

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

DIPLOMSKO DELO

Klemen Kozlovič

Ljubljana, 2019

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM 1. STOPNJE
KEMIJA

Sinteza izbranih amidov piruvične kisline

DIPLOMSKO DELO

Klemen Kozlovič

Mentor: doc. dr. Krištof Kranjc

Ljubljana, 2019

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega dela

Spodaj podpisani Klemen Kozlovič sem avtor diplomskega dela z naslovom: Sinteza izbranih amidov piruvične kisline.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom doc. dr. Krištofa Kranjca;
- sem poskrbel, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbel za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela

V Ljubljani, 29.8.2019

Podpis avtorja

Zahvala

Rad bi se zahvalil mentorju, doc. dr. Krištofu Kranjcu za vso pomoč in strokovne nasvete ter za spodbudo pri nastajanju diplomskega dela, kolegom v laboratoriju za pomoč pri delu in za dobro delovno vzdušje, družini za vso pomoč in podporo v času študija in vsem ostalim, ki so mi v času študija stali ob strani.

Sinteza izbranih amidov piruvične kisline

Povzetek: Sledeče diplomsko delo opisuje pripravo štirih različnih amidov piruvične kisline. Sinteze so bile izvedene preko njenega kislinskega klorida (ki je bil iz piruvične kisline pripravljen s pomočjo oksalil klorida), ki je v naslednji stopnji z različnimi amini (dietilamin, cikloheksilamin, anilin, 4-metoksianilin) reagiral do različno substituiranih amidov. Sintetizirane amide smo okarakterizirali s pomočjo IR spektroskopije, ¹H NMR spektroskopije, HRMS ter jim izmerili temperaturo tališča.

Ključne besede: piruvična kislina, oksalil klorid, kislinski kloridi, Schotten – Baumannovi pogoji sinteze amidov, spektroskopija.

Synthesis of selected amides of pyruvic acid

Abstract: The following diploma thesis describes the synthesis of four different amides of pyruvic acid. The reactions were carried out *via* corresponding acid chloride (prepared from pyruvic acid with the addition of oxalyl chloride) that was in the next step reacted with a selection of amines (diethylamine, cyclohexylamine, aniline, 4-methoxyaniline) yielding variously substituted amides. The final products were characterised using IR spectroscopy, ¹H NMR spectroscopy, HRMS and with melting points measurement.

Keywords: pyruvic acid, oxalyl chloride, acid chlorides, Schotten–Baumann conditions of amides synthesis, spectroscopy

Kazalo

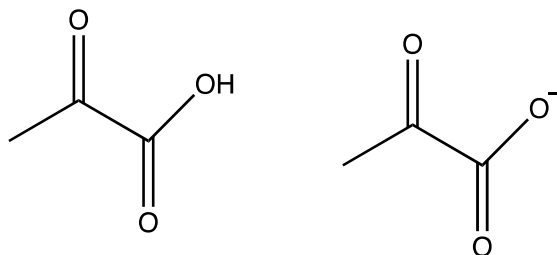
1. Uvod.....	1
1.2. Sinteza piruvične kisline.....	2
1.3. Piruvatni ion kot biološka spojina.....	3
1.4. Amidi ter njihova sinteza.....	6
1.5. Kislinski kloridi.....	8
1.6. Schotten – Baumanova reakcija.....	10
2. Namen diplomskega dela.....	13
3. Rezultati in razprava.....	15
3.1. Izvedene reakcije.....	15
3.2. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -dietilpropanamida (3a).....	17
3.3. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -cikloheksilamida (3b).....	18
3.4. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -fenilamida (3c).....	18
3.5. Sinteza <i>N</i> -(4-metoksifenil)propanamida (3d).....	18
4. Eksperimentalni del.....	21
4.1. Sinteza 2-okso- <i>N,N</i> -dietilpropanamida (3a).....	22
4.2. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -cikloheksilamida (3b).....	24
4.3. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -fenilamida (3c).....	25
4.4. Sinteza 2-okso- <i>N</i> -(4-metoksifenil)propanamida (3d).....	26
5. Zaključek.....	27
6. Literatura.....	29

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

Ac	acetilna skupina
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
δ	kemijski premik pri NMR
d	dublet
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
Et	etilna skupina
GDP	gvanozin difosfat
GTP	gvanozin trifosfat
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (ang. High-Resolution Mass Spectrometry)
IR	infrardeča spektroskopija (ang. Infrared Spectroscopy)
<i>J</i>	sklopitvena konstanta pri NMR
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NMR	jedrska magnetna resonance
m	multiplet
PEP	fosfoenol piruvat
PE	petrol eter
Ph	fenilna skupina
Pi	anorganski fosfat
R	splošni ali določeni substiuent
razš. s	razširjen singlet
s	singlet
TLC	tankoplastna kromatografija (angl. Thin-Layer Chromatography)
UV	ultravijoločno

1. Uvod

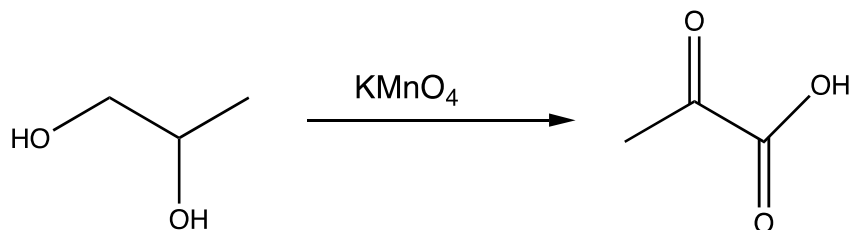
Piruvična kislina, poznana tudi pod IUPAC imenom 2-oksopropanojska kislina ali semisistematičnim imenom α -ketopropionska kislina, je najpreprostejša α -keto kislina, kar pomeni, da poleg karboksilne funkcionalne skupine vsebuje še karbonylno funkcionalno skupino na α -mestu (sosednje mesto glede na karbonylni ogljikov atom karboksilne skupine). Njena konjugirana baza, piruvatni anion, je zelo pomembna spojina v biokemiji, saj sodeluje kot intermediat v mnogih celičnih procesih. Številne raziskave omenjajo potencialne pozitivne lastnosti in uporabe piruvične kisline in njenih derivatov, predvsem v medicini in kozmetični industriji. Kljub temu pa je področje uporabe piruvične kisline in njenih derivatov še vseeno precej neraziskano.



