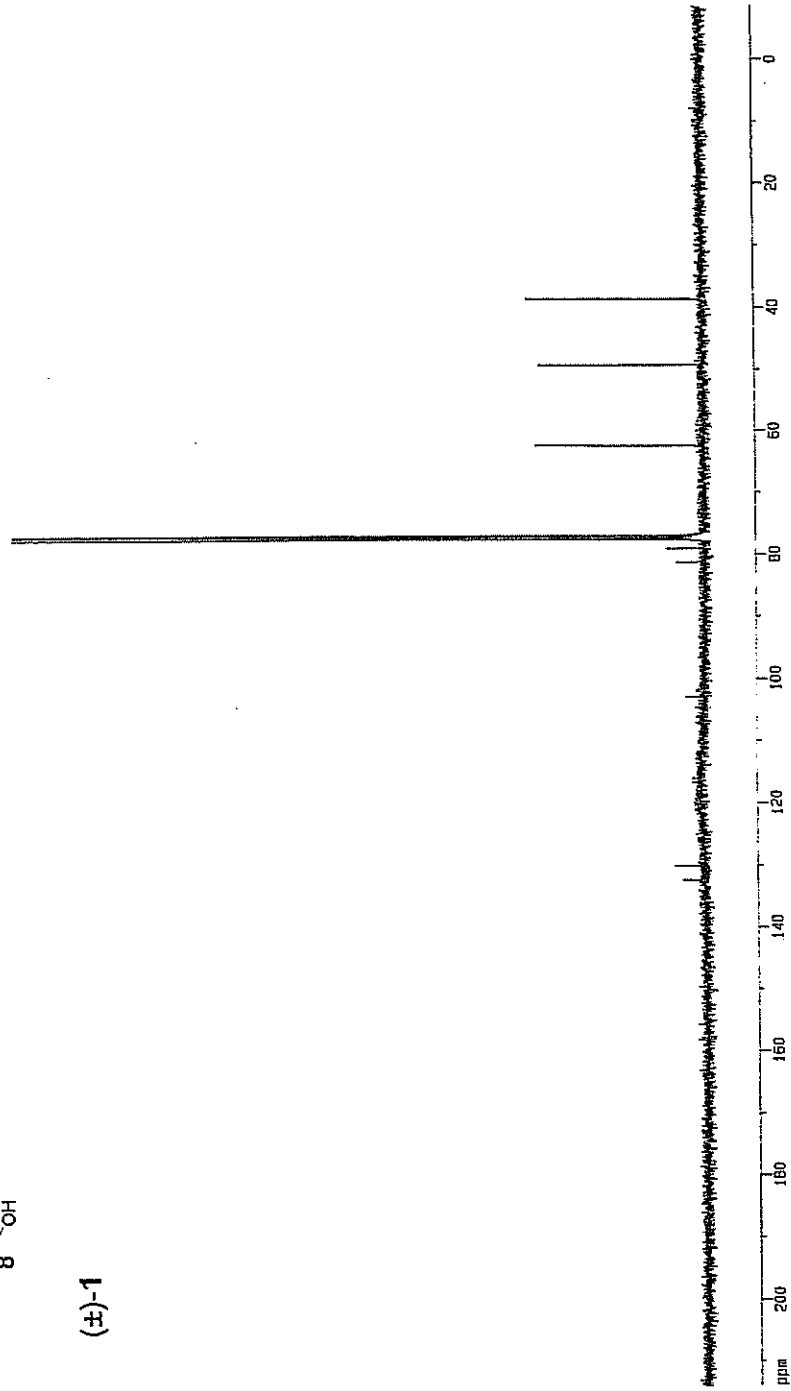
1. Seguchi, K.; Sera, A.; Maruyama, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1976**, *49*, 3558.
2. Khan, F. A.; Prabhudas, B.; Dash, J. *J. Prakt. Chem.* **2000**, *342*, No.5, 512.
3. Yadav, J. S.; Sasmal, P. K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5185.
4. Khan, F. A.; Prabhudas, B.; Dash, J.; Sahu, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9558.
5. Khan, F. A.; Dash, J.; Sahu, N.; Sudheer, Ch.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3783.
6. Khan, F. A.; Dash, J.; Sahu, N.; Gupta, S. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 1015.
7. Khan, F. A.; Dash, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2424.
8. Duke, C. C.; Holder, G. M. *J. Chromatogr.* **1988**, *430*, 53.
9. Carter, S. R.; Duke, C. C.; Cutler, D. J.; Holder, G. M. *J. Chromatogr.* **1992**, *574*, 77.
10. Duke, C. C.; Carter, S. R.; Hambley T. W.; Holder G. M.; Cutler D. J. *Chirality* **1994**, *6*, 670.
11. Paquette, L. A.; Learn, K. S.; Romine, J. L.; Lin, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 879.
12. Corey, E. J.; Shibasaki, M.; Nicolau, K. C.; Malmsten, C. L.; Samuelsson, B. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *10*, 737.
13. Takano, S.; Kubodera, N.; Ogasawara, K. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 786.
14. Lapis, A. A. M.; Kreutz, O. C.; Pohlmann, A. R.; Costa, V. E. U. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 557.
15. Berson, J. A.; Walia, J. S.; Remanick, A.; Suzuki, S.; Reynolds-Warnhoff, P.; Willner, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3986.
16. Akhmedov, I. M.; Peynircioglu, B.; Mamedov, E. G.; Tanyeli, C.; Demir, A. S. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 2099.
17. Yamamoto, H.; Ishihara, K.; Kondo, S.; Kurihara, H. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 3026.
18. Turkmen, Y. E.; Akhmedov, I. M.; Tanyeli, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2315.



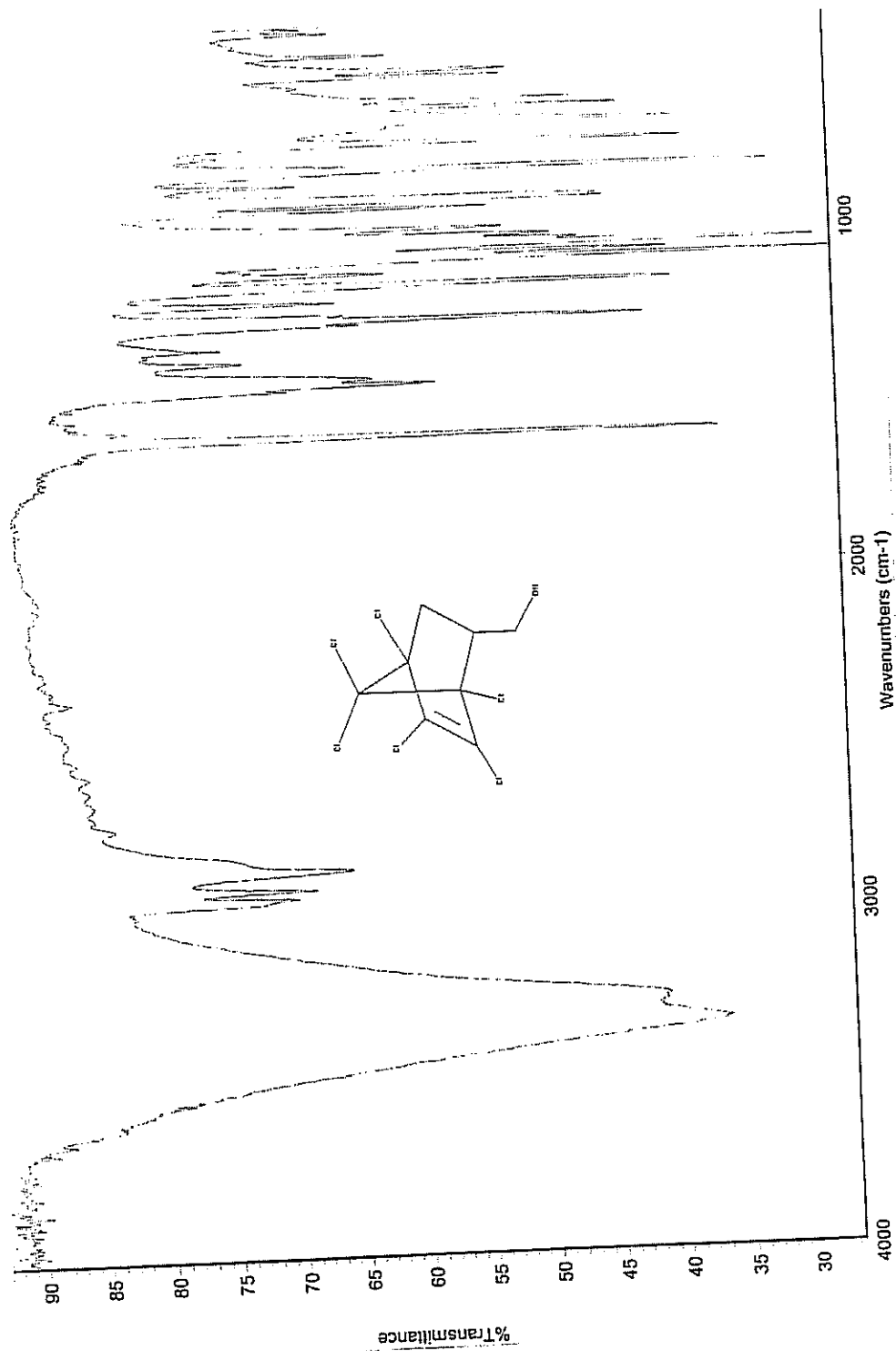
Figür 1. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



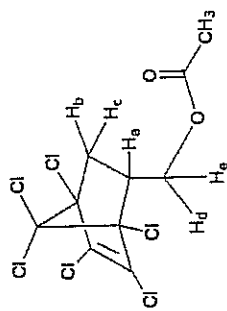
(±)-1



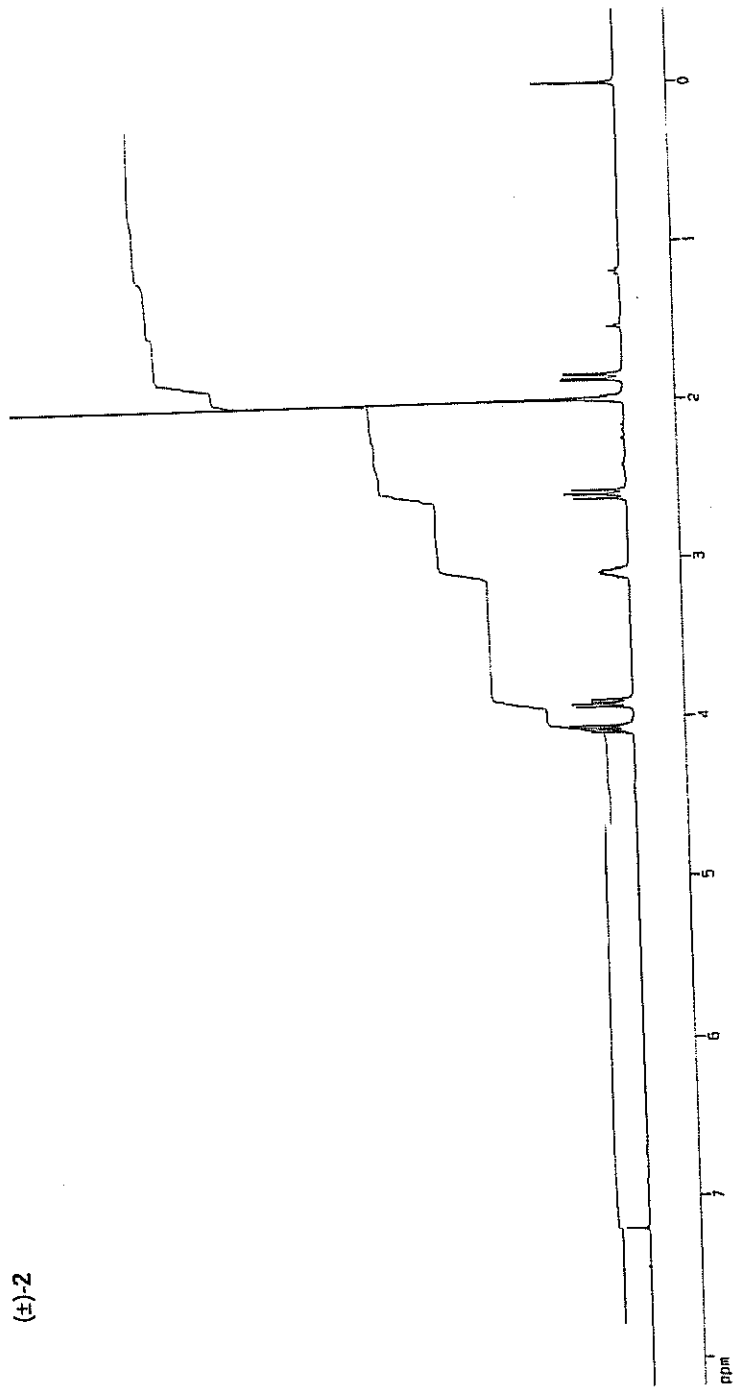
Figür 2. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



