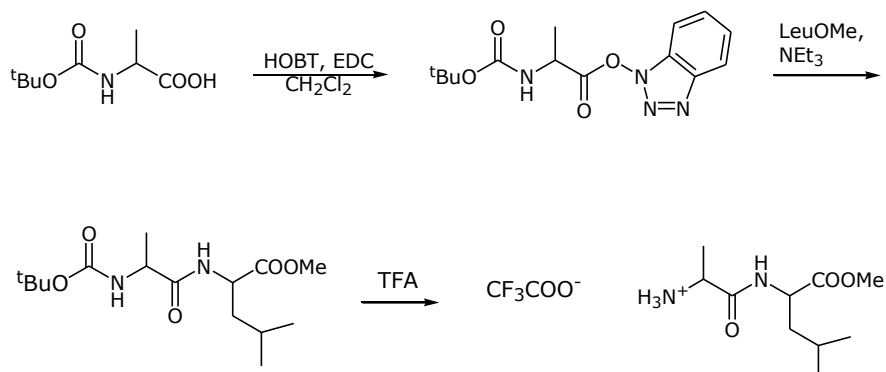


Sintesi dipeptide Ala-Leu-Ome



1° giorno

1. In un pallone da 50 ml si pesano ca. 0.5 g di Boc-L-Ala-OH (PM 189.21 g/mol). **Annotare il peso preciso del reagente che avete effettivamente pesato.** Questo verrà poi riportato nella relazione ed utilizzato per calcolare la quantità degli altri reagenti, resa finale etc.
2. Si aggiungono nel pallone di reazione 10 ml di CH_2Cl_2 anidro.
3. Si prepara l'agitatore magnetico e successivamente si introduce nel pallone di reazione anche un'ancoretta magnetica di piccole dimensioni.
4. Si pone il pallone sotto alta agitazione (rpm più alto possibile evitando che l'ancoretta schizzi da tutte le parti). Usare sempre un'alta agitazione!
5. Si aggiunge quindi 1 eq molare di HOBT che va calcolato sul peso effettivamente pesato di Boc-L-Ala-OH (idrossibenzotriazolo, PM 135.12 g/mol).
6. Dopo pochi minuti, si immerge il pallone di reazione in un bagno di ghiaccio.
7. Una volta trascorsi almeno 10 min per permettere alla soluzione di raggiungere gli 0°C si aggiungono 1.2 eq di EDC-HCl (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, PM 191.70 g/mol). Anche questi vanno calcolati rispetto al peso iniziale effettivo di Boc-L-Ala-OH. Si mantiene la soluzione sotto agitazione a 0° per 1h.
8. Al termine si aggiungono lentamente 1 eq di Leu-OMe-HCl (Leucina Metil estere HCl, PM 181.66) seguito da 2.5 eq di NEt_3 (triethylammina – TEA, PM 101.19 g/mol e $d = 0.726 \text{ g/mL}$). All'aggiunta della base dovrebbe formarsi un precipitato, che cos'è? **Se non si forma precipitato continuate ad aggiungere TEA a frazioni di 10 gocce fino a che non si forma precipitato.**
9. Con una cartina tornasole si controlla che il pH della soluzione sia 8-8.5, per farlo, si immerge una bacchetta di vetro nella soluzione e poi con la punta si bagna la cartina tornasole.
10. Si prosegue l'agitazione per altre 12h chiudendo il collo del pallone con un tappo adeguato.