Slika 1: struktura piruvične kisline (levo) in piruvatnega aniona (desno)

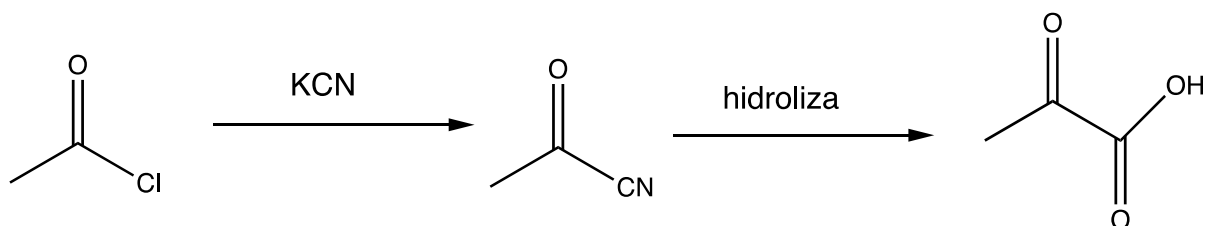
1.2. Sinteza piruvične kisline

Piruvično kislino je možno pripraviti na več načinov. Eden izmed njih je oksidacija propilen glikola (propan-1,2-diola) z močnim oksidantom, npr. KMnO_4 (Shema 1).¹



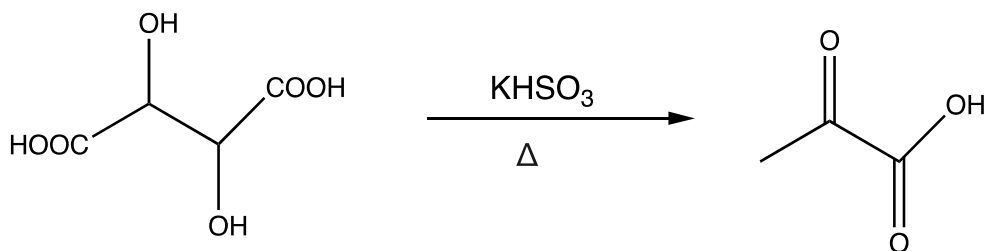
Shema 1

Drug način priprave je s hidrolizo acetil cianida, ki ga pripravimo iz acetil klorida in kalijevega cianida (Shema 2).¹



Shema 2

Na industrijski skali piruvično kislino proizvajajo z dehidracijo in dekarboksilacijo vinske kisline (2,3-dihidroksibutandiojska kislina). Pri tem postopku piruvično kislino oddestilirajo iz zmesi vinske kisline in kalijevega hidrogensulfata(IV) pri $220\text{ }^\circ\text{C}$. Čisti produkt nato dobijo z destilacijo pod znižanim tlakom (Shema 3).^{1,5}



Shema 3

1.3. Piruvatni ion kot biološka spojina

Glikoliza je univerzalna metabolična pot, pri kateri poteka razgradnja glukoze in ogljikovih hidratov. Energija, pridobljena z glikolizo, je edina energija za nekatere tipe celic in tkiv (npr. možgani, eritrociti, ledvice). Gre za sosledje encimsko kataliziranih reakcij, v katerih se glukoza postopoma pretvori v piruvatni ion. V evoluciji živih bitij je bila glikoliza verjetno prva metabolična pot za proizvodnjo energije. Razvila se je verjetno še pred fotosintezo, torej v času, ko je bila atmosfera še anaerobna (brez prisotnosti kisika). Pri anaerobnih organizmih je tako ATP, ki se sprosti pri glikolizi, edini dostopni vir energije iz ogljikovih hidratov, pri aerobnih pogojih pa se glukoza pretvori do drugih intermediatov, ki vstopijo v druge metabolične poti.

Proces glikolize sestavlja 10 reakcij, ki jih lahko v grobem razdelimo v dve skupini: prvih 5 predstavlja t.i. pripravljalno fazo (ang. *preparatory phase*), drugih 5 pa predstavlja t.i. »payoff« fazo.

Tabela 1: reakcije, ki sestavljajo glikolizo

Korak	Reakcija	Encim, ki katalizira reakcijo
1	$\text{glukoza} + \text{ATP}^{4-} \rightarrow \text{glukoza-6-fosfat} + \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+$	heksokinaza
2	$\text{glukoza-6-fosfat}^{2-} \rightleftharpoons \text{fruktoza-6-fosfat}^{2-}$	fosfoheksoizomeraza
3	$\text{fruktoza-6-fosfat}^{2-} + \text{ATP}^{4-} \rightarrow \text{fruktoza-1,6-bisfosfat}^{4-} + \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+$	fosfofruktokinaza-1
4	$\text{fruktoza-1,6-bisfosfat}^{4-} \rightleftharpoons \text{dihidroksiaceton fosfat}^{2-} + \text{gliceraldehid-3-fosfat}^{2-}$	aldolaza

5	$\text{dihidroksiaceton fosfat}^{2-} \rightleftharpoons \text{gliceraldehid-3-fosfat}^{2-}$	trioza fosfat izomeraza
6	$\text{gliceraldehid-3-fosfat}^{2-} + \text{Pi}^{2-} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{1,3-bisfosfoglicerat} + \text{NADH} + \text{H}^+$	gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza
7	$\text{1,3-bisfosfoglicerat}^{4-} + \text{ADP}^{3-} \rightarrow \text{3-fosfoglicerat}^{3-} + \text{ATP}^{4-}$	fosfoglicerat kinaza
8	$\text{3-fosfoglicerat}^{3-} \rightleftharpoons \text{2-fosfoglicerat}^{3-}$	fosfoglicerat mutaza
9	$\text{2-fosfoglicerat}^{3-} \rightleftharpoons \text{fosfoenolpiruvat}^{3-} + \text{H}_2\text{O}$	enolaza
10	$\text{fosfoenolpiruvat}^{3-} + \text{ADP}^{3-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{piruvat}^- + \text{ATP}^{4-}$	piruvat kinaza

Celokupna reakcija glikolize tako znaša:



Pod aerobnimi pogoji se piruvatni ion, ki nastane v glikolizi, pretvori v acetil-CoA. Ta nato vstopi v Krebsov cikel in se oksidira v CO_2 in H_2O . NADH, ki nastane pri glikolizi, se ponovno oksidira v NAD^+ s tokom elektronom (redukcijo) na kisik, kar se zgodi v mitohondrijih pri t.i. mitohondrijskem dihanju.

Pod anaerobnimi in hipoksičnimi pogoji (npr. v zelo aktivnih mišicah, v podzemnih delih rastlin, v tumorskih celicah, v nekaterih bakterijah) pa se NAD^+ ne more regenerirati, saj ni prisotnega (dovolj) kisika. V takih primerih se v živalskih tkivih

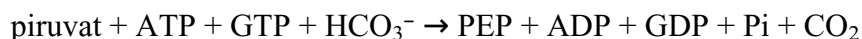
piruvatni ion reducira do L-laktatnega iona (reakcijo katalizira encim laktat dehidrogenaza), pri glivah kvasovkah pa se piruvatni ion dekarboksilira s pomočjo encima piruvat dekarboksilaze. Pri tem nastane acetaldehid, ki se s pomočjo alkohol dehidrogenaze pretvori v etanol, s tem se tudi NADH regenerira v NAD⁺.

Pri sesalcih so nekatera tkiva skoraj popolnoma odvisna od glukoze za metabolično energijo. Za človeške možgane in celoten živčni sistem, eritrocite, vezivna tkiva in ledvice je glukoza iz krvi edini oz. večinski vir energije. Možgani sami potrebujejo več kot 120 g glukoze dnevno, kar je več kot polovica glukoze, ki je shranjena v jetrih v obliki glikogena. Kljub temu, da ima naše telo nekaj zaloge glikogena, tega ni vedno zadosti; npr. med obroki in ob daljšem stradanju ali intenzivni telesni vadbi, glikogena primanjkuje. V takih primerih mora telo samo sintetizirati glukozo. Taki metabolični poti pravimo glukoneogeneza.

