

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URBAN KOŠAK

SINTEZA 3-KETOPALMITOIL KOENCIMA A

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URBAN KOŠAK

**SINTEZA 3-KETOPALMITOIL KOENCIMA A
SYNTHESIS OF 3-KETOPALMITOYL COENZYME A**

Ljubljana, 2011

Diplomsko naložbo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Andreje Kovač, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Štefan.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in asist. dr. Andreji Kovač, mag. farm. za posredovanjo strokovno pomoč in nasvete pri diplomskem delu. Še posebej bi se rad zahvalil raziskovalcem iz Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so posneli $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ in $^{31}\text{P-NMR}$ spektre. Zahvalil bi se tudi tistim, ki so posneli masne spektre, izvedli elementne analize in liofilizacijo.

Na koncu bi se zahvalil še staršem, bratu, dekletu in prijateljem za podporo in pomoč v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko naložbo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Andreje Kovač, mag. farm.

Urban Košak

Ljubljana, 2011

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD	1
1.1. 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 12 (17 β -HSD12).....	1
1.2. β -keto estri.....	3
1.2.1. Nekateri načini sinteze α,α -nesubstituiranih β -ketoestrov (2)	5
2. NAČRT DELA.....	8
2.1. Retrosintezna analiza 3-ketopalmitoil koencima A	8
2.1.1. Retrosintezna analiza – brez uporabe zaščitne skupine	8
2.1.2. Retrosintezna analiza – z uporabo zaščitne skupine	9
3. MATERIALI IN METODE	11
4. EKSPERIMENTALO DELO IN REZULTATI ANALIZ	15
4.1. Shematski prikaz sinteze β -ketoestrov (5, 26–29)	15
4.1.1. Sinteza β -ketoestrov (5, 26–29)	15
4.1.1.1. Sinteza etil 3-oksoheksadecanoata (5)	15
4.1.1.2. Sinteza etil 3-oksooctanoata (26)	16
4.1.1.3. Sinteza etil 3-okso-3-fenilpropanoata (27)	16
4.1.1.4. Sinteza etil 3-(4-nitrofenil)-3-oksopropanoata (28)	16
4.1.1.5. Sinteza etil 3-(4-klorofenil)-3-oksopropanoata (29).....	17
4.2. Shematski prikaz sinteze 3-ketopalmitoil konecima A (1)	18
4.2.1. Sinteza 3-oksoheksadekojske kisline (19).....	19
4.2.2. Poskus sinteze 3-oksoheksadekanoil klorida (31).....	19
4.2.3. Poskus sinteze etil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida oz. sinteza pentadekan-2-ona (46)	20
4.2.4. Poskus sinteze izobutil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida (33)	21
4.2.5. Poskus sinteze 2,5-dioksopirolidin-1-il 3-oksoheksadecanoata (34)	21
4.2.6. Poskus sinteze 1,3-dioksoizoindolin-2-il 3-oksoheksadecanoata (35)	22
4.2.7. Poskus sinteze 1-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)heksadekan-1,3-diona (36)	22
4.2.8. Poskus sinteze metil 2-(3-oksoheksadekanoil)tioacetata (38)	23
4.2.9. Sinteza etil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (24)	24
4.2.10. Sinteza 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetne kisline (23).....	24
4.2.11. Sinteza etil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (39)	25

4.2.12. Poskus sinteze izobutil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (40)	26
4.2.13. Sinteza 2,5-dioksopiroolidin-1-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (41).....	26
4.2.14. Sinteza 1,3-dioksoisoindolin-2-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (42).....	27
4.2.15. Sinteza metil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (43)	27
4.2.16. Poskus sinteze metil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (43)	28
4.2.17. Sinteza tioestra NAC z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (45)	29
4.2.18. Sinteza tioestera koencim A z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (22)	30
4.2.19. Poskus sinteze tioestra koencima A s 3-oksoheksadekanojsko kislino A (3-ketopalmitoil koencima A) (1).....	31
4.2.20. Sinteza tioestra koencima A s 3-oksoheksadekanojsko kislino A (3-ketopalmitoil koencima A) (1)	32
5. RAZPRAVA.....	34
5.1. Razprava o sintezi β -keto estrov	34
5.2. Razprava o sintezi 3-ketopalmitoil koencima A	35
5.2.1. Sinteza 3-oksoheksadekanojske kisline (19).....	35
5.2.2. Poskus aktivacije 3-oksoheksadekanojske kisline	36
5.2.2.1. Poskus sinteze 3-oksoheksadekanoil klorida (31)	36
5.2.2.2. Poskus sinteze etil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida (32) oz. sinteza pentadekan-2-on (46) in poskus sinteze izobutil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida (33)	36
5.2.2.3. Poskus sinteze 2,5-dioksopiroolidin-1-il 3-oksoheksadekanoata (34) in 1,3-dioksoisoindolin-2-il 3-oksoheksadekanoata (35)	37
5.2.2.4. Poskus sinteze 1-(1 <i>H</i> -imidazol-1-il)heksadekan-1,3-diona (36).....	38
5.2.3. Poskus sinteze metil 2-(3-oksoheksadekanoiltio)acetata (38)	38
5.2.4. Sinteza etil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (24)	39
5.2.5. Sinteza 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetne kisline (23).....	40

5.2.6. Sinteza etil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (39) in poskus sinteze izobutil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (40)	40
5.2.7. Sinteza 2,5-dioksopirolidin-1-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (41) in 1,3-dioksoisoindolin-2-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (42)	41
5.2.8. Sinteza metil 2-(2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (43)	41
5.2.9. Poskus sinteze metil 2-(2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (43)	43
5.2.10. Sinteza tioestra NAC z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2il)ocetno kislino (45)	43
5.2.11. Sinteza tioestera koencim A z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (22)	44
5.2.12. Sinteza tioestra koencima A s 3-oksoheksadekanojsko kislino A (3-ketopalmitoil koencima A) (1)	44
5.3. Razvoj HPLC metod	46
5.3.1. Razvoj HPLC metod na koloni B	46
5.3.2. Razvoj HPLC metod na koloni A	46
6. ZAKLJUČEK	48
7. LITERATURA	49
PRILOGA	I
1. Primerjava hitrosti reakcije odščite pri različnih pogojih	I
1.1. 254,16 nm	I
1.2. 210,8 nm	IV
1.3. 280,16 nm	VII
2. Gradienti mobilnih faz in pripadajoči HPLC kromatogrami	X

POVZETEK

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 12 je encim, ki sodi v družino 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz in katalizira redukcijo estrona v estradiol. Poleg vloge pri steroidogenezi naj bi imel vlogo tudi pri presnavljanju lipidov. Kataliziral naj bi redukcijo 3-ketoacil koencima A v 3-hidroksiacyl koencim A. Ta redukcija je druga stopnja mikrosomalnega podaljševanja maščobnih kislin. S sintezo potencialnega endogenega substrata, 3-ketopalmitoil koencima A, bi prispevali k raziskovanju potencialne multifunkcionalnosti tega encima in s tem k razvoju novih učinkovin za nekatera rakava obolenja, motnje presnove in različne genetske ter nevrodegenerativne bolezni, s katerimi so povezane 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze. Ker smo za sintezo 3-ketopalmitoil koencima A potrebovali etil 3-oksoheksadecanoat, smo razvili enostaven postopek za sintezo α,α -nesubstituiranih in α -monosubstituiranih β -keto estrov iz kislinskih kloridov in etil acetoacetata. S tem postopkom smo sintetizirali etil 3-oksooctanoat, etil 3-oksopropionatoat in etil 3-oxohexanoat, etil 3-(4-nitrofenil)-3-oksopropanoat, etil 3-(4-klorofenil)-3-oksopropanoat in etil 3-oxohexadecanoat, ki smo ga uporabili za sintezo 3-ketopalmitoil koencima A. Sintesa končne spojine 3-ketopalmitoil koencima A je bila mogoča le z uvedbo zaščitne skupine za β -karbonilno skupino. Za določanje čistosti 3-(1',3'-dioksolanil)palmitoil koencima A in 3-ketopalitoil koencima A ter spremljanje poteka pretvorbe 3-(1',3'-dioksolanil)palmitoil koencima A v 3-ketopalitoil koencima A smo razvili več HPLC metod.

ABSTRACT

17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 12 is a member of the 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase enzyme family and catalyzes the reduction of estrone into estradiol. In addition to its role in steroidogenesis, 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 12 may also be involved in lipid metabolism by catalyzing the reduction of 3-ketoacyl coenzyme A into 3-hydroxyacyl coenzyme A. This reduction is the second step of microsomal fatty acyl elongation. The synthesis of a potential endogenous substrate, 3-ketopalmitoyl coenzyme A, would contribute to research of potential multifunctionality of this enzyme and development of new drugs for some types of cancers, metabolic disorders, and different genetic and neurodegenerative diseases associated with 17 β -hydroxysteroid-dehydrogenases. Because we needed ethyl 3-oxohexadecanoate to synthesize 3-ketopalmitoyl coenzyme A,

we developed a simple procedure for preparing α,α -disubstituted and α -monosubstituted β -keto esters from acyl chlorides and ethyl acetoacetate. Using this procedure we synthesized ethyl 3-oxooctanoate, ethyl 3-oxo-3-phenylpropanoate, ethyl 3-(4-nitrophenyl)-3-oxopropanoate, ethyl 3-(4-nitrophenyl)-3-oxopropanoate and ethyl 3-oxohexadecanoate, which was used in the synthesis of 3-ketopalmitoyl coenzyme A. The synthesis of final compound 3-ketopalmitoyl coenzyme A was possible only with the use of a protective group for the β -carbonyl group. We also developed several HPLC methods for determination of purity of 3-(1',3'-dioxolanyl)palmitoyl coenzyme A and 3-ketopalmitoyl coenzyme A and monitoring the conversion of 3-(1',3'-dioxolanyl)palmitoyl coenzyme A into 3-ketopalmitoyl coenzyme A.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ledocet
bs	širok singlet
bt	širok triplet
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
CoASH	koencim A
CV	volumen kolone
d	dublet
dd	dublet dubleta
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DCU	<i>N,N'</i> -dicikoheksilsečnina
4-DMAP	<i>N,N</i> -dimetil-4-aminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
dt	dublet tripleta
EtOAc	etyl acetat
EtOH	etanol
EtONa	natrijev etanolat
Et ₃ N	<i>N,N,N</i> -trietylamin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	visoko ločljiva masna spektrometrija
HOBr	<i>N</i> -hidroksibenzotriazol
IR	infrardeča spektroskopija
kat.	katalitična količina
Li ₃ CoASH	trilitijeva sol koencima A
M	molarnost (mol/l)
m	multiplet
MeOH	metanol
MeONa	natrijev metanolat
min	minute
mol. ekv.	molarni ekvivalent
MS	masna spektrometrija
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid
NADH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotida

NADP^+	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NHF	<i>N</i> -hidroksiftalimid
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
q	kvartet
<i>iPr</i> ₂ EtN	<i>N,N,N</i> -etildiizopropilamin
Rf	retencijski faktor
s.t.	sobna temperatura
TBAC	tetra- <i>n</i> -butilamonijev klorid
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TFA	trifluorocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
TMS	tetrametilsilan
TLC	tankoplastna kromatografija
<i>t</i> _R	retencijski čas
T _{tal}	temperatura tališča
<i>p</i> -TsOH	4-metilbenzensulfonska kislina

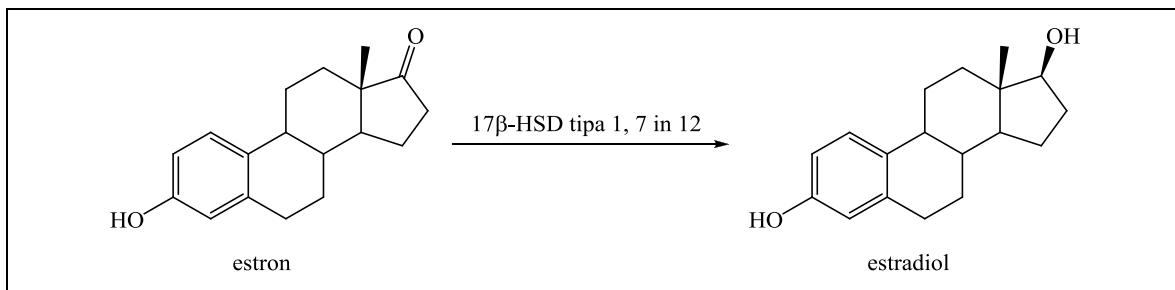
1. UVOD

1.1. 17β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 12 (17 β -HSD12)

17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze (17 β -HSD) so encimi, ki katalizirajo oksidacijo 17 β -hidroksisteroidov ali redukcijo 17-ketosteroidov. Za oksidacijo uporabljajo kofaktor NAD(P)⁺, kofaktor NAD(P)H pa za redukcijo (1). Oksidativne 17 β -HSD deaktivirajo steroide, reduktivne 17 β -HSD pa aktivirajo androgene in estrogene (2). Nekatere 17 β -HSD so udeležene v rakavih in določenih genetskih in nevrodegenerativnih obolenjih (1).

17 β -HSD12 je encim, ki sodi med reduktivne 17 β -HSD. Nahaja se v možganih, srcu, skeletnih mišicah, ledvicah, jetrih, celicah Langerhansovih otočkov trebušne slinavke, na površinskem epiteliju tankega in debelega črevesa, adenohipofizi, nadledvični žlezi, testisih, placenti, mlečni žlezi, jajčnikih, placenti in maternici (1, 2). Med tkivi, ki so občutljiva na estrogen, ga je največ v mlečni žlezi in jajčnikih (2).

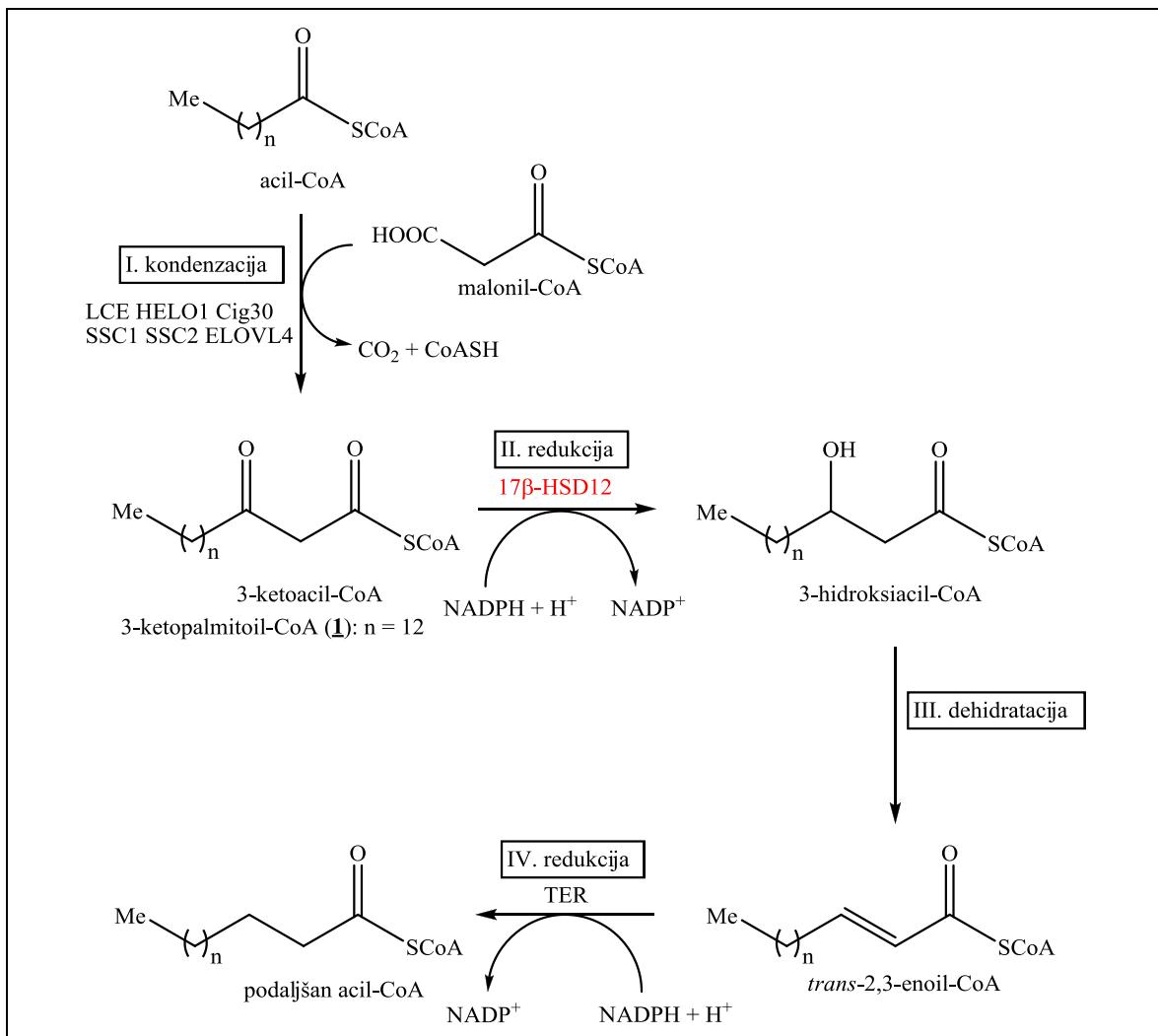
17 β -HSD12 sodeluje v procesu steroidogeneze tako, da katalizira pretvorbo estrona v estradiol (slika 1) (2). Estradiol je najmočnejši estrogen. Odgovoren je za diferenciacijo, rast in funkcijo ženskih spolnih organov. Z aktivacijo receptorjev za estrogene je povezan z rastjo od estrogenov odvisnega raka dojk in endometrija (3). Redukcijo estrona v estradiol katalizirata tudi 17 β -HSD tipa 1 in 7. V placenti se v največji meri izraža 17 β -HSD tipa 1, v jetrih 17 β -HSD tipa 7, v mlečni žlezi, jajčnikih in maternici pa 17 β -HSD12. Zato je ta encim pomemben vir estradiola pri ženskah pred in po menopavzi, ko postanejo periferna tkiva edini vir estrogenov (2).



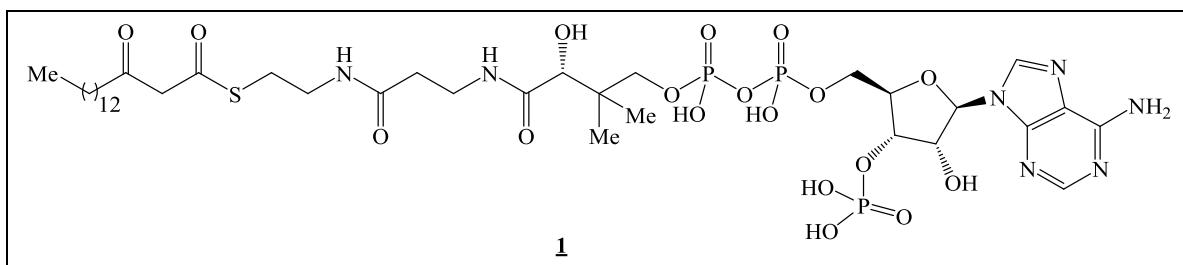
Slika 1: Redukcija estrona v estradiol.

Pomen 17 β -HSD12 v presnovi lipidov še ni povsem pojasnjen. 17 β -HSD12 encim je humani homolog 3-ketoacil-CoA reduktaze, ki jo najdemo pri kvasovkah. Katalizira pretvorbo 3-ketoacil-CoA v 3-hidroksiacil-CoA. Ta redukcija je druga stopnja mikrosmalnega podaljševanja maščobnih kislin (slika 2). 3-ketopalmitoil koencim A (**1**) je potencialni endogeni substrat tega encima (slika 3) (4). Prisotnost 17 β -HSD12 v organizih in tkivih, kjer poteka presnova lipidov podpira tezo, da je 17 β -HSD12 udeležen tudi pri

presnovi lipidov. Sinteza tioestra **1** bi prispevala k preučevanju fiziološkega pomena tega multifunkcionalnega encima in s tem k razvoju novih učinkovin za nekatera rakava obolenja, motnje presnove in različne genetske ter nevrodegenerativne bolezni, s katerimi so povezane 17 β -HSD (1).



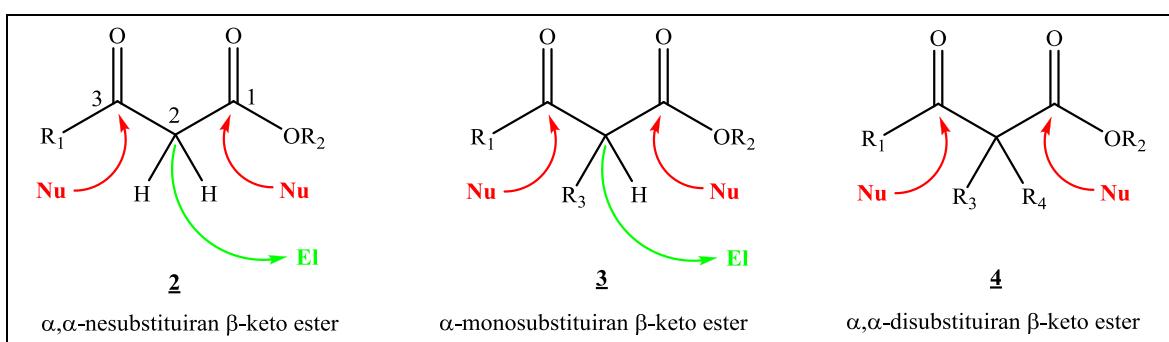
Slika 2: Mikrosomalno podaljševanje maščobnih kislin. Encimi so: elongaze dolgorožnih maščobnih kislin (**LCE, HELO1, Cig30, SSC1, SSC2 in ELOVL4**), 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 12 (**17 β -HSD12**) in *trans*-2,3-enoil-CoA reduktaza (**TER**).



Slika 3: Struktura 3-ketopalmitoil koencima A (**1**).

1.2. β -keto estri

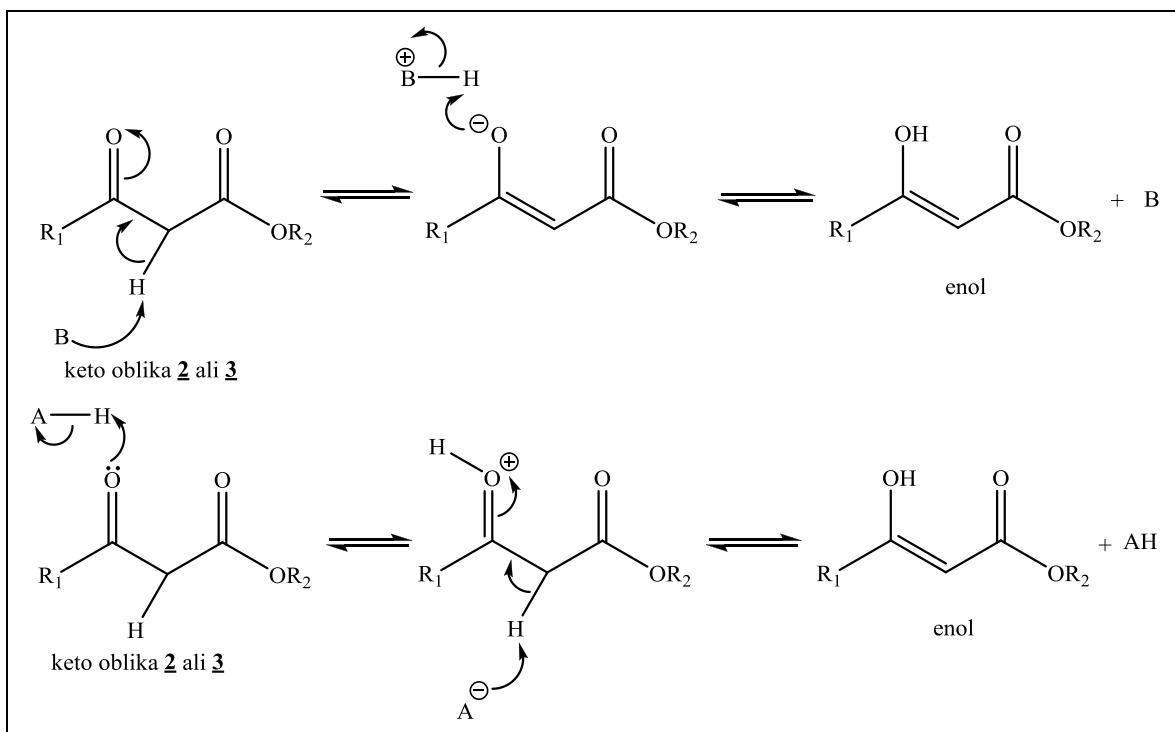
β -keto estri so organske spojine, ki imajo v svoji strukturi poleg estrske skupine še karbonilno skupino na mestu 3 (β -mesto). Glede na število vodikov na ogljikovem atomu med estrsko in karbonilno skupino (mesto 2 ali α -mesto) ločimo α,α -nesubstituirane (**2**), α -monosubstituirane (**3**) in α,α -disubstituirane β -keto estre (**4**). Razlike v reaktivnosti in s tem tudi sintezni uporabnosti so posledica razlik v strukturah. β -keto estri **2**, **3** in **4** imajo v svoji strukturi dve elektrofilni (karbonilna in estrska) skupini, ki lahko pri ustreznih pogojih reagirata z nukleofili. β -Keto estri **2** in **3** pa imajo poleg elektrofilnih še skupino (CH_2 pri **2** in CH pri **3**), ki jo lahko pri ustreznih pogojih pretvorimo v nukleofil, ki reagira z elektrofilimi (slika 4).



Slika 4: Strukture β -keto estrov in prikaz reaktivnosti (EI = elektrofil, Nu = nukleofil).

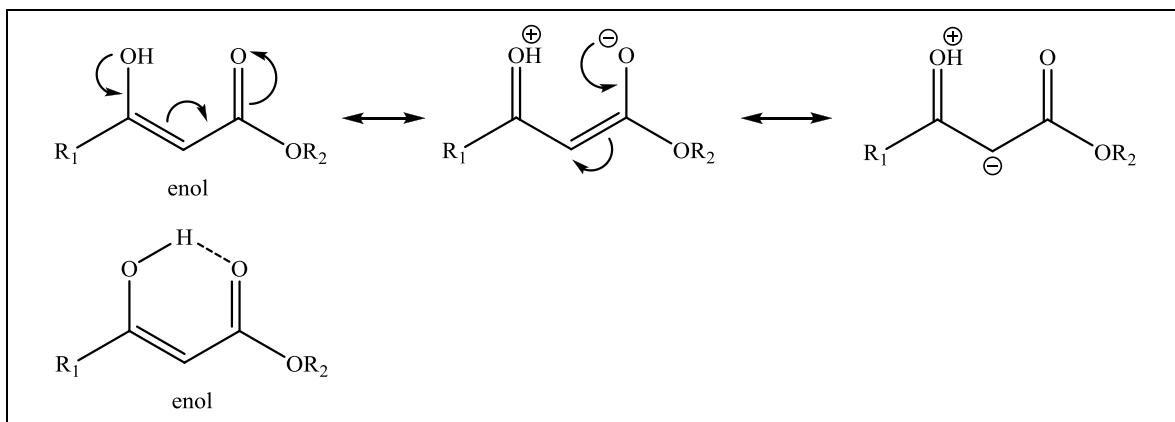
Zaradi omenjenih reaktivnih skupin lahko iz β -keto estrov sintetiziramo številne derivate. V farmaciji so β -keto estri pomembni intermediati pri sintezi številnih učinkovin (npr. cerivastatin, fluvastatin, rosuvastatin, nifedipin, felodipin, nimodipin, flordipin, taludipin, misoprostol, tenoksikam, haloperidol, droperidol, pimozid, tetrabenazin, sakvinavir) in pomožnih snovi (npr. biorazgradljivi polimeri) (5).

Za β -keto estre **2** in **3** je značilna keto-enol tautomerija. To je izomerizacija, pri kateri pride do sočasne prenestitve vodikovega atoma in dvojne vezi v sklopu treh atomov. Posamezne izomere imenujemo tautomere, prehod iz keto v enolno obliko pa enolizacija. Gre za eksotermen proces, ki poteka v plinski fazi, v samih tekočinah ali v raztopini. Enolizacijo katalizirajo kisline ali baze (slika 5) (6).



