

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**YENİ TRIPEPTİT SÜBSTİTÜE SİKLOTRİFOSFAZEN
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İN
VİTRO SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

Alpaslan KAPLAN

Doktora Tezi

KİMYA ANABİLİM DALI

Anorganik Kimya Bilim Dalı

HAZİRAN 2024

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

**YENİ TRIPEPTİT SÜBSTİTÜE SİKLOTRİFOSFAZEN
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO
SİTOTOKSİK VE GENOTOKSİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Tez Yazarı
Alpaslan KAPLAN

Danışman
Doç. Dr. Kenan KORAN

HAZİRAN 2024
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Başlığı: Yeni Tripeptit Sübstitüe Siklotrifosfazen Bileşiklerinin Sentezi,
Karakterizasyonu ve İn Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin
İncelenmesi

Yazarı: Alpaslan KAPLAN

İlk Teslim Tarihi: 01.04.2024

Savunma Tarihi: 06.06.2024

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Kenan KORAN Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Prof. Dr. Bahattin YALÇIN Marmara Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Ahmet Orhan GÖRGÜLÜ Marmara Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. Ayşegül YAZICI Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Doç. Dr. Fatih BİRYAN Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza

Prof. Dr. Burhan ERGEN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım ‘‘Yeni Tripeptit Sübstitüe Siklotrifosfazen Bileşiklerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve İn Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin İncelenmesi’’ Başlıklı Doktora Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

06.06.2024

Alpaslan KAPLAN



ÖNSÖZ

Anorganik kimyanın önemli bir sınıfını oluşturan fosfazen bileşikleri, yan zincirlerine bağlanan organik, inorganik veya organo-metalik grupların özelliklerine göre farklı ve üstün özellikler gösterebilmek potansiyeline sahiptirler. Siklotrifosfazen halkasındaki fosfor atomuna bağlı olan klorların, -di, -tri, tetra, penta veya hekza süstitü fonksiyonlu nükleofiller ile kolay yer değiştirme reaksiyonları verebilmektedirler. Bu reaksiyonlar neticesinde, farklı fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler gösterebilmektedir. Halka üzerindeki klor atomlarının reaktif olmasından dolayı süstitüe olan grupların göstermiş oldukları özelliklere bağlı olarak antikanser, antibakteriyel, sensör, biyo-sensör, dielektrik, LED/OLED teknolojisi, yanmaya dayanıklı malzeme, alev geciktirici olma gibi önemli birçok farklı özellik sergilemektedir.

Çalışmalarım süresince zaman gözetmeksizin vakit ayırıp sorularımı cevaplayan, tüm olaylara karşı bilimsel bakış açımı genişleten danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kenan KORAN'a çok teşekkür ederim. Lisansüstü eğitimim süresince ilgi ve alakalarını gördüğüm Prof. Dr. Ahmet Orhan GÖRGÜLÜ hocama, anti-kanser çalışmalarda yardımlarını ve imkânlarını esirgemeyen İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Suat TEKİN ve Prof. Dr. Süleyman SANDAL hocalarıma ve Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya bölümü hocalarıma ve personellerine teşekkür ederim. Tez savunmam öncesi ve sonrasında desteklerini esirgemeyen CHEMBRIDGE Research Group ekibine sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, en büyük emeğe sahip olan kıymetli aileme, doktora tez savunma sınav zamanım ile eş zamanlı olarak Gülhane Tıp Fakültesini birincilikle bitiren ve bana bir kez daha büyük bir gurur yaşatan biricik kızıma şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması 118Z286 numaralı proje kapsamında TÜBİTAK-1001 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Alpaslan KAPLAN
ELAZIĞ, 2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ÖZET	Vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	xii
1. Giriş	1
2. SİKLOFOSFAZENLERİN NÜKLEOFİLİK REAKSİYONLARI VE MEKANİZMASI.....	4
3. SİKLOTRİFOSFAZEN BİLEŞİKLERİ İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI.....	9
4. MATERYAL VE METOT	17
4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
4.2. Spektroskopik Çalışmalar	17
4.3. Sentez ve Karakterizasyon Çalışmaları	18
4.3.1. Dipeptit Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu (Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ , Boc-Tyr-Gly-OH, Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ , Boc-Tyr-Ala-OH).....	18
4.3.1.1. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Dipeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	19
4.3.1.2. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Dipeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	23
4.3.1.3. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	27
4.3.1.4. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	29
4.3.2. Tripeptit Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	31
4.3.2.1. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	32
4.3.2.2. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	36
4.3.2.3. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	39
4.3.2.4. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	42
4.3.2.5. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	45
4.3.2.6. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu	48
4.3.3. Tripeptit Süstitüe Fosfazen Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	51
4.3.3.1. Başlangıç Bileşiği Dispirosiklotrifosfazen Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu (DPP).....	51
4.3.3.2. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	55
4.3.3.3. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	61
4.3.3.4. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	66
4.3.3.5. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	71
4.3.3.6. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	76
4.3.3.7. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2"-dioksi-1',1"-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu	81
4.3.4. Bileşiklerin Termal Özelliklerinin İncelenmesi	85

4.4.	Bileşiklerin İn Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin İncelenmesi.....	86
4.4.1.	İn Vitro Sitotoksosite Aktivite Çalışmaları	86
4.4.2.	İn Vitro Genotoksosite (DNA Hasarı) Çalışmaları	88
5.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	91
6.	SONUÇLAR.....	96
	KAYNAKLAR.....	97
	ÖZGEÇMİŞ	



ÖZET

Yeni Tripeptit Sübstitüe Siklotrifosfazen Bileşiklerinin Sentezi, Karakterizasyonu ve İn Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin İncelenmesi

Alpaslan KAPLAN

Doktora Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Haziran 2024, Sayfa: xii + 99

Bu tez çalışmasında ilk olarak, başlangıç bileşiği olarak amin grubu korumalı karboksil grubu serbest olan tirozin aminoasitinin (Boc-Tyr-OH) sırasıyla Glisin ve Alanin metil ester hidroklorür formları ile CDMT yöntemi ile asetonitril ortamında etkileştirilerek 2 adet dipeptit bileşiği (Boc-Tyr-Gly-OCH₃ ve Boc-Tyr-Ala-OCH₃) elde edildi. Bu dipeptitler kullanılarak birinci aşamada, metil esterli dipeptit bileşiklerinin ester grupları karboksil grubuna dönüştürülerek Boc-Tyr-Gly/Ala-OH dipeptitleri sentezlenmiştir. Boc-Tyr-Gly-OH ve Boc-Tyr-Ala-OH dipeptitleri bileşiklerinden Boc-Tyr-Gly-OH ile Glisin (NH₂-Gly-OCH₃.HCl) ve Alanin (NH₂-Ala-OCH₃.HCl), Boc-Tyr-Ala-OH dipeptiti ile sırasıyla Glisin (NH₂-Gly-OCH₃.HCl), Alanin (NH₂-Ala-OCH₃.HCl), Valin (NH₂-Val-OCH₃.HCl) ve Fenilalanin (NH₂-Phe-OCH₃.HCl) metil ester hidroklorür aminoasitleri ile asetonitril içerisinde CDMT yöntemine kullanılarak etkileştirilmesi ile 6 adet tripeptit bileşiği elde edilmiştir. Üçüncü aşamada, elde edilen tripeptit bileşikleri, fosfazen başlangıç bileşiği olan DPP ile etkileştirilerek 6 adet disübsititüe tripeptit-siklotrifosfazen bileşiği elde edildi. Elde edilen tüm bileşikler ince tabaka kromatografisi ile takip edilerek sonlandırıldı ve aynı hareketli faz göz önünde bulundurularak Flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen tripeptitlerin yapısal karakterizasyonları elementel analiz, FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR spektrumları ile sübstitüe fosfazen bileşiklerinin ise ek olarak ³¹P ve HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS spektroskopisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bileşiklerin termal özellikleri TGA yöntemi ile belirlendi. TGA eğrilerinden bileşiklerin neredeyse tamamının bozunmaya başladığı sıcaklık 400 °C'nin üzerindedir. Bu sonuçlar neticesinde elde edilen siklotrifosfazenlerin termal olarak kararlı bir yapıda oldukları görülmektedir.

Saf olarak elde edilen bileşiklerin insan kanser hücre hatları over (A2780) ve prostat (PC-3) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik özellikleri MTT assay yöntemiyle belirlenerek % hücre canlılıkları belirlendi ve bileşiklerin LogIC₅₀ değerleri hesaplandı. Hücre ölümlerinin DNA hasarı mekanizması üzerinden olup olmadığı Comet Assay metodu ile belirlendi. Hücre canlılığında meydana gelen azalmanın temelinde DNA hasarına bağlı olarak ortaya çıktığı comet assay deneyleriyle belirlendi (p<0.05).

Anahtar Kelimeler: Siklotrifosfazen, Tripeptit, Sitotoksikite, DNA Hasarı, Genotoksikite

ABSTRACT

Investigation of Synthesis, Characterization In Vitro Cytotoxic and Genotoxic Properties of New Tripeptide Substituted Cyclotriphosphazenes

Alpaslan KAPLAN

Ph.D. Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

June 2024, Pages: xii + 99

In this thesis, 2 dipeptide compounds (Boc-Tyr-Gly-OCH₃ and Boc-Tyr-Ala-OCH₃) were obtained by interacting the amino acid tyrosine (Boc-Tyr-OH) with Glycine and Alanine methyl ester hydrochloride forms with protected amine group and free carboxyl group respectively by CDMT method in acetonitrile medium. Using these dipeptides, Boc-Tyr-Gly-OH and Boc-Tyr-Ala-OH dipeptides were synthesized in the first step by converting the ester groups of the methyl ester dipeptide compounds into carboxyl groups in acetonitrile. Boc-Tyr-Gly/Ala-OH dipeptides were synthesized as Boc-Tyr-Gly-OH with Glycine (NH₂-Gly-OCH₃.HCl) and Alanine (NH₂-Ala-OCH₃.HCl), Boc-Tyr-Ala-OH dipeptide with Glycine (NH₂-Gly-OCH₃.HCl), Alanine (NH₂-Ala-OCH₃.HCl), Valine (NH₂-Val-OCH₃.HCl) and Phenylalanine (NH₂-Phe-OCH₃.HCl) methyl ester hydrochloride amino acids in acetonitrile using the CDMT method, 6 tripeptide compounds were obtained. In the third step, the obtained tripeptide compounds were interacted with the phosphazene starting compound DPP to obtain 6 disubstituted tripeptide-cyclotriphosphazene compounds. All the compounds obtained were followed by thin layer chromatography and purified by flash chromatography using the same mobile phase. Structural characterizations of the purified tripeptides were carried out by elemental analysis, FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR spectra and substituted phosphazene compounds were additionally characterized by ³¹P and HETCOR (2D) NMR and MALDI-TOF MS spectroscopy. Thermal properties of the compounds were determined by TGA method. From the TGA curves, the temperature at which almost all of the compounds start to decompose is above 400 °C. These results indicate that the obtained cyclotriphosphazenes are thermally stable.

The cytotoxicity properties of the pure compounds against human cancer cell lines ovarian (A2780) and prostate (PC-3) cancer cell lines were determined by MTT assay method, % cell viability was determined and LogIC₅₀ values of the compounds were calculated. Comet assay method was used to determine whether cell death was caused by DNA damage mechanism. It was determined by comet assay experiments that the decrease in cell viability was mainly due to DNA damage (p<0.05).

Keywords: Cyclotriphosphazene, Tripeptide, Cytotoxicity, DNA Damage, Genotoxicity

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Siklofosfazen yapıları ile ilgili bazı örnek gösterimler.....	1
Şekil 1.2. Dört ve Yirmi dört üyeli siklofosfazen yapıları ile ilgili gösterimler	2
Şekil 1.3. Dört ve yirmi dört üyeli siklofosfazen yapıları ile ilgili gösterimler	2
Şekil 1.4. Karışık süstitüent içeren siklofosfazenler.....	3
Şekil 2.1. Pentakis alkoksi ve ariloksisiklofosfazenlerin hazırlanması	5
Şekil 2.2. $N_3P_3Cl_5(NR_2)$ ile reaksiyonunda bir nükleofilin olası saldırı bölgeleri	5
Şekil 2.3. Siklotrifosfazenin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarında S_N2 reaksiyon yolları.....	6
Şekil 2.4. Siklotrifosfazenin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarında S_N1 reaksiyon gösterimleri	7
Şekil 3.1. Suda çözünür fosfazen trimer-doksorubisin konjugatının genel sentez şeması.....	10
Şekil 3.2. Tiyosemikarbazon süstitüe fosfazen bileşiklerinin genel sentez şeması	11
Şekil 3.3. 3-oksipiridin grupları taşıyan iki yeni siklotrifosfazen ligandı (2 ve 3) ve Ru(II) komplekslerinin (4 ve 5) genel sentez gösterimi	12
Şekil 3.4. İlgili literatürde sentezlenmiş olan kumarin-fosfazen bileşiklerinin genel sentez gösterimi	12
Şekil 3.5. 3-oksipiridin grupları taşıyan iki yeni siklotrifosfazen ligandı (2 ve 3) ve Ru(II) komplekslerinin (4 ve 5) genel sentez gösterimi	13
Şekil 3.6. Antrakınon grupları taşıyan siklotrifosfazen (7-9) bileşiklerinin gösterimi	14
Şekil 3.7. Dipeptit yapıları taşıyan siklotrifosfazen bileşiklerinin gösterimi.....	16
Şekil 3.8. Hekza süstitüe kalkon grupları taşıyan siklotrifosfazen bileşikleri	15
Şekil 4.1. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	19
Şekil 4.2. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	20
Şekil 4.3. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆).....	20
Şekil 4.4. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (THF).....	21
Şekil 4.5. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	23
Şekil 4.6. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆).....	24
Şekil 4.7. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆).....	24
Şekil 4.8. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu	25
Şekil 4.9. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	27
Şekil 4.10. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆).....	27
Şekil 4.11. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	28
Şekil 4.12. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	29
Şekil 4.13. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆).....	30
Şekil 4.14. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	30

Şekil 4.15. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	33
Şekil 4.16. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	33
Şekil 4.17. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	34
Şekil 4.18. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ bileşiğinin MALDI-TOF-kütle spektrumu	34
Şekil 4.19. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	36
Şekil 4.20. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	37
Şekil 4.21. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	37
Şekil 4.22. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	39
Şekil 4.23. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	40
Şekil 4.24. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	40
Şekil 4.25. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	42
Şekil 4.26. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	43
Şekil 4.27. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	43
Şekil 4.28. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	45
Şekil 4.29. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	46
Şekil 4.30. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	46
Şekil 4.31. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	48
Şekil 4.32. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	49
Şekil 4.33. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	49
Şekil 4.34. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu.....	50
Şekil 4.35. DPP Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	52
Şekil 4.36. DPP Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (Kloroform-d)	53
Şekil 4.37. DPP Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (Kloroform-d).....	53
Şekil 4.38. DPP Bileşiğinin ¹³C-NMR Spektrumu (Kloroform-d).....	54
Şekil 4.39. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	55
Şekil 4.40. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	56
Şekil 4.41. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	56
Şekil 4.42. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	57
Şekil 4.43. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	57
Şekil 4.44. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)	58
Şekil 4.45. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR).....	61
Şekil 4.46. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	62
Şekil 4.47. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆).....	62
Şekil 4.48. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)	63

Şekil 4.49. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	63
Şekil 4.50. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d ₆)	64
Şekil 4.51. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	66
Şekil 4.52. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin ³¹ P-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	67
Şekil 4.53. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	67
Şekil 4.54. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	68
Şekil 4.55. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	68
Şekil 4.56. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d ₆)	69
Şekil 4.57. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	71
Şekil 4.58. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin ³¹ P-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	72
Şekil 4.59. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	72
Şekil 4.60. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	73
Şekil 4.61. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	73
Şekil 4.62. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d ₆)	74
Şekil 4.63. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	76
Şekil 4.64. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin ³¹ P-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	77
Şekil 4.65. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	77
Şekil 4.66. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	78
Şekil 4.67. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu	78
Şekil 4.68. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)	81
Şekil 4.69. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin ³¹ P-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	82
Şekil 4.70. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	82
Şekil 4.71. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin ¹³ C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d ₆)	83
Şekil 4.72. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d ₆)	83
Şekil 4.73. Bileşiklerin bazılarının Comet Assay denemeleri kapsamında A2780 ve PC-3 kanser hücrelerinden elde edilen örnek görüntüleri (Sarı ok işaretleri DNA hasarı meydana gelen ve comet görüntüsü elde edilen hücreleri göstermektedir; X10)	90
Şekil 5.1. PC-3 hücre hatlarına karşı LogIC50 grafikleri	92
Şekil 5.2. A2780 hücre hatlarına karşı bileşiklerin hücre canlılığı (%). Bileşiklerin neden olduğu hücre canlılığındaki (%) değişiklikler kontrol verileriyle karşılaştırılmıştır. Her veri noktası 10 canlılığın ortalamasına sahiptir (*p< 0.05).	93
Şekil 5.3. PC-3 hücre hatlarına karşı bileşiklerin LogIC50 grafikleri	94
Şekil 5.4. A2780 hücre hatlarına karşı bileşiklerin hücre canlılığı (%). Bileşiklerin neden olduğu hücre canlılığındaki (%) değişiklikler kontrol verileriyle karşılaştırılmıştır. Her veri noktası 10 canlılığın ortalamasına sahiptir (*p< 0.05).	94

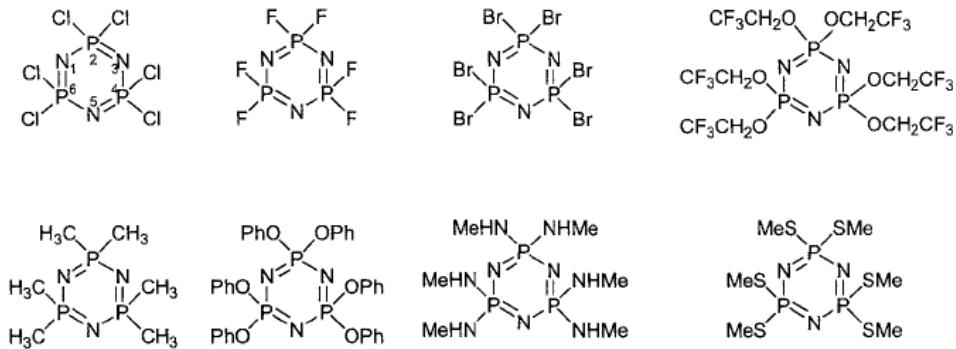
TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Bazı fosfazen bileşiklerinin erime ve kaynama noktaları	3
Tablo 4.1. Boc-Tyr-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	21
Tablo 4.2. Boc-Tyr-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	25
Tablo 4.3. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	28
Tablo 4.4. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	31
Tablo 4.5. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	35
Tablo 4.6. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	38
Tablo 4.7. Boc-Tyr-Ala-Ala-CH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	41
Tablo 4.8. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	44
Tablo 4.9. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	47
Tablo 4.10. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	50
Tablo 4.11. DPP bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	54
Tablo 4.12. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH ₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	58
Tablo 4.13. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	64
Tablo 4.14. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	69
Tablo 4.15. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	74
Tablo 4.16. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	79
Tablo 4.17. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH ₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları	84
Tablo 4.18. Bileşiklerin TGA analiz sonuçları	86
Tablo 4.19. Tripeptit bileşiklerinin A2780 ve PC-3 hücre hatlarındaki % hücre canlılıkları ve LogIC ₅₀ (%50 inhibisyona neden olan konsantrasyon) değerleri (µM) (*p<0.05) referans ilaç: RD: Docetaksel, RP: Paklitaksel	88
Tablo 4.20. Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin MCF-7, A2780, PC-3 ve Caco-2 hücre kültürlerine uygulanmasından 24 saat sonra TL, TI, OTI, HD ve HI değerlerinde meydana gelen değışiklikler	89

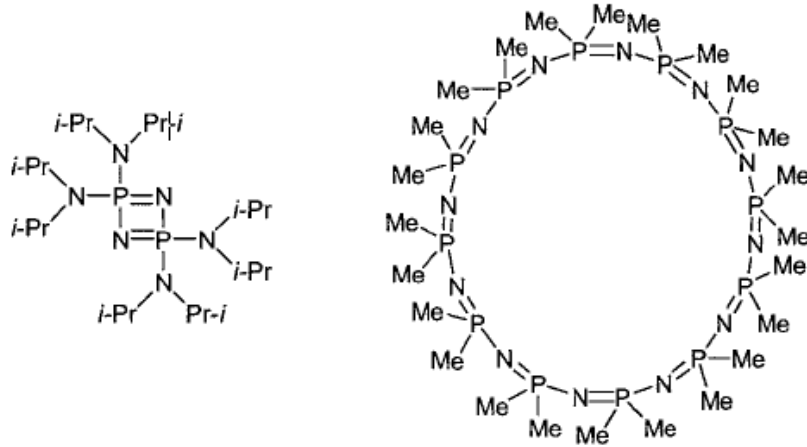
1. Giriş

Siklofosfazenler inorganik heterosiklik halkalardır [1, 2]. Bunlar, üzerinde çalışılan en eski inorganik halkalar arasındadır. Bunlar Liebig ve Wohler tarafından 1834 gibi erken bir tarihte hazırlanmıştır. Amerikalı kimyager Stokes da 1890'larda bu halkaları ayrıntılı olarak incelemiştir. Ancak, bu ilgi çekici bileşiklerle ilgili daha ileri çalışmalar için güçlü spektroskopik yöntemlerin ortaya çıkmasını beklemek gerekmiştir. Çok çekirdekli NMR'ın ortaya çıkışı ve tek kristal X-ışını yöntemlerinin rutin kullanımı, bu inorganik halkaların sistematik bir şekilde incelenmesine olanak sağlamıştır ve sonuç olarak siklofosfazenler için artık zengin bir bilgi mevcuttur. Şu anda siklofosfazenlere yönelik araştırma ilgisi literatürdeki çalışmalardan da görüleceği üzere farklı uygulama alanlarında özellikler sergilemelerinden kaynaklanmaktadır[3-9].

Siklofosfazenler $[N=PR_2]$ tekrar birimini içeren değerlikçe doymamış bir iskeletten oluşur. Halka, alternatif fosfor ve azot atomlarından oluşur. Bu halkalarda fosfor merkezi pentavalent ve tetra koordinat iken, nitrojen üç değerlikli ve di koordinattır. Böylece, her fosfor iki komşu halka azot atomuna ve iki ekzosiklik süstitüente bağlanır. Buna karşılık, her bir azot atomu iki bitişik fosfor atomuna bağlıdır. Azot atomunun herhangi bir ekzosiklik süstitüenti yoktur (Şekil 1.1). Dört üyeli halka yaygın değildir ve bu halkanın stabilizasyonu ancak $[NP(Nz'Pr)_2]_2$ [10] için olduğu gibi fosfor üzerinde sterik olarak engellenmiş süstitüentlerin bulunması ile mümkündür. En yaygın bileşikler altı ve sekiz üyeli halkaları içerenlerdir. $[NPF_2]_n$ serisi için, hepsi yapısal olarak karakterize edilmemiş olsa da, $n = 3$ ila 40 arasındaki bileşikler bilinmektedir [11]. Yapısal olarak karakterize edilmiş en büyük halka sistemi 24 üyeli permetil halkasıdır $[NPMe_2]_{12}$. Siklofosfazenlerin temsili örnekleri Şekil 1.2'de gösterilmiştir. Bu şekillerde gösterilen örneklerden, ekzosiklik P-N, P-O, P-S, P-C ve hatta P-M bağları içeren siklofosfazenlerin mümkün olduğu anlaşılmaktadır.



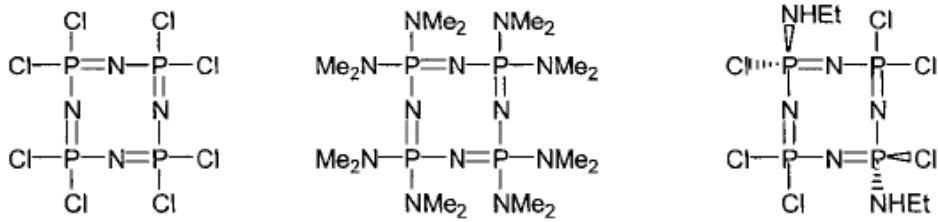
Şekil 1.1. Siklofosfazen yapıları ile ilgili bazı örnek gösterimler



Şekil 1.2. Dört ve Yirmi dört üyeli siklofosfazen yapıları ile ilgili gösterimler

Ayrıca siklofosfazenlerin homojen (tüm fosfor merkezlerinde aynı süstitüentler) veya heterojen süstitüe (farklı süstitüentler) olabileceği fark edilecektir. Bu bileşikler için şu anda kabul edilen isimlendirme sistemi Shaw [12] tarafından önerilen sistemdir. Böylece, altı üyeli halkalar siklotrifosfazatrienler ve sekiz üyeli halkalar siklotetrafosfazatetraenler (Şekil 1.3) olarak adlandırılır. Ene, siklik iskeletin değerlik açısından doymamış doğasını vurgulamak içindir.

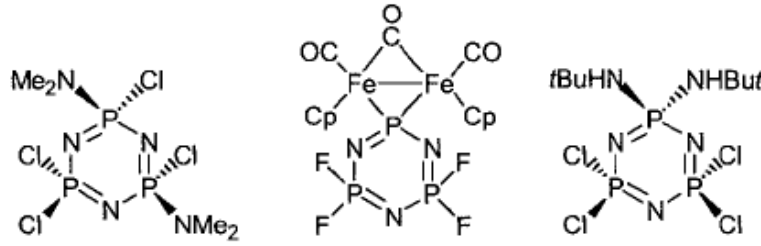
Numaralandırma şeması azottan başlar (ilk azot '1' olarak numaralandırılır, ardından fosfor '2' olarak numaralandırılır ve bu şekilde devam eder). Böylece, $N_3P_3Cl_6$ 2,2,4,6,6-heksaklorosiklotrifosfazatrien olarak adlandırılır. Bununla birlikte, tam isimlerle uğraşmak genellikle zorlaşır ve bu bileşiklerle ilgili literatürde, bunları ele almak için daha basit yolların geliştirildiği görülmektedir.



Şekil 1.3. Dört üyeli siklofosfazen yapıları ile ilgili gösterimler

Bu nedenle, süstitüentlerin regio ve stereodispozisyonunu belirtmek için kimyasal formülleri uygun ön eklerle yazmak çok daha basittir. Örneğin, 2,4-nongem-cis-- $N_3P_3Cl_4(NMe_2)_2$ iki dimetilamino süstitüentinin bitişik fosfor atomları üzerinde bulunduğu ve birbirlerine göre cis oldukları anlamını taşır (Şekil 1.4). Bu önekten 'nongem' çıkarılsa bile yapısal bilgi yeterince aktarılmış olur. Benzer şekilde, 2,2-gem- $N_3P_3Cl_4(NHtBu)_2$ bileşiği de $2,2-N_3P_3Cl_4(NHtBu)_2$ olarak

yazılabilir veya hatta basitçe gem-N₃P₃Cl₄(NH*t*Bu)₂ olarak adlandırılabilir (Şekil 1.4). N₃P₃Cl₆ ve N₄P₄Cl₈ bileşiklerinin önemsiz isimleri sırasıyla trimerik klorür ve tetramerik klorürdür.



Şekil 1.4. Karışık süstitüent içeren siklofosfazener

Çoğu siklofosfazen nispeten kararlıdır ve iyi raf ömürlerine sahiptir. Bazıları neme karşı duyarlıdır. Klorosiklofosfazener, N₃P₃Cl₆ ve N₄P₄Cl₈ bile açık havada (iyi havalandırılmış bir davlumbazda) kolayca işlenebilir. Çoğu persüstitüe siklofosfazen çok düşük dipol momentlerine sahiptir ve bu durum polar olmayan organik çözücülerde bile mükemmel çözünürlük özelliklerine yansımaktadır. Tablo 1.1 siklofosfazen ailesinin önde gelen bazı üyeleri için erime/kaynama noktası verilerini özetlemektedir.

Tablo 1.1. Bazı fosfazen bileşiklerinin erime ve kaynama noktaları

Bileşik	Erime (Kaynama) Noktası °C
N ₃ P ₃ Cl ₆	114
N ₃ P ₃ F ₆	27.8 (50.9)
N ₃ P ₃ Br ₆	192
N ₄ P ₄ Cl ₈	124
N ₄ P ₄ F ₈	30.5 (89.7)
N ₅ P ₅ Cl ₁₀	41.3
N ₅ P ₅ F ₁₀	-50 (120)
N ₃ P ₃ (NMe ₂) ₆	104
N ₄ P ₄ (NMe ₂) ₈	238
N ₃ P ₃ (OCH ₂ CF ₃) ₆	38
N ₄ P ₄ (OCH ₂ CF ₃) ₈	65
N ₃ P ₃ (OPh) ₆	111
N ₃ P ₃ (OPh) ₈	86

Siklofosfazenerin halka büyüklükleri önemli ölçüde değişmekle birlikte, bu çalışmada altı üyeli halkaları ve farklı organik ürünler ile reaksiyonları incelenmiştir. Bunun nedeni çoğunlukla bu halkaların kimyasının daha büyük boyutlu halka sistemlerine göre çok daha iyi gelişmiş ve anlaşılır olmasıdır [9].

2. SİKLOFOSFAZENLERİN NÜKLEOFİLİK REAKSİYONLARI VE MEKANİZMASI

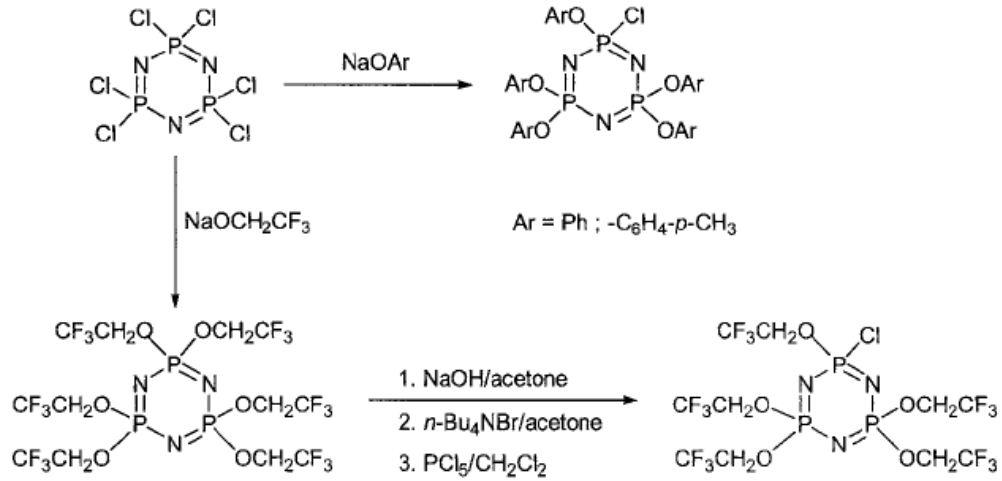
Klorosiklofosfazenler, siklofosfazen ailesinin en önemli üyeleridir. Bunlar, çok çeşitli diğer siklofosfazenlerin hazırlanması için öncü ve başlangıç malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Bu fosfazenlerin yapılarında bulunan -Cl atomlarının reaktifliğinden dolayı, kolaylıkla süstitüsyon reaksiyonları verebilmektedir. İlgili halojenosiklofosfazenlerden flor, klor veya bromun başka bir süstitüent (bir nükleofil) ile yer değiştirmesi, bu halka sistemlerinin kimyasının önemli bir yönüdür [10, 13]. İlk olarak, bu yol, ekzosiklik P-N, P-O, P-S, P-C, P-H ve P-M bağlantılarını içeren süstitüentlere sahip siklofosfazenlerin hazırlanmasının bir yolunu sağlar. Bu nedenle, bir bakıma halojen değiştirme reaksiyonlarının en yaygın reaksiyonlar olduğu söylenebilir. İkinci olarak, daha sonra açıklanacağı üzere, bu reaksiyonların küçük moleküllu siklofosfazen düzeyinde anlaşılması, bu kimyayı polifosfazenlere dönüştürme kabiliyetini büyük ölçüde artırır. Üçüncüsü, halojenosiklofosfazenlerin yer değiştirme reaksiyonlarında çok sayıda ilgi çekici ayrıntı vardır. Örneğin, oluşan ürünlerdeki regio- ve stereoseçicilikler nelerdir? Bağımlılıkları nedir?

Üç halka $N_3P_3F_6$, $N_3P_3Cl_6$ ve $N_3P_3Br_6$ arasında reaktivite $P-Br > P-Cl > P-F$ sırasını takip eder. Bu, P-X bağının bölünmesinin kolaylığını yansıtmaktadır. Tartışmamızın çoğu, bu bileşikler için mevcut verilerin zenginliği nedeniyle klorosiklofosfazenlerle sınırlı kalacaktır. Klorosiklofosfazenlerde sekiz üyeli $N_4P_4Cl_8$ halkası altı üyeli $N_3P_3Cl_6$ halkasından çok daha reaktiftir. Klorosiklofosfazenler aminler, alkoller veya fenoller gibi nükleofillere karşı oldukça reaktiftir. Klorların tamamen değiştirilmesi bir dizi reaktif ile kolayca mümkündür. Örneğin, $N_3P_3Cl_6$ veya $N_4P_4Cl_8$ 'in dimetilamin ile reaksiyonu $N_3P_3(NMe_2)_6$ veya $N_4P_4(NMe_2)_8$ oluşumuna yol açabilir. Bu reaksiyonlar, reaktivitede bireysel farklılıklar olmasına rağmen birincil, ikincil ve hatta aromatik aminlerle de oldukça iyi çalışır. Reaksiyonda oluşan hidrojen klorürü tutmak için nükleofil dimetilaminin kullanıldığı fark edilebilir. Bunun yerine, trietilamin gibi tersiyer bir baz bu amaç için daha çok tercih edilerek kullanılabilir.

Ekzosiklik P-O bağları içeren alkoksi veya ariloksisiklofosfazenleri hazırlamanın en yaygın yolu, klorosiklofosfazenleri alkol veya fenolün sodyum tuzu ile reaksiyona sokmaktır [10].

Bu reaksiyon P-S bağları içeren siklofosfazenlerin hazırlanması için de kullanılabilir. Ancak, bu kategoriye ait çok fazla siklofosfazen örneği bulunmamaktadır.

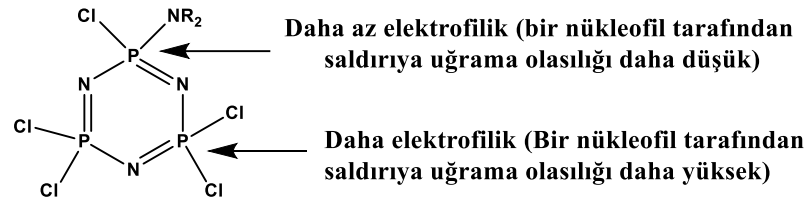
Tam süstitüent alkoksi ve ariloksisiklofosfazenler yaygın ürünler olmasına rağmen, bazı durumlarda yararlı penta süstitüent türevleri izole etmek mümkündür. Böylece, $N_3P_3Cl_6$ ve NaOR (R=Ph, $-C_6H_4-p-CH_3$) arasındaki reaksiyonda bir artık P-Cl bağı içeren pentakis ariloksisiklofosfazenler izole edilebilir. $N_3P_3(OCH_2CF_3)_6$ gibi bazı durumlarda, pentakis türevi $N_3P_3(OCH_2CF_3)_5(Cl)$ kontrollü bir hidroliz ve ardından PCl_5 ile bir reaksiyon ile hazırlanabilir (Şekil 2.1).



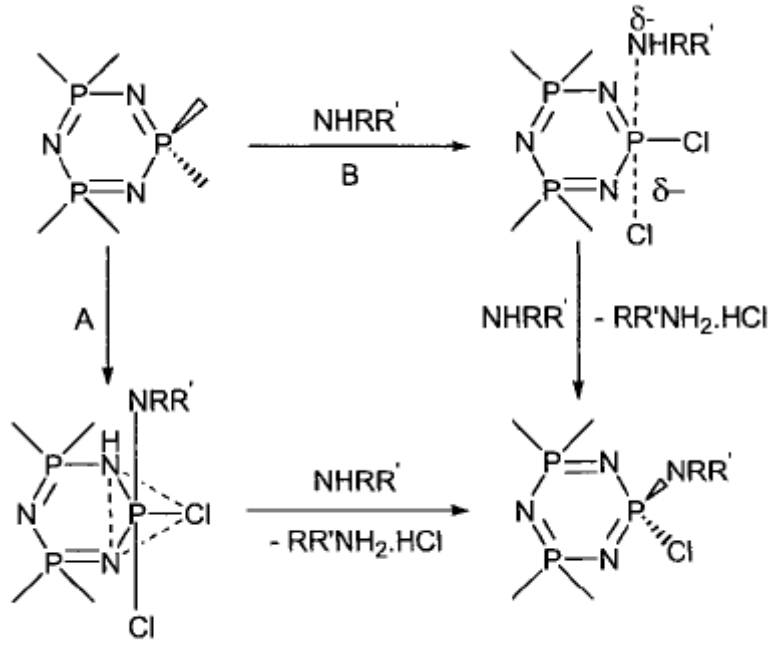
Şekil 2.1. Pentakis alkoksi ve ariloksisiklofosfazenlerin hazırlanması

Klorosiklofosfazenlerin nükleofilik süstitüsyon reaksiyonlarında çeşitli mekanistik yollar tanımlanmıştır [13]. Kinetik deneylerin çoğu aminlerle klorosiklofosfazenleri içeren reaksiyonlarda gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler, bu reaksiyonlarda çalışabilecek çeşitli mekanistik yollara işaret etmektedir. Aşağıda kinetik deneylerin çıkarımlarının bir özeti yer almaktadır.

Geminal olmayan ürün tercihi doğaldır. Bir aminin bir PCl₂ merkezi veya bir -P(Cl)NRR' merkezi ile reaksiyonunu düşünün. İlkindeki fosfor atomu daha elektrofiliktir ve dolayısıyla bir nükleofil daha az elektrofilik olan P(Cl)(NR₂) bölgesine kıyasla bu merkeze saldırılmayı tercih edecektir (Şekil 2.2). Bu da nongeminal ürünlerin her zaman tercih edilmesi gerektiği anlamına gelmektedir.



Şekil 2.2. N₃P₃Cl₅(NR₂) ile reaksiyonunda bir nükleofilin olası saldırı bölgeleri



A: S_N2 (nonpolar); B: S_N2 (concerted, polar)

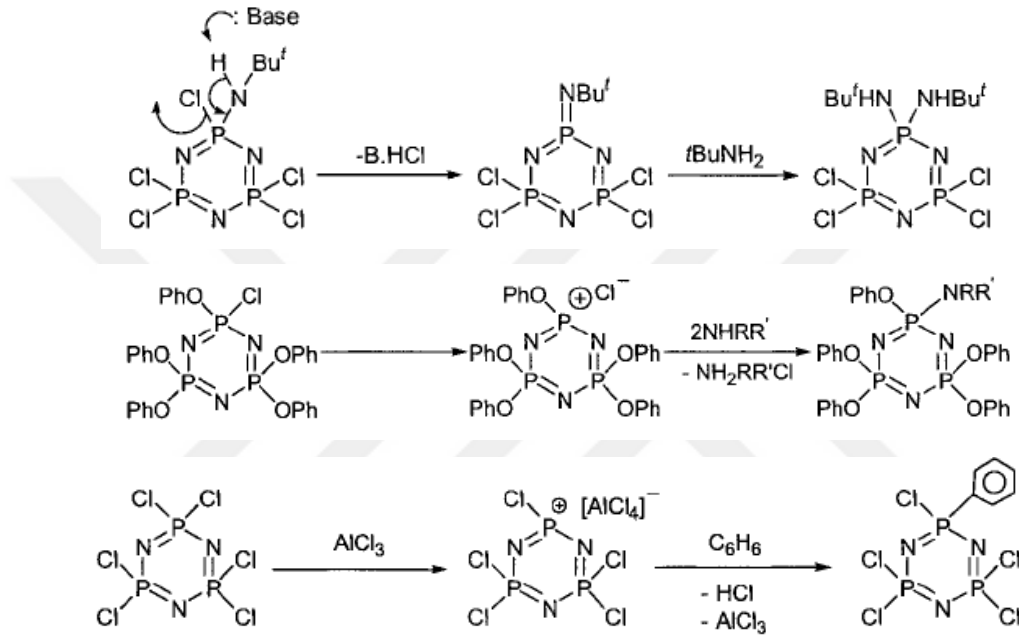
Şekil 2.3. Siklotrifosfazenin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarında S_N2 reaksiyon yolları

Kinetik deneyler farklı türde reaksiyon mekanizmaları oluşturmuş olsa da, klorosiklofosfazenlerdeki nükleofilik reaksiyonlar için en önemli yollardan biri bimoleküler birleşme yolu (S_N2) gibi görünmektedir. Bu mekanizma için iki tip geçiş durumu tanımlanmıştır (Şekil 2.3).

- Nötr beş koordinatlı fosfor ara ürününün oluşumu ve ardından ayrılan grubun dışarı atılması
- Karbon sisteminde bulunana benzer bir polar geçiş durumunu içeren uyumlu bir S_N2 mekanizması (yol B, Şekil 2.3). Her iki durumda da reaksiyon yolu, dört koordinatlı fosforun önce beş koordinatlı hale dönüştüğünü, ardından dört koordinatlı hale geri döndüğünü öngörür (Şekil 2.3).

S_N2 yolunun baskınlığı $N_4P_4Cl_8$ 'in daha hızlı reaktivitesini açıklamaktadır. İkincisi düzlemsel değildir ve bu moleküldeki fosfor merkezinin penta-koordinasyon elde etmesi daha kolaydır. Öte yandan, düzlemsel $N_3P_3Cl_6$ için geometrinin dört koordinattan beş koordinat durumuna yeniden ayarlanması daha zordur. Bu nedenlerden dolayı nükleofilik süstitüsyon $N_4P_4Cl_8$ ile $N_3P_3Cl_6$ 'ya göre çok daha hızlıdır. Mükemmel düzlemsel $N_3P_3F_6$ için beş koordinatlı geçiş halinin elde edilmesi daha da zordur. Sonuç olarak, $N_3P_3F_6$ 'nın reaktivitesi çok daha düşüktür. $N_3P_3F_6$ 'nın daha yavaş reaktivitesinden sorumlu olan bir diğer faktör de P-F bağının daha yüksek bağ kuvvetidir [10, 13].

Dissosiyatif veya S_N1 yollarının da belirli durumlarda ortaya çıktığı bilinmektedir. Çok reaktif olmayan bazı aminlerle dissosiyatif yollar (S_N1), birleşmeli S_N2 reaksiyonları ile birlikte rekabetçi de olabilir. Böyle bir mekanizmada, $N_3P_3Cl_5(NHR)$ gibi bir primer amino türevinden proton soyutlaması gerçekleşir ve üç koordinatlı bir P(V) ara ürününe yol açar. Daha sonra, geminal ürünler oluşur. Böylece, örneğin, $N_3P_3Cl_6$ 'nın dört eşdeğer $tBuNH_2$ ile reaksiyonu gem- $N_3P_3Cl_4(HNtBu)_2$ oluşumuna yol açar [9, 10, 13]. Siklotrifosfazenin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarında S_N1 reaksiyon gösterimleri Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Siklotrifosfazenin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonlarında S_N1 reaksiyon gösterimleri

Bu tez çalışmasında, termal olarak kararlı olan inorganik heterosiklik bileşiklerin önemli bir sınıfını oluşturan halkalı fosfazenlerin tripeptit sübstituentleri hazırlanarak in vitro sitotoksisite ve genotoksisite özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

Başlangıç bileşiği olarak amin grubu korunmalı karboksil grubu serbest olan tirozin aminoasitinin (**Boc-Tyr-OH**) sırasıyla Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**) ve Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**) metil ester hidroklorür formları ile CDMT yöntemi ile asetonitril ortamında etkileştirilerek metil ester grubu bulunan 2 adet dipeptit bileşiği (**Boc-Tyr-Gly-OCH₃** ve **Boc-Tyr-Ala-OCH₃**) elde edildi [14, 15].

Ardından bu dipeptitleri kullanılarak **2 farklı aşamada** reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. **Birinci aşamada**, metil esterli dipeptit bileşiklerinin ester grupları asetonitril içerisinde %8'lik NaOH çözeltisinin ilave edilmesi ile karboksil grubuna dönüştürülerek karboksil grupları serbest **Boc-Tyr-Gly-OH** ve **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptitleri sentezlenmiştir [16]. **Birinci aşamada**,

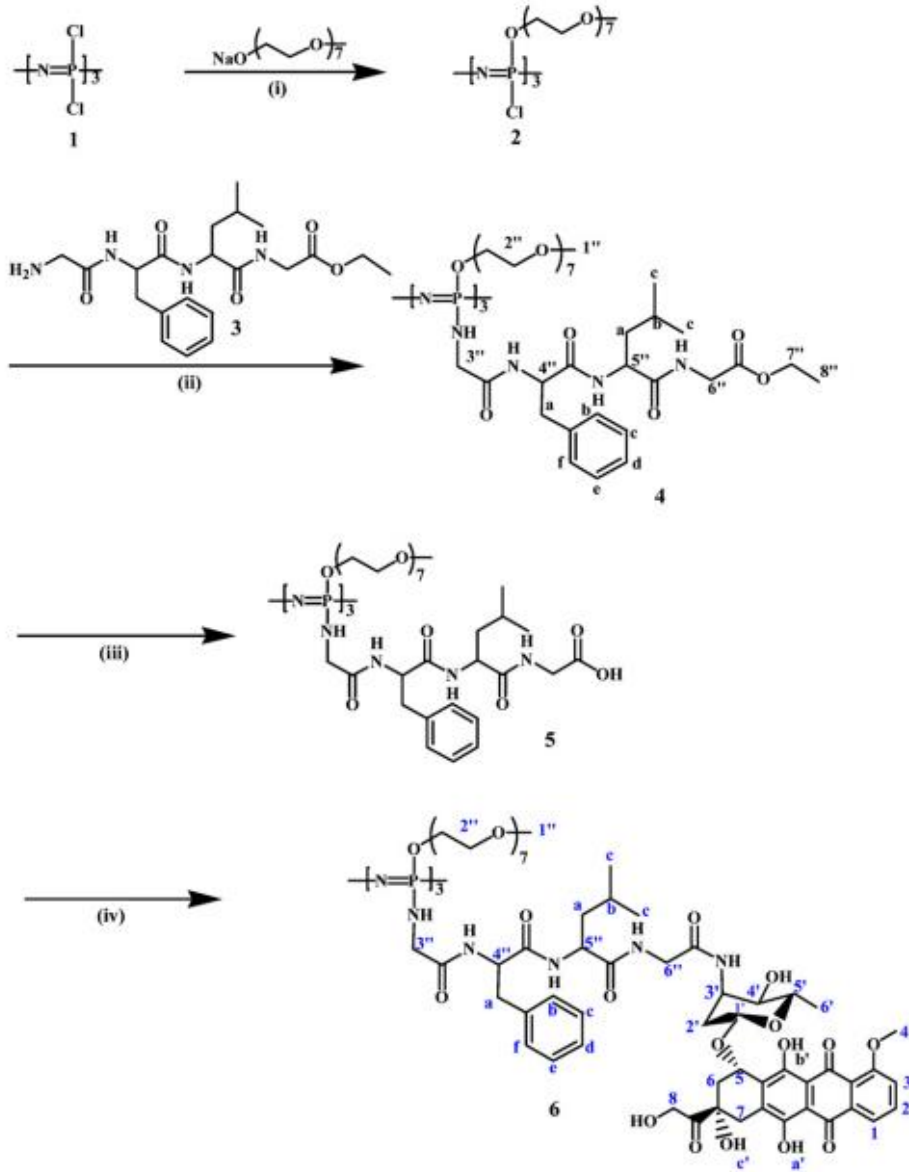
fosfazen başlangıç bileşikleri olarak kullanılan Di ve tetra sübsititü **BPP** ve **DPP** ile aseton içerisinde K_2CO_3 varlığında etkileştirilerek di ve tetra sübsititü 8 adet dipeptit-siklotrifosfazen bileşiği elde edilmiştir. **İkinci aşamada**, metil esterli dipeptit bileşiklerinin ester grupları asetonitril içerisinde %8'lik NaOH çözeltisinin ilave edilmesi ile karboksil grubuna dönüştürülerek karboksil grupları serbest **Boc-Tyr-Gly-OH**, **Boc-Tyr-Val-OH**, **Boc-Tyr-Ala-OH** ve **Boc-Tyr-Phe-OH** dipeptitleri sentezlenmiştir. **Boc-Tyr-Gly-OH** dipeptidi ile sırasıyla Glisin (**$NH_2-Gly-OCH_3.HCl$**) ve Alanin (**$NH_2-Ala-OCH_3.HCl$**) metil ester hidroklorür aminoasitleri ile asetonitril içerisinde CDMT yöntemi kullanılarak etkileştirilmesinden 2 adet tripeptit bileşiği elde edildi. Benzer yöntem ile **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptidi sırasıyla Glisin (**$NH_2-Gly-OCH_3.HCl$**), Alanin (**$NH_2-Ala-OCH_3.HCl$**), Valin (**$NH_2-Val-OCH_3.HCl$**) ve Fenilalanin (**$NH_2-Phe-OCH_3.HCl$**) metil ester hidroklorür aminoasitleri ile etkileştirilmesi sonucu 4 adet tripeptit bileşiği olmak üzere toplamda 6 adet tripeptit bileşiği elde edilmiştir [16]. Elde edilen tüm bileşikler ince tabaka kromatografisi ile takip edilerek sonlandırıldı ve aynı hareketli faz göz önünde bulundurularak Flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen dipeptit ve tripeptitlerin yapısal karakterizasyonları elementel analiz, FT-IR, 1H , ^{13}C -APT NMR spektrumları ile sübsititü fosfazen bileşiklerinin ise ek olarak ^{31}P ve HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS spektroskopisi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bileşiklerin termal özellikleri TGA yöntemleri ile belirlendi.