Piruvatni ion se v tem primeru iz citosola celice prenese v matriks mitohondrija, kjer ga encim piruvat karboksilaza pretvori v oksaloacetatni ion.

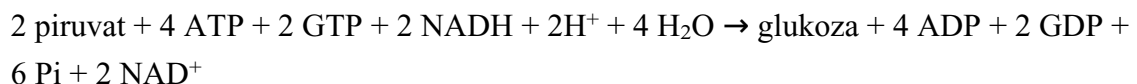
Ker mitohondrijska membrana nima transporterja za oksaloacetatne ione, se morajo ti ioni reducirati v L-malatne ione, kar se zgodi s pomočjo encima malat dehidrogenaze, in šele v reducirani obliki lahko iz matriksa mitohondrija preidejo v citosol. Tam se malatni ioni reoksidirajo nazaj v oksaloacetatne, slednji se pretvorijo v fosfoenolpiruvatne ione z encimom fosfoenolpiruvat karboksikinaza.

Celokupna reakcija pretvorbe piruvatnih ionov v fosfoenolpiruvatne znaša:



Fosfoenolpiruvat vstopi v cikel ravnotežnih reakcij, ki vodijo do nastanka glukoze.

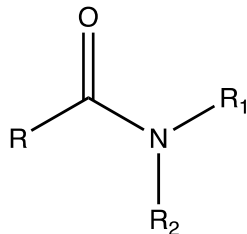
Celokupna reakcija glukoneogeneze znaša:



Procesa glikolize in glukoneogeneze sta recipročno regulirana, tako da se s tem prepreči prevelika aktivnost obeh metaboličnih poti.

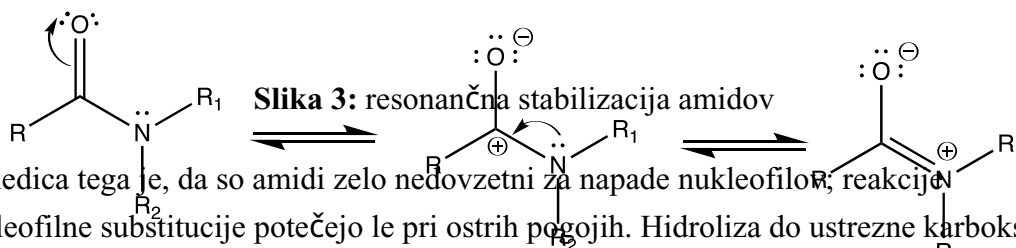
1.4. Amidi ter njihova sinteza

Amidi so derivati karboksilnih kislin, pri katerih je hidroksilna (-OH) skupina zamenjana z amsko.



Slika 2: struktura amida

V primerjavi s karboksilnimi kislinami so bistveno manj reaktivni, saj so močno resonančno stabilizirani z delokalizacijo dušikovega neveznega elektronskega para proti karbonilnemu delu amidne skupine.



Posledica tega je, da so amidi zelo nedovzetni za napade nukleofilov, reakcije nukleofilne substitucije potečejo le pri ostrih pogojih. Hidroliza do ustrezne karboksilne kisline tako poteče le z dolgotrajnim segrevanjem v močno kislem oz. bazičnem mediju.

Resonančna stabilizacija amidov je tudi vzrok za to, da so amidi rahlo kisli. Tako so bistveno šibkejše baze kot amini, vendar še vedno močnejše baze od karboksilnih kislin, estrov, aldehydov in ketonov.

Prisotnost amidov je v naravi zelo pogosta, prav tako pa njihove lastnosti izkoriščamo v tehnologiji materialov. Amidna vez se tvori dokaj enostavno, daje strukturno togost ter je precej odporna na hidrolizo. Amidne vezi povezujejo med sabo aminokislino, ki tvorijo biopolimere, imenovane proteini (beljakovine), ki so prisotni v vseh organizmih. Zelo pomemben, sintetično pridobljen, poliamid je najlon, ki je zaradi svojih lastnosti zelo široko uporabljan za izdelavo materialov, iz katerih izdelujejo oblačila, vrvi,

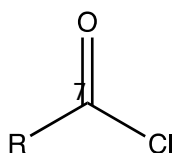
preproge... Amidna vez se nahaja tudi v številnih zdravilnih učinkovinah, na primer v paracetamolu in penicilinu, veliko amidov ima tudi razne biološke funkcije.

Pri sintezi amidov iz karboksilne kisline in amina moramo upoštevati, da je preferenčna reakcija kislinsko-bazna reakcija, saj karboksilna kislina in amin tvorita sol, v kateri je karboksilatni anion zelo odporen na napad nukleofilov in zato reakcija do amida ne poteče.

Čeprav je tvorba soli favorizirana, je reakcija reverzibilna. Pri visokih temperaturah lahko vseeno poteče adicijsko-eliminacijska reakcija karboksilne kisline in amina do amida, ki je termodinamsko bolj ugodna. Čeprav je tak pristop dokaj enostaven, za izvedbo ni najbolj primeren; poleg tega je reakcija ravnotežna in zato običajno ne daje dobrih izkoristkov amidov. Zato amide ponavadi bolj uspešno tvorimo z bolj reaktivnimi derivati karboksilnih kislin, na primer s kislinskimi kloridi ali anhidridi.

1.5. Kislinski kloridi

Kislinski kloridi so organske spojine s funkcionalno skupino $-\text{COCl}$ in so najbolj reaktivni derivati karboksilnih kislin.

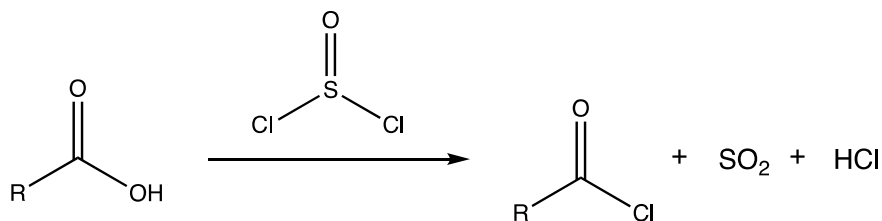


Slika 4: struktura kislinskega klorida

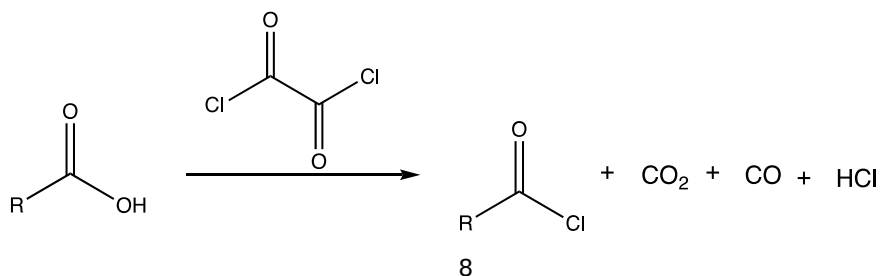
V primerjavi z analognimi karboksilnimi kislinami, je kloridni anion zelo dobro izstopajoča skupina, medtem ko hidroksidni ion ni. Posledično kislinski kloridi hitro reagirajo že s šibkimi nukleofili pri milih pogojih.