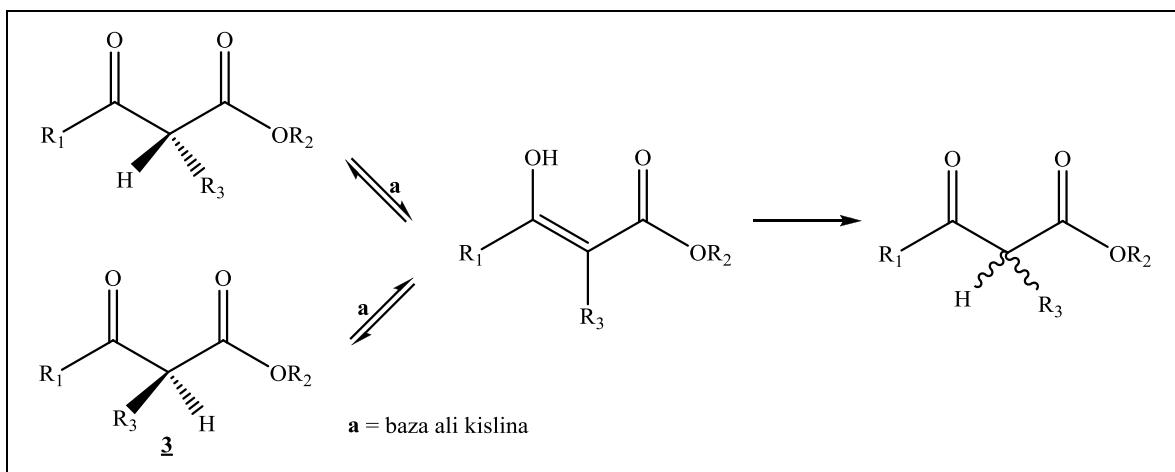
Slika 5: Shema z bazo (B) (zgoraj) in s kislino (AH) (spodaj) katalizirane enolizacije β -keto estrov **2** in **3**.

Struktura karbonilne spojine in topilo v veliki meri vplivata na delež enola. Pri β -keto estrih **2** in **3** je relativno visok delež enola posledica večje kislosti protona vezanega na ogljiku na mestu 2, resonančne stabilizacije enola in nastanka intramolekularne vodikove vezi pri enolu (slika 6) (6).



Slika 6: Shema resonančne stabilizacije enola (zgoraj) in prikaz intramolekularne vodikove vezi (s prekinjeno črto) pri enolu (spodaj).

Bolj polarno je topilo, manjši je delež enola. Intermolekularne vodikove vezi enola z molekulami topila motijo intramolekularno vodikovo vez, ki stabilizira enol. Pri trans-enolih (cikloalkan-1,3-dioni s štiričlenskim, petčlenskim in šestčlenskim obročem) zaradi stericnih ovir intramolekularna vodikova vez ni mogoča. Zato je v bolj polarnih topilih delež enolne oblike večji. Za optično čiste β -keto estre **3** je značilna tudi racemizacija. Gre za pojav pri katerem se čisti enantiomer pretvori v zmes enantiomerov (slika 7) (6).



Slika 7: Shema racemizacije optično čistih β -keto estrov **3**.

Objavljenih je veliko načinov sinteze β -keto estrov (7–28). Benneti in sodelavci so leta 1995 objavili obsežen pregledni članek o (do leta 1993 opisanih) načinih sinteze teh spojin (28). Ker sodi intermediat za sintezo 3-ketopalmitoil koencima A (**1**), etil 3-oksoheksadecanoat (**5**) med α,α -nesubstituirane β -keto estre (**2**), bomo v nadaljevanju predstavili nekatere načine sinteze teh spojin.

1.2.1. Nekateri načini sinteze α,α -nesubstituiranih β -ketoestrov (**2**)

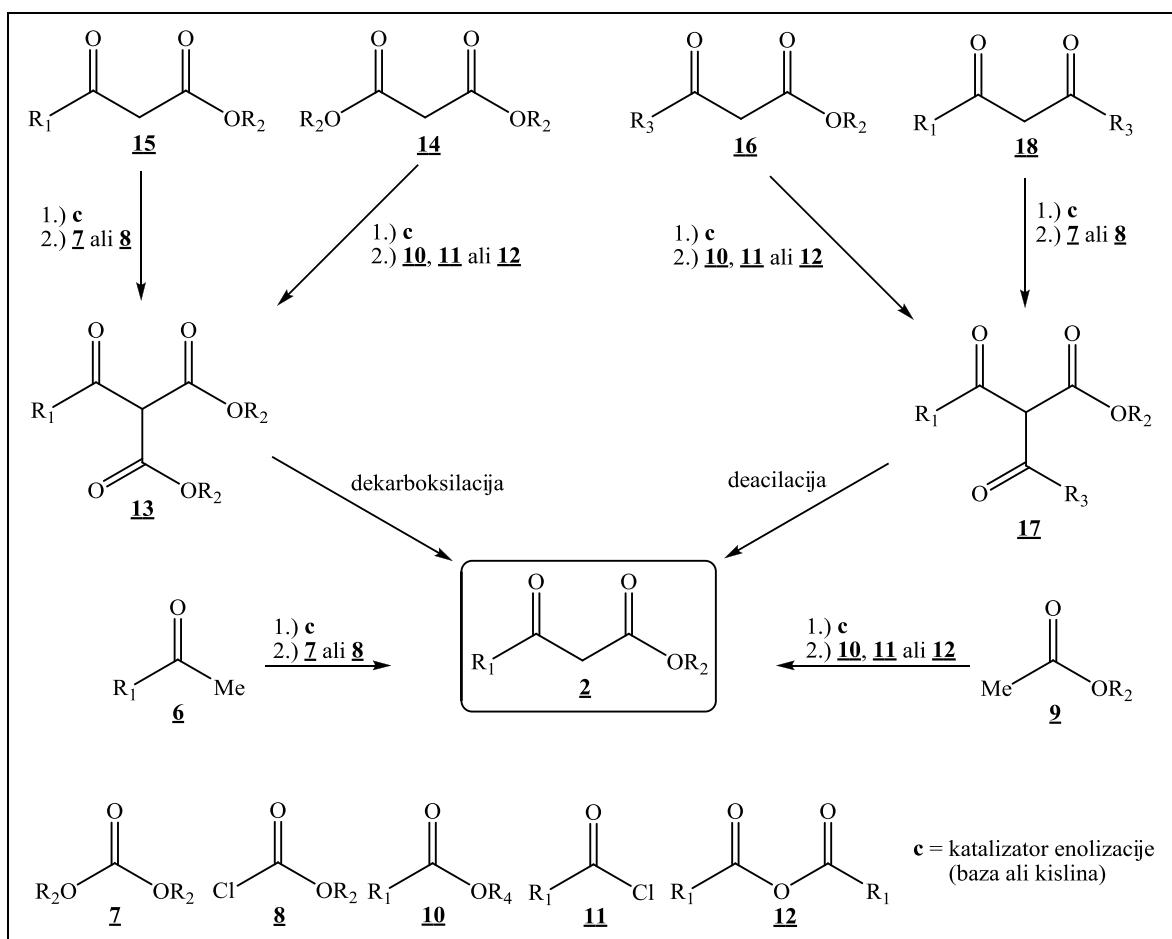
Shema nekaterih v literaturi opisanih načinov sinteze α,α -nesubstituiranih β -keto estrov (**2**) je prikazana na sliki 8. β -keto estre **2** lahko sintetiziramo:

- iz ketonov (**6**) in
 - dietil karbonata (**7**) v prisotnosti NaH (7, 8),
 - dimetil karbonata (**7**) v prisotnosti NaH (9),
 - dietil karbonata (**7**) v prisotnosti NaNH₂ (10),
- iz Grignardovih reagentov in etil cianoacetata, čemur sledi hidroliza nastalega imina z NH₄Cl in koncentrirano vodno raztopino HCl (10),
- iz estrov (**9**) in EtOAc (**10**) v prisotnosti NaH (11),
- iz kislinskih kloridov (**11**) in
 - etyl *t*-butil malonata v prisotnosti EtOMg, čemur sledi dekarboksilacija nastalega α -acil malonata (**13**) s *p*-TsOH ob segrevanju (10),
 - dietil malonata (**14**) v prisotnosti EtOMg, čemur sledi dekarboksilacija nastalega α -acil malonata (**13**) z naftalen-2-sulfonsko kislino ob segrevanju (12, 13), ali vodo ob segrevanju (14, 15),
- iz kislinskih kloridov (**11**) in

- etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti NaOH, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl (7),
 - metil acetoacetata (**16**) v prisotnosti NaH, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl (9),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti Na, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) s NH₃ (10),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti EtONa, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl ob segrevanju (16),
 - t-butil acetoacetat (**16**) v prisotnosti NaH, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NaOH (17),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti EtONa, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl in koncentrirano vodno raztopino NH₃ (18–21),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti EtONa, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl in 25 % vodno raztopino NH₃ ob segrevanju (22),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti NaOH, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z NH₄Cl in koncentrirano vodno raztopino NH₃ ob segrevanju (23),
 - etil acetoacetata (**16**) v prisotnosti Na, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z MeONa (24, 25),
 - metil acetoacetata (**16**) v prisotnosti BaO in katalitične količine H₂O, čemur sledi deacetilacija nastalega α -acil β -keto estra (**17**) z MeOH (11, 26),
- f) iz aldehidov in etil diazoacetata v prisotnosti katalitične količine Lewisove kisline (npr. SnCl₂, BF₃ ali GeCl₂) (27).

Način sinteze, ki je opisan pod c), je primer Claisenova kondenzacije estrov. Ciklične β -keto estre lahko sintetiziramo tudi z Deickmannovo kondenzacijo, ki je intramolekularna Claisenova kondnezacija estrov (6).

Urban Košak: Sinteza 3-ketopalmitoil koencima A



Slika 8. Shema nekaterih načinov sinteze α,α -nesubstituiranih β -ketoestrov (**2**).

2. NAČRT DELA

2.1. Retrosintezna analiza 3-ketopalmitoil koencima A

3-Ketopalmitoil koencim A (**1**) želimo sintetizirati na enostaven način. S pomočjo retrosinteze bomo pripravili sintežni načrt. Retrosinteza je analizni postopek, s katerim pretvorimo ciljno molekulo v sintone. Sintoni so polarizirani fragmenti molekul, s pomočjo katerih izberemo primerne reagente za sintezo. Sintezni ekvivalenti sintona so reagenti, ki predstavljajo isti sinton. Retrosinteza in s tem priprava sinteznega načrta se začne s strukturno formulo ciljne molekule. Smiselno je, da vsaka stopnja v retrosintezi (transform) vodi do reagentov, ki so lažje dostopni kot ciljna molekula. Transforme, ki jih označujemo z retorosinteznimi puščicami, ponavljamo toliko časa, da pridemo do enostavnih reagentov.

Izvedli bomo dve retrosintezni analizi ciljne molekule **1**. Pri prvi bomo predpostavili da za sintezo ne bomo potrebovali zaščitne skupine. Ta retrosintezna analiza bo vodila do relativno enostavnega sinteznega načrta. Pri drugi retrosintezni analizi bomo predpostavili, da bomo za sintezo potrebovali zaščitno skupino za karbonilno skupino β -keto estra **5**. Ta retrosinteza bo vodila do sinteznega načrta, ki bo za stopnjo uvedbe in stopnjo odstranitve zaščitne skupine daljši od prvega. V primeru, da nam ciljne molekule ne bo uspelo sintetizirati brez uporabe zaščitne skupine, bomo ciljno molekulo sintetizirali z uporabo zaščitne skupine.

2.1.1. Retrosintezna analiza – brez uporabe zaščitne skupine

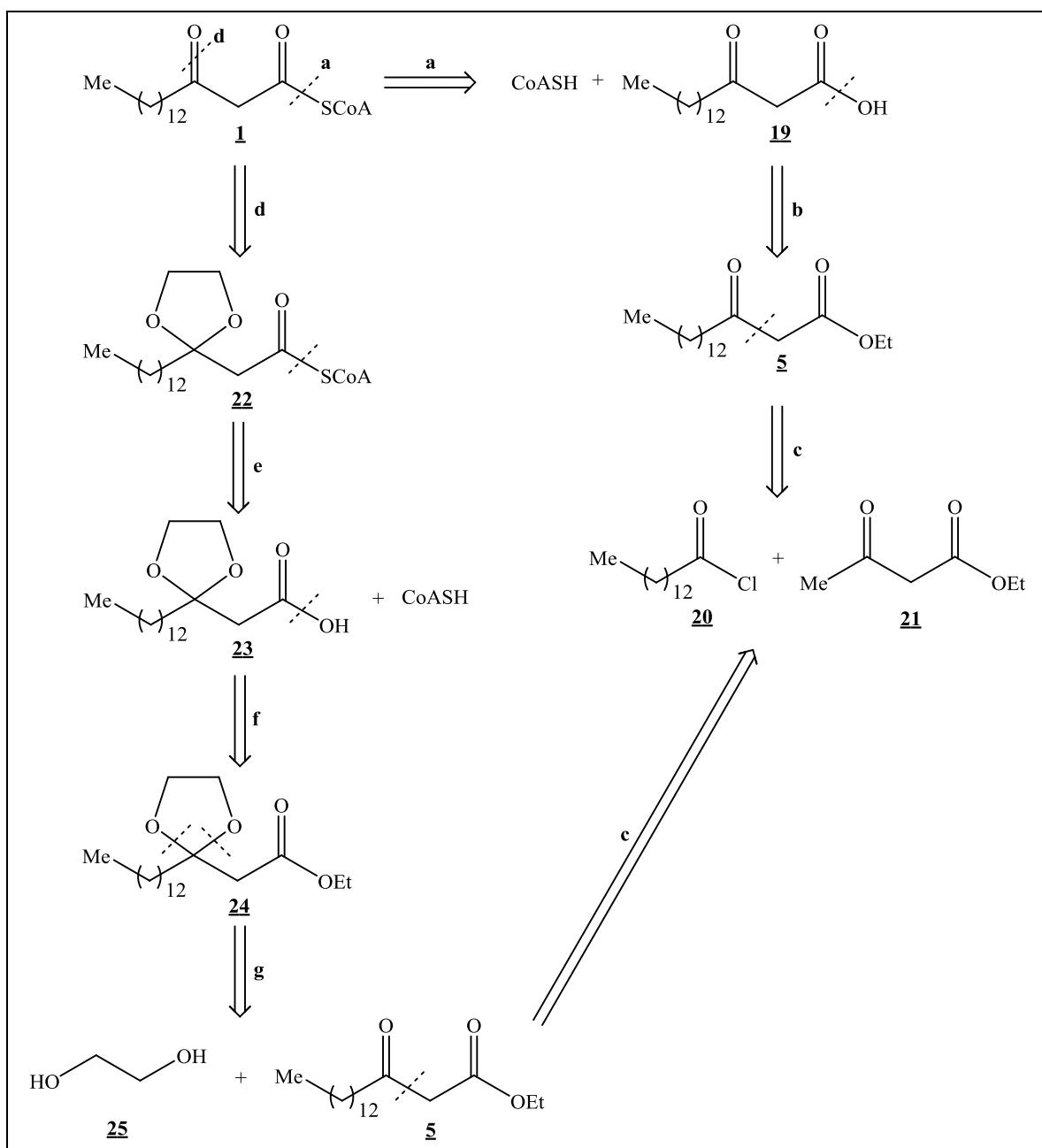
Retrosintezna cepitev pri posameznem transformu je označena s prekinjeno črto, ki prečka vez, ki jo cepimo. S transformom **a** cepimo tioestrsko vez 3-ketopalmitoil konecima A (**1**) in dobimo koencim A (CoASH) in 3-oksoheksadekanojsko kislino (3-ketopalmitinsko kislino) (**19**). To v sinteznem smislu pomeni, da bomo željeni tioester tvorili z ustrezno reakcijo med CoASH in β -keto karboksilino kislino **19**, ki jo bomo pretvorili v reaktivnejšo obliko. S transformom **b** izvedemo retrohidrolizo estrske vezi in dobimo etil 3-oksoheksadekanoat (**5**). To v smislu sinteze pomeni, da bomo β -keto karboksilno kislino **19** sintetizirali s hidrolizo estrske vezi β -keto estra **5**. Ker so β -keto karbokisline nestabilne v bazičnih pogojih, bomo izvedli s kislino katalizirano hidrolizo (29). S transformom **c** cepimo vez med ogljikom in ogljikom in dobimo miristoil klorid (**20**) in etil acetoacetat

(**21**). β -keto ester **5** bomo sintetizirali iz kislinskega klorida **20** in etil acetoacetata (**21**) (slika 9).

2.1.2. Retrosintezna analiza – z uporabo zaščitne skupine

S transformom **d** cepimo dvojno vez med ogljikom in kisikom v karbonilni skupini ciljne molekule **1** in s tem izvedemo »miselno« reakcijo uvedbe zaščitne skupine (v nadaljevanju zaščita) na to karbonilno skupino. Dobimo spojino **22**, ki ima v primerjavi s spojino **1** karbonilno skupino zaščiteno v obliki 1,3-dioksolana. Z reakcijo odstranitve zaščitne skupine (v nadaljevanju odščita) bomo iz spojine **22** sintetizirali spojino **1**. Pretvorbo 1,3-dioksolanov v karbonilne spojine lahko izvedemo z oksidacijo, s kislino katalizirano hidrolizo ali s kislino katalizirano izmenjevo dioksolanov (30). S transformom **e** cepimo tioestrsko vez spojine **22** in tako dobimo koencim A (CoASH) in karboksilno kislino **23**. Tioester **22** bomo sintetizirali z ustrezno reakcijo med CoASH in kislino **23**, ki jo bomo pretvorili v reaktivnejšo obliko. S transformom **f** izvedemo retrohidrolizo estrske vezi in dobimo etil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetat (**24**). S hidrolizo estrske vezi spojine **24** bomo sintetizirali karboksilno kislino **23**. Ker so 1,3-dioksolani nestabilni v kislih pogojih, bomo hidrolizo izvedli z bazo (30). S transformom **g** izvedemo »miselno« odščito estra **24** in dobimo β -ketoester **5**. Z zaščito karbonilne skupine spojine **5** v obliki 1,3-dioksolana bomo sintetizirali ester **24**. Kot reagent za sintezo 1,3-dioksalana iz karbonilne skupine spojine **5** bomo uporabili etilen glikol (**25**) (30). Zadnji transform **c** je enak kot pri retrosintezni analizi brez zaščitne skupine (slika 9).

Urban Košak: Sinteza 3-ketopalmitoil koencima A



Slika 9: Shema retrosintezne analize 3-ketopalmitoil koencima A (**1**).

3. MATERIALI IN METODE

- Bidestilirana voda**

Za pripravo vodnih raztopin pufrov in vzorcev spojin za analitsko reverzno fazno HPLC in avtomatizirano reverzno fazno »flash« kolonsko kromatografijo smo uporabili bidestilirano vodo, ki smo jo pridobili s pomočjo Millipore Advantage A10 sistema.

- Centrifugiranje**

Centrifugiranje smo izvedli s centrifugo Centric 150 proizvajalca Tehnica.

- Določanje temperatur tališč**

Temperature tališč smo določili na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirana.

- Elementna analiza**

Elementne analize so izvedli na Perkin-Emler C, H, N 240 C analizatorju na Katedri za organsko kemijo na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

- Filtriranje s presesavanjem**

Za filtriranje z odsesavanjem smo uporabili vodno črpalko.

- Infrardeča spekrtoskopija**

Spektre IR smo posneli na spektrofotometru Perkin-Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Valovno dolžino smo podali v cm^{-1} .

- Jedrska magnetna resonanca**

$^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ in $^{31}\text{P-NMR}$ spektre so posneli na Brucker Avance DPX₃₀₀ spektrometru v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani in Brucker Avance spektrometru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kemijske premike (δ) smo podali v »parts per million (ppm)« in se nanašajo na uporabljeni interni standard TMS, kadar smo uporabili CDCl_3 ali devterirano topilo, kadar smo uporabili D_2O . Sklopitvene konstante (J) smo podali v hertzih (Hz).

- Kromatografske metode**

Za »flash« kolonsko kromatografijo smo uporabili silikagel 60 (0,040–0,063 mm, velikost delcev 230–400 »mesh«) proizvajalca Merck. Za TLC smo uporabili plošče Silikagel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijstem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za ločbo zmesi spojin smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezi vsake spojine. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah

smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm) in reagente za oroševanje v obliki ustreznih raztopin (15 mg/mL ninhidrina v 96 % EtOH/AcOH = 5/1, 2,8 mg/mL 2,4-dinitrofenilhidrazina v 2 M vodni raztopini HCl, 9 % FeCl₃ v 45 % MeOH in 1,27 % I₂ v 96 % EtOH/3,25 % NaN₃ v 25 % EtOH = 1/1).

Analitsko reverzno fazno HPLC smo izvedli na Agilent 1100 LC modularnem sistemu opremljenem z avtomatskim vzorčevalcem, kvarterno črpalko, G1365B UV-VIS detektorjem (210,8, 254,16, 280,16 nm), termostatiranim prostorom za kolono in ChemStation podatkovim sistemom. Uporabili smo kolono A (Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 4,6 x 150 mm, 5 µm) in kolono B (Phenomenex Luna C18(2) 100A 250 x 4,6 mm, 5 µm). Na obeh kolonah smo uporabili predkolono Phenomenex Security Guard Cartridge C18 CODS, Octadecyl 4mmL x 3,0 mm ID. Pri vseh metodah smo kolono termostatirali pri 25 °C. HPLC metoda A: uporabili smo kolono A, injicirali 20 µL raztopine vzorca in eluirali s hitrostjo pretoka 0,7 mL/min z uporabo linearne gradijenta acetonitrila in vodne raztopine fosfatnega pufra (20 mM, pH = 4,95). Gradient za metodo A: v 20 minutah od 3 do 70 % acetonitrila, nato 6 minut 70 % acetonitrila in v 6 minutah nazaj do 3 % acetonitrila. HPLC metoda B: uporabili smo kolono A, injicirali 20 µL raztopine vzorca in eluirali s hitrostjo pretoka 0,7 mL/min z uporabo linearne gradijenta mobilne faze A (acetonitril) in mobile faze B (vodna raztopina fosfatega pufra (20 mM, pH = 4,95) s 3 % acetonitrila). Gradient za metodo B: v 20 minutah od 0 do 67 % mobilne faze A, nato 6 minut 67 % mobilne faze A in v 6 minutah nazaj do 0 % mobilne faze A. HPLC metoda C: uporabili smo kolono B, injicirali 20 µL raztopine vzorca in eluirali s hitrostjo pretoka 1,5 mL/min z uporabo linearne gradijenta acetonitrila in vodne raztopine fosfatnega pufra (25 mM, pH = 5,0). Gradient za metodo C: 3 minute 5 % acetonitrila, nato v 12 minutah do 70 % acetonitrila in nato 15 minut 70 % acetonitrila ter v 10 minutah nazaj do 3 % acetonitrila.

Avtomatizirano reverzno fazno »flash« kolonsko kromatografijo smo izvedeli na Biotage Isolera One System sistemu. Pri metodi D smo uporabili kolono C (Biotage SNAP Cartridge KP-C18-HS 30 g) in injicirani vzorec eluirali s hitrostjo pretoka 22 mL/min z uporabo linearne gradijenta acetonitrila in bidestilirane vode (5 CV 100 % bidestilirane vode in nato v 8 CV do 30 % acetonitrila). Pri obeh metodah smo valovno dolžino detektor nastavili na 254 in 210 nm.

• Liofilizacija

Za liofilizacijo smo uporabili Christ Beta 1-8K liofilizator.

- **Masna spektroskopija**

Masne spekture so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q proizvajalca Micromass, Manchester, Velika Britanija z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

- **Mešanje reakcijskih zmesi**

Mešanje reakcijskih zmesi smo izvedli z magnetnim mešalom in s teflonom obloženim magnetom (v nadaljevanju magnet za mešanje).

- **Odstranjevanje topil pri znižanem tlaku**

Za odstranjevanje topil pri znižanem tlaku (v nadaljevanju uparevanje) smo uporabili rotavapor Rotavapor R-200, regulator tlaka Vacuum Controller V-800 in membransko črpalko Vac V-500 proizvajalca Büchi. Temperaturo vodne kopeli smo nastavili na 40 °C. Izjeme smo ustrezno označili.

- **Poimenovanje in risanje struktur spojin**

Za poimenovanje in risanje struktur spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 proizvajalca CambridgeSoft.

- **Reagenti in topila**

Pri delu smo uporabili reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Carlo Erba, Euriso-top, Janssen chimica, J.T. Baker, Kemika, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Riedel-de Haën in Sigma). Nekatera topila in reagente smo pred uporabo očistili. THF smo 2 uri segevali ob vrenju v atmosferi argona nad natrijem in benzofenonom in nato frakcionirno destilirali skozi kolono polnjeno z Raschigovimi obročki. Etilen glikol smo sušili z zdrobljenim NaOH in nato vakuumsko destilirali. Etil kloroformat smo ekstrahirali z vodo (3 krat) in nato frakcionirno destilirali v atmosferi argona skozi 20 cm Vigreuxjevo kolono. NMM smo 3 ure segrevali ob vrenju v atmosferi argona nad natrijem in nato frakcionirno destilirali skozi 20 cm Vigreuxjevo kolono. TBAC smo prekristalizirali iz acetona z dodatkom Et₂O in nato sušili v eksikatorju nad zdrobljenim NaOH, P₂O₅ in silikagelom v vakuumu čez noč. Uporabili smo petroleter z vreliščem 40–60 °C (v nadaljevanju petroleter).

- **Reakcije v brezvodnih pogojih**

Kadar je navedeno, da smo reakcijo izvedli v brezvodnih pogojih, smo vse bučke, magnete za mešanje, igle in kanule, čez noč pred izvedbo reakcije, sušili v sušilniku pri 120 °C in jih neposredno pred uporabo ohladili v toku argona. Vse steklene brizge smo sprali z acetonom, posušili s toplim zrakom, prepahali z argonom in shranili v eksikatorju nad

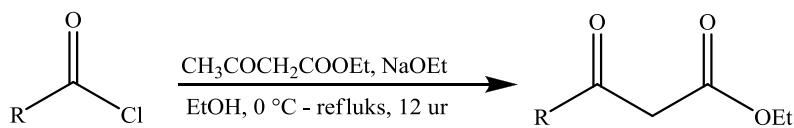
zdrobljenim NaOH, P₂O₅ in silikagelom do uporabe. Reakcijo smo izvedli v atmosferi argona, ki smo jo zagotovili z uporabo sept in balonov z argonom.

- **Vakuumska destilacija**

Za vakuumsko destilacijo smo uporabili oljno črpalko Chemistry-HYBRID-pump RC 5 proizvajalca VACUUBRAND GMBH + CO KG.

4. EKSPERIMENTALO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1. Shematski prikaz sinteze β -ketoestrov (5, 26–29)



5: R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}$

26: R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$

27: R = Ph

28: R = *p*-NO₂Ph

29: R = *p*-ClPh

4.1.1. Sinteza β -ketoestrov (5, 26–29)

Raztopino natrija (1,1 mol. ekv.) v EtOH smo ohladili na 0 °C in ob mešanju najprej po kapljicah dodali etil acetoacetat (1,1 mol. ekv.) in nato po kapljicah še kislinski klorid (1,0 mol. ekv.) Pri sintezi spojine **28** smo trdni 4-nitrobenzoilklorid raztopili v THF in nato po kapljicah dodali v reakcijsko zmes. Nastalo suspenzijo smo 12 ur segrevali ob vrenju, nato dodali 96 % EtOH in ohladili na sobno temperaturo. Suspenzijo smo filtrirali z odsesavanjem skozi, v Büchnerjevem liju (poroznost št. 4), zbit stolpec celita. Filtrat smo uparili in ostanku dodali toluen in vodo. Ob mešanju smo uravnali pH zmesi na 1–2 z 2 M vodno raztopino HCl. Organsko fazo smo ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo.

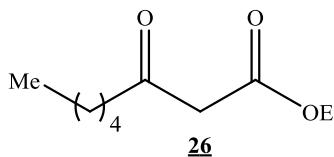
4.1.1.1. Sinteza etil 3-oksoheksadekanoata (5)

Spojino **5** smo sintetizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju »Sinteza β -ketoestrov (5, 26–29)«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 15/1).

 5	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 33 % T_{tal}: 27–30 °C TLC: R _f (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 4/1) = 0,56
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0,90 (3 H, t, <i>J</i> = 6,8 Hz), 1,06–1,37 (23 H, m), 1,53–1,63 (2 H, m), 2,54 (2 H, t, <i>J</i> = 7,35 Hz), 3,44 (1,92 H, keto, s), 4,20 (0,08 H, enol, q, <i>J</i> = 7,16 Hz), 4,21 (1,92 H, keto, q, <i>J</i> = 7,16 Hz), 4,99 (0,04 H, enol, s), 12,11 (0,04 H, enol, s)
MS (ESI+)	m/z = 299,3 ([M+H] ⁺), 321,2 ([M+Na] ⁺)
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₃₄ O ₃ Na ([M+Na] ⁺) 321,2406 Izmerjena vrednost 321,2402
IR (KBr)	v [cm ⁻¹] = 3652, 2925, 2853, 2362, 1744, 1718, 1468, 1318, 1233, 1032, 945, 721, 591
Elementna analiza za C₁₈H₃₄O₃	Izračunane vrednosti % C = 72,44; % H = 11,48 Izmerjene vrednosti % C = 72,76; % H = 11,87

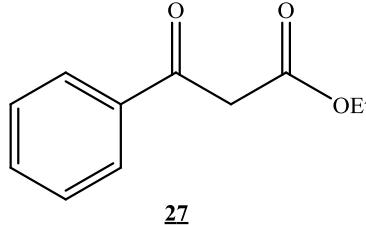
4.1.1.2. Sinteza etil 3-oksooktanoata (26)

Spojino **26** smo sintetizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju »**Sinteza β -keto estrov (5, 26–29)**«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 10/1).