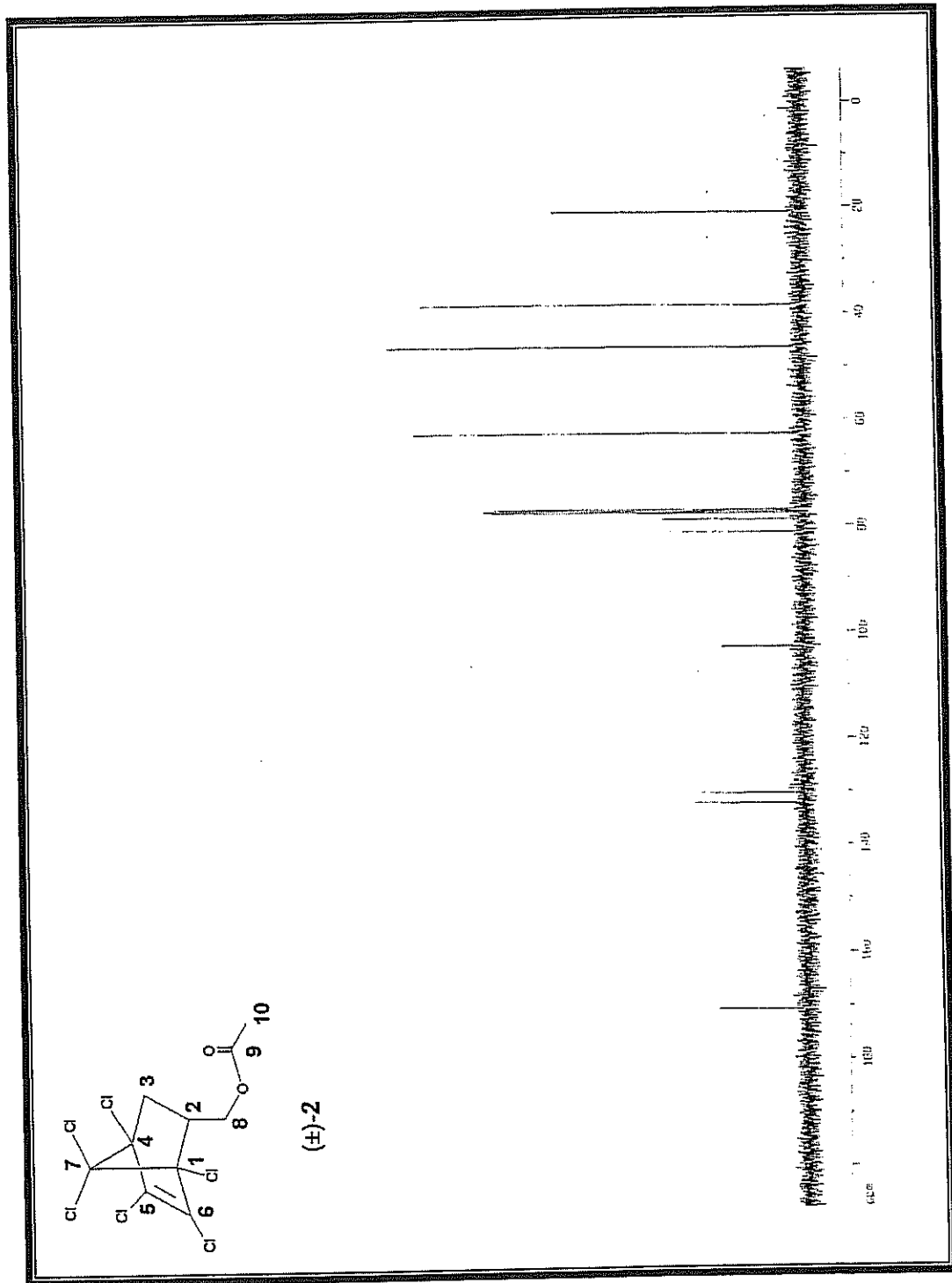
Figür 3. 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il metanol'ün IR spektrumu



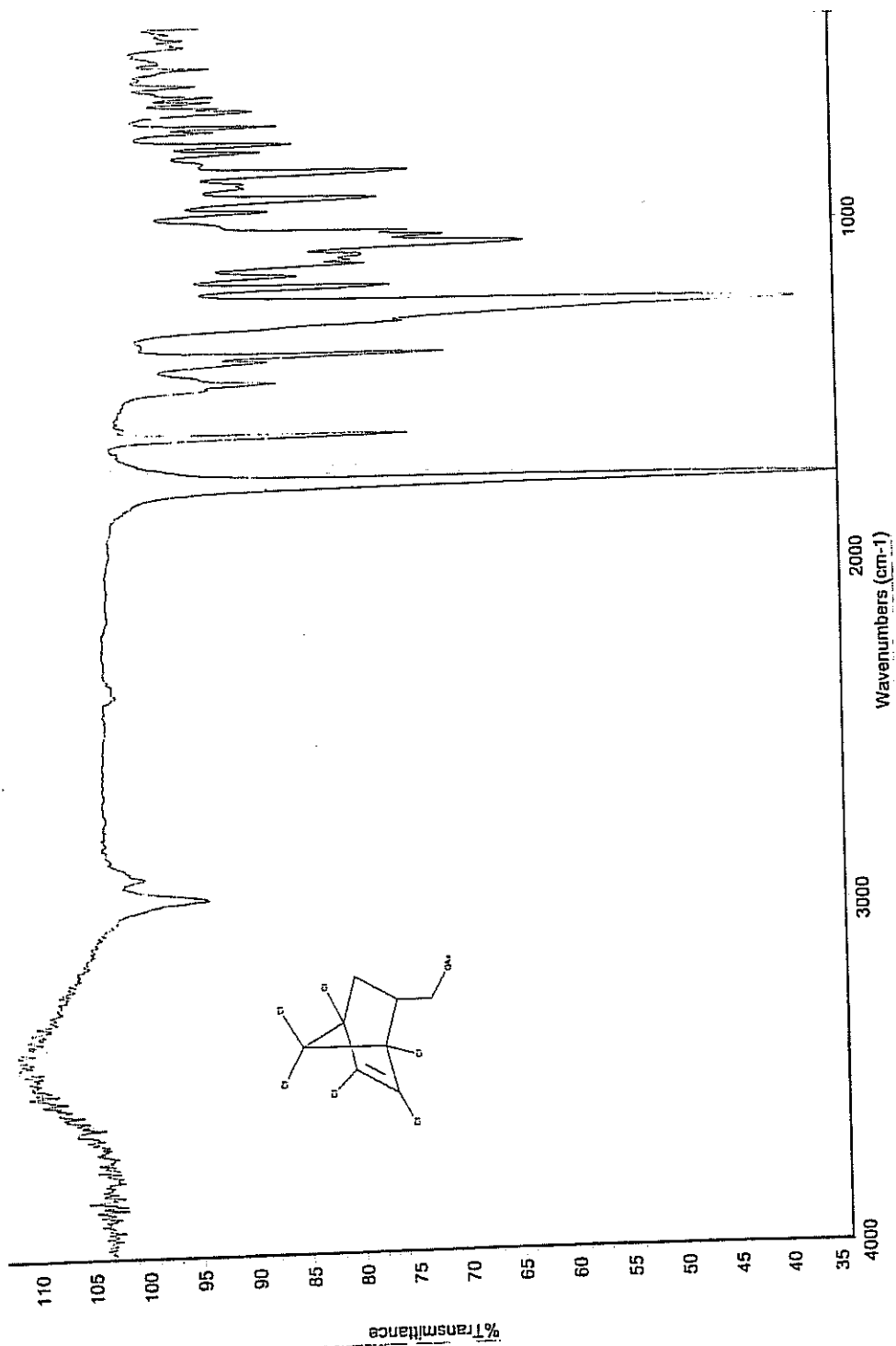
(±)-2



Figür 4. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

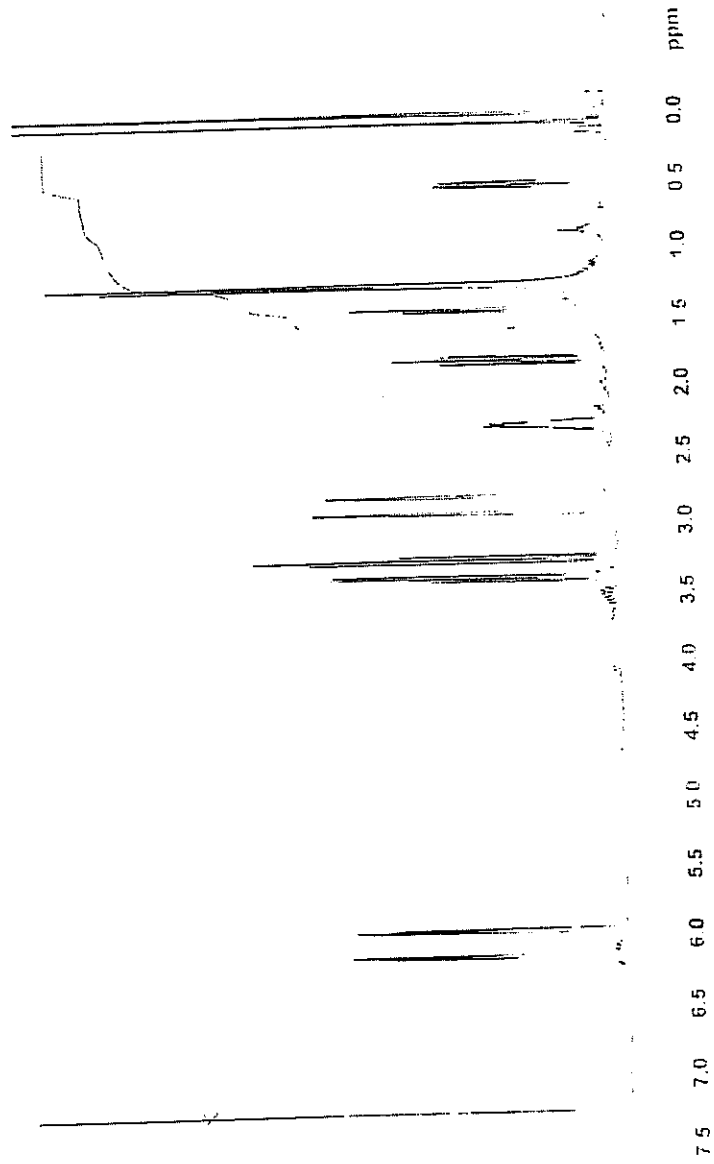
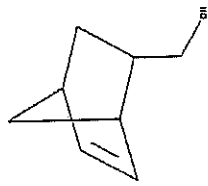