Kislinske kloride najbolj pogosto uporabljamo za pripravo derivatov karboksilnih kislin (anhidridov, estrov in amidov). Čeprav je sinteza večstopenjska (prva stopnja je pretvorba karboksilne kisline v kislinski klorid, druga pa je reakcija slednjega z alkoholom oz. aminom), daje dobre izkoristke. Zaželeno je, da se te reakcije izvaja v prisotnosti baze (na primer $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, piridin, trietilamin...), ki reagira s HCl, ki se sprošča pri reakciji. Kislinski kloridi reagirajo tudi z organokovinskimi reagenti, s katerimi lahko pripravimo ketone in alkohole (s presežkom reagenta).

Kislinske kloride običajno pripravljamo z reakcijo karboksilnih kislin s tionil kloridom (Shema 4) ali oksalil kloridom (Shema 5). Reakciji potekata že pri sobni temperaturi, lahko ju izvajamo v prisotnosti katalizatorja (običajno je to DMF). Moramo pa paziti, da te reakcije izvajamo pod pogoji s čim manjšo prisotnostjo vode.^{4,7}



Shema 4: reakcija med karboksilno kislino in tionil kloridom



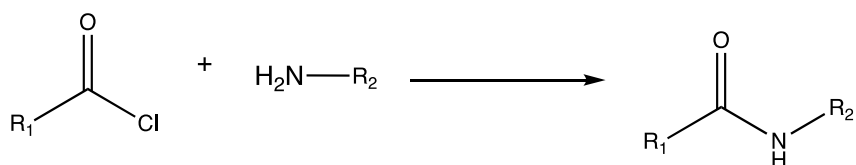
Shema 5: reakcija med karboksilno kislino in oksalil kloridom

Ker so kislinski kloridi zelo reaktivne spojine, moramo biti pri ravnanju z njimi še posebej previdni. Povzročajo hudo draženje oči, saj reagirajo z vodo na površini očesa, pri čemer se sproščata HCl in organska kislina, ki lahko zelo poškodujeta oko. Prav tako so hlapi kislinskih kloridov škodljivi za dihala.

1.6. Schotten – Baumannova reakcija

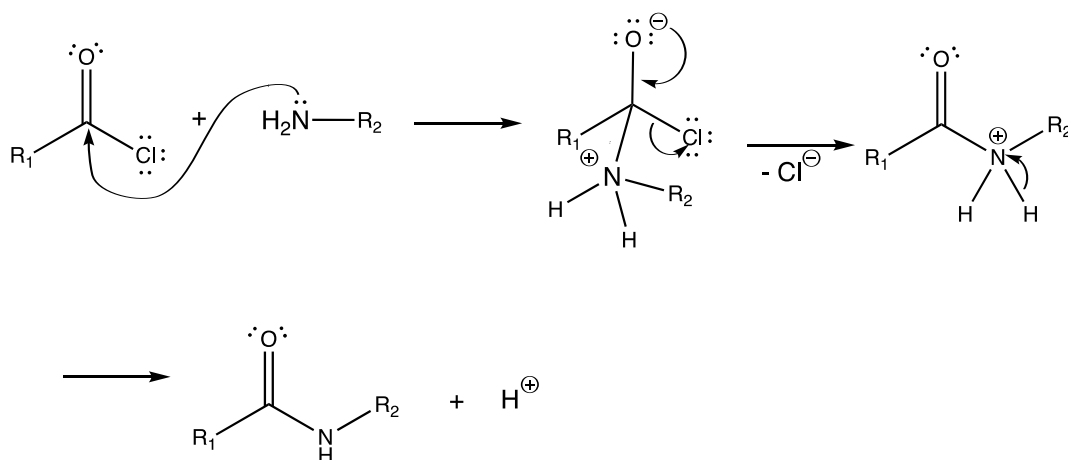
Schotten – Baumannova reakcija (Shema 6) je metoda za sintezo amidov iz kislinskih kloridov in aminov. Prvič sta jo opisala kemika Carl Schotten in Eugen Baumann leta

1883.^{4,8}



Shema 6

Mehanizem reakcije je adicijsko-eliminacijski. V prvem koraku poteče nukleofilni napadaminskega dušika na elektrofilni ogljikov atom kislinskega klorida. Pri tem nastane amid ter HCl, ki se nevtralizira z dodano bazo. Kot bazo se ponavadi uporabi vodno raztopino NaOH ali terciaren organski amin (najpogosteje Et₃N, piridin ali 4-pikolin), lahko pa se uporabi kar prebitno količino amina reaktanta. Prisotnost baze prepreči protonacijo amina, kar bi mu onemogočilo, da reagira kot nukleofil.^{4,8}



Shema 7: mehanizem Schotten – Baumannove reakcije

Ključni problem pri tovrstnih tvorbah amidov pa predstavlja izbira topil. Kot Schotten – Baumannove pogoje razumemo uporabo dvofaznega sistema topil, ki sestoji iz organske in vodne faze. Baza, ki se nahaja raztopljena v vodni fazi, nevtralizira HCl, ki se sprošča pri reakciji. Nastala sol se raztopi v vodni fazi, izhodni reaktanti in produkt pa se nahajajo raztopljeni v organski fazi. Pri reakcijah se ponavadi uporabljajo aprotična

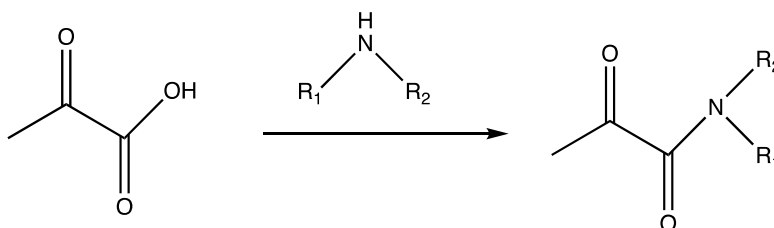
organska topila (na primer diklorometan ali dietil eter). Pogosteje se reakcije izvajajo pod modificiranimi Schotten – Baumannovimi pogoji: v obliki enofaznega sistema, kjer se uporabi organska aprotična topila in organsko bazo.^{4,8,9}

Včasih se ime Schotten – Baumannova reakcija uporablja tudi za analogno sintezo estrov iz kislinskih kloridov in alkoholov.

2. Namen diplomskega dela

Namen diplomskega dela je bil priprava različnih derivatov piruvične kisline, saj so njeni derivati v zadnjem času postali z medicinskega stališča zanimive molekule; izkazalo se je namreč, da nekateri izmed njih (zlasti estri 3-bromopiruvične kisline) učinkujejo na rakave celice tako, da zavirajo njihovo rast. Sintetizirani derivati bi lahko bili uporabljeni v raznih raziskavah, v katerih bi se lahko preučilo njihov učinek na rakave celice *in vitro*.

V okviru diplomskega dela sem se nameraval osredotočiti predvsem na sintezo amidov piruvične kisline, ki sem jih nameraval pripraviti s pretvorbo piruvične (karboksilne) kisline v kislinski klorid (na različne načine) ter nato izvesti reakcije slednjega z izbranimi amini pod Schotten – Baumannovimi pogoji amidiranja. Nameraval sem torej izvesti pretvorbo piruvične kisline v različne amide, kot je prikazano na Shemi 8.