Saf olarak elde edilen bileşiklerin insan kanser hücre hatları over (A2780) ve prostat (PC-3) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite özellikleri MTT assay yöntemiyle belirlenerek % hücre canlılıkları belirlendi ve bileşiklerin $LogIC_{50}$ değerleri hesaplandı. Tüm hücrelerde özellikle yüksek dozlarda hücre canlılıklarında önemli azalmaların olduğu gözlenmiştir. Dördüncü adımda bileşiklerin etki gösterdiği yüksek dozda (100 μM), DNA hasarı incelemesi Comet assay yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

3. SİKLOTRİFOSFAZEN BİLEŞİKLERİ İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

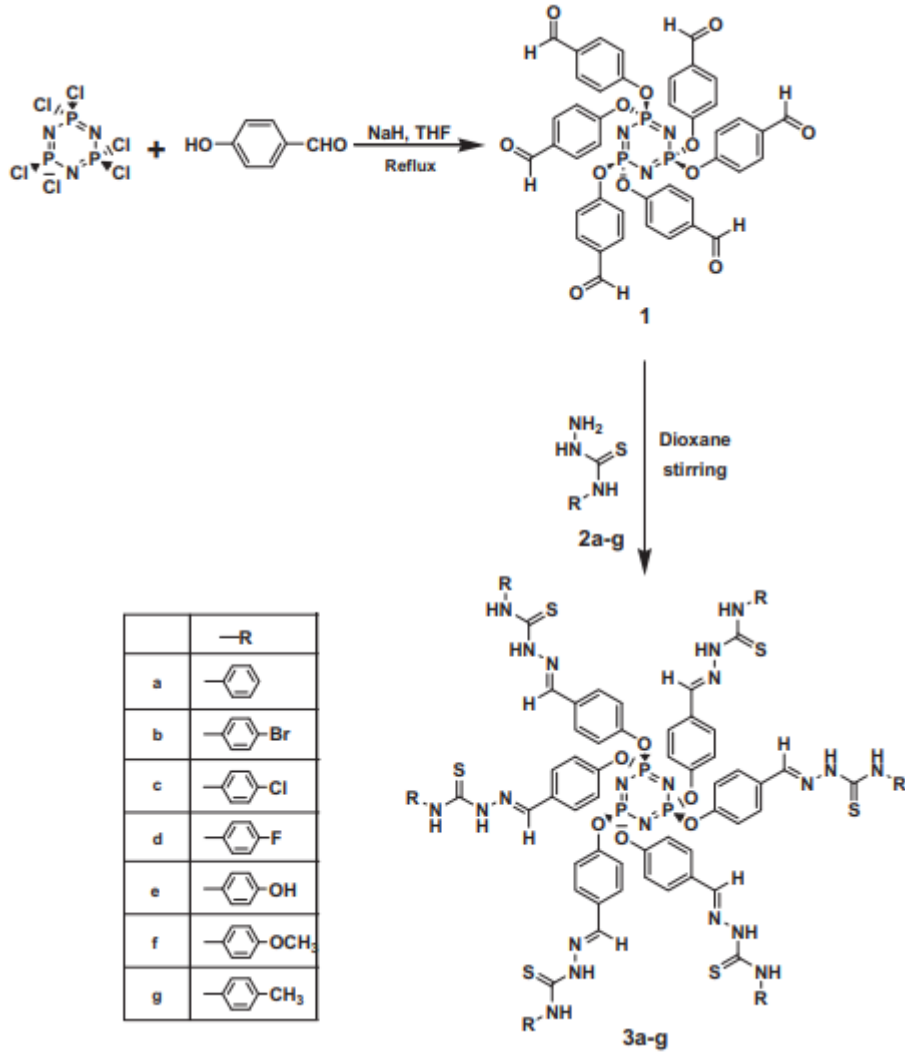
Son yıllarda fosfazen ve türevleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar da hem yeni bileşiklerin sentezlenmesi hem de bu yeni bileşiklerin uygulanabileceği alanların araştırılmasına dikkat çekilerek gerçekleştirilmiştir. Ayrıca uygulama alanına göre de yeni fosfazen yapıları tasarlanıp sentezlenmiştir. Böylelikle siklotrifosfazen halkasına bağlanmış olan gruplar ile birlikte sinerjik bir etki sonucu elde edilen ürünler dielektrik [17-19], LED/OLED teknolojisi [5, 20], kimyasal sensörler [7, 21], yanmaya dayanıklı ve alev geciktirici malzeme [22, 23] gibi birçok uygulama alanında kullanılacak özellikler sergilemişlerdir. Bu çalışmalardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

Siklotrifosfazene 350 (MPEG350) molekül ağırlığına sahip eşdeğer hidrofilik metoksi-poli(etilenglikol) ve tümöre özgü bir tetrapeptidin (GlyPhe-Leu-Gly) aşılandığı yeni bir biyolojik olarak parçalanabilir suda çözünür fosfazen trimer-doksorubisin konjugatı sentezlenmiştir (Şekil 3.1). Mevcut konjugat, serbest doksorubisinin sitotoksitesinden daha düşük ($IC_{50} = 0.10$ IM) ancak lösemi L1210 hücre hattına karşı oldukça yüksek bir in vitro sitotoksite ($IC_{50} = 1.1$ IM) sergilediği rapor edilmiştir. Bunun nedeni ise enzimatik olarak kontrol edilen salımdan kaynaklanabileceği belirtilmiştir [24].



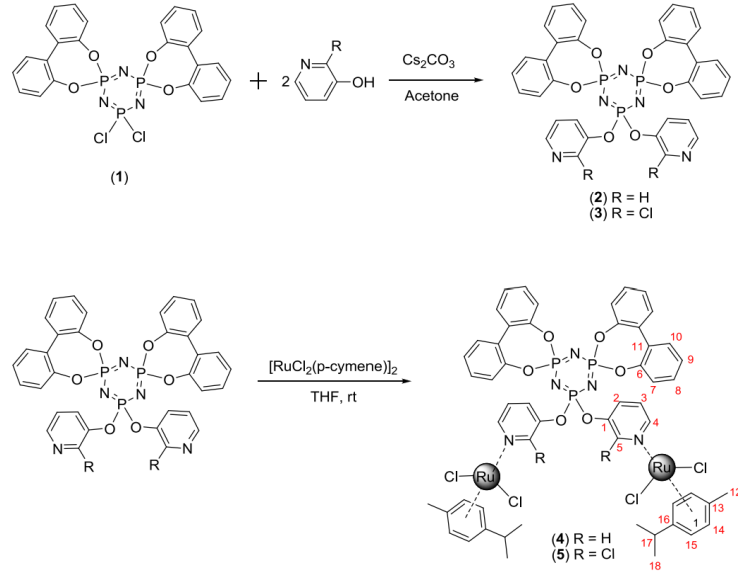
Şekil 3.1. Suda çözümlü fosfazen trimer-doksorubisin konjugatının genel sentez şeması

2014 Yılında yapılmış olan bir çalışmada heksaklorosiklotrifosfazen bileşiği ile tiyosemikarbazon bileşiklerinin sentezinden full süstitüye fosfazen bileşikleri sentezlenmiş (Şekil 3.2) ve bileşiklerin in vitro antiproliferatif aktiviteleri insan meme ve over kanser hücre hatlarına karşı incelendiği bildirilmiştir. Yeni sentezlenen bileşikler test edilen hücre hatlarına karşı orta ila iyi aktivite sergilemiştir. Özellikle halo süstitüye benzoik tiyosemikarbazonların antikanser aktivitesi daha etkili olduğu bulunmuştur [25].



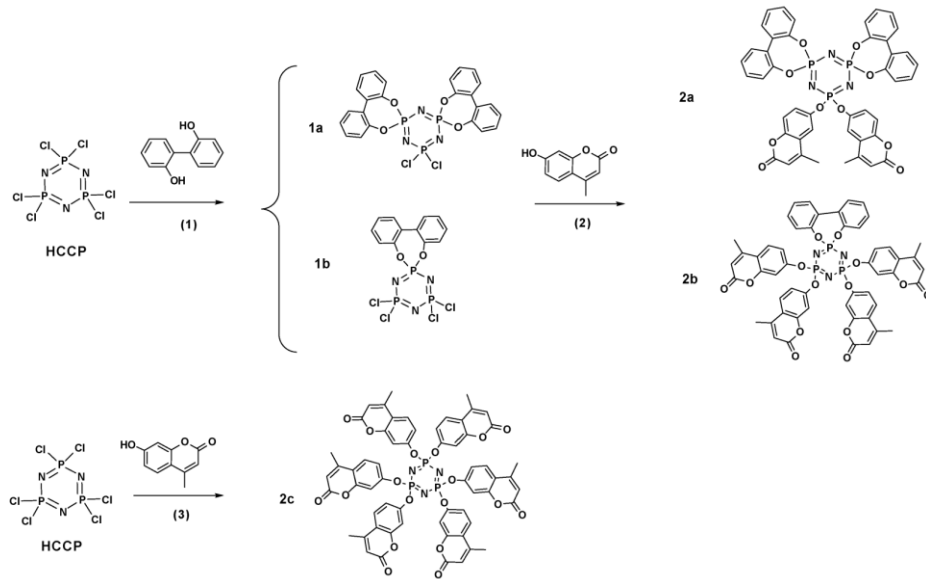
Şekil 3.2. Tiyosemikarbazon süstitüe fosfazen bileşiklerinin genel sentez şeması

2015 Yılında yapmış bir çalışmada 3-oksipiridin grupları taşıyan iki yeni siklotrifosfazen ligandı (2 ve 3) ve ardından bu liganlar ile Ru(II) kompleksleri (4 ve 5) elde edilmiştir (Şekil 3.3). Bu ligand ve Ru komplekslerinin sitotoksik aktiviteleri PC-3 (insan prostat kanseri), DLD-1 (insan kolorektal kanseri), HeLa (insan rahim ağzı kanseri) ve PNT1A (normal insan prostat) hücre hatlarına karşı incelenmiş. Ayrıca yapıların antimikrobiyal aktiviteleri Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ve maya kültürlerinden oluşan bir panele karşı araştırılmıştır. Bileşiklerin orta ila yüksek düzeyde sitotoksik ve antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu bulunmuş ve ayrıca Ru(II) kompleksleşmesi, ana bileşiklerle karşılaştırıldığında hem sitotoksik hem de antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığı tespit edilmiştir [26].



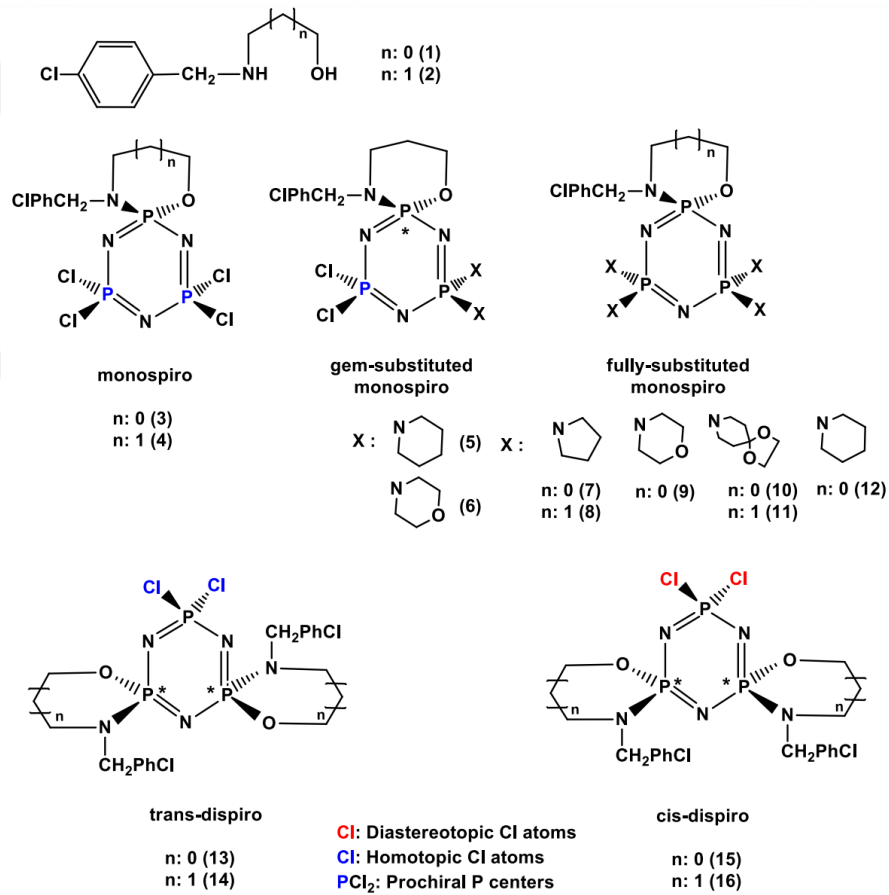
Şekil 3.3. 3-oksipiridin grupları taşıyan iki yeni siklotrifosfazen ligandı (2 ve 3) ve Ru(II) komplekslerinin (4 ve 5) genel sentez gösterimi

2019 Yılında yapılan bir çalışmada 4-metil-7-hidroksikumarin bileşiği ile heksaklorosiklotrifosfazen ve mono ve dispiro bifenil grupları taşıyan fosfazen bileşikleriyle reaksiyonundan hekza, tetra ve di sübstitüe kumarin-fosfazen bileşikleriyle sentezlenmiş (Şekil 3.4) ve bu bileşiklerin insan meme kanser hücre hatlarına (MCF-7, 4T1) karşı *in vitro* antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kumarin-fosfazen bileşiklerinin antitumor aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir [27].



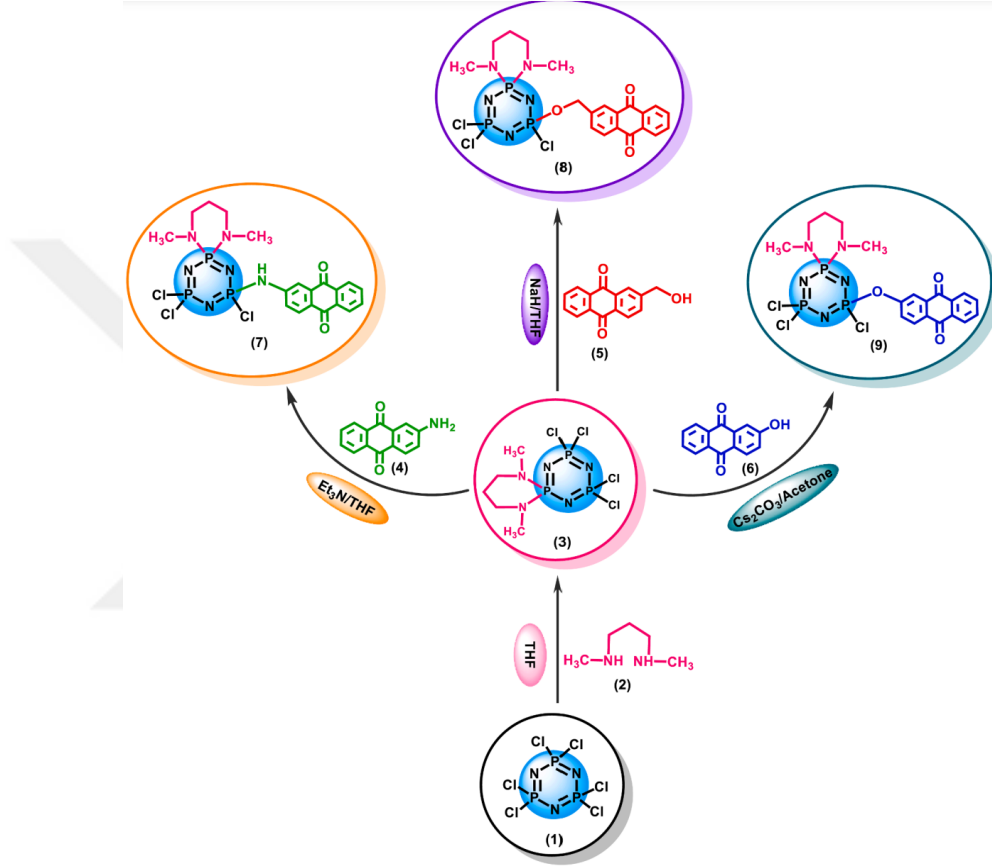
Şekil 3.4. İlgili literatürde sentezlenmiş olan kumarin-fosfazen bileşiklerinin genel sentez gösterimi

2021 Yılında yapılmış olan bir çalışmada morfolin, piperidin, pyrrolidin grupları taşıyan full sübstitüe mono ve dispirofosfazen türevleri sentezlenmiş (Şekil 3.5) ve bu bileşiklerin yapısal, stereojenik ve antibakteriyel, sitotoksik, plasmid DNA ile etkileşim gibi biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Biyolojik aktivite sonuçları, fosfazenlerin çoğunun ameliyat sonrası kanda, akciğerde (pnömoni) veya vücudun diğer bazı bölgelerinde enfeksiyon yapabilen *P. aeruginosa*'ya karşı etkili olduğu belirtilmiştir. Fosfazenler bakteri ve maya suşlarının çoğunun büyümesini inhibe ettiği ve ilaçlara karşı çoklu dirençli olduğu bilinen *E. coli* bakterisi, test edilen tüm fosfazenlere karşı duyarlılık gösterdiği belirtilmiştir. Bağlanan sübstitüentlere bağlı olarak monospiro-siklotrifosfazenler ve trans ve cis dispirosiklotrifosfazenlerin bazılarının diğer bileşiklere göre daha yüksek bir DNA bölünme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir belirtilmiştir [28].



Şekil 3.5. 3-oksipiridin grupları taşıyan iki yeni siklotrifosfazen ligandı (2 ve 3) ve Ru(II) komplekslerinin (4 ve 5) genel sentez gösterimi

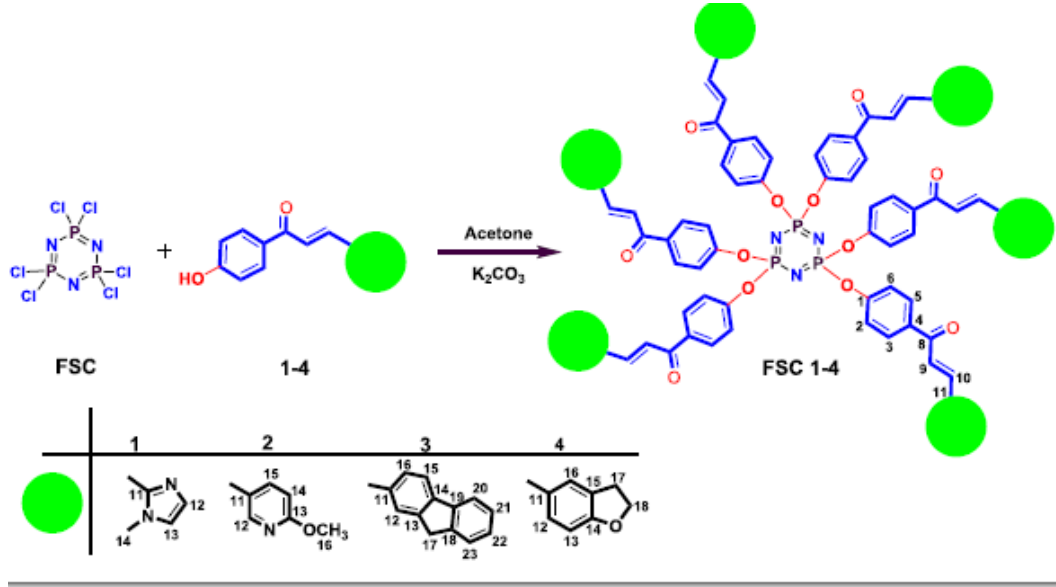
2022 Yılında yapılmış olan bu çalışmada yeni antrakinon grupları taşıyan siklotrifosfazener (7-9) sentezlenmiştir (Şekil 3.6). Daha sonra fosfazen bileşiklerinin küçük hücreli olmayan Akciğer Karsinomu (NSCLC) hücre hatları ve tümörsüz mezotelyal hücreler (MeT-5A) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuçlar, özellikle bileşik 8'in, kanser hücrelerinin yaşayabilirliğini azaltmada ve apoptozu tetiklemede en etkili bileşik olduğunu göstermiş ve ayrıca bileşik 8, normal muadilinden ziyade kanser hücrelerine karşı seçicilik taşıdığı bulunmuştur [29].



Şekil 3.6. Antrakinon grupları taşıyan siklotrifosfazen (7-9) bileşiklerinin gösterimi

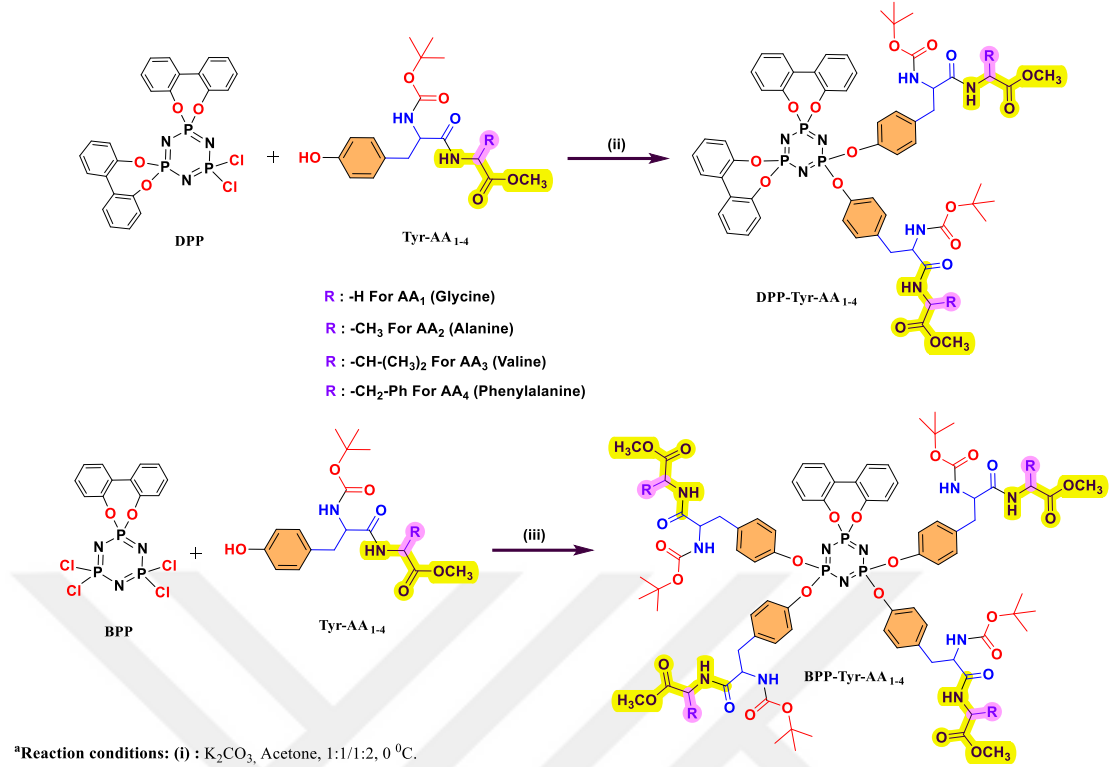
2022 Yılında yapılmış olan bir çalışmada ise hetero halkalı kalkon bileşikleri ile hezasklorisklotrifosfazen bileşiğinin reaksiyonundan tamamen süstitüe fosfazen bileşikleri sentezlenmiştir (Şekil 3.7). İnsan yumurtalık (A2780) ve insan prostat (PC-3 ve LNCaP) hücre hatlarına karşı 1, 5, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlarında bileşiklerin hücre canlılığındaki değişiklikler MTT test yöntemi ile araştırılmıştır. Bileşiklerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin DNA hasarı yoluyla olup olmadığını belirlemek için comet deneyi gerçekleştirilmiştir. Comet assay deneylerinde, bileşiklerin en yüksek konsantrasyonu (100 μ M) 24 saat boyunca hücrelere uygulanmış ve kuyruk uzunluğu (TL), kuyruk yoğunluğu (TI), zeytin kuyruğu momenti (OTM) parametreleri incelenmiştir. Sonuçlar, bileşik 1-4 ve FSC 1-4 bileşiklerinin tüm kanser hücre

hatlarına karşı hücre canlılığını azalttığını tespit edildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda, bu bileşiklerin farklı konsantrasyonları her üç hücre tipinde de DNA hasarına neden olduğu bildirilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin olası etkileşimleri ve kimyasal mekanizmaları moleküler yerleştirme ile hesaplamalı yöntemlerle açıklanmıştır. Çalışma sonuçları, bu bileşiklerin kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkileri olduğunu göstermiş ve bu etkilerin genotoksisite yoluyla meydana geldiği öne sürülmüştür [30].



Şekil 3.7. Hekza süstitüe kalkon grupları taşıyan siklotrifosfazen bileşikleri

2023 Yılında yapılmış olan bir çalışmada dipeptit yapıları içeren siklotrifosfazen türevleri sentezlenmiş (Şekil 3.8) ve bu bileşiklerin in vitro sitotoksik aktiviteleri incelenmiştir. Sitotoksik bileşiklerin DNA hasarı yoluyla hücre ölümüne neden olup olmadığını anlamak için genotoksisite çalışmaları yapılmıştır. Bileşiklerin, tüm insan kanser hücre hatlarına karşı hücre canlılığında önemli azalmalar gösterdiği bulunmuş ve özellikle A2780 hücre hatlarında dikkate değer etkiler sergilediği tespit edilmiştir. Bileşiklerin DNA hasarı çalışmaları sonuçları hücre ölümünün DNA hasar mekanizması yoluyla gerçekleştiğini göstermiştir. Sonuç olarak bileşiklerin umut verici sitotoksik etkiler gösterdiği ve farmasötik uygulamalar için güçlü aday moleküller olarak kabul edilebilir olduğunu ortaya koymuşlardır [15].



Şekil 3.8. Dipeptit yapıları taşıyan siklotrifosfazen bileşiklerinin gösterimi

Sonuç olarak literatür araştırmaları göz önüne alındığında siklofosfazen çekirdeğine farklı sübstitütlerin bağlandığı ve biyolojik alanlarda önemli sonuçları elde edildiği görülmektedir.

4. MATERİYAL VE METOT

4.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hekzaklorosiklotrifosfazen (trimer) Alfa Aesar firmasından temin edildi ve başlangıç bileşikleri DPP ve BPP'nin sentezinden önce n-hekzan da kristallendirilerek kullanılmıştır. Trietilamin (Et₃N), N,N'-Disikloheksilkarbodiimid (DCC), sodyum karbonat (NaHCO₃), Kloroform, tetrahidrofuran, asetonitril, susuz magnezyum karbonat (MgSO₄), potasyum karbonat (K₂CO₃) ve Tetrahidrofuran (THF), Merck firmasından temin edildi. K₂CO₃ kullanılmadan önce etüvde bir gece bekletildi. Sodyum hidroksit (NaOH), n-hekzan, etil asetat (EtOAc), etil alkol TEKKİM firmasından, glisin, valin, alanin, fenil alanin ve lösin metil esterleri, Boc-L-tirozin ve 2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT), Chem-Impex INT'L INC firmasından, 4-Metilmorfolin (NMM) ROTH Chemicals firmasından temin edilmiştir. NMR çalışmaları için döteryumlu çözücü olarak kullanılan DMSO-d₆ ve CDCl₃ Merck, Euroisotop ve Acros firmalarından firmasından temin edilmiştir.

4.2. Spektroskopik Çalışmalar

Bileşiklerin yapısal ve termal karakterizasyonlarında, sitotoksisite ve genotoksisite deneylerinde aşağıdaki cihazlar kullanılmıştır. Kütle analizleri GTÜ, Kimya bölümünde ve Gazi üniversitesi Eczacılık Fakültesinden, hücre kültürü ve DNA hasarı çalışmaları İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD'da, NMR, FT-IR, elementel analiz, TGA analizleri Fırat Üniversitesi Kimya bölümü araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

FT-IR spektrometresi	: Termo-Scientific (ATR)
¹ H, ¹³ C-APT, ³¹ P-NMR	: Bruker DPX-400 High Performance Digital FT-NMR
Kütle analizleri	: Bruker microflex LT MALDI-TOF MS
TGA analizleri	: SHIMADZU marka DTA-60 termobalans
Biyolojik emniyet kabini	: Nuve MN-120
CO ₂ 'li İnkübatör	: Panasonic
Mikroplate okuyucu	: BioTEK spektrofotometre
Hücrelerin bakım ve kontrolleri	: İnverted Mikroskop SOIF-XDS
Sterilizasyon	: Nuve marka Otoklav

4.3. Sentez ve Karakterizasyon Çalışmaları

4.3.1. Dipeptit Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu (Boc-Tyr-Gly-OCH₃, Boc-Tyr-Gly-OH, Boc-Tyr-Ala-OCH₃, Boc-Tyr-Ala-OH)

Bu basamaktaki sentez prosedürleri ve bileşikleri literatürde belirtilen yöntemlere göre sentezlenmiştir [14, 31-34]. I. Sentez prosedürü dipeptit metil ester bileşiklerinin sentezi ve karakterizasyonunun II. sentez prosedürü için dipeptit bileşiklerinin metil esterlerinin kırılarak – karboksil fonksiyonel grubuna dönüştürülmesi basamaklarını içermektedir.

I. Sentez Prosedürü

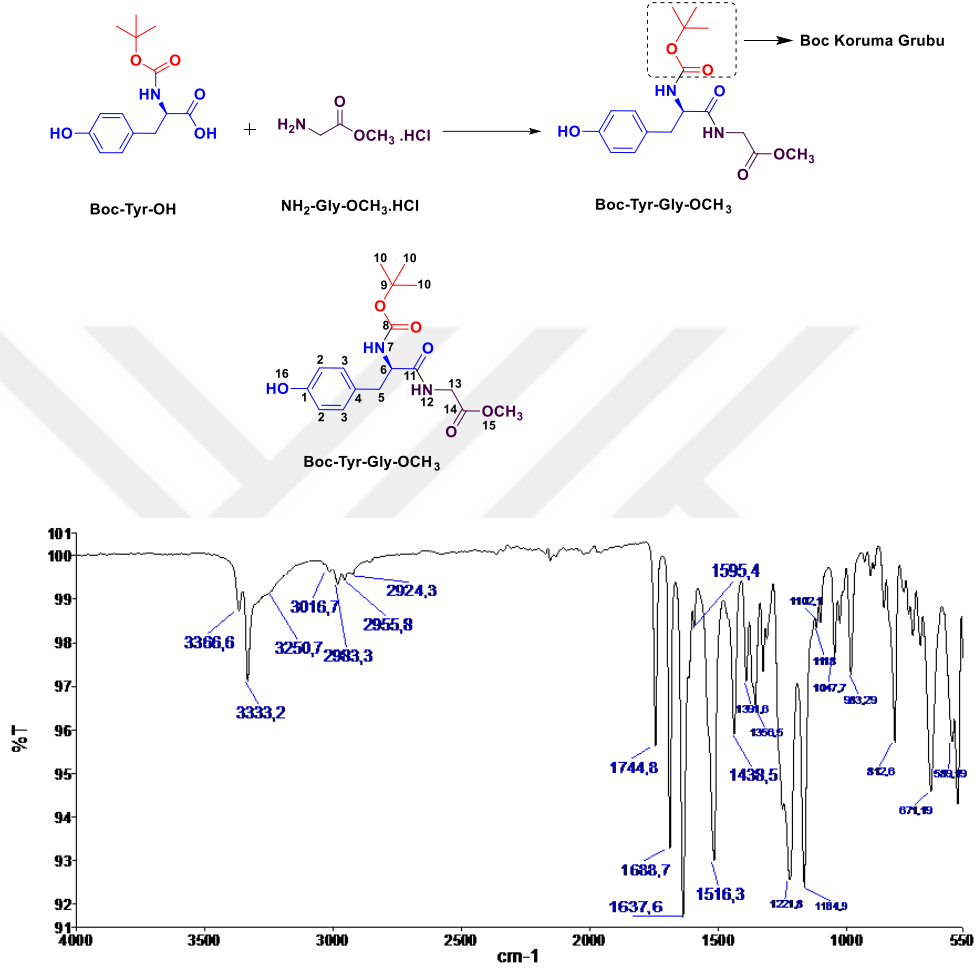
Amin grubu korunmuş 10.66 mmol Tirozin (**Boc-Tyr-OH**), 12.792 mmol **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)**, ve 10.66 mmol **Aminoasit metil ester hidroklorür (NH₂-Gly-OCH₃.HCl/ NH₂-Ala-OCH₃.HCl)** bileşikleri içerisinde 30 mL Asetonitril (MeCN) bulunan tek boyunlu reaksiyon balonuna ilave edildi ve karıştırıldı. Oluşan süspansiyona 26.65 mmol 4-Metilmorfolin (NMM) damlalık kullanılarak yavaş yavaş eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. TLC (6:4 EtOAc/n-hekzan) ile reaksiyon takip edilerek durduruldu (yaklaşık reaksiyon süresi 48 saat). Reaksiyon durdurulduktan sonra reaksiyonun çözücüsü MeCN bir kısmı buharlaştırıldı ve üzerine 30 mL su ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımdaki katı kısım hızlı bir şekilde çözünerek berrak görünüm kazandı. Fakat kısa süre içinde çökme başladı. Çökmenin tam olarak gerçekleşmesi için birkaç saat karıştırıldı. Çöken katı madde süzülerek kurumaya bırakıldı. Çöken madde ortamdaki süzülerek ayrıldıktan sonra verim az olan ürünler etil asetat (EtOAc) ile ekstraksiyon yapıldıktan sonra organik faza geçen kısım sırasıyla %10 sitrik asit, %5 sodyum karbonat (NaCO₃) ve saf su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik kısım MgSO₄ ile kurutuldu ve çözücü uçuruldu. Kalan kısım kloroformda çözünerek n-hekzan da çöktürüldü. Çöken katı madde süzülerek kurutuldu. Ürün saf olarak elde edildi [15].

II. Sentez Prosedür

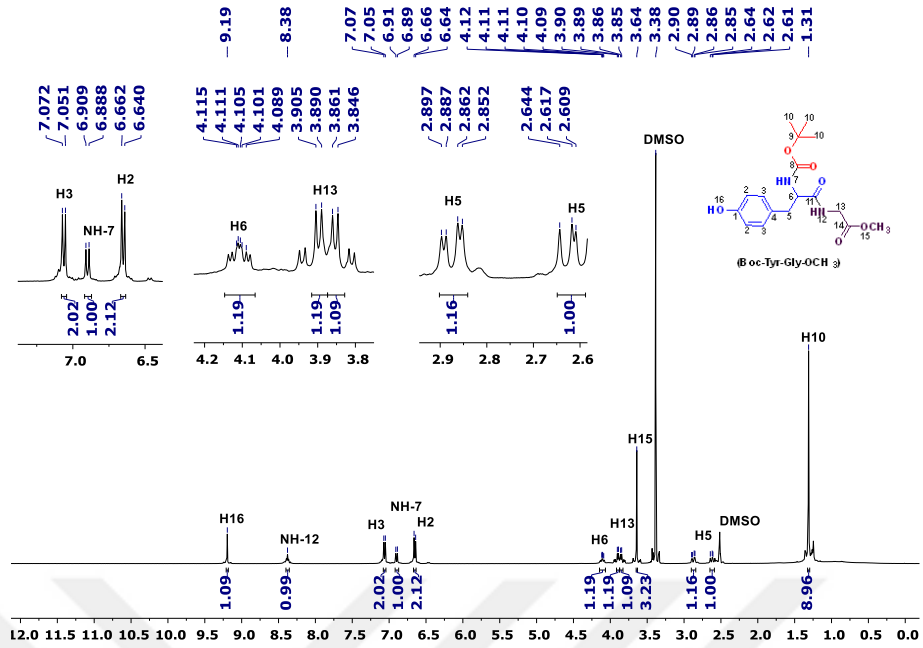
10.67 mmol (1 Eq.) **Boc-Tyr-Gly-OCH₃/ Boc-Tyr-Ala-OCH₃** bileşiği içerisinde 40 mL metanol (MeOH) bulunan tek boyunlu reaksiyon balonuna ilave edildi ve tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon ortamının sıcaklığı 0 °C'ye getirildi. Üzerine % 8'lik NaOH (2 M, 21.34 mmol, 10.67 mL, 2 Eq.) çözeltisi 0 °C'de damla damla 30 dakikada ilave edildi. Ardından reaksiyon oda sıcaklığında karıştırıldı. TLC (3:5 EtOAc/n-hekzan) ile reaksiyon takip edilerek durduruldu (yaklaşık reaksiyon süresi 24 saat). Reaksiyon durdurulduktan sonra karışımın pH'ı 3 olana kadar 0 °C'de 4N HCl çözeltisi ilave edildi. Bu aşamadan sonra MeOH vakum altında buharlaştırıldı. Karışıma yaklaşık 40 mL EtOAc ilave edilerek karıştırıldı. Çözünmeyen kısım süzülerek ayrıldı. Süzüntü MgSO₄ üzerinden kurutuldu ve EtOAc döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Elde edilen yağimsı madde kloroformda tekrar çözüldü ve n-hekzan içerisinde çöktürüldü. Çöken katı madde süzülerek ayrıldı ve vakum altında kurutuldu [16].

4.3.1.1. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Dipeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

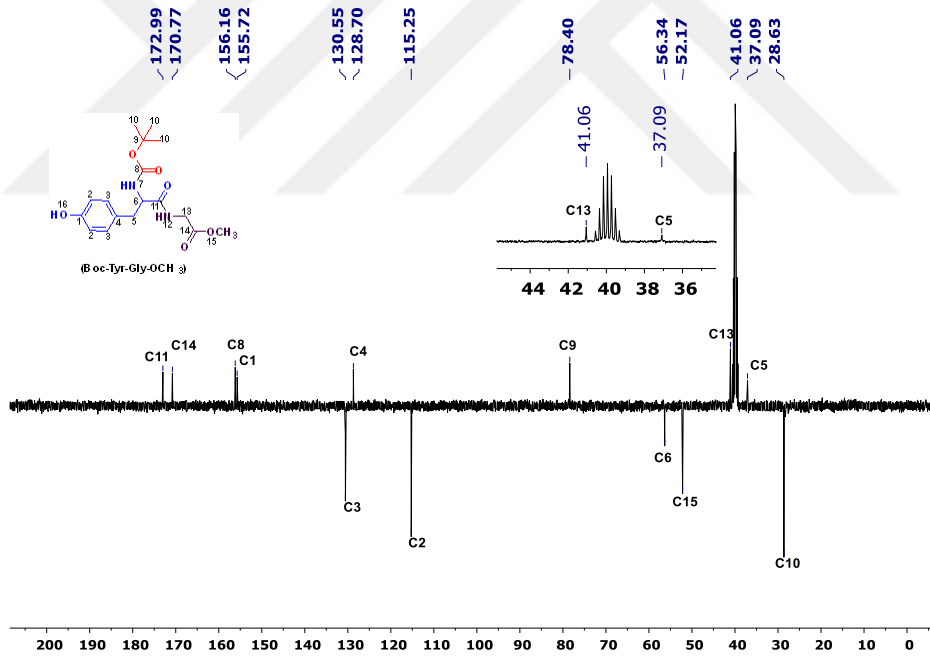
10.66 mmol **Boc-Tyr-OH**, 10.66 mmol **NH₂-Gly-OCH₃.HCl**. Verim : %75. **Boc-Tyr-Gly-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Tablo 4.1’de verilmiştir.



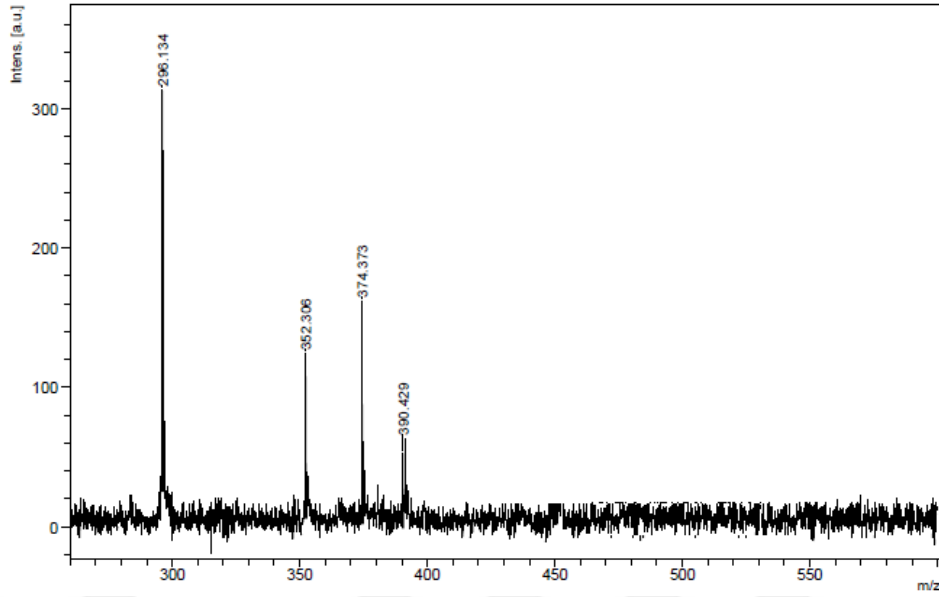
Şekil 4.1. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.2. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.3. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.4. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (THF)

Tablo 4.1. Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3250, 3366, 3333 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3016, 2924, 2955 VC=C 1516, 1595, VC=O 1637 (Amid C=O) 1688 (Boc koruma grubuna ait C=O), 1744 (Ester C=O),	1.31 (9H, s, H ¹⁰), 2.61-2.64 ve 2.85-2.90 (2H, H ⁵) 3.64 (3H, s, H ¹⁵), 3.85-3.90 (2H, H ¹³), 4.09-4.12 (1H, q, H ⁶), 6.64-6.66 (2H, d, J=8.8 Hz, H ²), 6.89-6.91 (1H, d, H ⁷ (-NH)), 7.05-7.07 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 8.38 (1H, t, H ¹² (-NH)), 9.19 (1H, s, H ¹⁶ (-OH))	155.72 C ¹ , 078.40 C ⁹ , 115.25 C ² , 028.63 C ¹⁰ , 130.55 C ³ , 172.99 C ¹¹ , 128.70 C ⁴ , 041.06 C ¹³ , 037.09 C ⁵ , 170.77 C ¹⁴ , 056.34 C ⁶ , 052.17 C ¹⁵ , 156.16 C ⁸
		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 39 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 352.39 g/mol Deneyisel [M] : 352.306 m/z [M+Na] : 374.373 m/z [M+K] : 390.429 m/z [M-C(CH₃)₃] : 296.134	C₁₇H₂₄N₂O₆ (Mw: 352.39 g/mol) Teorik : C, 57.94; H, 6.87; N, 7.95 Deneyisel : C, 57.99; H, 6.90; N, 7.99	

Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR spektrumunda yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.1'de verilmiştir. Boc-Tyr-OH'a ait karboksil -OH gerilme titreşimi bileşiğinin FT-IR spektrumunda gözlenmemiştir (Şekil 4.1). Ayrıca 1637 cm⁻¹ de amid karbonilinin (-C=O-NH-) titreşimi gözlenmiştir.

oluştugu görülmektedir. Ek olarak glisin aminoasitinin yapıya bağlanması ile yapısındaki ester karbonili de 1744 cm^{-1} de görülmektedir.

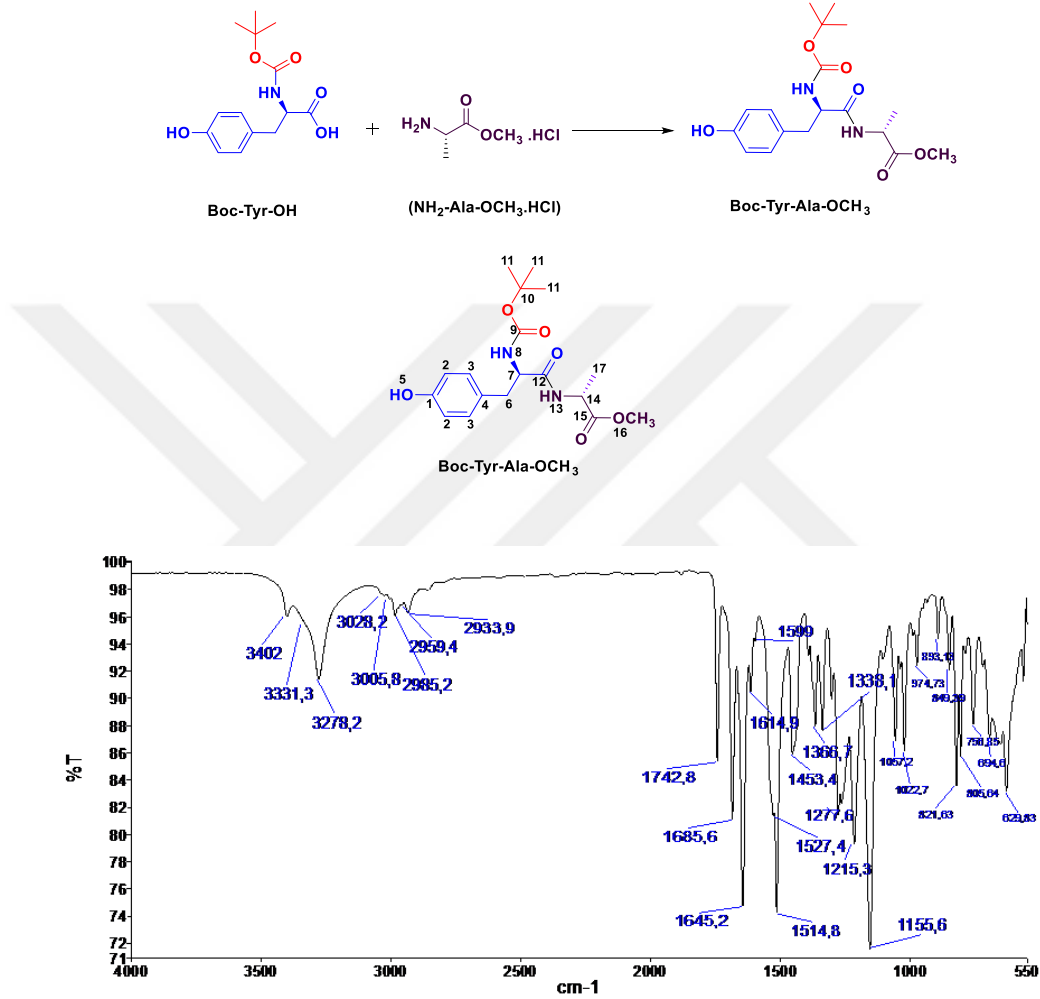
Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda **Boc-Tyr-OH**'a ait karboksilik asit -OH protonu görülmemektedir (Şekil 4.2). Amit bağının oluşması ile birlikte -NH protonu 8.38 (1H, t, H¹² (-NH)) spektrumda görülmektedir. Tirozinin yapısındaki -NH protonu ise 6.89-6.91 (1H, d, H⁷ (-NH)) de görülmüştür. Glisinin yapıya bağlanması ile birlikte yapısındaki -CH₂ protonları 3.85-3.90 (2H, H¹³) de, ester -C=O-OCH₃ protonları ise 3.64 (3H, s, H¹⁵) gözlenmiştir. İntegral yüksekliklerinin yapı ile uyumlu olması yapının oluştuğunu göstermektedir.