Figür 5. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

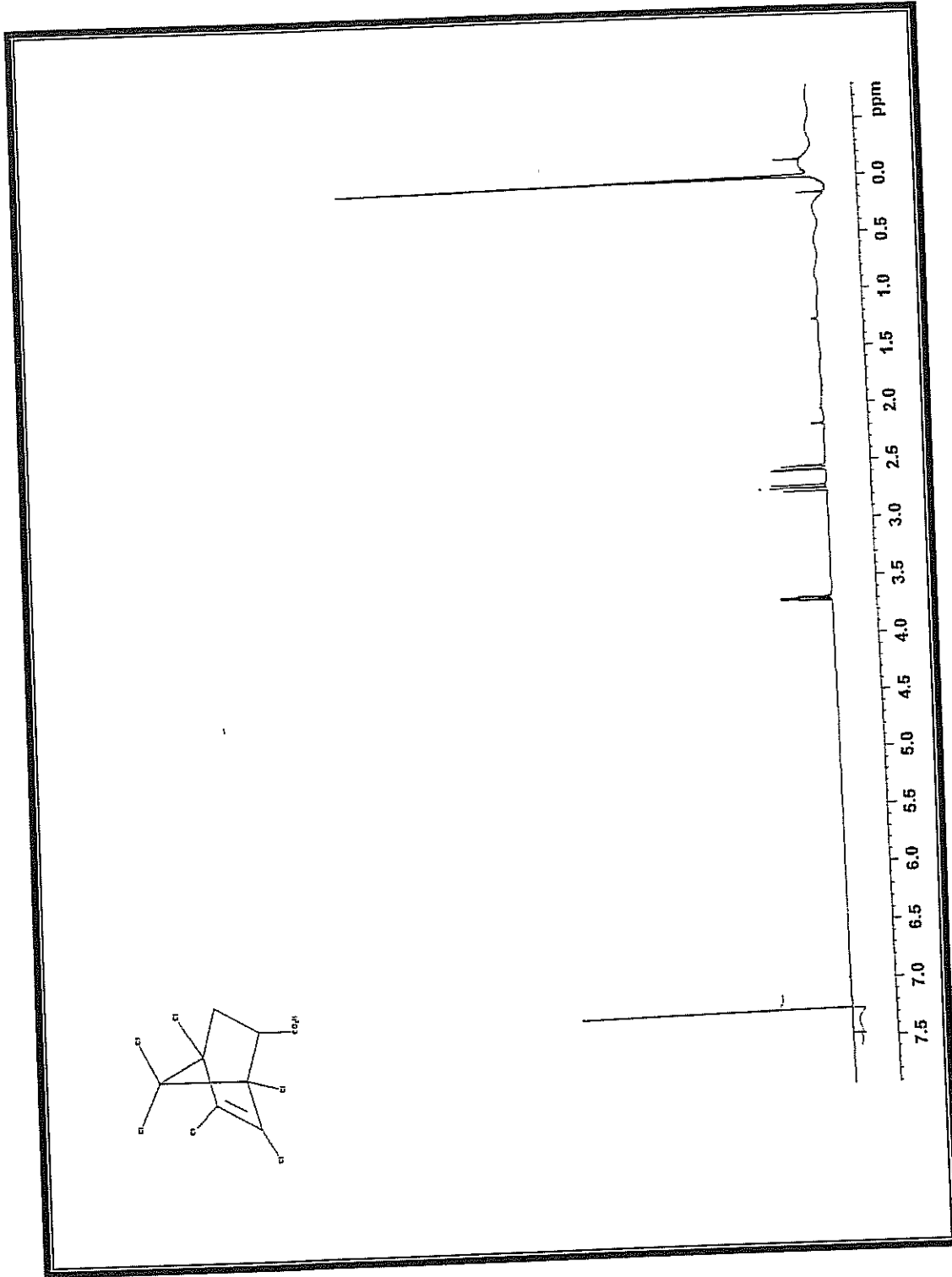


Figür 6. (1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın IR spektrumu

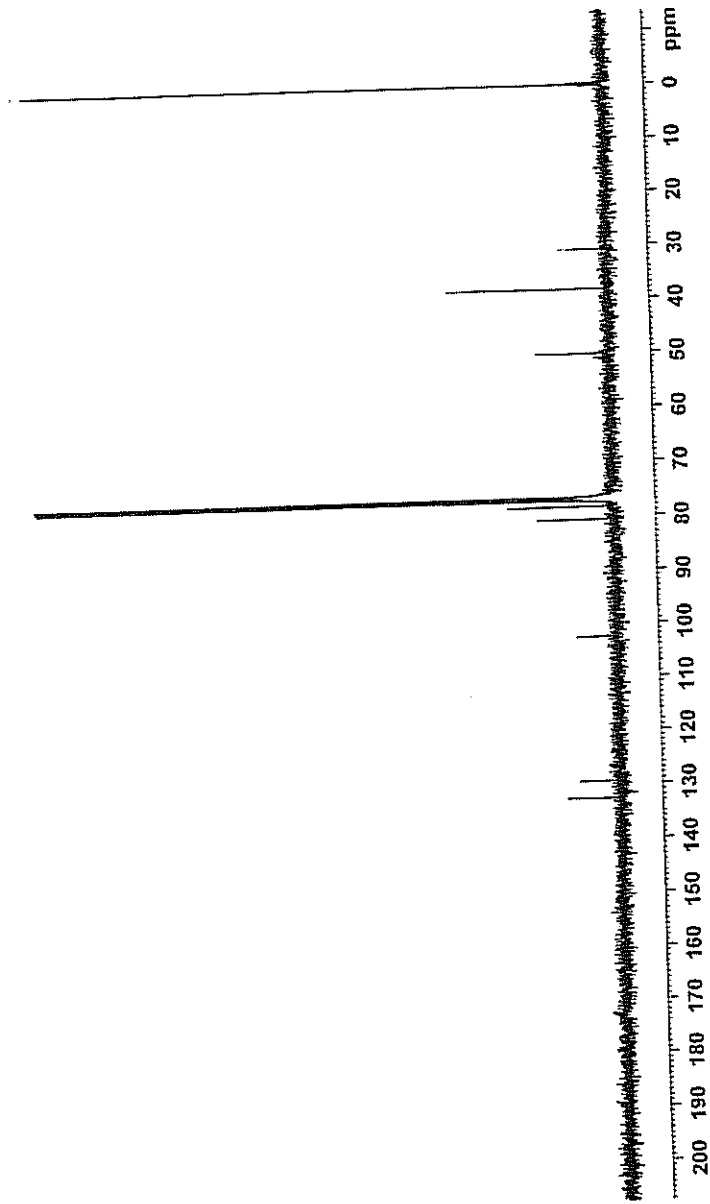
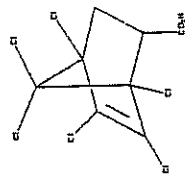




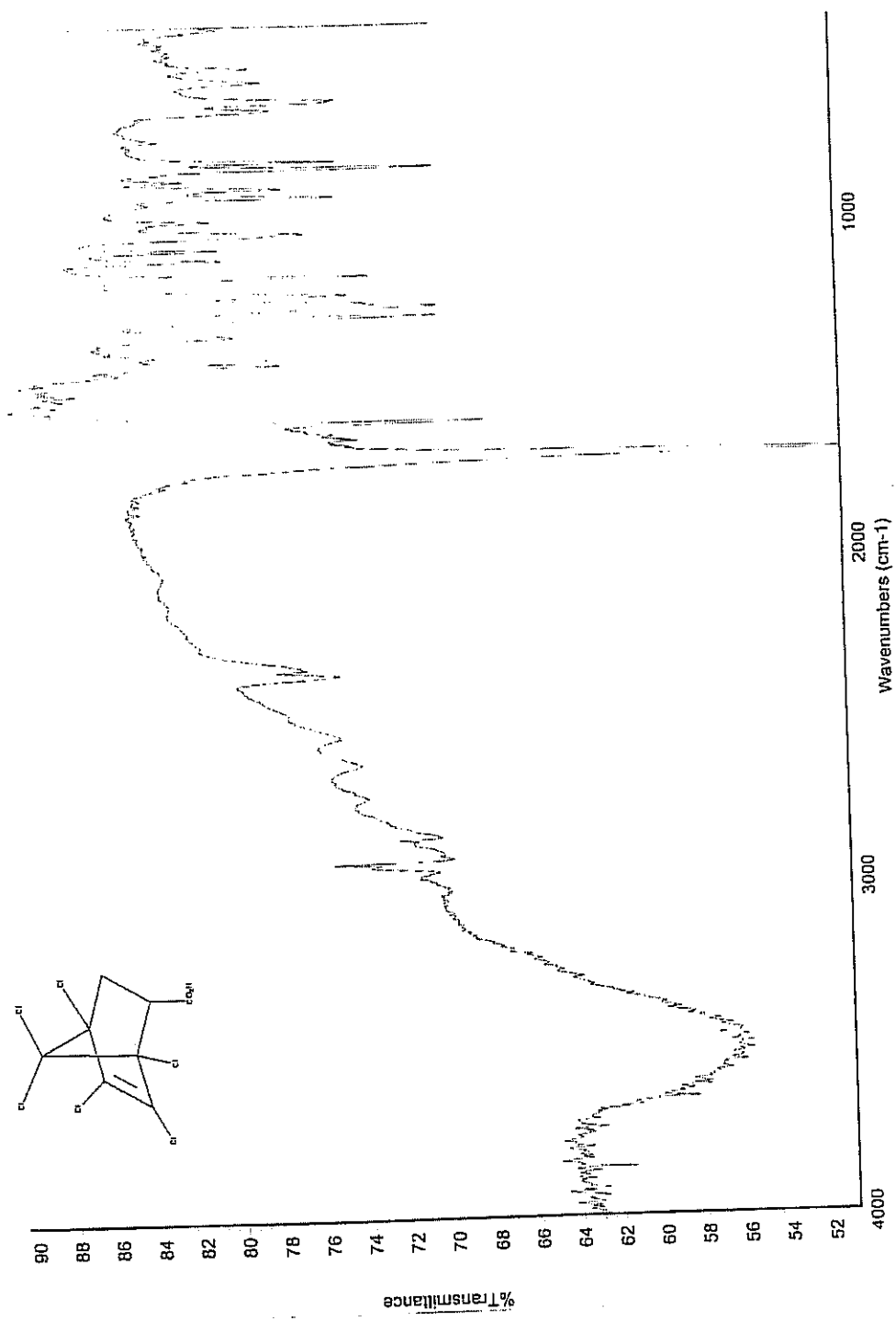
Figür 7. Bisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-ol metanol'ün  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu



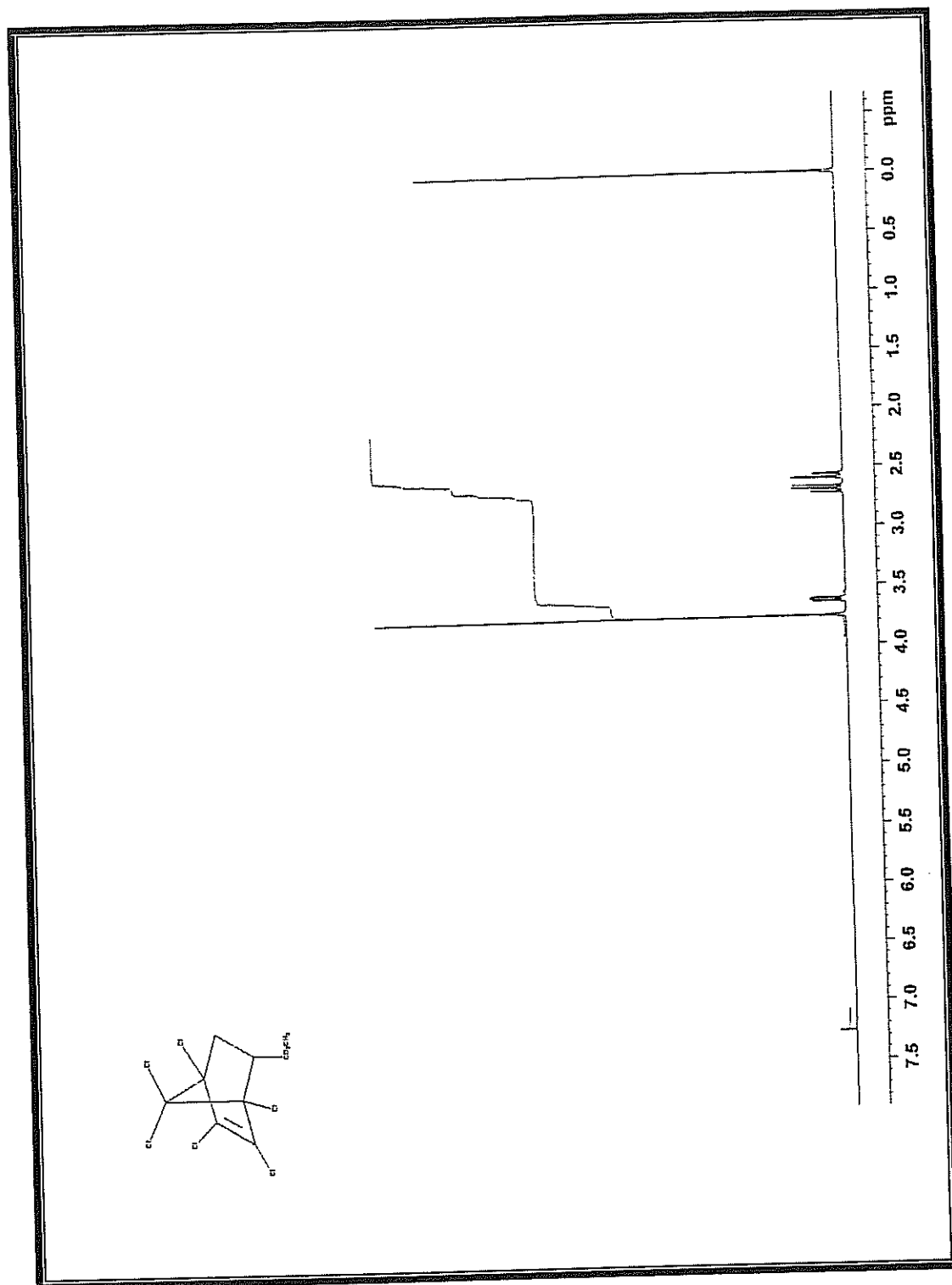
**Figür 8.** 1,4,5,6,7,7-Hekzaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



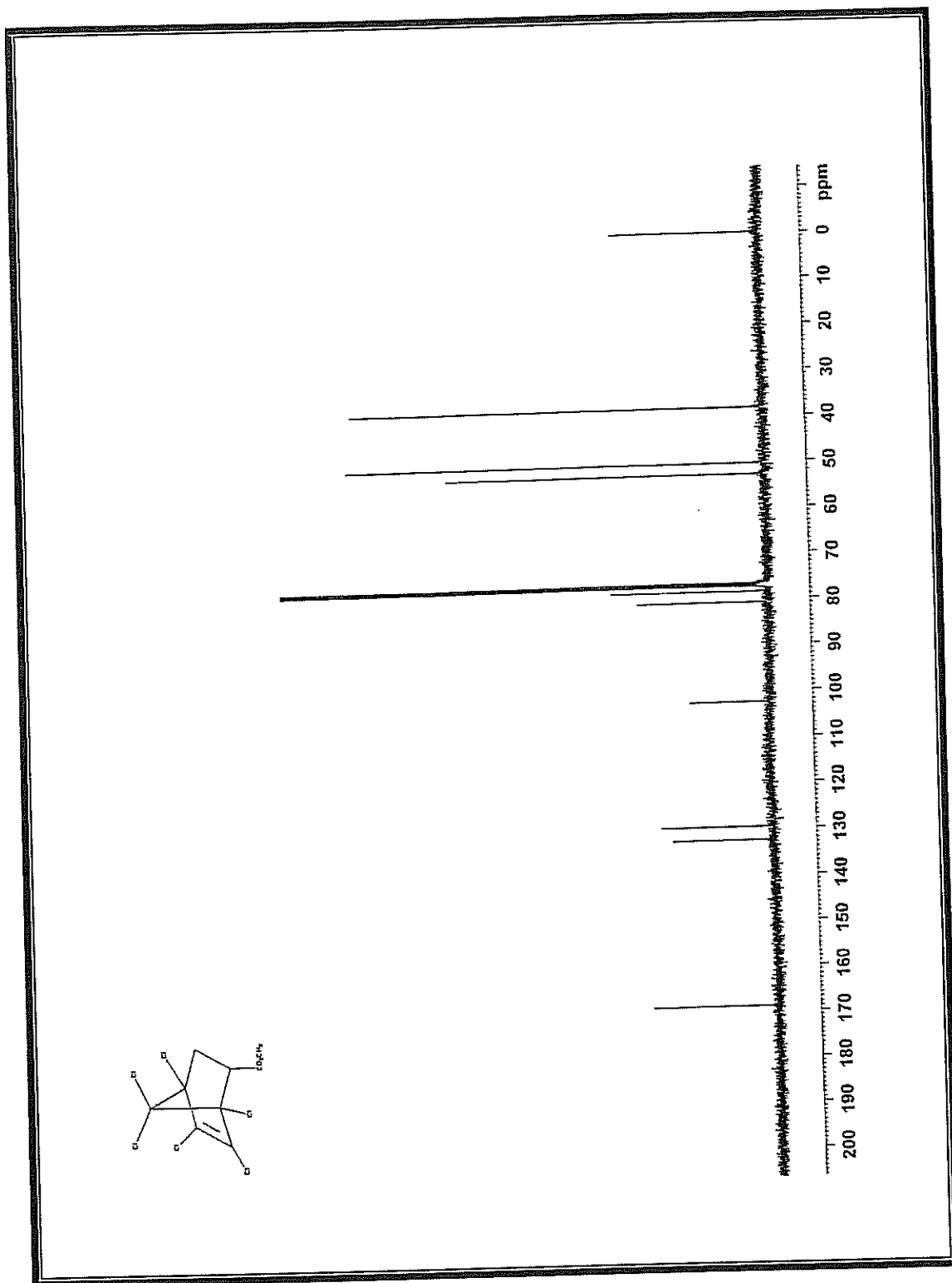
Figür 9. 1,4,5,6,7,7 -Heksaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karboksilik asit'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



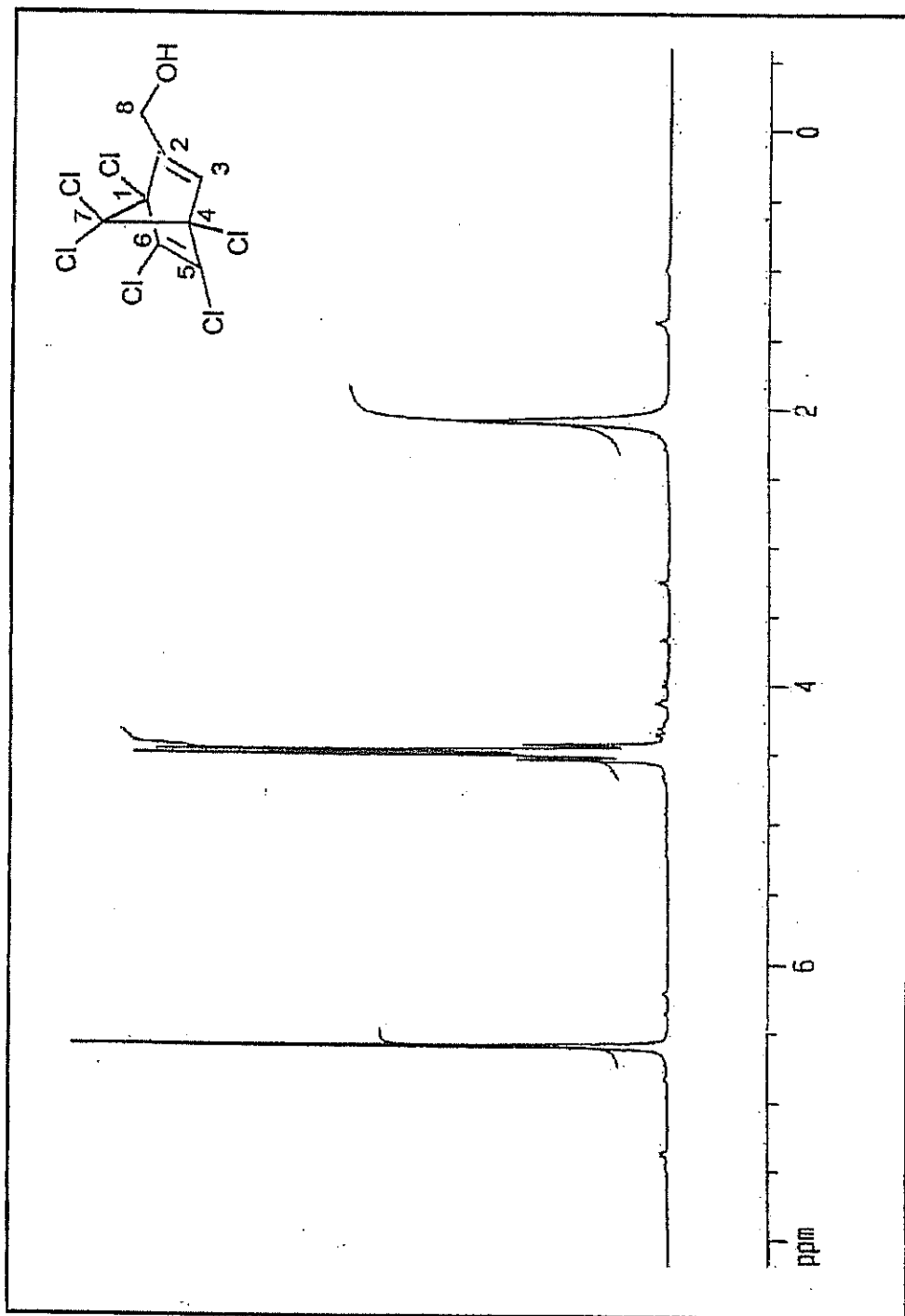
**Figür 10. 1,4,5,6,7,7 -Heksaklorobisiklo [2.2.1] hept-5-en-2-karbonsilik asit'in IR spektrumu**