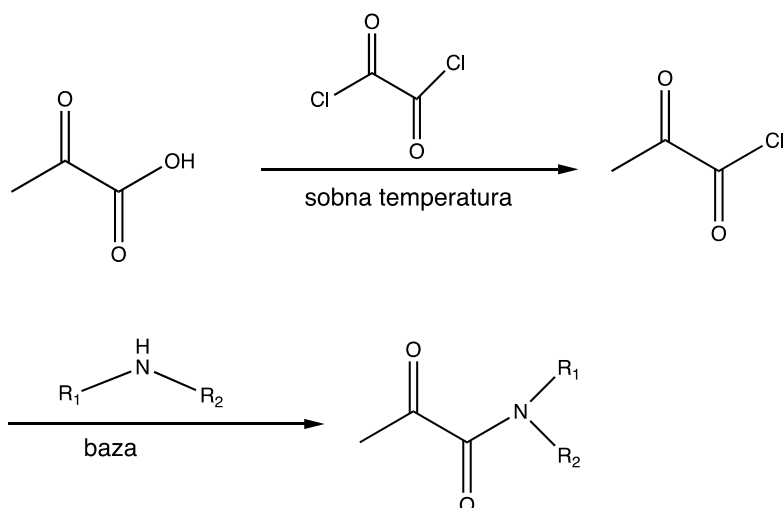
Shema 8

3. Rezultati in razprava

3.1. Izvedene reakcije

Sinteze derivatov piruvične kisline smo izvajali tako, da smo piruvično kislino pretvorili v kislinski klorid, ki je bolj reaktiven derivat v primerjavi z osnovno karboksilno kislino, nato pa dodali različne amine ter tako sintetizirali različne amide. Za pretvorbo karboksilne kisline v kislinski klorid smo uporabili dve metodi: s pomočjo tionil klorida in z oksalil kloridom, uporaba slednjega pa se je izkazala za bolj ustrezno.

Shema 9 in Tabela 2 prikazujeta izvedene pretvorbe piruvične kisline v amide.



Shema 9

Izhodni amin	Produkt	R ₁	R ₂
2a	3a	Et	Et
2b	3b	H	cikloheksil
2c	3c	H	Ph

2d	3d	H	p-OMe-C ₆ H ₄
-----------	-----------	---	-------------------------------------

Tabela 2

Pri vseh izvedenih sintezah smo piruvično kislino najprej raztopili v CH₂Cl₂, dodali reagent za tvorbo kislinskega klorida (tionil klorid ali oksalil klorid) ter po 3 urah mešanja na sobni temperaturi reakcijsko zmes ohladili na ledu in dodali ustrezen amin. Poleg tega smo v vsakem primeru uporabili še dodatek primerne baze, npr. Et₃N ali Et₂NH, ki nevtralizira HCl, ki se sprosti pri reakciji med kislinskim kloridom in aminom. Nastalo sol, ki ostane po tej nevtralizacijski reakciji (Et₃NH⁺ Cl⁻ oz. Et₂NH₂⁺ Cl⁻), smo po koncu reakcije odnučirali. Nezreagirane izhodne amine (vključno z aminom, ki je imel vlogo baze) in nezreagirano piruvično kislino smo iz reakcijske zmesi po koncu reakcije odstranili s stresanjem z vodno raztopino HCl. Ker je topnost produktov (amidov) v kisljih vodnih raztopinah zelo nizka, tovrstna obdelava ni povzročila dodatnih izgub produktov.

Vse reakcije smo izvajali po predhodno objavljenih postopkih iz literature.^{12,13} Izkoristki za sintetizirane spojine so bile nižji kot v literaturi.

Tabela 3: izkoristki izvedenih reakcij

Produkt	R₁	R₂	izkoristek
3a	Et	Et	9 %
3b	H	cikloheksil	16 % ^a
3c	H	Ph	35 % ^a
3d	H	-C ₆ H ₄ -OCH ₃	32 % ^a

^a zmes produkta in izhodne spojine. Produkt smo za karakterizacijo očistili s kolonsko kromatografijo.

Razlog za relativno nizke izkoristke vseh reakcij je verjetno dokaj nizka pretvorba piruvične kisline v analogen kislinski klorid. Pri izvedenih reakcijah topil nismo dodatno sušili, tako da bi se lahko oksalil klorid porabljal v reakciji z vodo. Prav tako pri izvedenih reakcijah nismo uporabili DMF kot katalizatorja. V nekaterih literaturnih virih se je tudi uporaba oksalil klorida za tvorbo kislinskih kloridov α -keto kislin izkazala za nezadovoljivo metodo, saj daja večinoma zelo nizke izkoristke. Kot najbolj ustrezen reagent za pretvorbo α -keto karboksilnih kislin v α -keto kislinske kloride se priporoča α,α -diklorometil metil eter, torej bi bila uporaba slednjega verjetno bolj učinkovita. Kljub temu smo se odločili za delo z oksalil kloridom, saj je cenejši, manj nevaren ter se ga po koncu reakcije lažje odstrani iz reakcijske zmesi.^{10,14}

3.2. Sinteza 2-okso-*N*-dietilpropanamida (3a)

V primeru **a**) smo kloridu piruvične kisline dodali 1,2 ekvivalenta dietilamina (**2a**) ter en ekvivalent trietilamina kot baze.

¹H NMR spekter je po koncu reakcije pokazal, da je željeni produkt sicer nastal, vendar je pokazal tudi večje količine nečistoč (veliko dietilamina in trietilamina ter nezreagirani piruvat). Produkt smo poskušali očistiti s ponovno ekstrakcijo z 1M HCl, vendar neuspešno.

V primeru **b**) smo kloridu piruvične kisline dodali samo 2,5 ekvivalenta dietilamina. ¹H NMR analiza produkta je tokrat pokazala bistveno manj nečistoč kot v prejšnjem primeru. Nečistoče smo poskušali odstraniti z ekstrakcijo z 1M HCl in z večurnim sušenjem produkta pod znižanim tlakom pri sobni temperaturi (dietil amin ima temperaturo vrelišča med 54,8–56,4 °C pri atmosferskem tlaku ter bi načeloma moral odpareti), vendar nobena izmed teh dveh metod ni delovala (v ¹H NMR spektru so bile nečistoče še vedno prisotne v približno enakem razmerju kot pred sušenjem).

Uporaba dietilamina v velikem presežku brez dodatka trietilamina se je v tem primeru izkazala za bolj ustrezno kot uporaba dietilamina kot reaktanta skupaj s trietilaminom kot bazo.

V primeru **c**) smo za sintezo **3a** namesto oksalil klorida uporabili tionil klorid. S pomočjo TLC analize in ^1H NMR spektroskopije je bilo razvidno, da je reakcija potekla le v sledovih. Vzroke za to bi lahko pripisali delu v neinertni atmosferi, poleg tega topila in steklovine pred samo reakcijo nismo posušili (oz. nismo prepihali z dušikom). Možno je, da je tionil klorid reagiral z vlago v zraku in na stenah posode in se zaradi tega porabil. Poleg tega se je zaradi gretja pod refluksom precejšen del piruvata zažgal in zaradi tega ni zreagirala.