 26	Izgled: brezbarvna tekočina Izkoristek reakcije: 30 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 4/1) = 0,52
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0,89 (3 H, t, <i>J</i> = 7,0 Hz), 1,23–1,35 (7 H, m), 1,56–1,64 (2 H, m), 2,54 (2 H, t, <i>J</i> = 7,40 Hz), 3,44 (1,84 H, keto, s), 4,19 (0,16 H, enol, q, <i>J</i> = 7,15 Hz), 4,20 (1,84 H, keto, q, <i>J</i> = 7,15 Hz), 4,98 (0,08 H, enol, s), 12,12 (0,08 H, enol, s)

4.1.1.3. Sinteza etil 3-okso-3-fenilpropanoata (27)

Spojino **27** smo sintetizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju »**Sinteza β -keto estrov (5, 26–29)**«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 15/1).

 27	Izgled: rahlo rožnata tekočina Izkoristek reakcije: 47 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 5/1) = 0,47
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 1,26 (2,52 H, keto, t, <i>J</i> = 7,10 Hz), 1,34 (0,48 H, enol, t, <i>J</i> = 7,10 Hz), 4,0 (1,68 H, keto, s), 4,22 (1,68 H, keto, q, <i>J</i> = 7,11 Hz), 4,27 (0,32 H, enol, q, <i>J</i> = 7,03 Hz), 5,67 (0,16 H, enol, s), 7,40–7,97 (5 H, m), 12,59 (0,16 H, enol, s)
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3647, 2984, 1741, 1688, 1625, 1450, 1268, 1198, 1037, 943, 757, 690, 593

4.1.1.4. Sinteza etil 3-(4-nitrofenil)-3-oksopropanoata (28)

Spojino **28** smo sintetizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju »**Sinteza β -ketoestrov (5, 26–29)**«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 21/4).

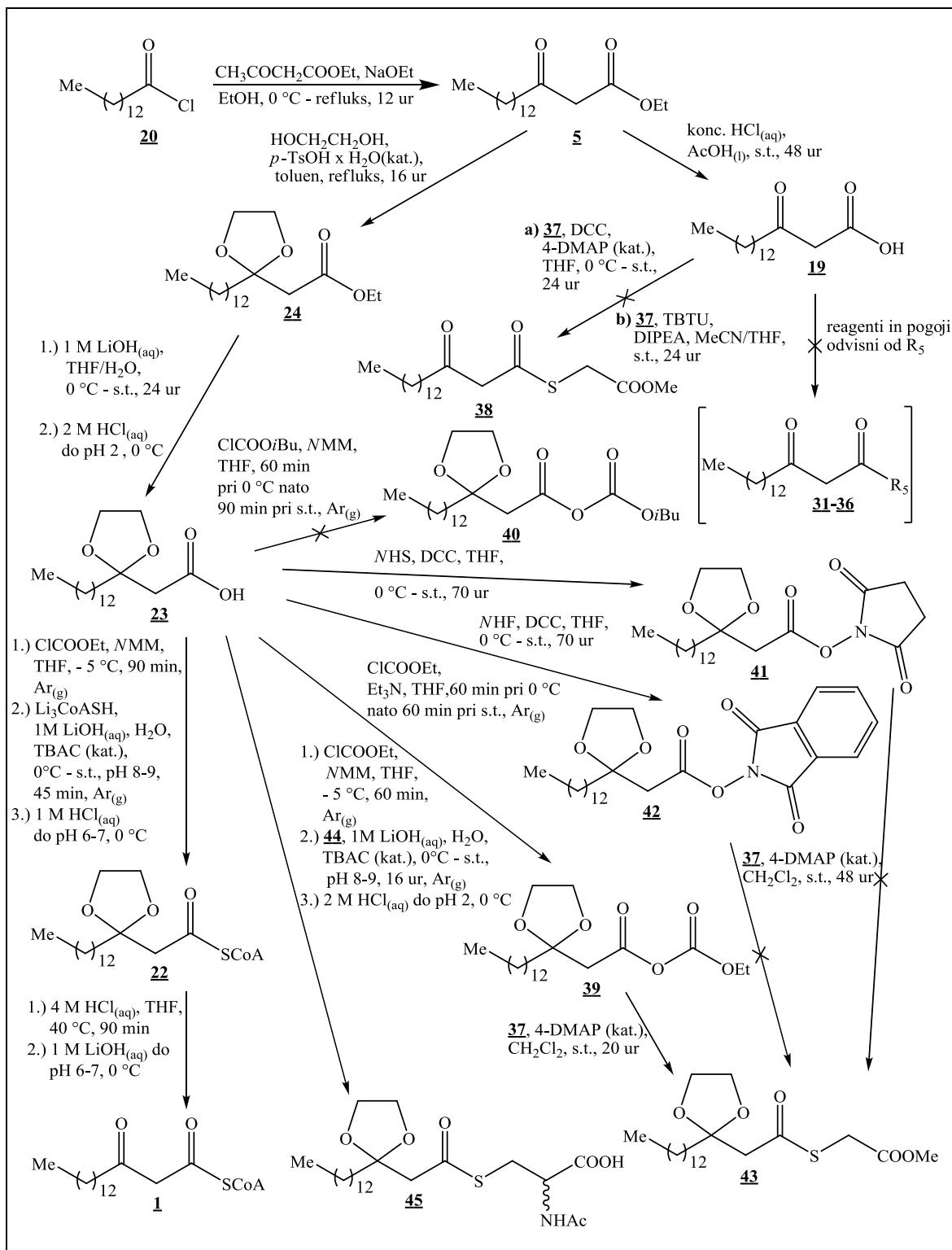
 28	Izgled: rahlo rumeni kristali Izkoristek reakcije: 35 % T_{tal}: 63–67 °C TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 4/1) = 0,45
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 1,27 (1,32 H, keto, t, <i>J</i> = 7,15 Hz), 1,36 (1,68 H, enol, t, <i>J</i> = 7,15 Hz), 4,04 (0,88 H, keto, s), 4,23 (0,88 H, keto, q, <i>J</i> = 7,15 Hz), 4,30 (1,12 H, enol, q, <i>J</i> = 7,05 Hz), 5,77 (0,56 H, enol, s), 7,94 (1,12 H, enol, dt, <i>J</i> ₁ = 4,89, <i>J</i> ₂ = 2,20 Hz), 8,12 (0,88 H, keto, dt, <i>J</i> ₁ = 4,89, <i>J</i> ₂ = 2,13 Hz), 8,28 (1,12 H, enol, dt, <i>J</i> ₁ = 4,89, <i>J</i> ₂ = 2,20 Hz), 8,34 (0,88 H, keto, dt, <i>J</i> ₁ = 4,89, <i>J</i> ₂ = 2,16 Hz), 12,57 (0,56 H, enol, s)

4.1.1.5. Sinteza etil 3-(4-klorofenil)-3-oksopropanoata (29)

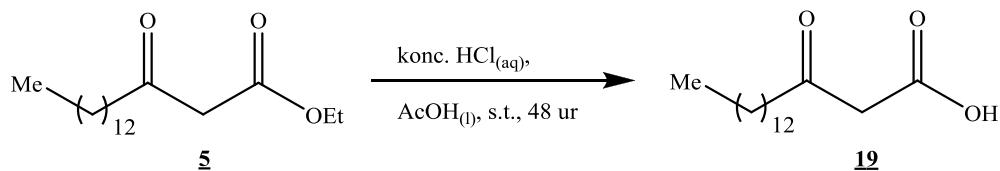
Spojino **29** smo sintetizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju »Sinteza β -ketoestrov (**5, 26–29**)«. Surovi produkt smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 8/1).

 29	Izgled: rahlo rožnata tekočina Izkoristek reakcije: 32 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 4/1) = 0,48
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 1,26 (2,31 H, keto, t, <i>J</i> = 7,15 Hz), 1,34 (0,69 H, enol, t, <i>J</i> = 7,15 Hz), 3,97 (1,54 H, keto, s), 4,22 (1,54 H, keto, q, <i>J</i> = 7,11 Hz), 4,27 (0,46 H, enol, q, <i>J</i> = 7,19), 5,64 (0,23 H, enol, s), 7,38–8,11 (4 H, m), 12,59 (0,23 H, enol, s)

4.2. Shematski prikaz sinteze 3-ketopalmitoil konecima A (1)



4.2.1. Sinteza 3-oksoheksadekanojske kisline (19)

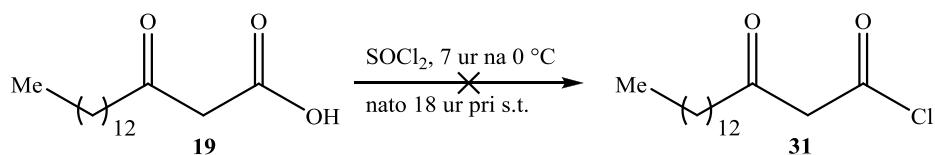


Raztopini estra **5** (2,517 g, 8,43 mmol, 1,0 mol. ekv.) v AcOH (10 mL) smo pri sobni temperaturi, ob mešanju, po kapljicah dodali toliko koncentrirane raztopine HCl, da je raztopina postala motna. Po 1 uri smo opazili izpadanje belih kristalov v reakcijski zmesi. Suspenzijo smo mešali še 48 ur in jo nato filtrirali s presesavanjem skozi Büchnerjev lij (poroznost št. 4). Bele kristale smo 2 uru sušili v eksikatorju nad zdrobljenim NaOH in slikagelom v vakuumu in nato prekristalizirali iz acetona z dodatkom petroletra. Masa spojine **19** je bila 1,434 g.

 19	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 63 % TLC: Rf (EtOAc/n-heksan/AcOH = 10/1/0,25) = 0,62
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0,91 (3 H, t, <i>J</i> = 6,69 Hz), 1,28 (20 H, bs), 1,59–1,66 (2 H, m), 2,25 (0,36 H, enol, t, <i>J</i> = 7,54 Hz), 2,58 (1,64 H, keto, t, <i>J</i> = 7,35 Hz), 3,53 (1,64 H, keto, s), 5,05 (0,18 H, enol, s), 11,84 (0,18 H, enol, s)

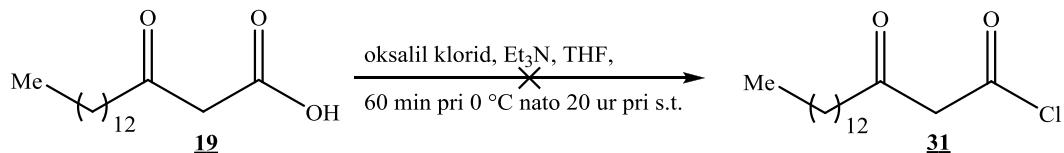
4.2.2. Poskus sinteze 3-oksoheksadekoil klorida (**31**)

Postopek a:



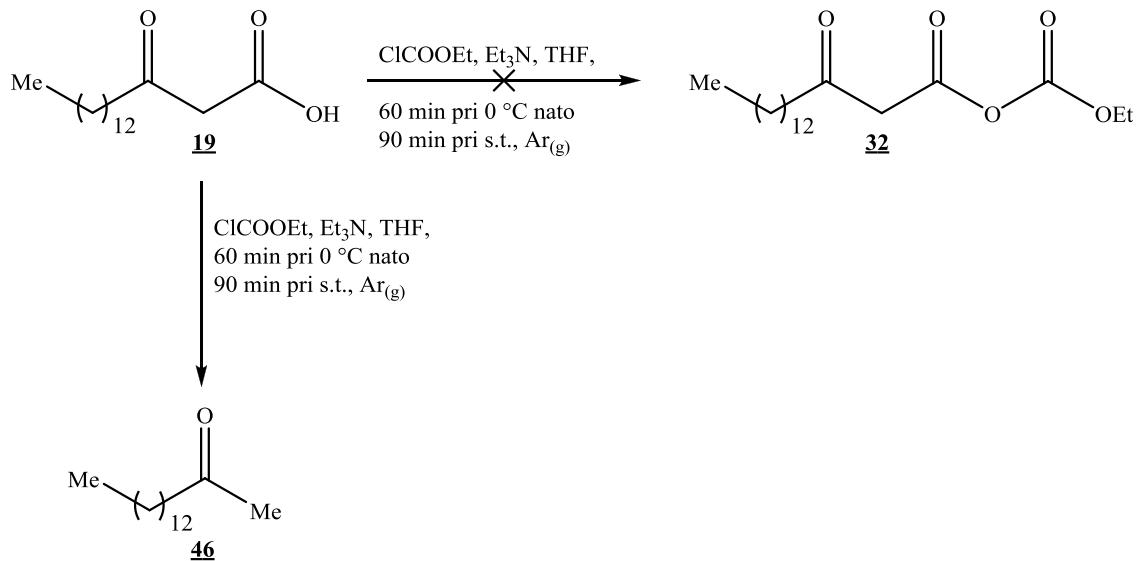
Kislino **19** (100,0 mg, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) smo ohladili na 0 °C in ob mešanju dodali tionil klorid (315,7 µL, 4,346 mmol, 11,75 mol. ekv.). Potek reakcije smo spremljali s TLC z MF: *n*-heksan/EtOAc = 3/1. Reakcijsko zmes smo vzorčili vsako uro. Po 7 urah je TLC pokazala, da so v reakcijski zmesi poleg kisline **19** prisotne še vsaj 4 spojine. Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 18 ur. S TLC smo ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi v primerjavi s prejšnjim dnem ni bistveno spremenila.

Postopek b:



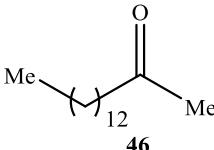
Raztopino kisline **19** (100,0 mg, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (10 mL) smo ohladili na 0 °C, ob mešanju po kapljicah dodali oksalil klorid (63,5 µL, 0,740 mmol, 2,0 mol. ekv.) in nato po kapljicah še Et₃N (77,4 µL, 0,550 mmol, 1,5 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in vzročili vsako uro. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: *n*-heksan/EtOAc = 3/1). Po 8 urah je TLC pokazala, da je v reakcijski zmesi poleg kisline **19** prisotnih še vsaj 5 spojin. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi še 12 ur. S TLC smo ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi v primerjavi s prejšnjim dnem ni bistveno spremenila.

4.2.3. Poskus sinteze etil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida (**32**) oz. sinteza pentadekan-2-ona (**46**)

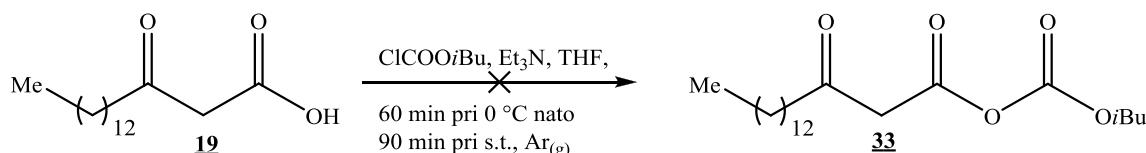


Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih. Karboksilni kislini **19** (0,100 g, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v 25 mL bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na 0 °C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali Et₃N (51,5 µL, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 15 minutah mešanja smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali etil kloroformat (35,4 µL, 0,370 mmol, 1,0 equiv) in nastalo suspenzijo 60 minut mešali pri 0°C, nato pa še 90 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali s TLC (MF = *n*-heksan/EtOAc = 3/1). Glede na TLC je bila v reakcijski zmesi poleg kisline **19** prisotna še ena spojina (Rf (*n*-

heksan/ EtOAc = 3/1) = 0,63). Liza, ki je na TLC predstavljala to spojino pri 2D razvijanju TLC ni hidrolizirala v kislino **19**, zato smo sklepali, da ta spojina ni mešani anhidrid **32**. Suspenzijo smo filtrirali s presesavanjem skozi, v Büchnerjevem liju (poroznost št. 4), zbit stolpec celita v 25 mL bučko. Filtrat smo uparili in ostanek očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 10/1). Masa spojine **46** je bila 62,2 mg.

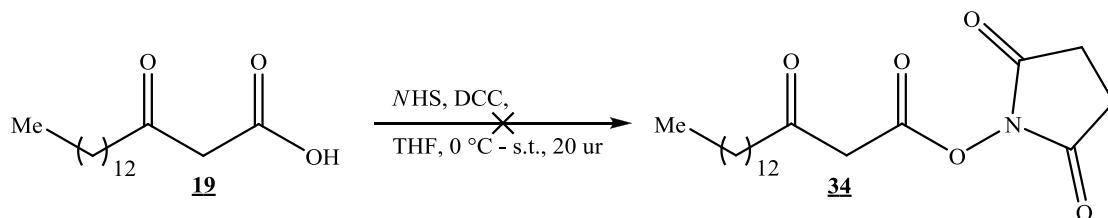
 46	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 74 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/ EtOAc = 3/1) = 0,63
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 0,90 (3 H, t, <i>J</i> = 6,69 Hz), 1,28 (20 H, bs), 1,56–1,60 (2 H, m), 2,15 (3 H, s), 2,43 (2 H, t, <i>J</i> = 7,44 Hz)	

4.2.4. Poskus sinteze izobutil karbonil 3-oksoheksadecanoil anhidrida (**33**)



Karboksilni kisline **19** (0,100 g, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v 25 mL bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na 0 °C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali Et₃N (51,5 µL, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 10 minutah mešanja smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali izobutil kloroformat (48,0 µL, 0,370 mmol, 1,0 equiv) in nastalo suspenzijo 60 minut mešali pri 0 °C, nato pa še 90 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali s TLC (MF = *n*-heksan/EtOAc = 3/1). Glede na TLC je bil v reakcijski zmesi poleg kisline **19** prisoten še keton **46** (Rf (*n*-heksan/ EtOAc = 3/1) = 0,63).

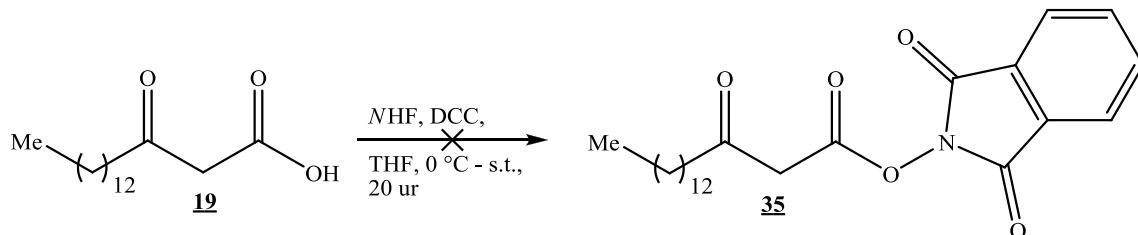
4.2.5. Poskus sinteze 2,5-dioksopiroolidin-1-il 3-oksoheksadecanoata (**34**)



Raztopino kisline **19** (150,0 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (15 mL) smo ob mešanju ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo dodali raztopino NHS (63,9 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (5 mL), mešali 10 minut in nato po kapljicah dodali še raztopino DCC (114,5 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (4 mL). Reakcijsko zmes smo segregali na sobno temperaturo. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF A). Po 1 uri sta bili v

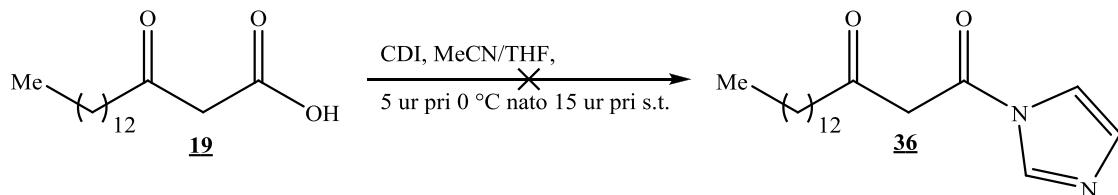
reakcijski zmesi prisotni kislina **19** (R_f (MF A) = 0,14), *NHS* (R_f (MF A) = 0,43) in keton **46** (R_f (MF A) = 0,83). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi še 19 ur. S TLC smo ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi, v primerjavi s prejšnjim dnem, ni bistveno spremenila. MF A = EtOAc/*n*-heksan = 5/1.

4.2.6. Poskus sinteze 1,3-dioksidoizoindolin-2-il 3-oksodekanoata (35)



Raztopino kislina **19** (150,0 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (15 mL) smo ob mešanju ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo dodali raztopino *NHS* (90,5 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (8 mL), mešali 10 minut in nato po kapljicah dodali še raztopino DCC (114,5 mg, 0,555 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (4 mL). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in vzorčili vsako uro. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF A). Po 1 uri so bili v reakcijski zmesi prisotni kislina **19** (R_f (MF A) = 0,14), *NHS* (R_f (MF A) = 0,46) in keton **46** (R_f (MF A) = 0,83). Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi še 19 ur. S TLC smo ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi v primerjavi s prejšnjim dnem ni bistveno spremenila. MF A = EtOAc/*n*-heksan = 5/1.

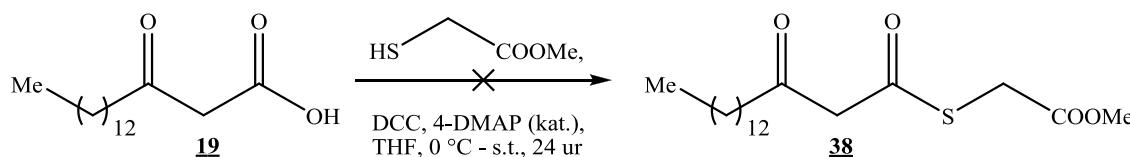
4.2.7. Poskus sinteze 1-(1*H*-imidazol-1-il)heksadekan-1,3-diona (36)



Raztopino kislina **19** (100,0 mg, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (10 mL) smo ob mešanju ohladili na 0 °C in dodali CDI (72,0 mg, 0,444 mmol, 1,2 mol. ekv.). Suspenziji smo dodali toliko MeCN, da je nastala raztopina, ki smo jo 5 ur mešali pri 0 °C. Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF B). Reakcijsko zmes smo vzorčili vsako uro in opazili, da je vsako uro prisotne manj izhode kisline **19** in več ketona **46** (R_f (MF B) = 0,63), ki je bil verjetno produkt dekarboksilacije. Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in mešali 15 ur. S TLC smo ugotovili, da v reakcijski zmesi ni bilo več kislina **19** (R_f (MF B) = 0,08), prisotna sta bila le še keton **46** in CDI (R_f (MF B) = 0,1). MF B = *n*-heksan/EtOAc = 3/1.

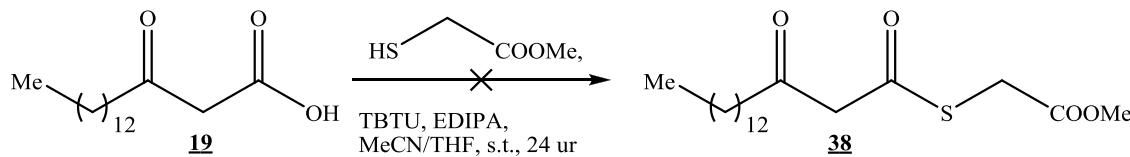
4.2.8. Poskus sinteze metil 2-(3-oksoheksadekanoil)tioacetata (**38**)

Postopek a:



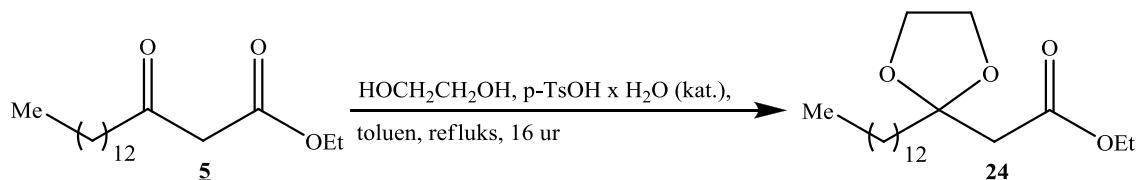
Raztopino kislina **19** (100,0 mg, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (10 mL) smo ob mešanju ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo dodali raztopino metil tioglikolat (**37**) (33,1 µL, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) in nato smo po kapljicah še raztopili DCC (76,3 mg, 0,389 mmol, 1,05 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo. Bučko z reakcijsko zmesjo smo pred svetlobo zaščitili tako, da smo jo ovili z alu folijo. Potek reakcije smo spremajali s TLC (MF C). Po 3 urah mešanja pri sobni temperaturi, smo s TLC ugotovili, da so bili v reakcijski zmesi prisotni kislina **19** (R_f (MF C) = 0,12), metil tioglikolat (R_f (MF C) = 0,52) in keton **46** (R_f (MF C) = 0,76). Po 24 urah mešanja pri sobni temperaturi, smo s TLC ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi v primerjavi s prejšnjim dnem ni bistveno spremenila. MF C = *n*-heksan/EtOAc = 2/1.

Postopek b:



Raztopini kislina **19** (100,0 mg, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) v zmesi MeCN (10 mL) in THF (5 mL) smo ob mešanju dodali TBTU (130,6 mg, 0,407 mmol, 1,1 mol. ekv.). Nastali raztopini smo po kapljicah dodali DIPEA (95,0 µL, 0,555 mmol, 1,5 mol. ekv.) in toliko THF (4 mL), da je suspenzija postala raztopina. Po 30 minutah mešanja smo dodali metil tioglikolat (**37**) (33,1 µL, 0,370 mmol, 1,0 mol. ekv.) in bučko z reakcijsko zmesjo zaščitili pred svetolobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. Potek reakcije smo spremajali s TLC (MF D). Po 1 uri mešanja pri sobni temperaturi smo s TLC ugotovili, da je bilo je reakcijski zmesi prisotnih vsaj 5 spojin. Lise so predstavljale TBTU in DIPEA (R_f (MF D) = 0,0), kislino **19** (R_f (MF D) = 0,06), metil tioglikolat (R_f (MF D) = 0,39), keton **46** (R_f (MF D) = 0,58) in neznano spojino (R_f (MF D) = 0,76). Ker se slednja lisa, po orosovanju TLC plošče z 2,4-dinitrofenil hidrazom, niobarvala rumeno, smo sklepali, da ni tioester **38**. Po 24 urah mešanja pri sobni temperaturi smo s TLC ugotovili, da se v tem času sestava reakcijske zmesi v primerjavi s prejšnjim dnem ni bistveno spremenila. MF D = *n*-heksan/EtOAc = 6/1.

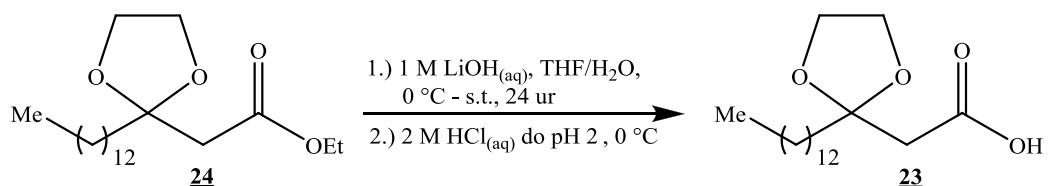
4.2.9. Sinteza etil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (24)



Raztopini estra **5** (3,361 g, 11,260 mmol, 1,0 mol. ekv.) v toluenu (50 mL) smo dodali etilen glikol (1,884 mL, 33,780 mmol, 3,0 mol. ekv.) in *p*-TsOH x H₂O (214,21 mg, 1,126 mmol, 0,1 mol. ekv.). Nastalo zmes smo mešali ob vrenju 16 ur z uporabo Dean-Starkovega nastavka za odstranjevanje vode. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo in ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (50 mL), nato pa še z nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in uparili. Ostanek smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 5/1). Masa spojine **24** je bila 2,303 g.

 24	Izgled: brezbarvna tekočina Izkoristek reakcije: 60 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 3/1) = 0,63
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = δ 0,90 (3 H, t, <i>J</i> = 6,89 Hz), 1,05–1,52 (25 H, m), 1,78–1,84 (2 H, m), 2,66 (2 H, s), 3,94–4,05 (4 H, m), 4,17 (2 H, q, <i>J</i> = 7,10 Hz)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = δ 14,13, 14,19, 22,70, 23,54, 29,37, 29,58, 29,66, 29,70, 29,72, 31,93, 37,79, 42,59, 60,50, 65,09, 109,49, 169,62
MS (ESI+)	m/z = 343,3 ([M+H] ⁺), 365,3 ([M+Na] ⁺), 381,2 ([M+K] ⁺)
HRMS (ESI+)	Izračunana vrednost za C ₂₀ H ₃₉ O ₄ ([M+H] ⁺) 343,2848 Izmerjena vrednost 343,2842
IR (NaCl)	v [cm ⁻¹] = 3650, 2925, 2854, 1739, 1466, 1369, 1304, 1219, 1040, 949, 842, 722
Elementna analiza za C₂₀H₃₈O₄	Izračunane vrednosti % C = 70,13; % H = 11,18 Izmerjene vrednosti % C = 70,35; % H = 11,41

4.2.10. Sinteza 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetne kisline (23)

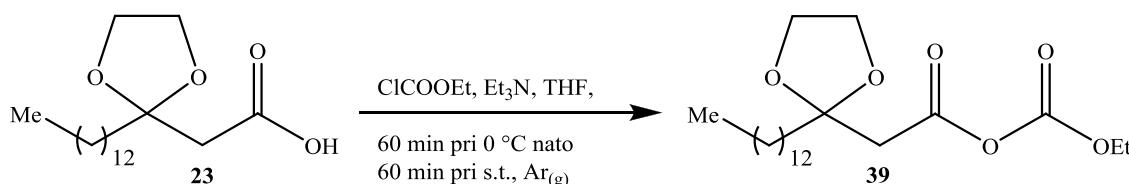


Raztopino estra **24** (2,303 g, 6,724 mmol, 1,0 mol. ekv.) v zmesi THF (40 mL) in vode (15 mL) smo ob mešanju ohladili na 0 °C. Po kapljicah smo ji dodali 1 M vodno raztopino LiOH (67,24 ml, 67,24 mmol, 10 mol. ekv.). Nastalo nehomogeno zmes smo segregali na sobno temperaturo in mešali 24 ur. Raztopino smo ohladili na 0 °C in ob mešanju uravnali

pH zmesi na 2 z 2 M vodno raztopino HCl. Nastalo suspenzijo smo ekstrahirali z EtOAc (3 krat po 75 mL). Združene organske faze smo nato ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (75 mL), sušili z Na₂SO₄, filtrirali in uparili. Trdni ostanek smo prekristalizirali iz EtOAc z dodatkom *n*-heksana. Masa spojine **23** je bila 1,974 g.