Boc-Tyr-Gly-OCH₃ Bileşiğinin yapısında primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner (-CH, -CH₂, -CH₃ ve -C) karbon atomlarının olması ¹³C-APT NMR spektrumunun alınması yapı karakterizasyonunu kolaylaştırmıştır. ¹³C-APT NMR spektrumu yapıdaki primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner karbonların kolaylıkla belirlenmesinde ve bileşiğin desteklenmesinde önemlidir. Bileşiğin ¹³C-APT NMR spektrumu incelendiğinde **Boc-Tyr-OH**'a ait karboksil C=O karbonunun, bileşiğin oluşması ile amit karboniline dönüşmesi ile 172.99 ppm'e (C¹¹) kaymıştır. Yapıdaki ester karbonili 170.77 (C¹⁴) ppm de gözlenmiştir. Glisin aminoasitine ait alifatik -CH₂ karbonu 41.06 ppm'de (C¹³), ester -OCH₃ karbonu ise 52.17 ppm'de (C¹⁵) gözlenmiştir. Bileşiğinin yapısındaki 2 ve 3 numaralı karbonlar ve -Boc koruma grubunun yapısındaki 3 tane -CH₃ karbonunun eşdeğer ve simetrik karbon atomları olduğundan karbon NMR spektrumunda 17 karbon yerine 13 adet karbon piki görülmektedir (Şekil 4.3).

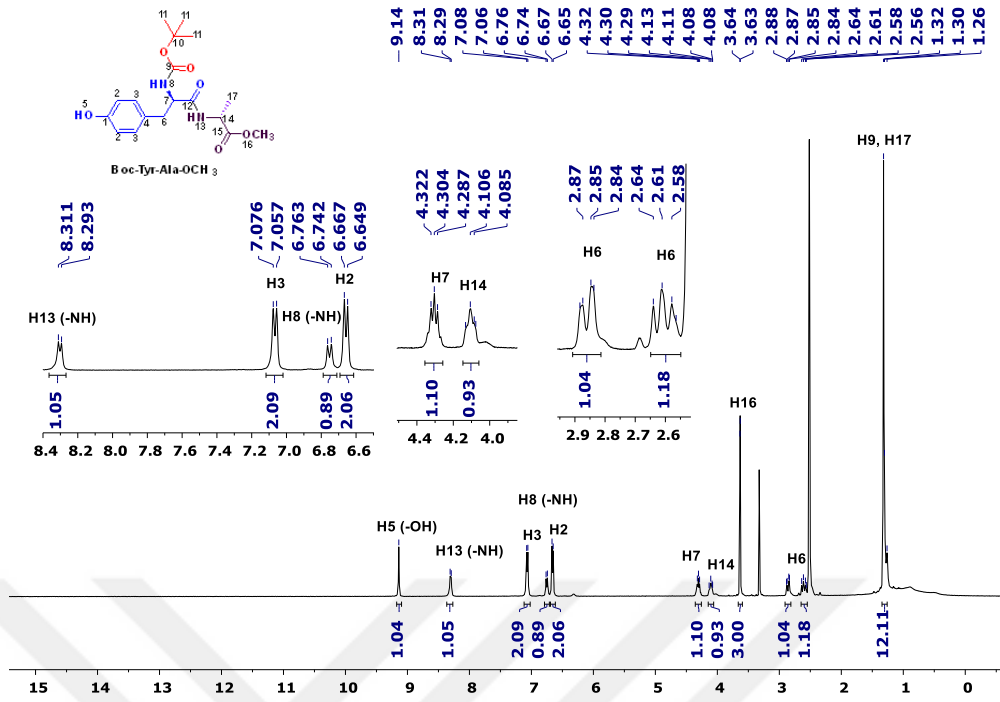
Boc-Tyr-Gly-OCH₃ bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **352.39 g/mol dür.** MALDI-TOF MS spektrumunda 352.306 piki bileşiğe ait piktir (Şekil 4.4). Bunun üstünde çıkan 374.373 [M+Na], 390.429 [M+K] dur. Altta gözlenen pik ise yapıdan ayrılan grubu göstermektedir. Bu da hesaplamalara göre Boc koruma grubundaki -C(CH₃)₃ grubuna karşılık gelmektedir 296.134 [M-C(CH₃)₃].

4.3.1.2. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Dipeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

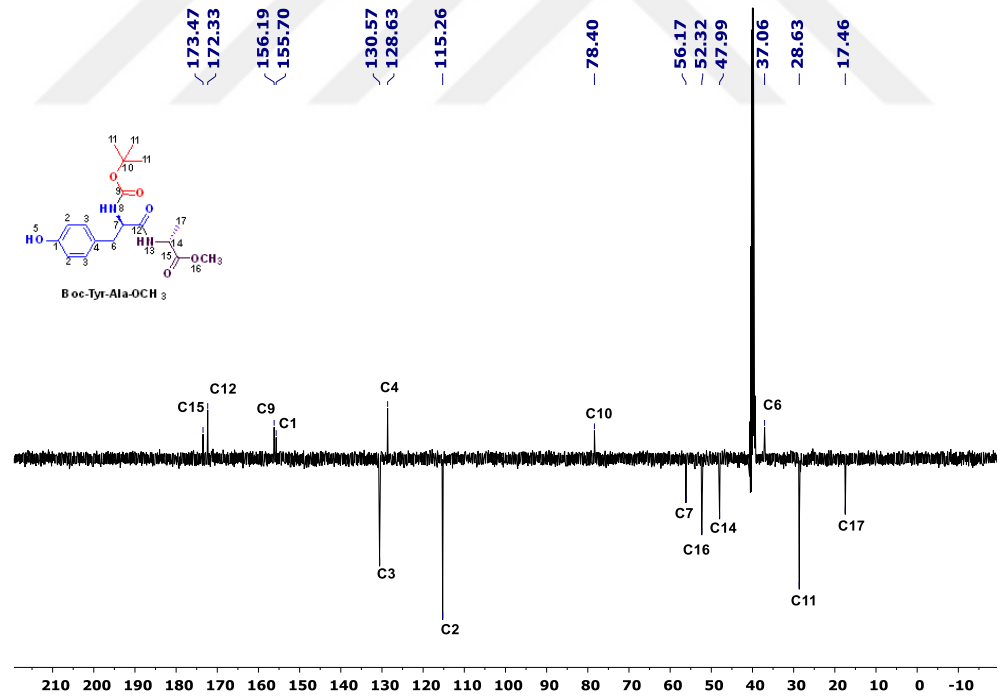
10.66 mmol **Boc-Tyr-OH**, 10.66 mmol **NH₂-Ala-OCH₃.HCl**. Verim : %65. **Boc-Tyr-Ala-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Tablo 4.2’de verilmiştir.



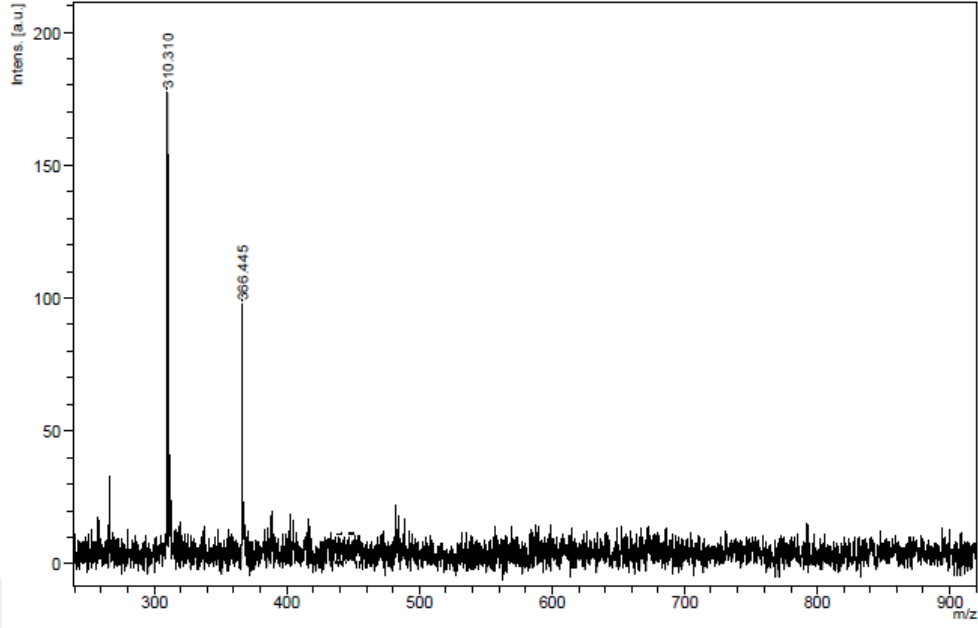
Şekil 4.5. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.6. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.7. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.8. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu

Tablo 4.2. Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3278, 3331, 3402 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3005, 3028 2933, 2959 VC=C 1514, 1527, 1599, 1614 VC=O 1645 (Amid C=O) 1685 (Boc koruma grubuna ait C=O), 1742 (Ester C=O),	1.26-1.30 (3H, d, H ¹⁷), 1.32 (9H, s, H ¹¹), 2.56-2.65 ve 2.84-2.88 (2H, H ⁶), 3.64 (3H, s, H ¹⁶), 4.08-4.13 (1H, m, H ¹⁴), 4.29-4.32 (1H, q, H ⁷), 6.65-6.67 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.74-6.76 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.06-7.08 (2H, d, J=8.8 Hz, H ³), 8.29-8.31 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.14 (1H, s, H ⁵ (-OH))	155.70 C ¹ , 078.40 C ¹⁰ , 115.26 C ² , 028.63 C ¹¹ , 130.57 C ³ , 172.33 C ¹² , 128.63 C ⁴ , 047.99 C ¹⁴ , 037.06 C ⁶ , 173.47 C ¹⁵ , 056.17 C ⁷ , 052.32 C ¹⁶ , 156.19 C ⁹ , 017.46 C ¹⁷ , DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 366.41 g/mol Deneyisel [M] : 366.445 m/z [M-C(CH₃)₃] : 310.310 m/z	C₁₈H₂₆N₂O₆ (Mw: 366.41 g/mol) Teorik : C, 59.0; H, 7.15; N, 7.65 Deneyisel : C, 59.07; H, 7.19; N, 7.61	

Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR spektrumunda yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.2’de verilmiştir. **Boc-Tyr-OH**’a ait karboksil -OH gerilme titreşimi bileşiğinin FT-IR spektrumunda gözlenmemiştir. Ayrıca 1645 cm⁻¹’de amit karbonilinin (-C=O-NH-) oluştuğu

görülmektedir. Ek olarak Alanin aminoasitinin yapıya bağlanması ile yapısındaki ester karbonili de 1742 cm^{-1} de görülmektedir (Şekil 4.5).

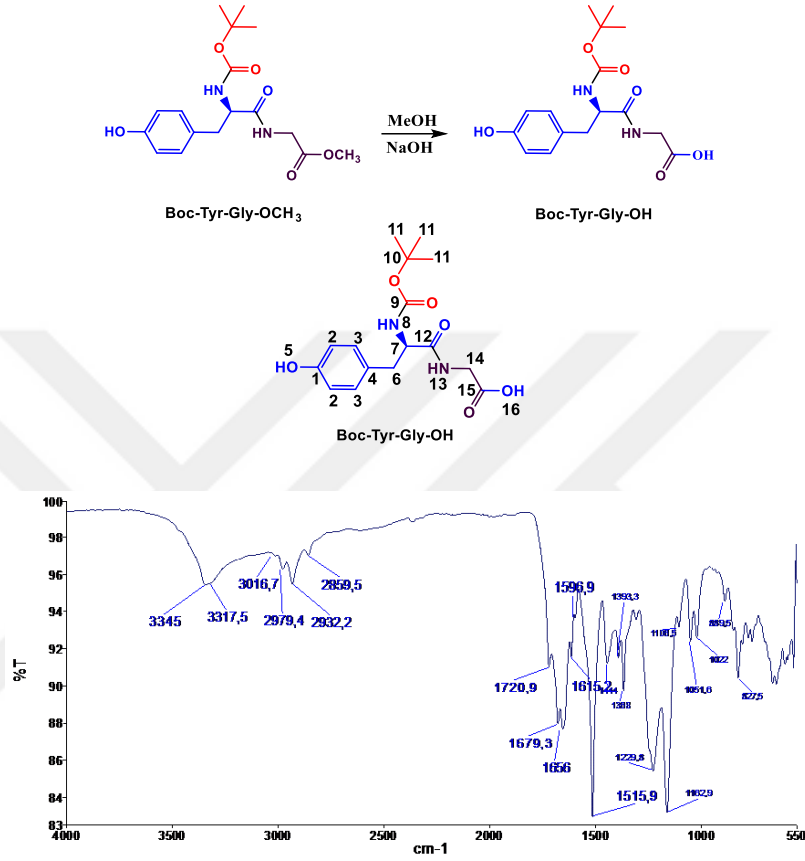
Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda **Boc-Tyr-OH**'a ait karboksilik asit -OH protonu görülmemektedir. Amit bağının oluşması ile birlikte -NH protonu 8.29-8.31 (1H, d, H¹³ (-NH)), spektrumda görülmektedir. Tirozinin yapısındaki -NH protonu ise 6.74-6.76 (1H, d, H⁸ (-NH)), de görülmüştür. Alaninin yapıya bağlanması ile birlikte yapısındaki -CH protonu 4.08-4.13 (1H, m, H¹⁴), -CH₃ protonları 1.26-1.30 (3H, d, H¹⁷) ve ester -C=O-OCH₃ protonları ise 3.64 (3H, s, H¹⁶) gözlenmiştir. İntegral yüksekliklerinin yapı ile uyumlu olması yapının oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.6).

Boc-Tyr-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumu incelendiğinde **Boc-Tyr-OH**'a ait karboksil C=O karbonunun, bileşiğin oluşması ile amit karboniline dönüşmesi ile 172.33 ppm'e (C¹²) kaymıştır. Yapıdaki ester karbonili 173.47 (C¹⁵) ppm de gözlenmiştir. Alanin aminoasitine ait alifatik -CH karbonu 47.99 ppm'de (C¹⁴), -CH₃ karbonu 17.46 ppm'de (C¹⁷) ve ester -OCH₃ karbonu ise 52.32 ppm'de (C¹⁶) gözlenmiştir. Bileşiğinin yapısındaki 2 ve 3 numaralı karbonlar ve -Boc koruma grubunun yapısındaki 3 tane -CH₃ karbonunun eşdeğer ve simetrik karbon atomları olduğundan karbon NMR spektrumunda 18 karbon yerine 14 adet karbon piki görülmektedir (Şekil 4.7).

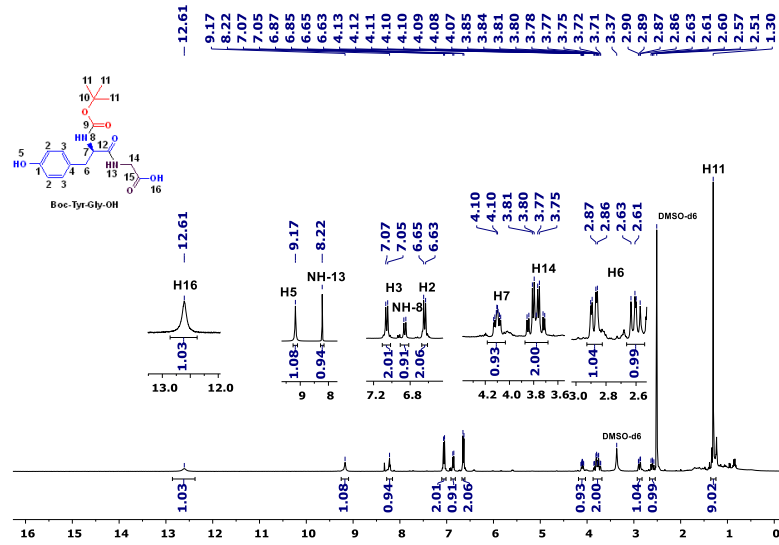
Boc-Tyr-Ala-OCH₃ bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **366.41 g/mol dür.** MALDI-TOF MS spektrumunda 366.445 [M] piki bileşiğe ait piktir. Bu pikin altında gözlenen pik ise yapıdan ayrılan gruplardan kaynaklanan bileşiği göstermektedir. Bu da hesaplamalara göre 310.310 daki pik Boc koruma grubundaki -C(CH₃)₃ grubunun kopmasına karşılık gelmektedir 310.310 [M-C(CH₃)₃] (Şekil 4.8).

4.3.1.3. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu

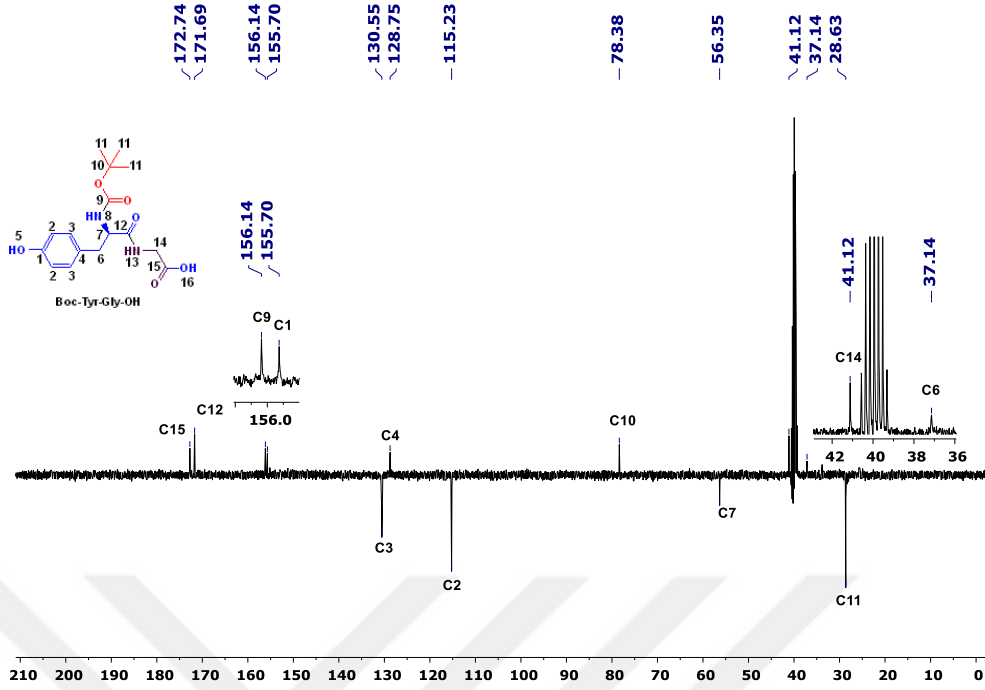
10.67 mmol **Boc-Tyr-Gly-OCH₃**, %8'lik NaOH (2 M, 21.34 mmol, 10.67 mL, 2 Eq.).
Verim: %70. **Boc-Tyr-Gly-OH** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H ve ¹³C-APT NMR sırasıyla Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Tablo 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.9. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.10. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.11. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.3. Boc-Tyr-Gly-OH Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3317, 3345	1.01 (9H, s, H ¹¹), 2.57-2.63 ve 2.86-2.90 (2H, H ⁶),	155.70 C ¹ , 156.14 C ⁹
VC-H(Aromatik), 3016	3.71-3.85 (2H, H ¹⁴), 4.07-4.13 (1H, q, H ⁷),	115.23 C ² , 078.38 C ¹⁰ , 130.55 C ³ , 028.63 C ¹¹ ,
VC=C 1515, 1596, 1615	6.63-6.65 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.87-6.85 (1H, d, H ⁸ (-NH)),	128.75 C ⁴ , 172.74 C ¹² , 037.14 C ⁶ , 041.12 C ¹⁴ ,
VC=O 1656 (Amid C=O) 1679 (Boc koruma grubuna ait C=O), 1720 (Asit C=O),	7.05-7.07 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 8.22 (1H, H ¹³ (-NH)), 9.17 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)), 12.61 (1H, s, H ¹⁶ (-COOH))	056.35 C ⁷ , 171.69 C ¹⁵ ,
		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 39 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 338.36 g/mol	C₁₆H₂₂N₂O₆ (Mw: 338.36 g/mol) Teorik : C, 56.80; H, 6.55; N, 8.28 Deneysel : C, 55.83; H, 6.58; N, 8.33	

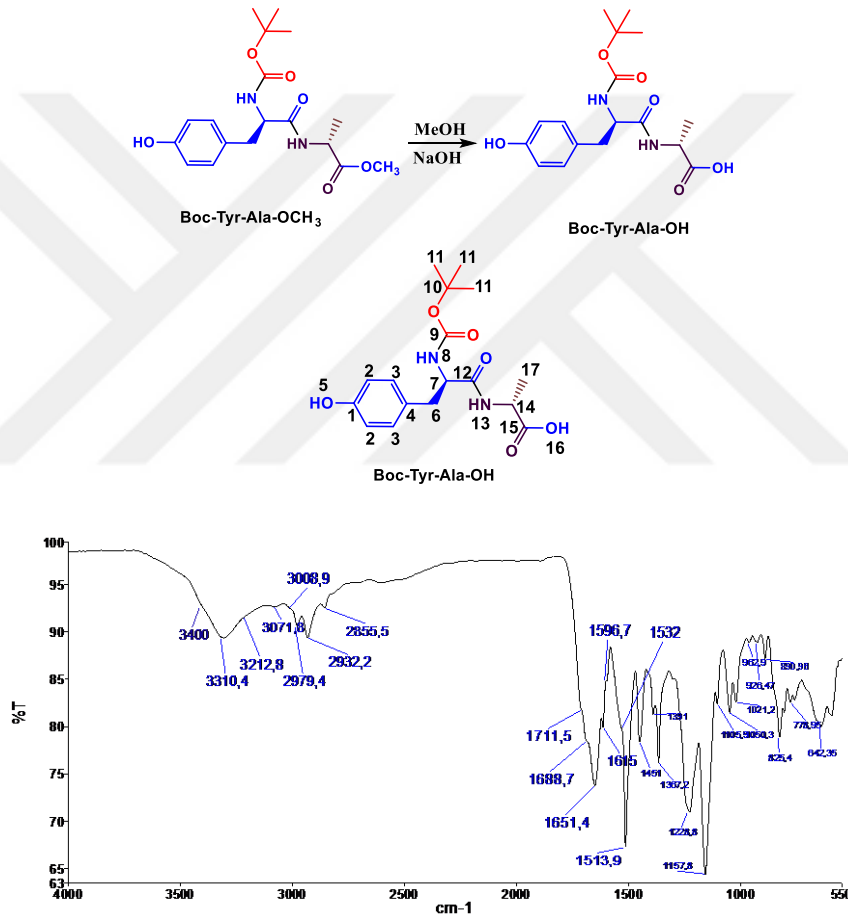
Boc-Tyr-Gly-OCH₃ bileşiğine ait 3.64 ppm deki 3 protonluk singlet -OCH₃ ester proton pikleri, Boc-Tyr-Gly-OH bileşiğinin ¹H-NMR'ında görülmemektedir. Benzer şekilde 52.17 ppm deki -OCH₃ ester karbon piki de Boc-Tyr-Gly-OH bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda görülmemektedir. Bu sonuçlar, -OCH₃ grubunun -OH fonksiyonel grubuna dönüştüğünü

göstermektedir. **Boc-Tyr-Gly-OH** bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 12.61 ppm deki 1 protonluk karboksilik asit $-\text{OH}$ pikinin varlığı $-\text{CO-OCH}_3$ ester grubunun $-\text{CO-OH}$ grubuna dönüştüğünün bir sonucudur. Bileşiğe ait diğer pikler spektrumda görülmesi ile birlikte integral yüksekliklerinin uyumunda yapının oluştuğunun göstergesidir.

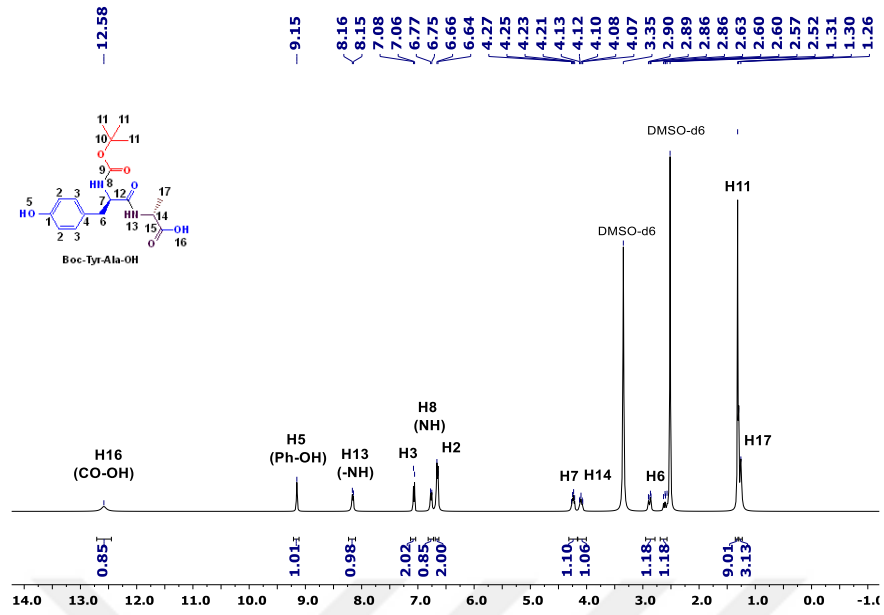
4.3.1.4. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu

5.46 mmol **Boc-Tyr-Ala-OCH₃**, %8'lik NaOH (2 M, 10.92 mmol, 5.46 mL, 2 Eq.). Verim: %78.

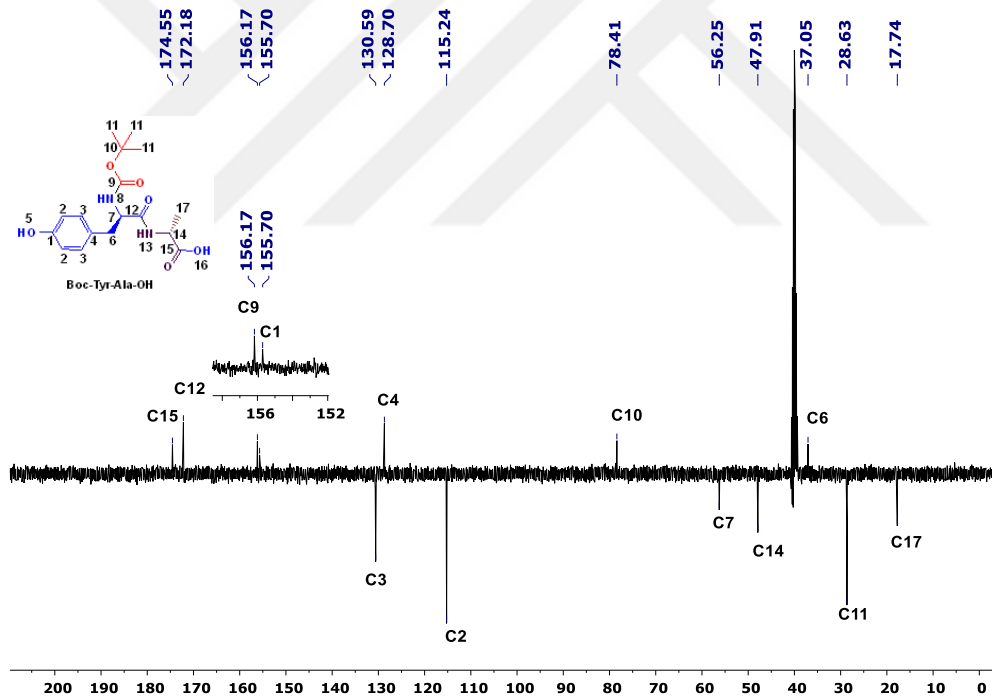
Boc-Tyr-Ala-OH bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ^1H ve ^{13}C -APT NMR sırasıyla Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Tablo 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.13. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.14. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.4. Boc-Tyr-Ala-OH Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3400, 3310, 3212 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3008, 3071 2855, 2932, 2979 VC=C 1513, 1532, 1596, 1615 VC=O 1651 (Amid C=O) 1688 (Boc koruma grubuna ait C=O), 1711 (Asit C=O),	1.26 (3H, d, H ¹⁷), 1.31 (9H, s, H ¹¹), 2.57-2.63 ve 2.86-2.90 (2H, H ⁶), 4.07-4.13 (1H, H ¹⁴), 4.21-4.27 (1H, H ⁷), 6.624-6.66 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.75-6.77 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.06-7.08 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 8.15-8.16 (1H, H ¹³ (-NH)), 9.15 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)), 12.58 (1H, s, H ¹⁶ (-COOH))	155.70 C ¹ , 078.41 C ¹⁰ , 115.24 C ² , 028.63 C ¹¹ , 130.59 C ³ , 172.18 C ¹² , 128.70 C ⁴ , 047.91 C ¹⁴ , 037.05 C ⁶ , 174.55 C ¹⁵ , 056.25 C ⁷ , 017.74 C ¹⁶ , 156.17 C ⁹ DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 352.39 g/mol Deneysel	C₁₇H₂₄N₂O₆ (Mw: 352.39 g/mol) Teorik : C, 57.94; H, 6.87; N, 7.95 Deneysel : C, 57.99; H, 6.92; N, 7.91	

Bileşiğe ait FT-IR, ¹H-NMR ve ¹³C-APT NMR spektrumu Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de verilmiştir. Karakterizasyon verileri ise Tablo 4.5'de verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-OCH₃** bileşiğine ait 3.64 ppm deki 3 protonluk singlet **-OCH₃** ester proton pikleri ve 52.32 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki **Boc-Tyr-Ala-OH** bileşiğinin ¹H, ¹³C-APT-NMR spektrumunda görülmemektedir. Bu sonuçlar, **-OCH₃** grubunun **-OH** fonksiyonel grubuna dönüştüğünü göstermektedir. **Boc-Tyr-Ala-OH** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 12.58 ppm deki 1 protonluk karboksilik asit **-OH** pikinin varlığı **-CO-OCH₃** ester grubunun **-CO-OH** grubuna dönüştüğünün bir sonucudur. Bu sonuçlar yanında dipeptitin yapısındaki aromatik alifatik ve -NH pikleri ve uygun integral yükseklikleri ve karbon sayıları ile birlikte NMR spektrumlarında yapıyla uyumlu olduğu açıkça görülmektedir.

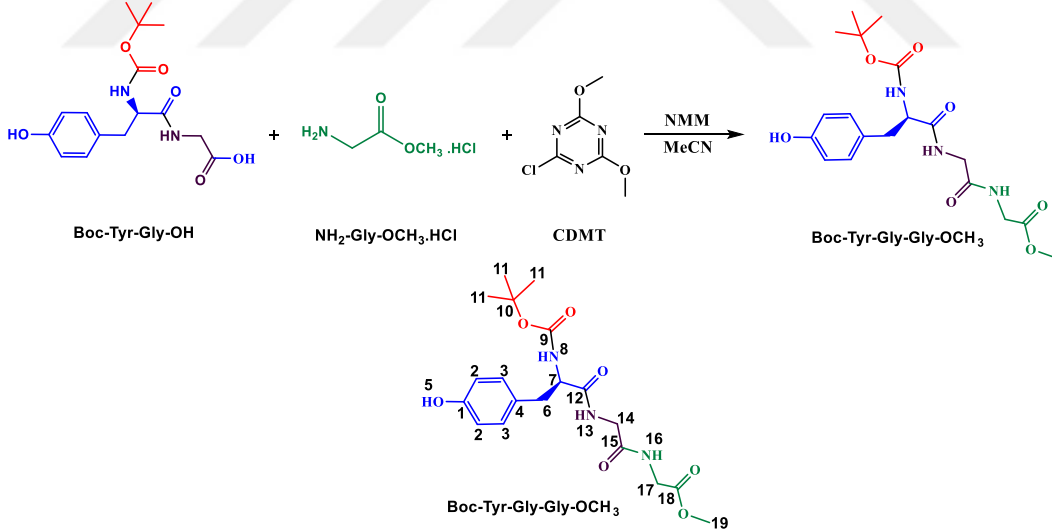
4.3.2. Tripeptit Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

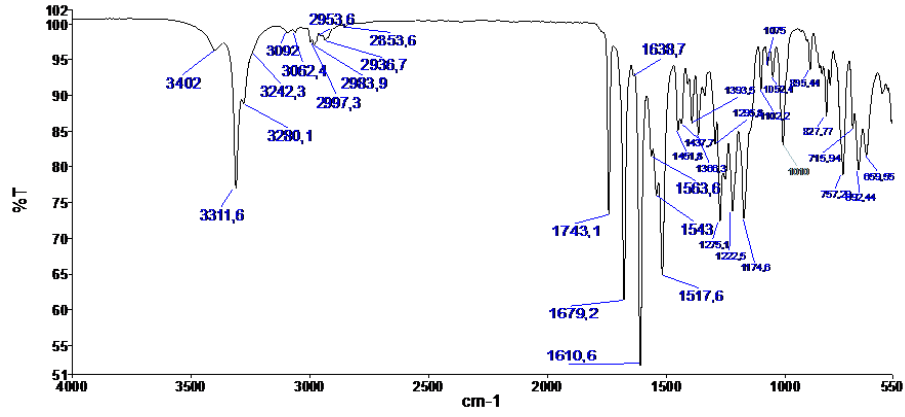
Sentezlenen **Boc-Tyr-Gly-OH** dipeptit bileşiğinden yola çıkarak **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** ve **Boc-Tyr-Ala-OCH₃** tripeptitleri, **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptit bileşiğinden yola çıkarak ise sırasıyla Alanin, Glisin, Valin ve Fenilalanin, metilester hidroklorür formundaki amonyasitlerin kombinasyonundan **Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃**, **Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃**, **Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃** ve **Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃** tripeptit bileşikler olmak üzere toplamda 6 adet tripeptit bileşiği sentezlenmiştir. Bileşiklerin sentezlerinde CDMT yöntemi kullanıldı [16]. Ayrıntılı sentez

yöntemi sadece **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** tripeptinin sentezinde verilmiştir. Diğer tripeptit bileşiklerinde de benzer yöntem kullanılmıştır.

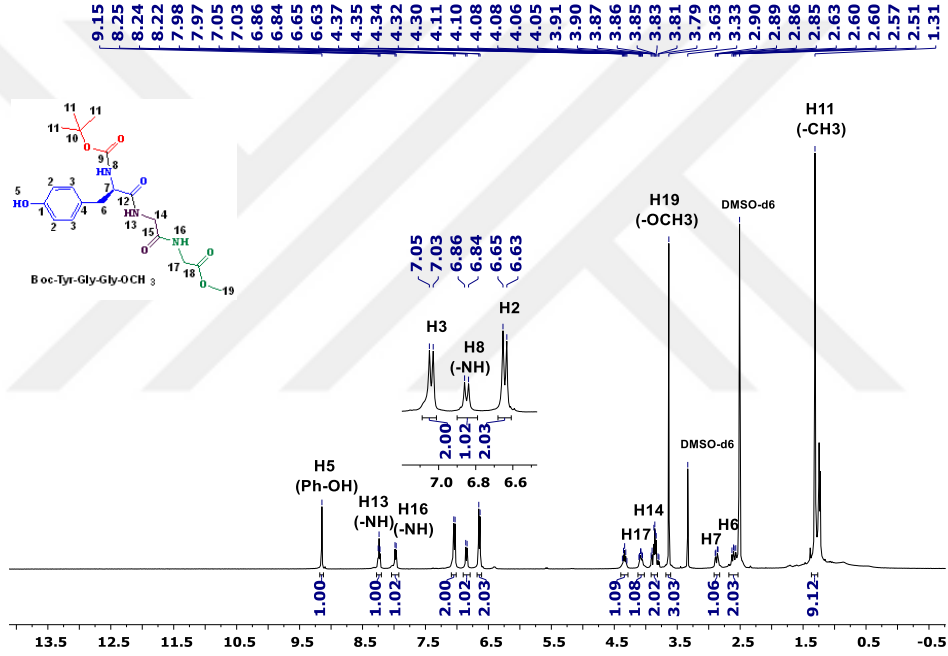
4.3.2.1. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu

1 g (2.96 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Gly-OH**, 0.623 g (3.55 mmol, 1.2 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)**, ve 0.371 mg (2.96 mmol, 1 Eq.) **Glisin metil ester hidroklorür (Gly-OCH₃)** bileşikleri içerisinde 30 mL Aetonitril (MeCN) bulunan tek boyunlu reaksiyon balonuna ilave edildi ve karıştırıldı. Oluşan süspansiyona 0.747 g (7.39 mmol, 812.33 µmL, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM) damlalık kullanılarak yavaş yavaş eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. TLC (6:4 EtOAc/n-hekzan) ile reaksiyon takip edilerek durduruldu (yaklaşık reaksiyon süresi 48 saat). Reaksiyon durdurulduktan sonra reaksiyonun çözücüsü MeCN bir kısmı buharlaştırıldı ve üzerine 30 mL su ilave edildi ve karıştırıldı. Karışımdaki katı kısım hızlı bir şekilde çözünerek berrak görünüm kazandı. Fakat kısa süre içinde çökme başladı. Çökmenin tam olarak gerçekleşmesi için birkaç saat karıştırıldı. Çöken katı madde süzülerek kurumaya bırakıldı. Verim : %58 (0.7 g). C₁₉H₂₇N₃O₇, MA: 409.44 g/mol. **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Tablo 4.5’de verilmiştir.

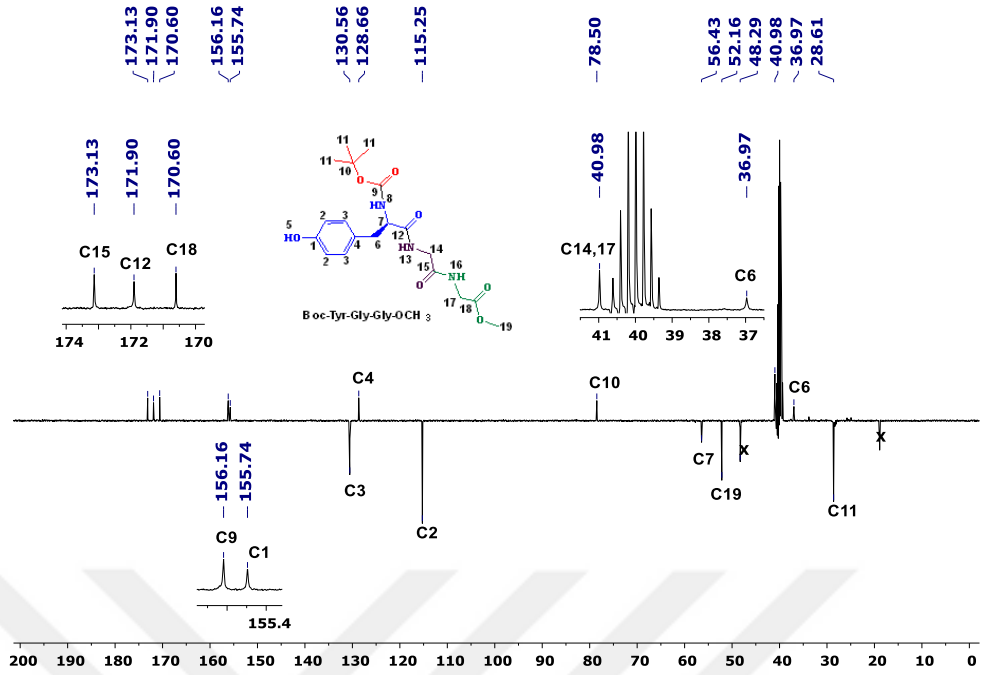




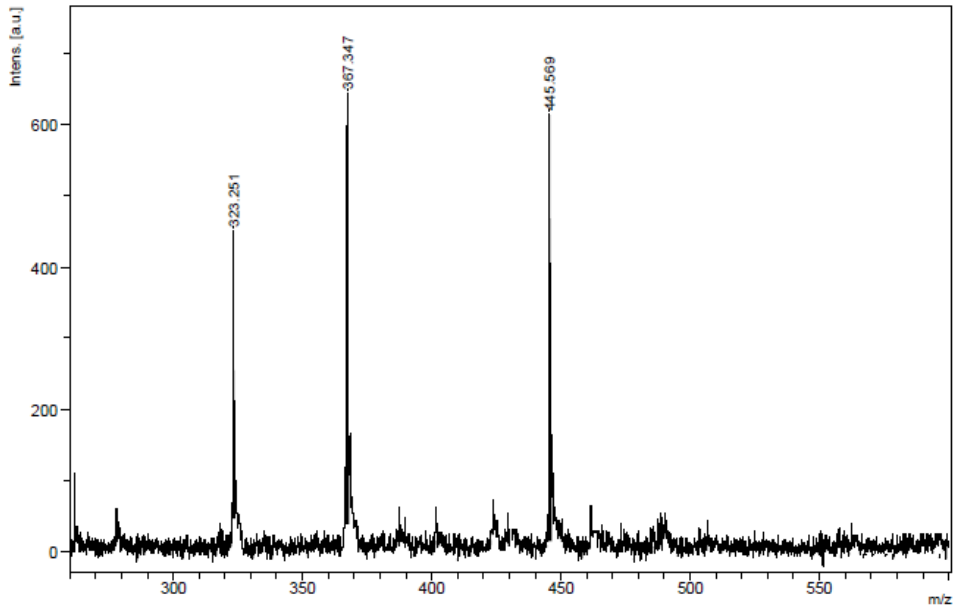
Şekil 4.15. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.16. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.17. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.18. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ bileşiğinin MALDI-TOF-kütle spektrumu

Tablo 4.5. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3242, 3280, 3311, 3402 VC-H(Aromatik), 3062, 3092 VC-H(Alifatik) 2853, 2936, 2953, 2983 VC=C 1517, 1543, 1583 VC=O 1610 (Amid C=O) 1638 (Amid C=O) 1679 (Boc koruma C=O), 1743 (C=O)	1.31 (9H, s, H ¹¹), 2.57-2.63 (2H, H ⁶), 2.85-2.90 (1H, H ⁷), 3.63 (3H, s, H ¹⁹), 3.79-3.91 (2H, H ¹⁴), 4.05-4.11 ve 4.30-4.37 (1H, H ¹⁷), 6.63-6.65 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.84-6.86 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 7.97 (1H, H ¹⁶ (-NH)), 8.22-8.25 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.15 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)),	155.74 C ¹ , 078.50 C ¹⁰ , 115.25 C ² , 028.61 C ¹¹ , 130.56 C ³ , 071.90 C ¹² , 128.66 C ⁴ , 040.98 C ^{14,17} , 036.97 C ⁶ , 173.13 C ¹⁵ , 056.43 C ⁷ , 170.60 C ¹⁸ 156.16 C ⁹ , 052.16 C ¹⁹
		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 39 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 409.44 g/mol Deneysel [M+K] : 445.569 m/z [M-((CH₃)₃)] : 367.347 m/z [M--(C(CH₃)₃)-OCH₃] : 323.521 m/z	C₁₉H₂₇N₃O₇ (Mw: 409.44 g/mol) Teorik : C, 55.74; H, 6.65; N, 10.26 Deneysel : C, 55.79; H, 6.67; N, 10.28	

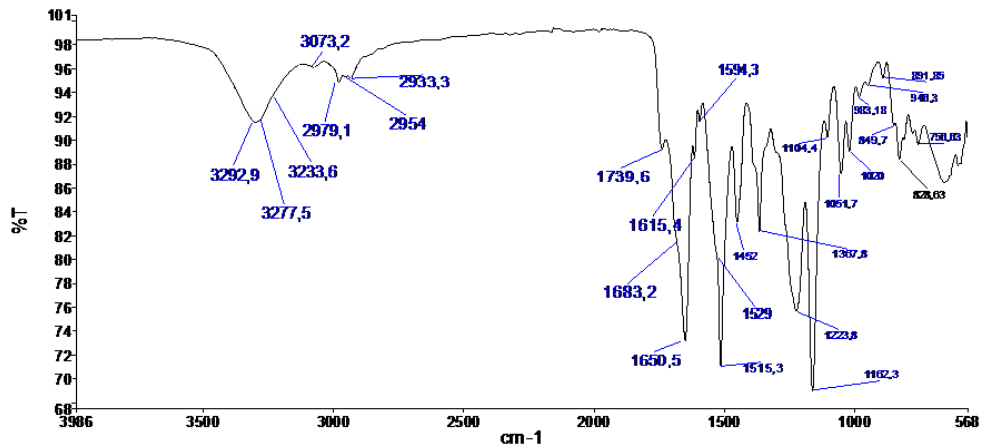
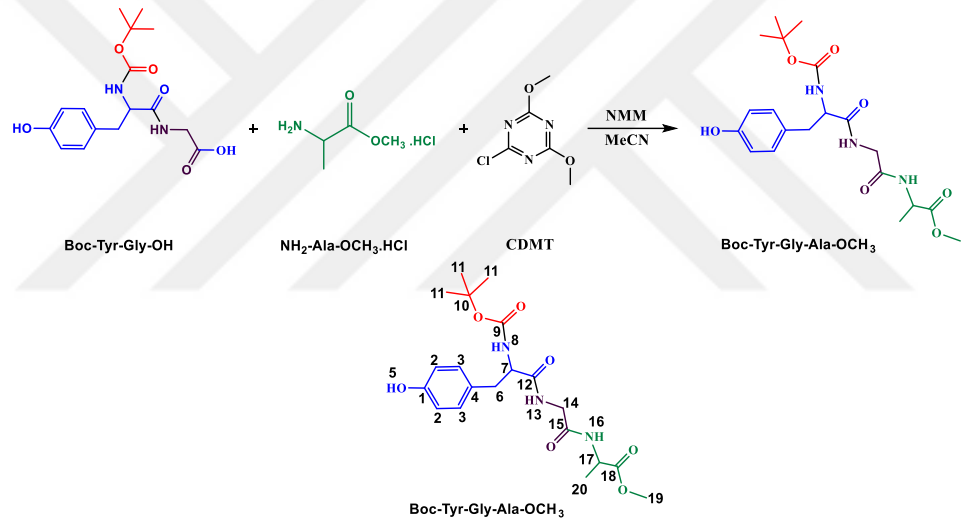
Boc-Tyr-Gly-OH bileşiğine ait 12.61 ppm deki 1 protonluk singlet **-CO-OH** grubuna ait pik **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin ¹H-NMR'ında görülmemektedir. Ayrıca oluşan tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 3.63 ppm'de 3 protonluk singlet **-OCH₃** piki görülmektedir. Yine **Gly-OCH₃** amino asidinin bağlanması ile yapıda 7.95 ppm de üçüncü bir **-NH** protonun varlığı görülmektedir. Benzer şekilde amino asidinin bağlanması ile 4.05-4.11 ve 4.30-4.37 ppm de 2 protonluk **-CH₂** pikleri de tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunun göstermektedir. Benzer durumlar ¹³C-APT NMR spektrumunda da yukarıda bahsedilen protonların karbon piklerinde de söz konusudur. Benzer şekilde 52.16 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki de **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda görülmektedir. ¹H-NMR ve ¹³C-APT NMR spektrumlarında alifatik bölgede küçük safsızlıklar görülmektedir. Söz konusu tripeptit bileşiklerinin çözücüleri hapsetme kabiliyetleri yüksek olması nedeniyle çöz çöktürmede kullanılan çözücü safsızlıklarıdır. Bileşiğe ait FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR spektrumları Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de verilmiştir. Detaylı datalar ise Tablo 4.5'de verilmiştir.

Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **409.44 g/mol** dür. MALDI-TOF MS spektrumunda 445.569 [M+K] karşılık gelmektedir (Şekil 4.18). Bu pikin

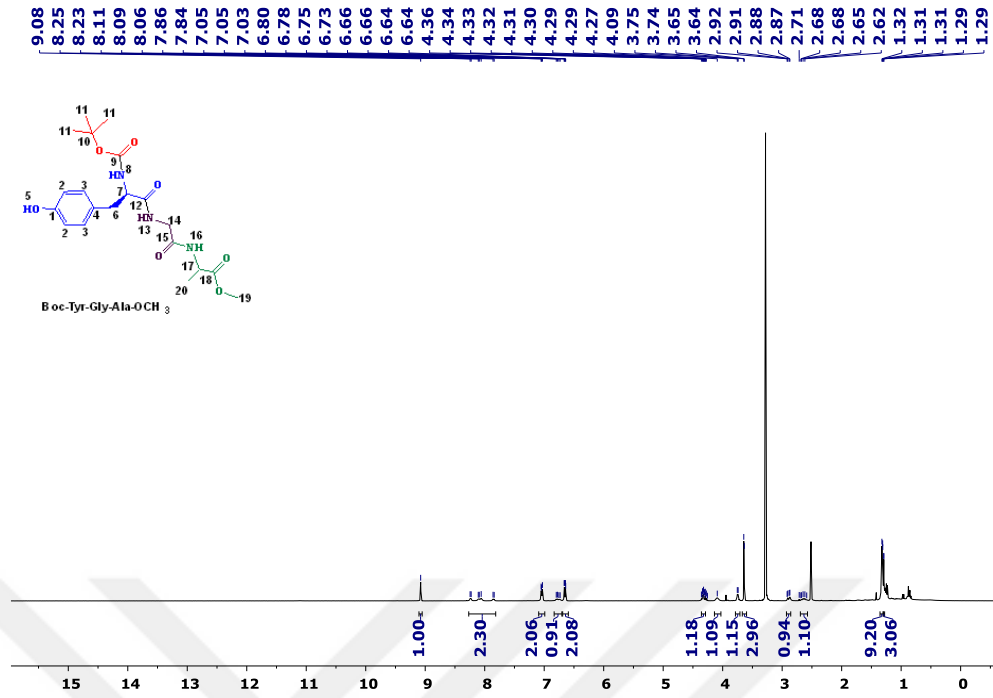
altında gözlenen pikler tripeptitin yapısındaki Boc grubunun bir tanesinde tamamen ayrıldığı, diğer 3 tanesinde ise Boc grubundaki $-(CH_3)_3$ grubunun kopmasına karşılık gelmektedir 367.347 [M- $((CH_3)_3)$]. İkinci ayrılan grup ise yapıdan boc grubunun $-C(CH_3)_3$ kısmı ve ester grubunun $-OCH_3$ 'ünün ayrılmasına karşılık gelmektedir 323.521 [M- $(C(CH_3)_3)-OCH_3$].

4.3.2.2. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Tripeptit Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu

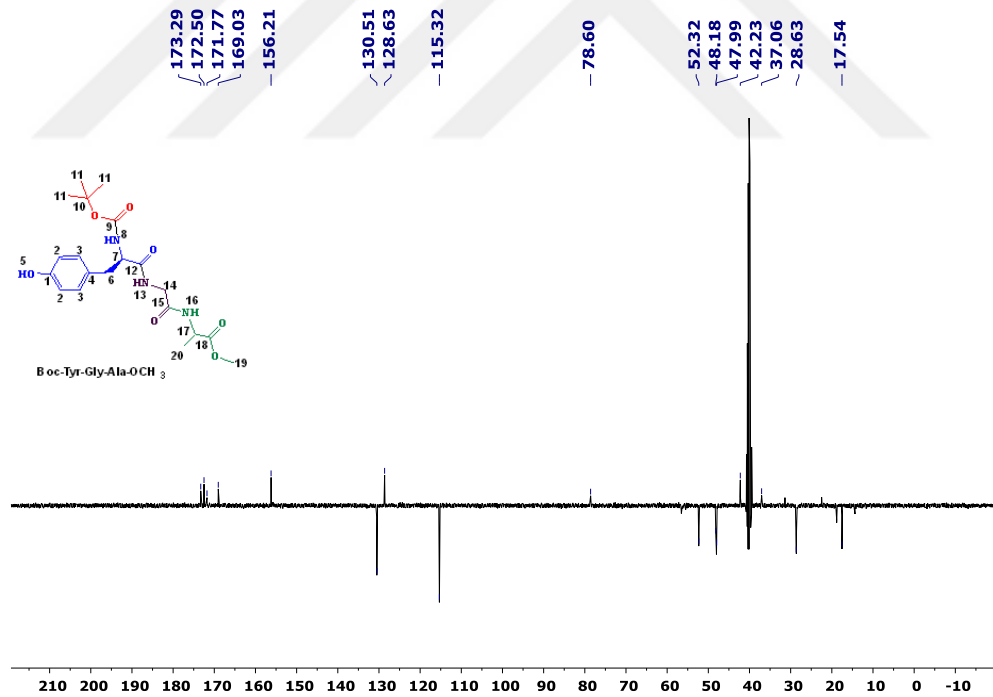
1.34 g (3.96 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Gly-OH**, 0.765 g (4,36 mmol, 1,1 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)**, ve 0.553 g (3.96 mmol, 1 Eq.) **Alanin metil ester hidroklorür (Ala-OCH₃)** ve 1 g (9.90 mmol, 1.09 μ mL, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM). Verim: %28. **Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H ve ¹³C-APT NMR sırasıyla Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Tablo 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.20. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.21. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

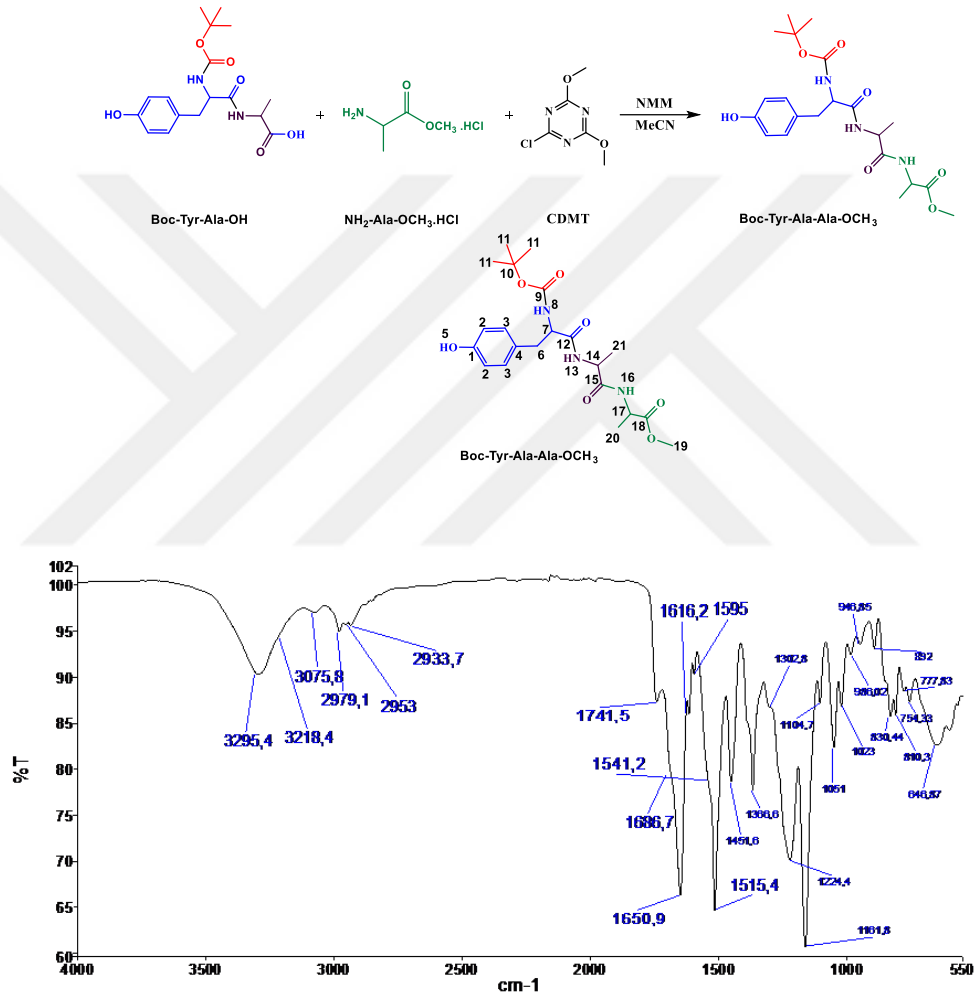
Tablo 4.6. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3233, 3277, 3292 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3073, 2933, 2954, 2979 VC=C 1515, 1529, 1594 VC=O 1615, 1650, 1683, 1739	1.29-1.31 (d, J=7.2 Hz, H ²⁰) 1.32 (9H, s, H ¹¹), 2.59-2.71 (1H, m, H ⁶), 2.87-2.92 (1H, m, H ⁶) 3.64-3.65 (3H, s, J=3.2 Hz, H ¹⁹), 3.75-3.74 (2H, d, J=5.6 Hz, H ¹⁴), 4.07-4.11 (1H, m, H ⁷), 4.26-4.36 (1H, m, H ¹⁷), 6.40-6.66 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.73-6.80 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 7.84-8.25 (2H, H ¹³ ve H ¹⁶ (-NH)), 9.08 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)),	155.21 C ¹ , 078.60 C ¹⁰ , 115.32 C ² , 028.63 C ¹¹ , 130.51 C ³ , 172.50 C ¹² , 128.63 C ⁴ , 042.23 C ¹⁴ , 037.06 C ⁶ , 173.29 C ¹⁵ , 056.55 C ⁷ , 169.03 C ¹⁸ 156.21 C ⁹ , 052.32 C ¹⁹ 047.99 C ¹⁷ , 017.54 C ²⁰ DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw Teorik : 423.47 g/mol Deneysel	C₂₀H₂₉N₃O₇ (Mw: 423.47 g/mol) Teorik : C, 56.73; H, 6.90; N, 9.92 Deneysel : C, 56.78; H, 6.93; N, 9.99	

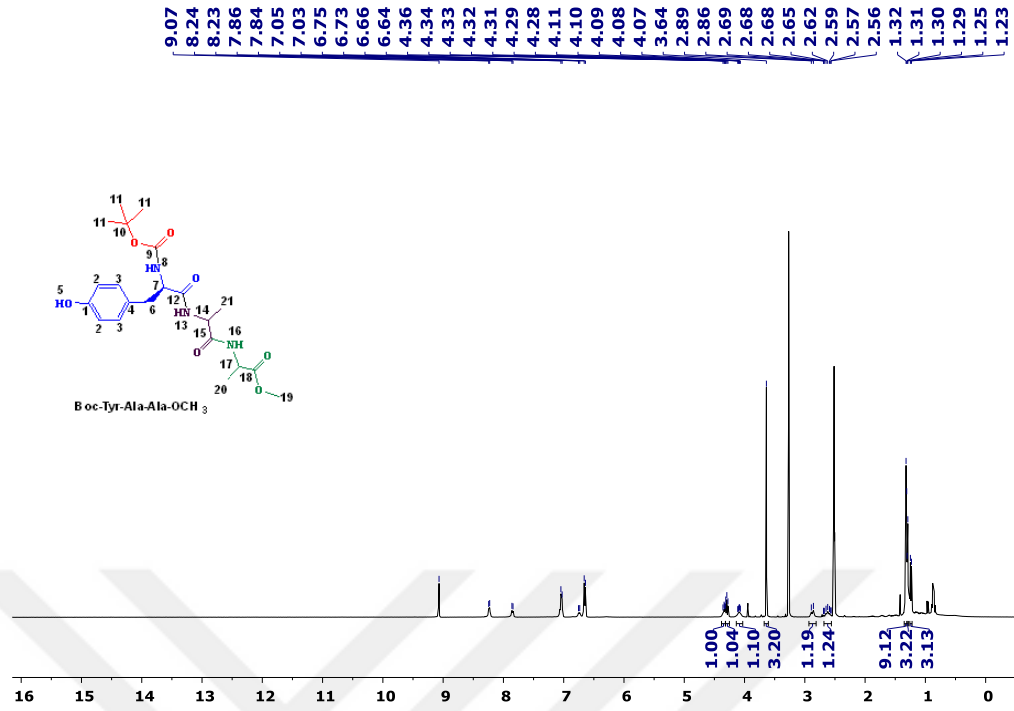
Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ bileşiğine ait FT-IR sepektrumu ve dataları sırasıyla Şekil 4.19 ve Tablo 4.6’da verilmiştir. **Boc-Tyr-Gly-OH** 12.61 ppm deki 1 protonluk singlet –CO-OH grubuna ait pik **Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** bileşiğinin ¹H-NMR’ında görülmemektedir (Şekil 4.20). Ayrıca oluşan tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 3.64 ppm’de 3 protonluk singlet -OCH₃ piki görülmektedir. Yine Ala-OCH₃ amino asidinin bağlanması ile yapıda 7.84 ppm de üçüncü bir –NH protonun varlığı görülmektedir. Benzer şekilde amino asidinin bağlanması ile 4.26-4.36 ppm’de –CH ve 1.29-1.31 ppm de 3 protonluk –CH₃ pikleri de tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunun göstermektedir. Benzer durumlar ¹³C-APT NMR spektrumunda da yukarıda bahsedilen protonların karbon piklerinde de söz konusudur. Benzer şekilde 52.32 ppm deki -OCH₃ ester karbon piki de **Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda görülmektedir (Şekil 4.21).

4.3.2.3. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Tripeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

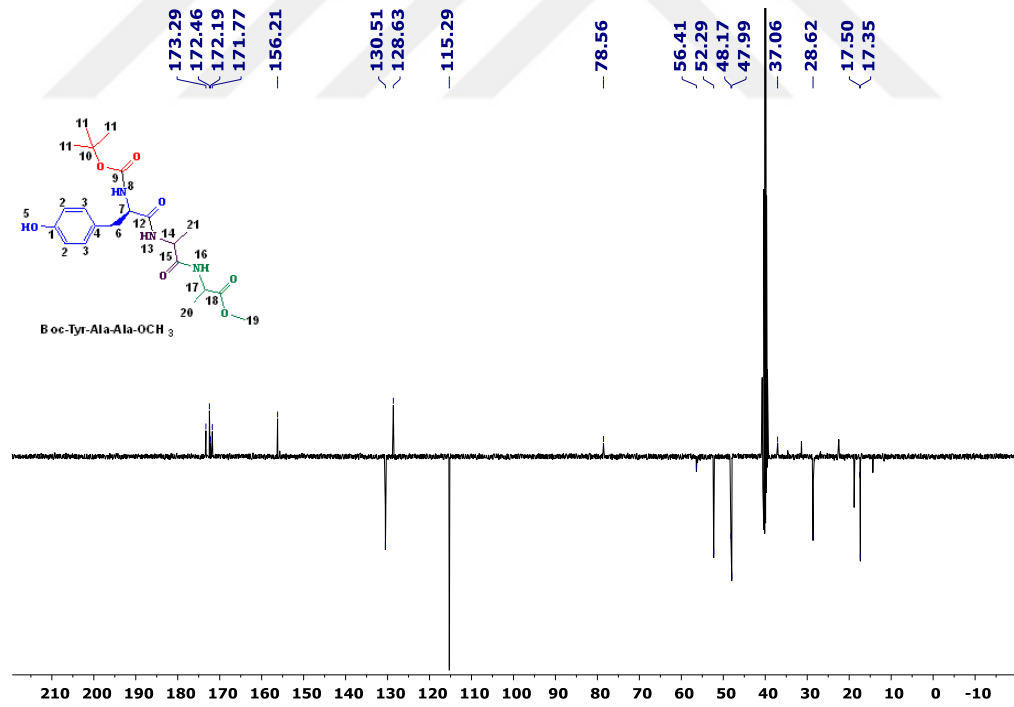
1.56 g (4.43 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Ala-OH**, 0.85 g (4,87 mmol, 1,1 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)**, ve 0.62 g (4.43 mmol, 1 Eq.) **Alanin metil ester hidroklorür (Ala-OCH₃)** ve 1.12 g (11.07 mmol, 1.22 μ L, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM). Verim: %47. **Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşimine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H ve ¹³C-APT NMR sırasıyla Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Tablo 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.23. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.24. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

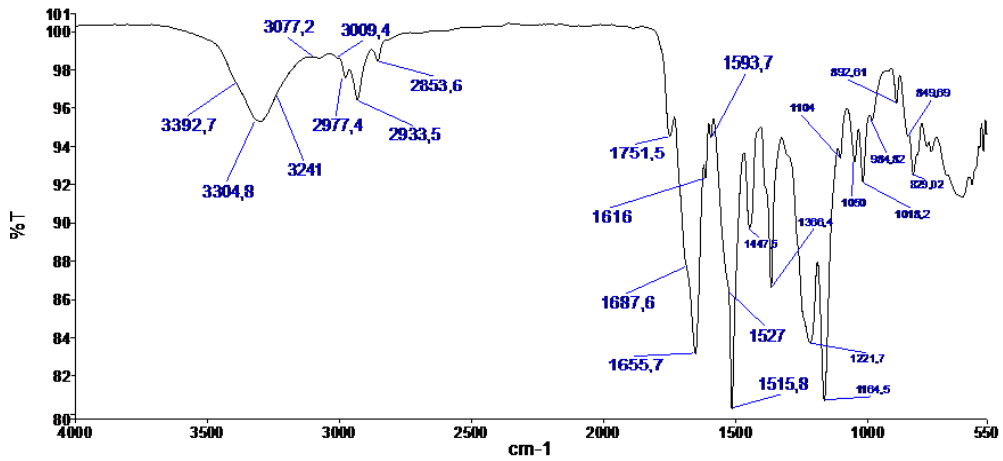
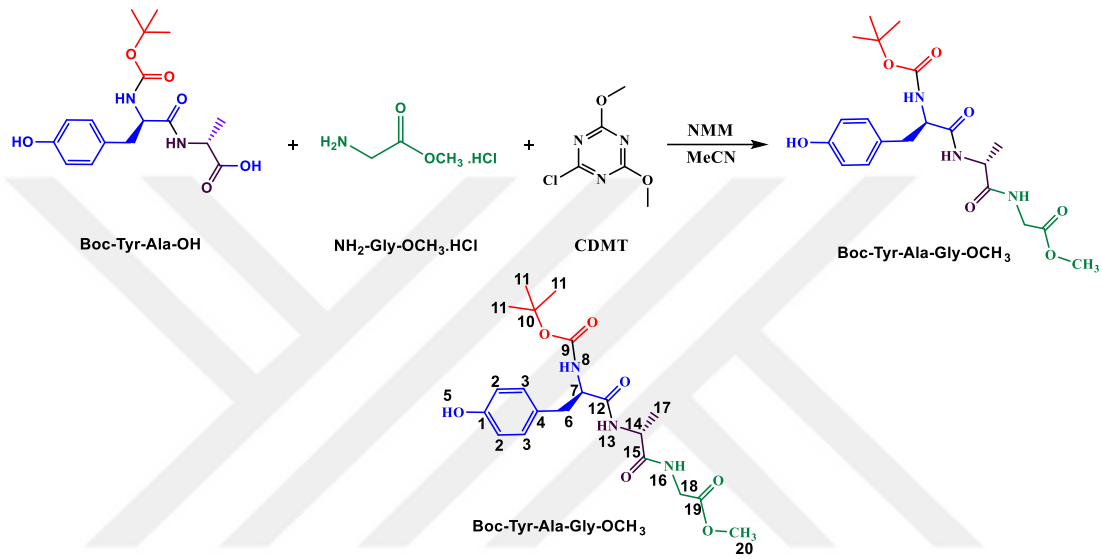
Tablo 4.7. Boc-Tyr-Ala-Ala-CH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3218, 3295 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3075, 2933, 2953, 2979 VC=C 1515, 1541, 1595 VC=O 1616, 1650, 1686, 1741	1.23-1.25 (3H, H ²⁰) 1.29-1.31 (3H, H ²¹) 1.32 (9H, s, H ¹¹), 2.56-2.65 (1H, H ⁶), 2.86-2.89 (1H, H ⁶), 3.64 (3H, s, H ¹⁹), 4.07-4.11 (1H, m, H ¹⁴), 4.28-4.31 (1H, m, H ¹⁷) 4.32-4.36(1H, m, H ⁷) 6.64-6.66 (2H, d, J=8.4 Hz, H ²), 6.73-6.75 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 7.84-7.86 (1H, H ¹⁶ (-NH)), 8.23-8.24 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.07 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)),	155.74 C ¹ , 078.56 C ¹⁰ , 115.29 C ² , 028.62 C ¹¹ , 130.51 C ³ , 171.77 C ¹² , 128.63 C ⁴ , 048.17 C ¹⁷ , 037.06 C ⁶ , 172.46 C ¹⁵ , 056.41 C ⁷ , 173.29 C ¹⁸ 156.21 C ⁹ , 052.29 C ¹⁹ 017.50 C ²¹ , 017.35 C ²⁰ 047.99 C ¹⁴
		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 39 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw Teorik : 437.49 g/mol Deneysel	C₂₁H₃₁N₃O₇ (Mw: 437.49 g/mol) Teorik : C, 57.65; H, 7.14; N, 9.60 Deneysel : C, 57.61; H, 7.18; N, 9.64	

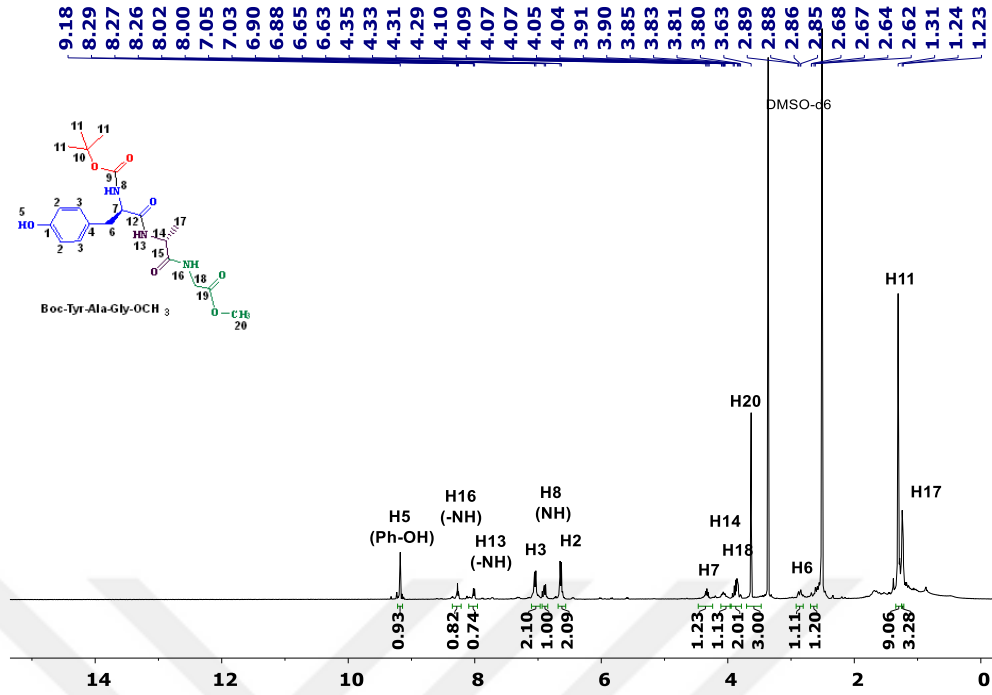
Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ bileşiğine ait FT-IR sepektrumu ve dataları sırasıyla Şekil 4.22 ve Tablo 4.7’de verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-OH** bileşiğine ait 12.58 ppm deki 1 protonluk singlet **-CO-OH** grubuna ait pik **Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin ¹H-NMR’ında görülmemektedir. Ayrıca oluşan tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 3.64 ppm’de 3 protonluk singlet **-OCH₃** piki görülmektedir. Yine **Ala-OCH₃** amino asidinin bağlanması ile yapıda 7.84-7.86 (1H, d, H¹⁶ (-NH)) ppm de üçüncü bir -NH protonun varlığı görülmektedir. Benzer şekilde Alanin amino asidinin bağlanması ile 4.28-4.31 (1H, m, H¹⁷), ppm’de -CH ve 1.23-1.25 (3H, d, H²⁰), ppm de 3 protonluk -CH₃ pikleri de tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda Şekil 4.23’de görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunun göstermektedir. Benzer durumlar ¹³C-APT NMR spektrumunda da yukarıda bahsedilen protonların karbon piklerinde de söz konusudur. Benzer şekilde 52.29 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki, 48.17 ppm’de -CH (C¹⁷) ve 17.35 ppm’de -CH₃ (C²⁰) karbonları **Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda Şekil 4.24’de görülmektedir.

4.3.2.4. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Tripeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

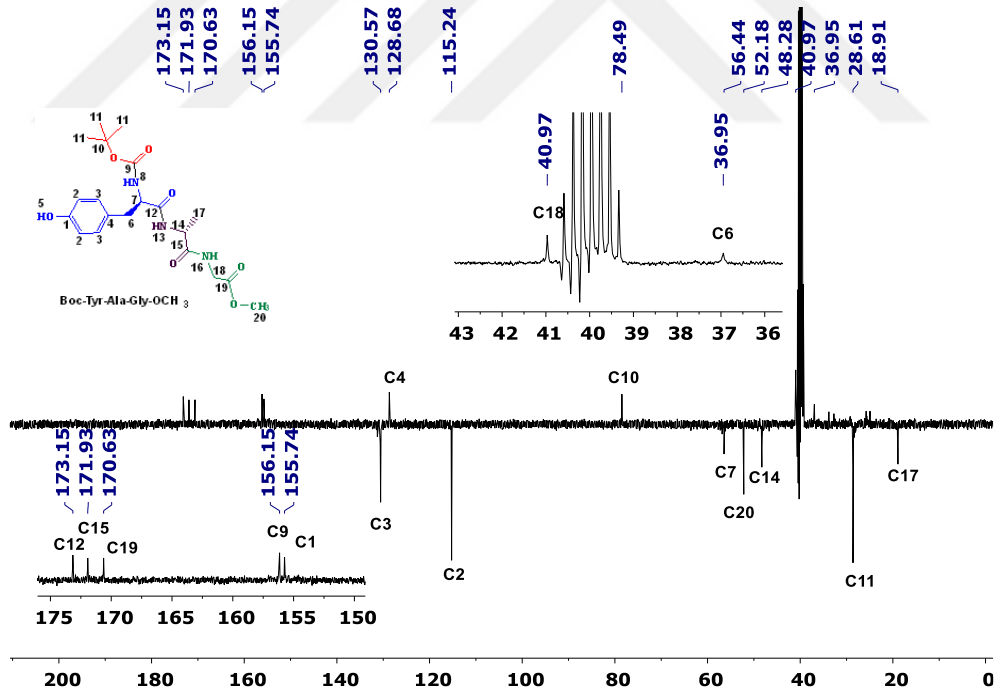
480 mg (1.36 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Ala-OH**, 1.50 mmol (1.1 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)** ve 1.36 mmol (1 Eq.) **Glisin metil ester hidroklorür (Gly-OCH₃)** ve 344,45 mg (3.41 mmol, 374.40 µL, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM). Verim: %55. **Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H ve ¹³C-APT NMR sırasıyla Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Tablo 4.8’de verilmiştir.



Şekil 4.25. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.26. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.27. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

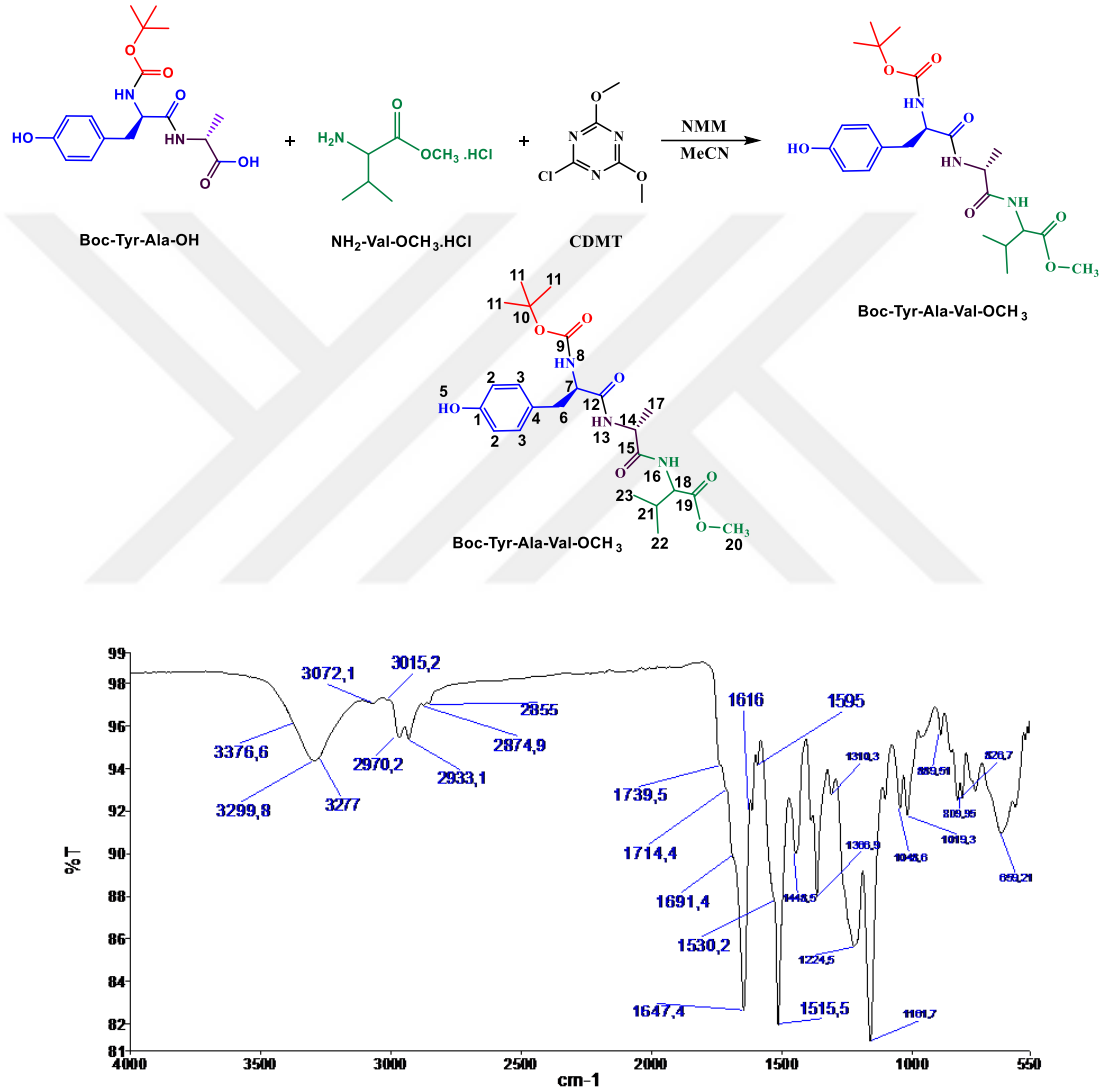
Tablo 4.8. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C-APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3241, 3304, 3392 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3009, 3077 2853, 2933, 2977 VC=C 1515, 1527, 1593, 1616 VC=O 1655, 1687, 1751 (C=O)	1.23-1.24 (3H, d, H ¹⁷), 1.31 (9H, s, H ¹¹), 2.62-2.68 ve 2.85-2.89 (2H, H ⁶), 3.63 (3H, s, H ²⁰), 3.80-3.91 (2H, H ¹⁸) 4.04-4.10 (1H, H ¹⁴), 4.29-4.35 (1H, H ⁷), 6.63-6.65 (2H, d, J= 8.4 Hz, H ²), 6.88-6.90 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 8.26-8.29 (1H, t, H ¹⁶ (-NH)), 8.00-8.02 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.18 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH))	155.74 C ¹ , 028.61 C ¹¹ , 115.24 C ² , 173.15 C ¹² , 130.57 C ³ , 048.28 C ¹⁴ , 128.68 C ⁴ , 171.93 C ¹⁵ , 036.95 C ⁶ , 018.91 C ¹⁷ , 056.44 C ⁷ , 040.97 C ¹⁸ , 156.15 C ⁹ , 170.63 C ¹⁹ , 078.49 C ¹⁰ , 052.18 C ²⁰ , DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 423.47 g/mol Deneysel [M] :	C₂₇H₃₅N₃O₇ (Mw: 423.47 g/mol) Teorik : C, 56.73; H, 6.90; N, 9.92 Deneysel : C, 56.77; H, 6.96; N, 9.95	

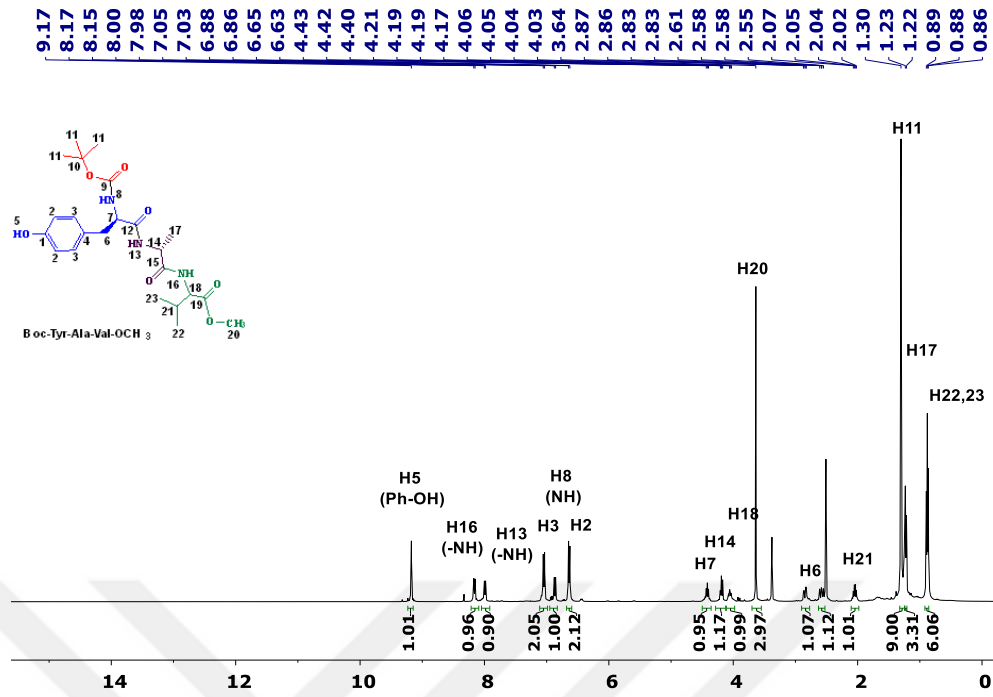
Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ bileşiğinin FT-IR spektrumu ve dataları sırasıyla Şekil 4.25 ve Tablo 4.8’de verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-OH** bileşiğine ait 12.58 ppm deki 1 protonluk singlet **-CO-OH** grubuna ait pik **Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃** bileşiğinin ¹H-NMR’ında görülmemektedir. Ayrıca oluşan tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 3.63 ppm’de 3 protonluk singlet **-OCH₃** piki görülmektedir. Yine **Gly-OCH₃** amino asidinin bağlanması ile yapıda 8.26-8.29 (1H, d, H¹⁶ (-NH)) ppm de üçüncü bir -NH protonunun varlığı görülmektedir. Benzer şekilde Glisin amino asidinin bağlanması ile 3.80-3.91 (2H, H¹⁸) ppm’de 2 protonluk -CH₂ pikleri de tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda görülmektedir (Şekil 4.26). İntegral yüksekliklerinin uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunun göstermektedir. Benzer durumlar ¹³C-APT NMR spektrumunda da yukarıda bahsedilen protonların karbon piklerinde de söz konusudur. Benzer şekilde 52.18 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki, 40.97 ppm’de -CH₂ (C¹⁸) karbonları **Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃** bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda Şekil 4.27’de görülmektedir.

4.3.2.5. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Tripeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

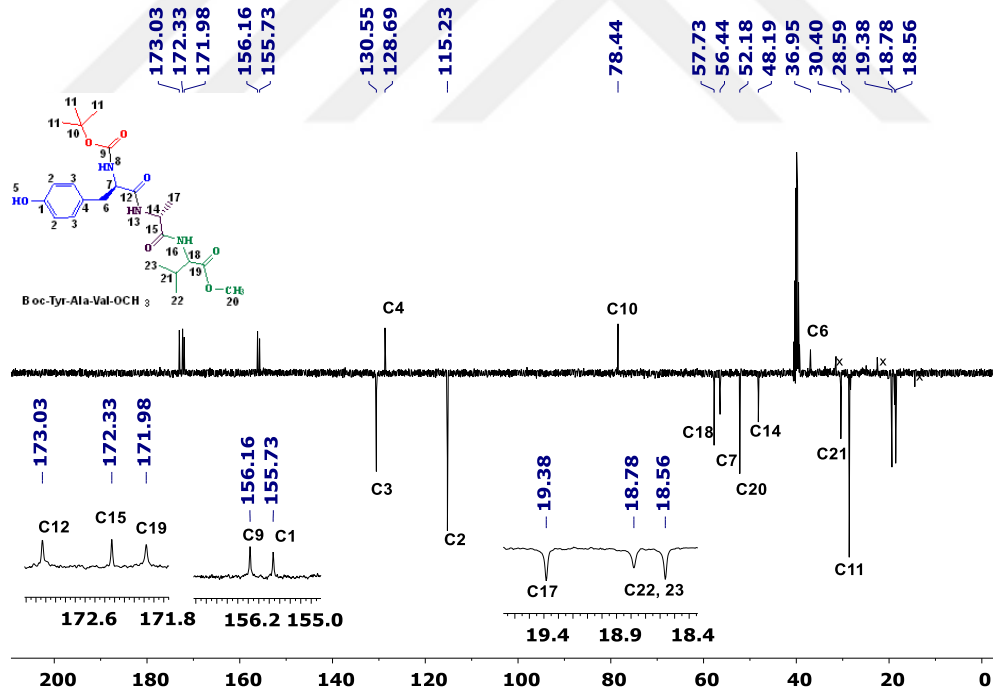
480 mg (1.36 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Ala-OH**, 1.50 mmol (1.1 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)** ve 1.36 mmol (1 Eq.) **Valin metil ester hidroklorür (Val-OCH₃)** ve 344,45 mg (3.41 mmol, 374.40 µL, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM). Verim: %60. **Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H ve ¹³C-APT NMR sırasıyla Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30 ve Tablo 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.28. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.29. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.30. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)

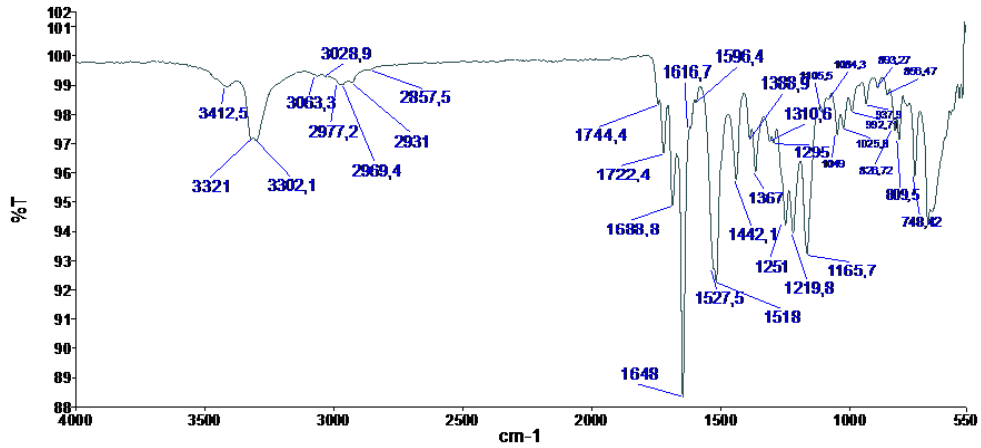
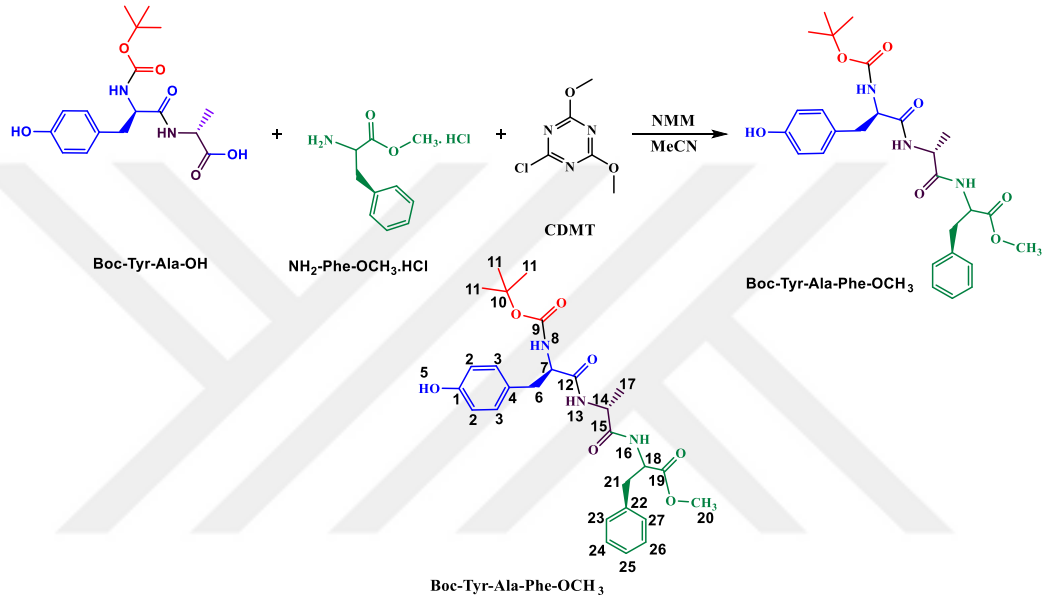
Tablo 4.9. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ bileşiminin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3277, 3299, 3376	0.86-0.89 (6H, H ^{22,23}) 1.22-1.23 (3H, d, H ¹⁷), 1.30 (9H, s, H ¹¹), 2.62-2.68 ve 2.85-2.89 (1H, m, H ²¹), 2.02-2.07 (1H, m, H ²¹), 2.55-2.61 ve 2.83-2.87 (2H, H ⁶), 3.64 (3H, s, H ²⁰), 4.03-4-08 (1H, H ¹⁸) 4.17-4.21 (1H, H ¹⁴), 4.3-4.35 (1H, H ⁷), 6.63-6.65 (2H, d, J= 8.4 Hz, H ²), 6.86-6.88 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 7.98-8.00 (1H, d, H ¹⁶ (-NH)), 8.15-8.17 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.17 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)),	155.73 C ¹ , 048.19 C ¹⁴ , 115.23 C ² , 172.33 C ¹⁵ , 130.55 C ³ , 019.38 C ¹⁷ , 128.69 C ⁴ , 057.73 C ¹⁸ , 036.95 C ⁶ , 171.98 C ¹⁹ , 056.44 C ⁷ , 052.18 C ²⁰ , 156.16 C ⁹ , 030.40 C ²¹ , 078.44 C ¹⁰ , 018.78 C ²² , 028.59 C ¹¹ , 018.56 C ²³ , 173.03 C ¹² ,
VC-H(Alifatik) 3015, 3072		DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
VC-H(Aromatik), 2855, 2874, 2933, 2970		
VC=C 1515, 1530, 1595, 1616		
VC=O 1647, 1691, 1714, 1739 (C=O)		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 465.55 g/mol	C₂₃H₃₅N₃O₇ (Mw: 465.55 g/mol) Teorik : C, 56.34; H, 7.58; N, 9.03 Deneyisel : C, 56.38; H, 7.63; N, 8.99	

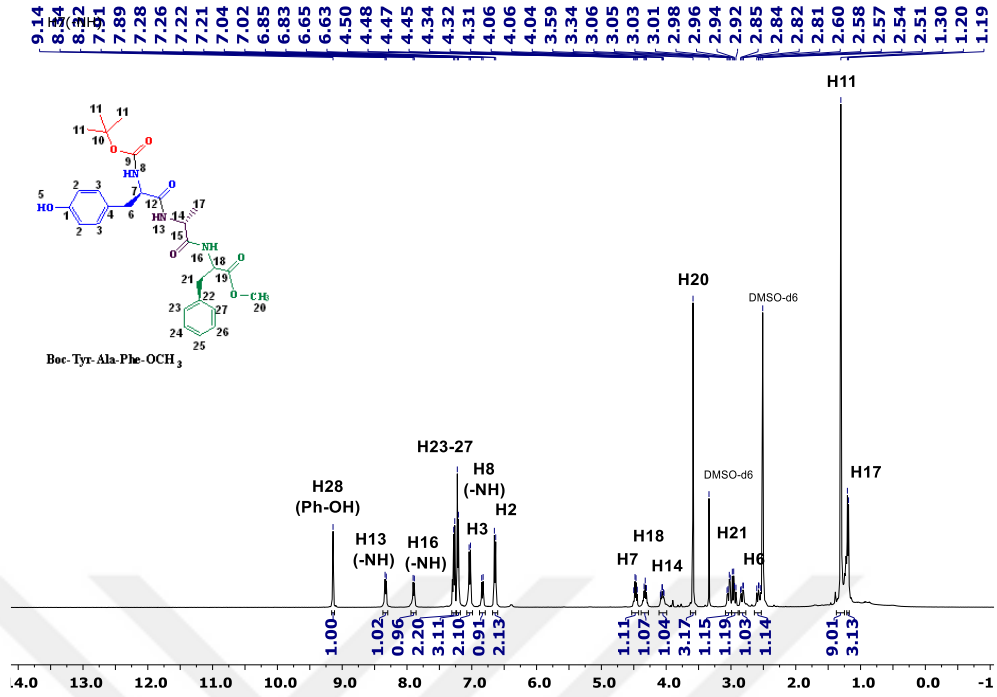
Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ bileşiminin FT-IR spektrumu ve analiz data sonuçları sırasıyla Şekil 4.28 ve Tablo 4.9’da verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-OH** bileşiğine ait 12.58 ppm deki 1 protonluk singlet **-CO-OH** grubuna ait pik **Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃** bileşiminin ¹H-NMR’ında görülmemektedir. Ayrıca oluşan tripeptit bileşiminin ¹H-NMR spektrumunda 3.64 ppm’de 3 protonluk singlet **-OCH₃** piki görülmektedir. Yine **Val-OCH₃** amino asidinin bağlanması ile yapıda 7.98-8.00 (1H, d, H¹⁶ (-NH)) ppm de üçüncü bir -NH protonunun varlığı görülmektedir. Benzer şekilde Valin amino asidinin bağlanması ile 4.03-4-08 (1H, H¹⁸) ppm’de ve 2.02-2.07 (1H, m, H²¹) 1 protonluk -CH, 0.86-0.89 (6H, H^{22,23}) ppm’de 3 protonluk eş değer iki karbon atomuna ait -CH₃ pikleri de tripeptit bileşiminin ¹H-NMR spektrumunda Şekil 4.29’da görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunu göstermektedir. Benzer durumlar ¹³C-APT NMR spektrumunda da yukarıda bahsedilen protonların karbon piklerinde de söz konusudur. Benzer şekilde 52.18 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki, 57.73 ppm’de -CH (C¹⁸), 30.40 -CH (C²¹), 18.78 ppm de -CH₃ (C²²) ve 18.56 ppm’de -CH (C²³) karbonları **Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃** bileşiminin ¹³C-APT NMR spektrumunda Şekil 4.30’da görülmektedir.