3.3. Sinteza 2-okso-*N*-cikloheksilamida (**3b**)

Sintezo spojine **3b** smo izvajali po modificiranem postopku iz literature.¹² Piruvični kislini smo dodali oksalil klorid ter po treh urah dodali cikloheksilamin (**2b**) v presežku. ^1H NMR spekter potrjuje, da smo uspeli izolirati produkt **3b** v zelo čisti obliki, brez prisotnosti nečistoč. Nastanek produkta **3b** potrjuje tudi masni spekter. Produktu **3b** smo izmerili interval tališča, ki je znašal 56–62 °C, medtem ko interval tališča po podatkih iz literature znaša 79,5–80,5 °C.¹⁵

3.4. Sinteza 2-okso-*N*-fenilamida (**3c**)

Sintezo spojine **3c** smo izvajali po modificiranem postopku iz literature.¹² Piruvični kislini smo dodali oksalil klorid ter po treh urah dodali anilin (**2c**) v presežku. ^1H NMR analiza je pokazala, da je izoliran produkt **3c** dokaj čist, čeprav je bilo v spektru razvidno, da je nekaj nečistoč še vedno prisotnih, predvsem v območju kemijskih premikov za aromatske protone. Sklepamo, da je v prečiščenem produktu **3c** še vedno prisoten določen delež anilina.

Produktu **3c** smo izmerili interval tališča, ki je znašal 89–94 °C; vendar zaradi različnih literarnih podatkov ne moremo ovrednotiti čistosti produkta (nekateri viri navajajo temperaturo tališča 180 °C, nekateri pa 62 °C).^{12,15}

Masna spektrometrija molekulskega iona ni zaznala, vendar glede na ^1H NMR spekter lahko trdimo, da je bila reakcija uspešna.

3.5. Sinteza *N*-(4-metoksifenil)propanamida (**3d**)

Sintezo spojine **3d** smo izvajali po modificiranem postopku iz literature.¹² Piruvični kislini smo dodali oksalil klorid ter po štirih urah dodali 4-metoksianilin (**2d**) v presežku. Z ¹H NMR analizo smo potrdili, da smo izolirali produkt **3d** v zelo čisti obliki.

Produktu **3d** smo izmerili interval tališča, ki je znašal 112–116 °C, kar se dokaj ujema z literaturnimi podatki (literaturni podatek znaša 129–130 °C).¹²

Masna spektroskopija molekulskega iona ni zaznala, vendar glede na ¹H NMR spekter lahko trdimo, da je bila reakcija uspešna.

4. Eksperimentalni del

Uporabljene kemikalije in topila so na voljo iz komercialnih virov. Topil pred uporabo nismo dodatno sušili.

Vse reakcije smo izvajali pod inertno atmosfero (prepihovanje z dušikom).

TLC analize za so bile opravljene na aluminijastih ploščicah z nanosom silikagela (Fluka 60778), ki je vseboval fluorescentni indikator.

Za detekcijo lis je bila uporabljena UV svetilka s svetlobo valovne dolžine 254 nm.

Kolonske kromatografije smo izvajali na silikagelu (Fluka, Silika gel 60, velikost delcev 0,035–0,070 mm).

Infrardeči (IR) spektri so bili posneti na Bruker Alpha Platinum ATR FT-IR spektrometru.

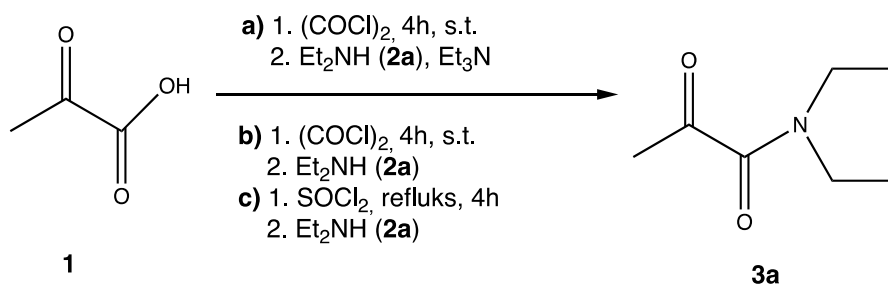
Meritve jedrske magnetne resonance (NMR) so bile izvedene na 300 MHz Bruker DPX 300 NMR spektrometru v CDCl_3 . Za standard je bil uporabljen tetrametilsilan (TMS), kemijski premiki (δ) pa so podani v ppm.

Masni spektri visoke ločljivosti (HRMS) so bili posneti na Agilent 6224 Accurate Mass TOF LC/MS instrumentu z ionizacijo z razprševanjem v električnem polju (ESI).

Tališča so bila izmerjena na mikroskopu z ogrevalno mizico. Tališča so nekorrigirana.

4.1. Sinteza 2-okso-*N,N*-dietilpropanamida (**3a**)

Potek reakcije:



Shema 10: sinteza 2-okso-*N,N*-dietilpropanamida (**3a**)

V primeru **a**) smo piruvično kislino (**1**) (4,013 g; 45,6 mmol; 1 ekv.) raztopili v CH₂Cl₂, dodali oksalil klorid (4,8 mL; 56 mmol; 1,3 ekv.), vsebino bučke pustili mešati 3 ure na sobni temperaturi; nato smo reakcijsko zmes ohladili na ledu in počasi dodajali dietilamin (4,7 mL; 45,4 mmol; 1 ekv.) in trietilamin (6,32 mL; 45,4 mmol; 1 ekv.) ter pustili pri sobni temperaturi na mešanju 4 ure. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 10 mL vodne raztopine HCl, 10 mL vode in 5 mL nasičene vodne raztopine NaCl. V liju ločniku smo ločili organsko in vodno fazo; vodno fazo smo zavrgli, organsko topilo pa odpareli pod znižanim tlakom, reakcijski preostanek pa očistili s flash kromatografijo (mobilna faza EtOAc:PE = 90:15).

V primeru **b**) smo piruvično kislino (**1**) (3,989 g, 45 mmol) raztopili v 30 mL CH₂Cl₂ ter dodali oksalil klorid (4,7 mL; 55 mmol; 1,2 ekv.) ter na sobni temperaturi mešali 3 ure. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledu, dodali 11,7 mL dietilamina (112,5 mmol; 2,5 ekv.) ter na sobni temperaturi mešali 4 ure. Reakcijski zmesi smo nato dodali 10 mL 1M HCl_(aq) ter 15 mL vode. Organsko fazo smo z isto mešanico sprali še 2×, združen organski ekstrakt posušili z brezvodnim Na₂SO₄ ter topilo uparili na rotacijskem uparjalniku. Dobljeni produkt **3a** smo prečistili s flash kromatografijo (enaka mobilna faza kot v prejšnjem primeru).

V primeru **c**) smo v bučko zatehtali 4,009 g (45,5 mmol, 1 ekv.) piruvične kisline in jo raztopili v CH₂Cl₂, dodali tionil klorid (4,4 mL; 60 mmol, 1,4 ekv), vsebino bučke pustili mešati 4 ure na temperaturi refluxa; nato smo reakcijsko zmes ohladili na ledu

in počasi dodajali dietilamin (6,20 mL; 60 mmol; 1,3 ekv.) ter pustili pri sobni temperaturi na mešanju 4 ure. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 10 mL 1M HCl, 10 mL vode in 5 mL nasičene vodne raztopine NaCl. V liju ločniku smo ločili organsko in vodno fazo; vodno fazo smo zavrgli, organsko topilo pa odpareli pod znižanim tlakom.