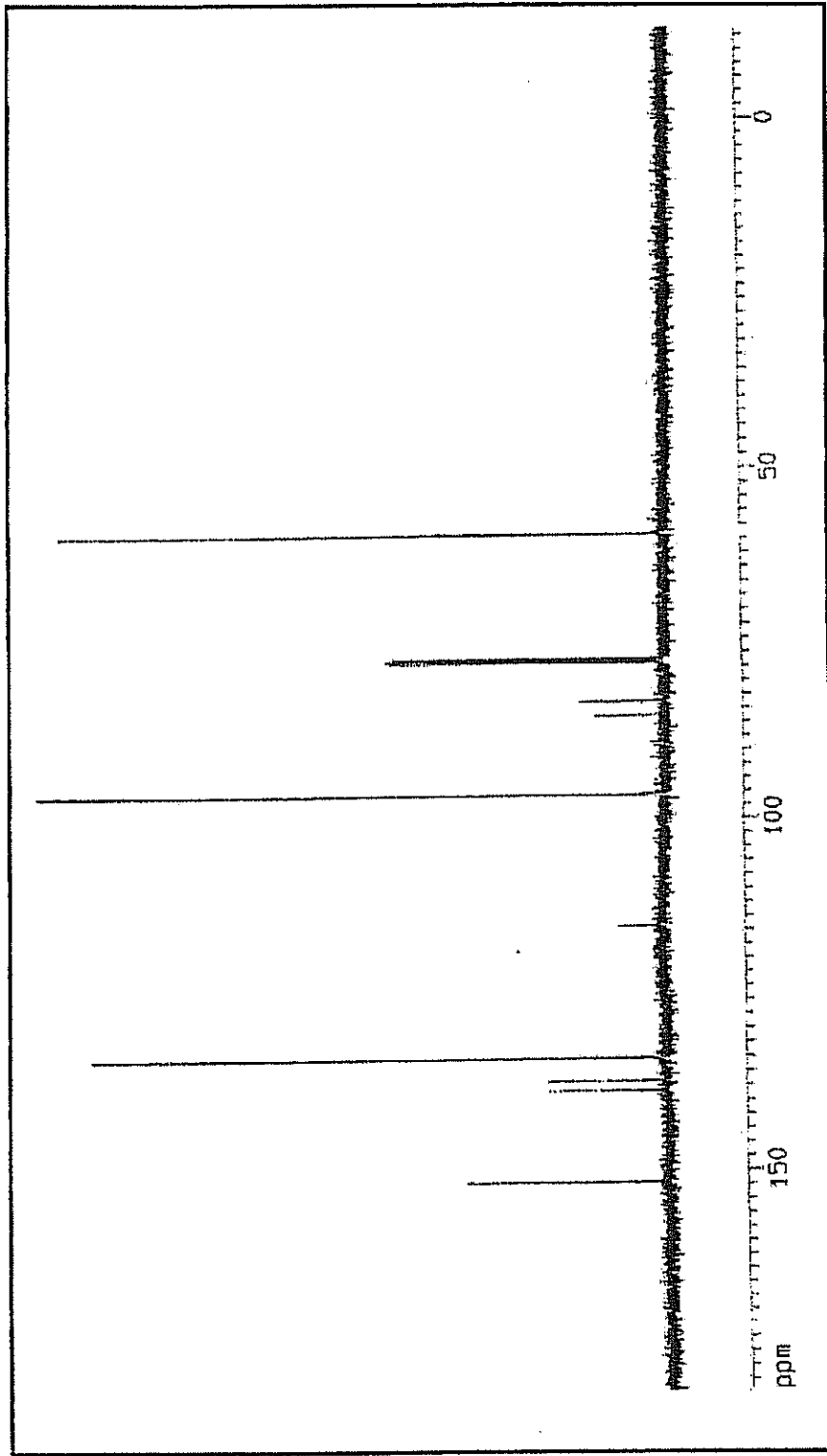
Figür 11. Metil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboksilat'ın  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu



Figür 12. Metil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-karboksilat'ın  $^{13}\text{NMR}$  spektrumu

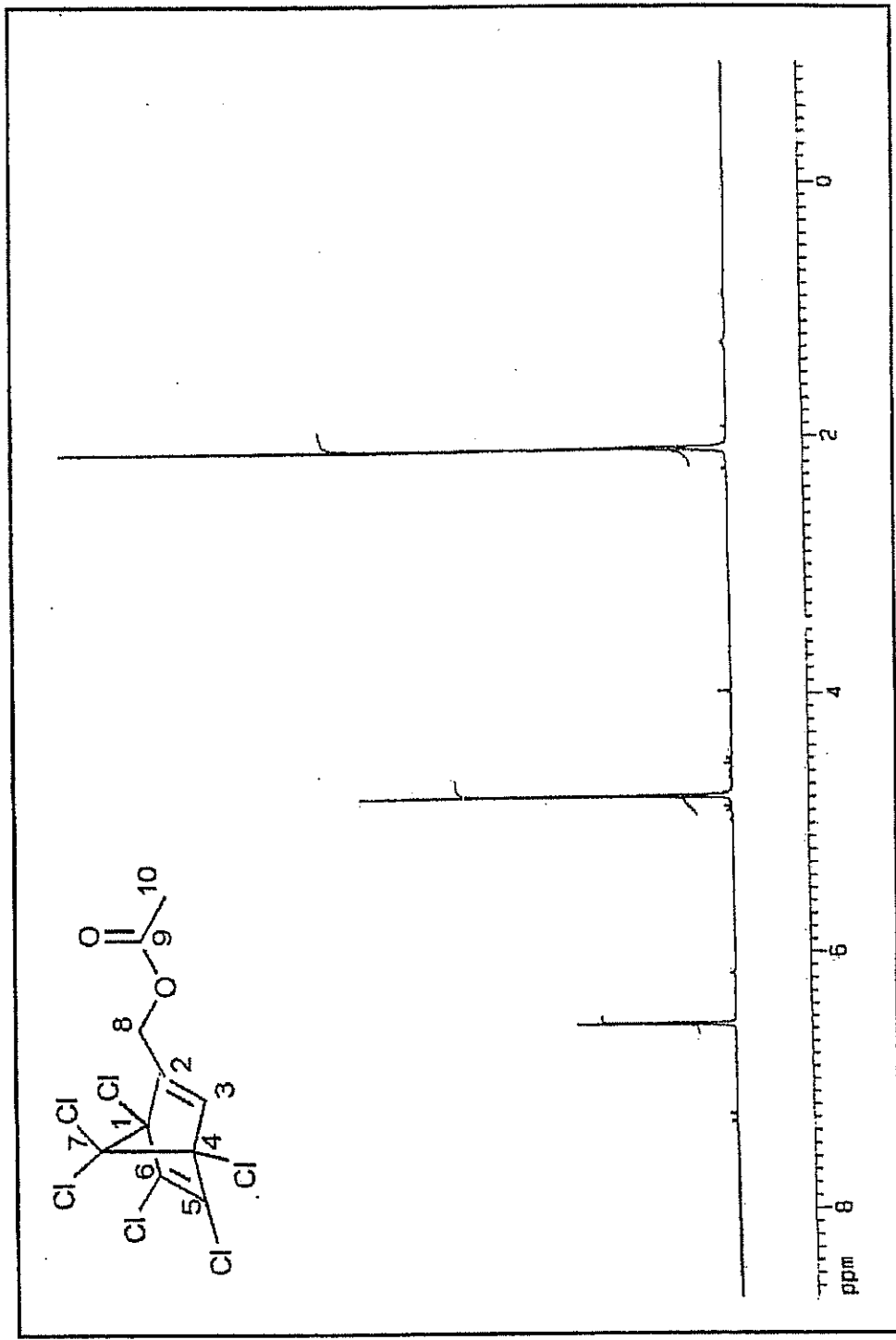


Figür 13. 2-Hidroksimetil-1,4,5,6,7,7-heksaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in <sup>1</sup>H -NMR spektrumu

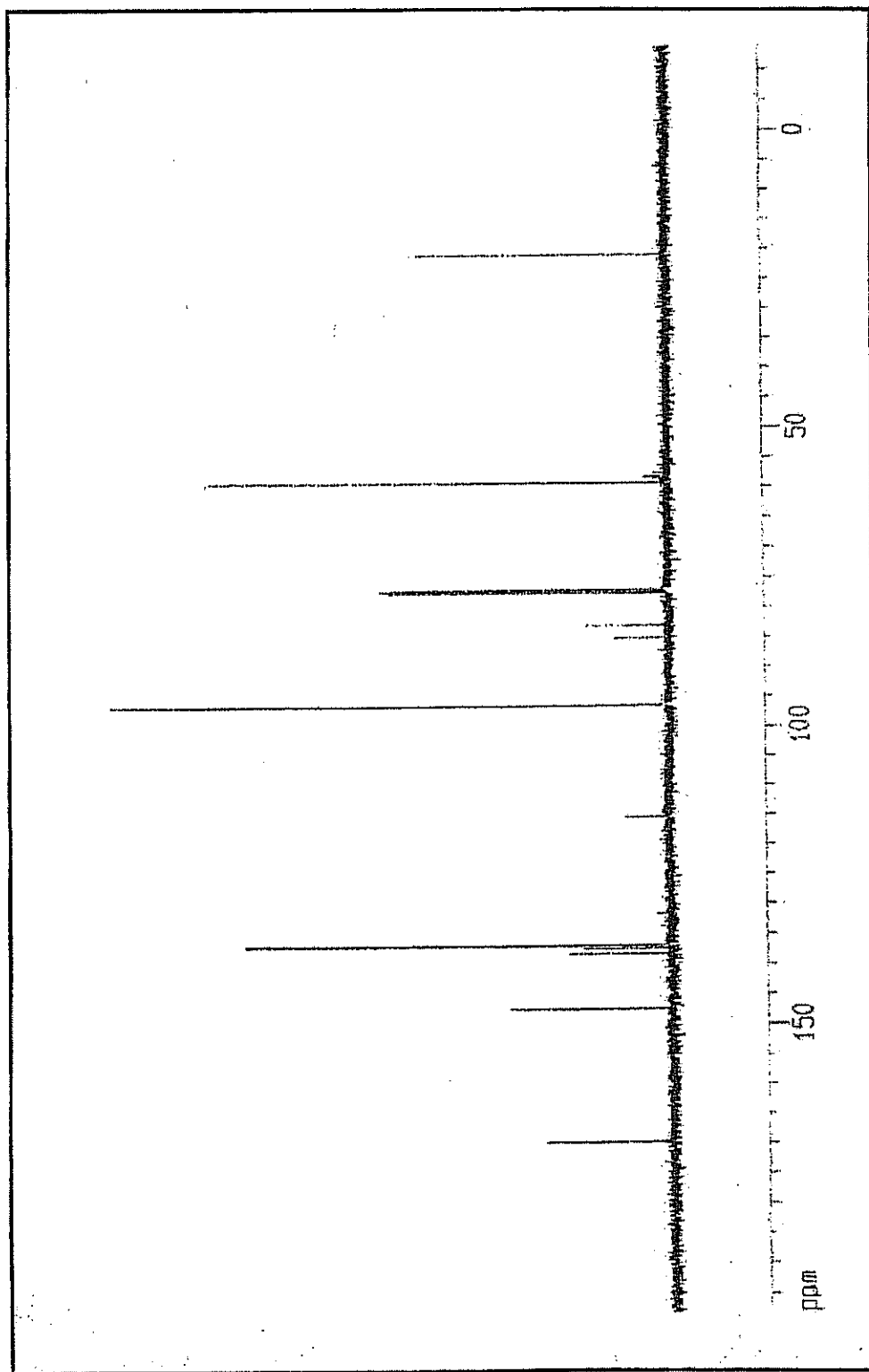


Figür 14. 2-Hidroksimetil-1,4,5,6,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