 23	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 92 % T_{tal}: 65–68 °C TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc/AcOH = 2/1/0,25) = 0,54
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = δ 0,90 (3 H, t, J = 6,90), 1,12–1,42 (22 H, m), 1,78–1,83 (2 H, m), 2,72 (2 H, s), 4,00–4,08 (4 H, m), 10,91 (1 H, bs)
MS (ESI-)	m/z = 313,2 ([M-H] ⁻)
HRMS (ESI-)	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₃₃ O ₄ ([M-H] ⁻) Izmerjena vrednost
IR (KBr)	v [cm ⁻¹] = 2917, 2848, 1715, 1466, 1430, 1326, 1224, 1140, 1049, 940, 751, 724, 646, 562
Elementna analiza za C₁₈H₃₄O₄	Izračunane vrednosti Izmerjene vrednosti
	% C = 68,75; % H = 10,90 % C = 69,08; % H = 11,29

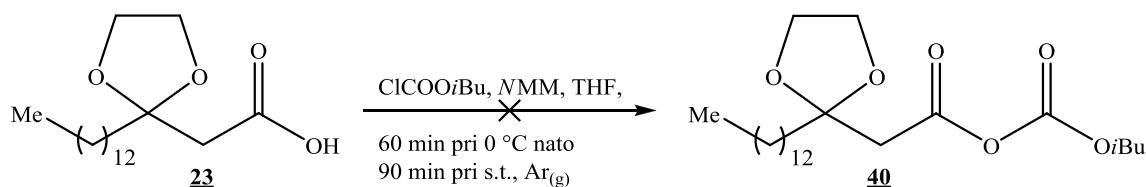
4.2.11. Sinteza etil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (**39**)



Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih. Karboksilni kislini **23** (0,400 g, 1,272 mmol, 1,0 mol. ekv.) v 25 mL bučki, z okroglim dnom in magnetom za mešanje, smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na 0 °C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali Et₃N (177,3 µL, 1,272 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 15 minutah smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali še etil kloroformat (121,6 µL, 1,272 mmol, 1,0 equiv). Nastalo suspenzijo smo 60 minut mešali pri 0 °C in nato še 60 minut pri sobni temperaturi. Suspenzijo smo filtrirali s presesavanjem skozi, na Büchnerjevem liju (poroznost št. 4), zbit stolpec celita v 25 mL bučko. Filtrat smo uparili, ostanek prepigli s argonom in shranili na -20 °C. Masa surovega produkta **39** je bila 0,500 g. Za analize in sintezo tioestra **43** smo uporabili surovi **39**.

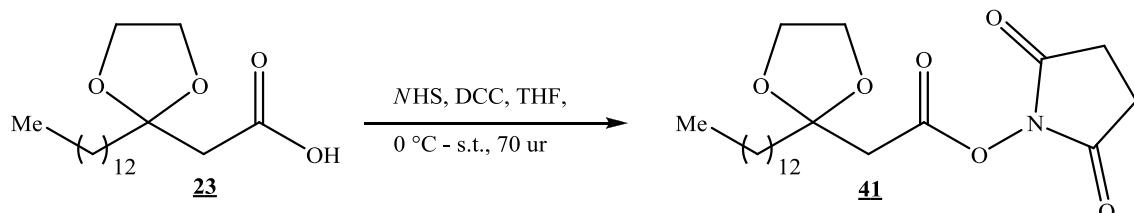
 39	Izgled: rahlo rumena trdna snov TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 1/1) = 0,77
---------------	---

4.2.12. Poskus sinteze izobutil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (40)



Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih. Karboksilni kislini 23 (150,0 mg, 0,477 mmol, 1,0 mol. ekv.), v 25 mL bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na -5°C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali *N*-metilmorfolin (*NMM*) (52,4 μL , 0,477 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 10 minutah smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali izobutil kloroformat (61,9 μL , 1,272 mmol, 1,0 equiv) in nastalo suspenzijo 60 minut mešali pri -5°C in še 90 minut pri sobni temperaturi. Reakcijo smo spremljali s TLC (MF E). Glede na TLC so bile, po 60 minutah mešanja pri -5°C , v reakcijski zmesi prisotne 3 spojine: kislina 23 (R_f (MF E) = 0,12), spojina z neznano strukturo (R_f (MF E) = 0,60) in mešani anhidrid 40 (R_f (MF E) = 0,71), ki je pri 2D razvijanju TLC hidroliziral v kislino 23. MF E = *n*-heksan/EtOAc = 2/1.

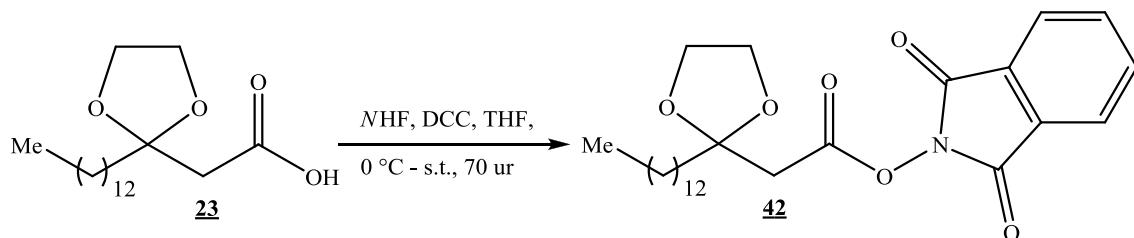
4.2.13. Sinteza 2,5-dioksopiroolidin-1-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (41)



Raztopini kisline 23 (500,0 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (12 mL) smo med mešanjem dodali raztopino NHS (183,0 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (7 mL). Nastalo raztopino smo ohladili na 0°C in po kapljicah dodali raztopino DCC (328,1 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (7 mL). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in jo mešali 70 ur. Suspenzijo smo filtrirali s presesavanjem skozi Büchnerjev lij (poroznost št. 4). Filtrat smo uparili in ostanek prekristalizirali iz EtOH. Masa očiščene spojine 41 je bila 495,5 mg.

 41	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 76 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 1/1) = 0,48
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 0,88 (3 H, t, <i>J</i> = 6,75 Hz), 1,26–1,43 (22 H, m), 1,79–1,84 (2 H, m), 2,83 (4 H, s), 2,94 (2 H, s), 3,94–4,11 (4 H, m)

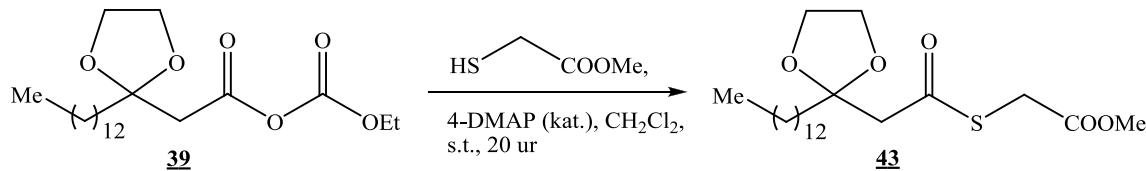
4.2.14. Sinteza 1,3-dioksoisoindolin-2-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (42)



Raztopini kisline **23** (500,0 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) THF (12 mL) smo ob mešanju dodali raztopino NHF (259,4 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (13 mL). Nastalo raztopino smo ohladili na 0 °C in po kapljicah dodali raztopino DCC (328,1 mg, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (7 mL). Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in jo mešali 70 ur. Suspenzijo smo filtrirali s presesavanjem skozi Büchnerjev lij (poroznost št. 4). Filtrat smo uparili in ostanek prekristalizirali iz EtOH. Masa očiščene spojine **42** je bila 562,6 mg.

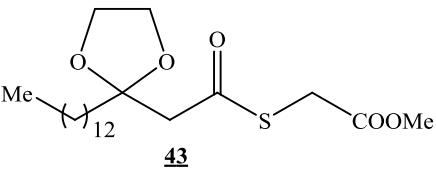
 42	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 77 % TLC: Rf (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 1/1) = 0,73
¹ H-NMR (300 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 0,88 (3 H, t, <i>J</i> = 6,6 Hz), 1,19–1,46 (22 H, m), 1,83–1,88 (2 H, m), 3,00 (2 H, s), 3,67–4,18 (4 H, m), 7,74–7,93 (4 H, m)

4.2.15. Sinteza metil 2-(2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (43)



Raztopini surovega mešanega anhidrida **39** (0,500 g, 1,294 mmol, 1,0 mol. ekv.) v CH₂Cl₂ (5 mL) smo ob mešanju dodali metil thioglikolat (**37**) (105,2 μL, 1,177 mmol, 0,91 mol.

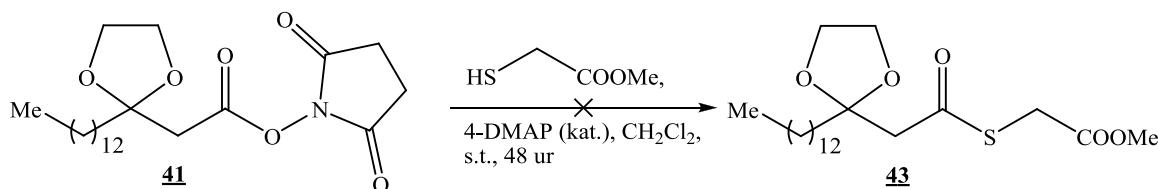
ekv.). Nato smo dodali še 4-DMAP (16,0 mg, 0,1294 mmol, 0,10 mol. ekv.). Bučko z reakcijsko zmesjo smo zaščitili pred svetlobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. Po 20 urah mešanja pri sobni temperaturi je bil nitroprusidni test za prisotnost tiolov v vzorcu reakcijske zmesi zelo rahlo pozitiven, zato smo dodali celit in suspenzijo uparili. Ostanek smo očistili s »flash« kolonsko kromatografijo (MF = petroleter/Et₂O = 3/1). Masa spojine **43** je bila 0,312 g.

 43	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 60 % TLC: R _f (<i>n</i> -heksan/EtOAc = 4/1) = 0,37
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm] = 0,90 (3 H, t, J = 6,90 Hz), 1,27–1,42 (22 H, m), 1,74–1,78 (2 H, m), 2,96 (2 H, s), 3,74 (2 H, s), 3,76 (3 H, s), 3,97–4,07 (4 H, m)

4.2.16. Poskus sinteze metil 2-(2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata

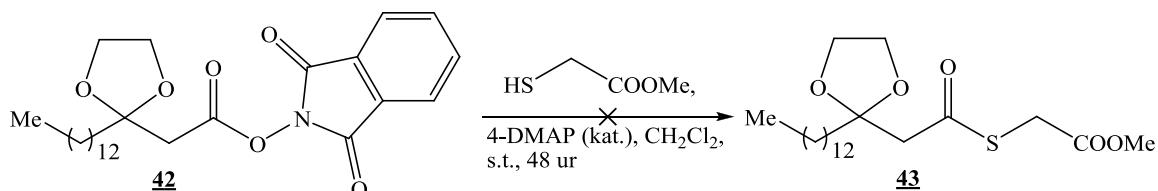
(**43**)

Postopek a:



Raztopini estra **41** (131,3 mg, 0,319 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (3 mL) smo ob mešanju dodali metil tioglikolat (**37**) (28,53 µL, 0,319 mmol, 1,0 mol. ekv.). Nato smo dodali še 4-DMAP (3,9 mg, 0,0319 mmol, 0,10 mol. ekv.). Bučko z reakcijsko zmesjo smo zaščitili pred svetlobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. Nastalo raztopino smo mešali pri sobni temperaturi in potek reakcije spremljali s TLC z MF: *n*-heksan/EtOAc = 4/1 in nitroprusidnim testom za prisotnost tiolov. Po 48 urah je bil nitroprusidni test za prisotnost tiolov močno pozitiven. TLC analiza je pokazala, da je nastalo zelo malo tioestra **43** (R_f (*n*-heksan/EtOAc = 4/1) = 0,37) in da je v reakcijski zmesi prisotnega še precej estra **41**.

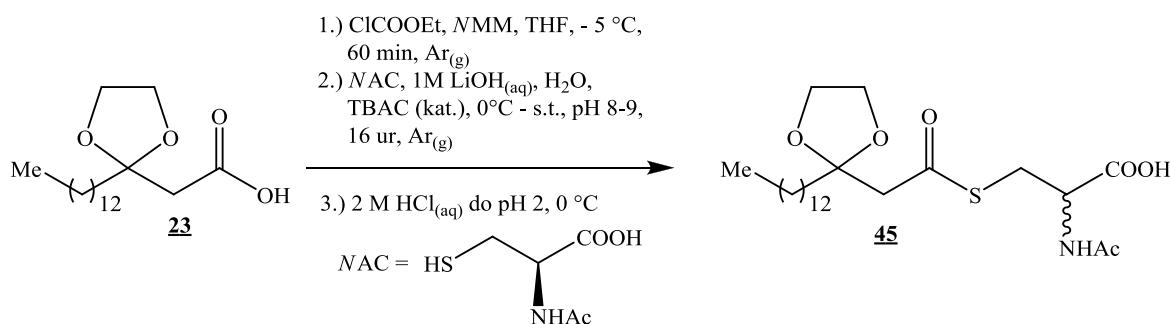
Postopek b:



Raztopini estra **42** (311,4 mg, 0,678 mmol, 1,0 mol. ekv.) v THF (6 mL) smo ob mešanju dodali metil tioglikolat (**37**) (60,59 µL, 0,678 mmol, 1,0 mol. ekv.). Nato smo dodali še 4-

DMAP (8,3 mg, 0,0678 mmol, 0,10 mol. ekv.). Bučko z reakcijsko zmesjo smo pred svetlobo zaščitili tako, da smo jo ovili z alu folijo. Nastalo raztopino smo mešali pri sobni temperaturi in potek reakcije spremljali s TLC z MF: *n*-heksan/EtOAc = 4/1 in nitroprusidnim testom za prisotnost tiolov. Po 48 urah je bil nitroprusidni test za prisotnost tiola močno pozitiven. TLC je pokazala, da je nastalo zelo malo tioestra **43** (*Rf* (*n*-heksan/EtOAc = 4/1) = 0,37) in da je v reakcijski zmesi prisotnega še precej estra **42**.

4.2.17. Sinteza tioestra NAC z 2-(tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (45)



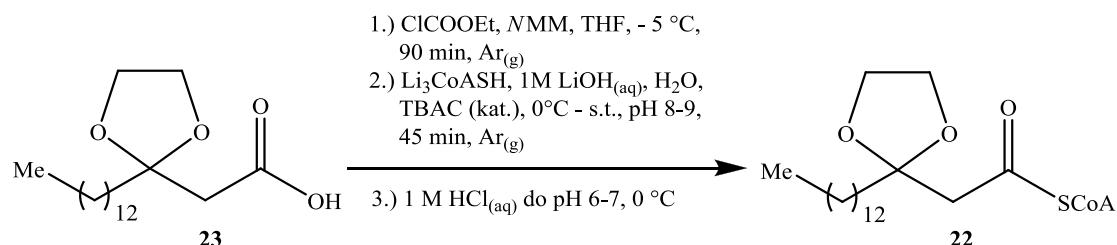
Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih. 1 M vodno raztopino LiOH smo pripravili z raztopljanjem LiOH v z argonom prepihani bidestilirani vodi.

Karboksilni kislini **23** (0,500 g, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.) v 25 mL bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na -5 °C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali NMM (175,0 µL, 1,590 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 15 minutah mešanja smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali še etil kloroformat (152,0 µL, 1,590 mmol, 1,0 equiv). Nastalo suspenzijo smo 60 minut mešali pri -5 °C. Mešanje smo ustavili in pustili, da se je oborina posedla na dno bučke. Supernatant smo s stekleno brizgo prenesli v 25 mL bučko z okroglim dnom in magnetom za mešanje. S kanulo smo dodali THF (5 mL). Raztopini smo ob mešanju dodali TBAC (44,2 mg, 0,159 mmol, 0,10 mol. ekv.) in nato s kanulo po kapljicah še raztopino A. Z dodajanjem 1 M vodne raztopine LiOH s stekleno brizgo smo uravnali pH reakcijske zmesi na 8–9. Bučko z reakcijsko zmesjo smo zaščitili pred svetlobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. Po 16 urah mešanja pri sobni temperaturi je bil nitroprusidni test za prisotnost tiolov v vzorcu reakcijske zmesi negativen. Z uparevanjem smo odstranili THF, ostanek ohladili na 0 °C in z dodajanjem 2 M vodne raztopine HCl uravnali pH raztopine na 2. Nastalo suspenzijo smo ekstrahirali z EtOAc (3 krat po 25 mL). Združene organske faze smo nato ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (30 mL), sušili z Na₂SO₄, filtrirali in uparili. Masa surovega produkta **45** je 0,625 g. Za analize smo uporabili surovi produkt **45**.

Priprava raztopine A: NAC (**44**) (0,234 g, 1,434 mmol, 0,9 mol. ekv.) v 10 ml bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali z argonom prepihano bidestilirano vodo (5 mL). Raztopino smo ob mešanju ohladili na 0 °C in z dodajanjem 1 M vodne raztopine LiOH s stekleno brizgo uravnali pH na 8–9.

 45	Izgled: beli kristali Izkoristek reakcije: 95 % TLC: Rf (n-heksan/EtOAc/AcOH = 2/1/1) = 0,49
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0,88 (3 H, t, <i>J</i> = 6,90 Hz), 1,20–1,38 (22 H, m), 1,73–1,77 (2 H, m), 2,03 (3 H, s), 2,92 (2 H, s), 3,34–3,48 (2 H, m), 3,95–4,05 (4 H, m), 4,74–4,79 (1 H, m), 6,63 (1 H, d, <i>J</i> = 7,28), 7,58 (1 H, bs)

4.2.18. Sinteza tioestera koencim A z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (**22**)



Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih. 1 M vodno raztopino LiOH smo pripravili z razapljanjem LiOH v z argonom prepihani bidestilirani vodi.

Karboksilni kislini **23** (400,0 mg, 1,272 mmol, 1,0 mol. ekv.) v 25 mL bučki z okroglim dnom in magnetom za mešanje smo s stekleno brizgo dodali THF (10 mL). Nastalo raztopino smo ob mešanju ohladili na -5 °C in s stekleno brizgo po kapljicah dodali NMM (140,0 µL, 1,272 mmol, 1,0 mol. ekv.). Po 15 minutah mešanja smo s stekleno brizgo po kapljicah dodali etil kloroformat (121,6 µL, 1,272 mmol, 1,0 equiv) in nastalo suspenzijo 90 minut mešali pri -5 °C. Mešanje smo ustavili in pustili, da se je oborina posedla na dno bučke. 1,25 mL supernatanta smo s stekleno brizgo prenesli v 25 mL bučko z okroglim dnom in magnetom za mešanje ter s kanulo dodali THF (9 mL). Raztopini smo ob mešanju dodali TBAC (3,54 mg) in nato s kanulo po kapljicah še raztopino A. Med reakcijo smo z dodajanjem 1 M vodne raztopine LiOH s stekleno brizgo skrbeli, da je bila pH reakcijske zmesi 8–9. Po 45 minutah mešanja pri sobni temperaturi je bil nitroprusidni test za prisotnost tiolov v vzorcu reakcijske zmesi negativen, zato smo raztopino ohladili na 0 °C, odstranili balon z argonom in septo ter pH raztopine uravnali na 6–7 z 1 M vodno raztopino HCl. Raztopino smo prenesli v 50 mL bučko z okroglim dnom in z uparevanjem

odstranili THF, pri čemer smo temperaturo vodne kopeli rotavaporja nastavili na 30 °C. Ostanek smo zmrznili v tekočem dušiku in liofilizirali. Masa surovega produkta **22** je bila 151,5 mg. Za analize in sintezo tioestra **1** smo uporabili surovi produkt **22**.

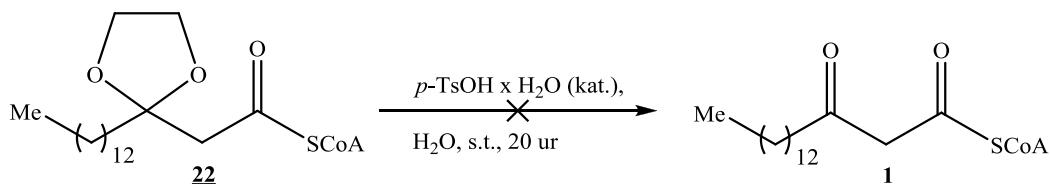
Priprava raztopine A: Z argonom prepihanjo bidestilirano vodo (5 mL) smo s stekleno brizgo dodali v vsebnik s Li₃CoASH (100 mg, 0,1273 mmol). Raztopino smo s stekleno brizgo prenesli v 10 ml bučko z okroglim dnom in magnetom za mešanje. Ob mešanju smo jo ohladili na 0 °C in z dodajanjem 1 M vodne raztopine LiOH s stekleno brizgo uravnali pH na 8–9.

 22	Izgled: bela trdna snov TLC: Rf (n-BuOH/ H ₂ O/AcOH/ = 5/3/2) = 0,49
MS (ESI-) m/z = 1062,3 ([M-H] ⁻), 1084,3 ([M-H+Na] ⁻)	
HR-MS (ESI-) Izračunana vrednost za C ₃₉ H ₆₇ N ₇ O ₁₉ P ₃ S ([M-H] ⁻) Izmerjena vrednost	1062,3425 1062,3452
HPLC Čistost spojine 85 % pri 254,16 nm (metoda A, t _R = 20,63 min; metoda C, t _R = 16,76 min)	

4.2.19. Poskus sinteze tioestra koencima A s 3-oksoheksadekanojsko kislino A

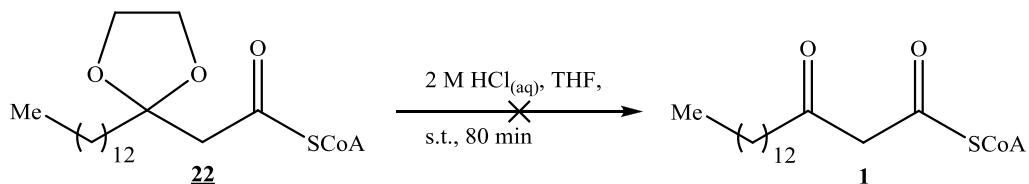
(3-ketopalmitoil koencima A) (**1**)

Postopek a



Surovi tioester **22** (1,0 mg) smo raztopili v bidestilirani vodi (1 mL) in ob mešanju dodali p-TsOH x H₂O (0,1 mg). Nastalo raztopino smo mešali pri sobni temperaturi in potek reakcije spremljali s HPLC metodo B. 30 minut, 1 uro, 3,5 in 20 ur po dodatku p-TsOH x H₂O je bil v reakcijski zmesi prisoten tioester **22**. Tioestra **1** pa niti v 20 urah ni nastalo nič.

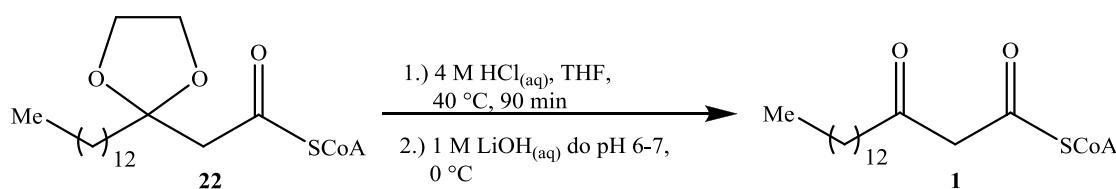
Postopek b



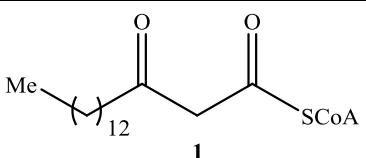
Surovi tioester **22** (3,5 mg) smo suspendirali v 2 M vodni raztopini HCl (839,0 μL) in ob mešanju dodali THF (približno 250,0 μL). Nastalo raztopino smo mešali pri sobni

temperaturi in potek reakcije spremljali s HPLC metodo B. 40 in 80 minut po dodatku kisline je bil v reakcijski zmesi prisoten tioester **22**. Tioestra **1** pa niti v 80 minutah ni nastalo nič.

4.2.20. Sinteza tioestra koencima A s 3-oksoheksadekojsko kislino A (3-ketopalmitoil koencima A) (**1**)



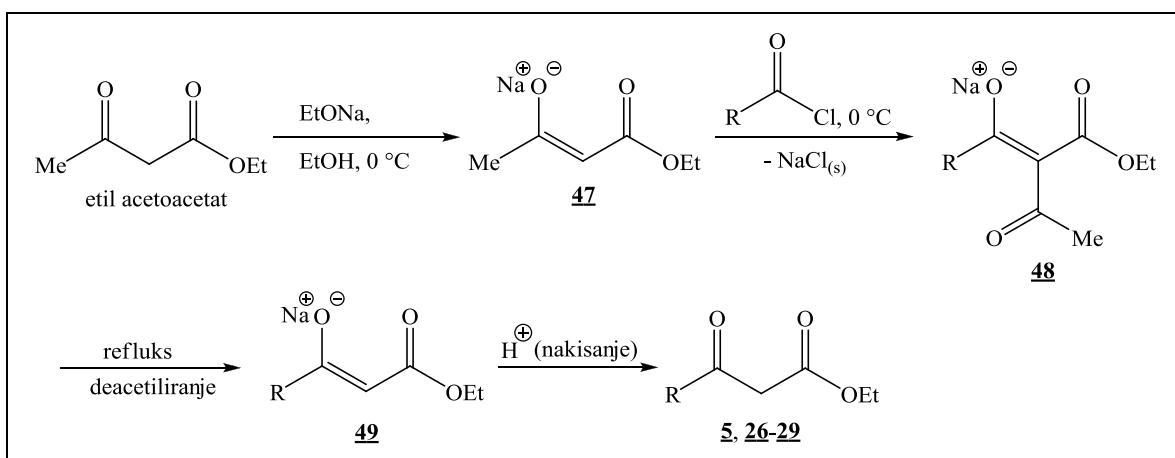
Surovi tioester **22** (100,0 mg) smo suspendirali v 4 M vodni raztopini HCl (8 mL) in ob mešanju segreli na 40 °C. Dodali smo toliko THF (2 mL), da je postala suspenzija bistra raztopina. Potek reakcije smo spremljali s HPLC metodo B. Po 90 minutah mešanja smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in odstranili THF s prepihavanjem reakcijske zmesi z dušikom. Nastalo suspenzijo smo prenesli v 14 mL centrifugirno epruveto in ohladili na 0 °C. Dodali smo bidestilirano vodo (3,5 mL) in pustili 10 minut na 0 °C. Suspenzijo smo nato centrifugirali (3 krat po 90 sekund pri 5000 obratih na minuto) in odstranili supernatant. HPLC analiza vzorca supernatanta z metodo B je pokazala, da v supernatantu ni tioestra **22**. Ostanku smo dodali bidestilirano vodo (1 mL), suspenzijo ohladili na 0 °C in uravnali pH na 6–7 z 1 M vodno raztopino LiOH. Nastalo raztopino smo segreli na sobno temperaturo in očistili z avtomatizirano reverzno »flash« kolonsko kromatografijo z metodo D. Frakcije, ki so vsebovale tioester **22** smo združili in uparili THF, pri čemer smo temperaturo vodne kopeli rotavaporja nastavili na 30 °C. Ostanek smo zmrznili v tekočem dušiku in liofilizirali. Masa očiščene spojine **1** je bila 47,8 mg.