S pomočjo TLC analize (enaka mobilna faza kot v obeh prejšnjih primerih) in ^1H NMR spektroskopije je bio razvidno, da je reakcija potekla le v sledovih.

Izkoristek: 0,5612 g (8,7 %)

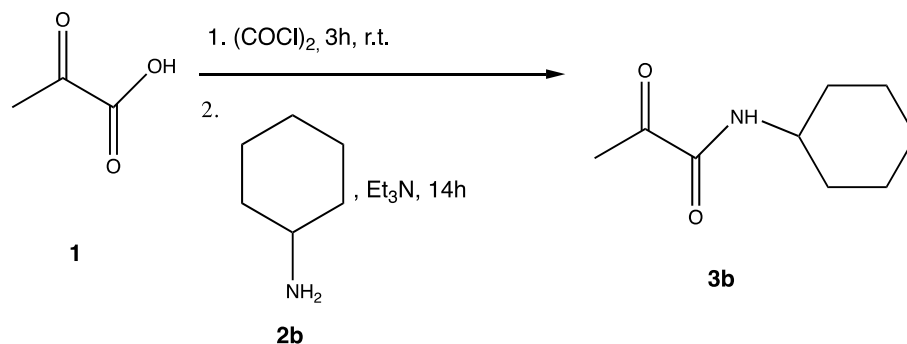
IR: ν_{maks} 2977, 2937, 1713, 1631, 1437, 1381, 1362, 1314, 1256, 1218, 1198, 1115, 1023, 944, 869, 844, 786, 630 cm^{-1} .

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 3,43 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$), 2,42 (s, 3H, CH_3), 1,21 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$).

EI-HRMS izračunana za $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2$ (MH^+): $m/z = 144,1019$; izmerjena: 144,1020.

4.2. Sinteza 2-okso-*N*-cikloheksilamida (**3b**)

Potek reakcije:



Shema 11: Sinteza 2-okso-*N*-cikloheksilamida (**3b**)

V bučko smo zatehtali 1,375 g piruvične kisline (**1**) (15,6 mmol; 1,0 ekv.) ter jo raztopili v 30 mL CH_2Cl_2 . Ko se je piruvična kislina raztopila, smo reakcijsko zmes ohladili na ledu ter dodali 2 mL oksalil klorida (23,3 mmol; 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo na sobni temperaturi pustili mešati 3 ure, nato smo jo ohladili na ledu, dodali 2,1 mL cikloheksilamina (**2b**) (18,3 mmol; 1,2 ekv.) in 2,2 mL Et_3N (15,8 mmol; 1 ekv.), ki sta bila raztopljena v manjši količini CH_2Cl_2 , in pustili mešati na sobni temperaturi 14 ur. Po pretečenem času smo dodali 5 mL 1M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$, 15 mL vode ter 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl . Reakcijsko zmes smo prefiltrirali, filtrat pa trikrat sprali s po 20 mL 0,5 M $\text{HCl}_{(\text{aq})}$. Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na_2SO_4 ter topilo odparili na rotacijskem uparjalniku ter dobili surov produkt **3b** (0,424 g).

S kolonsko kromatografijo smo prečistili 0,254 g produkta **3b**. Uporabljena mobilna faza je bila PE:EtOAc v volumskem razmerju 85:15.

Izkoristek: 0,075 g (29,4 % glede na kolonsko kromatografijo)

IR: ν_{maks} 3322, 3285, 2933, 2853, 1719, 1656, 1520, 1448, 1411, 1355, 1240, 1212, 1171, 1081, 1013, 985, 960, 918, 892, 852, 742, 682, 623 cm^{-1} .

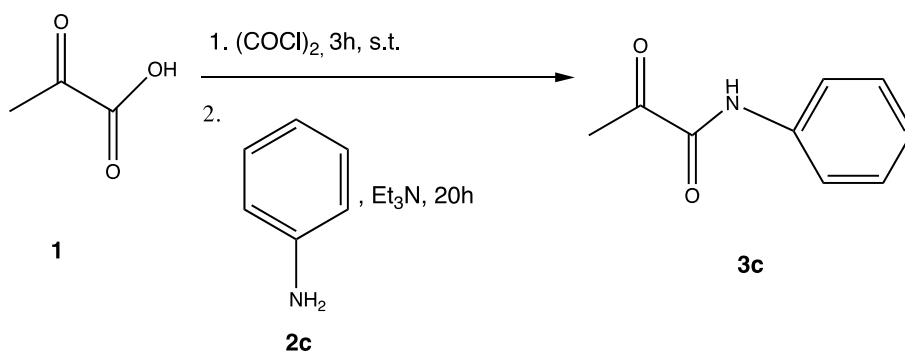
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6,91 (razš. s, 1H, NH), 2,47 (s, 3H, CH_3), 1,88 (m, 1H, CH), 1,75 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,45–1,18 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_3$).

EI-HRMS izračunana za $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_2$ (MH) $^+$: $m/z = 170,1176$; izmerjena: 170.1176.

Tališče: 56–62 °C

4.3. Sinteza 2-okso-*N*-fenilamida (**3c**)

Potek reakcije:



Shema 12: Sinteza 2-okso-*N*-fenilamida (**3c**)

V bučko smo zatehtali 1,310 g piruvične kisline (**1**) (14,8 mmol; 1,0 ekv.) ter jo raztopili v 30 mL CH₂Cl₂. Ko se je piruvična kislina raztopila, smo reakcijsko zmes ohladili na ledu ter dodali 1,9 mL oksalil klorida (22,1 mmol, 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo na sobni temperaturi pustili mešati 3 ure. Nato smo na ledu ohlajeni reakcijski zmesi dodali 1,6 mL anilina (**2c**) (16,4 mmol, 1,1 ekv.) in 3,1 mL Et₃N (22,4 mmol, 1,5 ekv.), ki sta bila raztopljena v manjši količini CH₂Cl₂ in pustili mešati na sobni temperaturi 20 ur.

Po pretečenem času smo dodali 5 mL 1M HCl_(aq), 15 mL vode ter 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Reakcijsko zmes smo prefiltrirali, filtrat pa dvakrat sprali s po 20 mL vodne raztopine HCl (pH 1). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na₂SO₄ ter topilo odparili na rotacijskem uparjalniku in dobili trden, oranžen produkt **3c** (0,850 g).

S kolonsko kromatografijo (mobilna faza EtOAc: PE = 9:1) smo prečistili 0,195 g produkta **3c**.