4.3.2.6. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Tripeptit Bileşiminin Sentezi ve Karakterizasyonu

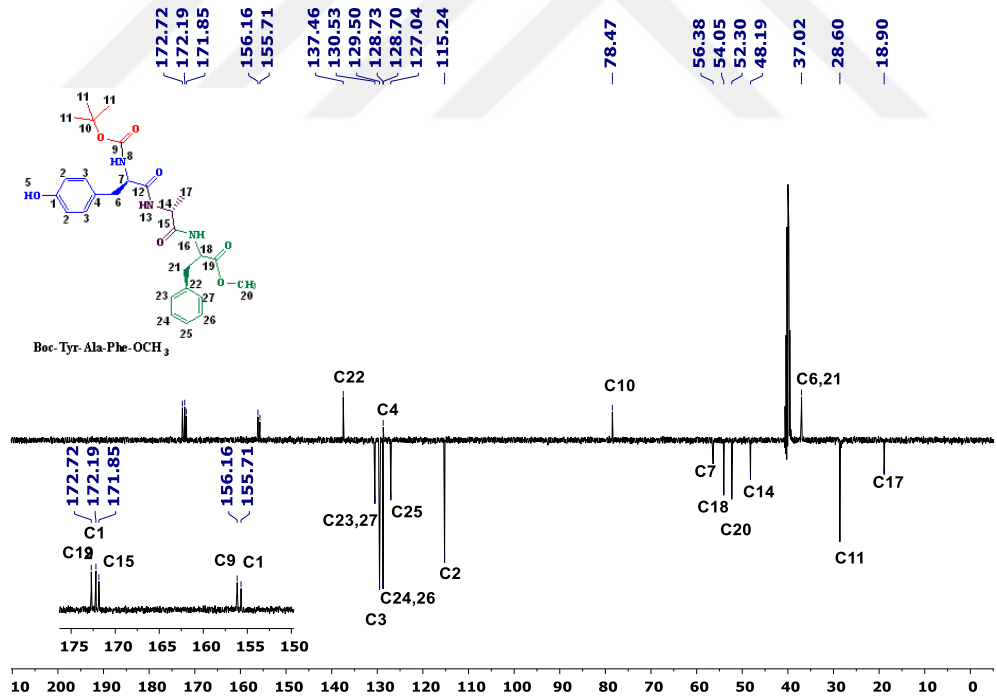
480 mg (1.36 mmol, 1 Eq.) **Boc-Tyr-Ala-OH**, 263.07 mg (1.50 mmol, 1.1 Eq.) **2-Kloro-4,6-dimetoksi-1,3,5-triazin (CDMT)** ve 293.78 mg (1.36 mmol, 1 Eq.) **Fenilalanin metil ester hidroklorür (Phe-OCH₃)** ve 344,45 mg (3.41 mmol, 374.40 µmL, 2.5 Eq.) 4-Metilmorfolin (NMM). Verim: 46. **Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃** bileşimine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.



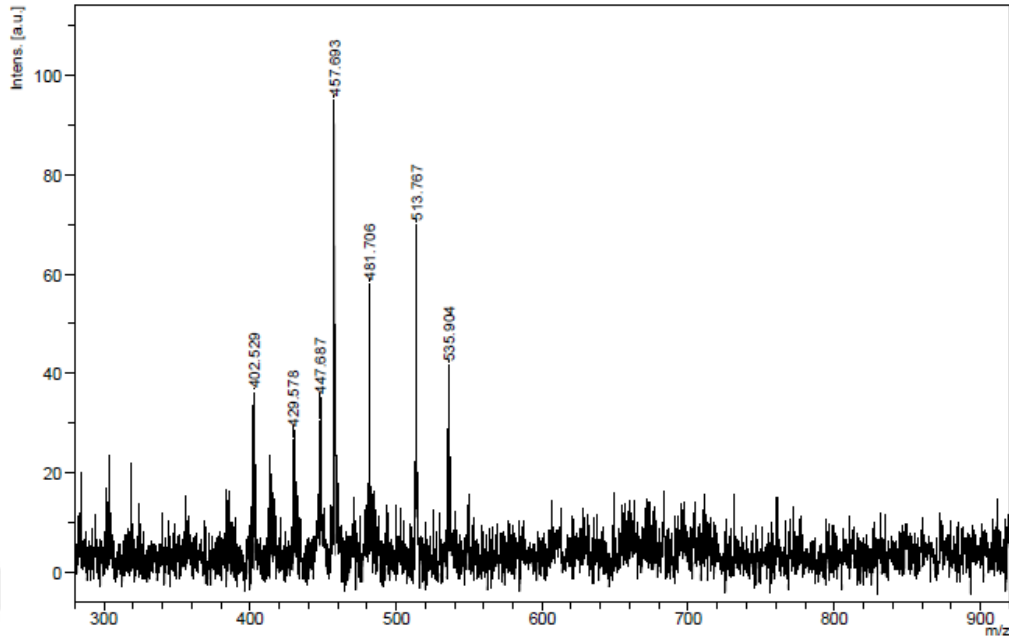
Şekil 4.31. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.32. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.33. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.34. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu

Tablo 4.10. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

FT-IR (cm ⁻¹)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
VN-H, VOH 3242, 3280, 3311, 3402 VC-H(Aromatik), 3062, 3092 VC-H(Alifatik) 2853, 2936, 2953, 2983 VC=C 1517, 1543, 1583 VC=O 1610 (Amid C=O) 1638 (Amid C=O) 1679 (Boc koruma grubuna ait C=O), 1743 (C=O)	1.19-1.20 (3H, d, H ¹⁷), 1.30 (9H, s, H ¹¹), 2.57-2.60 ve 2.81-2.85 (2H, H ⁶), 2.92-2.98 ve 3.01-3.06 (2H, H ²¹), 3.59 (3H, s, H ²⁰), 4.03-4.09 (1H, H ¹⁴) 4.31-4.34 (1H, H ¹⁸), 4.45-4.50 (1H, H ⁷), 6.63-6.65 (2H, d, J= 8.4 Hz, H ²), 6.83-6.85 (1H, d, H ⁸ (-NH)), 7.02-7.04 (2H, d, J=8.4 Hz, H ³), 7.21-7.28 (5H, m, H ²³⁻²⁷), 7.89-7.91 (1H, d, H ¹⁶ (-NH)), 8.32-8.34 (1H, d, H ¹³ (-NH)), 9.14 (1H, s, H ⁵ (-Ph-OH)),	155.71 C ¹ , 171.85 C ¹⁵ , 115.24 C ² , 018.90 C ¹⁷ , 129.50 C ³ , 054.05 C ¹⁸ , 128.70 C ⁴ , 172.72 C ¹⁹ , 037.02 C ⁶ , 052.30 C ²⁰ , 056.38 C ⁷ , 037.02 C ²¹ , 156.16 C ⁹ , 137.46 C ²² , 078.47 C ¹⁰ , 130.53 C ^{23,27} , 028.60 C ¹¹ , 128.73 C ^{24,26} , 172.19 C ¹² , 127.04 C ²⁵ , 048.19 C ¹⁴ , DMSO-d₆ ¹³C –APT : 39 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.36
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Teorik Mw : 513,59 g/mol Deneysel [M] : 513.767 m/z [M+Na] : 535.904 m/z	C₂₇H₃₅N₃O₇ (Mw: 513.59 g/mol) Teorik : C, 63.14; H, 6.87; N, 8.18 Deneysel : C, 63.21; H, 6.93; N, 8.14	

Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ bileşiğinin FT-IR spektrumu ve analiz dataları sırasıyla Şekil 4.31 ve Tablo 4.10'da verilmiştir. Boc-Tyr-Ala-OH bileşiğine ait 12.58 ppm'deki 1 protonluk singlet –CO-OH grubuna ait pik Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ bileşiğinin ¹H-NMR'ında Şekil 4.32'de görülmektedir. Ayrıca oluşan tripeptit bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda 3.59 ppm'de 3 protonluk singlet -OCH₃ piki görülmektedir. Yine Phe-OCH₃ amino asidinin bağlanması ile

yapıda 7.89-7.91 ppm de üçüncü bir –NH protonu görülmektedir. **Phe-OCH₃** yapısındaki aromatik pikler de 7.21-7.28 ppm de (5H, m, H²³⁻²⁷) görülmektedir. **Phe-OCH₃** yapısındaki alifatik-CH₂ (H²¹) grubunun proton pikleri sırasıyla 2.92-2.98 ve 3.01-3.06 ppm’de (2H, H²¹) ve –CH (H¹⁸) grubuna ait protonun piki 4.31-4.34 ppm’de (1H, H¹⁸) görülmektedir. Aynı grupların karbon pikleri de sırasıyla 37.02 ve 54.05 ppm’de görülmektedir. 52.30 ppm deki **-OCH₃** ester karbon piki de **Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃** bileşiğinin ¹³C-APT NMR spektrumunda Şekil 4.33’de görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin ve karbon piklerinin yapı ile uyumu ve beklenen piklerin gözlenmesi yapının oluştuğunu göstermektedir.

Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **513.59 g/mol** dür. MALDI-TOF MS spektrumunda Şekil 4.34’de 513.767 [M], 535.904 [M+Na] karşılık gelmektedir. Bu piklerin altında gözlenen pikler tripeptitin yapısından ayrılan gruplardan kaynaklanmaktadır. 481.706 ester grubunun –OCH₃’ünün ayılmasına karşılık gelmektedir [M-OCH₃]. 457.693 Boc grubunun yapısındaki –C(CH₃)₃ grubunun ayrılmasına karşılık gelmektedir [M-C(CH₃)₃]. 447.687 yapıdan fenilalanin kısmının fenil grubunun ayrılmasına karşılık gelmektedir [M-Ph-4H]. 429.538 yapıdan yapıdan Boc grubunun ayrılmasına karşılık gelmektedir [M-Boc]. 402.529 Boc ve ester –CH₃ gruplarının yapıdan ayrılmasına karşılık gelmektedir [M-Boc-CH₃].

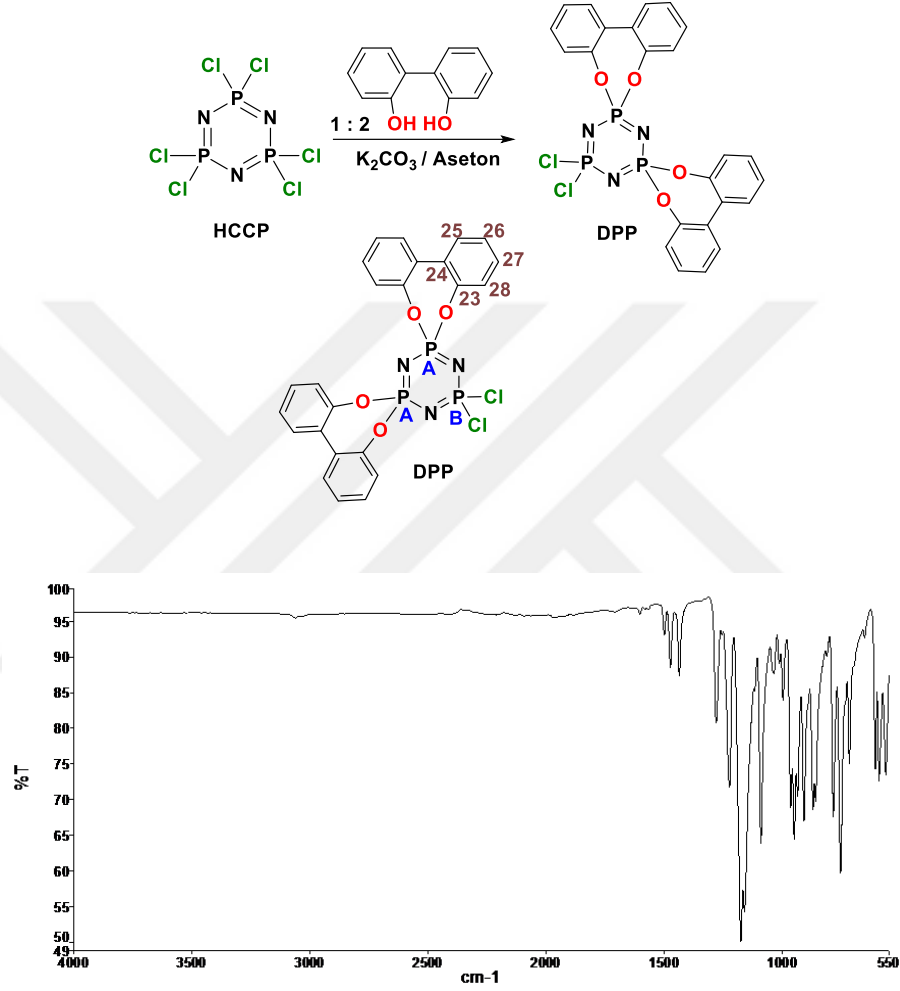
4.3.3. Tripeptit Sübstitüe Fosfazen Bileşiklerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Dioksibifenil grubu taşıyan dikloro spiro siklotrifosfazen bileşiği (**DPP**) heksaklorosiklotrifosfazenin (**HCCP**), bifenil-2,2’-diol ile 1:2 stokiyometrik oranlarda etkileştirilmesi ile literatürdeki yöntemle benzer yolla sentezlenerek karakterize edilmiştir [35]. Tez kapsamında sentezlenen 6 adet tripeptit bileşikleri **DPP** ile disüstitüe siklotrifosfazen bileşikleri başarılı bir şekilde sentezlendi. Ayrıntılı sentez yöntemleri **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinde verilmiştir. Diğer bileşiklerde benzer prosedür kullanılmıştır.

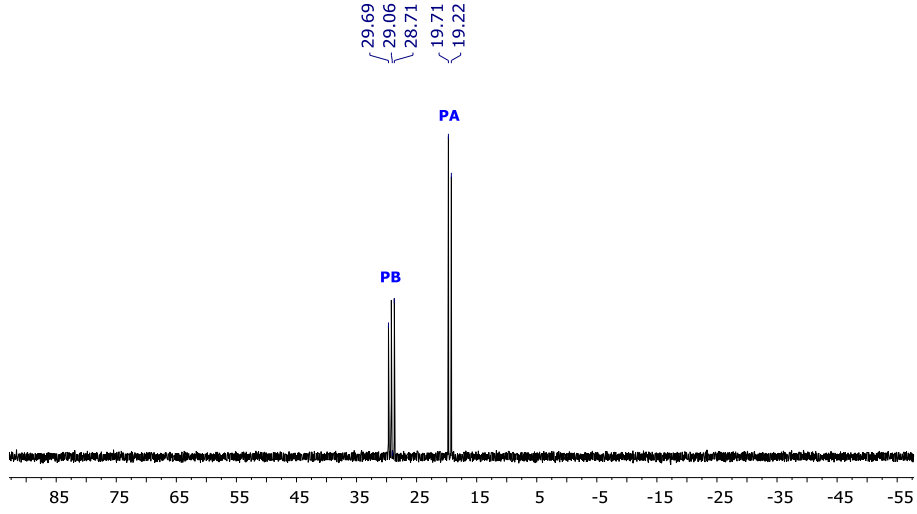
4.3.3.1. Başlangıç Bileşiği Dispirosiklotrifosfazen Bileşiğinin Sentezi ve Karakterizasyonu (**DPP**)

Argonlu havasız ortam reaksiyon sistemi hazırlandıktan sonra 144.80 mmol K₂CO₃ içerisinde 150 mL aseton bulunan üç ağızlı balona ilave edildi. Üzerine 57.49 mmol 2,2’-bifenol eklenerek reaksiyon ortamı buz ile 0 °C’ye soğutuldu. Karışım 5-10 dk. karıştırıldı ve 29.38 mmol heksaklorosiklotrifosfazen (**HCCP**) eklenerek reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon oda sıcaklığında ve argon atmosferinde 2 saat devam ettirilerek durduruldu. Reaksiyonun çözücüsü aseton dönerli buharlaştırıcı ile ortamdan vakum uygulanarak uzaklaştırıldı. Balon da kalan katı madde diklormetan ile ekstrakte (5*50 mL) edilerek alındı. Diklormetan döner buharlaştırıcı ile ortamdan

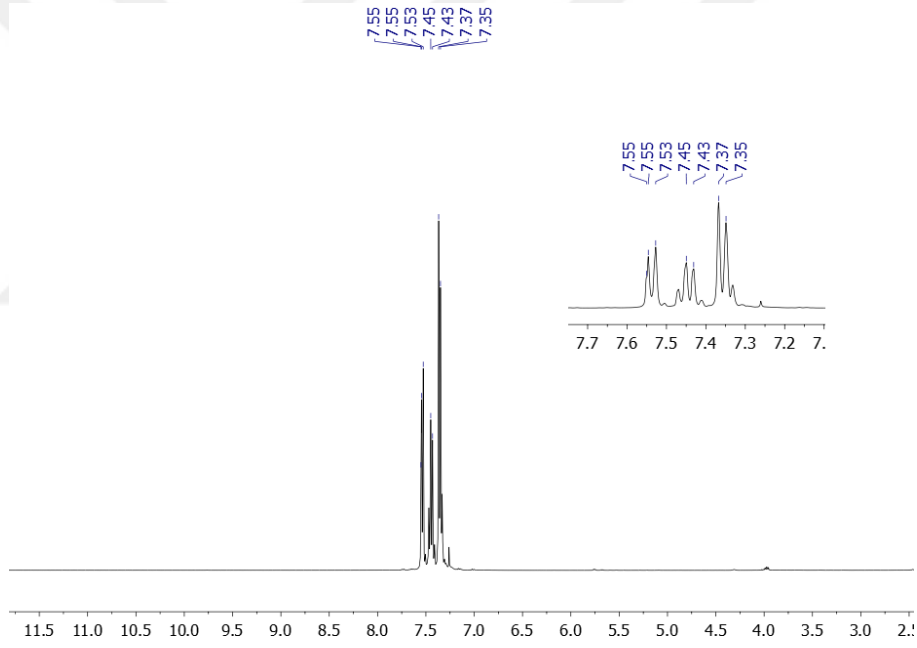
uzaklaştırılmasıyla beyaz katı madde elde edildi. **DPP** bileşiği asetonda kristallendirildikten sonra 14.32 g (**DPP**) bileşiği elde edildi (verim %85). Elde edilen **DPP** bileşiğinin ($C_{24}H_{16}O_4Cl_2N_3P_3$) molekül ağırlığı 574.23 g/mol'dür. DPP bileşiğinin FT-IR, ^{31}P , 1H , ^{13}C -NMR ve analiz verileri sırasıyla Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38 ve Tablo 4.11'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



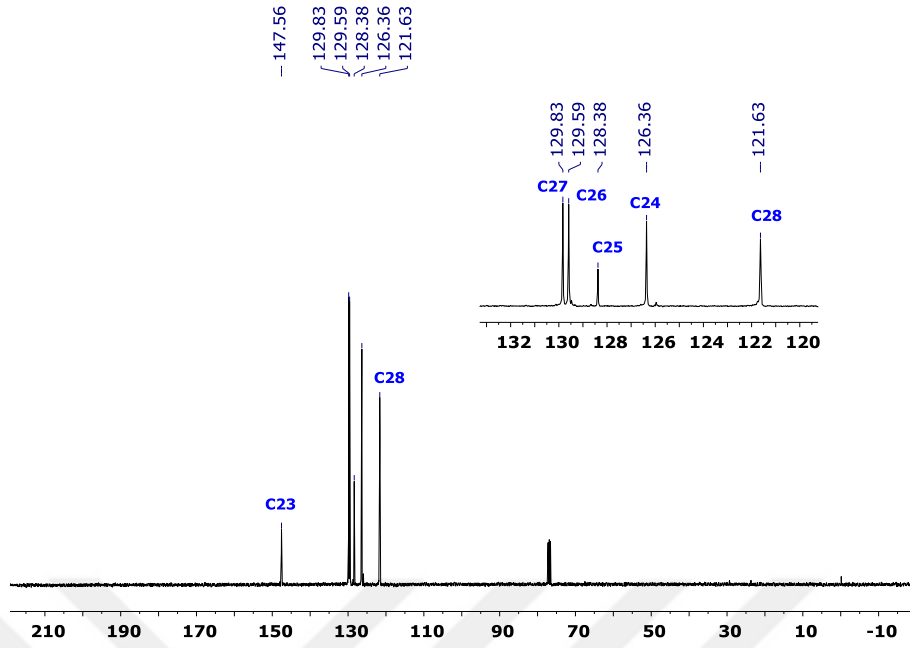
Şekil 4.35. DPP Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



Şekil 4.36. DPP Bileşiminin ^{31}P -NMR Spektrumu (Kloroform-d)



Şekil 4.37. DPP Bileşiminin ^1H -NMR Spektrumu (Kloroform-d)



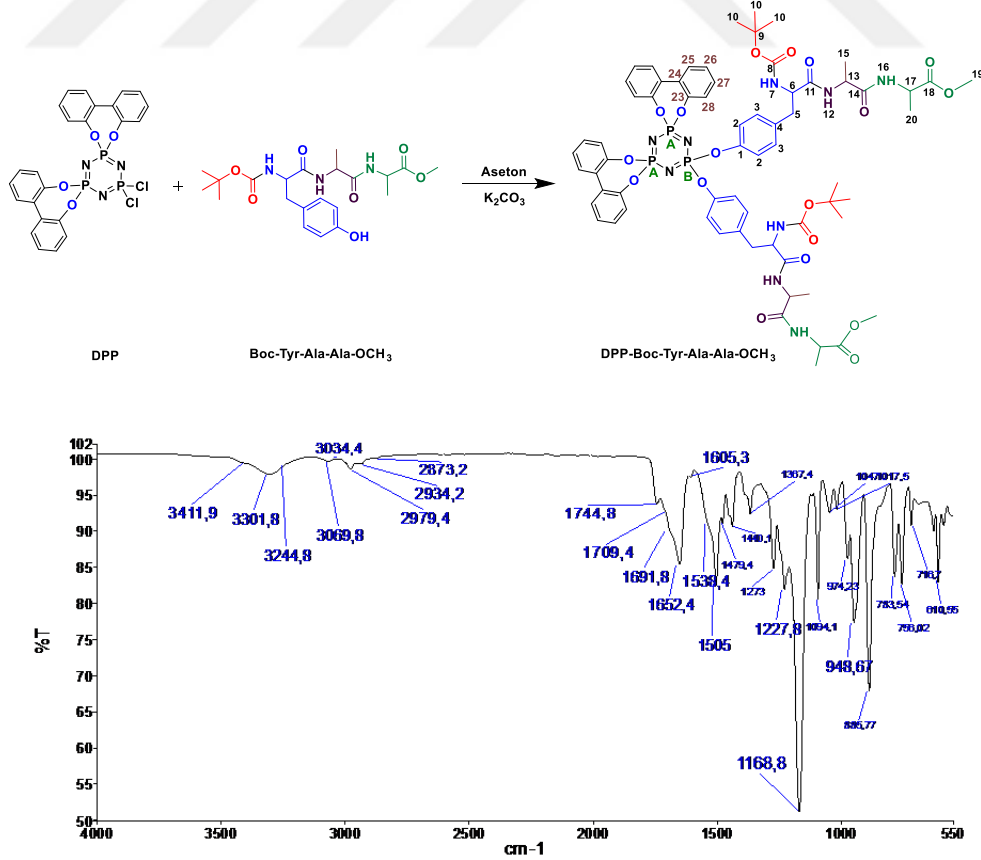
Şekil 4.38. DPP Bileşiğinin ^{13}C -NMR Spektrumu (Kloroform-d)

Tablo 4.11. DPP bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

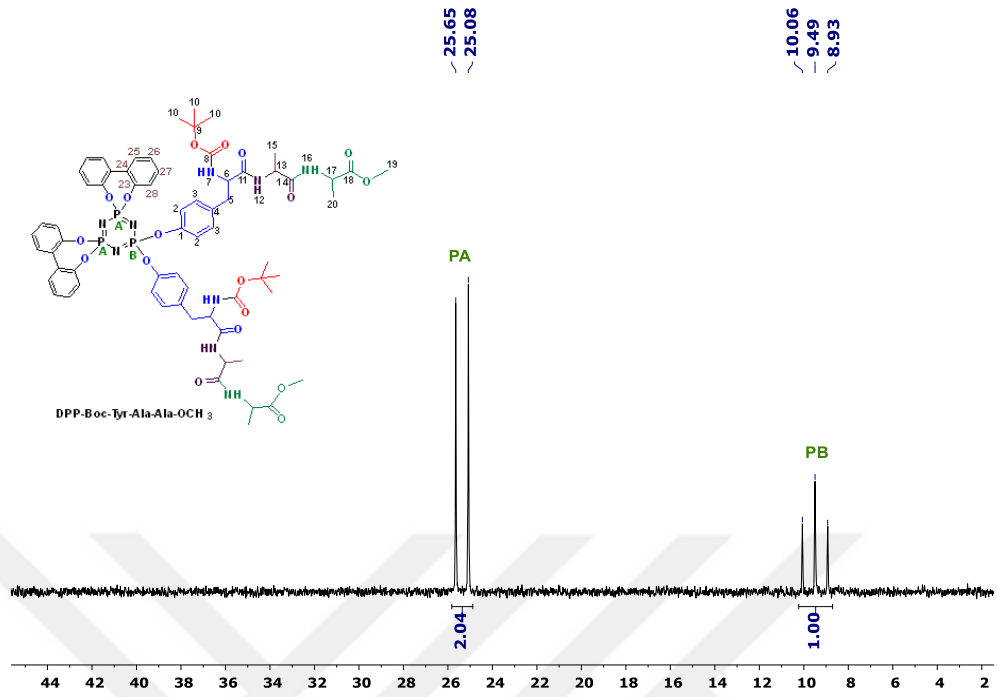
^{31}P -NMR (ppm)	^1H -NMR (ppm)	^{13}C –APT NMR (ppm)
28.71-29.69 (1P, t, $\text{PB}(\text{PCl}_2)$), 19.22-19.71 (2P, d, $\text{PA}(\text{P}(\text{O}_2\text{C}_{12}\text{H}_8))_2$), A ₂ X Spin Sistemi	7.35-7.55 (16H, m, C_{12}H_8), Kloroform-d ₁ : 7.29 ve 77 ppm	147.56 C ²³ , 126.36 C ²⁴ , 128.38 C ²⁵ , 129.59 C ²⁶ , 129.83 C ²⁷ , 121.63 C ²⁸
FT-IR (cm^{-1})	Elementel Analiz (%)	
VC-H(Aromatik) VC=C 3030, 3061, 1436, 1474, 1499 VP=N 1160, 1175, 1223, VP-O-C 949	$\text{N}_3\text{P}_3\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{C}_2\text{O}_4$ (Mw: 574.23 g/mol) Teorik : C, 50.20; H, 2.81; N, 7.32 DeneySEL : C, 50.23; H, 2.84; N, 7.36	

4.3.3.2. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Tripeptit bileşiminin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

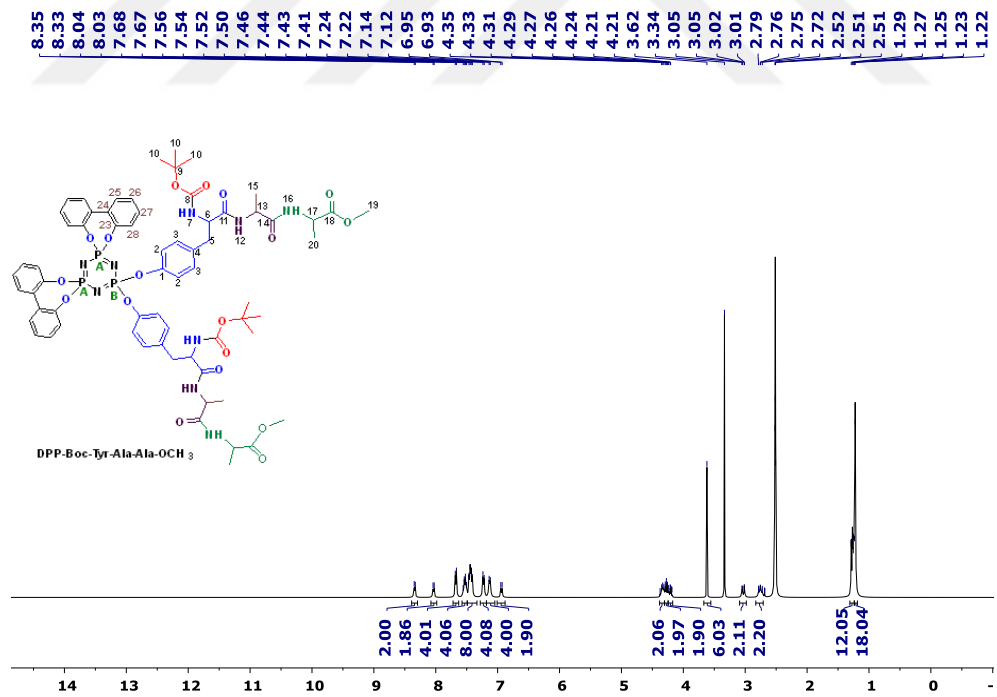
Argonlu havasız ortam reaksiyon balonu (100 mL) hazırlandıktan sonra içerisine 50 mL aseton ilave edildi. Üzerine 0.44 mmol (0.25 g) DPP eklendi ve çözünene kadar karıştırıldı. Daha sonra reaksiyon balonuna 1.52 mmol (0.21 g) K₂CO₃ ilave edildi ve 10 dk. karıştırıldı. Bu aşamanın ardından reaksiyon karışımına 1.31 mmol (0.57 g) Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ tripeptit bileşiği ilave edildi. Bu şekilde reaksiyon 5 dk. Karıştırıldı ve geri soğutucu altında ısıtıldı. Reaksiyon ince tabaka ile takip edildi ve yaklaşık 24 saat sonra durduruldu. Reaksiyon karışımı doğrudan içerisinde saf su bulunan 250 mL behere ilave edildi ve karıştırıldı. Bu sırada karışıma az miktarda tuz ilavesi yapıldı. Çöken katı madde süzülerek ayrıldı ve kurutuldu. Daha sonra ürün Etilasetat da çözüldü ve seyreltik HCl çözeltisi ve doymuş sodyumbikarbonat çözeltisi ile birer defa ekstraksiyon yapılarak MgSO₄ üzerinde kurutuldu. Etilasetat buharlaştırıldı. Ardından kloroform'da tekrar çözüldü ve n-hekzan içerisinde çöktürüldü. Çöken katı madde Flash kromatografisi (0% → 30% Etilasetat:Hekzan) ile saflaştırıldı. Verim: %62. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT, HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42, Şekil 4.43, Şekil 4.44 ve Tablo 4.12'de verilmiştir.



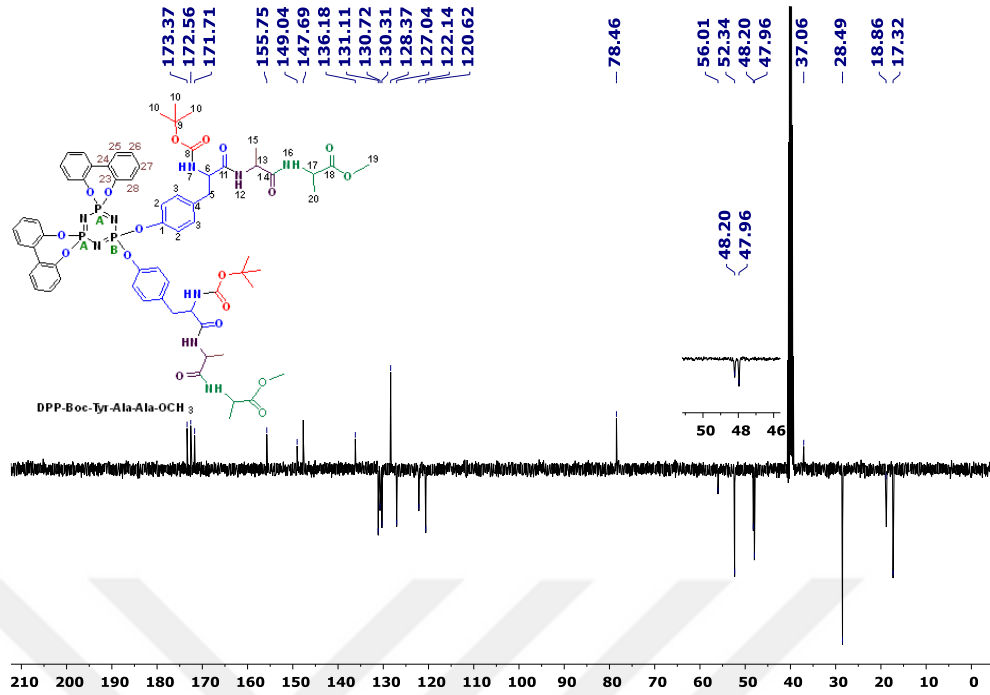
Şekil 4.39. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



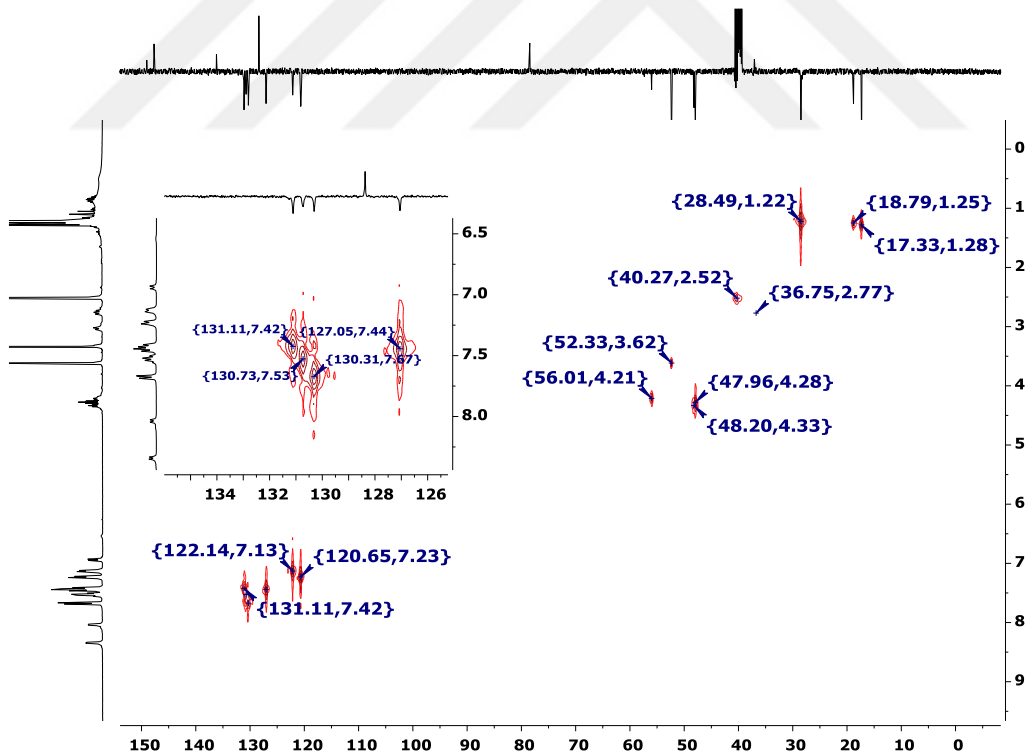
Şekil 4.40. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



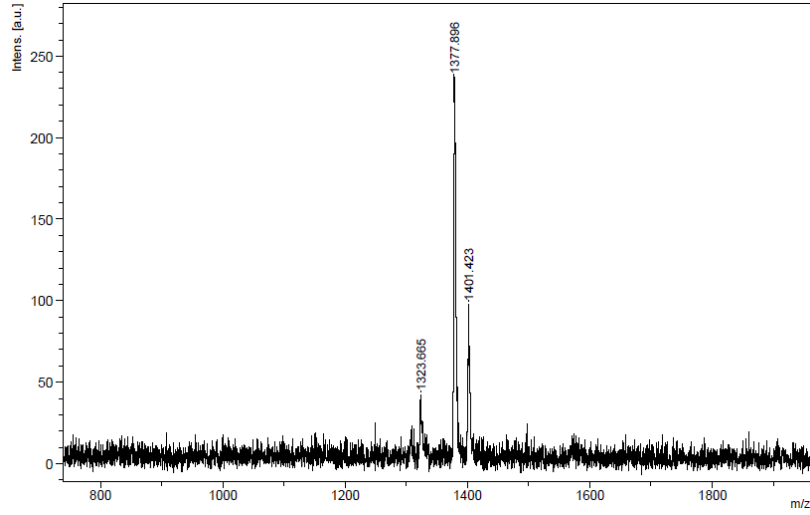
Şekil 4.41. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.42. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.43. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.44. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.12. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.08-25.65 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.93-10.06 (1P, t, PB((C ₂₁ H ₃₀ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	1.23 (18H, s, H ¹⁰), 1.25-1.29 (12H, m, H ¹⁵ , H ²⁰), 2.51-2.79 ve 3.01-3.05 (4H, m, H ⁵), 3.62 (6H, s, H ¹⁹), 4.18-4.21 (2H, m, H ⁶), 4.24-4.29 (2H, m, H ¹⁷), 4.31-4.37 (2H, m, H ¹³), 6.93-6.95 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.12-7.14 (4H, d, H ²⁸), 7.22-7.24 (4H, d, H ²), 7.41-7.46 (8H, m, H ³ , H ²⁶), 7.50-7.56 (4H, m, H ²⁷), 7.67-7.68 (4H, d, H ²⁵), 8.03-8.04 (2H, d, H ¹² (-NH)), 8.33-8.35 (2H, H ¹⁶ (-NH))	147.69 C ¹ , 028.49 C ¹⁰ , 120.62 C ² , 048.20 C ¹³ , 131.11 C ³ , 171.71 C ¹⁴ , 128.37 C ⁴ , 018.86 C ¹⁵ , 037.06 C ⁵ , 047.96 C ¹⁷ , 056.01 C ⁶ , 172.56 C ¹⁸ , 155.75 C ⁸ , 052.34 C ¹⁹ , 078.46 C ⁹ , 017.32 C ²⁰ , 173.37 C ¹¹ , 149.04 C ²³ , 136.18 C ²⁴ , 130.31 C ²⁵ , 127.04 C ²⁶ , 130.72 C ²⁷ , 122.14 C ²⁸
FT-IR (cm⁻¹)		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 40.14 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.24
VN-H, 3244, 3301, 3411 VC-H(Aromatik), 3034, 3069, VC-H(Alifatik) 2873, 2934, 2979 VC=C 1505, 1538, 1605 VC=O 1652, 1691, 1709, 1744 (C=O) VP=N, VP-O-Ph 1168, 1227 948		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1376.30 g/mol Deneyisel [M+Na+2H⁺] : 1401.423 m/z [M+H⁺] : 1377.896 m/z [M-(C(CH₃)₃)] : 1323.665 m/z	C₆₆H₇₆N₉O₁₈P₃ (Mw: 1376.30 g/mol) Teorik : C, 57.60; H, 5.57; N, 9.16 Deneyisel : C, 57.63; H, 5.61; N, 9.20	

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin (DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃) FT-IR spektrumunda yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.12’de verilmiştir. Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃

tripeptit bileşiğinin yapısında bulunan –OH gerilme titreşimlerinin **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin FT-IR spektrumunda Şekil 4.39’da gözlenmediği görülmektedir. Tripeptit bileşiğinin yapısında bulunan amit karbonilleri, -NH titreşimlerinde fosfazen bileşiğine ait spektrumda görülmektedir. P=N gerilme titreşimlerine ait olan pikler ise 1168 ve 1227 cm⁻¹’de görülmektedir. Yapının fosfazen halkasına bağlanması ile oluşan P-O-Ph bağına ait pik ise 948 cm⁻¹’de olduğu görülmektedir. Halkaya ait P=N gerilme titreşimlerinin **Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin reaksiyona girmesiyle düşük enerjiye kaydığı görülmektedir. Sübstitüentlerin bağlanması ile P=N bağı zayıflamıştır ve düşük enerjiye kayma olmuştur.

Genellikle aynı grupların bağlı olduğu fosfor atomları eşdeğerdir ve aynı kimyasal kayma değerinde sinyal vermektedir. Spektrumda bir ikili ve bir üçlü pikin görülmesi yapıda iki farklı fosfor atomunun olduğunun göstergesidir. İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A₂B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiğinin ³¹P-NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşiğindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen 28.71-29.69 ppm’deki pik (1P, t, PB(PCl₂)), tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 8.93-10.06 ppm’e (1P, t, PB((C₂₁H₃₀O₇N₃)₂)) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor pikide spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiğinde 19.22-19.71 ppm’den (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) tripeptitin halkaya bağlanması ile 25.08-25.65 ppm’e (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) kaymıştır. **DPP** bileşiğindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşiğin yani **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃**’ün Şekil 4.40’daki ³¹P-NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Ayrıca fosfazen halkasına bağlanan sübstitüentin etkisiyle fosfor piki yüksek alana kaymıştır. Bu fosfor atomu üzerinde elektron yoğunluğunun arttığı anlamına gelmektedir. Bu da fosfazen halkasına bağlanan sübstitüentin elektron çekmesi sonucu P=N bağındaki elektronların fosfor üzerinde yoğunlaşmasına neden olmasından kaynaklanmaktadır.

Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin yapısında olan ve spektrumunda 9.07 ppm deki 1H, singlet OH protonunun **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin Şekil 4.41’deki ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde gözlenmediği görülmektedir. Bağlanmanın meydana geldiğinin ilk kanıtıdır. **Tripeptit** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda gözlenen –NH protonları (6.73-6.95 (1H, d, H⁸ (-NH)), 7.84-7.86 (1H, d, H¹⁶ (-NH)), ve 8.23-8.24 (1H, d, H¹³ (-NH))), tirozin yapısından gelen aromatik protonlar (6.64-6.66 (2H, d, J=8.4 Hz, H²) ve 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H³)), metoksi protonları (3.64 (3H, s, H¹⁹)) ve tripeptit yapısındaki alifatik pikler (1.23-1.25 (3H, H²⁰), 1.29-1.31 (3H, H²¹), 1.32 (9H, s, H¹¹), 2.56-2.65 (1H, H⁵), 2.86-2.89 (1H, H⁶), 4.07-4.11 (1H, m, H¹⁴), 4.28-4.31 (1H, m, H¹⁷) ve 4.32-4.36(1H, m, H⁷) ppm’de gözlenmiştir. **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** fosfazen bileşiğinin oluşması ile bu pikler sırasıyla –NH protonları 6.93-6.95 (2H, d, H⁷ (-NH)), 8.03-8.04 (2H, d, H¹² (-NH)) ve 8.33-8.35 (2H, H¹⁶ (-NH)) tirozin yapısından gelen aromatik protonlar 7.22-7.24 (4H, d, H²), ve 7.41-7.46 (4H, m, H³), ppm’lerde, metoksi protonları

3.64 (6H, s, H²¹) ppm'de ve tripeptit yapısındaki alifatik proton pikleri 1.23 (18H, s, H¹⁰), 1.25-1.29 (12H, m, H¹⁵, H²⁰), 2.51-2.79 ve 3.01-3.05 (4H, m, H⁵), 4.18-4.21 (2H, m, H⁶), 4.24-4.29 (2H, m, H¹⁷), 4.31-4.37 (2H, m, H¹³) ppm'lere kaymıştır. **DPP** bileşiğinin yapısında bulunan 7.35-7.55 (16H, m, C₁₂H₈) ppm arasındaki bifenil grubuna ait aromatik protonlar ise 7.67-7.68 (4H, d, H²⁵), 7.41-7.46 (4H, m, H²⁶), 7.50-7.56 (4H, m, H²⁷) ve 7.12-7.14 (4H, d, H²⁸) ppm'lere kaymıştır. Bunun akabinde elde edilen integral yüksekliklerinin yapı ile uyumlu olması ve fosfor atomuna yakın protonlardaki değişimler yapının oluştuğunun göstergesidir.

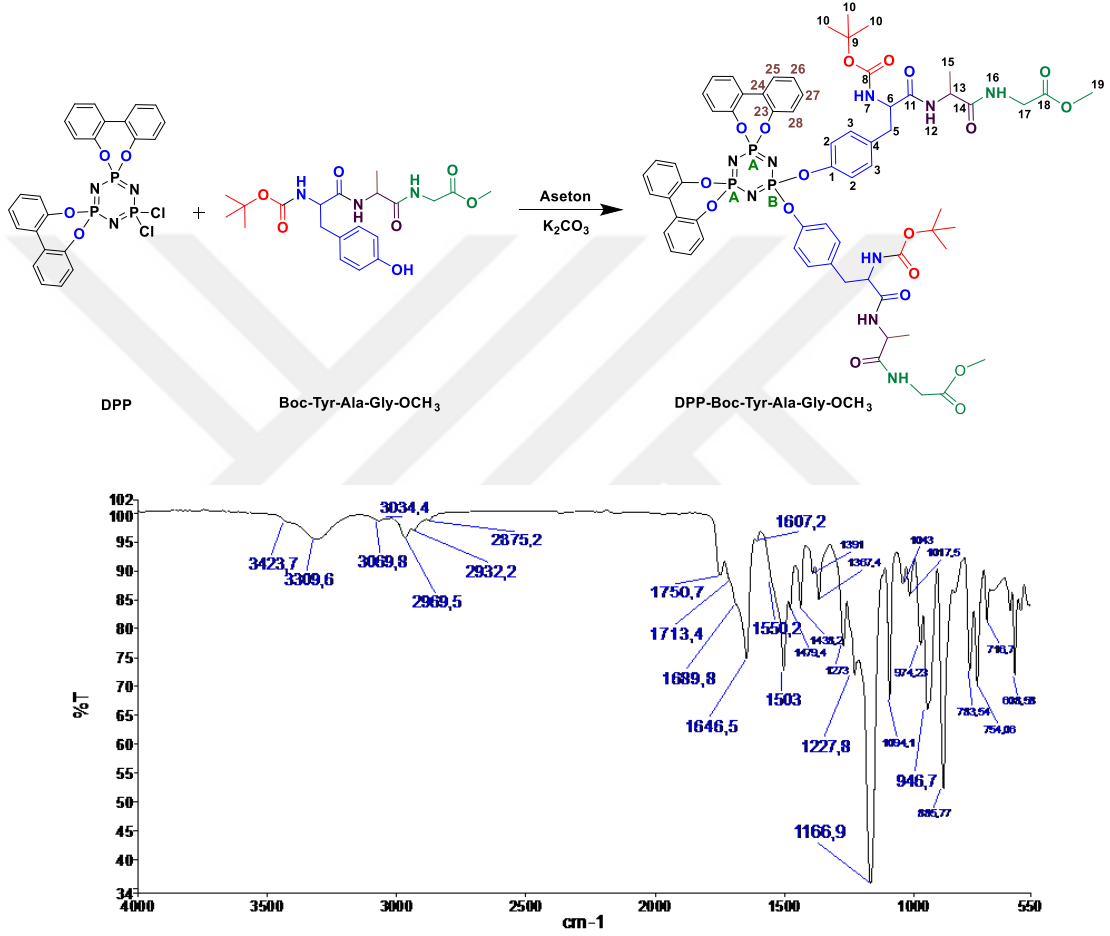
Tripeptit süstitü siklotrifosfazen bileşiğinin Şekil 4.42'deki ¹³C-APT NMR spektrumu incelendiğinde tripeptitin 155.74 ppm'de (C¹) OH-Ph grubundaki ipso karbonu fenol grubunun fosfor atomuna bağlanması ile birlikte oluşan P-O-Ph bağı sonucu ipso karbonu 147.69 ppm'e (C¹) kaymıştır. Bifenol bağlı olan **DPP** bileşiğinin yapısındaki aromatik ipso karbonları (147.56 C²³ ve 126.36 C²⁴), **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** bileşiğinin oluşması ile birlikte 149.04 (C²³) ve 136.18 (C²⁴) ppm'lere kaymıştır. Tripeptit bileşiğinin yapısındaki 156.21 (C⁹), 171.77 (C¹²), 172.46 (C¹⁵) ve 173.29 (C¹⁸) ppm'deki ester ve amit karbonil karbon pikleri, tripeptitin fosfazen halkasına bağlanması ile 155.75 (C⁸), 171.71 (C¹¹), 172.56 (C¹⁴) ve 173.37 (C¹⁸) ppm'e kaymıştır. Bu da yapının fosfazen halkasına bağlandıktan sonraki etkileşmeler ile değişimini göstermektedir. Bunun yanında alifatik -C-, -CH-, -CH₂-, -CH₃ ve -OCH₃ karbonları spektrumda 37.06 C⁵, 56.01 C⁶, 78.46 C⁹, 28.49 C¹⁰, 48.20 C¹³, 18.86 C¹⁵, 47.96 C¹⁷, 52.34 C¹⁹ ve 17.32 C²⁰ ppm'de görülmektedir. Bunların dışında diğer karbon atomlarında da etkileşmelerden dolayı az da olsa belirgin bir şekilde karbon piklerinde kaymaların gözlemlendiği görülmektedir. **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** Bileşiğinin yapısındaki 2, 3, 10 numaralı ve bifenol yapısındaki karbonlarda eşdeğer ve simetrik karbon atomlarında vardır.