 1	Izgled: bela trdna snov Izkoristek reakcije: 36 % (glede na Li ₃ CoASH) T_{tal}: 185–190 °C TLC: Rf (<i>n</i> -BuOH/H ₂ O/ AcOH/ = 5/3/2) = 0,53	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm] = 0,61 (3 H, s), 0,69–0,77 (6 H, m), 0,84–1,14 (20 H, m), 1,39 (2 H, bt), 2,32 (2 H, t, <i>J</i> = 6,90 Hz), 2,45 (2 H, t, <i>J</i> = 7,28 Hz), 2,59 (1,24 H, keto, s), 2,93 (2 H, t, <i>J</i> = 6,21 Hz), 3,24 (2 H, t, <i>J</i> = 6,40 Hz), 3,33 (2 H, t, <i>J</i> = 6,90), 3,42 (1 H, dd, <i>J</i> ₁ = 9,73, <i>J</i> ₂ = 4,83 Hz), 3,56 (1 H, dd, <i>J</i> ₁ = 9,54, <i>J</i> ₂ = 5,14 Hz), 3,91 (1 H, s), 4,12 (2 H, bs), 4,27 (0,38 H, enol, bs), 4,46 (0,62 H, keto, bt), 4,51 (0,38 H, enol, t, <i>J</i> = 4,58 Hz), 4,86–4,92 (0,38 H, enol, m), 6,02 (0,62 H, keto, d, <i>J</i> = 6,27 Hz), 6,09 (0,38 H, enol, d, <i>J</i> = 5,27 Hz), 8,69–8,15 (1 H, m), 8,38–8,44 (1 H, m)	
³¹P-NMR (162 MHz, D₂O)	δ [ppm] = -11,25 (d, <i>J</i> = 19,51 Hz), -10,77 (d, <i>J</i> = 19,51 Hz), 1,93–2,10 (m, enol), 2,36–2,62 (m, keto)	
MS (ESI-)	m/z = 1018,3 ([M-H] ⁻), 1040,3 ([M-H+Na] ⁻)	
HR-MS (ESI-)	Izračunana vrednost za C ₃₇ H ₆₃ N ₇ O ₁₈ P ₃ S ([M-H] ⁻) Izmerjena vrednost	1018,3163 1018,3150
IR (KBr)	v [cm ⁻¹] = 3402, 2925, 2854, 1652, 1244, 1083, 946, 518	
HPLC	Čistost spojine 95 % pri 254,16 nm (metoda B, <i>t</i> _R = 20,55 min; metoda C, <i>t</i> _R = 16,57 min)	

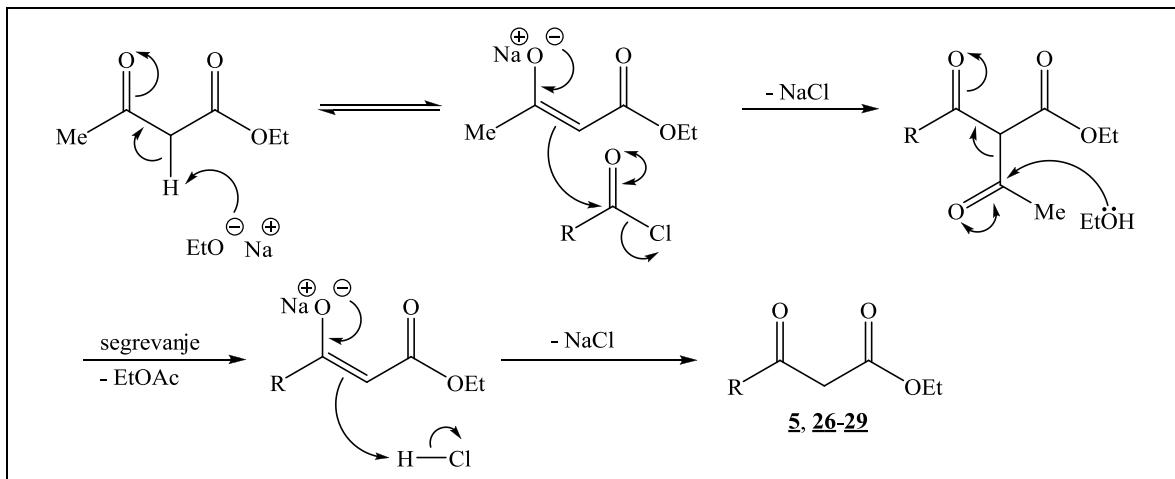
5. RAZPRAVA

5.1. Razprava o sintezi β -keto estrov

Predvidevali smo, da je reakcija potekla tako, da je iz etil acetoaceata, ki smo ga po kapljicah dodali na 0 °C ohljeni raztopini bazičnega natrijevega etilata (EtONa) v EtOH, nastal nukleofilni enolat natrijev etil acetoacetat (**47**). Ko smo tej raztopini po kapljicah dodali kislinski klorid, je prišlo do nukleofilne substitucije in nastanka natrijeve soli α -acetil β -keto estra (**48**) in NaCl, ki se je oboril in reakcijska zmes je postala suspenzija. Pri segrevanju reacijske zmesi ob vrenju smo s TLC opazili izginjanje lise, ki je predstavljala spojino **48** in nastajanje nove, manj polarne lise. Ker po 12 urah segrevanja ob vrenju v reakcijski zmesi glede na TLC ni bilo več spojine **48**, smo se določili za izolacijo. Suspenzijo smo ohladili na sobno temperaturo, razredčili z 96 % EtOH in filtrirali z odsesavanjem skozi v Büchnerjev liju (poroznost št. 4) zbit stolpec celita. Kadar smo filtrirali brez uporabe celita, nam ni uspelo ločiti oborine od raztopine. Ker je bila oborina dobro topna v H₂O, smo sklepali, da je NaCl in je pri reakciji res prišlo do nukleofilne substitucije. Filtrat smo uparili in se tako znebili EtOH, ki bi s porazdeljevanjem tako v organsko kot vodno fazo pri ekstrakciji povzročal težave. Ostanku smo dodali vodo in izmerili pH. Izkazalo se je, da je bila zmes alkalna, kar smo zaradi prebitka natrijevega etil acetoacetata, glede na kislinski klorid, tudi pričakovali. Zaradi alkavnosti smo predvidevali, da je v zmesi prisotna natrijeva sol β -keto estra (**49**). Ker smo želeli β -keto estre **5, 26–29** v neprotonirani obliki, ki jo bomo lahko ekstrahirali v organsko topilo, smo se določili, da bomo z dodanjem 2 M vodne raztopine HCl uravnali pH zmesi na 1–2. Dodali smo toluen in zmes ob mešanju nakisali. Fazi smo ločili v liju ločniku in organsko fazo nato ekstrahirali še z nasičeno vodno raztopino NaCl, da smo se znebili še nekaj vode. Organsko fazo smo šušili z Na₂SO₄, nato pa suspenzijo filtrirali in uparili. Pri sintezah β -keto estrov **5, 26–29** je bil ostanek po uparevanju toluena zmes večih spojin. β -keto estre smo iz teh zmesi izolirali s »flash« kolonsko kromatografijo, čeprav bi se lahko odločili tudi za vakuumsko destilacijo (slika 10 in slika 11).



Slika 10: Shema predlaganega poteka reakcije.



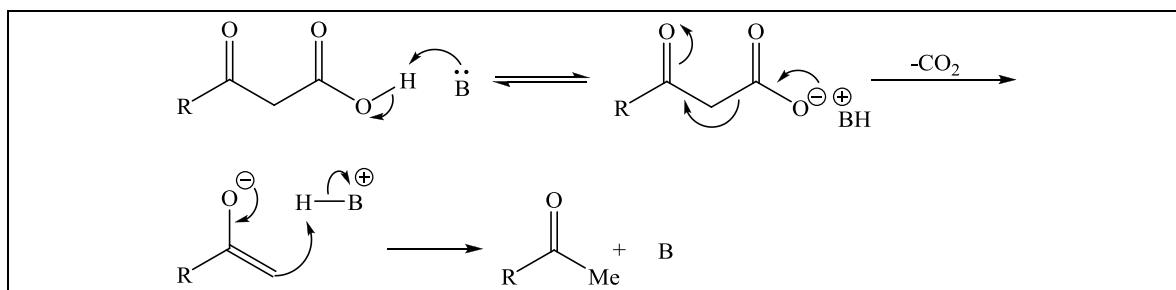
Slika 11: Predlagani mehanizem reakcije.

Pri metodah za sintezo β -keto estrov iz kislinskih kloridov in acetoacetatnih estrov, ki so podobne naši, so izkoristki zelo različni (21–93 %) (7, 9, 10, 16–26). Sintezo izvajajo z zelo različnimi količinami reagentov. Z našo metodo so bili izkoristki 30–47 %, kar je primerljivo z ostalimi. Prednost naše metode je zagotovo enostavnost izvedbe, saj izolacija α -acetil β -keto estra ali *in situ* deacetilacija α -acetil β -keto estra do β -keto estra z dodatkom novega reagenta (NH_4Cl in/ali NH_3 , NaOH ali MeOH) v reakcijsko zmes ni potrebna.

5.2. Razprava o sintezi 3-ketopalitoil koencima A

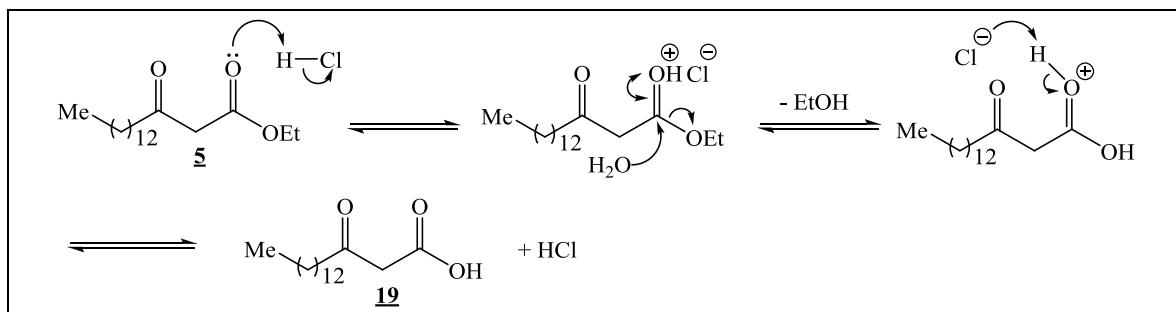
5.2.1. Sinteza 3-oksoheksadekanojske kisline (19)

β -keto karboksilno kislino **19** smo sintetizirali s kislino katalizirano hidrolizo β -keto estra **5**. Za s kislino katalizirano hidrolizo smo se odločili, ker so β -keto karboksilne kisline nestabilne v alkalnih pogojih, saj pride do dekarbosilacije v keton (slika 12) (29).



Slika 12: Mehanizem z bazo (B) katalizirane dekarboksilacije β -keto karboksilnih kislin.

Kislino **19** smo sintetizirali z metodo za sintezo višjih alifatskih β -keto kislin s hidrolizo metilnih estrov z zmesjo AcOH in koncentrirane vodne raztopine HCl, ki so jo razvili Mitz in sodelavci (slika 13) (24).



Slika 13: Mehanizem s kislino katalizirane hidrolize etilnega estra (**5**).

5.2.2. Poskus aktivacije 3-oksoheksadekanojske kisline

5.2.2.1. Poskus sinteze 3-oksoheksadekanoil klorida (31)

Shumway in sodelavci so iz β -keto karboksilne kisline s tionil kloridom (SOCl₂) sintetizirali β -keto kislinski klorid (31), Tsai in sodelavci pa so to pretvorbo izvedli z oksalil kloridom in Et₃N (32). Z obema postopkom smo poskusili iz β -keto karboksilne kisline **19** sintetizirati β -keto kislinski klorid **31**. Bili smo neuspešni, saj je, glede na TLC reakcijske zmesi, v obeh primerih nastala zmes večih spojin.

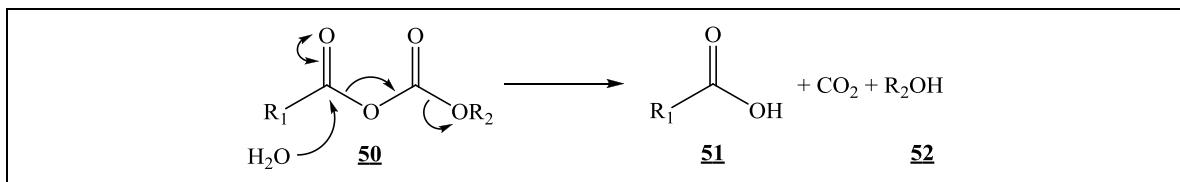
5.2.2.2. Poskus sinteze etil karbonil 3-oksoheksadekanoil anhidrida (32) oz. sinteza

pentadekan-2-on (46) in poskus sinteze izobutil karbonil 3-

oksoheksadekanoil anhidrida (33)

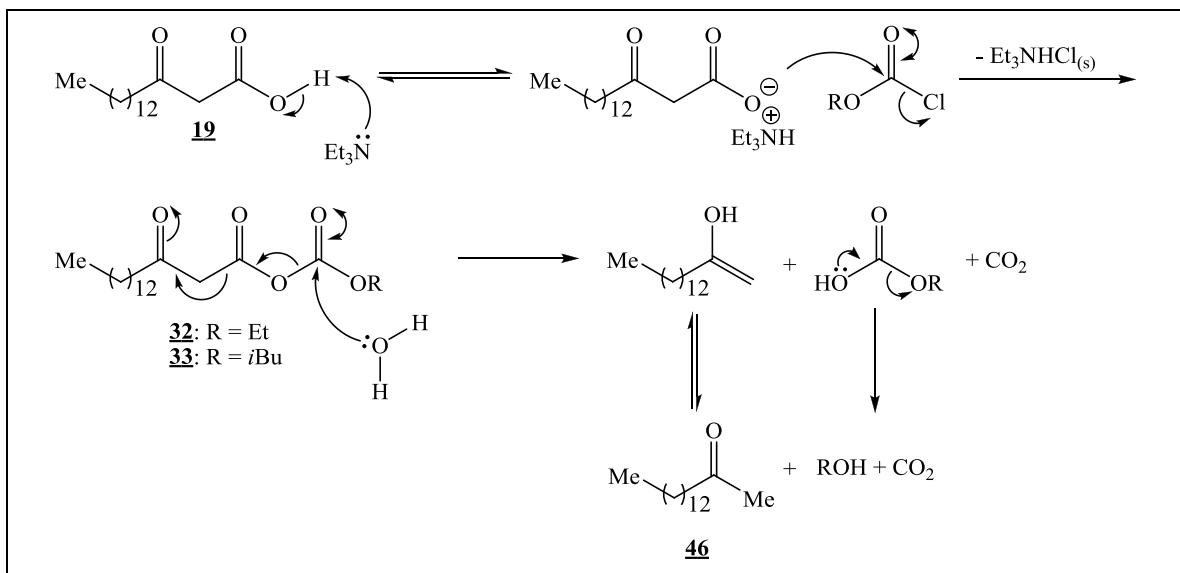
Ker sinteza mešanih anhidridov iz α,α -nesubstituiranih in α -monosubstituiranih β -keto karboksilnih kislin ni znana, smo poskusili mešana anhidrida **32** in **33** sintetizirati po postopku za sintezo mešanega anhidrida iz α,α -nesubstituirane β -keto karboksilne kisline (nalidiksne kisline), ki so jo objavili McCoy in sodelavci (33). Ta postopek je sicer izpeljan iz postopka za sintezo mešanih anhidridov iz karboksilnih kislin, ki na β -mestu nimajo karbonilne skupine, in alkil kloroformatov (etyl kloromormat, izobutil kloroformat) v prisotnosti organske baze (Et₃N) (34–42). Ker mešani anhidridi (**50**) v prisotnosti vode

razpadejo na karboksilno kislino (**51**), CO_2 in alkohol (**52**), smo reakciji sinteze **32** in **33** izvedli v brezvodnih pogojih (slika 14).



Slika 14: Mehanizem hidrolize mešanih anhidridov.

Pri poskusu sinteze anhidrida **32** in anhidrida **33** je prišlo do dekarboksilacije in nastanka ketona **46**. S TLC analizo reakcijskih zmesi po dodatku Et_3N in po dodatku alkil kloroformata (etyl kloroformata za sintezo **32** in izobutil kloroformata za sintezo **33**) smo ugotovili, da je do dekarboksilacije prišlo šele po dodatku alkil kloroformata in ne že po dodatku Et_3N . Po dodatku alkil kloroformata je v reakcijski zmesi nastala oborina. Sklepali smo, da je šlo za trietilamonijev klorid (Et_3NHCl). Iz TLC analize in nastale oborine smo sklepali, da je prišlo do nastanka **32** in **33**, a je pri reakciji z vodo prišlo do dekarboksilacije v keton **46**, čeprav smo reakciji izvedli v brezvodnih pogojih (slika 15).

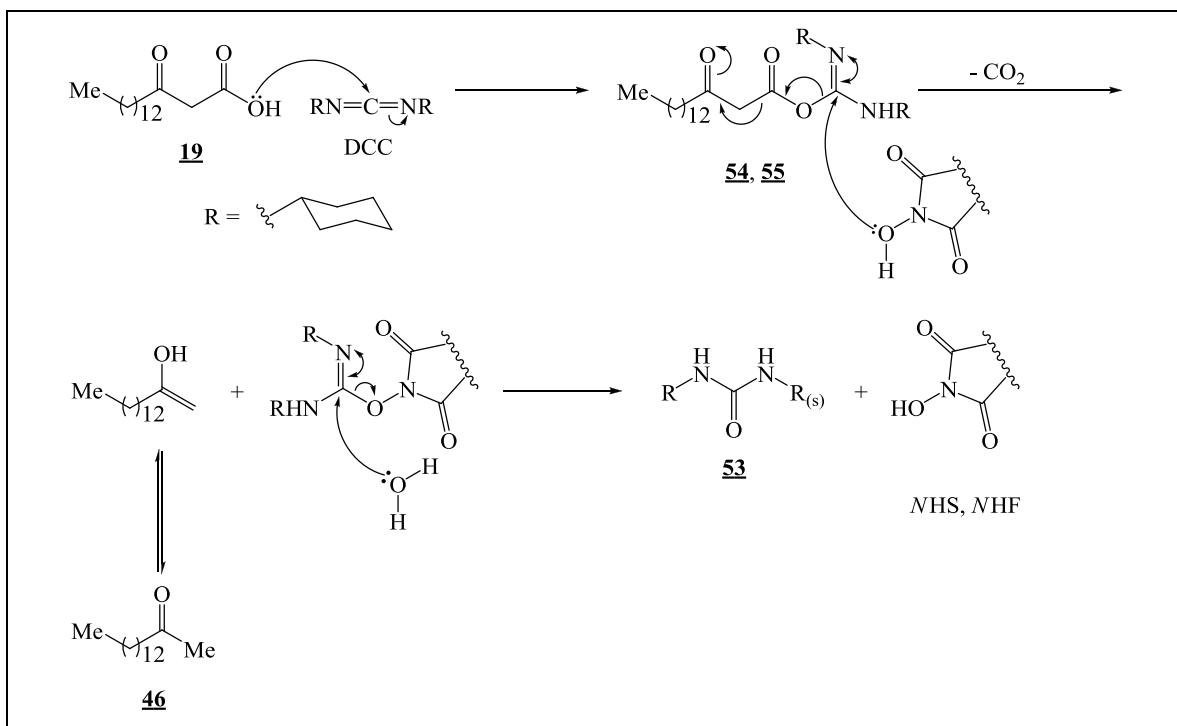


Slika 15: Predlagan mehanizem nastanka ketona **46** pri poskusu sinteze mešanih anhidridov **32** in **33**.

5.2.2.3. Poskus sinteze 2,5-dioksopiroolidin-1-il 3-oksoheksadekanoata (**34**) in 1,3-dioksoizoindolin-2-il 3-oksoheksadekanoata (**35**)

Ker sinteza *NHS* in *NHF* estrov β -keto karboksilnih kislin ni znana, smo poskusili spojini **34** in **35** sintetizirati po postopkih za sintezo teh estrov iz karboksilnih kislin, ki na β -mestu nimajo karbonilne skupine (43–45). Pri poskusu sinteze estrov **34** in **35** je prišlo do dekarboksilacije in nastanka ketona **46**. Pri obeh sintezah je po segretju reakcijske zmesi na sobno temperaturo iz reakcijske zmesi izpadla oborina. S TLC smo potrdili, da je oborina

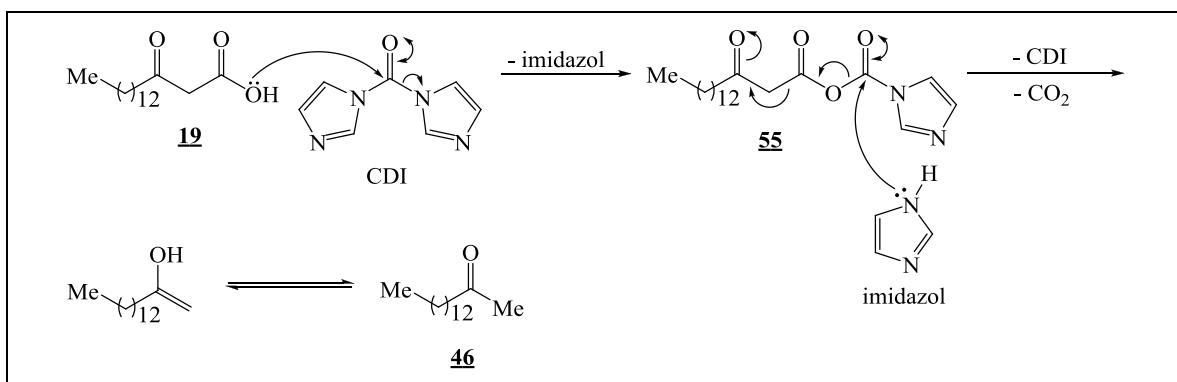
DCU (**53**). Sklepali smo, da je prišlo do nastanka anhidridov **54** in **55**, a je pri reakciji z NHS oz. NHF prišlo do dekarboksilacije v keton **46** (slika 16).



Slika 16: Predlagan mehanizem nastanka ketona **46** pri poskusu sinteze estrov **34** in **35**.

5.2.2.4. Poskus sinteze 1-(1*H*-imidazol-1-il)heksadekan-1,3-diona (**36**)

Sakuda in sodelavci so iz β -keto karboksilne kisline sintetizirali β -keto imidazol amid (**46**). Ta postopek je sicer izpeljan iz postopka za sintezo imidazol amidov iz karboksilnih kislin, ki na β -mestu nimajo karbonilne skupine (47–49). Pri poskusu sinteze amida **36** je prišlo do dekarboksilacije in nastanka ketona **46**. Sklepali smo, da je prišlo do nastanka anhidrida **55**, a je pri reakciji z imidazolom prišlo do dekarboksilacije v keton **46** (slika 17).

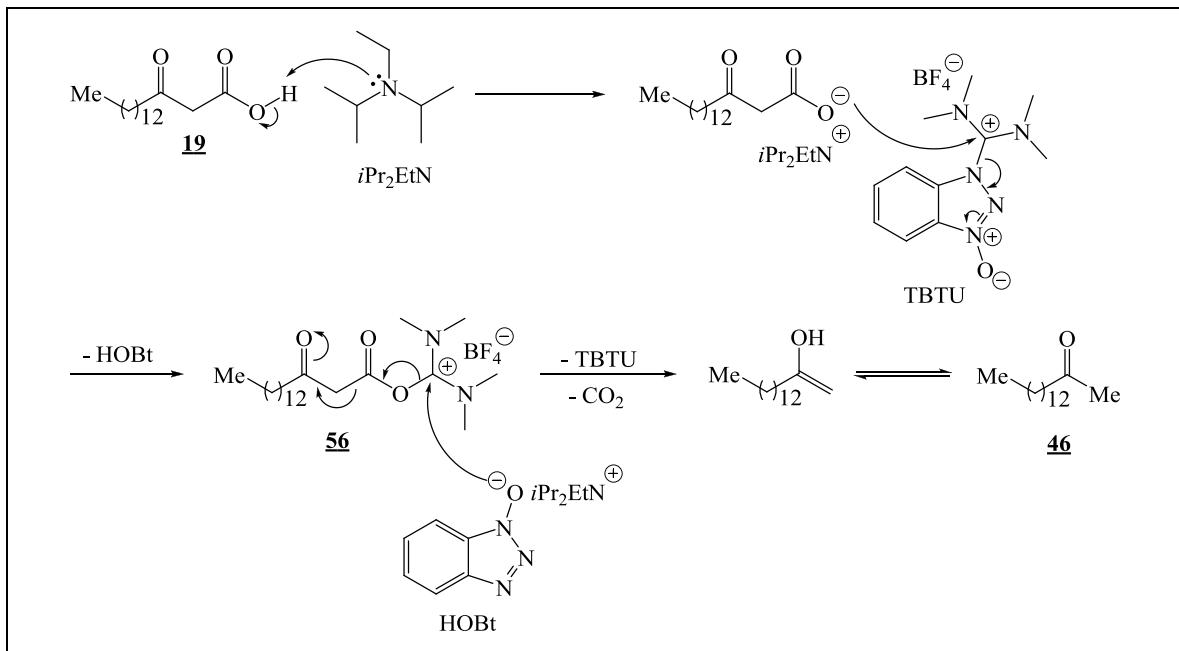


Slika 17: Predlagan mehanizem nastanka ketona **46** pri poskusu sinteze amida **36**.

5.2.3. Poskus sinteze metil 2-(3-oksoheksadekanoiltio)acetata (**38**)

Tioestra **38** nam iz β -keto karboksilne kisline **19** in metil tioglikolata (**37**) z uporabo »coupling« reagentov ni uspelo sintetizirati. Pri postopku a je bil ta reagent DCC, pri

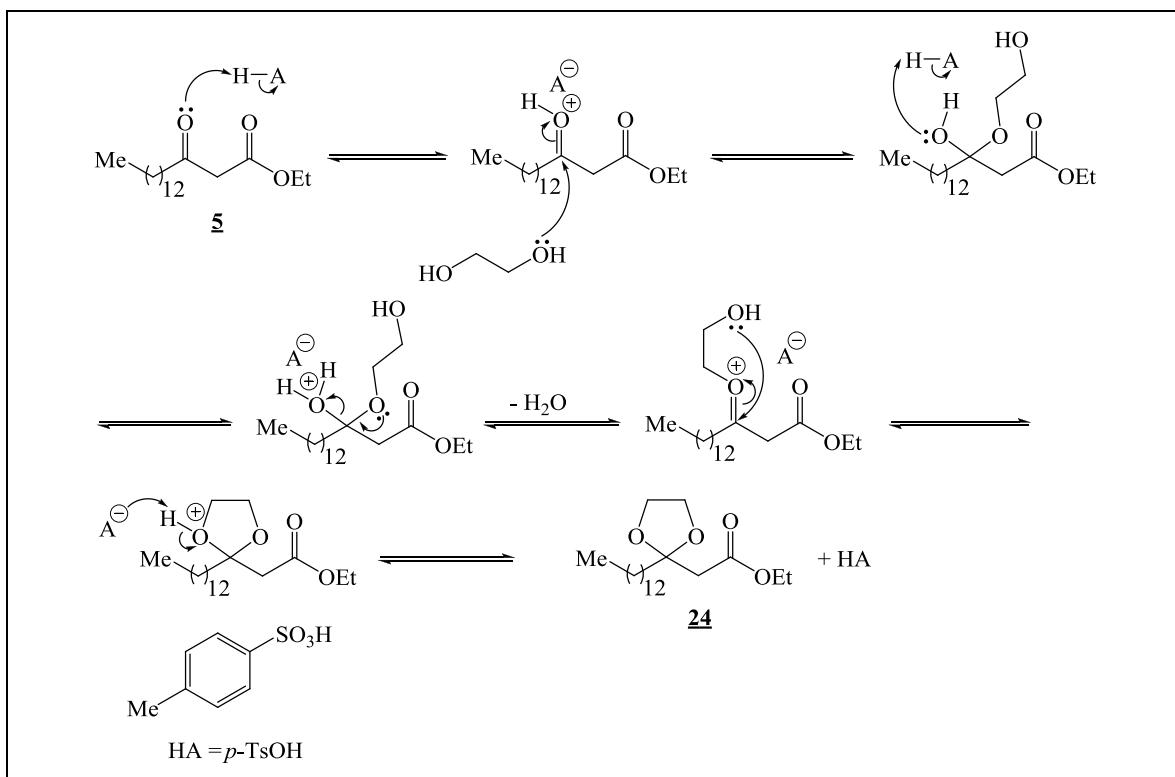
postopku **b** pa TBTU (50). Sklepali smo, da je pri postopku **a** keton **46** nastal na enak način kot pri poskusu sinteze estrov **34** in **35** (slika 16). Pri postopku **b** je prišlo do dekarboksilacije in nastanka ketona **46**. Sklepali smo, da je prišlo do nastanka estra **56**, a je bil ta tako reaktiv, da je pri reakciji s HOBr prišlo do dekarboksilacije v keton **46** (slika 18).



Slika 18: Predlagan mehanizem nastanka ketona **46** pri poskusu sinteze tioestra **38**.