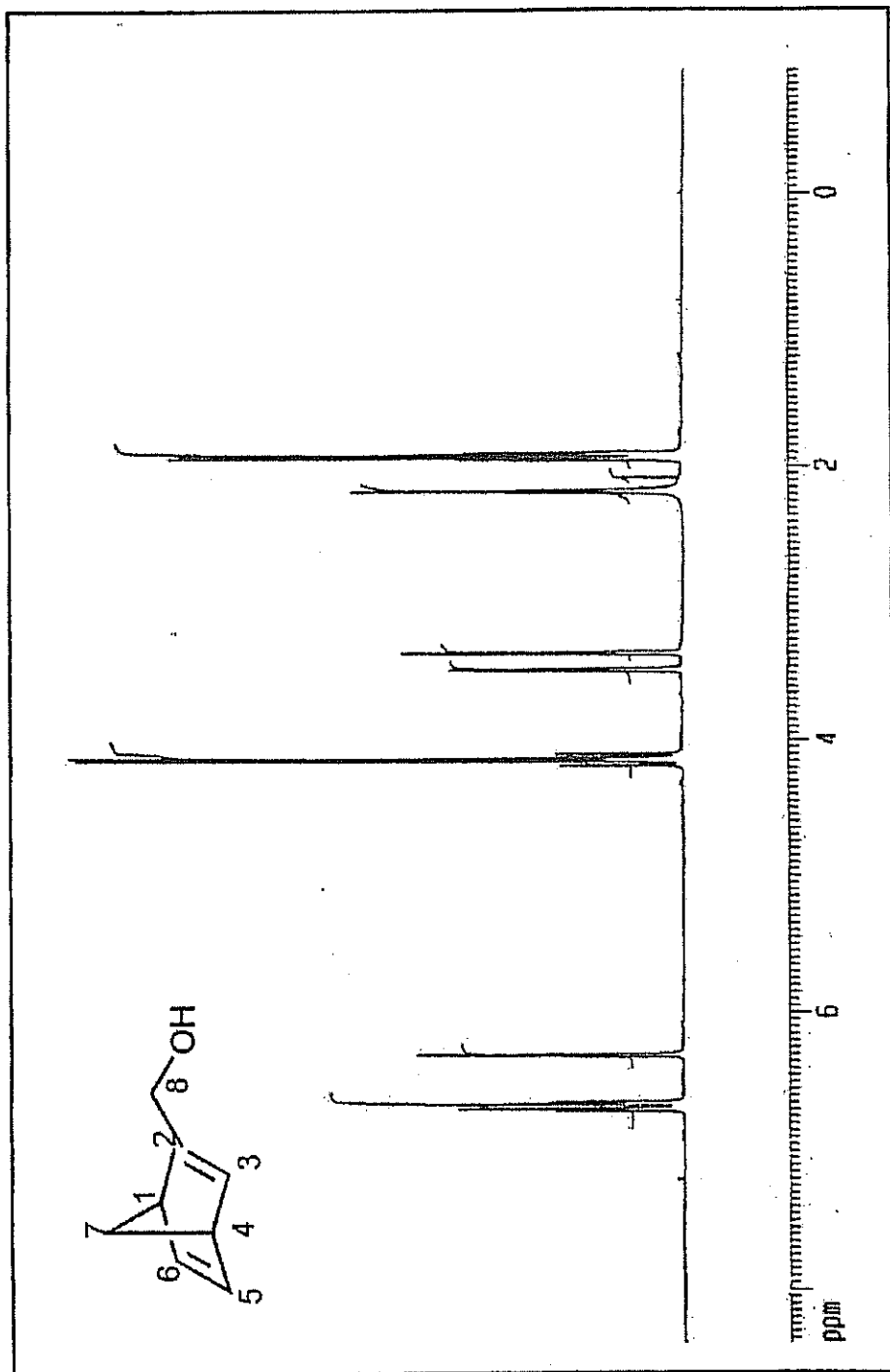




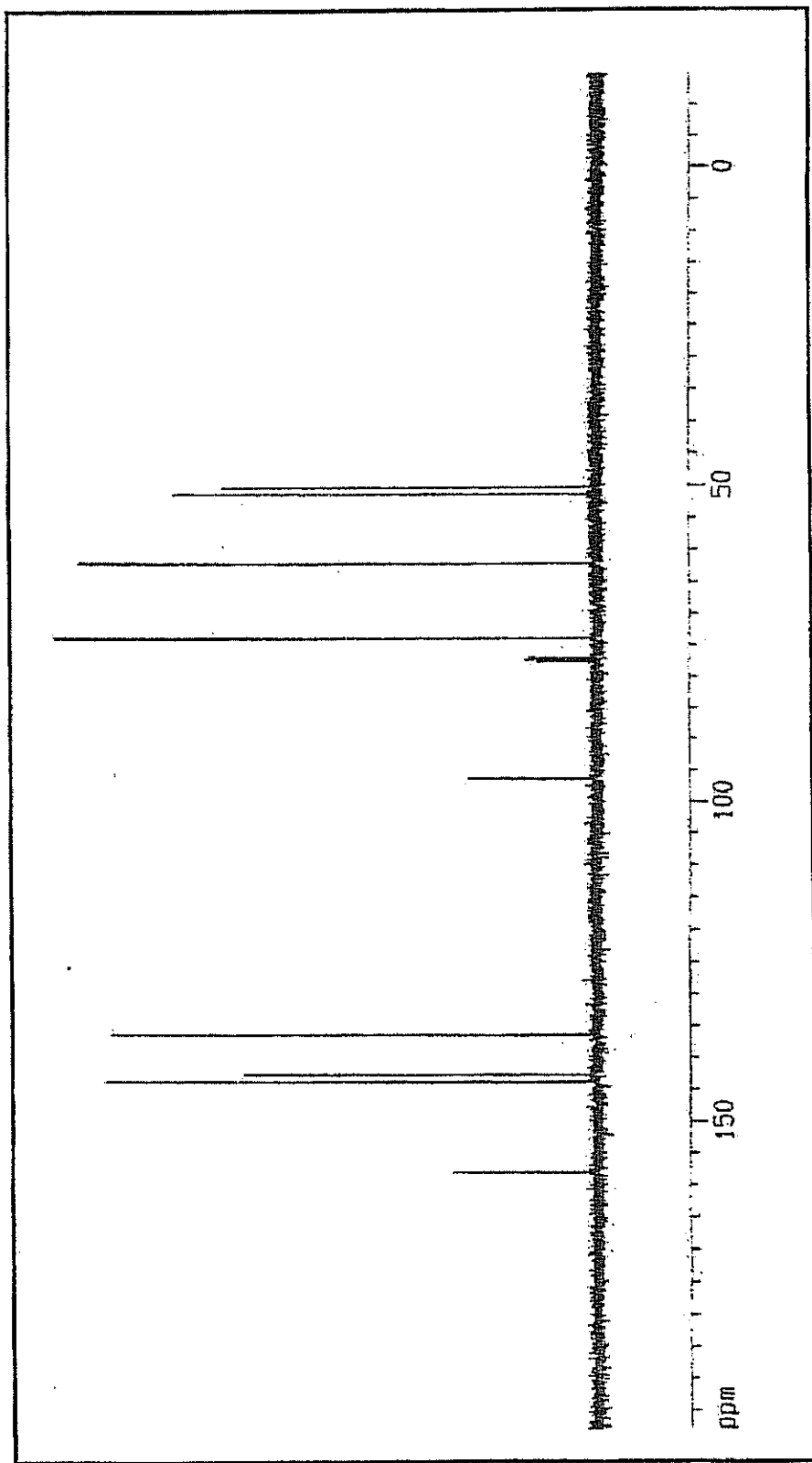
Figür 15. 2-Asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in <sup>1</sup>H -NMR spektrumu



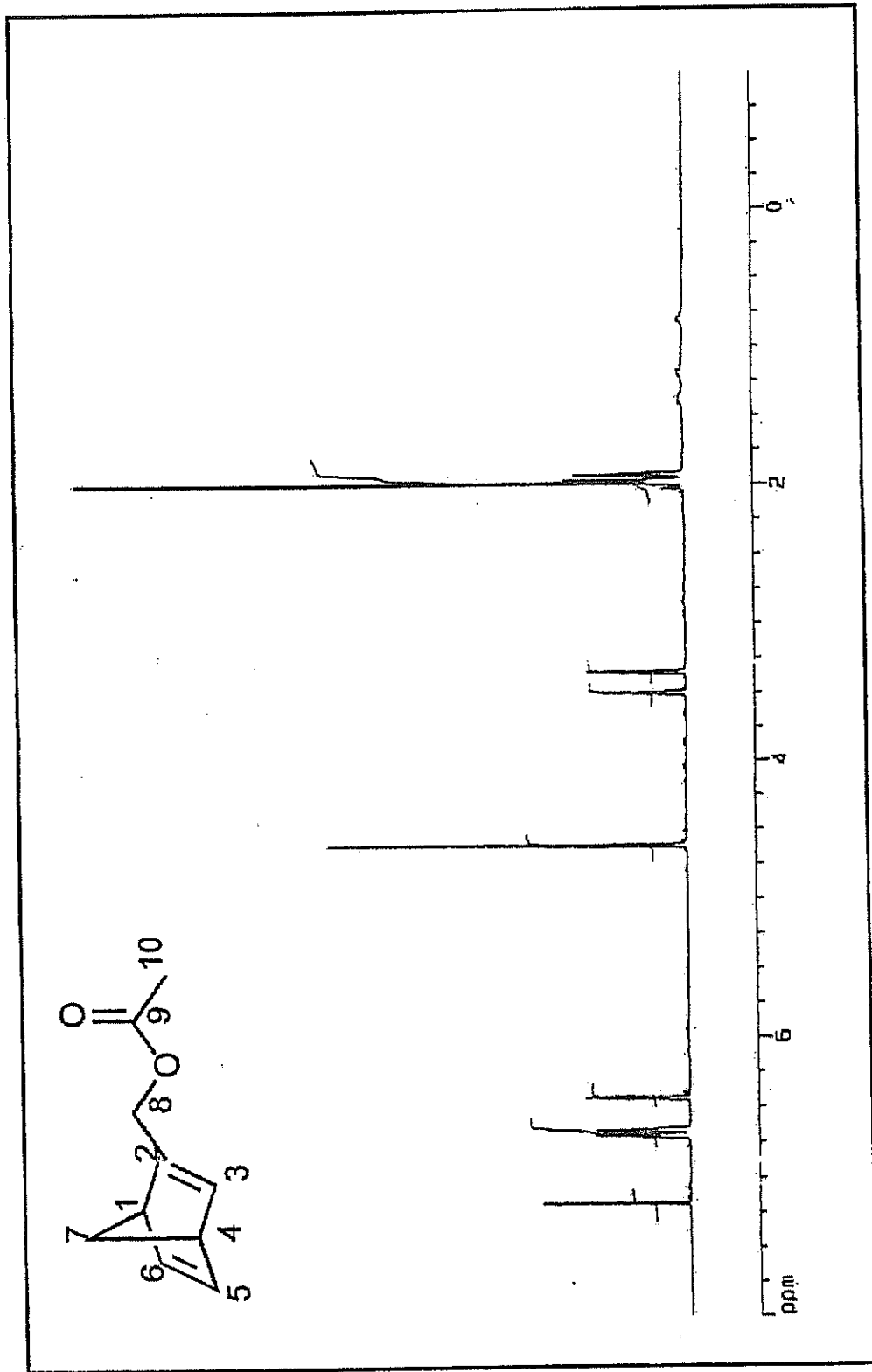
Figür 16. 2-Asetoksimetil-1,4,5,6,7,7-hekzaklorobisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



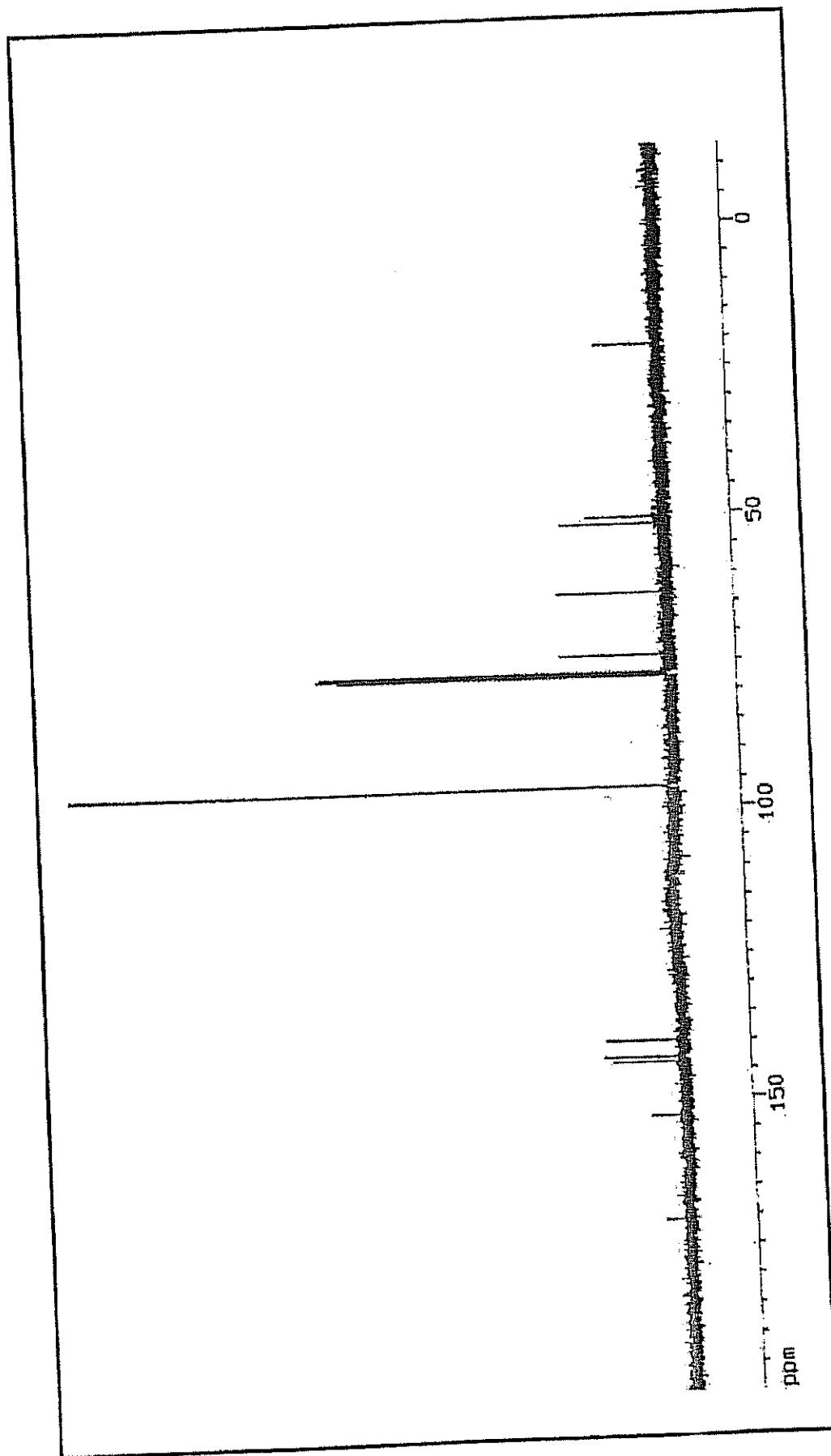
Figür 17. 2-Hidroksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