HETCOR NMR spekturumu protonlu karbonların yerinin net olarak belirlenmesi ve yapının kanıtı için önemlidir. Bu sebeple tripeptit-fosfazen bileşiğinin Şekil 4.43'deki HETCOR spektrumu yapıdaki protonlu karbon atomlarına ait piklerin belirlenmesinde yararlanılmıştır. Yapı ile de bire bir uyumlu olduğu ¹H, ¹³C-APT ve HETCOR spektrumları birlikte incelendiğinde açıkça görülmektedir.

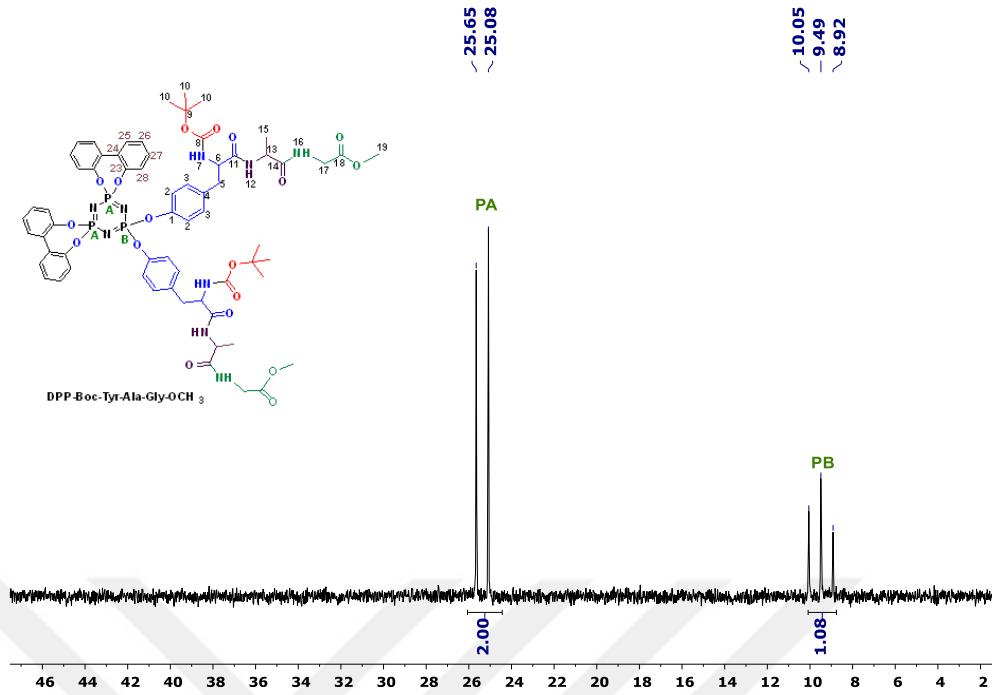
DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ fosfazen bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **1376.30** g/mol dür. Şekil 4.44'deki MALDI-TOF MS spektrumunda 1377.896 [M+H], 1401.423 [M+Na+2H] karşılık gelmektedir. Bunlar yapının oluştuğunun göstergeleridir.

4.3.3.3. Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Tripeptit bileşiminin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

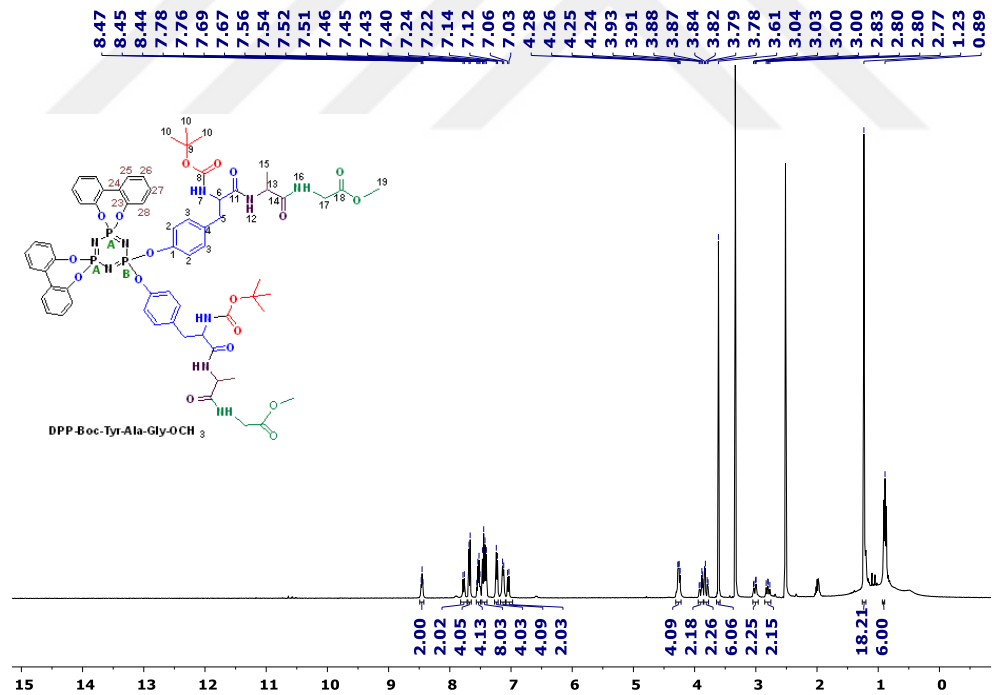
0.35 mmol (0.2 g) DPP, 1.22 mmol (0.17 g) K₂CO₃, 1.04 mmol (0.44 g) Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃. Verim: %60. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT, HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.45, Şekil 4.46, Şekil 4.47, Şekil 4.48, Şekil 4.49, Şekil 4.50 ve Tablo 4.13’de verilmiştir.



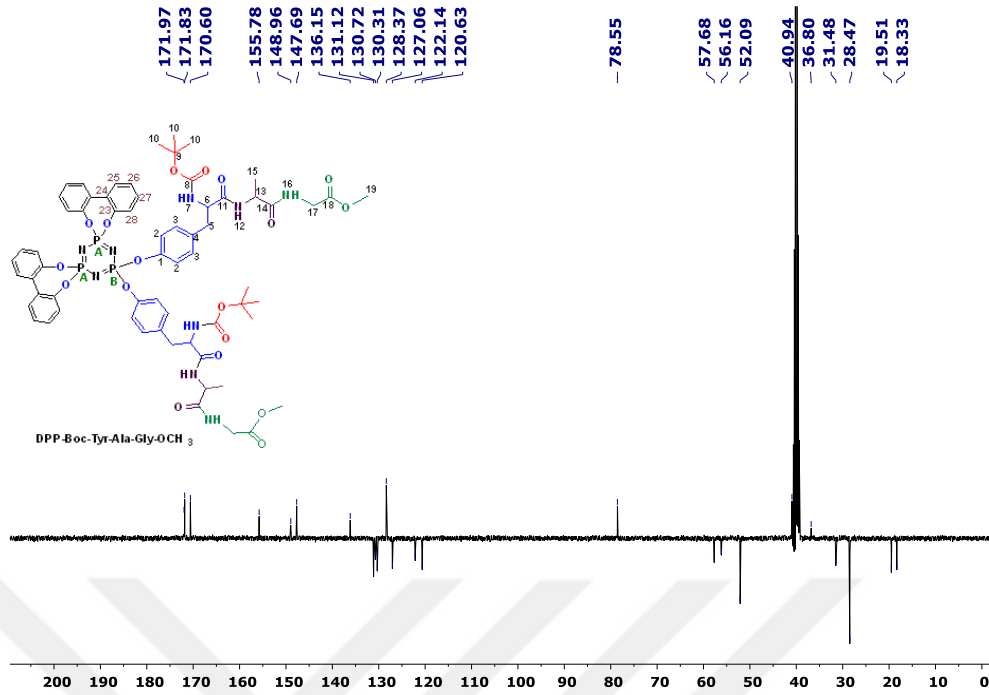
Şekil 4.45. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



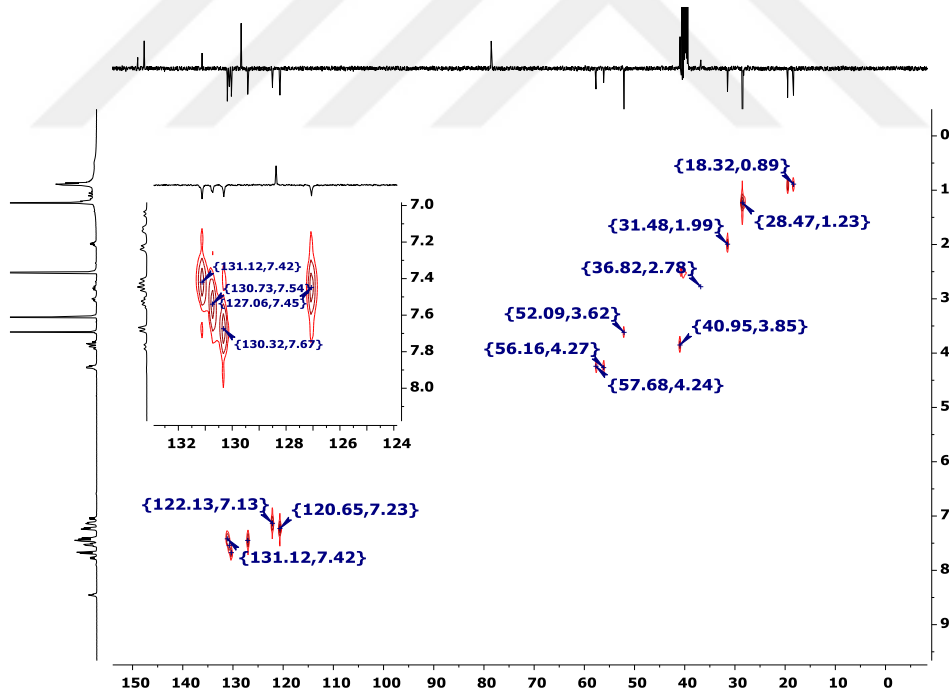
Şekil 4.46. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



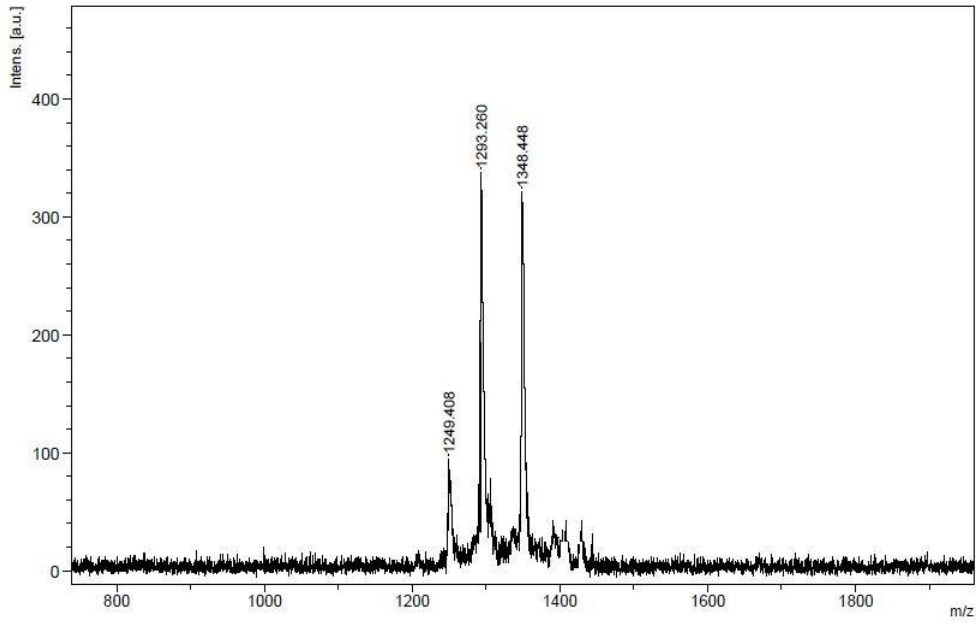
Şekil 4.47. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.48. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.49. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.50. DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.13. DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.08-25.65 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.92-10.05 (1P, t, PB((C ₂₀ H ₂₈ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	0.89-0.90 (6H, d, H ¹⁵), 1.23 (18H, s, H ¹⁰), 2.77-2.83 ve 3.00-3.04 (4H, m, H ⁵), 3.61 (6H, s, H ¹⁹), 3.78-3.93 (4H, m, H ¹⁷), 4.24-4.28 (4H, m, H ⁶ , H ¹³), 7.03-7.06 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.12-7.14 (4H, d, H ²⁸), 7.22-7.24 (4H, d, H ²), 7.40-7.46 (8H, m, H ³ , H ²⁶), 7.51-7.56 (4H, m, H ²⁷), 7.67-7.69 (4H, d, H ²⁵), 7.76-7.78 (2H, d, H ¹² (-NH)), 8.44-8.47 (2H, t, H ¹⁶ (-NH))	147.69 C ¹ , 028.47 C ¹⁰ , 120.63 C ² , 171.97 C ¹¹ , 131.12 C ³ , 056.16 C ¹³ , 128.37 C ⁴ , 171.83 C ¹⁴ , 036.80 C ⁵ , 018.33 C ¹⁵ , 057.68 C ⁶ , 040.94 C ¹⁷ , 155.78 C ⁸ , 170.60 C ¹⁸ , 078.55 C ⁹ , 052.09 C ¹⁹ , 148.96 C ²³ , 136.15 C ²⁴ , 130.32 C ²⁵ , 127.06 C ²⁶ , 130.72 C ²⁷ , 122.14 C ²⁸
FT-IR (cm⁻¹)		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 40.14 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.24
VN-H, 3309, 3423 VC-H(Aromatik), 3034, 3069 VC-H(Alifatik) 2875, 2932, 2969 VC=C 1503, 1550, 1607 VC=O 1646, 1689, 1713, 1750 VP=N, VP-O-Ph 1166, 1227, 946		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1348.25 g/mol Deneyisel [M] : 1348.448 m/z [M-(C(CH₃)₃)] : 1293.260 m/z	C₆₄H₇₂N₉O₁₈P₃ (Mw: 1348.25 g/mol) Teorik : C, 57.02; H, 5.38; N, 9.35 Deneyisel : C, 57.06; H, 5.41; N, 9.39	

Tripeptit süstitü siklotrifosfazen bileşiminin (**DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃**) FT-IR spektrumunda yapıya ait karakteristik pikler Şekil 4.45 ve Tablo 4.13’de verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃** Tripeptit bileşiminin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşimindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağı FT-IR spektrumunda 946 cm⁻¹’de gözlenmiştir. –OH gerilme titreşimlerine ait pik ise görülmemiştir. Karakteristik aromatik, alifatik, –NH, –C=C–, amit ve ester karbonileri, –P=N– pikleri FT-IR spektrumunda görülmektedir.

İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A₂B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiminin ³¹P-NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşimindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen 28.71-29.69 ppm’deki pik (1P, t, PB(PCl₂)), tripeptit bileşiminin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 8.92-10.05 ppm’e (1P, t, PB((C₂₀H₂₈O₇N₃)₂)) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor piki de spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiminde 19.22-19.71 ppm’den (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) tripeptitin halkaya bağlanması ile 25.08-25.65 ppm’e (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) kaymıştır. **DPP** bileşimindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşimin yani **DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃**’ün Şekil 4.46’deki ³¹P-NMR spektrumunda gözlenmemiştir.

Benzer şekilde tripeptit bileşiminin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 9.07 ppm’deki fenolik –OH protonu tripeptit süstitü fosfazen bileşiminin Şekil 4.47’deki ¹H-NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Dahası hem tripeptitin hem **DPP** fosfazen bileşiminin yapısında yer alan karakteristik proton pikleri spektrumda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve yapıda olması gereken proton piklerinin varlığı yapının oluştuğunun önemli kanıtlarıdır.

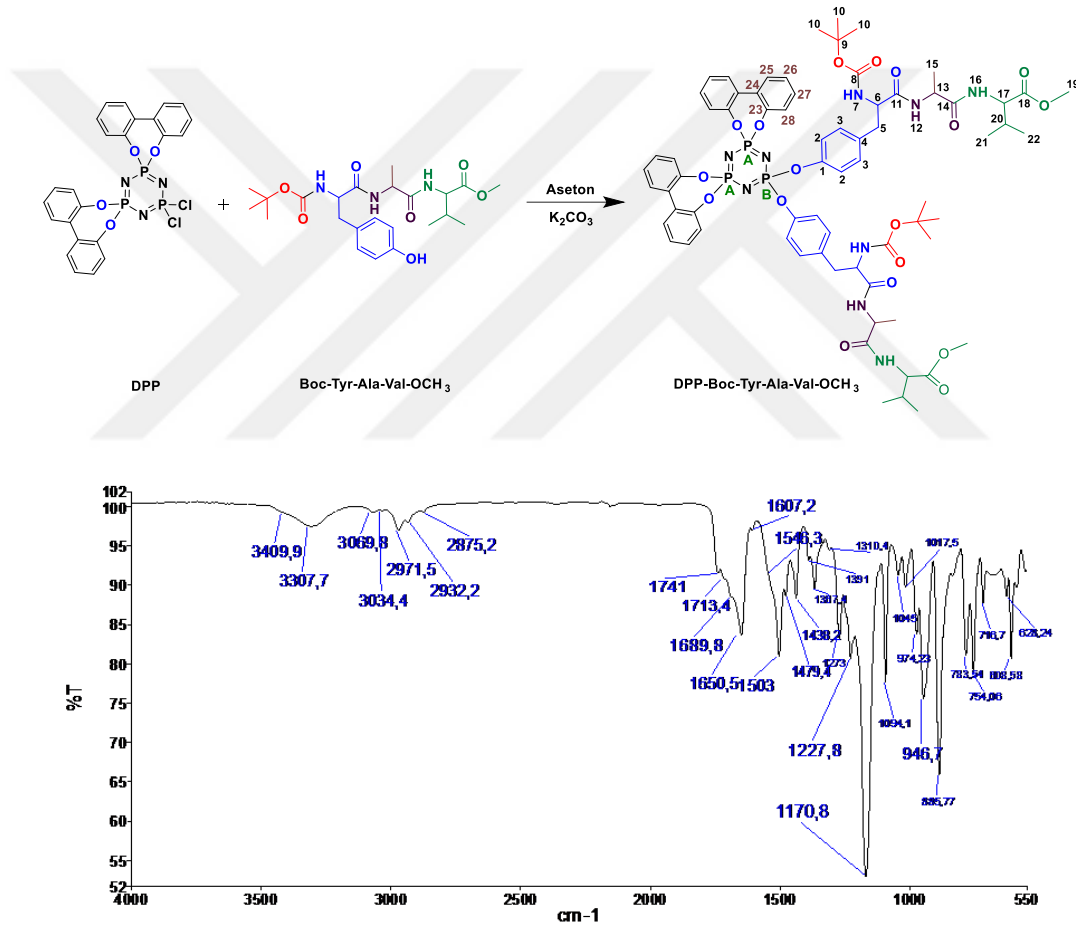
Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ tripeptit bileşiminin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşimindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağına ait ipso karbonu Şekil 4.48’deki ¹³C-APT spektrumunda 147.69 (C1) ppm’de görülmektedir. Tripeptit bileşiminin NMR spektrumunda HO-Ph piki 155.74 ppm’de (C¹) gözlenmiştir. Fakat P-O-Ph bağının oluşması ile bu pik kaybolmuştur. Buda yapının bağlandığının en önemli kanıtıdır. Hem tripeptitin hem de **DPP** fosfazen bileşimine ait aromatik karbonlar, alifatik karbonlar bağlanması etkisi ile az da olsa kayma gözlenmiş ve ¹³C-APT spektrumunda pikler görülmektedir. ¹H, ¹³C-APT ve HETCOR (Şekil 4.49) spektrumları birlikte incelendiğinde protonlu karbonların yerinin net olarak tespit edilmesi ve spektrumların yapı ile de bire bir uyumlu olduğu spektrumlar incelendiğinde açıkça görülmektedir.

İhmal edilebilecek düzeyde çok küçük safasızlıklar bulunmakadır. Flash kromatografisi ile yapılan saflaştırma sisteminden geldiği düşünölmektedir. Çünkü ne reaktiflere nede başlangıç bileşiklerine aittir. **DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃** fosfazen bileşiminin teorik olarak hesaplanan

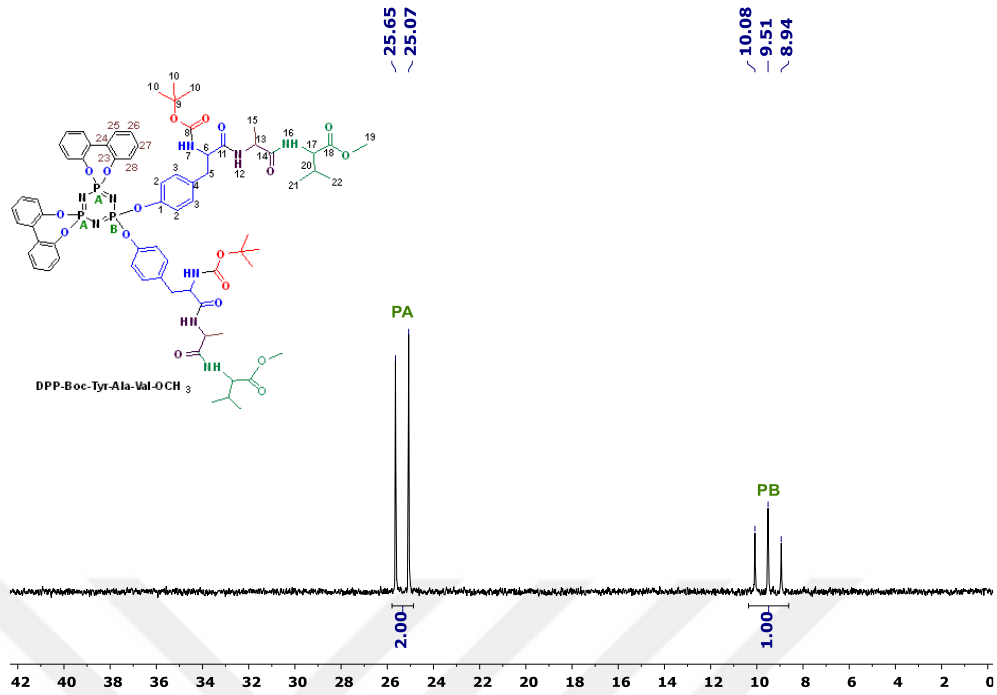
molekül ağırlığı **1348.25** g/mol dır. Şekil 4.50'deki MALDI-TOF MS spektrumunda 1348.448 [M], karşılık gelmektedir. Bu da yapı ile uyumlu olduğunun kanıtlarından bir tanesidir.

4.3.3.4. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Tripeptit bileşiğinin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

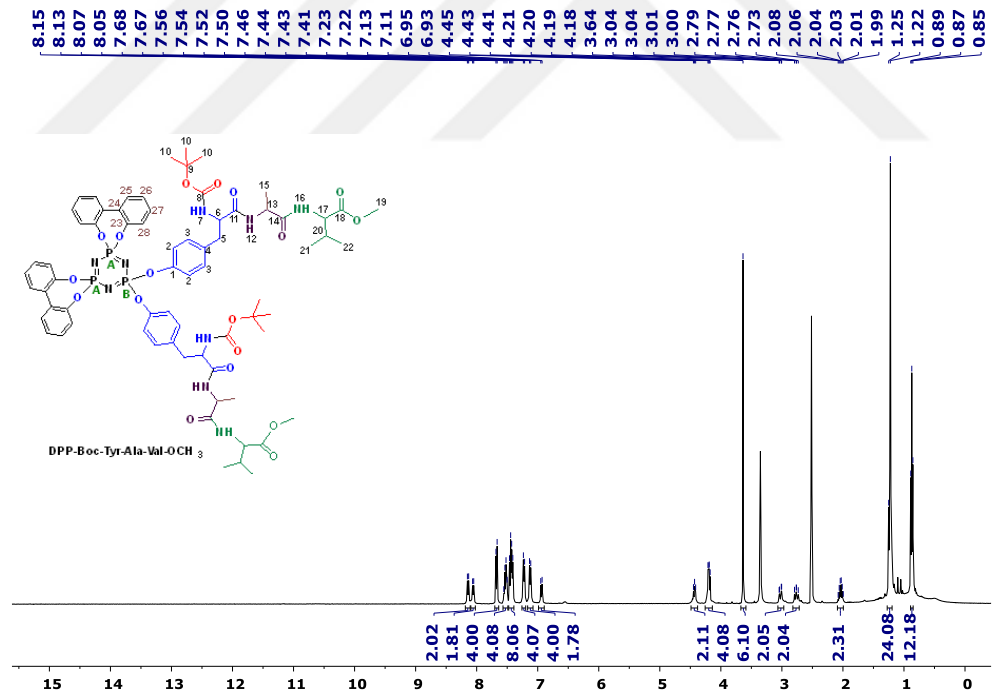
0.52 mmol (0.3 g) **DPP**, 1.83 mmol (0.25 g) **K₂CO₃**, 1.57 mmol (0.73 g) **Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃**. Verim: %62. **DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃** bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT, HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.51, Şekil 4.52, Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55, Şekil 4.56 ve Tablo 4.14'de verilmiştir.



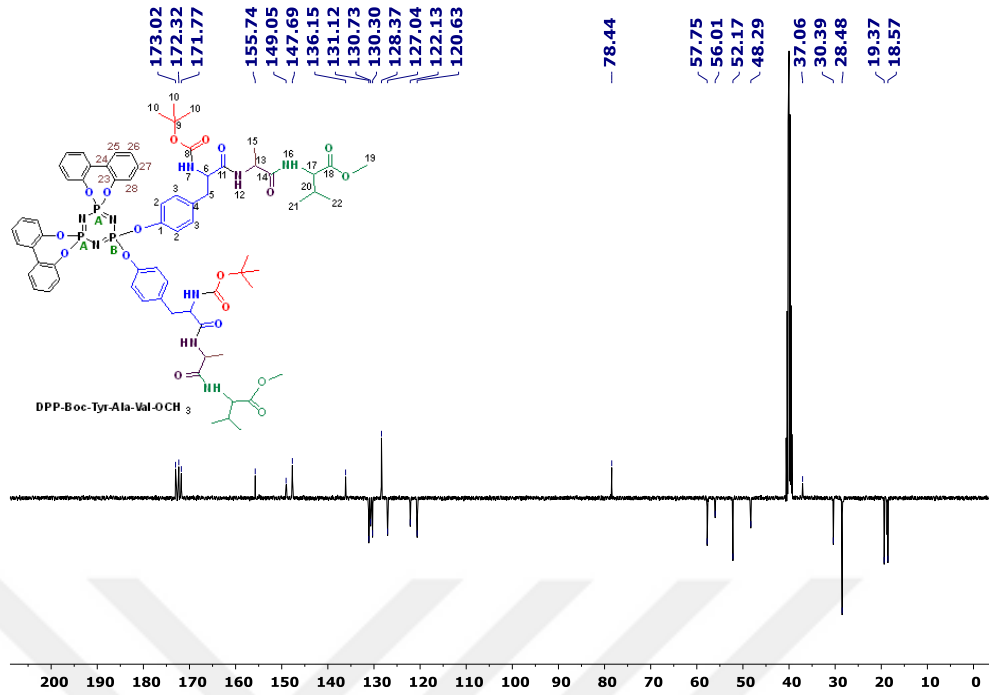
Şekil 4.51. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



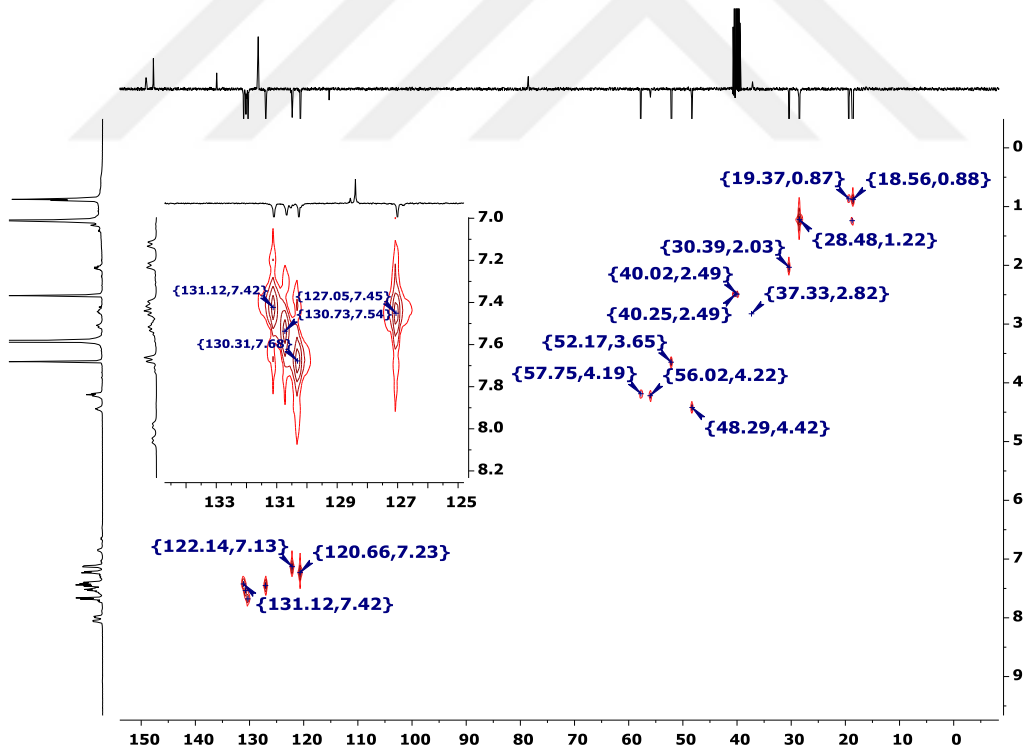
Şekil 4.52. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



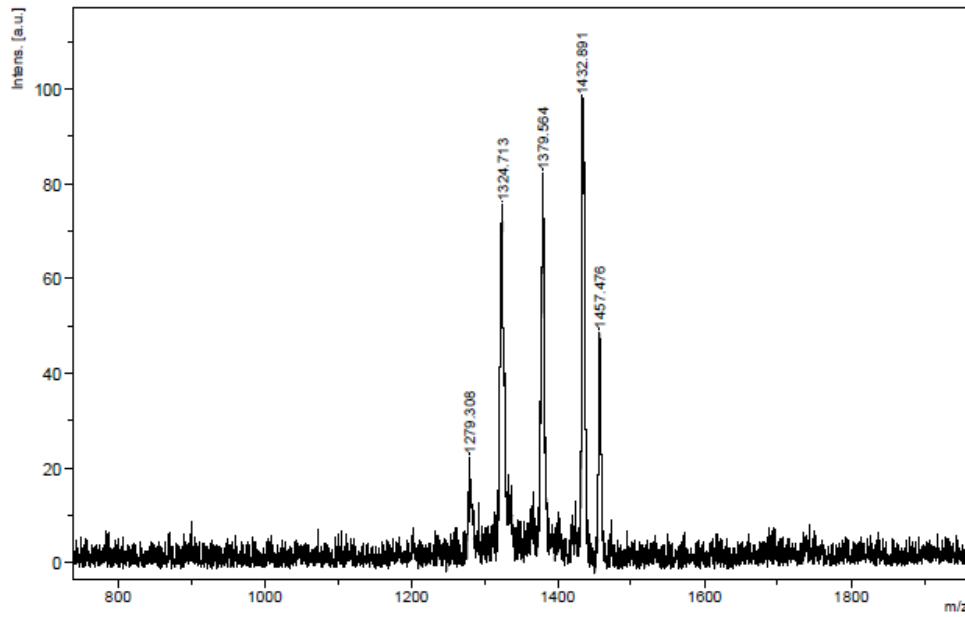
Şekil 4.53. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.54. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.55. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.56. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.14. DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.07-25.65 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.94-10.08 (1P, t, PB((C ₂₃ H ₃₄ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	0.85-0.89 (12H, m, H ²¹ , H ²²), 1.22-1.25 (24H, m, H ¹⁰ , H ¹⁵), 2.03-2.06 (2H, m, H ²⁰), 2.73-2.79 ve 3.00-3.04 (4H, m, H ⁵), 3.64 (6H, s, H ¹⁹), 4.18-4.21 (4H, m, H ⁶ , H ¹⁷), 4.41-4.45 (2H, m, H ¹³), 6.93-6.95 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.11-7.13 (4H, d, H ²⁸), 7.22-7.23 (4H, d, H ²), 7.41-7.46 (8H, m, H ³ , H ²⁶), 7.50-7.56 (4H, m, H ²⁷), 7.67-7.68 (4H, d, H ²⁵), 8.05-8.07 (2H, d, H ¹² (-NH)), 8.13-8.15 (2H, H ¹⁶ (-NH))	147.69 C ¹ , 173.02 C ¹¹ , 120.63 C ² , 048.29 C ¹³ , 131.12 C ³ , 171.77 C ¹⁴ , 128.37 C ⁴ , 018.74 C ¹⁵ , 037.06 C ⁵ , 057.75 C ¹⁷ , 056.02 C ⁶ , 172.32 C ¹⁸ , 155.74 C ⁸ , 052.17 C ¹⁹ , 078.44 C ⁹ , 030.39 C ²⁰ , 028.48 C ¹⁰ , 018.57 C ²¹ , 019.37 C ²² , 149.05 C ²³ , 136.15 C ²⁴ , 130.30 C ²⁵ , 127.04 C ²⁶ , 130.73 C ²⁷ , 122.13 C ²⁸
FT-IR (cm⁻¹)		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 40.14 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.24
VN-H, 3307, 3409 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3034, 3069, 2875, 2932, 2971 VC=C 1503, 1546, 1607 VC=O 1650, 1689, 1713, 1741 (C=O) VP=N, VP-O-Ph 1170, 1227 946		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1432.41 g/mol Deneysel [M+Na+2H⁺] : 1457.476 m/z [M⁺] : 1432.891 m/z	C₇₀H₈₄N₉O₁₈P₃ (Mw: 1432.41 g/mol) Teorik : C, 58.70; H, 5.91; N, 8.80 Deneysel : C, 58.74; H, 5.95; N, 8.85	

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin (DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃) FT-IR spektrumunda yapıya spektrum ve karakteristik pikler Şekil 4.51 ve Tablo 4.14’de verilmiştir. Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ Tripeptit bileşiğinin DPP fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu

DPP bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağı FT-IR spektrumunda 946 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. –OH gerilme titreşimlerine ait pik ise görülmemiştir. Karakteristik aromatik, alifatik, –NH, –C=C–, amit ve ester karbonilleri, –P=N– pikleri FT-IR spektrumunda görülmektedir.

İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A_2B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiğinin ^{31}P -NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşiğindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen $28.71\text{--}29.69$ ppm'deki pik (1P, t, $\text{PB}(\text{PCl}_2)$), tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte $8.94\text{--}10.08$ ppm'e (1P, t, $\text{PB}((\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_7\text{N}_3)_2)$) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor piki de spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiğinde $19.22\text{--}19.71$ ppm'den (2P, d, $\text{PA}((\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2)_2)$) tripeptitin halkaya bağlanması ile $25.07\text{--}25.65$ ppm'e (2P, d, $\text{PA}((\text{C}_{12}\text{H}_8\text{O}_2)_2)$) kaymıştır. **DPP** bileşiğindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşik **DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃**'ün Şekil 4.52'deki ^{31}P -NMR spektrumunda gözlenmemiştir.

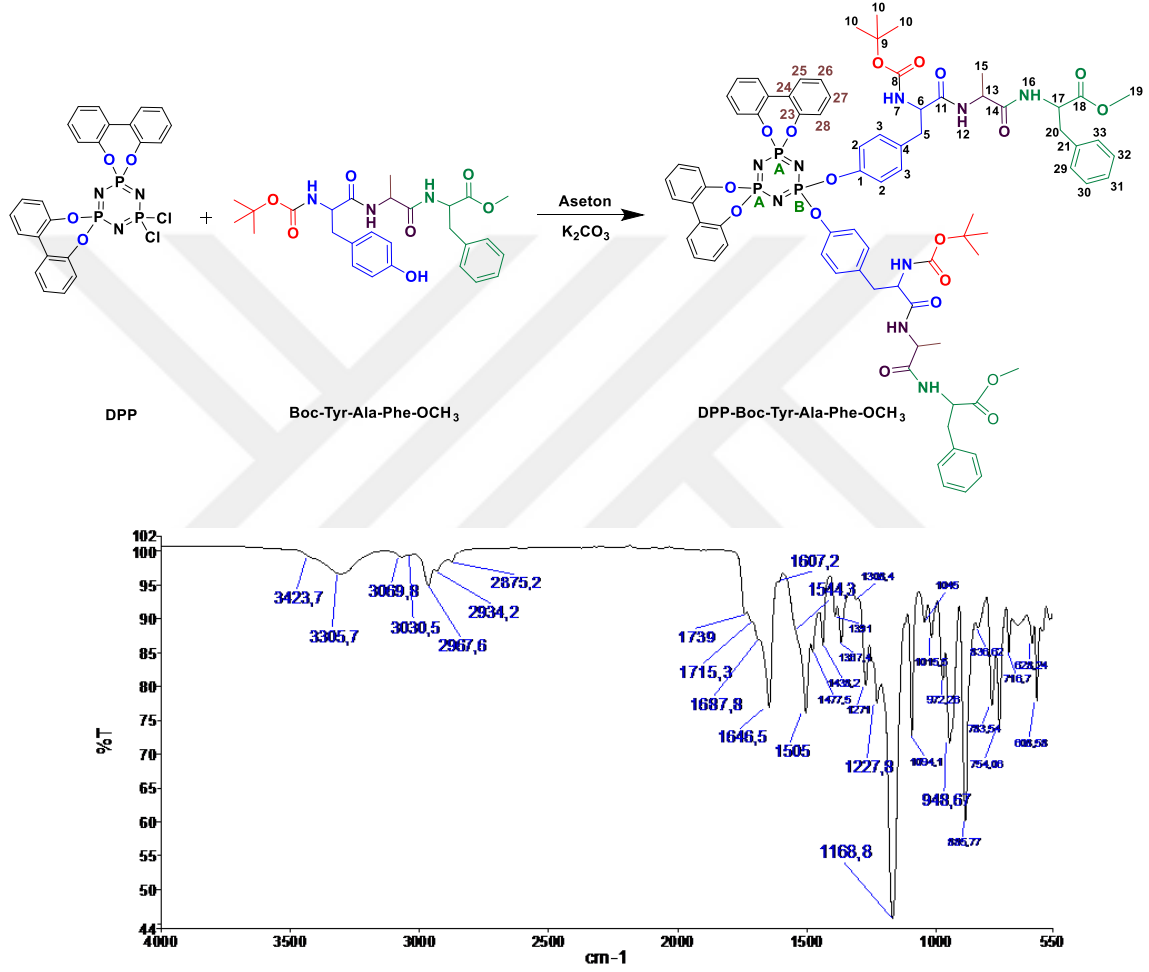
Benzer şekilde tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 9.17 ppm'deki fenolik –OH protonu tripeptit süstitüe fosfazen bileşiğinin ^1H -NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Dahası hem tripeptitin hem **DPP** fosfazen bileşiğinin yapısında yer alan karakteristik proton pikleri spektrumda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve yapıda olması gereken proton piklerinin varlığı yapının oluştuğunun önemli kanıtlarıdır.

Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ tripeptit bileşiğinin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağına ait ipso karbonu ^{13}C -APT spektrumunda 147.69 (C1) ppm'de görülmektedir. Tripeptit bileşiğinin NMR spektrumunda HO-Ph piki 155.73 ppm'de (C^1) gözlenmiştir. Fakat P-O-Ph bağına oluşması ile bu pik kaybolmuştur. Buda yapının bağlandığının en önemli kanıtıdır. Hem tripeptitin hem de **DPP** fosfazen bileşiğine ait aromatik karbonlar, alifatik karbonlar bağlanmanın etkisi ile az da olsa kayma gözlenmiş ve ^{13}C -APT spektrumunda pikler görülmektedir. Sırasıyla Şekil 4.53, Şekil 4.54 ve Şekil 4.55 ^1H , ^{13}C -APT ve HETCOR spektrumları birlikte incelendiğinde protonlu karbonların yerinin net olarak tespit edilmesi ve spektrumların yapı ile de bire bir uyumlu olduğu spektrumlar incelendiğinde açıkça görülmektedir.

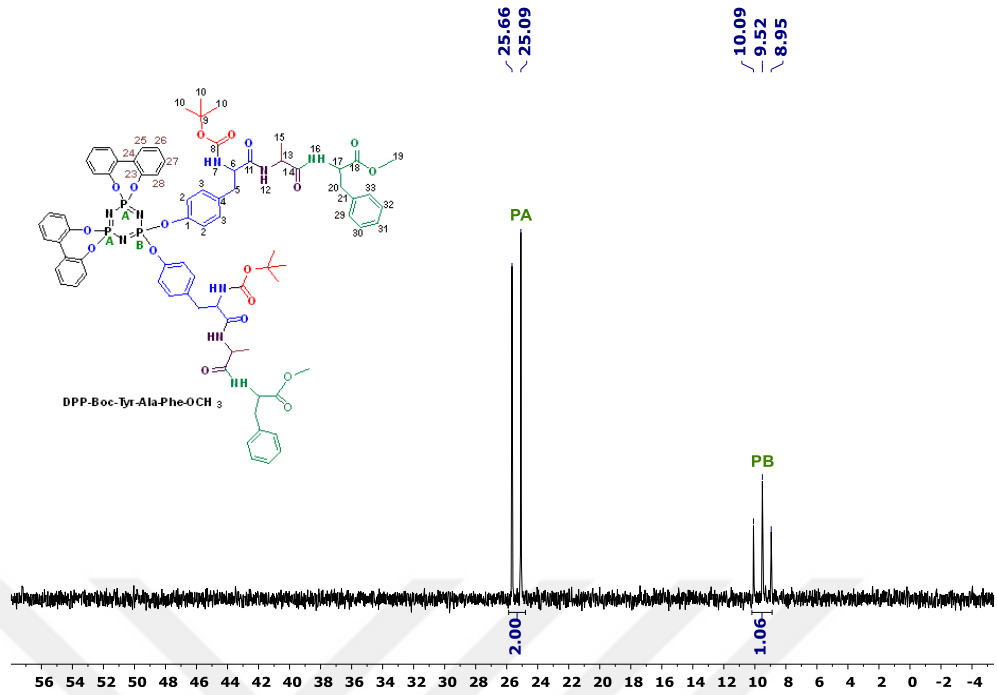
DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ fosfazen bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **1432.41** g/mol dür. Şekil 4.56'daki MALDI-TOF MS spektrumunda 1432.891 [M+], karşılık gelmektedir. Bu da yapı ile uyumlu olduğunun kanıtlarından biridir.

4.3.3.5. Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Tripeptit bileşiminin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

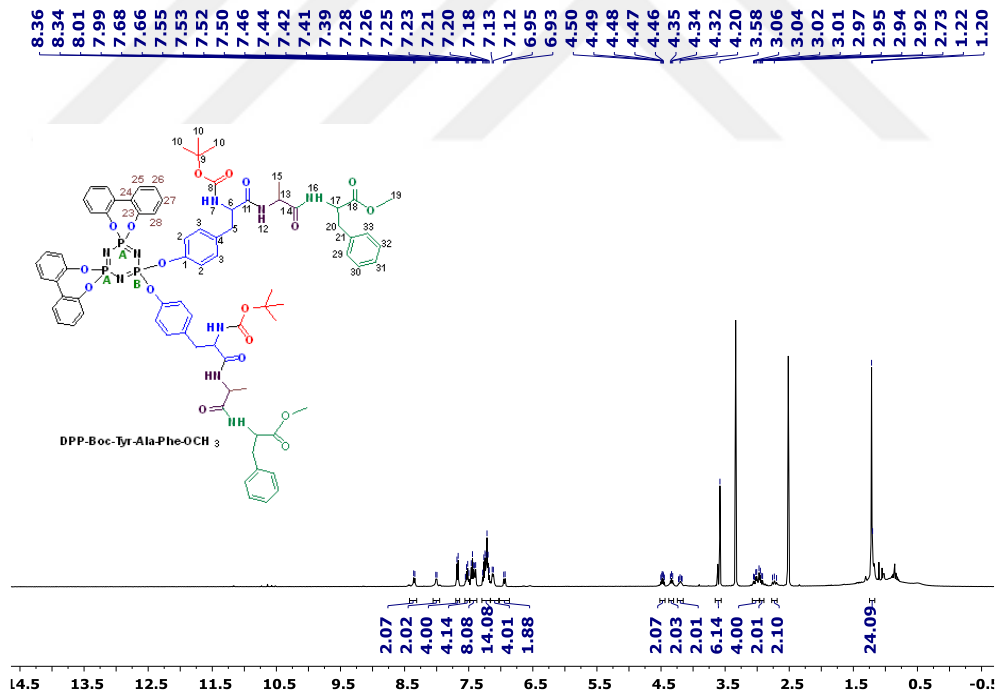
0.52 mmol (0.3 g) DPP, 1.83 mmol (0.25 g) K₂CO₃, 1.57 mmol (0.8 g) Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃. Verim: %62. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT, HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.57, Şekil 4.58, Şekil 4.59, Şekil 4.60, Şekil 4.61, Şekil 4.62 ve Tablo 4.15’de verilmiştir.