5.2.4. Sinteza etil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (24)

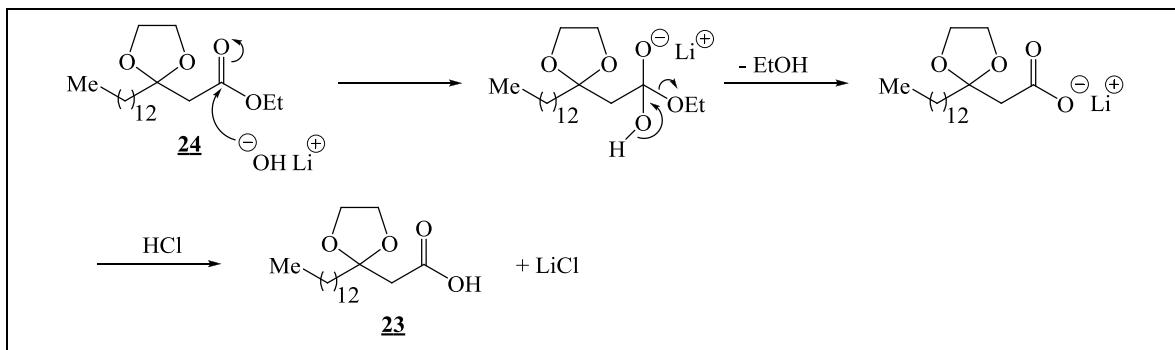
Ker nam iz β -keto karboksilne kisline **19** ni uspelo sintetizirati reaktivnih derivatov **31–36** ali tioestra **38**, smo tioester **1** sintetizirali z uporabo zaščitne skupine. Karbonilno skupino estra **5** smo pretvorili v 1,3-dioksolan **24** s kislino (*p*-TsOH x H₂O) katalizirano tvorbo ketala (slika 19).



Slika 19: Mehanizem s kislino katalizirane tvorbe 1,3-dioksolana 24.

5.2.5. Sinteza 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetne kisline (23)

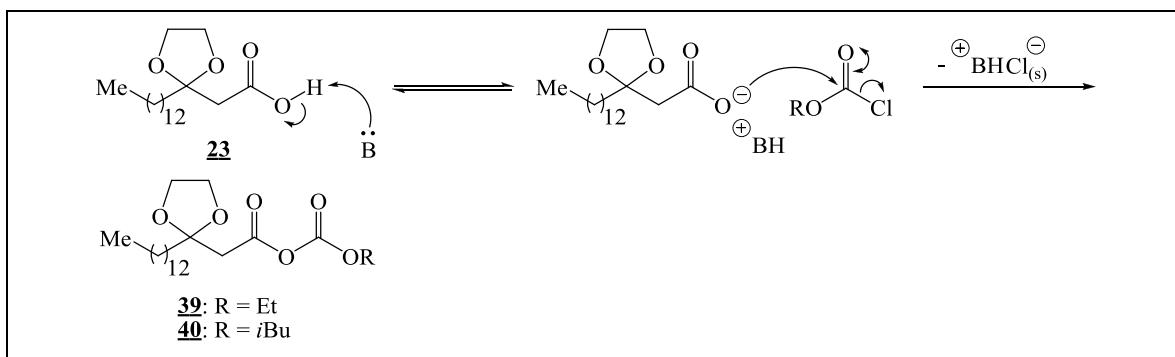
Karboksilno kislino 23 smo sintetizirali s bazično hidrolizo etilnega estra 24. Kot bazo smo uporabili 1 M vodno raztopino LiOH (slika 20).



Slika 20: Mehanizem bazične hidrolize etilnega estra 24.

5.2.6. Sinteza etil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (39) in poskus sinteze izobutil karbonil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acet anhidrida (40)

Mešana anhidrida 39 in 40 smo sintetizirali po postopku za sintezo teh spojin iz karboksilnih kislin in alkil kloroformatov (etyl kloroformat, izobutil kloroformat) v prisotnosti organske baze (Et_3N , *NMM*) (slika 21) (34–42).

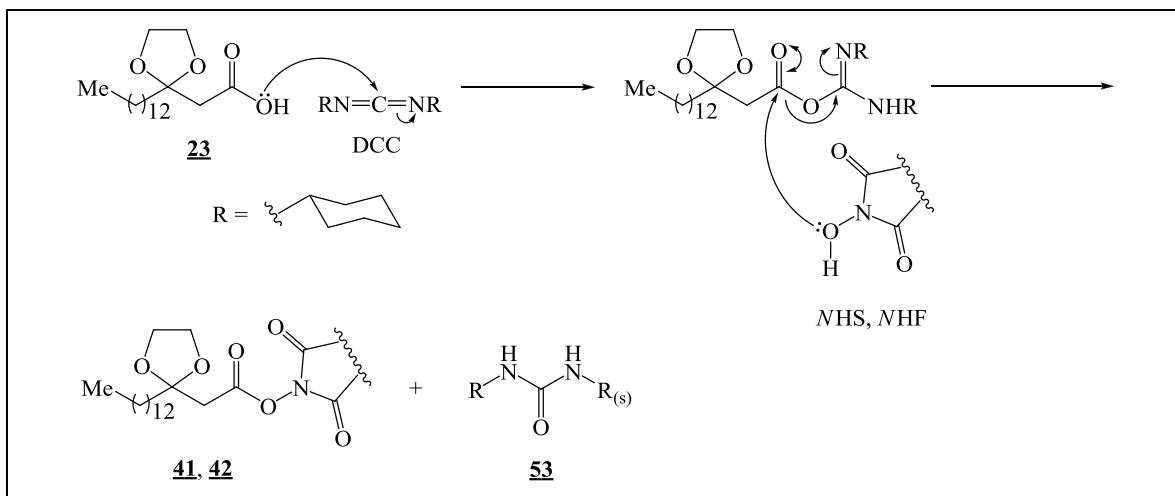


Slika 21: Mehanizem nastanka mešanih anhidridov **39** in **40** (B = Et₃N ali NMM).

Ker mešani anhidridi (**50**) v prisotnosti vode razpadejo na karboksilno kislino (**51**), CO₂ in alkohol (**52**), smo reakciji sinteze **39** in **40** izvedli v brezvodnih pogojih (slika 14). Anhidrida **39** nismo izolirali, ampak smo za sintezo tioestra **43** uporabili surovi produkt. Pri sintezi anhidrida **40** pa je poleg spojine **40** nastal produkt z neznano strukturo (Rf (MF E) = 0,60).

5.2.7. Sinteza 2,5-dioksopiroolidin-1-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (**41**) in 1,3-dioksoisoindolin-2-il 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetata (**42**)

NHS in NHF estra karboksilne kisline **23** smo sintetizirali po postopku za sintezo teh estrov iz karboksilnih kislin in NHS oz NHF v prisotnosti »coupling« reagenta (DCC) (43–45) (slika 22). S TLC smo ugotovili, da pri kristalizaciji surovih estrov **41** in **42** iz EtOH ni prišlo do nastanka etilnega estra **24**.

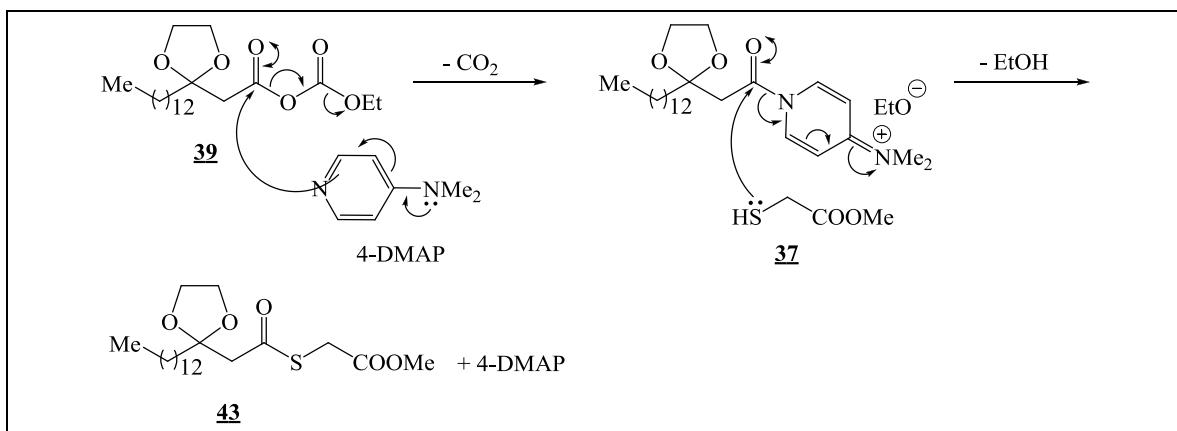


Slika 22: Mehanizem nastanka estrov **41** in **42**.

5.2.8. Sinteza metil 2-(2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltio)acetata (**43**)

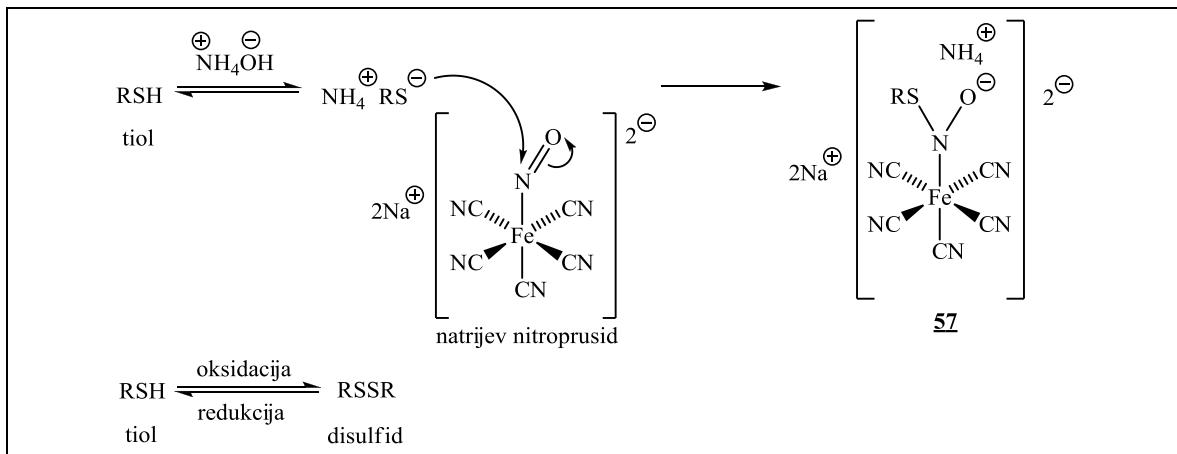
Pri sintezi tioestra **43** iz anhidrida **39** in metil tioglikolata (**37**) smo uporabili nukelofilni katalizator (4-DMAP). Takoj po dodatku katalitične količine 4-DMAP v reakcijsko zmes

anhidrida **39** in metil tioglikolata (**37**) smo opazili izhajanje plina. Sklepali smo, da je CO₂ in nastaja tioester **43** (slika 23).



Slika 23: Mehanizem nastanka tioestra **43**.

Bučko z reakcijsko zmesjo smo po dodatku 4-DMAP zaščitili pred svetlobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. S tem smo želeli preprečiti s svetlobo katalizirano oksidacijo metil tioglikolata v disulfid. Izginjanje metil tioglikolata (**37**) in s tem potek reakcije, smo spremljali s TLC in nitroprusidnim testom. Ta test predstavlja enostaven način za določanje prisotnosti tiolov v reakcijski zmesi. Natrijev nitroprusid je natrijev pentacianonitrozilferat(II), ki s tioli reagira tako, da tvori spojino z intenzivno vijolično barvo (**57**). Test smo izvedli tako, da smo alkalni vodni raztopini natrijevega nitroprusida dodali vzorec reakcijske zmesi. Alkalnost raztopine smo zagotovili z razredčeno vodno raztopino NH₃. Če je bil v reakcijski zmesi prisoten tiol, se je barva raztopine spremenila iz rahlo rjave v vijolično. Večja je bila koncentracija tiola, intenzivnejša je bila vijolična barva. Če se po dodatku vzorca reakcijske zmesi barva ni spremenila, v reakcijski zmesi ni bilo (več) tiola (slika 24).



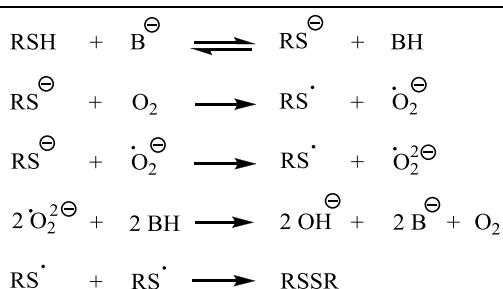
Slika 24: Predlagan potek reakcije pri nitroprusidnem testu (zgoraj) in prikaz oksidacije tiola v disulfid (spodaj desno).

5.2.9. Poskus sinteze metil 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetiltioacetata (43)

Estra **41** in **42** sta bila premalo reaktivna, da bi ju lahko z metil tioglikolatom (**37**) in katalitično količino nukleofilnega katalizatorja (4-DMAP) pretvorili v tioester **43**. Na slabo reaktivnost **41** in **42** smo pomislili že po izolaciji teh dveh spojin, ko pri kristalizaciji iz EtOH, glede na TLC, ni nastalo nič etilnega estra **24**. Zaradi slabe reaktivnosti estrov **41** in **42**, smo tioester **22** sintetizirali s tvorbo mešanega anhidrida **39**.

5.2.10. Sinteza tioestra NAC z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)ocetno kislino (45)

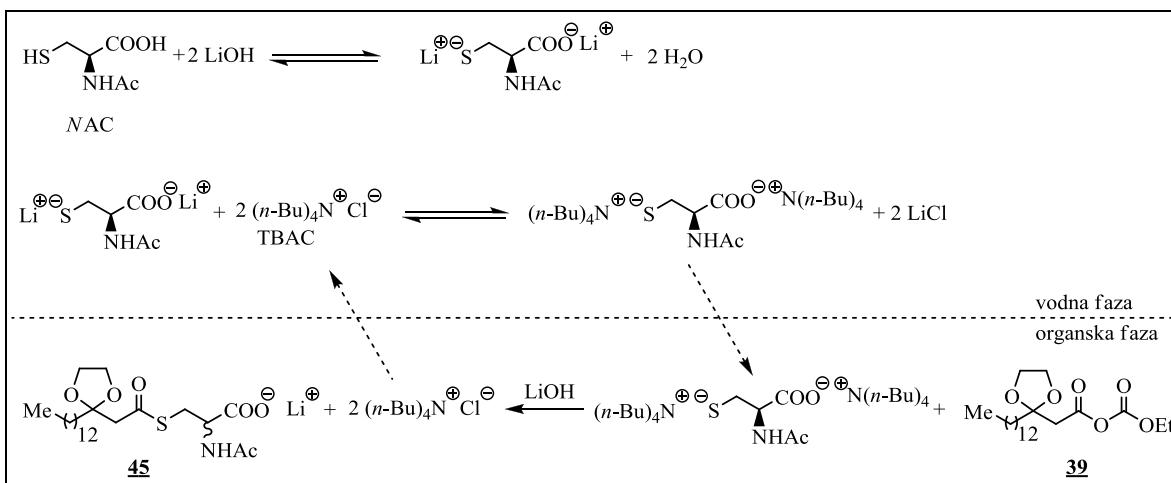
Glavni namen te sinteze je bil razvoj optimalnih reakcijskih pogojev za sintezo tioestra **22**. NAC smo izbrali kot tiol, ki je v grobem posnemal CoASH. Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih, ker mešani anhidridi (**50**) v prisotnosti vode razpadajo na karboksilno kislino (**51**), CO₂ in alkohol (**52**) (slika 14), tioli (RSH) pa pod vplivom kisika iz zraka oksidirajo v disulfide (RSSR) ob prisotnosti majhne količina baze (slika 25) (51).



Slika 25: Mehanizem nastanka disulfidov (RSSR) iz tiolov (RSH) pod vplivom kisika in baze (B).

Karboksilno kislino **23** smo *in situ* pretvorili v mešani anhidrid **39**, dodali TBAC in nato tvorili tioester **45** z dodatkom vodne raztopine NAC s pH 8–9 (raztopina A). Izginjanje NAC in s tem potek reakcije smo spremljali s TLC in nitroprusidnim testom (slika 24). Bučko z reakcijsko zmesjo smo po dodatku raztopine A zaščitili pred svetlobo tako, da smo jo ovili z alu folijo. S tem smo želeli preprečiti s svetlobo katalizirano oksidacijo metil tioglikolata v disulfid.

Ugotovili smo, da je za uspešno sintezo tioestra **45** bistveno, da je reakcijska zmes bistra raztopina in je pH med 8–9. Sklepali smo, da je bistra raztopina bistvena za stik med mešanim anhidridom **39** in tiolom (NAC). Dosegli smo jo z ustreznim razmerjem med topiloma (THF/H₂O = 3/1). K bistrosti je prispeval tudi katalizator faznega prenosa (TABC). Sklepali smo, da je alkalnost reakcijske zmesi (pH 8–9) nujna za ionizacijo NAC, ki je bila verjetno bistvena za nastanek tioestra **45**. Dosegli smo jo z 1 M vodno raztopino LiOH. TABC smo dodali v reakcijsko zmes, da bi v primeru, če bi prišlo do nastanka emulzije, prenašal ionizirani NAC v organsko fazo emulzije (slika 26).



Slika 26: Shema katalize faznega prenosa.

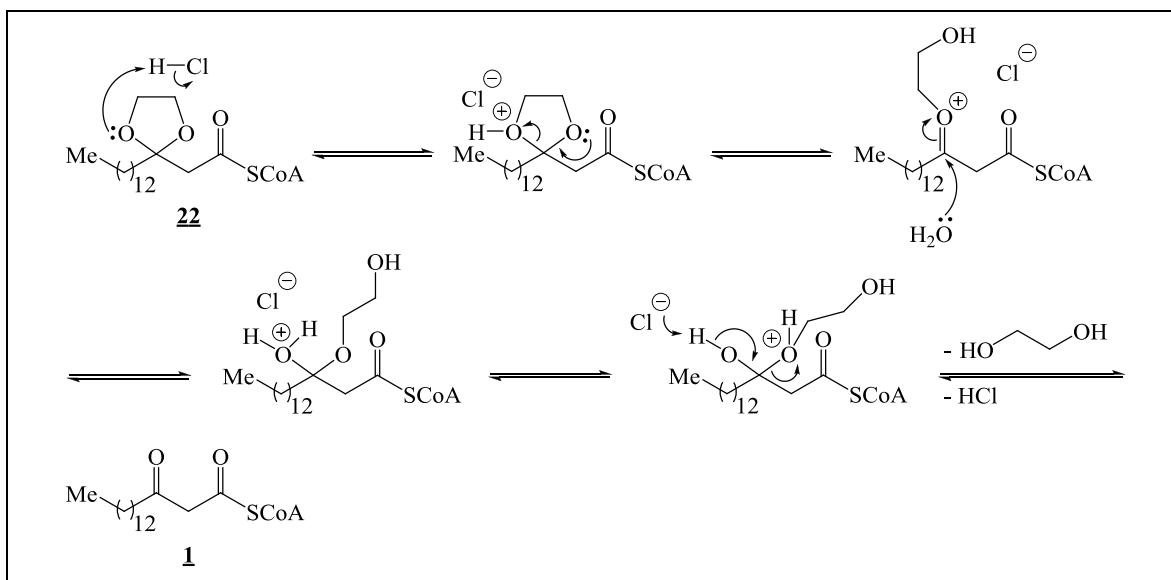
5.2.11. Sinteza tioestera koencim A z 2-(2-tridecil-1,3-dioksolan-2-il)acetno kislino (22)

Reakcijo smo izvedli v brezvodnih pogojih, ker mešani anhidridi (**50**) v prisotnosti vode razpadejo na karboksilno kislino (**51**), CO₂ in alkohol (**52**) (Slika 14), tioli (RSH) pa pod vplivom kisika iz zraka oksidirajo v disulfide (RSSR) ob prisotnosti majhne količine baze (slika 25) (51). Karboksilno kislino **7** smo *in situ* pretvorili v mešani anhidrid **39**, dodali TBAC in nato tvorili tioester **22** z dodatkom vodne raztopine trilitijeve soli CoASH s pH 8–9 (raztopina A). Porabo CoASH, in s tem potek reakcije, smo spremljali s TLC in nitroprusidnim testom (slika 24).

Reakcijski pogoje, s katerimi smo uspešno sintetizirali tioester **45**, smo uporabili za sintezo tioestra **22**. Zanimivo je, da je bila za nastanek tioestra **22** nujna alkalnost reakcijske zmesi, čeprav so alkalne raztopine CoASH nestabilne (52). Zaradi možnih hidroliz tioestrske, pirofosfatne, fosfatnih in drugih labilnih vezi pri izlolaciji spojine **22**, smo za sintezo tioestra **1** uporabili surovi tioester **22**.

5.2.12. Sinteza tioestra koencima A s 3-oksoheksadekanojsko kislino A (3-ketopalmitoil koencima A) (**1**)

Tioester **1** smo sintetizirali s kislino katalizirano hidrolizo 1,3-dioksolana **22**. Izvedli smo jo pri 40 °C s 4 M vodno raztopino HCl v prisotnosti majhne količine THF, ki je odigral vlogo kotopila (slika 27).



Slika 27: Mechanizem s kislino katalizirane hidrolize 1,3-dioksolana **22**.

Kurosawa in sodelavci so ugotovili, da je za s kislino katalizirano pretvorbo koencim A β - (1,3-dioksolanil) tioestrov v koencim A β -keto tioestre bistveno, da je reakcijska zmes raztopina. Te pretvorbe so izvedli pri sobni temperaturi s 4 M vodno raztopino HCl (34). Ker je bil surovi tioester **22** slabo topen v 4 M vodni raztopini HCl, smo suspenziji dodali toliko THF, da je reakcijska zmes postala bistra raztopina.

Pri poskusu odščite s katalitično količino *p*-TsOH v vodni raztopini pri sobni temperaturi v 20 urah ni nastalo nič tioestra **1**. Tudi pri reakciji z 2 M vodno raztopino HCl in majhno količino THF pri sobni temperaturi v 80 minutah ni nastalo nič tioestra **1**. S 4 M vodno raztopino HCl, v prisotnosti majhne količne THF pri sobni temperaturi, je reakcija potekala zelo počasi, saj je bilo po 400 minutah, glede na HPLC, pri 254,16 nm v reakcijski zmesi 12,37 % tioestra **22**. Med reakcijo smo morali z dodajanjem THF skrbeli, da je bila reakcijska zmes bistra raztopina. Izkoristek je bil slab, saj smo iz 20,0 mg surovega tioestra **22** po izolaciji dobili 4,5 mg tioestra **22** 85 % HPLC čistosti (254,16 nm). Zaradi teh težav smo se odločili, da bomo poskusili reakcijo izvesti s segrevanjem reakcijske zmesi pri 40 °C. Reakcija je potekala bistveno hitreje, saj je bilo po 200 minutah, glede na HPLC, pri 254,16 nm v reakcijski zmesi 1,95 % tioestra **22**. THF je bilo potrebno dodati le na začetku reakcije. Izkoristek je bil boljši, saj smo iz 20,0 mg surovega tioestra **22** po izolaciji dobili 10,2 mg tioestra 88 % HPLC čistosti (254,16 nm). Reakcijo s 100,0 mg surovega tioestra **22** smo zato izvedli pri 40 °C. Reakcija je potekala še hitreje, saj je bilo po 70 minutah, glede na HPLC pri 254,16 nm, v reakcijski zmesi 1,51 % tioestra **22**. Po izolaciji smo dobili 47,8 mg tioestra **1** 95 % HPLC čistosti (254,16 nm). Izvedli smo tudi grafično primerjavo hitrosti reakcije odščite pri različnih pogojih (priloga).

5.3. Razvoj HPLC metod

Za določanje čistosti tioestrov **22** in **1** in spremljanje poteka reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1** smo morali razviti primerne HPLC metode. Pomagali smo si z objavljenimi HPLC metodami za določanje čistosti in izolacijo (preparativno HPLC) tioestrov in tioetrov koencima A (34–37, 39–43, 45, 47, 48, 50, 53–61). S »poskus in napaka« pristopom smo s spreminjaanjem HPLC parametrov (dolžina kolone, sestava mobilne faze, hitrost pretoka mobilne faze, gradient in čas analize) razvili metode A, B in C.

Metodi A in B smo razvili na koloni A ($l = 150$ mm), metodo C pa na koloni B ($l = 250$ mm). Pri vseh metodah smo kolono termostatirali pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Najprej smo razvili metodo C in na osnovi te metodi A in B. Pri vseh metodah smo kot organsko topilo mobilne faze uporabili MeCN, ki je za razliko od MeOH nenukleofilno topilo. Predvidevali smo, da bi lahko karbonilna skupina tioestra **1** z MeOH na koloni tvorila polketal oz. ketal in bi tako dobili nerealne rezultate. Pri vseh metodah smo injicirali $20\text{ }\mu\text{l}$ raztopine vzorca. Vsi gradienti in kromatogrami so v prilogi.

5.3.1. Razvoj HPLC metod na koloni B

Metode s hitrostjo pretoka mobilne faze $1,5\text{ mL/min}$ in z vodo, $0,01\%$ ali $0,1\%$ vodno raztopino TFA kot vodno komponento mobilne faze niso bile primerne za določanje čistosti tioestrov **22** in **1** ter spremljanje poteka reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1**. Sklepali smo, da je bil vzrok prenizka puferska kapaciteta mobilne faze. Za določanje čistosti tioestrov **22** in **1** ter spremljanje poteka reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1** na daljši koloni B, so bile primerne metoda s hitrostjo pretoka mobilne faze $1,5\text{ mL/min}$ in gradientom MeCN/ 25 mM acetatni pufer s pH 5,0 (preglednica 7 in kromatogram 1), metoda s hitrostjo pretoka mobilne faze $1,5\text{ mL/min}$ in gradientom MeCN/ 15 mM fosfatni pufer s pH 5,0 (preglednica 8 in kromatogram 2) in metoda C.

5.3.2. Razvoj HPLC metod na koloni A

Pri razvoju HPLC metod A in B na koloni A smo si pomagali z rezultati, ki smo jih pridobili z razvijanjem metod na daljši koloni B. Kot vodno fazo mobilne faze smo uporabili 20 mM fosfatni pufer s pH 4,95. Detekcijo smo izvedli pri $210,8$, $254,16$ in $280,16\text{ nm}$. Osredotočili smo se na razvoj metode, ki bi bila primerna za spremljanje poteka reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1**. Spreminjali smo gradient, čas analize in hitrost pretoka mobilne faze.

Najprej smo spremiščali le gradient in čas analize, hitrost pretoka mobilne faze pa je bil 1 mL/min. Uporabili smo gradiente 3, 4, 5, 6 in 7 (priloga). Z metodo z gradientom 3 (preglednica 9) smo ugotovili, da je bil čas analize lahko krajši od 35 minut, čeprav s to metodo nismo uspeli ločiti spojini **22** in **1** na bazni liniji (kromatogram 3). Pri metodi z gradientom 4 (preglednica 10) smo čas analize skrajšali na 28 minut. Ker pa je bil gradient 4 hitrejši od gradiента 3, je bila ločba spojin **22** in **1** slabša (kromatogram 4). Tako smo ugotovili, da je bil za ločbo spojin **22** in **1** potreben nekoliko počasnejši gradient. Pri metodi z gradientom 5 (preglednica 11) je bil čas analize 32 minut. Ker je bil gradient 5 počasnejši od gradientov 3 in 4, je bila ločba spojin **22** in **1** boljša, a spojini nista bili povsem ločeni na bazni liniji (kromatogram 5). Zato smo čas analize pri metodi z gradientom 6 (preglednica 12) podaljšali na 35 minut in upočasnili gradient. Ločba spojin **22** in **1** je bila boljša, a spojini vseeno nista bili povsem ločeni na bazni liniji (kromatogram 6). Pri metodi z gradientom 7 (preglednica 13) smo čas analize skrajšali na 32 minut in pospešili gradient. Ločba spojin **22** in **1** je bila slabša kot pri metodi z gradientom 6 (kromatogram 7). Zanimalo nas je, kako bi na ločbo spojin **22** in **1** vplivalo zmanjšanje hitrosti pretoka mobilne faze. Uporabili smo gradient 7 (preglednica 13), hitrost pretoka pa smo zmanjšali iz 1,0 mL/min na 0,8 mL/min. Retencijski časi so se podaljšali, ločba spojin **22** in **1** pa se ni izboljšala (kromatogram 8). Ko smo hitrost pretoka upočasnili na 0,7 mL/min, so se retencijski časi podaljšali, a se ločba ni izboljšala (kromatogram 9). HPLC metoda A je bila zelo podobna tej metodi in je bila primerna za določanje čistosti tioestra **22** ne pa tudi za spremeljanje poteka reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1**. Za slednje smo metodo A še nekoliko spremenili. Pufru smo dodali 3 % MeCN (V/V) in spremenili gradient. S to metodo (metoda B) smo spojini **22** in **1** ločili dovolj dobro, da smo lahko spremeljali potek reakcije pretvorbe spojine **22** v spojino **1** (kromatogram 10).