2° giorno

1. Il giorno seguente si osserva la formazione di una soluzione trasparente o leggermente biancastra.

2. Dopo aver spento l'agitatore magnetico si procede con la rimozione dell'ancoretta magnetica usando una bacchetta magnetica.
3. Si prosegue con l'eliminazione del solvente, prima di procedere però è bene controllare che il collo del Rotavapor sia pulito, in caso contrario lo si lava con acetone. **Fare attenzione a non romperlo!**
4. Si collega il pallone di reazione al Rotavapor e lentamente si svapora il CH_2Cl_2 facendo attenzione a non far salire il prodotto di reazione sopra il collo del pallone.
5. Controllare che il solvente sia completamente rimosso, altrimenti l'estrazione non risulterà efficiente (perché?). Si ottiene così un solido di colore bianco.
6. In seguito, si aggiungono al pallone 6/10 ml di acetato di etile usando una siringa usa e getta, si osserva la formazione di una sospensione bianca. Perché? Agitare bene la soluzione a mano.
7. Nel mentre si prepara un imbuto separatore da 100 ml.
8. Trasferire il contenuto del pallone nell'imbuto separatore. Per favorire il trasferimento del precipitato bianco nell'imbuto separatore si può aggiungere nel pallone una piccola quantità di NaHCO_3 soluzione satura. Una volta trasferito tutto nell'imbuto separatore si possono cominciare i lavaggi acido/base.
9. In tutto si effettuano 1 lavaggio con NaHCO_3 soluzione satura seguito da 1 lavaggio con acido citrico al 2%. Questa sequenza di lavaggio si ripete in tutto 2 volte e si finisce con un ulteriore lavaggio con NaHCO_3 .
10. Successivamente si effettua un ultimo lavaggio con acqua distillata che consentirà di portare l'acetato di etile a pH neutro. La separazione tra acqua e acetato di etile deve essere condotta con accuratezza.
11. Si trasferisce la fase organica rimanente dal collo superiore dell'imbuto in una beuta a collo largo da 25 ml
12. Si anidifica la soluzione con sodio solfato anidro (circa 4/5 spatole) e lo si lascia agire per almeno 10 min.
13. In seguito, si trasferisce la fase organica (senza sodio solfato) in un pallone da 50 ml, **precedentemente pesato per il calcolo della resa di reazione**, e l'acetato di etile viene rimosso al Rotavapor.
14. Alla fine del processo si è ottenuto il dipeptide Ala-Leu-OMe e Boc protetto.
15. Lasciare il pallone aperto sotto la cappa per la notte in modo che il composto si asciughi bene.

3° giorno

1. Pesare il pallone e calcolare la resa del primo step. Preparare i campioni per l'IR, il ^1H NMR.

Reazione di deprotezione:

2. Si determina il peso del peptide protetto una volta rimosse le frazioni per le analisi (punto precedente).
3. Si dissolve il rimanente del dipeptide protetto in 5 ml di CH_2Cl_2 .
4. Nel mentre si prepara la postazione per il riflusso con sotto un DriSyn appoggiato a una piastra riscaldante

5. Si addiziona al pallone di reazione 1 ml di TFA e lo si blocca rapidamente al condensatore a bolle precedentemente attrezzato con una fascetta in PTFE (teflon).
6. Lentamente si porta il pallone in contatto con il DriSyn per poi portare la piastra a riscaldamento, qual'è la temperatura di ebollizione del CH_2Cl_2 ? Quindi a che temperatura dobbiamo settare la piastra riscaldante per ottenere un riflusso efficiente?
7. Si lascia a riflusso per almeno 10 min (si parte a contare da quando la soluzione bolle vigorosamente e stabilmente).
8. Si passa ora alla rimozione di TFA non reagito per co-evaporazione con etere dietilico. Per fare questo si aggiunge quindi un'aliquota da 10-20 ml di etere dietilico alla soluzione di reazione e si tira il pallone a secco al Rotavapor. Questo passaggio viene ripetuto 2 volte, dopodiché si aggiungono altri 10-20 mL di Et_2O . Agitando il pallone manualmente per bene per qualche minuto si dovrebbe formare un precipitato bianco. Può capitare che un po' di prodotto rimanga attaccato come gocce bianche oleose e dense alle pareti del pallone. Se agitando manualmente queste gocce non vanno via, chiedere al tutor di usare il sonificatore per qualche secondo. Dopo questa operazione il prodotto (solido bianco) può essere filtrato a gravità su imbuto di vetro e carta da filtro. La maggior parte del solido dovrebbe rimanere nel pallone, dentro al quale si aggiunge il solido rimasto sulla carta da filtro. Aspettare qualche minuto che l' Et_2O evapori prima di procedere alle analisi.
9. Si pesa il pallone per la resa di reazione e si preparano i campioni per gli spettri IR, ^1H NMR. Per lo spettro ^1H NMR questa volta utilizzare D_2O ed inserire 5 mm di composto nel tubo NMR prima di aggiungere il solvente deuterato.

NMR:

Ogni tubo NMR dovrà essere etichettato propriamente indicando:

- (1) Lab Organica 3
- (2) Cognomi dei 2 componenti del gruppo
- (3) Nome del campione
- (4) Solvente deuterato utilizzato
- (5) Tipo di misura (solo "spettro ^1H NMR" in questo caso)

Il tubo NMR verrà consegnato al tutor che lo darà al tecnico per le misure.