Izkoristek: 0,051 g (26,2 % glede na kolonsko kromatografijo)

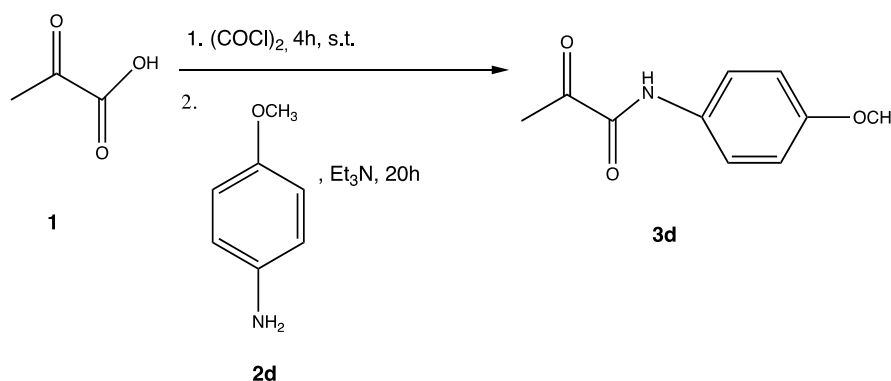
IR: ν_{maks} 3319, 2923, 2853, 1768, 1720, 1667, 1597, 1526, 1494, 1442, 1356, 1316, 1235, 1180, 1133, 1079, 1027, 973, 916, 893, 750, 722, 685, 631 cm⁻¹.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8,71 (razš. s, 1H, NH), 7,65–7,15 (m, 5H, Ph), 2,57 (s, 3H, CH₃).

Tališče: 89–94 °C

4.4. Sinteza 2-okso-*N*-(4-metoksifenil)propanamida (**3d**)

Potek reakcije:



Shema 13: Sinteza 2-okso-*N*-(4-metoksifenil)propanamida (**3d**)

V bučko smo zatehtali 1,526 g piruvične kisline (**1**) (17,3 mmol, 1,0 ekv.) in ji dodali 30 mL CH₂Cl₂. Ko se je piruvična kislina raztopila, smo reakcijsko zmes ohladili na ledu ter dodali oksalil klorid (2,2 mL; 25,6 mmol; 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo na sobni temperaturi pustili mešati 4 ure, jo nato ohladili na ledu ter ji dodali 2,471 g 4-metoksianilina (**2d**) (20 mmol, 1,2 ekv.) in Et₃N (2,5 mL; 22,4 mmol; 1,5 ekv.), raztopljeni v manjši količini CH₂Cl₂ in pustili mešati na sobni temperaturi 16 ur.

Nato smo dodali 15 mL 1M HCl_(aq) in 15 mL vode. Reakcijsko zmes smo prefiltrirali, filtrat pa dvakrat sprali s po 15 mL vodne raztopine HCl (pH 1). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim Na₂SO₄ ter topilo odparili na rotacijskem uparjalniku. Reakcijski preostanek se je izločil v obliki črne viskozne tekočine (1,0913 g).

S kolonsko kromatografijo (mobilna faza EtOAc: PE = 1:1) smo prečistili 0,1582 g reakcijskega preostanka in izolirali 0,052 g (32,7 %) oranžnega trdnega produkta **3d**.

IR: ν_{maks} 3333, 2921, 2853, 1715, 1668, 1594, 1531, 1511, 1463, 1443, 1414, 1359, 1302, 1268, 1230, 1179, 1140, 1112, 1028, 977, 900, 840, 815, 753, 723, 679, 610 cm⁻¹.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8,60 (razš. s, 1H, NH), 7,56 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, Ph), 6,90 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H, Ph), 3,81 (s, 3H, OCH_3), 2,56 (s, 3H, CH_3).

Tališče: 112–116 °C

5. Zaključek

Amide piruvične kisline smo sintetizirali s pretvorbo piruvične kisline v kislinski klorid, slednjemu pa smo dodali različne amine. Pri vseh reakcijah smo kot reagent za pretvorbo piruvične kisline v kislinski klorid uporabili oksalil klorid, ki se je izkazal za boljšega od tionil klorida (ki smo ga preizkusili v enem primeru, vendar sinteza ni bila uspešna), saj je pripomogel k višjemu izkoristku. Kljub temu izkoristki reakcij še vedno niso ravno zadovoljivi, saj tudi oksalil klorid ni najbolj primeren za tvorbo kislinskih kloridov α -keto karboksilnih kislin. Kot topilo smo pri vseh reakcijah uporabili diklorometan.

Vse produkte nam je po čiščenju s kolonsko kromatografijo uspelo izolirati v zelo čisti obliki, razen 2-okso-*N,N*-dietilpropanamida, pri katerem je ostal prisoten delež hlapnega reaktanta (dietilamina), ki ga nismo uspeli odstraniti niti s sušenjem na vakumski črpalki.

6. Literatura

- [1] https://en.wikipedia.org/wiki/Pyruvic_acid (pridobljeno 19. jul. 2019)
- [2] <https://www.rxlist.com/pyruvate/supplements.htm> (pridobljeno 19. jul. 2019)
- [3] D. L. Nelson, M. M. Cox, A. L. Lehninger: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7. izdaja, New York, NY: W. H. Freeman and Company 2017
- [4] K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore: *Organic Chemistry: Structure and Function*. 6. izdaja, New York, NY: W. H. Freeman and Company 2017, str. 534–565.
- [5] J. W. Howard, W. A. Fraser: Pyruvic Acid. *Org. Synth.* **1925**, *4*, 63.
- [6] <https://en.wikipedia.org/wiki/Amide> (pridobljeno 19. jul. 2019)
- [7] https://en.wikipedia.org/wiki/Acyl_chloride (pridobljeno 19. jul. 2019)
- [8] https://en.wikipedia.org/wiki/Schotten%E2%80%93Baumann_reaction (pridobljeno 19. jul. 2019)
- [9] A. P. Rajput, R. P. Gore: *N*-Acylation in non-aqueous and aqueous medium-method of amide synthesis in non-peptide compounds. *Pharm. Chem.* **2011**, *3*, 409–421.
- [10] H. C. J. Ottenheijm, M. W. Tjihuis: Acid Chlorides from α -keto acids with α,α -dichloromethyl methyl ether: Pyruvoyl Chloride. *Org. Synth.* **1983**, *61*, 1.
- [11] L. Kürti, B. Czakó: *Strategic applications of named reactions in organic synthesis: background and detailed mechanisms*. 2005, Amsterdam: Elsevier Academic Press, str. 398–399.
- [12] S. Gouedranche, D. Pierrot, T. Constantieux, D. Bonne, J. Rodriguez: A temporary-bridge strategy for enantioselective organocatalyzed synthesis of aza-seven-membered rings. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 15605–15608.
- [13] H.-K. Lee, I.-D. Kim, S.-W. Kim, H. Lee, J.-Y. Park, S.-H. Yoon, J.-K. Lee: Anti-inflammatory and anti-excitotoxic effects of diethyl oxopropanamide, an ethyl pyruvate bioisoster, exert robust neuroprotective effects in the postischemic brain. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–14.

[14] F. Heaney, J. Fenlon, P. McArdle, D. Cunningham: α -Keto amides as precursors to heterocycles – generation and cycloaddition reactions of piperazin-5-one nitrones. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1122–1132.

[15] P. Kaur, P. Singh, S. Kumar: Regio- and stereochemical aspects in synthesis of 2-allyl derivatives of glycolic, mandelic and lactic acids and their iodocyclisations to 3-hydroxy-3,4-dihydrofuran-2(5*H*)-ones. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 8231–8240.