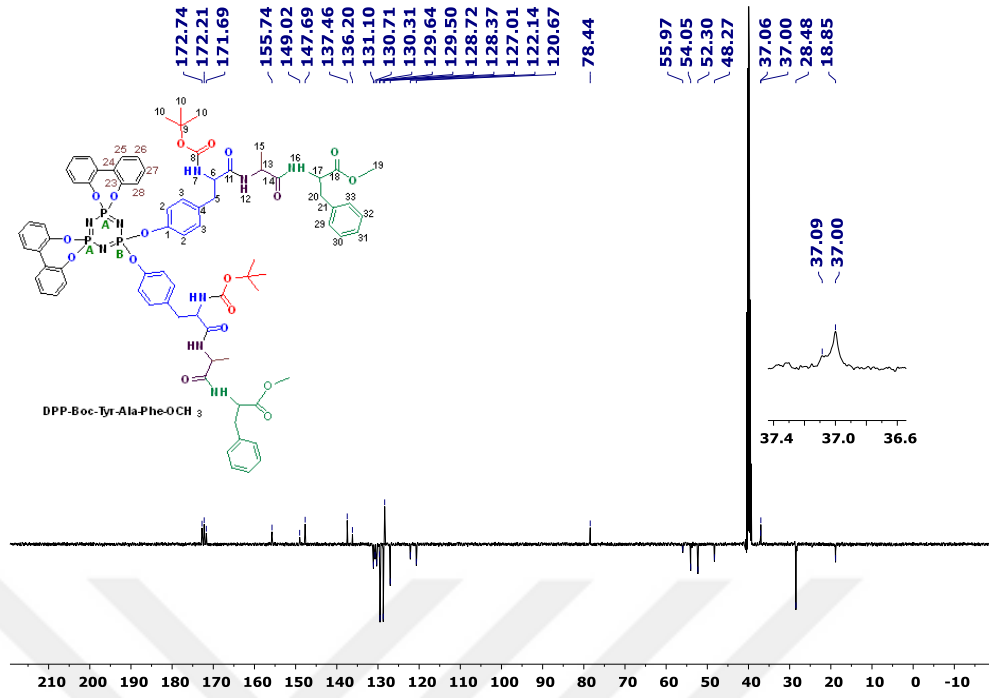
Şekil 4.57. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



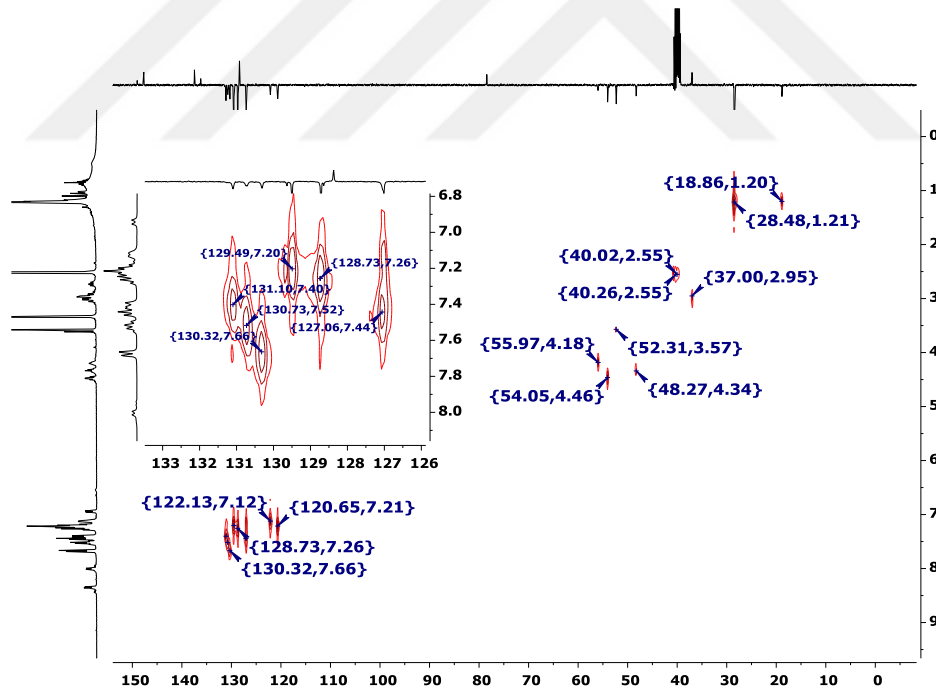
Şekil 4.58. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



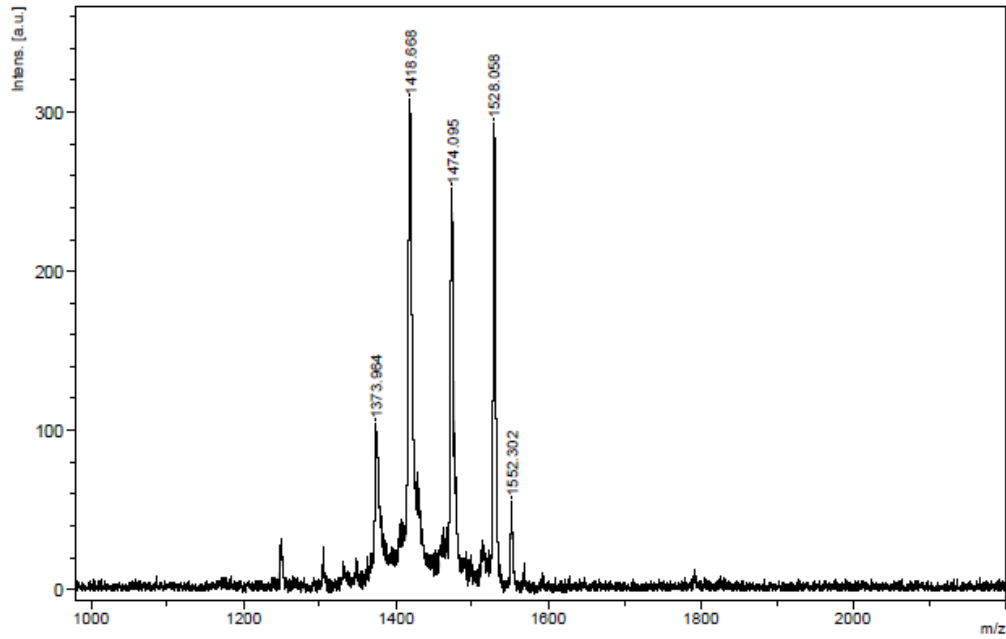
Şekil 4.59. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.60. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.61. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin HETCOR (2D) NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.62. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.15. DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.09-25.66 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.95-10.09 (1P, t, PB((C ₂₇ H ₃₄ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	1.20-1.22 (24H, m, H ¹⁰ , H ¹⁵), 2.73-2.76 ve 2.92-3.06 (8H, m, H ⁵ , H ²⁰), 3.58 (6H, s, H ¹⁹), 4.17-4.23 (2H, m, H ¹⁷), 4.32-4.35 (2H, m, H ¹³), 4.41-4.45 (2H, m, H ⁶), 6.93-6.95 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.12-7.13 (4H, d, H ²⁸), 7.20-7.28 (14H, d, H ² , H ²⁹⁻³³), 7.39-7.46 (8H, m, H ³ , H ²⁶), 7.50-7.55 (4H, m, H ²⁷), 7.66-7.68 (4H, d, H ²⁵), 7.99-8.01 (2H, d, H ¹² (-NH)), 8.34-8.36 (2H, H ¹⁶ (-NH))	147.69 C ¹ , 172.74 C ¹¹ , 120.67 C ² , 048.27 C ¹³ , 131.10 C ³ , 171.69 C ¹⁴ , 128.37 C ⁴ , 018.85 C ¹⁵ , 037.09 C ⁵ , 055.97 C ¹⁷ , 054.05 C ⁶ , 172.21 C ¹⁸ , 155.74 C ⁸ , 052.30 C ¹⁹ , 078.44 C ⁹ , 037.00 C ²⁰ , 028.48 C ¹⁰ , 137.46 C ²¹ , 149.02 C ²³ , 136.20 C ²⁴ , 130.31 C ²⁵ , 127.01 C ²⁶ , 130.71 C ²⁷ , 122.14 C ²⁸ , 129.50 C ^{29,33} , 128.72 C ^{30,32} , 129.64 C ³¹
FT-IR (cm⁻¹)		
VN-H, 3305, 3423 VC-H(Aromatik), VC-H(Alifatik) 3030, 3069, 2875, 2934, 2967 VC=C 1505, 1544, 1607 VC=O 1646, 1687, 1715, 1739 (C=O) VP=N, VP-O-Ph 1168, 1227 948		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1528.50 g/mol Deneysel [M+Na+2H⁺] : 1552.302 m/z [M⁺] : 1528.058 m/z	C₇₈H₈₄N₉O₁₈P₃ (Mw: 1528.50 g/mol) Teorik : C, 61.29; H, 5.54; N, 8.25 Deneysel : C, 61.34; H, 5.59; N, 8.28	
		DMSO-d₆ ¹³C –APT : 40.14 ¹H-NMR : 2.51 ve 3.24

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin (DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃) FT-IR spektrumu Şekil 4.57’de ve yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.15’de verilmiştir. **Boc-Tyr-Ala-**

Phe-OCH₃ Tripeptit bileşiğinin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağı FT-IR spektrumunda 948 cm⁻¹'de gözlenmiştir. –OH gerilme titreşimlerine ait pik ise görülmemiştir. Karakteristik aromatik, alifatik, -NH-, -C=C-, amit ve ester karbonilleri, -P=N- pikleri FT-IR spektrumunda görülmektedir.

İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A₂B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiğinin ³¹P-NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşiğindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen 28.71-29.69 ppm'deki pik (1P, t, PB(PCl₂)), tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 8.95-10.09 ppm'e (1P, t, PB((C₂₇H₃₄O₇N₃)₂)) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor pikide spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiğinde 19.22-19.71 ppm'den (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) tripeptitin halkaya bağlanması ile 25.09-25.66 ppm'e (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) kaymıştır. **DPP** bileşiğindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşiği **DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃**'ün Şekil 4.58'deki ³¹P-NMR spektrumunda gözlenmemiştir.

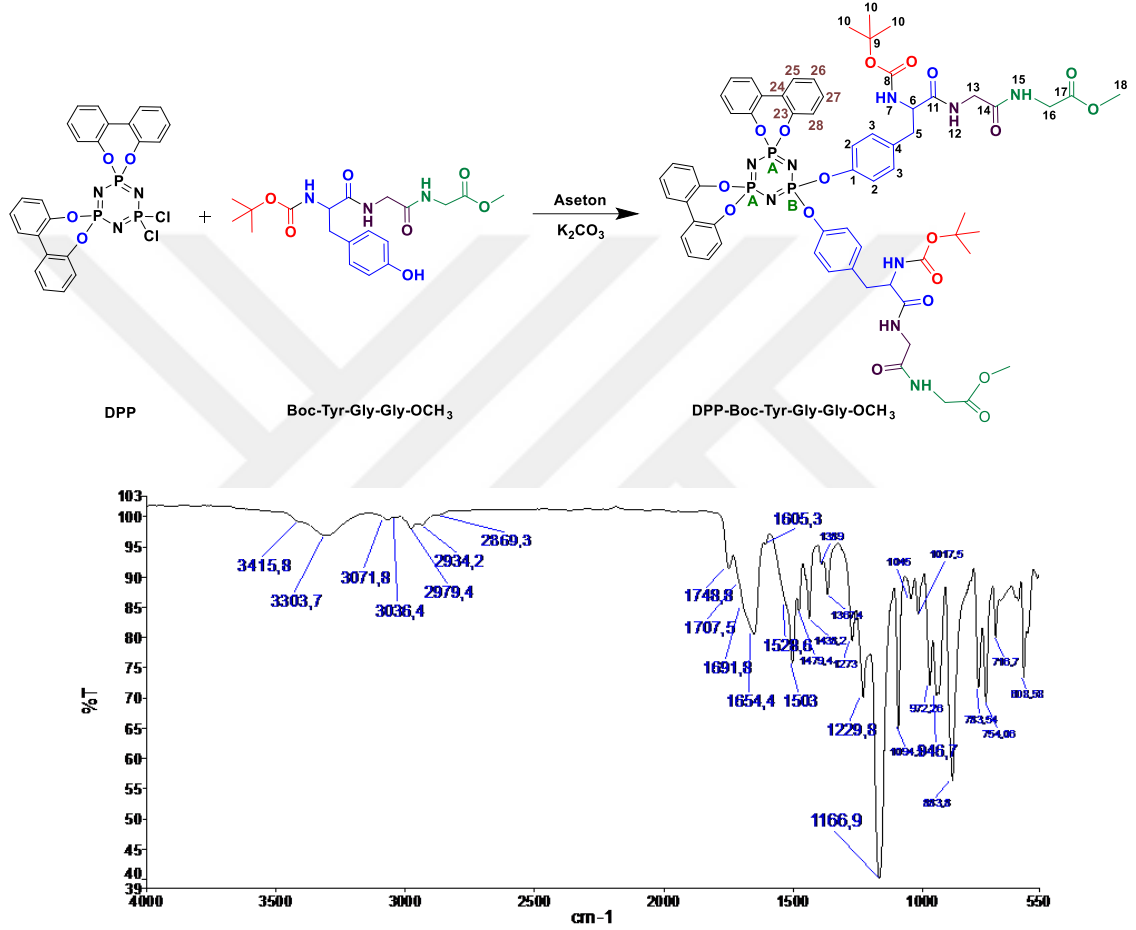
Benzer şekilde tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 9.15 ppm'deki fenolik –OH protonu tripeptit süstitüe fosfazen bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Dahası hem tripeptitin hem **DPP** fosfazen bileşiğinin yapısında yer alan karakteristik proton pikleri spektrumda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve yapıda olması gereken proton piklerinin varlığı yapının oluştuğunun önemli kanıtlarıdır.

Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ tripeptit bileşiğinin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağına ait ipso karbonu ¹³C-APT spektrumunda 147.69 (C1) ppm'de görülmektedir. Tripeptit bileşiğinin NMR spektrumunda HO-Ph piki 155.73 ppm'de (C¹) gözlenmiştir. Fakat P-O-Ph bağına oluşması ile bu pik kaybolmuştur. Buda yapının bağlandığının en önemli kanıtıdır. Hem tripeptitin hem de **DPP** fosfazen bileşiğine ait aromatik karbonlar, alifatik karbonlar bağlanmanın etkisi ile az da olsa kayma gözlenmiş ve ¹³C-APT spektrumunda pikler görülmektedir. Sırasıyla Şekil 4.59, Şekil 4.60 ve Şekil 4.61'de ¹H, ¹³C-APT ve HETCOR spektrumları birlikte incelendiğinde protonlu karbonların yerinin net olarak tespit edilmesi ve spektrumların yapı ile de bire bir uyumlu olduğu spektrumlar incelendiğinde açıkça görülmektedir.

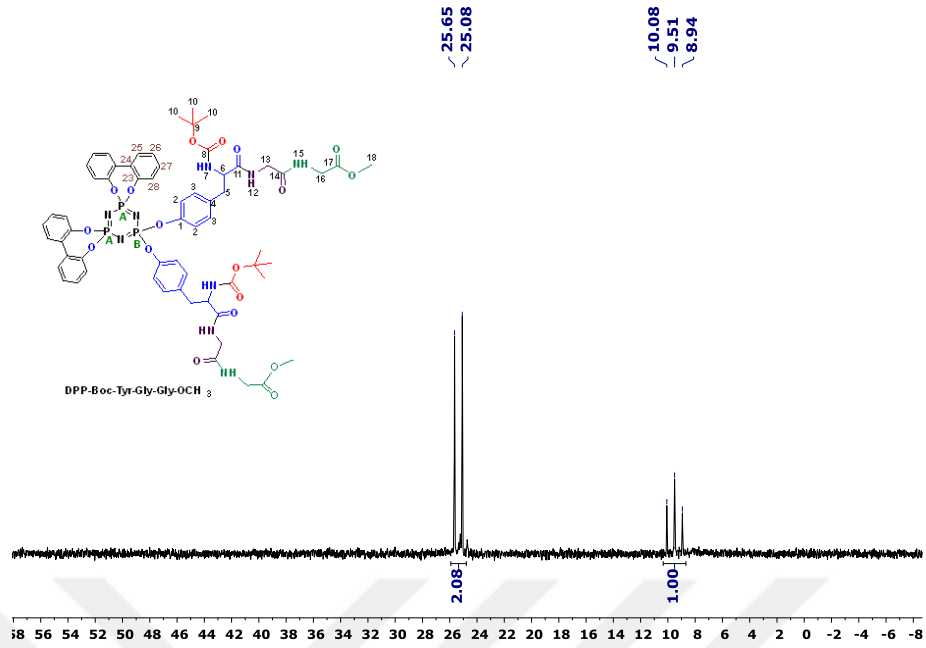
DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ fosfazen bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **1528.5** g/mol dür. Şekil 4.62'deki MALDI-TOF MS spektrumunda 1528.058 [M+] karşılık gelmektedir. Bu da yapı ile uyumlu olduğunun kanıtlarından biridir.

4.3.3.6. Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Tripeptit bileşiminin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

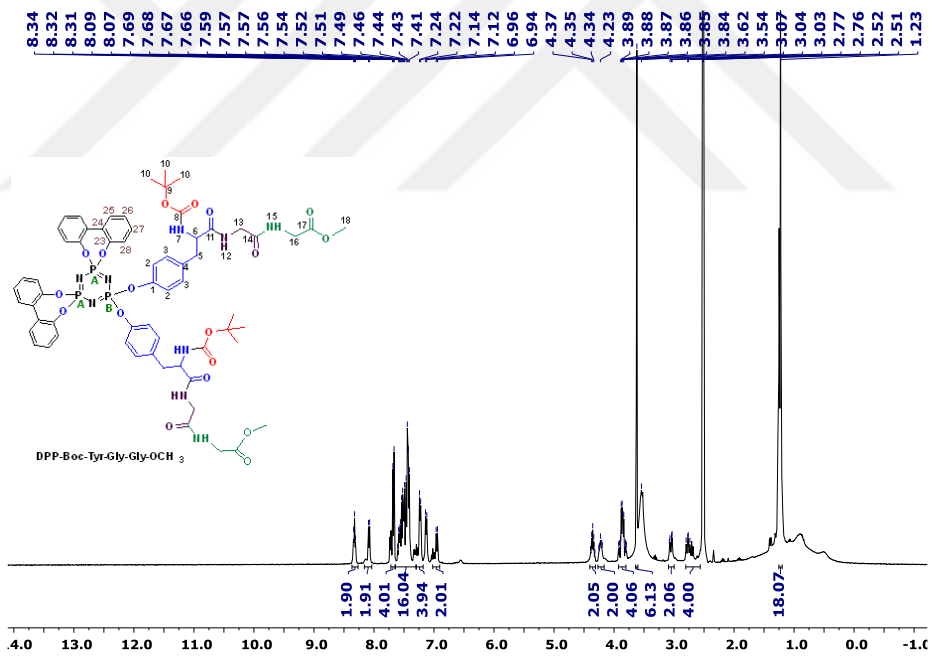
0.35 mmol DPP, 1.39 mmol (0.21 g) K₂CO₃, 1.04 mmol Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃. Verim: %15. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ bileşiğine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.63, Şekil 4.64, Şekil 4.65, Şekil 4.66, Şekil 4.67 ve Tablo 4.16'de verilmiştir.



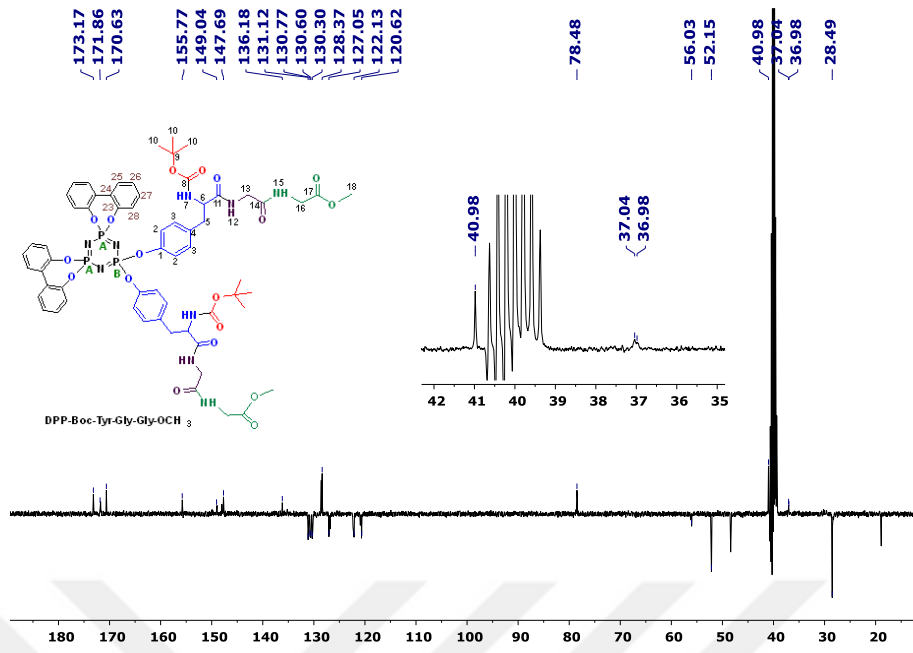
Şekil 4.63. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin FT-IR Spektrumu (ATR)



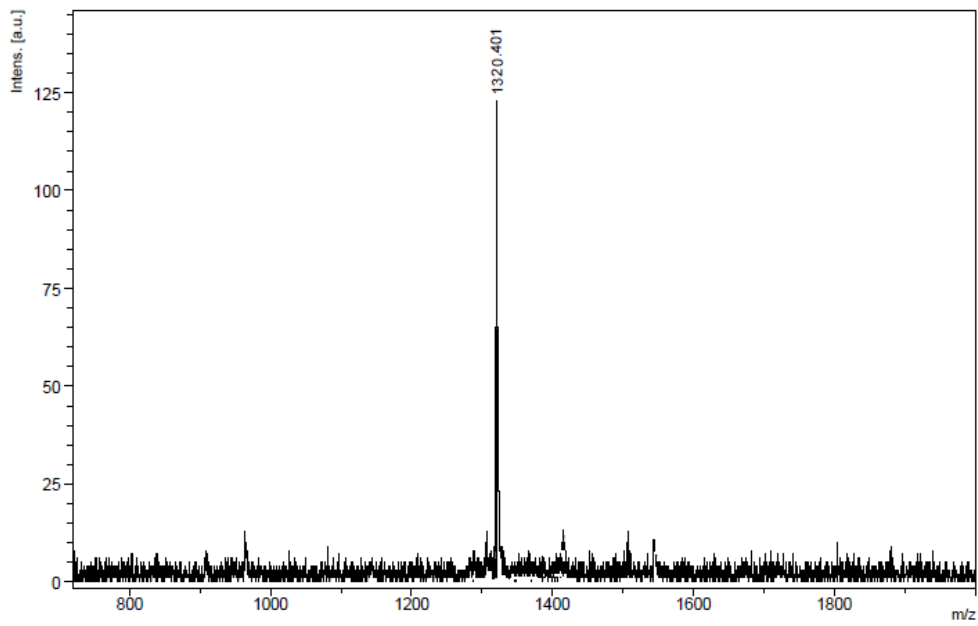
Şekil 4.64. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.65. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.66. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.67. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu

Tablo 4.16. DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.08-25.65 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.94-10.08 (1P, t, PB((C ₁₉ H ₂₆ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	1.23 (18H, m, H ¹⁰), 2.74-2.80 (4H, m, H ⁵) 3.03-3.08 (2H, m, H ⁶), 3.62 (6H, s, H ¹⁸), 3.79-3.92 (4H, m, H ¹³), 4.20-4.25 ve 4.32-4.39 (4H, m, H ¹⁶), 6.94-6.96 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.22-7.24 (4H, m, H ²), 7.41-7.57 (16H, m, H ³ , H ²⁶ , H ²⁷ , H ²⁸), 7.66-7.69 (4H, m, H ²⁵), 8.07-8.09 (2H, d, H ¹² (-NH)), 8.31-8.34 (2H, H ¹⁵ (-NH))	147.69 C ¹ , 170.63 C ¹⁴ , 120.62 C ² , 040.98 C ¹⁶ , 131.12 C ³ , 171.86 C ¹⁷ , 128.37 C ⁴ , 052.15 C ¹⁸ , 037.04 C ⁵ , 149.04 C ²³ , 056.03 C ⁶ , 136.18 C ²⁴ , 155.77 C ⁸ , 130.30 C ²⁵ , 078.48 C ⁹ , 127.05 C ²⁶ , 028.49 C ¹⁰ , 130.60 C ²⁷ , 173.17 C ¹¹ , 122.13 C ²⁸ , 036.98 C ¹³ ,
FT-IR (cm⁻¹)		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 40.14 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.24
VN-H, 3303, 3415 VC-H(Aromatik), 3036, 3071 VC-H(Alifatik) 2869, 2934, 2979 VC=C 1503, 1528, 1605 VC=O 1654, 1691, 1707, 1748 (C=O) VP=N, 1166, 1229 VP-O-Ph 946		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1320.19 g/mol Deneyisel [M]⁺ : 1320.401 m/z	C₆₂H₆₈N₉O₁₈P₃ (Mw: 1320.19 g/mol) Teorik : C,56.41; H, 5.19; N, 9.55 Deneyisel : C, 56.46; H, 5.24; N, 9.59	

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin (**DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃**) FT-IR spektrumu Şekil 4.63’de ve yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.16’da verilmiştir. **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** tripeptit bileşiğinin yapısında bulunan –OH gerilme titreşimlerinin **DPP- Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin FT-IR spektrumunda gözlenmediği görülmektedir. Tripeptit bileşiğinin yapısında bulunan amit karbonilleri, -NH titreşimlerinde fosfazen bileşiğine ait spektrumda görülmektedir. P=N gerilme titreşimlerine ait olan pikler ise 1166 ve 1229 cm⁻¹’de görülmektedir. Yapının fosfazen halkasına bağlanması ile oluşan P-O-Ph bağına ait pik ise 946 cm⁻¹’de oluştuğu görülmektedir. Halkaya ait P=N gerilme titreşimlerinin **Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin reaksiyona girmesiyle düşük enerjiye kaydığı görülmektedir. Süstitüentlerin bağlanması ile P=N bağı zayıflamıştır ve düşük enerjiye kayma olmuştur.

Genellikle aynı grupların bağlı olduğu fosfor atomları eşdeğerdir ve aynı kimyasal kayma değerinde sinyal vermektedir. Spektrumda bir ikili ve bir üçlü pikin görülmesi yapıda iki farklı fosfor atomunun olduğunun göstergesidir. İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A₂B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiğinin ³¹P-NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşiğindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen 28.71-29.69 ppm’deki pik (1P, t, PB(PCl₂)), tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 8.94-10.08 ppm’e (1P, t, PB((C₁₉H₂₆O₇N₃)₂)) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor pikide spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu

fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiğinde 19.22-19.71 ppm'den (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) tripeptitin halkaya bağlanması ile 25.08-25.65 ppm'e (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂)) kaymıştır. **DPP** bileşiğindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşi **DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃**'ün Şekil 4.64'deki ³¹P-NMR spektrumunda gözlenmemiştir. Ayrıca fosfazen halkasına bağlanan sübstitüentin etkisiyle fosfor piki yüksek alana kaymıştır. Bu fosfor atomu üzerinde elektron yoğunluğunun arttığı anlamına gelmektedir. Bu da fosfazen halkasına bağlanan sübstitüentin elektron çekmesi sonucu P=N bağındaki elektronların fosfor üzerinde yoğunlaşmasına neden olmasından kaynaklanmaktadır.

Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ Bileşiğinin yapısında olan ve spektrumunda 9.15 ppm deki ¹H, singlet OH protonunun **DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin Şekil 4.65'deki ¹H-NMR spektrumu incelendiğinde gözlenmediği görülmektedir. Bağlanmanın meydana geldiğinin ilk kanıtıdır. **Tripeptit** bileşiğinin ¹H-NMR spektrumunda gözlenen -NH protonları (6.84-6.86 (1H, d, H⁸ (-NH)), 7.97 (1H, d, H¹⁶ (-NH)), 8.22-8.25 (1H, d, H¹³ (-NH)), tirozin yapısından gelen aromatik protonlar (6.63-6.65 (2H, d, J=8.4 Hz, H²) ve 7.03-7.05 (2H, d, J=8.4 Hz, H³)), metoksi protonları (3.63 (3H, s, H¹⁹) ve tripeptit yapısındaki alifatik pikler 1.37 (9H, m, H¹¹), 2.57-2.63 (2H, H⁶) ve 2.85-2.90 (2H, H⁷), 3.79-3.91 (2H, H¹⁴), 4.05-4.11 ve 4.30-4.37 (1H, H¹⁷) ppm'de gözlenmiştir. **DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** fosfazen bileşiğinin oluşması ile bu pikler sırasıyla -NH protonları 6.94-6.96 (2H, d, H⁷ (-NH)), 8.07-8.09 (2H, d, H¹² (-NH)) ve 8.31-8.34 (2H, H¹⁵ (-NH)) tripeptit ve bifenolün yapısından gelen aromatik protonlar 7.22-7.24 (4H, m, H²), 7.66-7.69 (4H, m, H²⁵) ve 7.41-7.57 (16H, m, H³, H²⁶, H²⁷, H²⁸) ppm'lerde, metoksi protonları 3.62 (6H, s, H¹⁸) ppm'de ve tripeptit yapısındaki alifatik proton pikleri 1.23 (18H, m, H¹⁰), 2.74-2.80 (4H, m, H⁵), 3.03-3.08 (2H, m, H⁶), 3.79-3.92 (4H, m, H¹³) ve 4.20-4.25 ve 4.32-4.39 (4H, m, H¹⁶) ppm'lere kaymıştır. Bunun akabinde elde edilen integral yüksekliklerinin yapı ile uyumlu olması ve fosfor atomuna yakın protonlardaki değişimler yapının oluştuğunun göstergesidir.

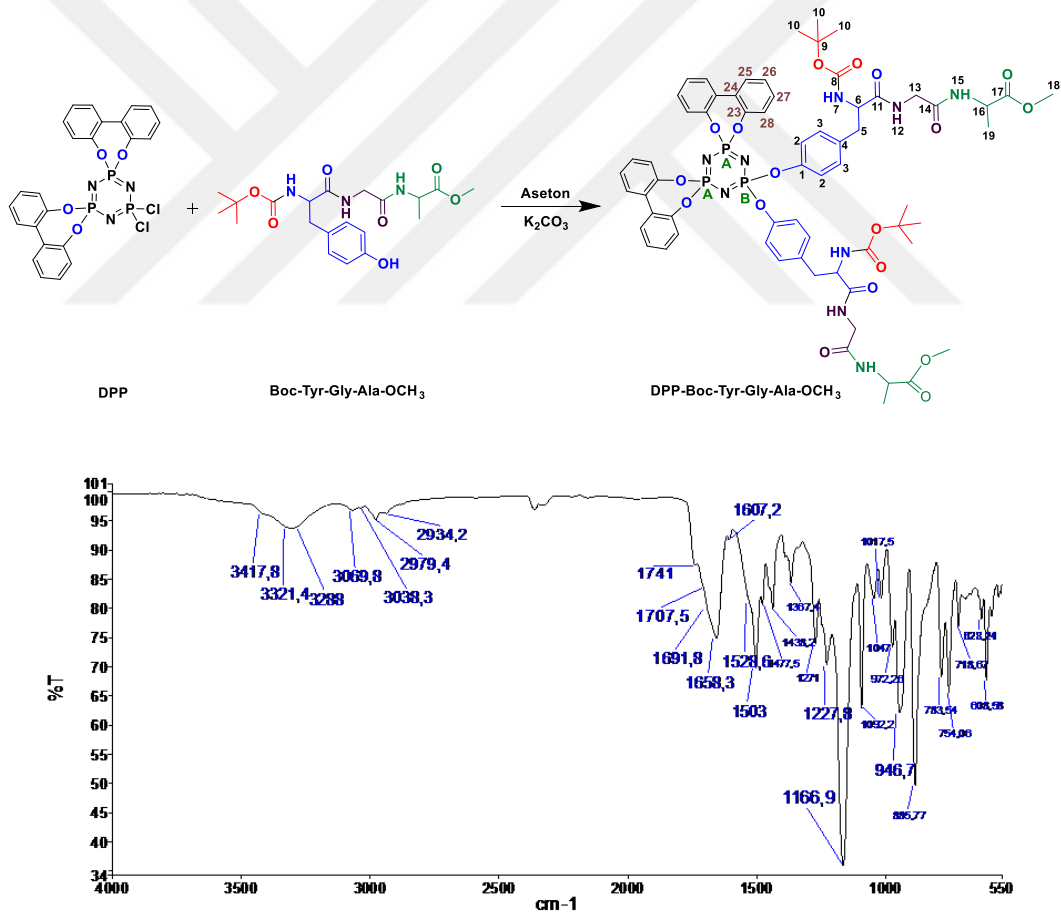
Tripeptit sübstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin Şekil 4.66'daki ¹³C-APT NMR spektrumu incelendiğinde tripeptitin 155.74 ppm'de (C¹) OH-Ph grubundaki ipso karbonu fenol grubunun fosfor atomuna bağlanması ile birlikte oluşan P-O-Ph bağı sonucu ipso karbonu 147.69 ppm'e (C¹) kaymıştır. Bifenol bağlı olan **DPP** bileşiğinin yapısındaki aromatik ipso karbonları (147.56 C²³ ve 126.36 C²⁴), **DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** bileşiğinin oluşması ile birlikte 149.04 (C²³) ve 136.18 (C²⁴) ppm'lere kaymıştır. Tripeptit bileşiğinin yapısındaki 156.16 (C⁹), 171.51 (C¹²), 171.84 (C¹⁵) ve 172.12 (C¹⁸) ppm'deki ester ve amit karbonil karbon pikleri, tripeptitin fosfazen halkasına bağlanması ile 155.77 (C⁸), 173.17 (C¹¹), 170.63 (C¹⁴) ve 171.86 (C¹⁷) ppm'e kaymıştır. Bu da yapının fosfazen halkasına bağlandıktan sonraki etkileşmeler ile değişimini göstermektedir. Bunun yanında alifatik -C, -CH, -CH₂, -CH₃ ve -OCH₃ karbonları spektrumda 37.04 C⁵, 56.03 C⁶, 78.48 C⁹, 28.49 C¹⁰, 36.98 C¹³, 40.98 C¹⁶ ve 52.15 C¹⁸ ppm'de görülmektedir. Bunların dışında diğer karbon atomlarında da etkileşmelerden dolayı az da olsa belirgin bir şekilde karbon piklerinde

kaymaların gözleendiği görülmektedir. **DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃** Bileşiminin yapısındaki 2, 3, 10 numaralı ve bifenol yapısındaki karbonlarda eşdeğer ve simetrik karbon atomları da vardır.

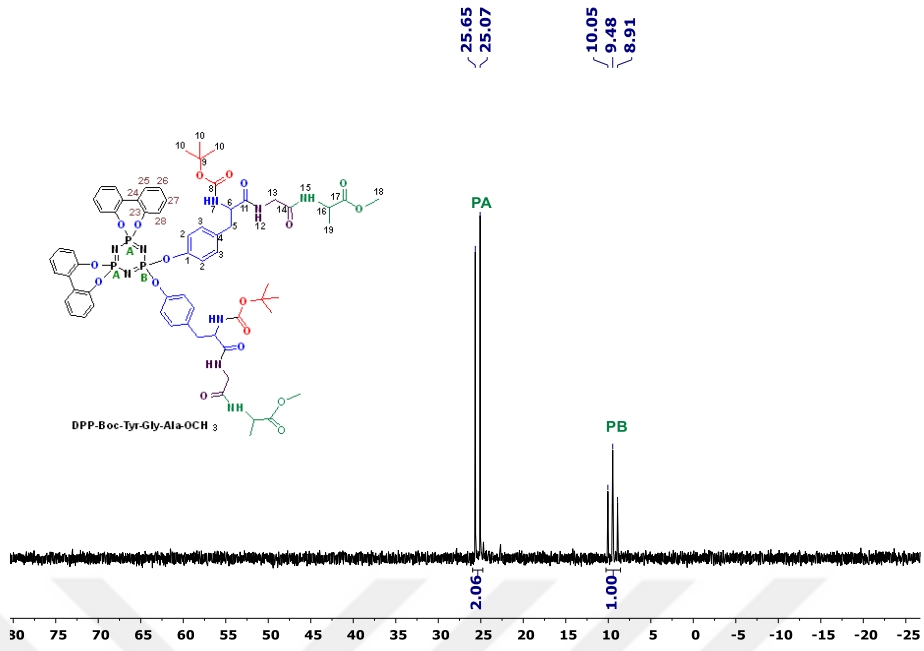
DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ fosfazen bileşiminin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **1320.19 g/mol** dür. Şekil 4.67'deki MALDI-TOF MS spektrumunda 1320.401 m/z [M]⁺ karşılık gelmektedir. Bu da yapı ile uyumlu olduğunun en önemli kanıtlarından biridir.

4.3.3.7. Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Tripeptit bileşiminin 2,2-dikloro-4,4,6,6-bis[spiro(2',2''-dioksi-1',1''-bifenilil)]siklotrifosfazenin (DPP) reaksiyonu ve karakterizasyonu

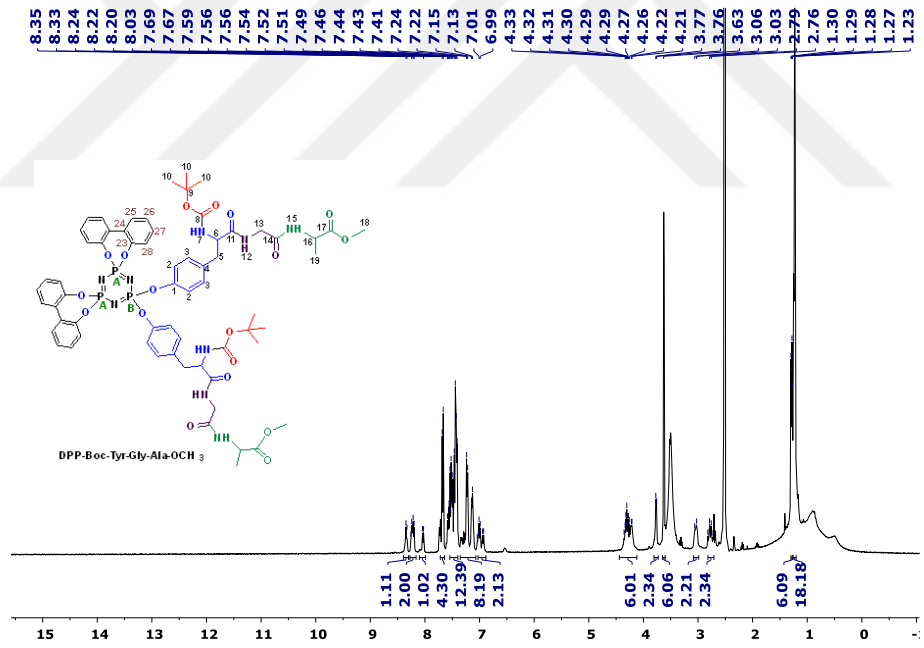
0.35 mmol **DPP**, 1.39 mmol (0.21 g) **K₂CO₃**, 1.04 mmol **Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃**. Verim: %12. **DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** bileşimine ait karakterizasyon spektrumları ve dataları FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT NMR ve MALDI-TOF MS sırasıyla Şekil 4.68, Şekil 4.69, Şekil 4.70, Şekil 4.71, Şekil 4.72 ve Tablo 4.17'de verilmiştir.



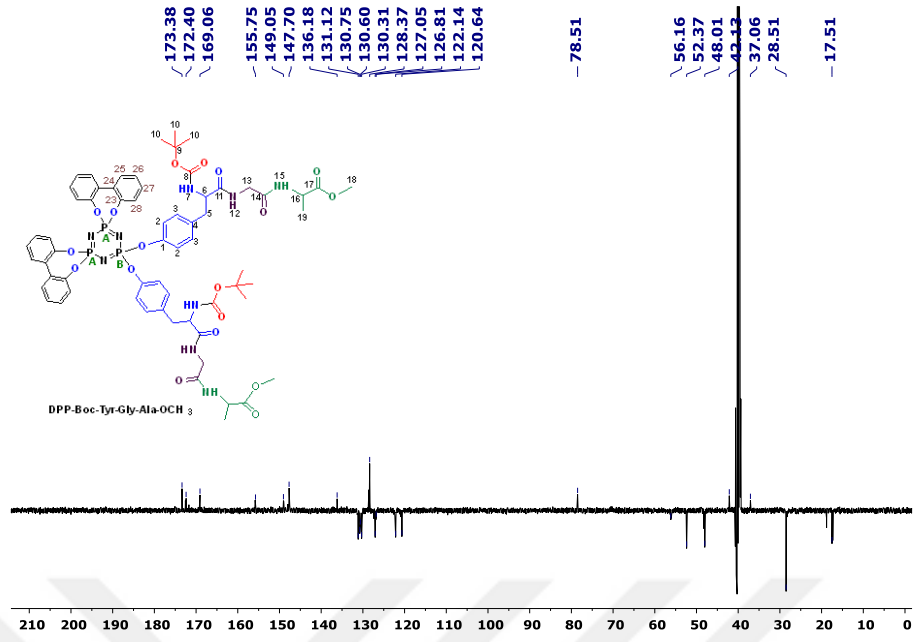
Şekil 4.68. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiminin FT-IR Spektrumu (ATR)



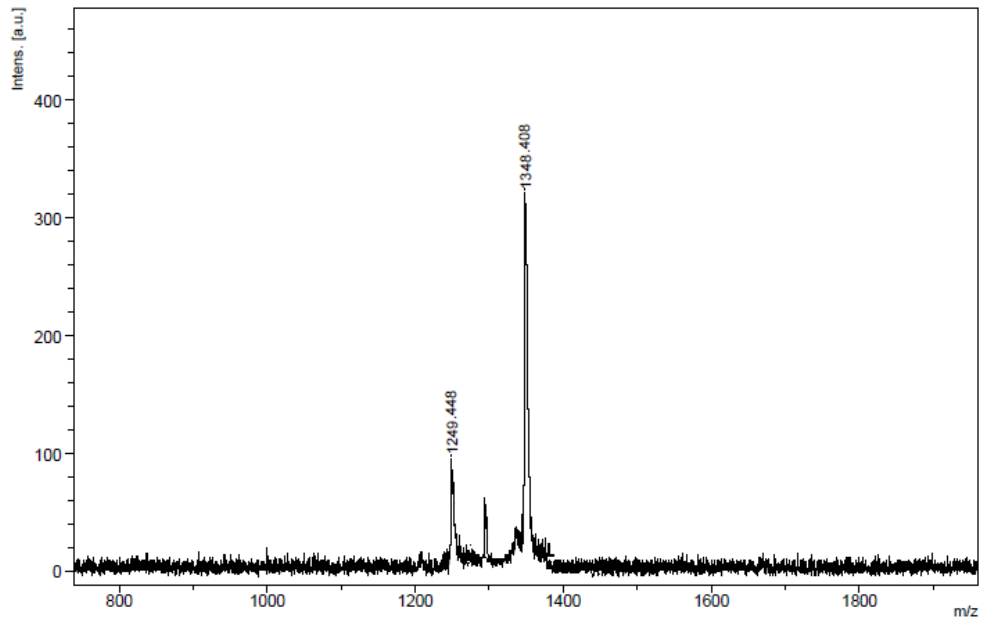
Şekil 4.69. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ³¹P-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.70. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.71. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin ¹³C-APT NMR Spektrumu (DMSO-d₆)



Şekil 4.72. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin MALDI-TOF MS Spektrumu (DMSO-d₆)

Tablo 4.17. DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon sonuçları

³¹ P-NMR (ppm)	¹ H-NMR (ppm)	¹³ C –APT NMR (ppm)
25.07-25.65 (2P, d, PA((-C ₁₂ H ₈ O ₂) ₂), 8.91-10.05 (1P, t, PB((C ₂₀ H ₂₇ O ₇ N ₃) ₂) A ₂ B spin sistemi	1.23 (18H, s, H ¹⁰), 1.27-1.30 (6H, m, H ¹⁹), 2.73-3.06 (4H, m, H ⁵), 3.63 (6H, s, H ¹⁸), 3.76-3.77 (2H, m, H ⁶), 4.21-4.35 (6H, m, H ¹³ , H ¹⁶), 6.92-7.04 (2H, d, H ⁷ (-NH)), 7.13-7.24 (8H, m, H ² , H ²⁸), 7.41-7.59 (12H, m, H ³ , H ²⁶ , H ²⁷), 7.67-7.69 (4H, m, H ²⁵), 8.03-8.35 (4H, H ¹² , H ¹⁵ (-NH)),	147.70 C ¹ , 169.06 C ¹⁴ , 120.64 C ² , 048.01 C ¹⁶ , 131.12 C ³ , 172.40 C ¹⁷ , 128.37 C ⁴ , 052.37 C ¹⁸ , 037.06 C ⁵ , 017.51 C ¹⁹ , 056.16 C ⁶ , 149.05 C ²³ , 155.75 C ⁸ , 136.18 C ²⁴ , 078.51 C ⁹ , 130.31 C ²⁵ , 028.51 C ¹⁰ , 127.05 C ²⁶ , 173.38 C ¹¹ , 130.60 C ²⁷ , 042.13 C ¹³ , 122.14 C ²⁸ ,
FT-IR (cm⁻¹)		DMSO-d₆ ¹³ C –APT : 40.14 ¹ H-NMR : 2.51 ve 3.24
VN-H, VC-H(Aromatik), 3288, 3321, 3417 3038, 3069 VC-H(Alifatik) 2934, 2979 VC=C 1503, 1528, 1607 VC=O 1658, 1691, 1707, 1741 (C=O) VP=N, VP-O-Ph 1166, 1227 946		
MALDI-TOF MS	Elementel Analiz (%)	
Mw (Teorik) : 1348.25 g/mol Deneyisel [M]⁺ : 1348.408 m/z	C₆₄H₇₂N₉O₁₈P₃ (Mw: 1348.25 g/mol) Teorik : C,57.02; H, 5.38; N, 9.35 Deneyisel : C, 57.08; H, 5.41; N, 9.39	

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiğinin (**DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃**) FT-IR spektrumu Şekil 4.68’de ve yapıya ait karakteristik pikler Tablo 4.17’de verilmiştir. **Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** Tripeptit bileşiğinin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağı FT-IR spektrumunda 946 cm⁻¹’de gözlenmiştir. –OH gerilme titreşimlerine ait pik ise görülmemiştir. Karakteristik aromatik, alifatik, -NH, -C=C-, amit ve ester karbonilleri, P=N- pikleri FT-IR spektrumunda görülmektedir.

İki fosforun (PA) kimyasal çevrelerinin aynı olduğunu ve spin sisteminin ise A₂B şeklinde olduğunu göstermektedir. Başlangıç maddesi olan **DPP** bileşiğinin ³¹P-NMR spektrumu incelendiğinde **DPP** bileşiğindeki P-Cl gruplarının olduğu ve üçlü pik olarak görülen 28.71-29.69 ppm’deki pik (1P, t, PB(PCl₂)), tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 8.91-10.05 ppm’e (1P, t, PB((C₂₀H₂₇O₇N₃)₂) kaymıştır. P-Cl gruplarının olduğu fosfor pikide spektrumda gözlenmemiştir. Bifenil gruplarının bağlı olduğu fosfor pikleri ise (PA), **DPP** bileşiğinde 19.22-19.71 ppm’den (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂) tripeptitin halkaya bağlanması ile 25.07-25.65 ppm’e (2P, d, PA((-C₁₂H₈O₂)₂) kaymıştır. **DPP** bileşiğindeki fosforlara ait olan piklerin, elde edilen bileşik **DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃**’ün Şekil 4.69’daki ³¹P-NMR spektrumunda gözlenmemiştir.

Benzer şekilde tripeptit bileşiğinin fosfazen halkasına bağlanması ile birlikte 9.08 ppm’deki fenolik –OH protonu tripeptit süstitüe fosfazen bileşiğinin Şekil 4.70’deki ¹H-NMR spektrumunda

gözlenmemiştir. Dahası hem tripeptitin hem **DPP** fosfazen bileşiğinin yapısında yer alan karakteristik proton pikleri spektrumda görülmektedir. İntegral yüksekliklerinin uyumu ve yapıda olması gereken proton piklerinin varlığı yapının oluştuğunun önemli kanıtlarıdır.

Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ tripeptit bileşiğinin **DPP** fosfazen başlangıç maddesi ile reaksiyonu sonucu **DPP** bileşiğindeki –Cl atomlarının tripeptit yapısındaki fenolik –OH ile yer değiştirmesi ile oluşan P-O-Ph bağına ait ipso karbonu ¹³C-APT spektrumunda 147.70 (C1) ppm’de görülmektedir. Tripeptit bileşiğinin NMR spektrumunda HO-Ph piki 155.21 ppm’de (C¹) gözlenmiştir. Fakat P-O-Ph bağının oluşması ile bu pik kaybolmuştur. Buda yapının bağlandığının en önemli kanıtıdır. Hem tripeptitin hem de **DPP** fosfazen bileşiğine ait aromatik karbonlar, alifatik karbonlar bağlanmanın etkisi ile az da olsa kayma gözlenmiş ve Şekil 4.71’deki ¹³C-APT spektrumunda pikler görülmektedir. Flash kolon sisteminden gelen çok küçük önemli olmayan çözücü safsızlıkları az da olsa bulunmaktadır.

DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ fosfazen bileşiğinin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlığı **1348.25** g/mol dür. Şekil 4.72’deki MALDI-TOF MS spektrumunda 1348.408 m/z [M]⁺ karşılık gelmektedir. Bu da yapı ile uyumlu olduğunun kanıtlarından biridir.

DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ Bileşiğinin karakterizasyon spektrumları incelendiğinde tripeptite ait piklerin varlığı, kütle spektrumundan molekül ağırlığının bire bir örtüşmesi ve ilave bir safsızlığın gözlenmemesi yapının oluştuğunun en önemli kanıtlarıdır. Yinede, proton ve karbon NMR spektrumlarında Flash kromatografisinin kolonundan gelen çok küçük safsızlıklar bulunmaktadır. Bunlar ihmal edilebilecek boyuttadır.

4.3.4. Bileşiklerin Termal Özelliklerinin İncelenmesi

Bileşiklerin termal bozunması DTA cihazı kullanılarak 10 °C/dk ısıtma hızıyla 500/600 °C’ye kadar ısıtılarak TGA eğrileri kaydedilerek elde edilmiştir. TGA ölçümlerinin sonucuna göre 500/600 °C’ye kadar bozulmanın başladığı sıcaklıklar, bozulmanın %50 olduğu sıcaklık değeri ve 500/600 °C’deki atık yüzdeleri Tablo 4.18’de verilmiştir.