6. ZAKLJUČEK

Razvili smo relativno enostaven način za sintezo α,α -nesubstituiranih in α -monosubstituiranih β -keto estrov. Naša metoda se od drugih metod za sintezo teh spojin iz kislinskih kloridov in acetoacetatnih estrov razlikuje v tem, da α -acetil β -keto ester deacetiliramo do β -keto estra brez izolacije ali dodatka novega reagenta (NH_4Cl in/ali NH_3 , NaOH ali MeOH), ampak enostavno s segrevanjem reakcijske zmesi ob vrenju. Menimo, da je naša metoda primerna za sintezo α,α -nesubstituiranih in α -monosubstituiranih β -keto estrov, ki so intermediati pri sintezi učinkovin.

S to metodo smo sintetizirali etil 3-oksoheksadekanoat in ga uporabili za sintezo 3-ketopalmitoil koencima A, ki je potencialni endogeni substrat 17β -HSD12. S tem smo ustvarili pogoje za potrditev hipoteze, da je 17β -HSD12 multifunkcionalen encim, ki ima poleg vloge pri steroidogenezi pomembno vlogo tudi pri presnovi lipidov.

7. LITERATURA

- (1) Sakurai N, Miki Y, Suzuki T, Wantanabe K, Narita T, Ando K, Yung TMC, Aoki D, Sasano H, Hanada H: Systemic distribution and tissue localizations of human 17beta-hidroksisteroid dehydrogenase type 12. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 2006; 99: 174-181.
- (2) Luu-The V, Tremblay P, Labrie F: Characterization of type 12 17 β -hidroxysteroid dehydrogenase, an isoform of type 3 17 β -hidroxysteroid dehydrogenase responsible for estradiol formation in women. *Molecular Endocrinology* 2006; 20 (2): 437-433.
- (3) Porier D: New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgenes. *Drug Discovery Research* 2008; 69: 304-318.
- (4) Moon YA, Horton JD: Identification of two mammalian reductases involved in the two-carbon fatty acyl elongation cascade. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 276 (9); 7335-7343.
- (5) Lednicer D: Strategies for organic synthesis, prva izdaja, John Wiley & Sons, New York, 1998: 14-16, 18-20, 250-252, 338 in 441-442.
- (6) Tišler M: Organska kemija, tretja izdaja, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991: 72, 198-204 in 228-230.
- (7) Sato N, Saito N: Studies on pyrazines. 17. An efficient synthesis of pteridine-6-carboxylic acids. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 1988; 25 (6): 1737-1740.
- (8) Zhu Y, Zou X, Hu F, Yao C, Liu B, Yang H: Synthesis and herbicidal evaluation of novel 3-[(α -hydroxy-substituted)benzylidene]pyrrolidine-2,4-diones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53 (24): 9566-9570.
- (9) Haruna N, Acosta DE, Nakagawa S, Yamaguchi K, Tai A, Okuyama T, Sugimura T: Asymmetric hydrogenation of furan-containing ketones over tartaric acid-modified raney nickel catalyst. *Heterocycles* 2004; 62 (1): 375-386.
- (10) Anderson GW, Halverstadt IF, Miller WH, Roblin RO: Studies in chemotherapy. X. Antithyroid compounds. Synthesis of 5- and 6- substituted 2-thiouracils from β -oxoesters and thiourea. *Journal of the American Chemical Society* 1945; 67 (12): 2197–2200.
- (11) Lehmann F, Holm M, Laufer S : Three-component combinatorial synthesis of novel dihydropyrano[2,3-*c*]pyrazoles. *Journal of Combinatorial Chemistry* 2008; 10 (3): 364-367.
- (12) Riegel B, Lilienfeld WM: The synthesis of β -keto esters by the decomposition of acylated malonic esters. *Journal of the American Chemical Society* 1945; 67 (8): 1273-1275.

- (13) House HO, DeTar MB, Sieloff RF, VanDerveer D: Enones with strained double bonds. 5. The 2-methylbicyclo[3.3.1]non-1-en-3-one system. *Journal of Organic Chemistry* 1980; 45 (18): 3545-3549.
- (14) Paine JB, Kirshner WB, Moskowitz DW, Dolphin D: An improved synthesis of octaethylporphyrin. *Journal of Organic Chemistry* 1976; 41 (24): 3857-3860.
- (15) Schweizer EE, Lee KJ: Reactions of phosphorus compounds. 40. Alkylation and acylation reactions of triphenylphosphonium 2-[(2-oxo-1,2-diphenylethylidene)hydrazono] propylide. Examination of the anomalous pyridazine and pyrazole products from the benzoylation reaction. *Journal of Organic Chemistry* 1982; 47 (14), 2768-2773.
- (16) Thorp L, Brunskill ER: *o*-And *p*-chlorobenzoylacetate esters and some of their derivatives. *Journal of the American Chemical Society* 1915; 37 (5): 1258-1264.
- (17) Meyer WL, Brannon MJ, Burgos CG, Goodwin TE, Howard RW: Annulation of α -formyl α,β -unsaturated ketones by a Michael addition-cyclization sequence. A versatile synthesis of alicyclic six-membered rings. *Journal of Organic Chemistry* 1985; 50 (4): 438-447.
- (18) Langley Searles A, Ressler D: Alkylation and cyclization of benzoylacetanilides. *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80 (14): 3656-3663.
- (19) Morgan TK, Lis R, Marisca AJ, Argentieri TM, Sullivan ME, Wong SS: Synthesis and cardiac electrophysiological activity of 2- and 3-[(substituted phenyl)alkyl]quinuclidines. Structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 1987; 30 (12): 2259-2269.
- (20) Messali M, Christiaens LE, Alshahateet SF, Kooli F: Synthesis of 4*H*-benzo[*e*]-1,2-selanazin-4-one derivatives: a new heterocyclic ring system. *Tetrahedron Letters* 2007; 48 (42): 7448-7451.
- (21) Zhu Y, Zou X, Hu F, Yao C, Liu B, Yang H: Synthesis and herbicidal evaluation of novel 3-[(α -hydroxy-substituted)benzylidene]pyrrolidine-2,4-diones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53 (24): 9566-9570.
- (22) Wang S, Yan J, Wang X, Yang Z, Lin F, Zhang T: Synthesis and evaluation of the α -glucosidase inhibitory activity of 3-[4-(phenylsulfonamido)benzoyl]-2*H*-1-benzopyran-2-one derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 45 (3): 1250-1255.
- (23) Lee LF, Schleppnik FM, Howe RK: Syntheses and reactions of 2-halo-5-thiazolecarboxylates. *Journal of Heterocyclic Chemistry* 1985; 22: 1621-1630.

- (24) Mitz MA, Axelrod AE, Hofmann K: The synthesis of higher aliphatic β -keto acids. *Journal of the American Chemical Society* 1950; 72: 1231-1232.
- (25) Çelik H: Synthesis of monoketo and monohydroxy eicosanoic acids and esters with substituents at odd-numbered (3-13) carbons. *Jourbal of the Serbian Chemical Society* 2002; 67 (7): 473-480.
- (26) Yuasa Y, Tsuruta H: Facile synthesis of β -keto esters from methyl acetoacetate and acid chloride: The barium oxide/methanol system. *Organic Proces Research & Development* 1998; 2 (6): 412–414.
- (27) Holmquist CR, Roskamp EJ: A selective method for the direct conversion of aldehydes into β -keto esters with ethyl diazoacetate catalyzed by tin(II) chloride. *Journal of Organic Chemistry* 1989; 54 (14): 3258–3260.
- (28) Benetti S, Romagnoli R, De Risi C, Spalluto G, Zanirato V: Mastering β -keto esters. *Chemical Reviews* 1995; 95 (4); 1065–1114.
- (29) Clayden J, Greeves N, Warren S, Wothers P: *Organic Chemistry*, prva izdaja, Oxford University Press, 2001.
- (30) Greene TW, Wuts PGM: *Protective groups in organic synthesis*, tretja izdaja, John Wiley & Sons, New York, 1999: 297-367.
- (31) Shumway WW, Dalley NK, Birney DM: Reinvestigation of the reactions of camphorketene: Structural evidence for pseudopericyclic pathways. *Journal of Organic Chemistry* 2001; 66 (17): 5832- 5839.
- (32) Tsai MS, Rao UR, Hsueh PY, Yeh MCP: Completely diastereoselective tricarbonyliron complexation reactions of chiral dienes. *Organometallics* 2001; 20 (2): 289-259.
- (33) McCoy CP, Morrow RJ, Edwards CR, Jones DS, Gorman SP: Neighboring group-controlled hydrolysis: Towards »designer« drug release biomaterials. *Bioconjugate Chemistry* 2007; 18: 209-215.
- (34) Kurosawa T, Fujiwara M, Nakano H, Sato M, Yoshimura T, Murai T: Synthesis of coenzyme A esters of $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -trihydroxy- and $3\alpha, 7\alpha$ -dihydroxy-24-oxo- 5β -cholestane-24-oic acids for the study of β -oxidation in bile acid biosynthesis. *Steroids* 2001; 66: 499-504.
- (35) He X, Alian A, Stroud R, Ortiz de Montellano PR: Pyrrolidine carboxamides as a novel class of inhibitors of enoyl acyl carrier protein reductase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49 (21): 6308-6323.

- (36) Levoine N, Chrétien F, Lapicque F, Chapleur Y: Synthesis and biological Testing of acyl-CoA-ketoprofen conjugates as selective irreversible inhibitors of COX-2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2002; 10 (3): 753-757.
- (37) Wong BJ, Gerlt JA: Evolution of function in the crotonase superfamily: (3*S*)-Methylglutaconyl-CoA hydratase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 2004; 43 (16): 4646-4654.
- (38) Liu X, Deng G, Chu X, Li N, Wu L, Li D: Formation of an enolat is required for the reaction catalyzed by 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007; 17: 3187-3190.
- (39) Dakoji S., Li D, Agnihotri G, Zhou H, Liu H: Studies on the inactivation of bovine liver enoyl-CoA hydratase by (methylenecyclopropyl)formyl-CoA: Elucidation of the inactivation mechanism and identification of cysteine-114 as the entrapped nucleophile. *Journal of the American Chemical Society* 2001; 123 (40): 9749-9759.
- (40) Lai MT, Liu LD, Liu HW: Mechanistic study on the inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase by a metabolite of hypoglycin A. *Journal of the American Chemical Society* 1991, 113 (19), 7388-7397.
- (41) Lai MT, Li D, Oh E, Liu HW: Inactivation of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by a metabolite of hypoglycin: characterization of the major turnover product and evidence suggesting an alternative flavin modification pathway. *Journal of the American Chemical Society* 1993; 115 (5): 1619–1628.
- (42) Jia Y, Wodzinska J, Park C, Sinskey AJ, Stubbe J: Mechanistic studies on class polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: Class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. *Biochemistry* 2001, 40 (4): 1011–1019.
- (43) Lucet-Levannier K, Lelouch JP, Mioskowski CJ: Polysilylated coenzyme A for high-yielding preparation of very lipophilic acyl coenzymes A in anhydrous organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 1995; 117: 7546-7547.
- (44) Al-Arif A, Blecher M: Synthesis of fatty acyl CoA and other thiol esters using N-hydroxysuccinimide esters of fatty acids. *Journal of Lipid Research* 1969; 10: 344-345.
- (45) Baldwin JE, Widdison WC: α - and β -deuterium kinetic isotope effects on the inactivation of the general acyl-coenzyme A dehydrogenase from pig kidney by (2-methylenecyclopropane)acetyl-CoA. *Journal of the American Chemical Society* 1992; 114 (6): 2245-2251.

- (46) Sakuda S, Higashi A, Tanaka S, Nihara T, Yamada Y: Biosynthesis of virginiae butanolide A, a butyrolactone autoregulator from Streptomyces. *Journal of the American Chemical Society* 1992; 114 (2): 663-668.
- (47) Kershaw NJ, Mukherij M, MacKinnon CH, Claridge TDW, Odell B, Wierzbicki AS, Lloyd MD, Schofield CJ: Studies on phytanoyl-CoA 2-hydroxylase and synthesis of phytanoyl-coenzyme A. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11: 2545-2548.
- (48) Carnell AJ, Hale I, Denis S, Wanders RJA, Isaacs WB, Wilson BA, Ferdinandusse S: Design, synthesis, and in vitro testing of α -methylacyl-CoA racemase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 50 (11): 2700-2707.
- (49) Foulon V, Asselberghs S, Geens W, Mannaerts GP, Casteels M, Van Veldhoven PP: Further studies on the substrate spectrum of phytanoyl-CoA hydroxylase: Implications for Refsum disease? *Journal of Lipid Research* 2003; 44: 2349-2355.
- (50) Movassagh B, Balalaie S, Shaygan P: A new and efficient protocol for preparation of thiol esters from carboxylic acids and thiols in the presence of 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate (TBTU). *Arkivoc* 2007; 13: 47-52.
- (51) Smith M, March J: *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*, peta izdaja, John Wiley & Sons, New York, 2001: 1543-1544.
- (52) Buyske DA, Handschumacher RE, Schilling ED, Strong FM: The stability of coenzyme A. *Journal of the American Chemical Society* 1954; 76 (13): 3575–3577.
- (53) Sagar V, Zheng W, Thompson PR, Cole PA: Bisubstrate analogue structure-activity relationships for p300 histone acetyltransferase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004; 12 (12): 3383-3390.
- (54) Levert KL, Waldrop GL: A bisubstrate analog inhibitor of carboxytransferase component of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 291 (5): 1213-1217.
- (55) Colman TM, Li N, Huang F: A simple and efficient method to prepare thioesters in aqueous solutions. *Tetrahedron Letters* 2005; 46 (25): 4307-4310.
- (56) Fraga H, Esteves da Silva JCG, Fontas R: Chemical synthesis and firefly luciferase produced dehydroluciferyl-coenzyme A. *Tetrahedron Letters* 2004; 45 (10): 2117-2120.
- (57) Cebrat M, Kim CM, Thompson PR, Daugherty M, Cole PA: Synthesis and analysis of potential prodrugs of coenzyme A analogues for the inhibition of the histone acetyltransferase p300. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2003; 11 (15): 3307-3313.

- (58) Gao F, Yan X, Shakya T, Baettig OM, Ait-Mohand-Brunet S, Berghuis AM: Synthesis and structure-activity relationships of truncated bisubstrate inhibitors of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferases. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49 (17): 5273-5281.
- (59) Watmough NJ, Turnbull DM, Sherratt HSA, Bartlett K: Measurement of the acyl-CoA intermediates of beta-oxidation by h.p.l.c. with on-line radiochemical and photodiode-array detection. Application to the study of [U-¹⁴C]hexadecanoate oxidation by intact rat liver mitochondria. *Biochemical Journal* 1989; 262: 261-269.
- (60) Antonenkov VD, Van Veldhoven PP, Waelkens E, Mannaerts GP: Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. Sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase is involved in the metabolism of 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 26023-26031.
- (61) Ouyang T, Walt DR: A new chemical method for synthesizing and recycling acyl coenzyme A thioesters. *Journal of Organic Chemistry* 1991; 56 (11): 3752-3755.

PRILOGA

1. Primerjava hitrosti reakcije odščite pri različnih pogojih

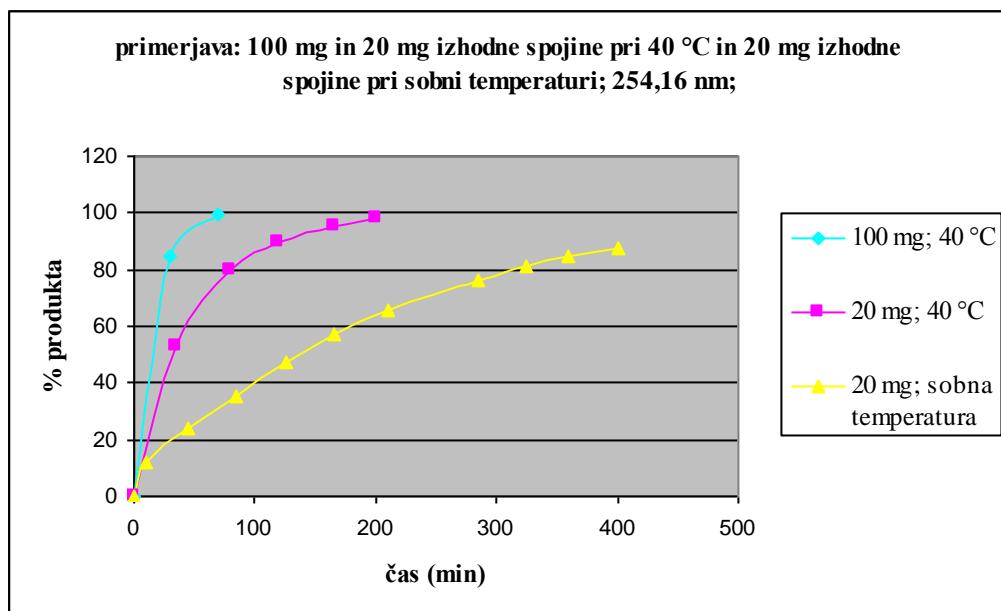
Primerjali smo hitrosti reakcije odščite 20,0 mg surovega tioestra **22** pri sobni temperaturi (pogoji A), 20,0 mg surovega tioestra **22** pri 40 °C (pogoji B) in 100,0 mg surovega tioestra **22** pri 40 °C (pogoji C). V vseh treh primerih smo uporabili 4 M vodno raztopino HCl in THF kot kotoptilo. Vse reakcije smo spremljali s HPLC metodo B. Ker je pri reakciji nastal kromofor (β -keto tioester), smo detekcijo s HPLC izvedli pri 3 različnih valovnih dolžinah (254,16, 210,8 in 280,16 nm). Ker smo uporabili surovi tioester **22**, smo predpostavili, da se bo ta pretvarjal le v tioester **1** (ob času 0 minut je bilo tioestra **22** (v nadaljevanju izhodna spojina) 100 % in tioestra **1** (v nadaljevanju produkt) 0 %).

1.1. 254,16 nm

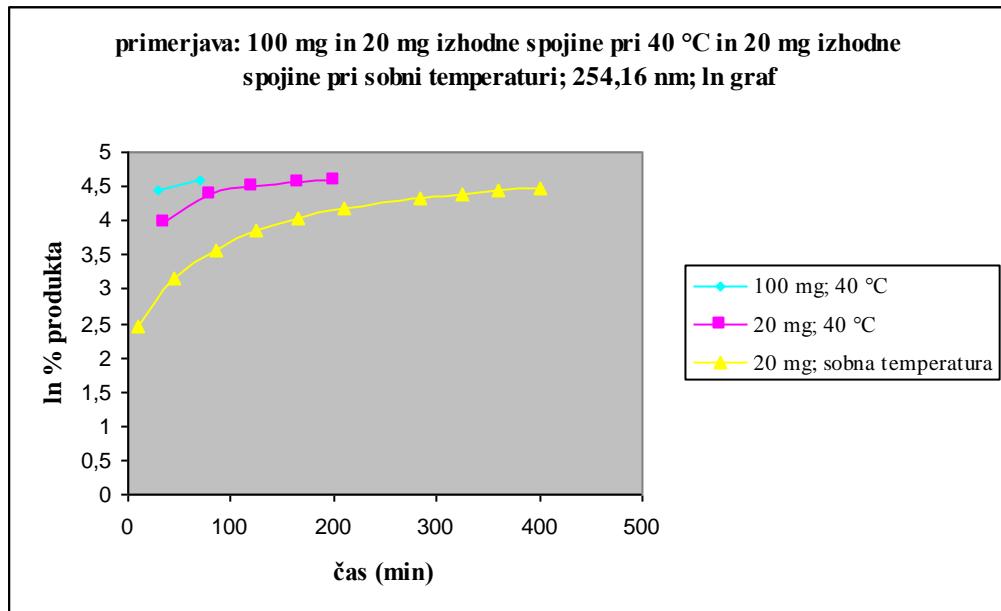
a) Nastajanje produkta

Preglednica 1: Nastajanje produkta (detekcija pri 254,16 nm)

čas (min)	% produkta (pogoji C)	ln % produkta (pogoji C)	čas (min)	% produkta (pogoji B)	ln % produkta (pogoji B)	čas (min)	% produkta (pogoji A)	ln % produkta (pogoji A)
0	0	/	0	0	/	0	0	/
30	84,51	4,436869871	35	53,04	3,971046346	10	11,72	2,461296784
70	99,4	4,58995502	80	79,82	4,3797741	45	23,78	3,168844891
			120	89,84	4,49803031	85	35,35	3,565298392
			165	95,48	4,558916801	125	47,03	3,850785696
			200	98,05	4,585477553	165	56,91	4,041471073
						210	65,75	4,185859671
						285	76,58	4,338335946
						325	81,39	4,399252415
						360	84,59	4,437816056
						400	87,63	4,473123405



Graf 1: Nastajanje produkta (detekcija pri 254,16 nm).

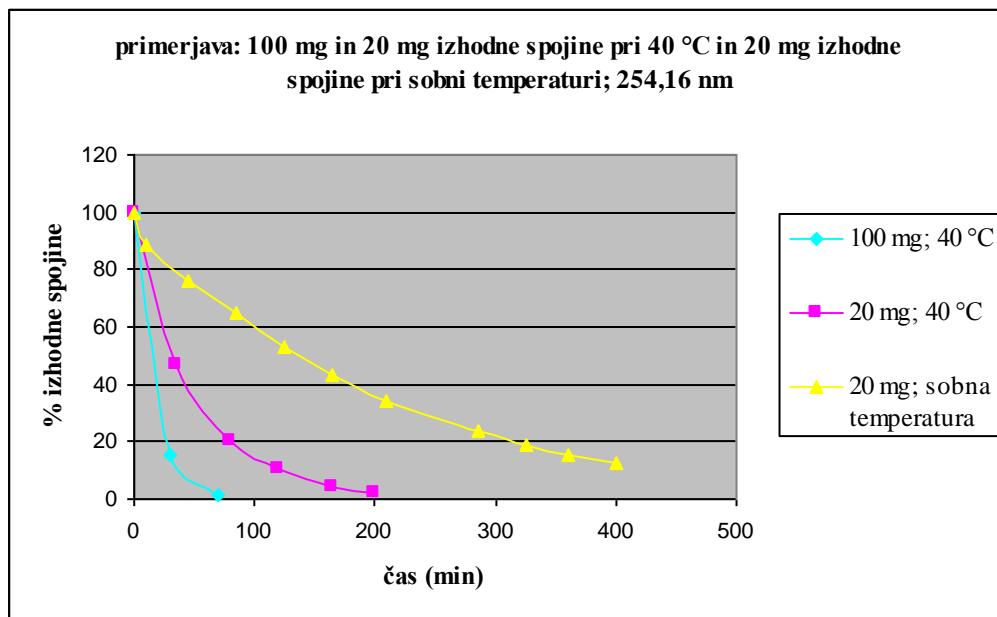


Graf 2: Nastajanje produkta (detekcija pri 254,16 nm); ln graf.

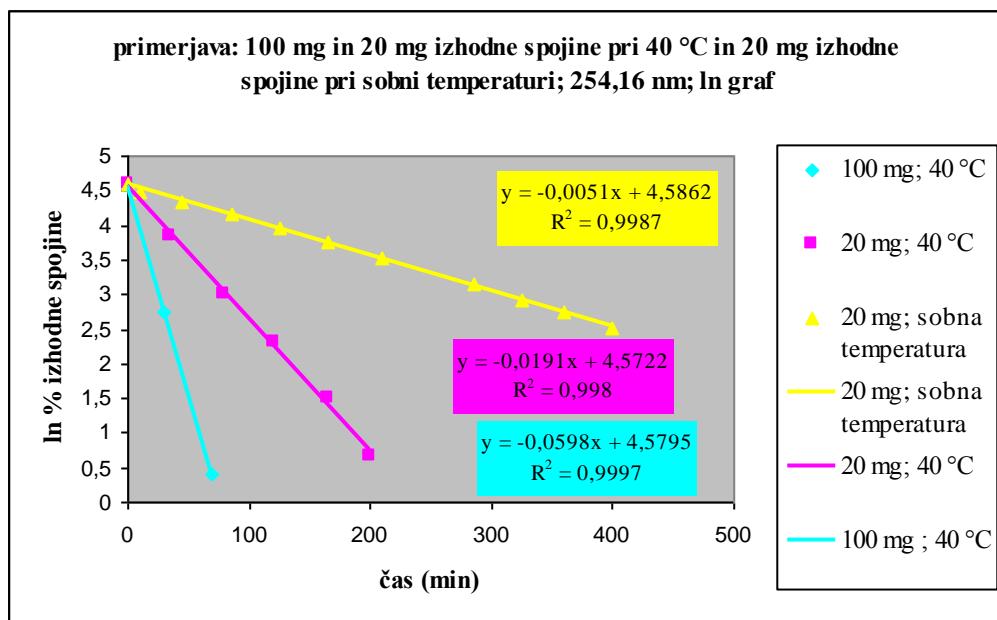
b) Izginjanje izhodne spojine

Preglednica 2: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 254,16 nm).

čas (min)	% izhodne spojine (pogoji C)	ln % izhodne spojine (pogoji C)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji B)	ln % izhodne spojine (pogoji B)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji A)	ln % izhodne spojine (pogoji A)
0	100	4,605170186	0	100	4,605170186	0	100	4,605170186
30	15,49	2,740194654	35	46,96	3,849296176	10	88,28	4,480513581
70	1,51	0,412109651	80	20,18	3,004692015	45	76,22	4,333623895
			120	10,16	2,318458442	85	64,65	4,168988105
			165	4,52	1,508511994	125	52,97	3,969725716
			200	1,95	0,667829373	165	43,09	3,763290952
						210	34,25	3,533686565
						285	23,42	3,153590358
						325	18,61	2,923699071
						360	15,41	2,735016649
						400	12,37	2,515274186



Graf 3: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 254,16 nm).



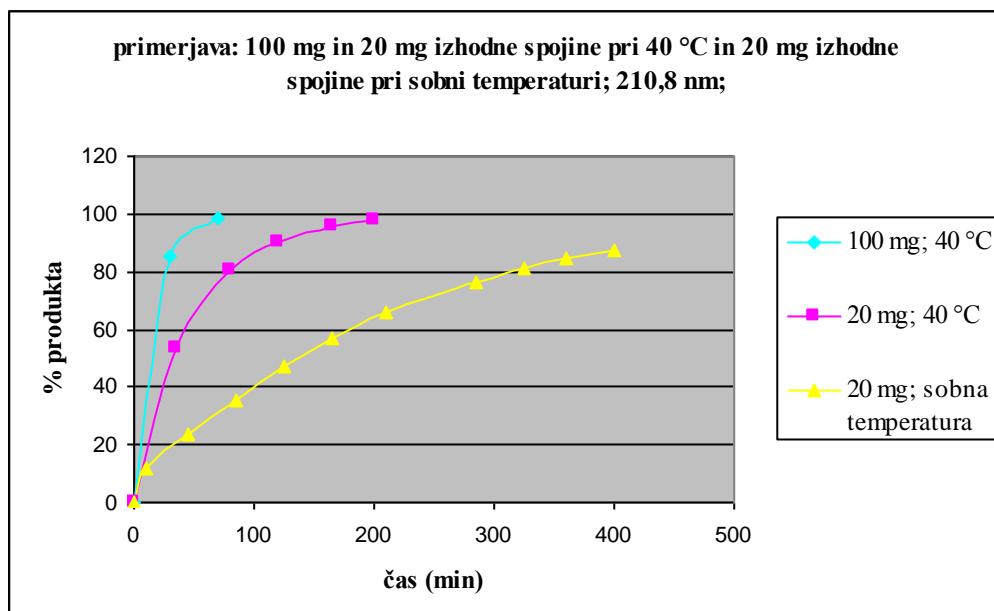
Graf 4: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 254,16 nm); ln graf.

1.2. 210,8 nm

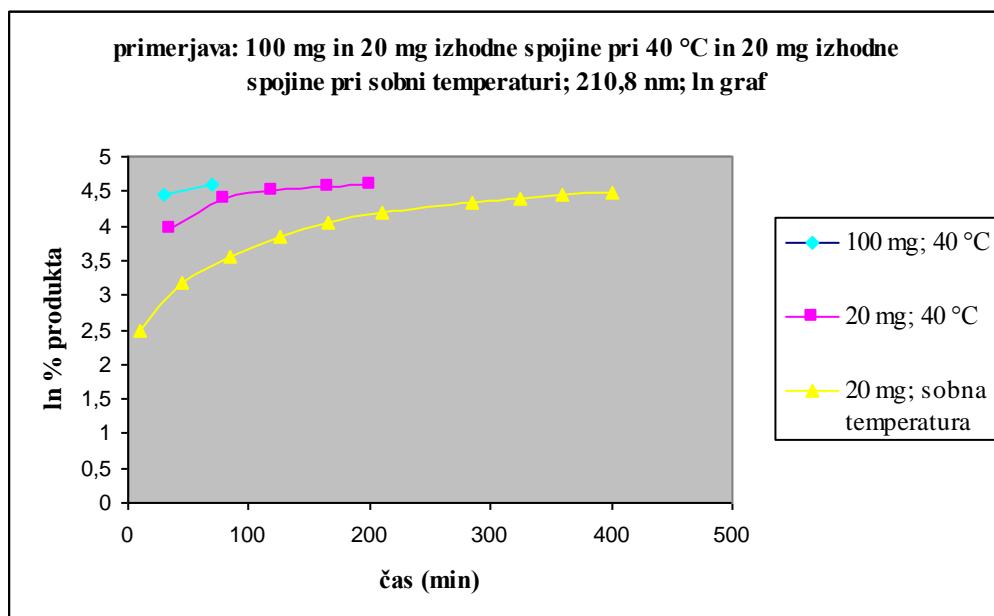
a) Nastajanje produkta

Preglednica 3: Nastajanje produkta (detekcija pri 210,8 nm).