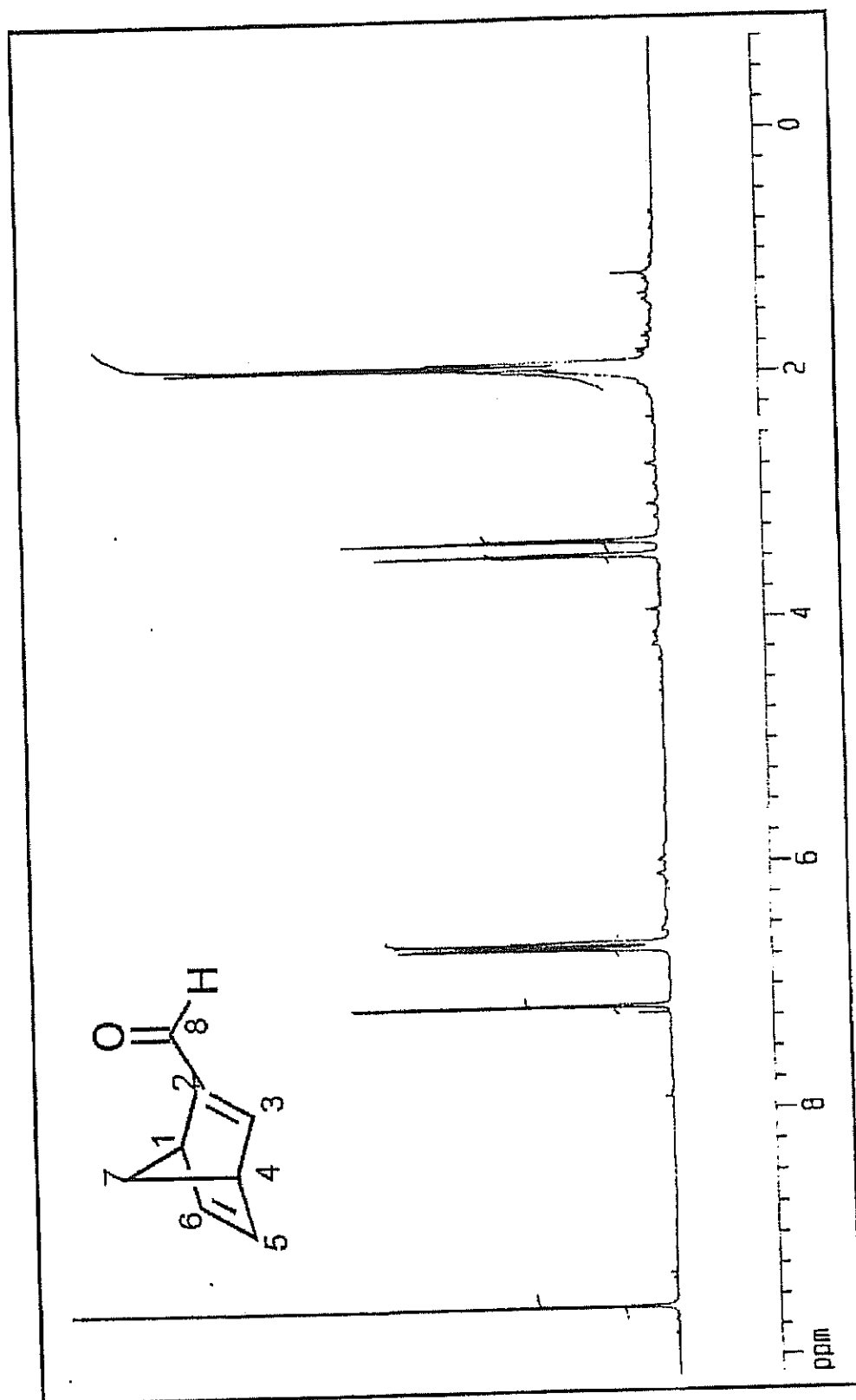
Figür 18. 2-Hidroksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



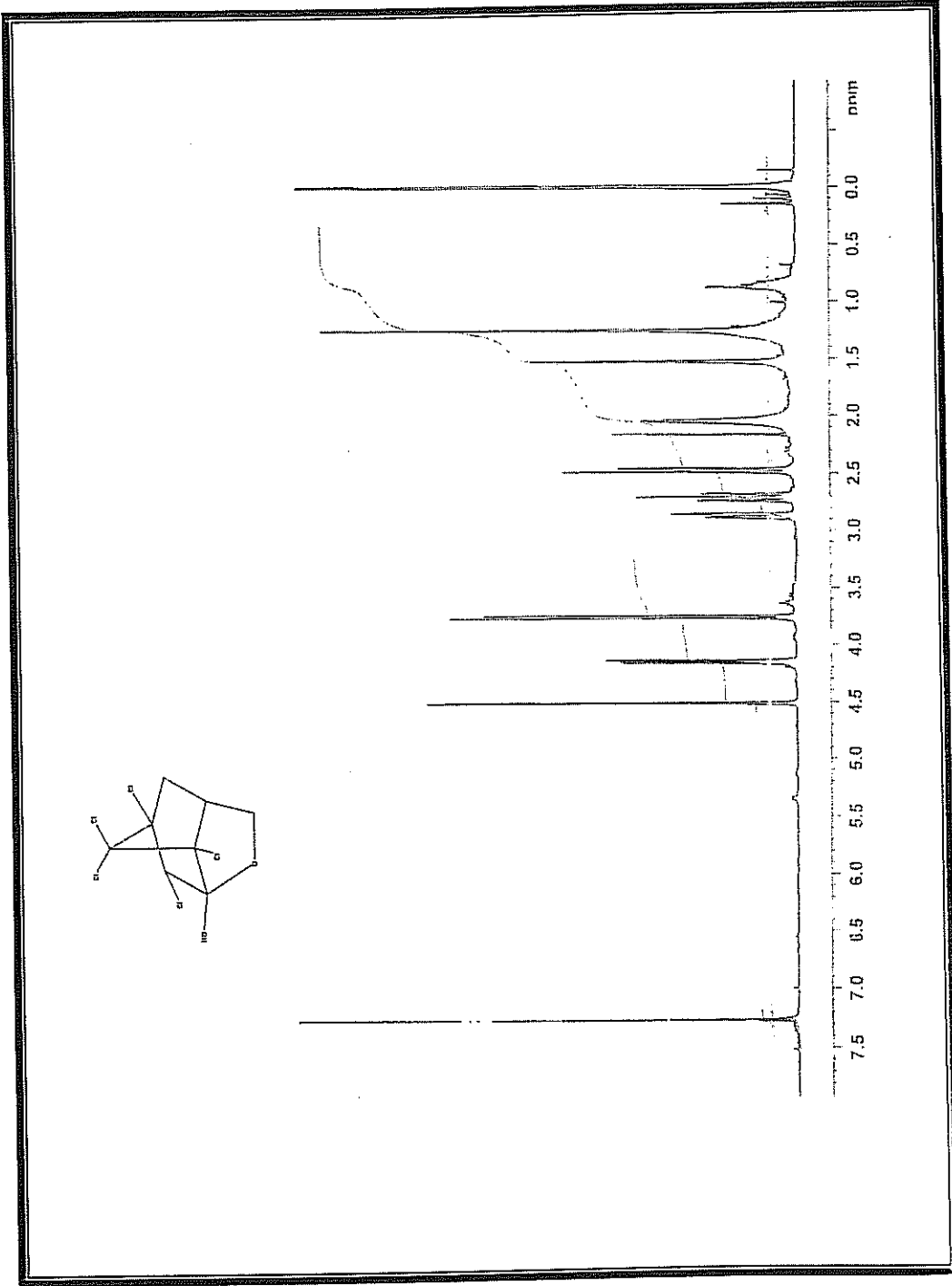
Figür 19. 2-Asetoksimetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in <sup>1</sup>H -NMR spektrumu



Figür 20. 2-Asetoksümetil-bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

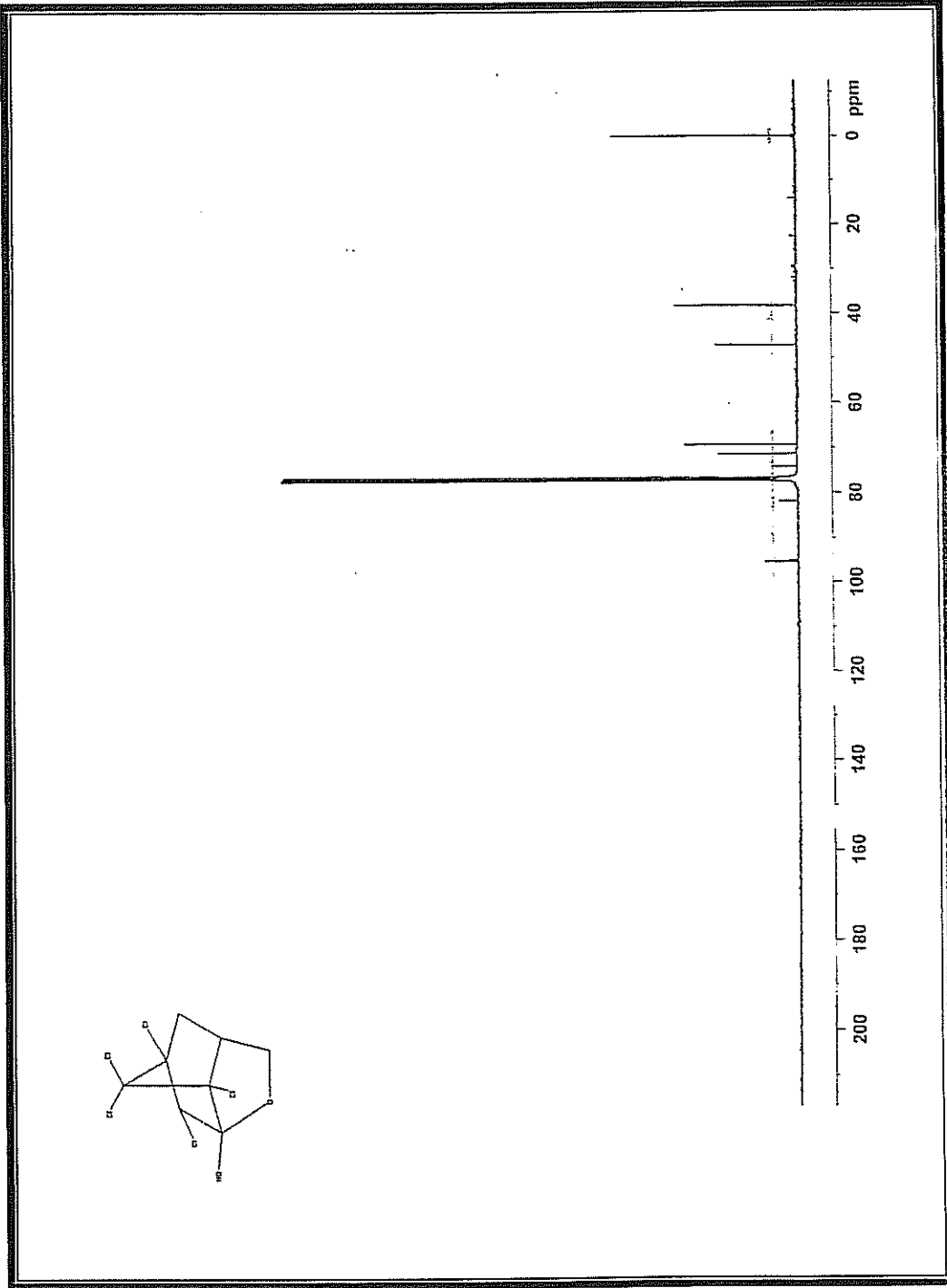


Figür 21. Bisiklo[2.2.1]hept-2,5-dien-2-karbaldehit'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