Tablo 4.18. Bileşiklerin TGA analiz sonuçları

Bileşikler	T _{baş} (°C)	T _{%50} (°C)	500 °C'deki % atık miktarı
Dipeptit Bileşikler			
Boc-Tyr-Gly-OCH₃ (TG)	204	328.11	16.63
Boc-Tyr-Ala-OCH₃ (TA)	199	315.60	10.61
Boc-Tyr-Gly-OH (TGO)	141	330.05	11.88
Boc-Tyr-Ala-OH (TAO)	142	338.42	19.62
Tripeptit Bileşikleri	T_{baş} (°C)	T_{%50} (°C)	500 °C'deki % atık miktarı
Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ (TAA)	200	300.58	6.62 / -
Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ (TAG)	196	311.25	18.58 / -
Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ (TAV)	210	294.73	4.23 / -
Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ (TAP)	206	309.90	10.05 / 9.01
Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ (TGG)	197	314.09	20.65 / 15.39
Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ (TGA)	204	298.15	20.41 / 3.67
Tripeptit-Siklotrifosfazen Bileşikleri	T_{baş} (°C)	T_{%50} (°C)	600 °C'deki % atık miktarı
DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃ (DTAA)	212	>600	59.73
DPP-Boc-Tyr-Ala-Gly-OCH₃ (DTAG)	222	522.10	41.25
DPP-Boc-Tyr-Ala-Val-OCH₃ (DTAV)	227	482.61	34.77
DPP-Boc-Tyr-Ala-Phe-OCH₃ (DTAP)	221	492.06	36.60
DPP-Boc-Tyr-Gly-Gly-OCH₃ (DTGG)	211	531.25	41.13
DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃ (DTGA)	212	>600	78.87

Siklotrifosfazen bileşiklerinde ise %50'sinin bozunduğu sıcaklıklar 400 °C'nin üzerindedir. **DPP-Boc-Tyr-Ala-Ala-OCH₃** ve **DPP-Boc-Tyr-Gly-Ala-OCH₃** bileşiklerinde %50 oranındaki bozunma sıcaklıkları 600 °C'nin üzerindedir. Bu bileşiklerin 500/600 °C'ye kadar olan ısıtılarda genellikle % atık miktarında %50'ye yakındır. Bu da sübstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin, sübstitüe olan gruba göre termal olarak daha kararlı bir yapıya sahip olduklarını ortaya koymaktadır.

4.4. Bileşiklerin İn Vitro Sitotoksik ve Genotoksik Özelliklerinin İncelenmesi

4.4.1. İn Vitro Sitotoksisite Aktivite Çalışmaları

Elde edilen bileşikler için belirlediğimiz 1, 5, 25, 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının hücre canlılık oranlarında meydana getirdiği % değişimler MTT assay ile belirlendi [36-39]. Bu yöntem, MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, MTT canlı hücrelere aktif olarak absorbe olur ve reaksiyon mitokondriyal süksinat dehidrogenaz tarafından katalize edilerek mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazan oluşumu, yalnızca aktif mitokondrinin bulunduğu canlı hücrelerde gözlenmektedir. Bu da hücre canlılığının bir belirteci olarak kabul edilir ve spektrofotometrik olarak belirlenen değer, yaşayan hücre sayısı ile ilişkilendirilir. Steril PBS içerisinde hazırlanan stok MTT solüsyonundan, 0,5 mg/mL MTT çalışma solüsyonu hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara ilave edildi. İnkübatörde 3 saat bekletildikten sonra plakalardaki hücrelerin optik dansiteleri, ELISA cihazında (Synergy HT

ABD) 550 nm dalga boyunda okutuldu. Kontrol kuyucukları okutularak, elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması alındı ve bu değer %100 canlı hücre olarak kabul edildi. Çözücü ve ajan uygulanan kuyucuklardan elde edilen absorbans değerleri, kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık olarak kabul edildi [40, 41].

Çalışmamızda hücre tipi olarak insan yumurtalık kanser hücre serisi (A2780) ve insan prostat kanser hücre serileri (PC-3) kullanıldı.

Tüm hücreler 25 cm² kültür flaklarında, RPMI-1640 medyum (içerisine %10 FCS, 100U/mL penisilin ve 0.1 mg/mL streptomisin ilave edilerek hazırlanan) ile beslendiler. Karbondioksitli (%5 CO₂) inkübatör de, 37 °C'de ve nemli ortamda tutulan hücrelerin medyumları haftada iki defa değiştirildi. Hücreler konfluent olduğunda, tripsin-EDTA solüsyonu kullanılarak flaklardan söküldü ve 96 kuyucuklu plaklara aktararak 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difenil tetrazolium bromid (MTT) analizlerinde kullanıldı.

Maddelerin DMSO (dimetilsülfoksit) içerisindeki çözeltileri hücre kültüründe kullanılmıştır. Bu neden ile çıkan sonuçların karşılaştırılmasında DMSO'ya karşı maddelerin etkileri istatistiksel analizi yapılarak tespit edildi. DMSO ORANI %1'in altında olacak şekilde çözeltiler hazırlanmıştır. Test edilen bileşiklerin, 1, 5, 25, 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonları ile aynı miktarlarda çözücü (DMSO) hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara ilave edildi ve CO₂ inkübatöründe (Panasonic/Japonya) 24 saat süreyle 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonlar sonrasında hücrelerin canlılık oranı bir hemositometrede % 0.4 tryphan blue kullanılarak belirlendi.

İstatistiksel Analizlerde IBM SPSS Statistics 22.0 (Windows) paket programı kullanıldı. Shapiro Wilk testi ile normal dağılıma uygunluk değerlendirildi. Nicel değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmaları, Kruskal Wallis H testi ile ölçüldü. Gruplar arasında önemli istatistiksel farklılık belirlendiğinde gruplar arası çoklu karşılaştırmalar Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ile yapıldı. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. P<0.05 değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi. LogIC₅₀ değerleri, deneyler sonucunda elde edilen MTT sonuçlarına göre, bilgisayar ortamında Graphpad prism 6 programı kullanılarak hesaplandı.

Bileşiklerinin 1, 5, 25, 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarının hücre canlılık oranlarında meydana getirdiği % değişimleri insan kanser hücre hatlarına A2780 ve PC-3 karşı MTT assat metodu ile incelenmiş olup % hücre canlılık sonuçları ve LogIC₅₀/IC₅₀ değerleri Tablo 4.19'da verilmiştir.

Tablo 4.19. Tripeptit bileşiklerinin A2780 ve PC-3 hücre hatlarındaki % hücre canlılıkları ve LogIC₅₀ (%50 inhibisyona neden olan konsantrasyon) değerleri (µM) (*p<0.05) referans ilaç: RD: Docetaksel, RP: Paklitaksel

A2780 Cell Line							
	Kontrol	Çözücü	1 µM	5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
DTGG	100±8.67	95.81±8.09	88.19±7.84	97.029±9.73	66.79±6.44*	68.01±7.29*	34.54±3.51*
DTGA	100±8.67	95.81±8.09	88.88±7.86	96.15±1078	91.44±12.06	90.56±8.59	81.46±9.71
DTAA	100±8.67	95.81±8.09	99.40±11.71	100.82±9.61	94.74±8.22	63.10±5.75*	49.55±8.83*
DTAG	100±8.67	95.81±8.09	97.64±7.99	80.83±9.34	84.55±9.19	58.72±8.69*	58.12±5.20*
DTAV	100±8.67	95.81±8.09	95.18±8.39	98.28±4.09	99.55±1.86	87.67±6.16	54.60±2.27*
DTAP	100±8.67	95.81±8.09	102.63±8.16	100.01±9.08	93.13±8.88	42.21±4.34*	37.39±5.06*
RP	100±9.67	91.25±8.16	75.43±3.70*	60.50±4.37*	17.30±4.2*	8.65±2.8*	1.0±1.99*
PC-3 Cell Line							
	Kontrol	Çözücü	1 µM	5 µM	25 µM	50 µM	100 µM
DTGG	100±8.77	90.44±9.85	84.21±10.16	88.22±13.21	65.33±9.33*	45.03±9.02*	24.26±6.84*
DTGA	100±8.77	90.44±9.85	88.44±9.85	89.89±8.03	64.67±6.30*	49.39±8.43*	50.59±9.52*
DTAA	100±8.77	90.44±9.85	92.59±10.28	90.06±12.53	82.12±10.95	66.10±9.52*	46.17±9.37*
DTAG	100±8.77	90.44±9.85	92.31±8.69	91.76±10.21	88.60±8.65	66.29±9.45*	41.61±6.53*
DTAV	100±8.77	90.44±9.85	90.47±9.94	72.25±7.56*	66.027±9.28*	58.55±7.28*	41.41±9.70*
DTAP	100±8.77	90.44±9.85	91.15±7.21	88.03±8.69	63.32±9.30*	39.83±6.16*	14.13±9.55*
RD	100±8.76	94.22±7.87	80.85±0.61*	80.31±3.46*	52.18±2.45*	32.12±1.60*	4.02±0.37*
LogIC ₅₀ /IC ₅₀ (µM)							
	A2780				PC-3		
DTGG	1,23 / 17,27				1,858 / 72,14		
DTGA	-				-		
DTAA	2,06 / 112,3				1,381 / 24,05		
DTAG	2,011 / 105,5				2,603 / 400,7		
DTAV	2,282 / 191,6				1,334 / 21,6		
RP	0.7516/5.645				-		
RD	-				1.308/20.33		

4.4.2. İn Vitro Genotoksisite (DNA Hasarı) Çalışmaları

Comet Assay

Tek hücre jel elektroforezi olarak da bilinen Comet Assay, memelilerin DNA hasarını (Genotoksisite) belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [42]. Nötral comet assay tekniği Devlin vd. [43] tarafından tarif edilen metotta küçük değişiklikler yapılarak uygulandı. İlk olarak rodajlı lamalar mikrodalga fırında PBS içerisinde çözdürülen %0.65'lik high melting agarose (HMA) ile kaplandı ve karanlıkta 1 gün süreyle kurumaya bırakıldı. Kültüre edilen A2780 ve PC-3 hücreleri, test edilecek bileşiklerin etki gösterdiği en yüksek konsantrasyonda (100 µM) ile 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 42 °C sıcaklıktaki low melting agarose ile karıştırıldı. HMA ile kaplanmış lam üzerine yayılarak ve lamaların üzeri hızlı bir şekilde lamelle kapatılarak agar katılaşınca kadar 10-15 dakika süreyle +4 °C'de karanlıkta tutuldu. Daha sonra lamalar stok lizis solüsyonundan (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH: 10) taze olarak hazırlanan soğuk lizis solüsyonu (stok lizis solüsyonuna, %1 Triton X-100 ve %10 DMSO ilave edilerek hazırlanacak) içerisine yerleştirildi ve yine karanlıkta +4 °C'de 1 saat süreyle bekletildi.

Elektroforez

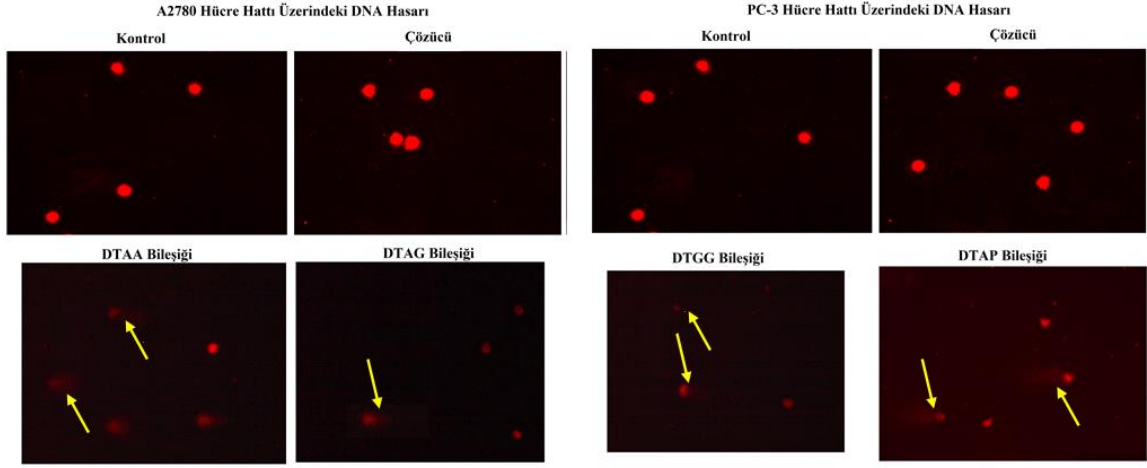
Lizis işleminden sonra lamalar içerisi soğuk nötral elektroforez tamponu ile dolu yatay bir elektroforez tankına (Bio-Rad, ABD) aynı yönlü olarak yerleştirildi. Lamalar tanka yerleştirilmeden önce tankın voltajı 25 V (0.83 V/cm), amperi de 300 mA'e sabitlendi ve 20 dakika süreyle işleme devam edildi. Elektroforez sonrasında lamalar nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris, pH 7.5) ile 3 kez 5 dk, +4 °C'de nötralize edildi. Daha sonra lamalar, 50 µL ethidium bromide ile boyandı üzerleri lamel ile kapatılarak karanlıkta +4 °C'de yaklaşık 20-30 dk. kadar bekletildi.

Skorlama

Skorlama işlemi, bir floresans mikroskop (Leica) ve Comet IV software programı kullanılarak yapıldı. Uygulamalardan sonra hücreler mikroskopta görüntülenerek DNA hasarının derecesi Comet IV software programı ile değerlendirildi. Her lamdan rastgele en az 25 hücre sayılarak, grupların Kuyruk Uzunluğu (Tail length (TL)), Kuyruk yoğunluğu (Tail intensity (TI)), Olive Kuyruk Yoğunluğu (Olive Tail Intensity (OTI)), Kafa Çapı (Head Length (HL)), ve Kafa Yoğunluğu (Head intensity (HI)) parametrelerinde meydana gelen değişiklikler ile DNA hasarının varlığını ve oranını belirlenmiştir. Tripeptit süstitü siklotrifosfazen bileşiklerinin A2780 ve PC-3 hücre kültürlerine uygulanmasından 24 saat sonra TL, TI, OTI, HD ve HI değerlerinde meydana gelen değişiklikler Tablo 4.20'de verilmiştir.

Tablo 4.20. Tripeptit süstitü siklotrifosfazen bileşiklerinin A2780 ve PC-3 hücre kültürlerine uygulanmasından 24 saat sonra TL, TI, OTI, HD ve HI değerlerinde meydana gelen değişiklikler

A2780 Hücre Hatlarındaki DNA Hasarı					
	Kuyruk Uzunluğu (Tail length (TL))	Kuyruk yoğunluğu (Tail intensity (TI))	Olive Kuyruk Yoğunluğu (Olive Tail Intensity (OTI))	Kafa Çapı (Head Length (HL))	Kafa Yoğunluğu (Head Intensity (HI))
KONTROL	19,15±1,41	32,54±3,03	6,08±1,49	57,51±11,81	531,26±237,48
CÖZÜCÜ	20,42±5,10	88,42±12,97	5,67±1,99	59,2±8,59	240,24±79,45
DTGG	37,48±11,07*	100,69±47,22*	17,55±9,96*	23,06±8,24*	120,58±98,08
DTGA	-	-	-	-	-
DTAA	90,12±68,86*	415,98±356,76*	45,10±35,34*	48,25±20,64	179,64±135,21
DTAG	172,66±203,33*	1270,65±1042,32*	81,48±103,53*	76,93±27,74	1004,53±536,23*
DTAV	66,58±41,72*	341,71±269,96*	30,74±20,67*	48,07±14,87	299,58±180,17
DTAP	19,24±1,3	89,57±21,53	3,22±0,54	99,5±10,24*	1575,80±300,34*
PC-3 Hücre Hatlarındaki DNA Hasarı					
	Kuyruk Uzunluğu (Tail length (TL))	Kuyruk yoğunluğu (Tail intensity (TI))	Olive Kuyruk Yoğunluğu (Olive Tail Intensity (OTI))	Kafa Çapı (Head Length (HL))	Kafa Yoğunluğu (Head Intensity (HI))
KONTROL	5,48±2,49	291,28±172,46	2,10±1,74	13,88±5,83	1602,45±1233,35
CÖZÜCÜ	5,98±4,57	349,27±429,61	1,95±2,03	15,36±5,82	1933,55±1415,11
DTGG	22,55±27,99*	1433,75±2018,00*	8,86±13,78	17,17±5,47	2428,09±1128,00
DTGA	22,56±24,85*	2224,17±4055,12*	9,27±12,10	15,57±7,00	2114,34±1667,86
DTAA	11,23±12,66	674,75±1105,37	4,77±7,22*	11,77±4,37	1080,82±686,96
DTAG	7,18±9,75	362,57±409,90	2,79±5,34	13,23±3,54	1389,78±631,07
DTAV	10,31±14,13*	646,77±1110,77*	3,85±7,72*	15,65±4,4*	1859,04±1043,81
DTAP	11,99±16,68*	788,36±1251,52*	4,27±7,54*	17,05±2,04	2214,44±532,95



Şekil 4.73. Bileşiklerin bazılarının Comet Assay denemeleri kapsamında A2780 ve PC-3 kanser hücrelerinden elde edilen örnek görüntüleri (Sarı ok işaretleri DNA hasarı meydana gelen ve comet görüntüsü elde edilen hücreleri göstermektedir; X10)

Sitotoksik etki gösteren bileşiklerde A2780 ve PC-3 hücre hatları üzerindeki hücre ölümlerini DNA hasarı üzerinden yaptığı comet assay deney sonuçlarından tespit edilmiştir. Tablo 4.20 ve Şekil 4.73’de hasar parametreleri ve hücrelerde meydana gelen değişiklikler gösterilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ilk olarak, başlangıç bileşiği olarak amin grubu korumalı karboksil grubu serbest olan tirozin aminoasitinin (**Boc-Tyr-OH**) sırasıyla Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**) ve Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**) metil ester hidroklorür formları ile CDMT yöntemi ile asetonitril ortamında etkileştirilerek metil ester grubu bulunan 2 adet dipeptit bileşiği (**Boc-Tyr-Gly-OCH₃** ve **Boc-Tyr-Ala-OCH₃**) elde edildi [15].

Ardından bu dipeptitleri kullanılarak **3 farklı aşamada** reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. **Birinci aşamada**, metil esterli dipeptit bileşiklerinin ester grupları asetonitril içerisinde %8'lik NaOH çözeltisinin ilave edilmesi ile karboksil grubuna dönüştürülerek karboksil grupları serbest **Boc-Tyr-Gly-OH** ve **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptitleri sentezlenmiştir [16]. **Boc-Tyr-Gly-OH** ve **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptitleri bileşiklerinden **Boc-Tyr-Gly-OH** ile Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**) ve Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**), **Boc-Tyr-Ala-OH** dipeptiti ile sırasıyla Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**), Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**), Valin (**NH₂-Val-OCH₃.HCl**) ve Fenilalanin (**NH₂-Phe-OCH₃.HCl**) metil ester hidroklorür aminoasitleri ile asetonitril içerisinde CDMT yöntemine kullanılarak etkileştirilmesi ile 6 adet tripeptit bileşiği elde edilmiştir [16]. Üçüncü aşamada, elde edilen tripeptit bileşikleri, fosfazen başlangıç bileşiği olan **DPP** ile etkileştirilerek 6 adet disübsititü tripeptit-siklotrifosfazen bileşiği elde edildi. Elde edilen tüm bileşikler ince tabaka kromatografisi ile takip edilerek sonlandırıldı ve aynı hareketli faz göz önünde bulundurularak Flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır.

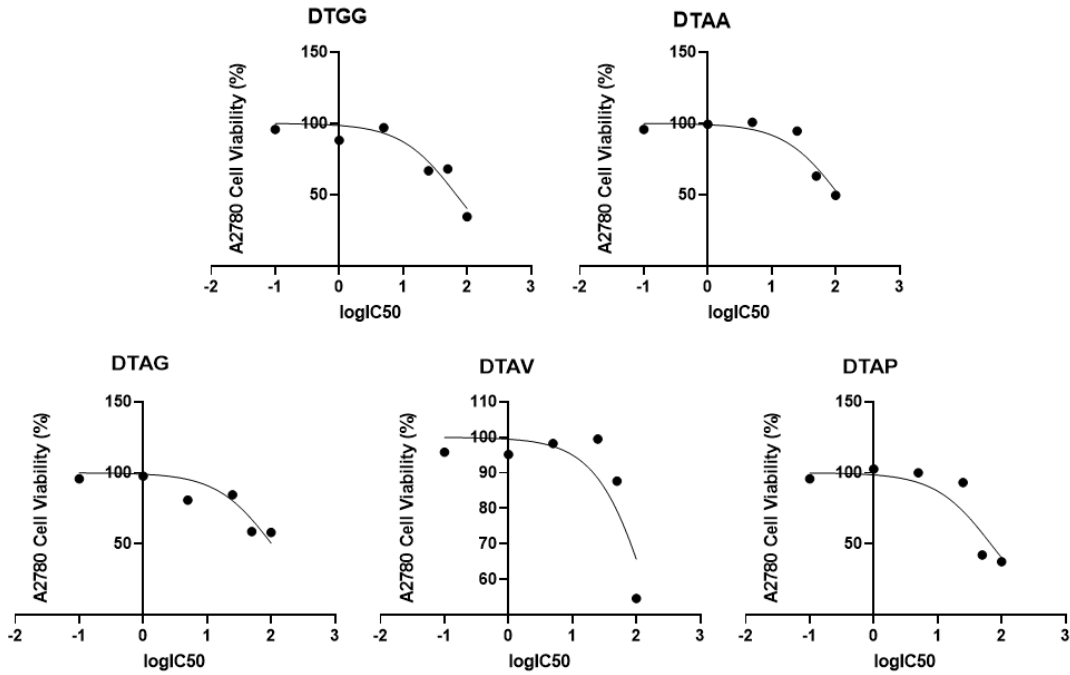
Saf olarak elde edilen tripeptitlerin yapısal karakterizasyonları elementel analiz, FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR spektrumları ile sübsititü fosfazen bileşiklerinin ise ek olarak ³¹P ve HETCOR (2D) NMR ve MALDI-TOF MS spektroskopi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Bileşiklerin termal özellikleri TGA yöntemi ile belirlendi. Disübsititü siklotrifosfazen bileşiklerinin 600 °C'ye kadar alınan TGA eğrilerinden bileşiklerin neredeyse tamamının bozunmaya başladığı sıcaklık 400 °C'nin üzerindedir. Bu sonuçlar neticesinde elde edilen siklotrifosfazenlerin termal olarak kararlı bir yapıda oldukları görülmektedir.

Karakterizasyon ile ilgili sonuçlar ve deneysel veriler ayrıntılı olarak sentez ve karakterizasyon başlığında belirtilmiştir.

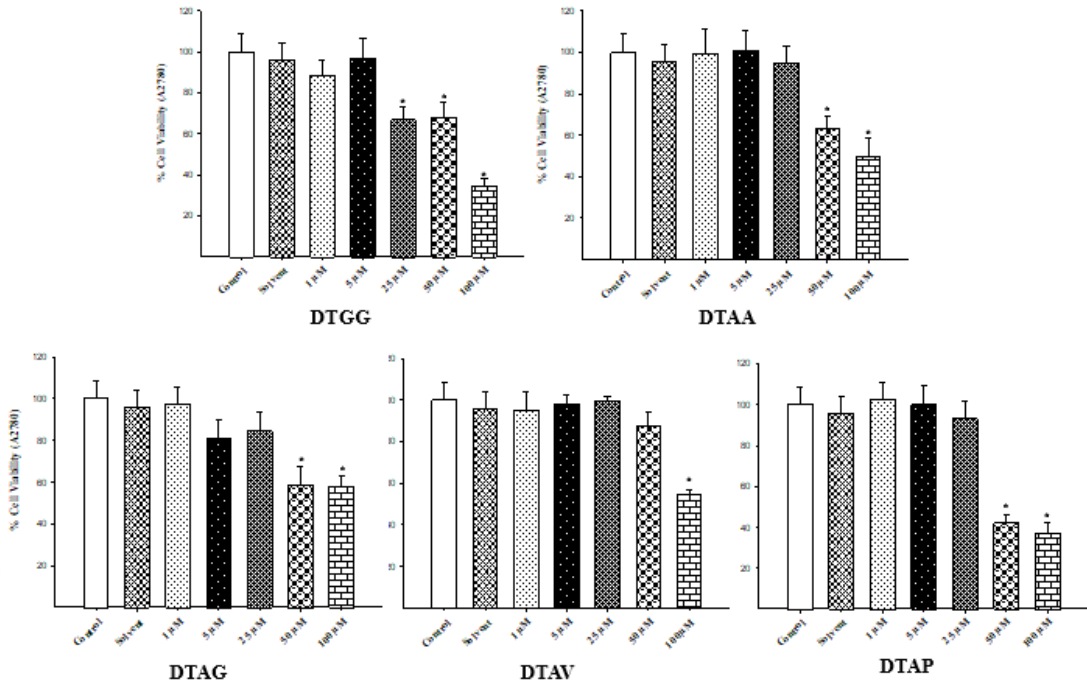
Saf olarak elde edilen bileşiklerin insan kanser hücre hatları over (A2780) ve prostat (PC-3) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite özellikleri MTT assay yöntemiyle belirlenerek % hücre canlılıkları belirlendi ve bileşiklerin LogIC₅₀ değerleri hesaplandı. Son olarak hücre ölümlerinin DNA hasarı mekanizması üzerinden olup olmadığı Comet Assay metodu ile belirlendi. % Hücre canlılıklarındaki değişimler ve LocIC₅₀ değerleri ve Comet Assay parametrelerindeki değişimler deneysel bölümde ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin **A2780** hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde ve tripeptit bileşiklerinin literatürdeki sonuçları ile karşılaştırıldığında aşağıdaki durumlar gözlenmiştir.

- Tripeptit bileşiminde doz bağımlı olarak etki gösteren **TGG, TAG, TAV, TAP** bileşikleri di süstitüe olarak fosfazen bileşimine bağlandığında, **DTGG** 25, 50 ve 100 μM 'lık dozlarda, **DTAG** ve **DTAP** için 50 ve 100 μM 'lık dozlarda, **DTAV** 100 μM 'lık dozda sitotoksik aktivite göstermişlerdir ($p < 0.05$). Benzer şekilde tripeptit **TGA** bileşimi 50 ve 100 μM 'lık dozda etki göstermişken, **DTGA** bileşimi hiçbir dozda istatistiksel olarak anlam taşıyabilecek bir etki göstermemiştir ($P > 0.05$).
- Yine de özellikle **DTAA** bileşimi 100 μM 'lık dozda % hücre canlılığını önemli oranda azaltmışlardır ($p < 0.05$). **DTAA** bileşimi tripeptit bileşimi **TAA** (sadece 100 μM) dan farklı olarak 50 ve 100 μM 'lık dozlarda etki göstermiştir ($p < 0.05$). Bileşiklerin LogIC50 grafikleri ve konsantrasyona karşı % hücre canlılığındaki değişimleri gösteren grafikler Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'de gösterilmiştir.



Şekil 5.1. PC-3 hücre hatlarına karşı LogIC50 grafikleri

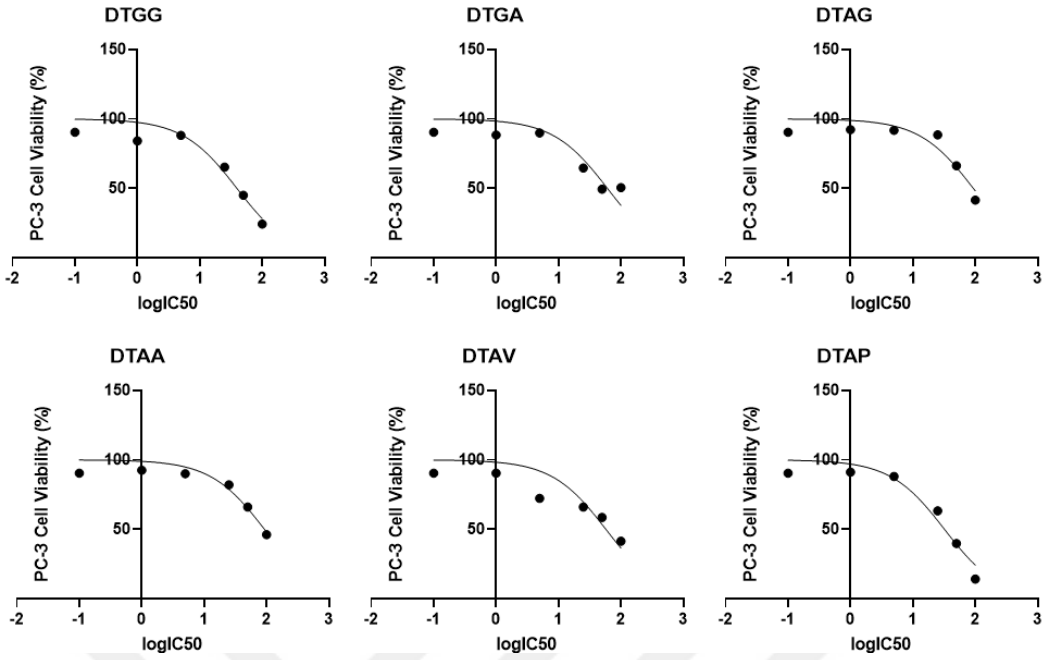


Şekil 5.2. A2780 hücre hatlarına karşı bileşiklerin hücre canlılığı (%). Bileşiklerin neden olduğu hücre canlılığındaki (%) değişiklikler kontrol verileriyle karşılaştırılmıştır. Her veri noktası 10 canlılığın ortalamasına sahiptir (* $p < 0.05$).

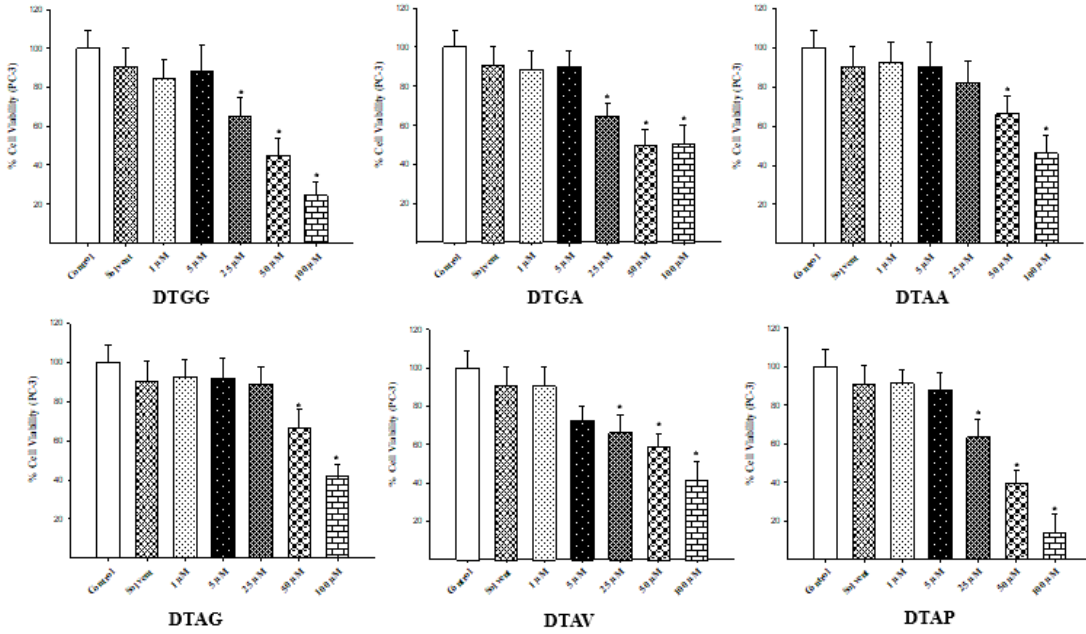
Tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin **PC-3** hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi incelendiğinde ve tripeptit bileşiği ile karşılaştırıldığında aşağıdaki durumlar gözlenmiştir.

- Tripeptit bileşiklerinden **TAA**, **TAG** hiçbir dozda etki göstermemiştir ($p > 0.05$). Fakat tripeptit süstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin hepsi sitotoksik etki göstermiştir ($p < 0.05$). Ayrıca % hücre canlılığında meydana gelen azalmalar fosfazen bileşiklerinde daha fazla olmuştur. Ek olarak tripeptit bileşiklerinden farklı olarak daha düşük dozlarda da etki göstermişlerdir.

Tripeptit bileşiğinde **TGG** 50 ve 100 μM 'lık dozlarda, **TGA** ve **TAV** 100 μM 'lık dozda, **TAP** ise 5, 25, 50, 100 μM 'lık dozlarda sitotoksik etkiye sahip iken ($p < 0.05$). Bu tripeptit bileşiklerini fosfazen halkasına bağlandığında **DTGG**, **DTGA**, **DTAV** bileşikleri 25, 50 ve 100 μM 'lık dozlarda, etki göstermiştir ($p < 0.05$). **DTAP** bileşiği ise 5, 25, 50 ve 100 μM 'lık dozlarda etki göstermiştir ($p < 0.05$). Bu sonuçlar neticesinde tüm tripeptit-fosfazen bileşiklerini tripeptit bileşiklerine göre daha iyi aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Buda bağlanan süstitüent sayısı arttıkça aktivitenin de artması ile açıklanabilir bir sonuç olduğunu göstermektedir. Bileşiklerin LogIC50 grafikleri ve konsantrasyona karşı % hücre canlılığındaki değişimleri gösteren grafikler Şekil 5.3 ve Şekil 5.4'de verilmiştir.



Şekil 5.3. PC-3 hücre hatlarına karşı bileşiklerin LogIC50 grafikleri



Şekil 5.4. A2780 hücre hatlarına karşı bileşiklerin hücre canlılığı (%). Bileşiklerin neden olduğu hücre canlılığındaki (%) değişiklikler kontrol verileriyle karşılaştırılmıştır. Her veri noktası 10 canlılığın ortalamasına sahiptir (* $p < 0.05$).

Bileşiklerinin insan over (A2780) ve prostat (PC-3) kanser hücre hattındaki DNA hasarı çalışmaları en yüksek konsantrasyon da gerçekleştirildi. 100 μM 'lık dozda meydana getirdiği Kuyruk Uzunluğu (Tail length (TL)), Kuyruk yoğunluğu (Tail intensity (TI)), Olive Kuyruk Yoğunluğu (Olive Tail Intensity (OTI)), Kafa Çapı (Head Length (HL)), ve Kafa Yoğunluğu (Head intensity (HI)) parametreleri incelendi. Yapılan comet deneyleri sonucunda kültür ortamına eklenen maddelerin hücrelerin yukarıdaki parametre değerleri üzerinde etkili olduğu istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Detaylı sonuçlar deneysel bölümde verilmiştir. 24 saat süreyle inkübasyon sonrası hücre canlılığında meydana gelen azalmanın temelinde DNA hasarına bağlı olarak hücrelerde gelişen ölümün ortaya çıktığı comet assay deneyleriyle belirlendi ($p<0.05$).



6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, tirozin amino asitinden (**Boc-Tyr-OH**) yola çıkarak önce Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**) ve Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**) amino asitleri ile dipeptit bileşikleri (**Boc-Tyr-Gly-OCH₃** ve **Boc-Tyr-Ala-OCH₃**) daha sonra ise Glisin (**NH₂-Gly-OCH₃.HCl**), Alanin (**NH₂-Ala-OCH₃.HCl**), Valin (**NH₂-Val-OCH₃.HCl**) ve Fenilalanin (**NH₂-Phe-OCH₃.HCl**) amino asitleri ile 6 adet tripeptit bileşiği sentezlendi. Elde edilen tüm bileşikler ince tabaka kromatografisi ile takip edilerek sonlandırıldı ve aynı hareketli faz göz önünde bulundurularak Flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen tripeptitlerin yapısal karakterizasyonları elementel analiz, FT-IR, ¹H, ¹³C-APT NMR spektrumları ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen tripeptit bileşiği dispiro fosfazen bileşiği (**DPP**) ile 1:2 ekivalent olacak şekilde etkileştirilerek ilk bu çalışma kapsamında olmak üzere yeni tripeptit süstitüe fosfazen bileşikleri elde edildi. Elde edilen fosfazen bileşikleri ince tabaka kromatografisi ile takip edilerek sonlandırıldı ve aynı hareketli faz göz önünde bulundurularak Flash kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saf olarak elde edilen fosfazen bileşiklerinin yapısal karakterizasyonları elementel analiz, FT-IR, ³¹P, ¹H, ¹³C-APT, HETCOR (2D) NMR, MALDI-TOF MS spektroskopik teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıntılı deneysel veriler ve spektrumlar sentez ve karakterizasyon başlığında belirtilmiştir.

Disüstitüe siklotrifosfazen bileşiklerinin 600 °C'ye kadar alınan TGA eğrilerinden bileşiklerin neredeyse tamamının bozunmaya başladığı sıcaklık 400 °C'nin üzerindedir. Bu sonuçlar neticesinde elde edilen siklotrifosfazenlerin termal olarak kararlı bir yapıda oldukları da belirlenmiştir.

Saf olarak elde edilen bileşiklerin insan kanser hücre hatları over (A2780) ve prostat (PC-3) kanser hücre hatlarına karşı sitotoksikite özellikleri MTT assay yöntemiyle belirlenerek % hücre canlılıkları belirlendi ve bileşiklerin LogIC₅₀ değerleri hesaplandı. Son olarak hücre ölümlerinin DNA hasarı mekanizması üzerinden olup olmadığı Comet Assay metodu ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar kanser hücre hatlarında meydana gelen azalmaların DNA hasarı mekanizması üzerinden olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar neticesinde bileşiklerin potansiyel bir ilaç aday molekül olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] M. Gleria, R. De Jaeger, *Applicative Aspects of Cyclophosphazenes*, Nova Science Publishers 2004.
- [2] H. Allcock, Recent advances in phosphazene (phosphonitrilic) chemistry, *Chemical Reviews* 72 (1972) 315-356.
- [3] H. Baek, Y. Cho, C.O. Lee, Y.S. Sohn, Synthesis and antitumor activity of cyclotriphosphazene-(diamine) platinum (II) conjugates, *Anti-Cancer Drugs* 11 (2000) 715-725.
- [4] K. Brandt, R. Kruszynski, T.J. Bartczak, I. Porwolik-Czomperlik, AIDS-related lymphoma screen results and molecular structure determination of a new crown ether bearing aziridinylcyclophosphazene, potentially capable of ion-regulated DNA cleavage action, *Inorg Chim Acta* 322 (2001) 138-144.
- [5] H.J. Bolink, E. Barea, R.D. Costa, E. Coronado, S. Sudhakar, C. Zhen, A. Sellinger, Efficient blue emitting organic light emitting diodes based on fluorescent solution processable cyclic phosphazenes, *Organic electronics* 9 (2008) 155-163.
- [6] G.Y. Çiftçi, N. Bayık, E.T. Eçik, E. Şenkuytu, M. Akşahin, T. Yıldırım, Synthesis of the first 2-hydroxyanthraquinone substituted cyclotriphosphazenes and their cytotoxic properties, *New J Chem* 44 (2020) 16733-16740.
- [7] R. Xue, H. Gou, Y.-P. Zheng, Y.-S. Liu, H.-H. Rao, G.-H. Zhao, A novel microporous phosphazene-triazinyl based covalent organic framework: Preparation, characterization and fluorescence properties, *Optik* 242 (2021) 167184.
- [8] E. Özcan, B.T. Aksoy, E.T. Eçik, A. Dere, A. Karabulut, F. Yakuphanoglu, B. Çoşut, Fabrication of hybrid photodiode systems: BODIPY decorated cyclotriphosphazene covalently grafted graphene oxides, *Inorganic Chemistry Frontiers* 7 (2020) 2920-2931.
- [9] V. Chandrasekhar, *Inorganic and organometallic polymers*, Springer 2005.
- [10] V. Chandrasekhar, V. Krishnan, *Advances in the chemistry of chlorocyclophosphazenes*, (2002).
- [11] A.J. Elias, M.S. Jean'ne, Perfluorinated cyclic phosphazenes, *Advances in Inorganic Chemistry* 52 (2001) 335-358.
- [12] R.A. Shaw, B. Fitzsimmons, B.C. Smith, *The Phosphazenes (Phosphonitrilic Compounds)*, *Chemical Reviews* 62 (1962) 247-281.
- [13] C.W. Allen, Regio- and stereochemical control in substitution reactions of cyclophosphazenes, *Chemical Reviews* 91 (1991) 119-135.
- [14] C.E. Garrett, X. Jiang, K. Prasad, O. Repič, New observations on peptide bond formation using CDMT, *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 4161-4165.
- [15] K. Koran, E. Çalışkan, D.A. Öztürk, İ. Çapan, S. Tekin, S. Sandal, A.O. Görgülü, The first peptide derivatives of dioxybiphenyl-bridged spiro cyclotriphosphazenes: In vitro cytotoxicity activities and DNA damage studies, *Bioorganic Chemistry* 132 (2023) 106338.
- [16] E. Çalışkan, A. Kaplan, G. Şekerci, İ. Çapan, S. Tekin, S. Erkan, K. Koran, S. Sandal, A.O. Görgülü, Synthesis, docking studies, in vitro cytotoxicity evaluation and DNA damage mechanism of new tyrosine-based tripeptides, *Journal of biochemical and molecular toxicology* 37 (2023) e23388.
- [17] K. Koran, F. Özen, G. Torğut, G. Pıhtılı, E. Çil, A.O. Görgülü, M. Arslan, Synthesis, characterization and dielectric properties of phosphazenes containing chalcones, *Polyhedron* 79 (2014) 213-220.
- [18] H. Akbaş, A. Karadağ, A. Destegül, Ç. Çakırlar, Y. Yerli, K.C. Tekin, U. Malayoğlu, Z. Kılıç, Synthesis, and spectroscopic, thermal and dielectric properties of phosphazene based ionic liquids: OFET application and tribological behavior, *New J Chem* 43 (2019) 2098-2110.
- [19] S.N.K. Usri, Z. Jamain, M.Z.H. Makmud, A review on synthesis, structural, flame retardancy and dielectric properties of hexasubstituted cyclotriphosphazene, *Polymers* 13 (2021) 2916.
- [20] P. Schrögel, M. Hoping, W. Kowalsky, A. Hunze, G. Wagenblast, C. Lennartz, P. Strohriegel, Phosphazene-based host materials for the use in blue phosphorescent organic light-emitting diodes, *Chemistry of Materials* 23 (2011) 4947-4953.

- [21] E. Şenkuytu, E.T. Eçik, Octa-BODIPY derivative dendrimeric cyclotetraphosphazenes; photophysical properties and fluorescent chemosensor for Co²⁺ ions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 173 (2017) 863-870.
- [22] G. Yang, W.-H. Wu, Y.-H. Wang, Y.-H. Jiao, L.-Y. Lu, H.-Q. Qu, X.-Y. Qin, Synthesis of a novel phosphazene-based flame retardant with active amine groups and its application in reducing the fire hazard of Epoxy Resin, *Journal of hazardous materials* 366 (2019) 78-87.
- [23] X. Zhou, S. Qiu, X. Mu, M. Zhou, W. Cai, L. Song, W. Xing, Y. Hu, Polyphosphazenes-based flame retardants: A review, *Composites Part B: Engineering* 202 (2020) 108397.
- [24] J.K. Kim, U.S. Toti, R. Song, Y.S. Sohn, A macromolecular prodrug of doxorubicin conjugated to a biodegradable cyclotriphosphazene bearing a tetrapeptide, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 15 (2005) 3576-3579.
- [25] S.S. Machakanur, B.R. Patil, G.N. Naik, R.P. Bakale, S.A. Bligh, K.B. Gudasi, Synthesis, characterization and antiproliferative activity of hexa arm star shaped thiosemicarbazones derived from cyclotriphosphazene core, *Inorg Chim Acta* 421 (2014) 459-464.
- [26] D. Erdener Çıralı, Z. Uyar, İ. Koyuncu, N. Hacıoğlu, Synthesis, characterization and catalytic, cytotoxic and antimicrobial activities of two novel cyclotriphosphazene-based multisite ligands and their Ru (II) complexes, *Appl Organomet Chem* 29 (2015) 536-542.
- [27] J. Chen, L. Wang, Y. Fan, Y. Yang, M. Xu, X. Shi, Synthesis and anticancer activity of cyclotriphosphazenes functionalized with 4-methyl-7-hydroxycoumarin, *New J Chem* 43 (2019) 18316-18321.
- [28] Ö. İşcan, R. Cemaloğlu, N. Asmafiliz, C.T. Zeyrek, Z. Kılıç, L. Açıık, B. Aydın, M. Türk, T. Hökelek, Phosphorus–nitrogen compounds: part 53—synthesis, characterization, cytotoxic and antimicrobial activity, DNA interaction and molecular docking studies of new mono- and dispirocyclotriphosphazenes with pendant arm (s), *Molecular Diversity* 26 (2022) 1077-1100.
- [29] G.Y. Çiftçi, N. Bayık, G. Turhal, İ.N. Baslılar, A. Demiroglu-Zergeroglu, The first mono anthraquinone substituted monospiro cyclotriphosphazene derivatives and their effects on non-small cell lung cancer cells, *Inorg Chim Acta* 539 (2022) 121002.
- [30] A. Beytur, Ç. Tekin, E. Çalışkan, S. Tekin, K. Koran, A. Orhan Görgülü, S. Sandal, Hexa-substituted cyclotriphosphazene derivatives containing hetero-ring chalcones: Synthesis, in vitro cytotoxic activity and their DNA damage determination, *Bioorganic Chemistry* 127 (2022) 105997.
- [31] J.C. Sheehan, G.P. Hess, A new method of forming peptide bonds, *Journal of the American Chemical Society* 77 (1955) 1067-1068.
- [32] V. Percec, A.E. Dulcey, M. Peterca, P. Adelman, R. Samant, V.S. Balagurusamy, P.A. Heiney, Helical pores self-assembled from homochiral dendritic dipeptides based on L-tyr and nonpolar α -amino acids, *Journal of the American Chemical Society* 129 (2007) 5992-6002.
- [33] A. Baran^áMandal, A new micelle-forming peptide, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (1993) 237-238.
- [34] Y. OKADA, N. OHTA, Amino Acids and Peptides. VII. Synthesis of Methionine-Enkephalin using Transfer Hydrogenation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 30 (1982) 581-585.
- [35] G.A. Carriedo, L. Fernández-Catuxo, F.J. García Alonso, P. Gómez-Elipe, P.A. González, Preparation of a New Type of Phosphazene High Polymers Containing 2,2'-Dioxybiphenyl Groups, *Macromolecules* 29 (1996) 5320-5325.
- [36] A.O. Görgülü, K. Koran, F. Özen, S. Tekin, S. Sandal, Synthesis, structural characterization and anti-carcinogenic activity of new cyclotriphosphazenes containing dioxybiphenyl and chalcone groups, *J Mol Struct* 1087 (2015) 1-10.
- [37] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of immunological methods* 89 (1986) 271-277.
- [38] T.R. Mosmann, H. Cherwinski, M.W. Bond, M.A. Giedlin, R.L. Coffman, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 136 (1986) 2348-2357.
- [39] N.K. Singh, S.B. Singh, Biological and solid state electrical conductance properties of the complexes of 1-salicyloyl-4-benzoyl-3-thiosemicarbazide with manganese (II), cobalt (II),

nickel (II), copper (II), and zinc (II), Synthesis and reactivity in inorganic and metal-organic chemistry 32 (2002) 25-47.

- [40] S. Tekin, S. Sandal, C. Colak, Effects of Apelin-13 on human prostate cancer lines [İnsan Prostat Kanseri Hücre Serilerinde Apelin-13'ün Etkileri], Med Sci 303 (2014) 1427-418143.
- [41] B. Yilmaz, S. Sandal, C.H. Chen, D.O. Carpenter, Effects of PCB 52 and PCB 77 on cell viability, [Ca(2+)](i) levels and membrane fluidity in mouse thymocytes, Toxicology 217 (2006) 184-193.
- [42] M. Klaude, S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnström, The comet assay: mechanisms and technical considerations, Mutation Research/DNA Repair 363 (1996) 89-96.
- [43] H.-L. Devlin, P.C. Mack, R.A. Burich, P.H. Gumerlock, H.-J. Kung, M. Mudryj, R.W. deVere White, Impairment of the DNA repair and growth arrest pathways by p53R2 silencing enhances DNA damage-induced apoptosis in a p53-dependent manner in prostate cancer cells, Molecular Cancer Research 6 (2008) 808-818.