čas (min)	% produkta (pogoji C)	ln % produkta (pogoji C)	čas (min)	% produkta (pogoji B)	ln % produkta (pogoji B)	čas (min)	% produkta (pogoji A)	ln % produkta (pogoji A)
0	0	/	0	0	/	0	0	/
30	85,2	4,445001434	35	53,08	3,971800209	10	12,08	2,491551193
70	98,8	4,593097605	80	80,66	4,390242789	45	23,89	3,173459961
			120	90,26	4,502694394	85	35,14	3,559340083
			165	95,81	4,562367064	125	46,94	3,84887019
			200	97,77	4,582617782	165	56,72	4,038126882
						210	65,67	4,1846422
						285	76,62	4,338858139
						325	81,48	4,400357591
						360	84,62	4,438170645
						400	87,59	4,472666836



Graf 5: Nastajanje produkta (detekcija pri 210,8 nm).

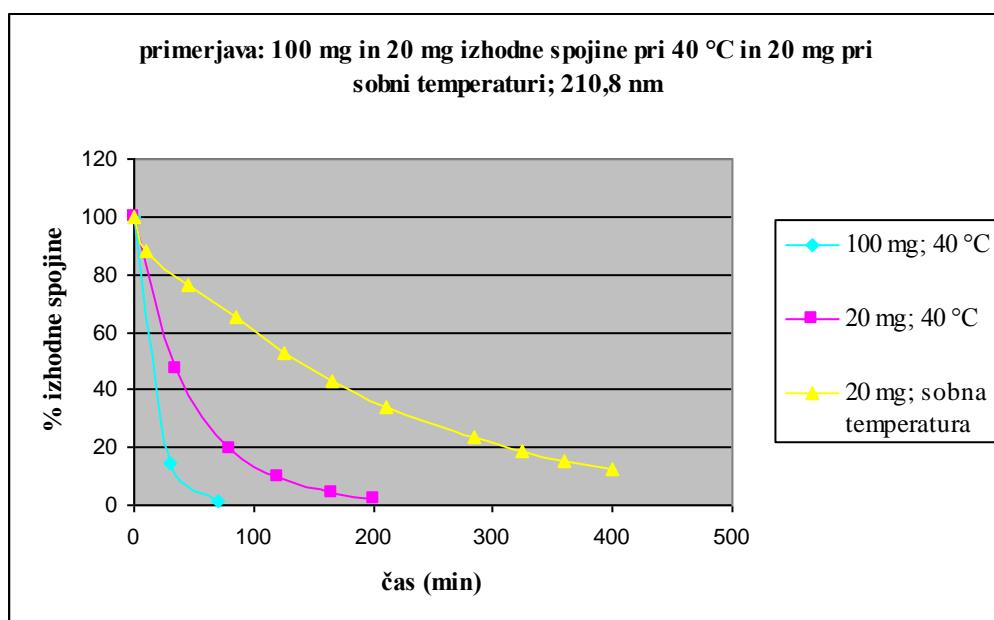


Graf 6: Nastajanje produkta (detekcija pri 210,8 nm); ln graf.

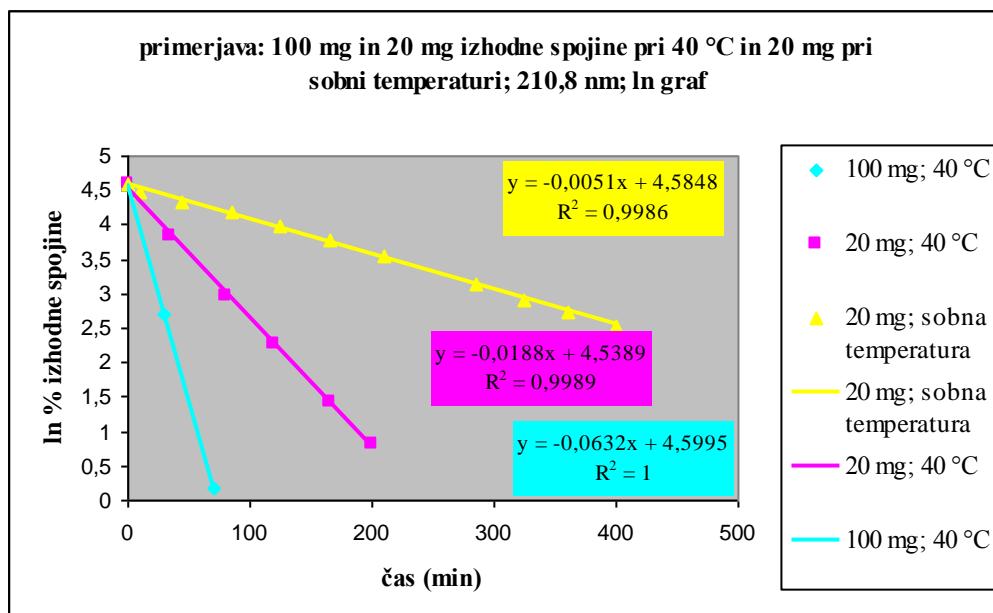
b) Izginjanje izhodne spojine

Preglednica 4: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 210,8 nm).

čas (min)	% izhodne spojine (pogoji C)	ln % izhodne spojine (pogoji C)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji B)	ln % izhodne spojine (pogoji B)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji A)	ln % izhodne spojine (pogoji A)
0	100	4,605170186	0	100	4,605170186	0	100	4,605170186
30	14,8	2,694627181	35	46,92	3,848444024	10	87,92	4,47642731
70	1,2	0,182321557	80	19,34	2,96217549	45	76,11	4,332179662
			120	9,79	2,281361457	85	64,86	4,172231101
			165	4,19	1,432700734	125	53,06	3,971423349
			200	2,23	0,802001585	165	43,28	3,767690635
						210	34,33	3,536019607
						285	23,38	3,151880956
						325	18,52	2,918851229
						360	15,37	2,732417558
						400	12,59	2,532902848



Graf 7: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 210,8 nm).



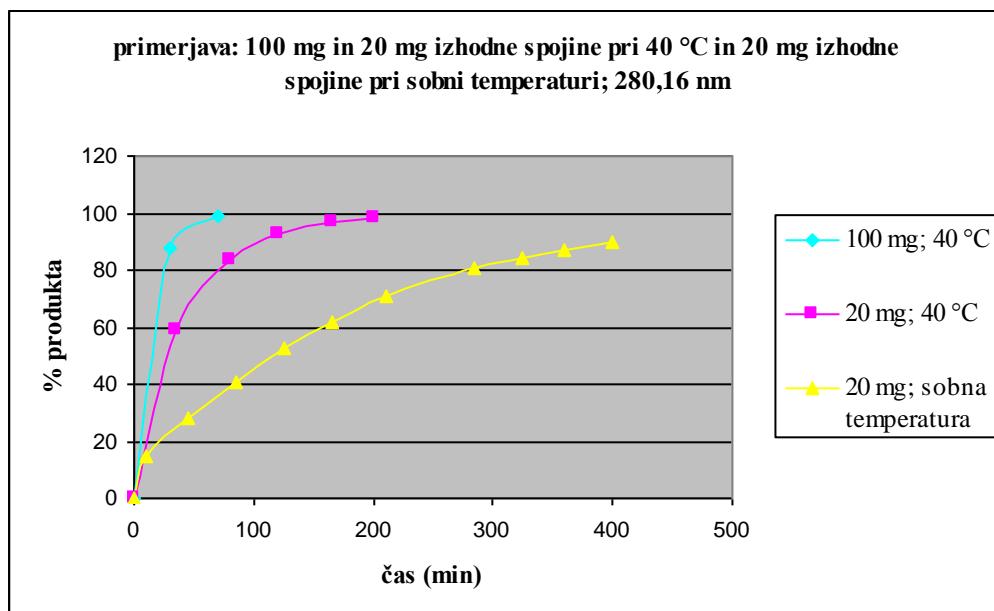
Graf 8: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 210,8 nm); ln graf.

1.3. 280,16 nm

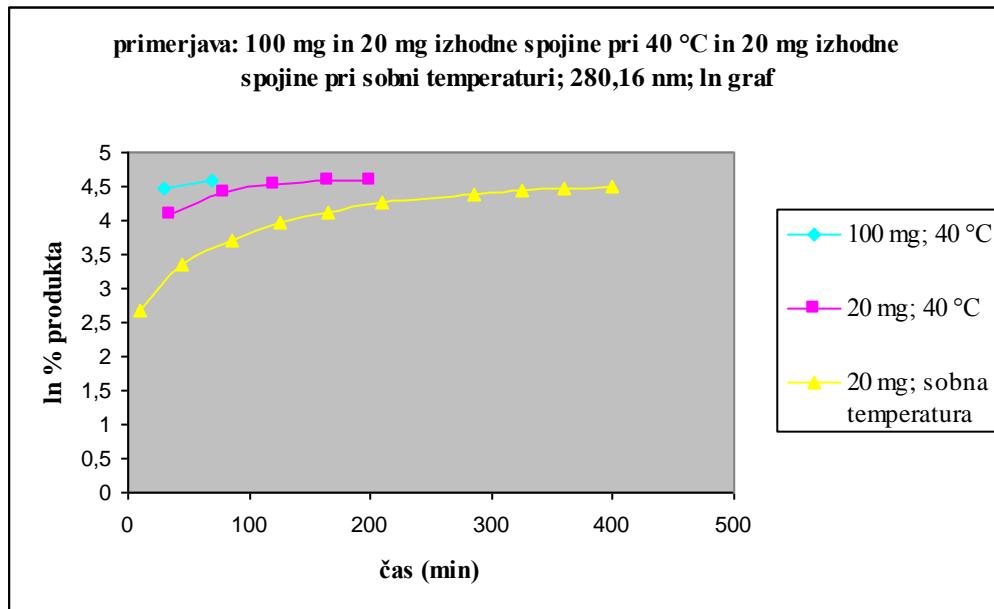
a) Nastajanje produkta

Preglednica 5: Nastajanje produkta (detekcija pri 280,16 nm).

čas (min)	% produkta (pogoji C)	ln % produkta (pogoji C)	čas (min)	% produkta (pogoji B)	ln % produkta (pogoji B)	čas (min)	% produkta (pogoji A)	ln % produkta (pogoji A)
0	0	/	0	0	/	0	/	0
30	87,62	4,473009282	35	59,11	4,079400115	10	2,681021529	14,6
70	98,81	4,593198814	80	83,32	4,422688616	45	3,343215099	28,31
			120	92,34	4,525477417	85	3,706228092	40,7
			165	96,97	4,574401652	125	3,963096276	52,62
			200	98,49	4,58995502	165	4,126166175	61,94
						210	4,256321678	70,55
						285	4,387884444	80,47
						325	4,437461342	84,56
						360	4,469808548	87,34
						400	4,495466921	89,61



Graf 9: Nastajanje produkta (detekcija pri 280,16 nm).

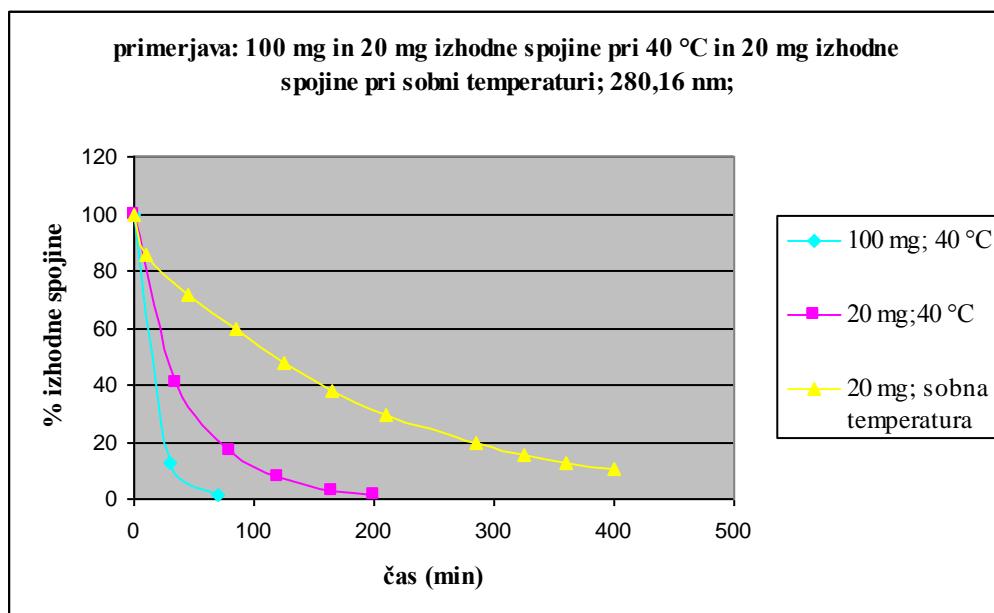


Graf 10: Nastajanje produkta (detekcija pri 280,16 nm); ln graf.

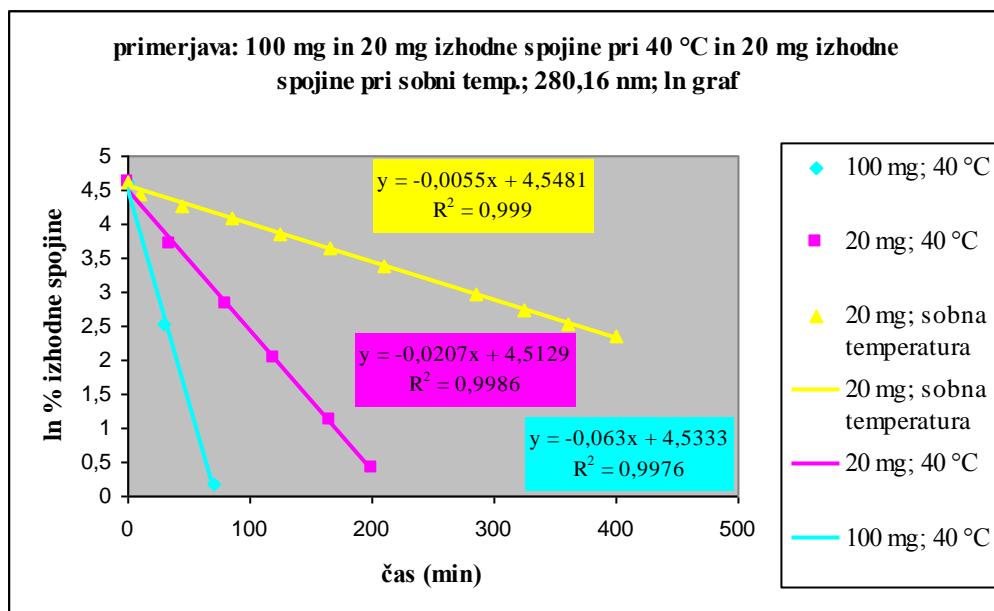
b) Izginjanje izhodne spojine

Preglednica 6: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 280,16 nm).

čas (min)	% izhodne spojine (pogoji C)	ln % izhodne spojine (pogoji C)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji B)	ln % izhodne spojine (pogoji B)	čas (min)	% izhodne spojine (pogoji A)	ln % izhodne spojine (pogoji A)
0	100	4,605170186	0	100	4,605170186	0	100	4,605170186
30	12,38	2,516082267	35	40,89	3,710885534	10	85,4	4,447346101
70	1,19	0,173953307	80	16,68	2,814210397	45	71,69	4,272351268
			120	7,66	2,036011984	85	59,3	4,082609306
			165	3,03	1,10856262	125	47,38	3,858200199
			200	1,51	0,412109651	165	38,06	3,639163862
						210	29,45	3,38269391
						285	19,52	2,971439581
						325	15,44	2,736961545
						360	12,66	2,538447417
						400	10,39	2,340843805



Graf 11: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 280,16 nm).

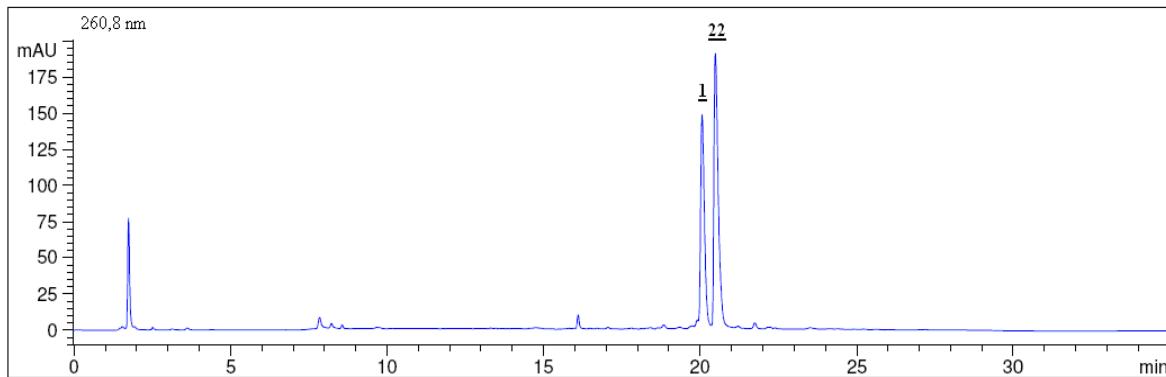


Graf 12: Izginjanje izhodne spojine (detekcija pri 280,16 nm); ln graf.

2. Gradienti mobilnih faz in pripadajoči HPLC kromatogrami

Preglednica 7: Gradient 1.

čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
3	95	5
20	30	70
25	30	70
30	95	5
35	95	5

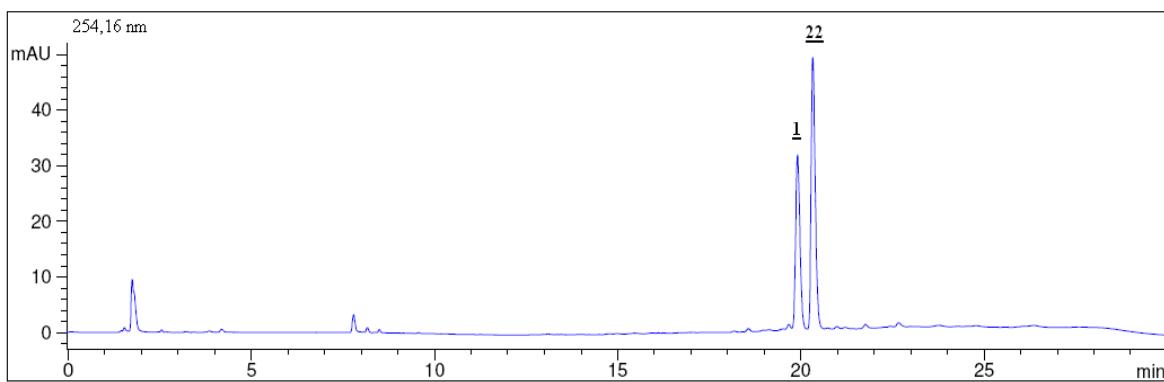


Kromatogram 1: $t_R \underline{1} = 19,91$ min, $t_R \underline{22} = 20,33$ min.

Preglednica 8: Gradient 2.

čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
3	95	5
20	30	70
25	30	70
30	95	5

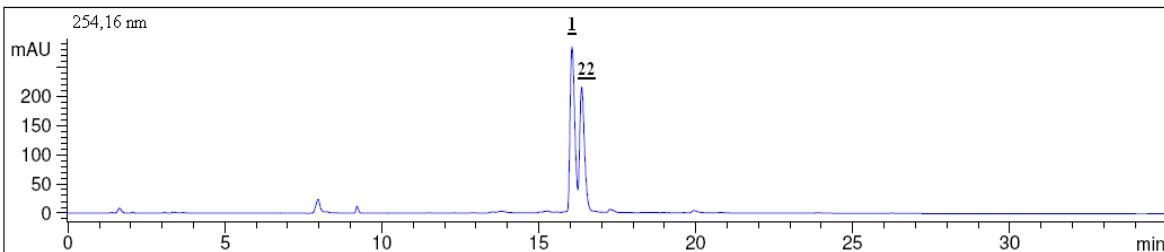
Urban Košak: Sinteza 3-ketopalmitoil koencima A



Kromatogram 2: $t_R \underline{1} = 20,06$ min, $t_R \underline{22} = 20,49$ min.

Preglednica 9: Gradient 3.

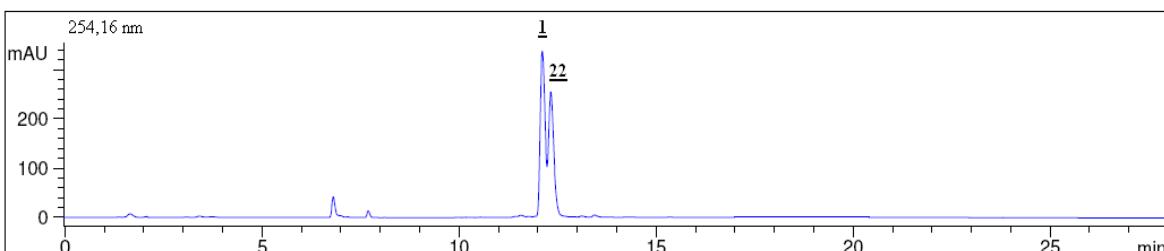
čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
3	95	5
15	30	70
30	30	70
40	95	5



Kromatogram 3: $t_R \underline{1} = 16,06$ min, $t_R \underline{22} = 16,39$ min.

Preglednica 10: Gradient 4.

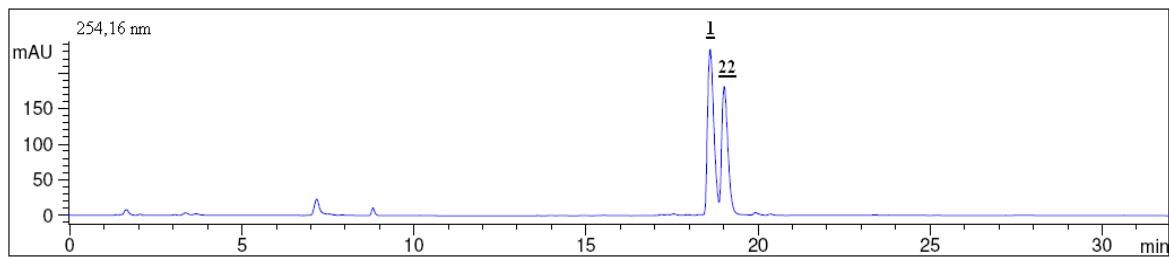
čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
2	95	5
10	30	70
20	30	70
28	95	5



Kromatogram 4: $t_R \underline{1} = 12,12$ min, $t_R \underline{22} = 12,33$ min.

Preglednica 11: Gradient 5.

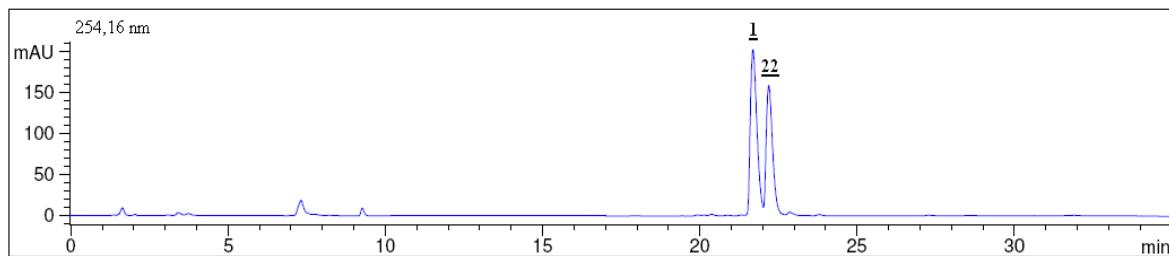
čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
2	95	5
20	30	70
28	30	70
32	95	5



Kromatogram 5: $t_R \underline{1} = 18,61$ min, $t_R \underline{22} = 19,02$ min.

Preglednica 12: Gradient 6.

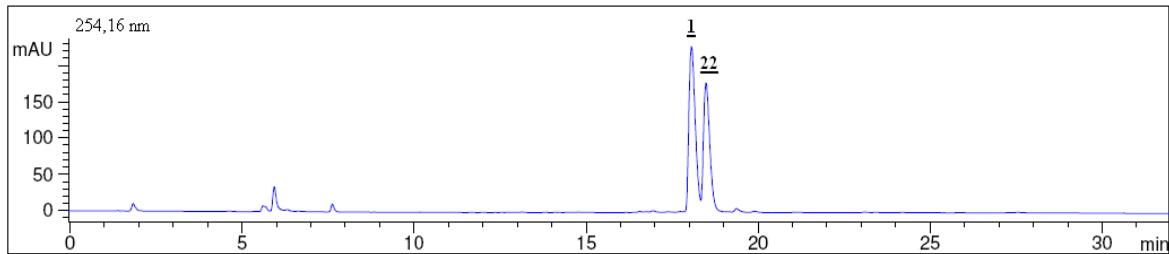
čas (min)	% pufra	% MeCN
0	95	5
2	95	5
25	30	70
30	30	70
35	95	5



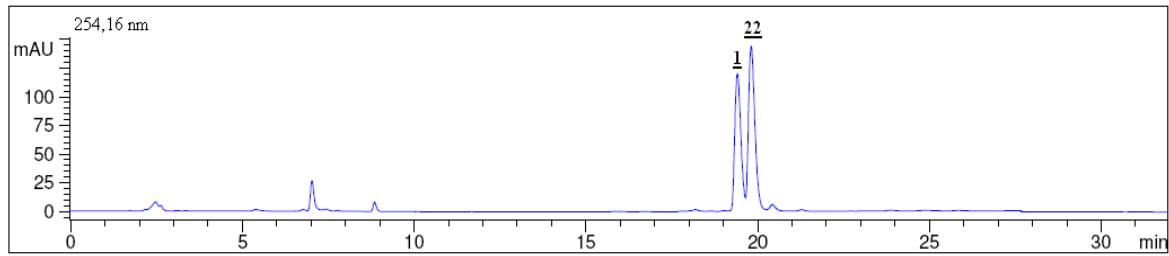
Kromatogram 6: $t_R \underline{1} = 21,69$ min, $t_R \underline{22} = 22,19$ min.

Preglednica 13: Gradient 7

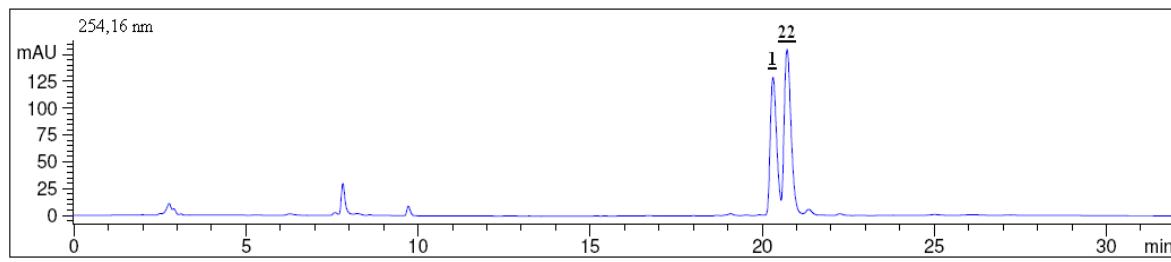
čas (min)	% pufra	% MeCN
0	97	3
20	30	70
25	30	70
32	97	3



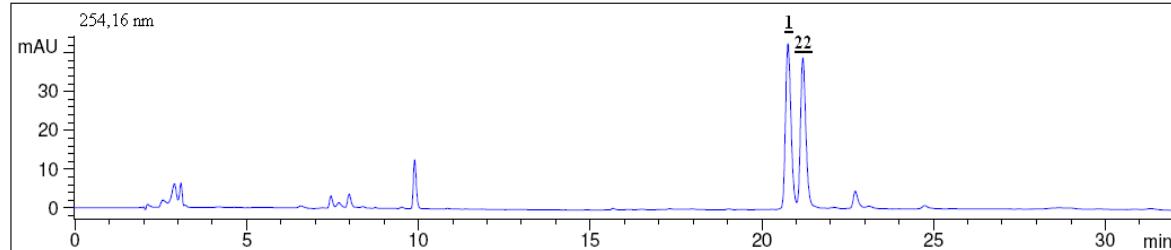
Kromatogram 7: $t_R \underline{1} = 18,07$ min, $t_R \underline{22} = 18,49$ min.



Kromatogram 8: $t_R \underline{1} = 19,41$ min, $t_R \underline{22} = 19,81$ min.



Kromatogram 9: $t_R \underline{\text{1}} = 20,31$ min, $t_R \underline{\text{22}} = 20,72$ min.



Kromatogram 10: $t_R \underline{\text{1}} = 20,76$ min, $t_R \underline{\text{22}} = 21,20$ min.