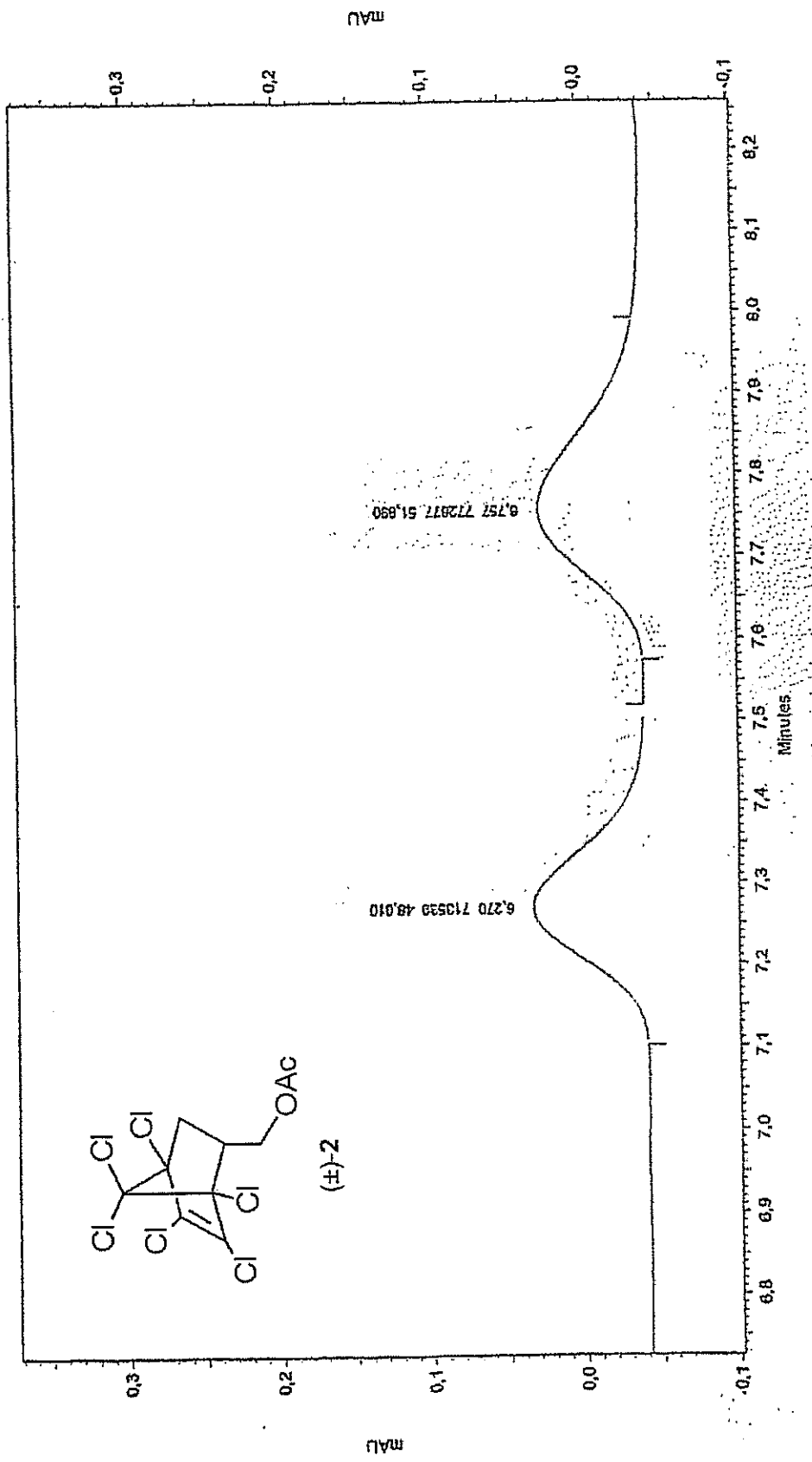


Figür 22. Trisiklik hemiketal yapının <sup>1</sup>H -NMR spektrumu

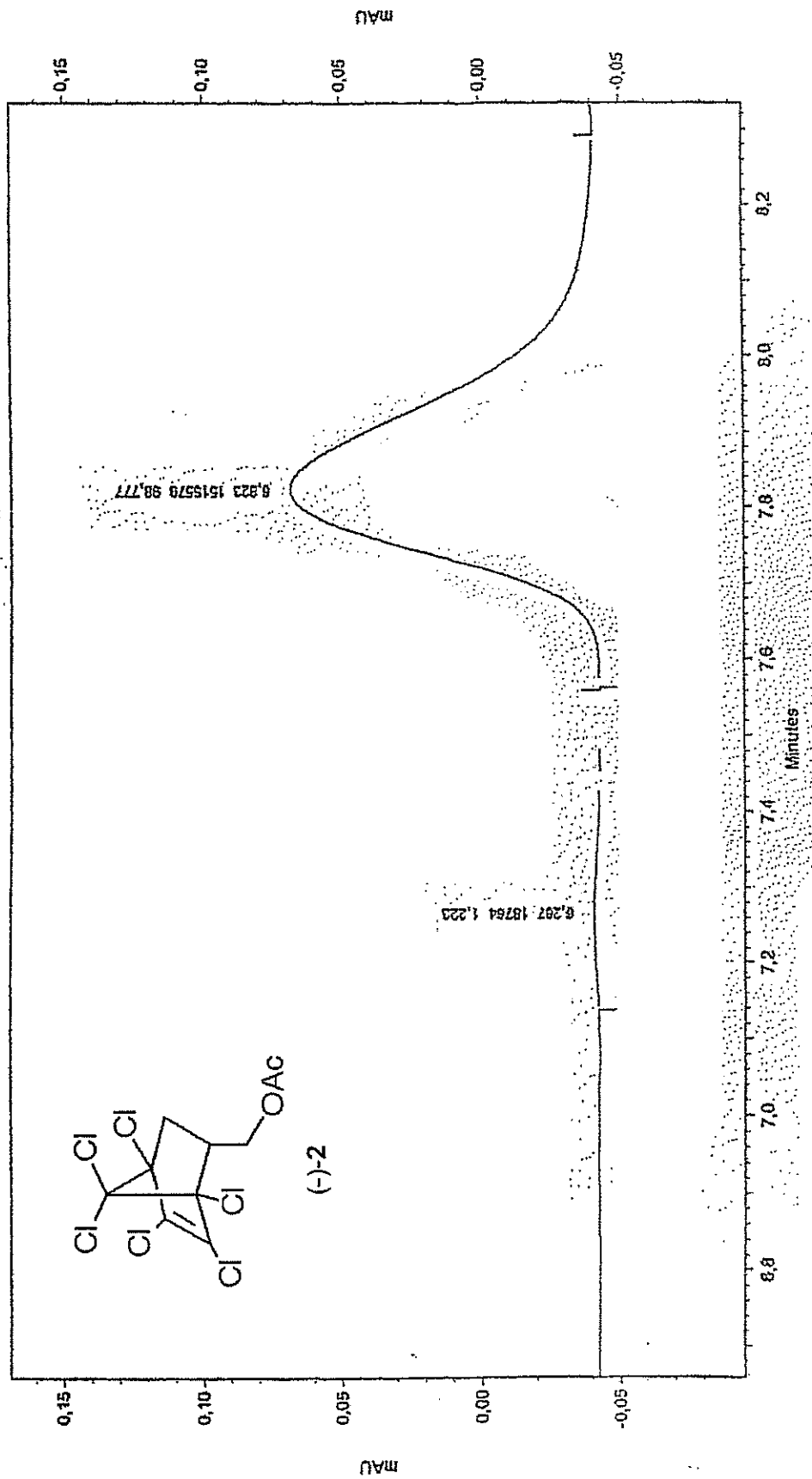




Figür 23. Trisiklik hemiketal yapının <sup>13</sup>C -NMR spektrumu



Figür 24. Rasemik (1,4,5,6,7,7-hexaklorobisiklo[2.2.1]hept-5-en-2-il) metil asetat'ın HPLC kromatogramı



Figür 25. Enantiyomerce zenginleştirilmiş (1,4,5,6,7,7-hexaklorobisiklo[2.2.1] hept-5-en-2-il) metil asetat'ın HPLC kromatogramı

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

18  
1-25, elden

1- Proje Kodu: TBAG-2454(104T066)
2- Proje Başlığı: Biyoaktif Norbornen-Hekzakloronorbornen Kiral Ester, Asit ve Alkollerin Enzimatik Yöntemle Eldesi
3- Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: Prof. Dr İdris M. Akhmedov, Arş. Gör. Ayşegül Gümüş, Timur Karadağ, Arş. Gör. Emre Yusuf Yazıcıoğlu
4- Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 06531 ANKARA
5- Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:
6- Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01.07.2004 - 01.07.2006
7- Öz (en çok 70 kelime) Kiral norbornen ve heksakloronorbornen karboksilik asit, ester ve alkol bileşiklerinin asimetric sentezi literatürde önemli bir yer tutmaktadır. Bu konudaki çalışmalar halen yoğun bir şekilde devam etmektedir. Bu maddeler özellikle prostaglandin maddelerinin sentezinde anahtar bileşik olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada hedeflenen maddelerin asimetric sentezi için enzimatik rezolüsyon yöntemi seçilmiştir. Katalitik miktarda kullanılmaları, yüksek enantiomerik seçiciliğe sahip olmaları ve çevreye uyumlu olmaları nedeni ile, enzimler asimetric sentezde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışmada heksakloronorbornen ve heksakloronorbornadien karboksilik asit, ester ve alkol türevleri heksaklorosiklopentadienin alil alkol, proparjil alkol ve akrilik asitle Diels- Alder tepkimesi aracılığı ile rasemik olarak sentezlenmiştir. Elde edilen rasemik ürünler çeşitli hidrolaz tipi enzimler ile enzimatik rezolüsyona tabi tutulmuş ve hedef ürünler yüksek enantiomerik saflıkla elde edilmiştir. Ürünlerin mutlak konfigürasyonları, onları deklorlaşma tepkimesi ile kendilerine karşılık gelen norbornen ve norbornadien türevlerine dönüştürmek ve optikçe çevirme açılarını literatürdeki değerleri ile karşılaştırmak vasıtasıyla belirlenmiştir.
8- Anahtar Kelimeler: Enzimatik rezolüsyon, heksakloronorbornen, mutlak konfigürasyon, deklorlaşma.
9- Projeden Kaynaklanan Yayınlar: Tetrahedron:Asymmetry 2005, 16, 2315-2318
Bilim Dalı: Doçentlik B. Dalı Kodu: