

Laboratorio di chimica organica III

3 CFU (8 ore per CFU, 24 ore)

Prof. Patrizia Nitti, pnitti@units.it, stanza 339

Tel 040 5583923

- **34** studenti, ogni studente lavorerà singolarmente
- Gruppo **1a** (8 studenti, lab 360) gruppo **1b** (8 studenti, lab 370)
- Gruppo **2a** (9 studenti, lab 360) gruppo **2b** (9 studenti, lab 370)

Orario

Tutti gli studenti giovedì 11/03 2021

14.30-16.00 in Aula o online;

Solo il gruppo **1a** 16.30-18.00 in Laboratorio 360 (preparazione vetreria per Grignard)

Gruppi 1a e 1b (lab 360 e 370)

lunedì 15 marzo, martedì 16 e mercoledì 17 dalle 14 e 30 alle 18 e 30
eventuale recupero e massa giovedì 18 marzo

lunedì 22 marzo, martedì 23 e mercoledì 24 dalle 14 e 30 alle 18 e 30
eventuale recupero e massa giovedì 25 marzo

Orario

Gruppi 2a e 2b (lab 360 e 370)

lunedì 29 marzo, martedì 30 e mercoledì 31 dalle 14 e 30 alle 18 e 30

eventuale recupero e massa giovedì 1 aprile

mercoledì 7 aprile, giovedì 8 e venerdì 9 dalle 14 e 30 alle 18 e 30

eventuale recupero e massa lunedì 12 aprile

Preparazione vetreria reazione di Grignard:

1a giovedì 11 marzo

1b giovedì 18 marzo

2a giovedì 25 marzo

2b giovedì 1 aprile

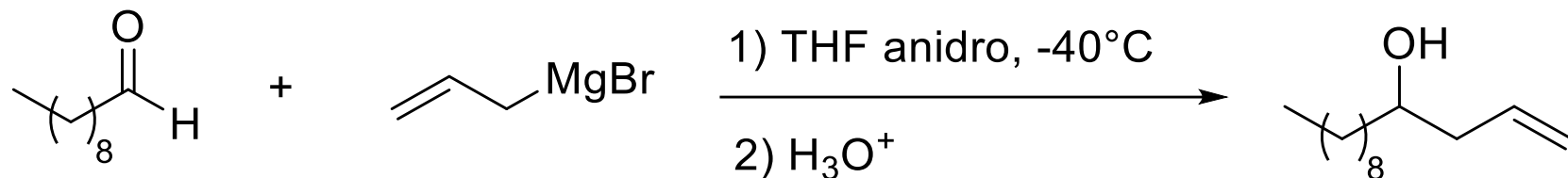
	Gruppo 1a lab 360	Gruppo 1b lab 370
I settimana	Grignard	Dipeptide
II settimana	Dipeptide	Grignard

	Gruppo 2a lab 360	Gruppo 2b lab 370
I settimana	Grignard	Dipeptide
II settimana	Dipeptide	Grignard

ESI-MS dott. Fabio Hollan, analisi dipeptide:

- Giovedì 18/03 14.00-17.00, gruppo **1b**
- Giovedì 25/03 14.00-17.00, gruppo **1a**
- Giovedì 01/04 14.00-17.00, gruppo **2b**
- Lunedì 12/04 , 14.00-17.00, gruppo **2a**

Sintesi del 1-tridecen-4-olo (reazione di Grignard)

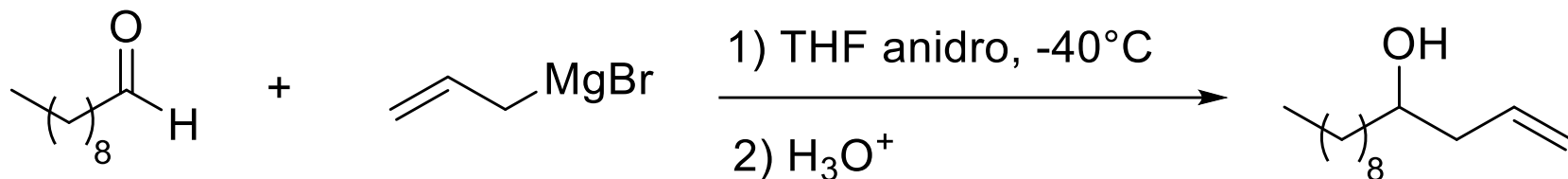


In un pallone a tre colli anidrificato la notte in stufa e successivamente raffreddato sotto flusso di argon si posiziona nel collo centrale l'imbuto gocciolatore dotato di compensatore, mentre nei due colli laterali si posizionano il termometro da freddo e l'entrata del flusso di argon.

video

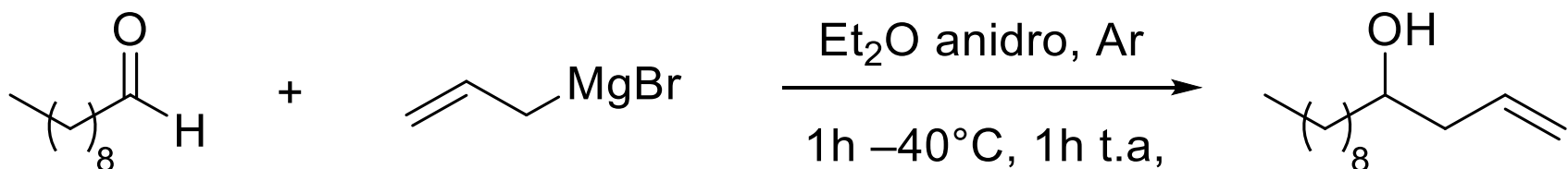
- Preparazione della vetreria
- Mettere tutta la vetreria in stufa a 120°C
- Mettere tutti i raccordi in plastica in essiccatore
- Illustrare la linea di Ar

Sintesi del 1-tridecen-4-olo (reazione di Grignard)



- Viene preparata una soluzione inserendo nel pallone 1 g (1,20 mL, 0,0064 mol) di decanale (PM 156,27 g/mol, d = 0,83 g/mL) e 10 mL di THF anidro dall'imbuto gocciolatore.
- Terminata l'aggiunta di solvente si pone il pallone nel bagno di azoto liquido e acetone. Una volta che la temperatura all'interno del pallone raggiunge i -40°C vengono aggiunti lentamente (1,2 eq, 0,0077 mol, 3,8 mL) di allil magnesio cloruro (soluzione 2M in THF).
- Dopo un'ora la miscela di reazione viene rimossa dal bagno e lasciata per un'altra ora a t.a., sempre sotto agitazione e in atmosfera di Ar.

Sintesi del 1-tridecen-4-olo (reazione di Grignard)



- Al termine della reazione la miscela ottenuta viene lavata con 10-12 ml di HCl 1:4 v/v e la fase acquosa separata viene poi estratta tre volte con etere dietilico. Le fasi organiche riunite sono lavate con NaHCO₃ 5% e poi con acqua.
- La soluzione organica viene anidrificata su Na₂SO₄ anidro

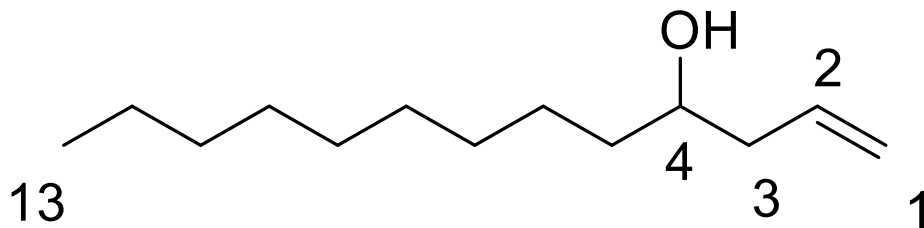
FINE PRIMO GIORNO

Sintesi del 1-tridecen-4-olo (reazione di Grignard)

Il grezzo viene purificato tramite flash-chromatography, utilizzando come fase mobile una miscela di etere di petrolio e acetato di etile 90:10 isocratica. Delle frazioni raccolte viene effettuata una TLC utilizzando come eluente una miscela di etere di petrolio e acetato di etile 80:20. (Indicatore soluzione acida di KMnO_4).

Calcolare la resa della reazione, registrare gli spettri IR, ^1H NMR e ^{13}C NMR del prodotto purificato.

Consegnare il prodotto alla docente



Tridec-1-ene-4-ol. Olio incolore; IR (CHCl₃): 3620, 3480, 3010, 2860, 1641, 1470, 1232, 997 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): δ = 0.87 (3H, t, J = 6.6 Hz), 1.20-1.50 (15H, m), 1.70 (1H, m), 2.21 (2H, m), 3.63 (1H, bs), 5.04-5.20 (2H, m), 5.82 (1H, dddd, J₁ = 14.5 Hz, J₂ = 9.5 Hz, J₃ = 8.0 Hz, J₄ = 6.6 Hz) ppm.

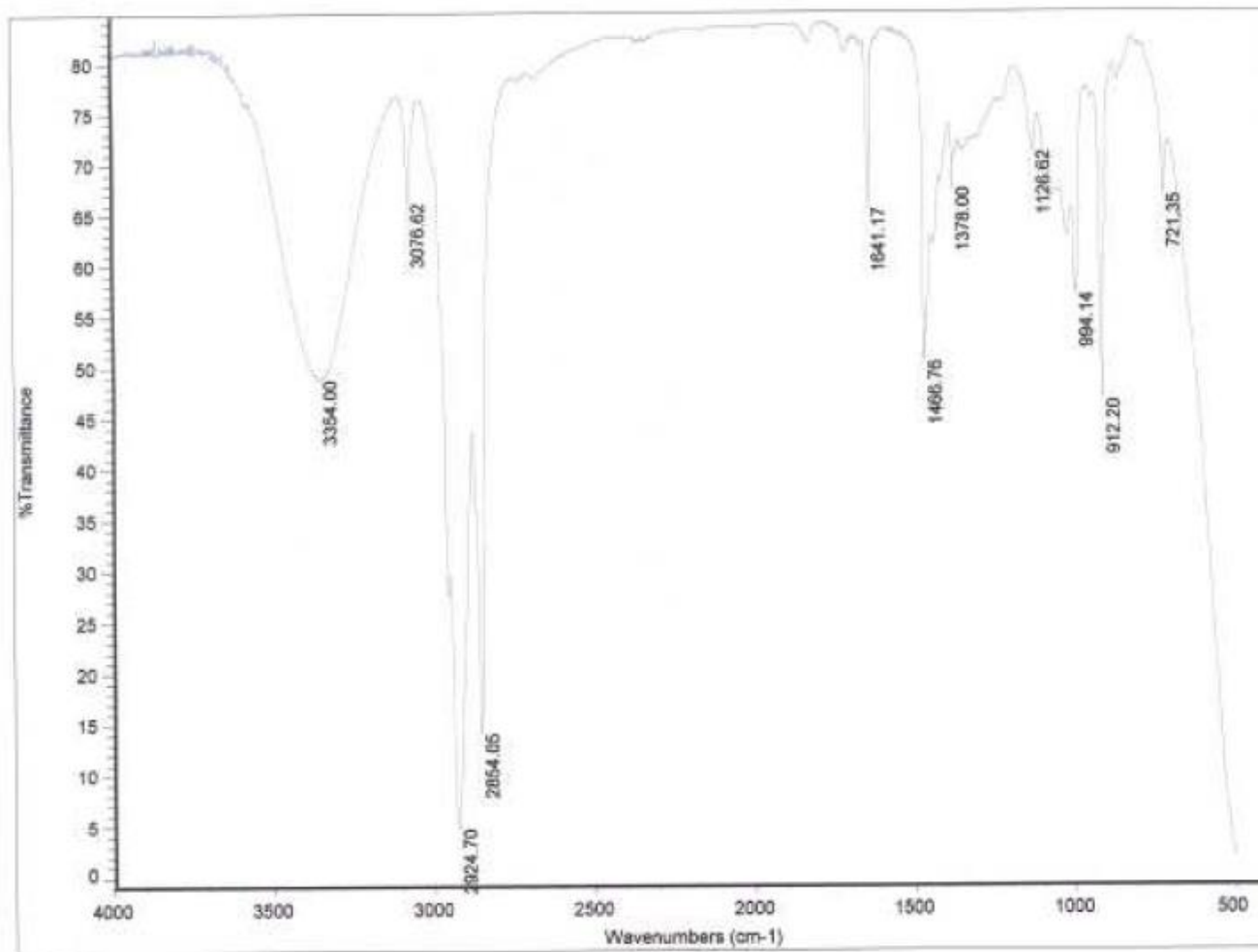
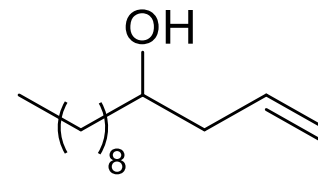
¹³C-NMR (CDCl₃, 50 MHz): δ = 14.1, 22.7, 25.7, 29.3, 29.5, 29.6, 29.7, 31.9, 36.8, 41.9 (C-3), 70.7 (C-4), 117.9 (C-1), 134.9 (C-2) ppm.

Corso blended

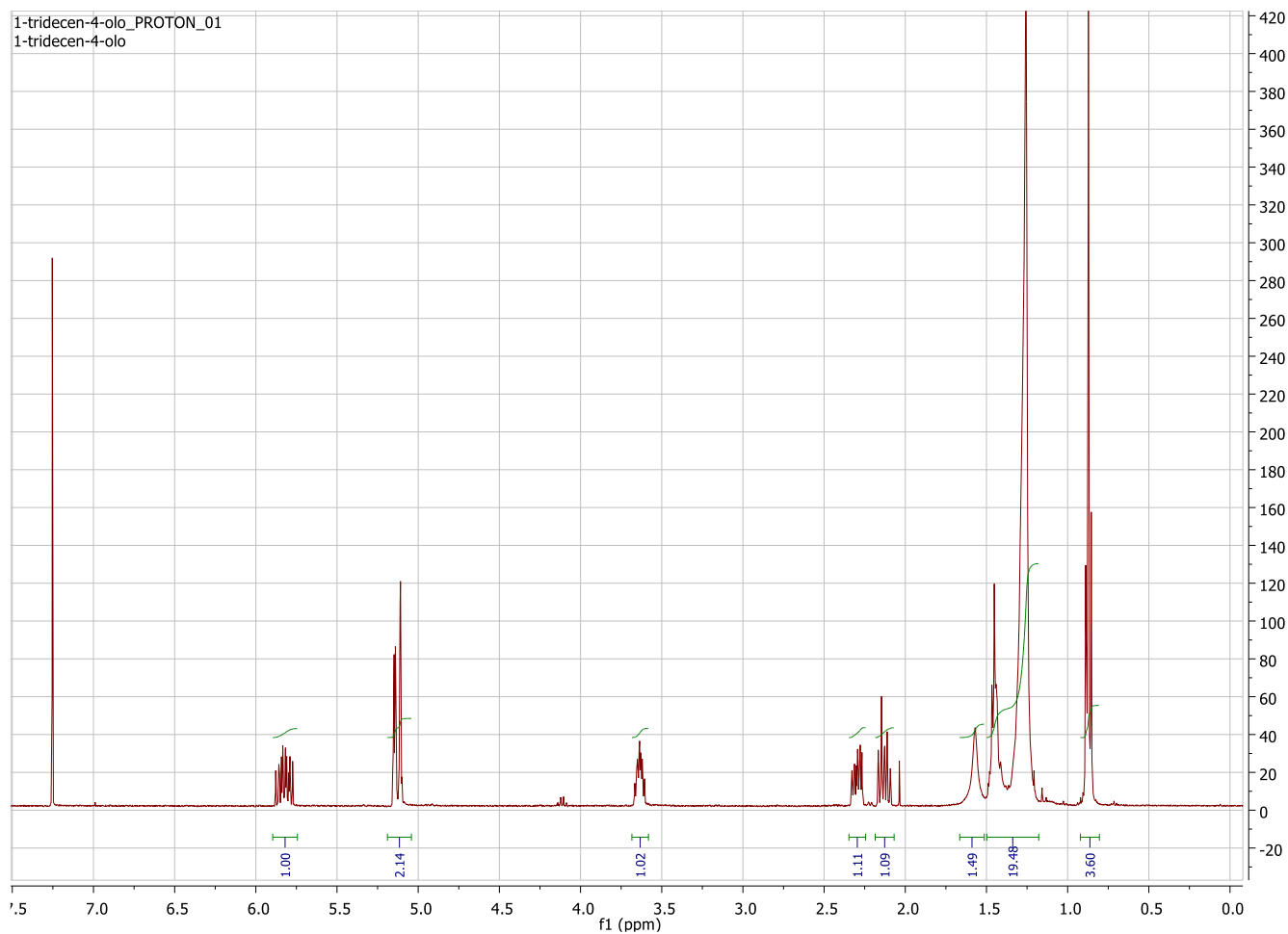
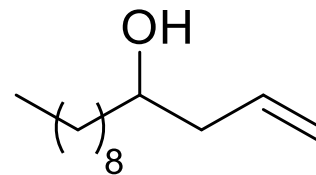
1 CFU = 25 ore di lavoro totale di cui 8 in laboratorio, 1 ora attività iterattiva, 5 ore di studio con materiale ITC (Information Communication Technology) + 11 ore di studio tradizionale

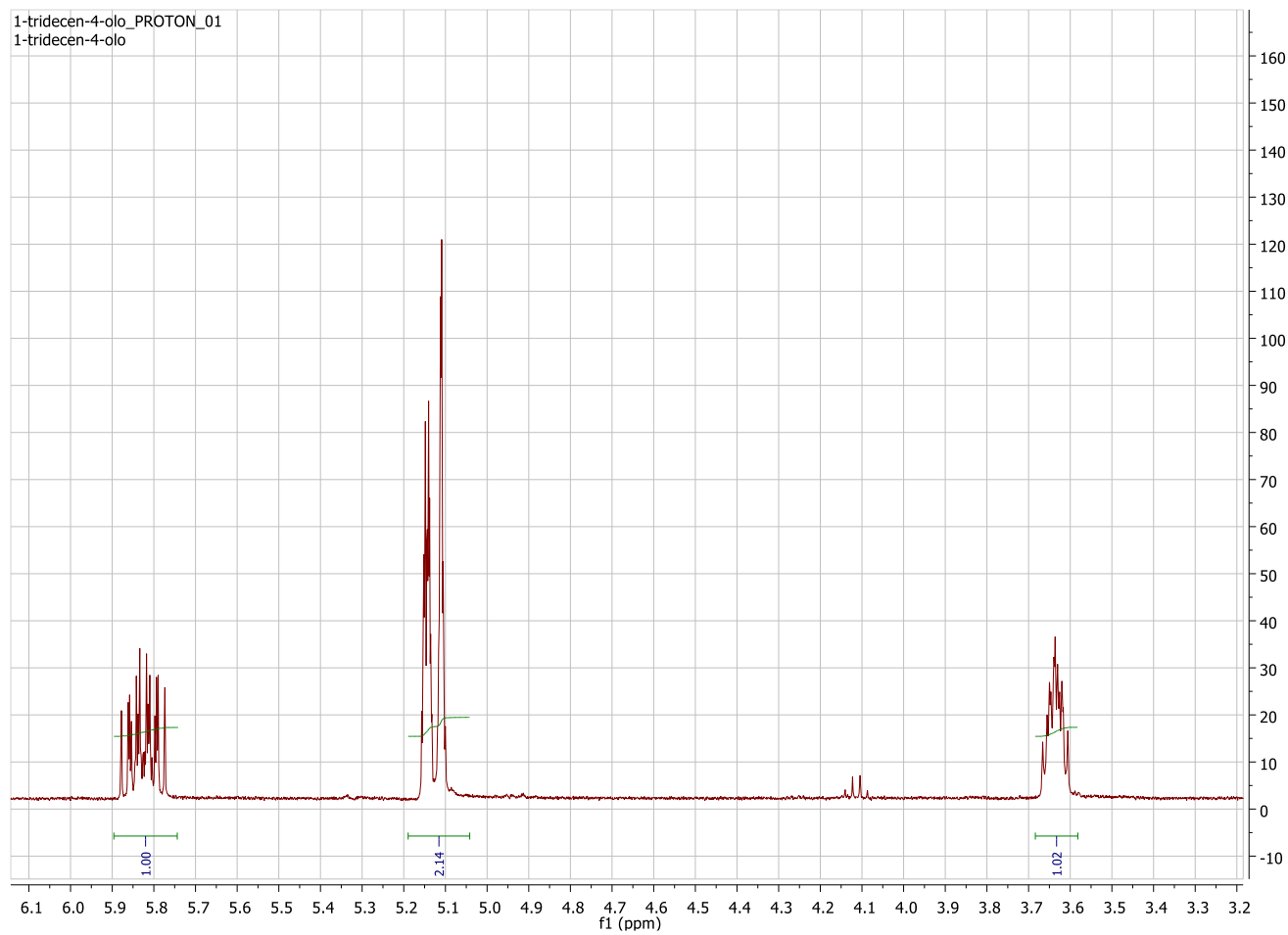
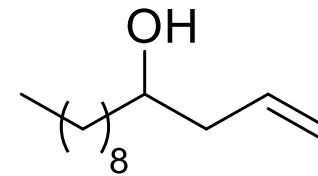
- Moodle 2 **Reazione di Grignard**
- File di ripasso sulla teoria della reazione
- Video in spagnolo (linea di gas inerte)
- Video sulla preparazione della vetreria (richiedere l'accesso)
- Video «Schlenk Lines Transfer of Solvents»
- Video «Preparing Anhydrous Reagents and Equipment»
- Video «Conducting Reactions Below Room Temperature»
- Commento sul materiale (feedback)
- Schede di sicurezza e **domande entro il 18 aprile 2021**
- Quiz sulla reazione di Grignard
- Relazione di laboratorio da consegnare entro il primo aprile 2022

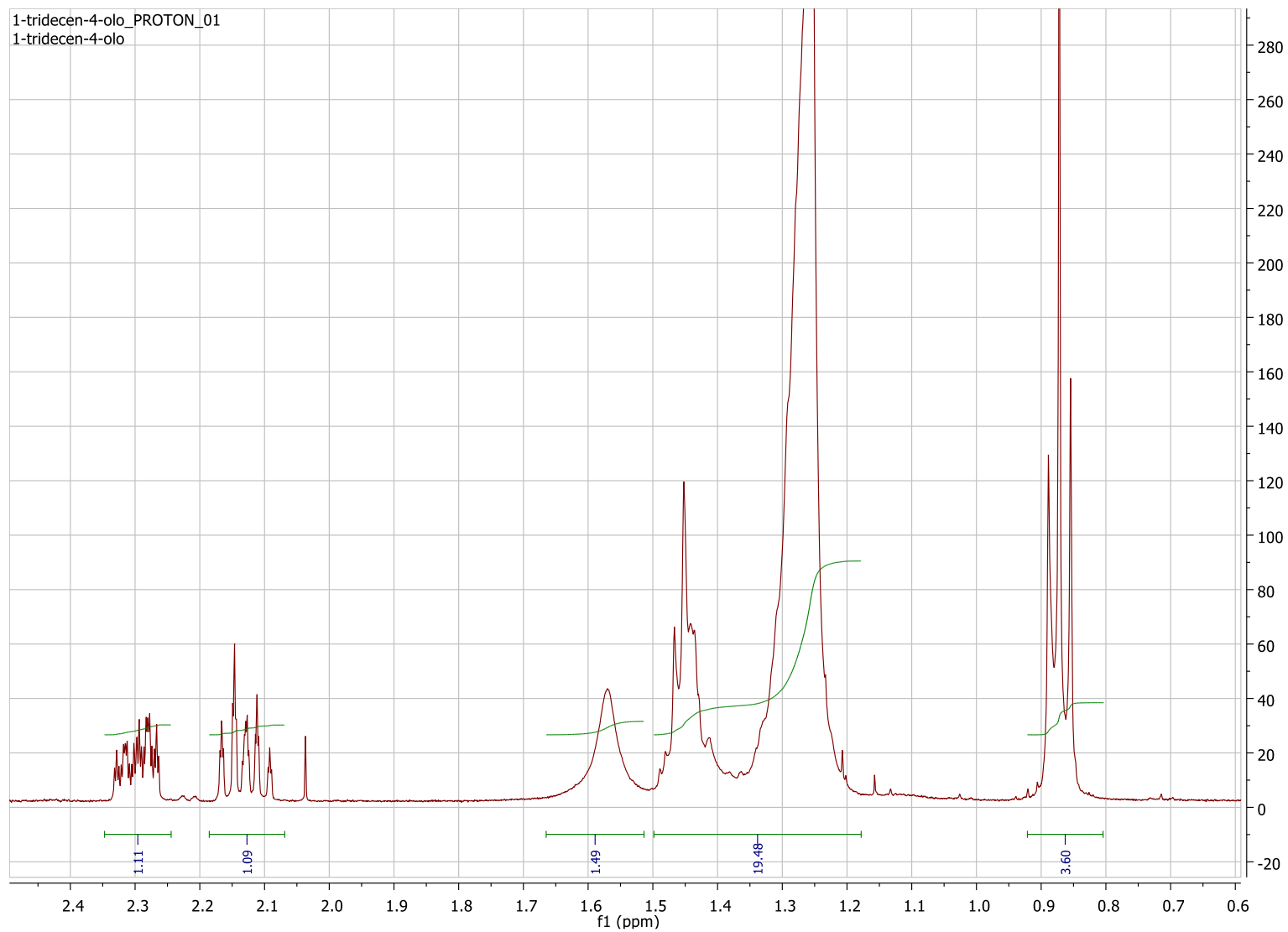
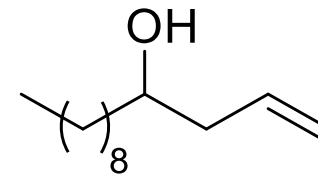
Spettro IR



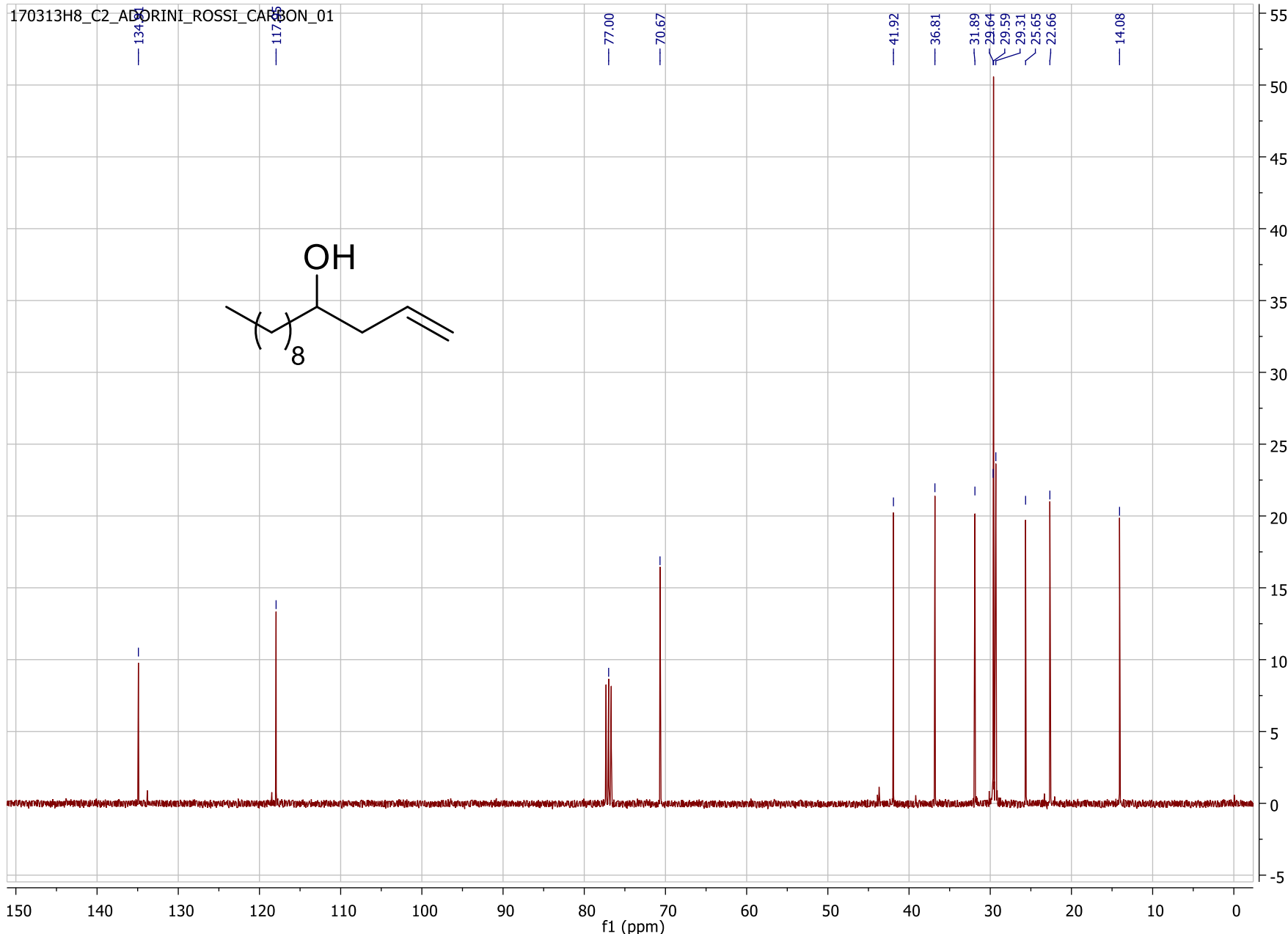
^1H NMR

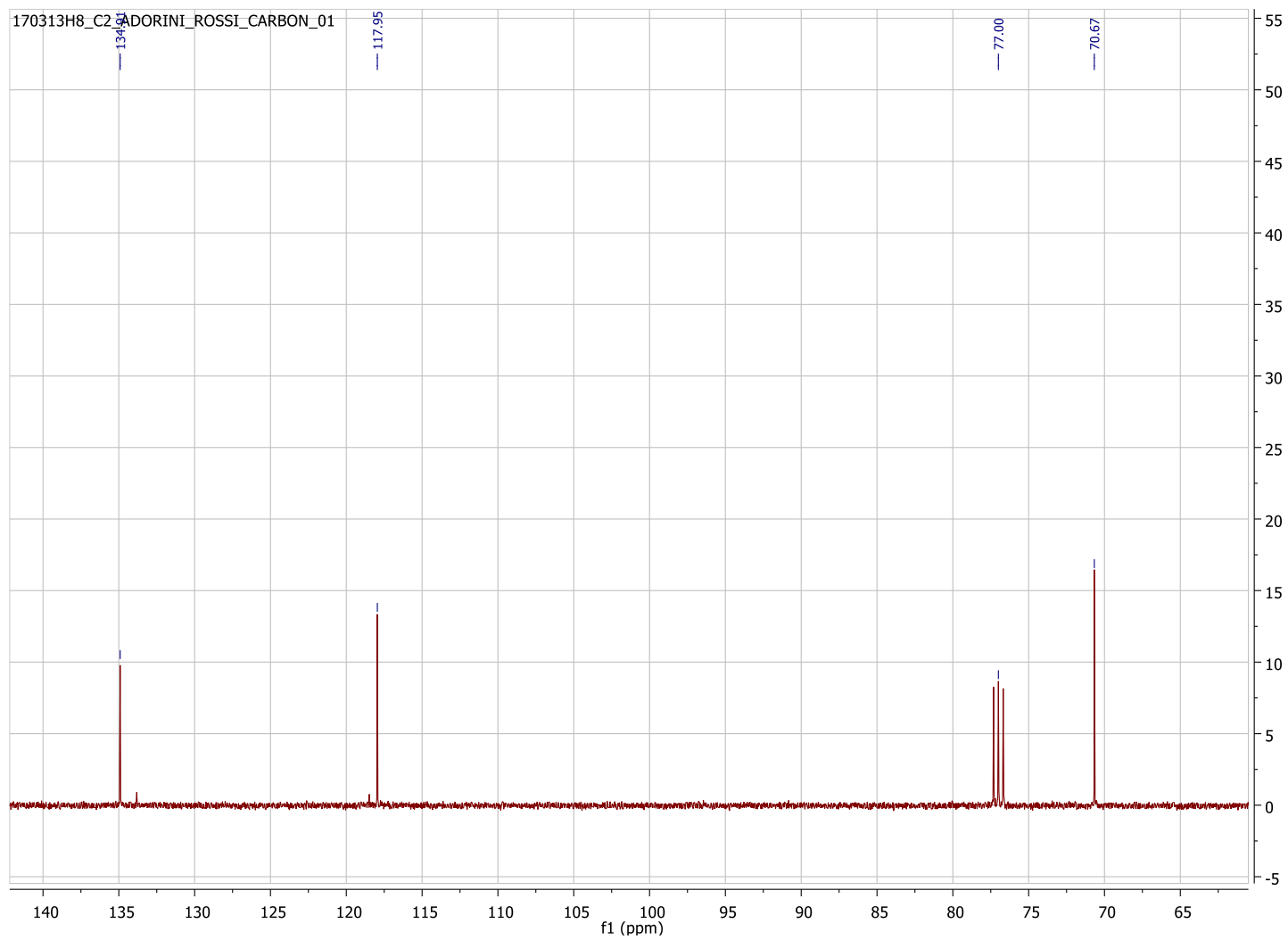
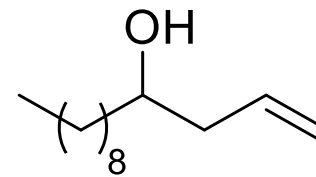


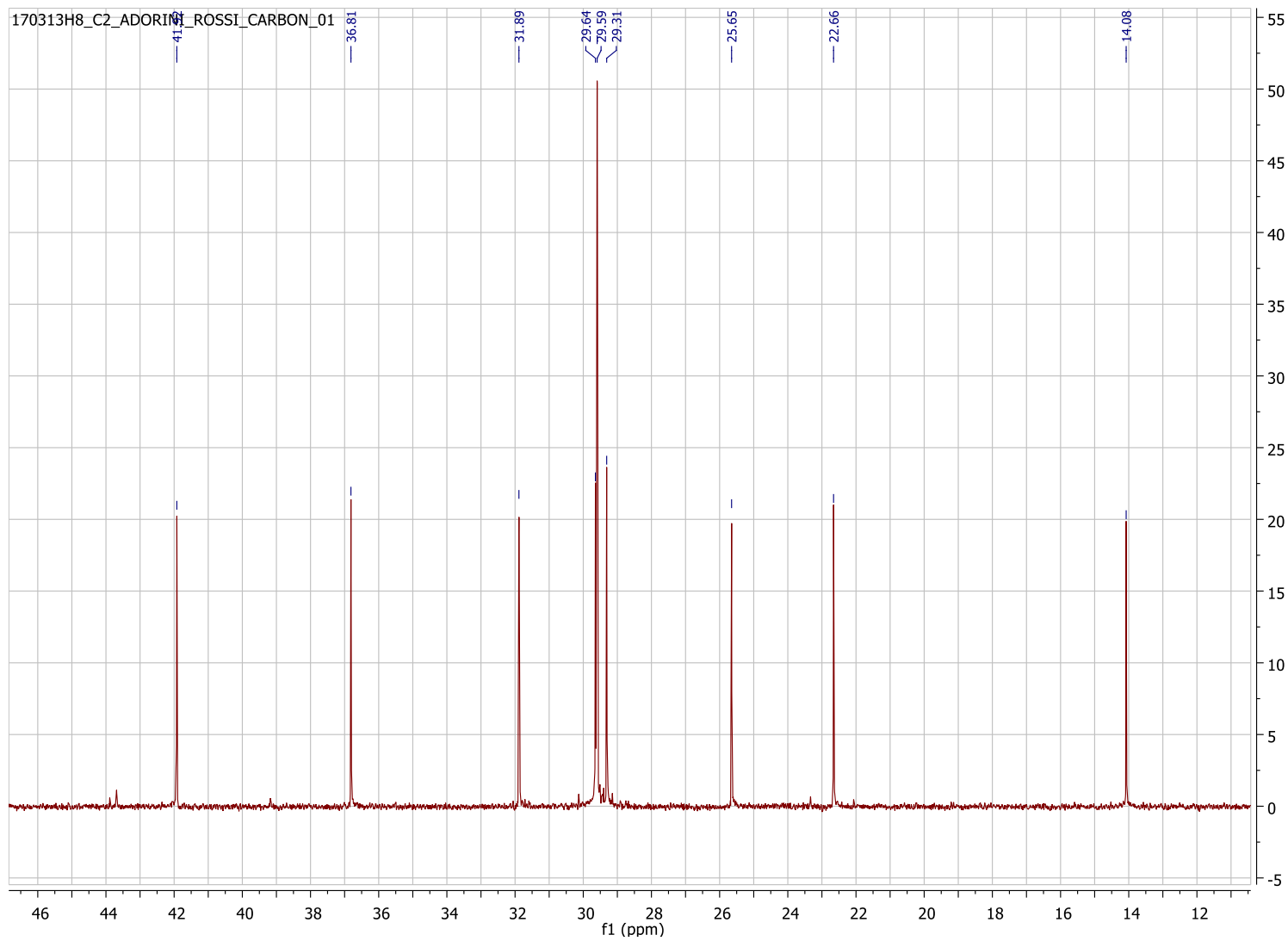
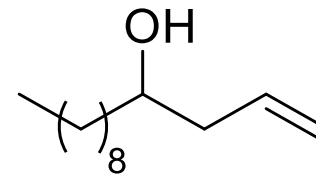




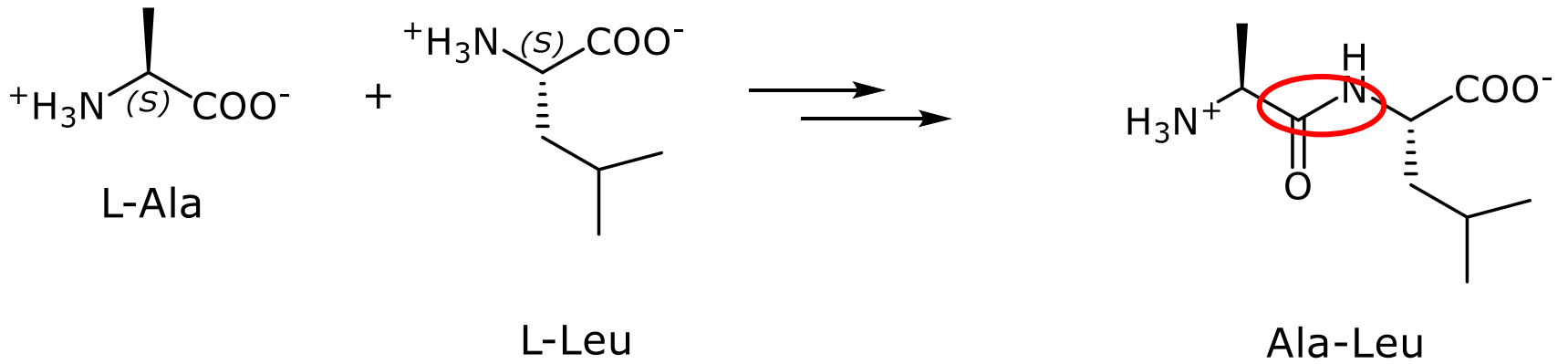
^{13}C NMR



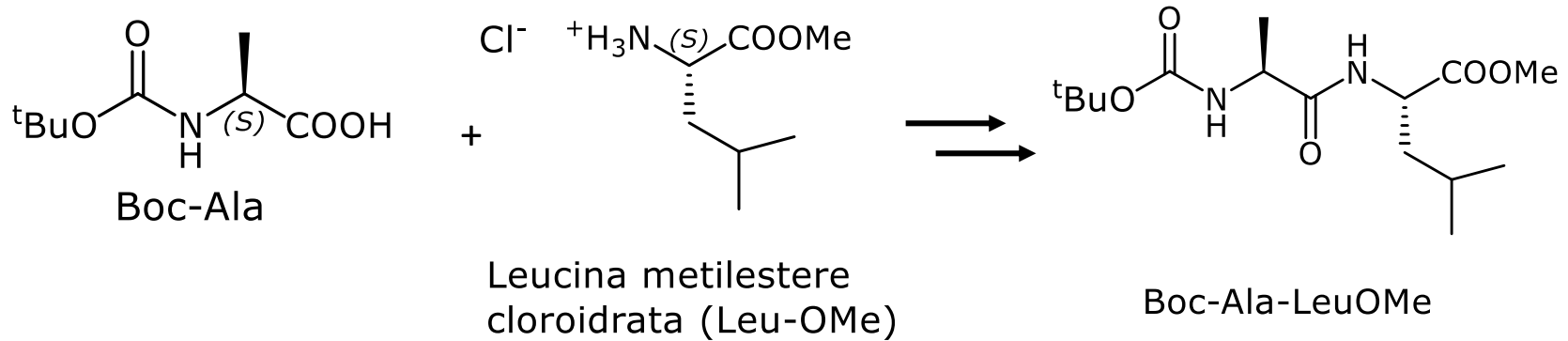
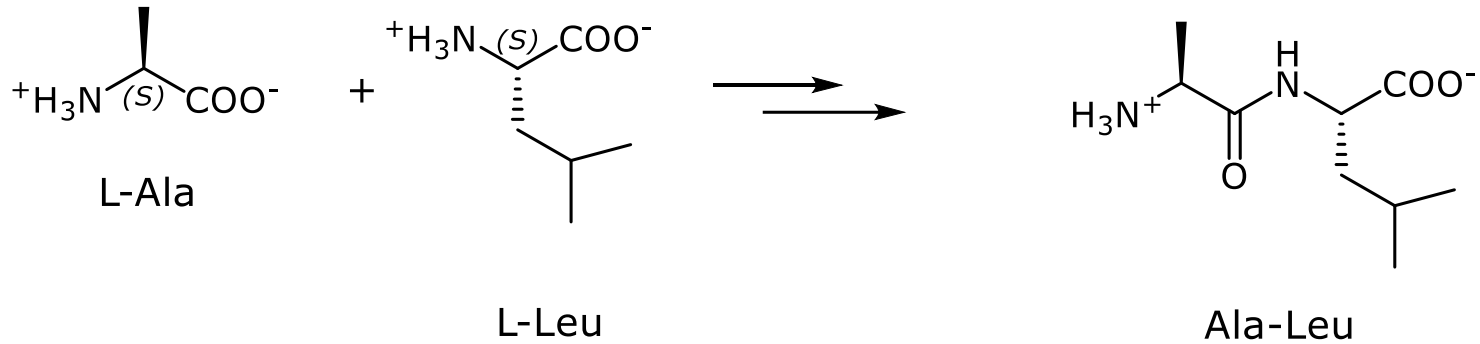




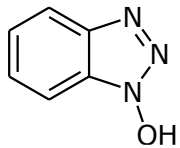
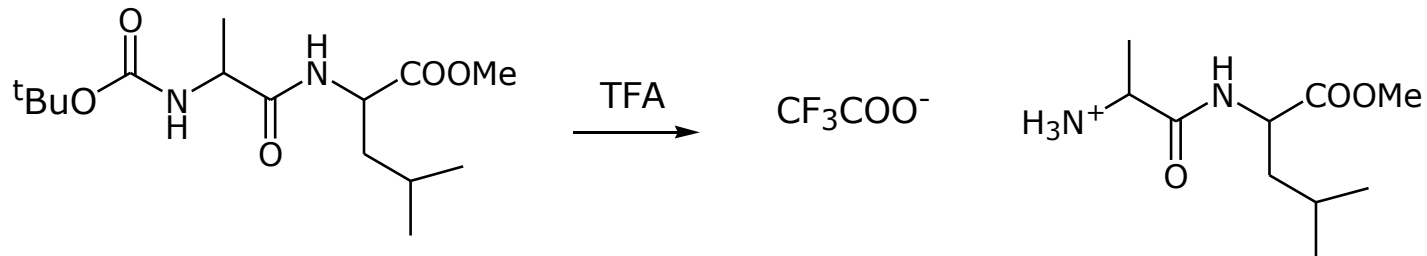
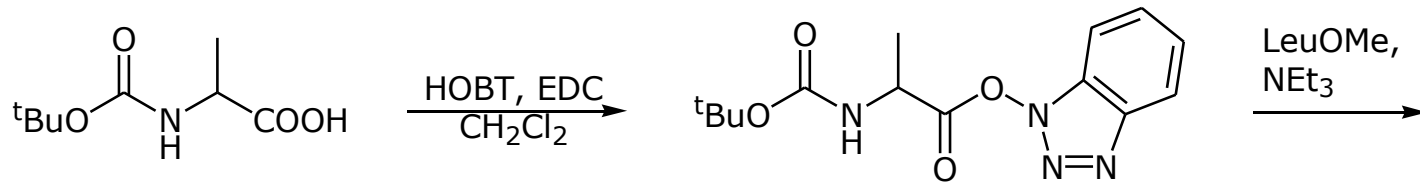
Sintesi del dipeptide Ala-Leu



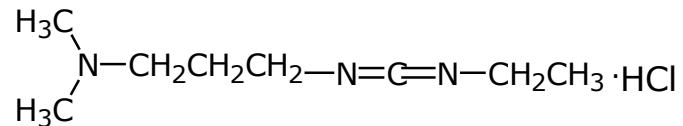
Sintesi del dipeptide Boc-Ala-LeuOMe



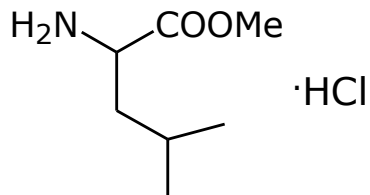
Sintesi del dipeptide Ala-Leu-OMe



Idrossibenzotriazolo (HOBT)



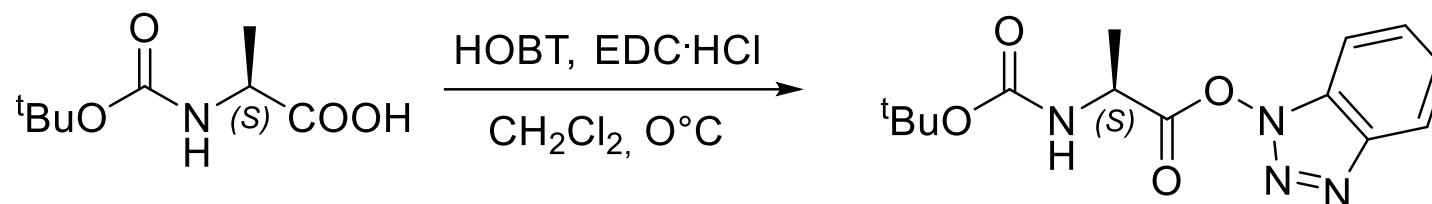
N-etil-N'(3-dimetilamminopropil)carbodiimide cloridrata (EDC·HCl)



Leucina metilestere cloroidrata (Leu-OMe)

Acido trifluoroacetico (TFA)

1° giorno



- 0.5 g (2.64 mmol) di Boc-L-Ala-OH (PM 189.21 g/mol) vengono sciolti in 10 ml di CH_2Cl_2 .
- Si aggiunge quindi 1.0 eq (2.64 mmol, 0.35 g) di HOBT (hydroxybenzotriazole, PM 135.12 g/mol) e si raffredda la soluzione a 0°C .
- Si aggiungono quindi 1.2 eq (3.17 mmol, 0.6 g) di EDC·HCl (N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, PM 191.70) e si mantiene la soluzione sotto agitazione a 0°C per 1 h.
- **Tutto sempre tappato! Si stappa solo per aggiungere i reattivi**

Peptide and Protein Drug Delivery

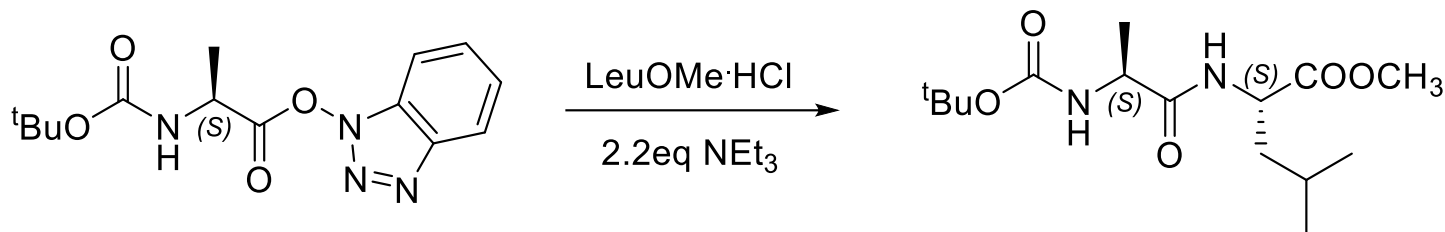
a cura di Vincent Lee

can lead to β -alanine-related impurities [34]. In 1970 it was observed that if 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) was added to a DCC-mediated peptide synthesis (Fig. 9), the optical and chemical purity of the resultant peptide product was markedly improved [35]. Later it was shown that HOBt could suppress or eliminate the extensive racemization that occurred during DCC-mediated couplings of Boc-His(Bzl) in SPPS [36].

A general trend has developed to include HOBt in the DCC coupling protocol as a racemization suppression agent. The product is usually of higher purity and in those cases where racemization is possible (e.g., segment condensation at a residue other than Gly or Pro) the product will be generally of higher optical integrity. Nonetheless, there have been numerous documented instances of DCC-HOBt-mediated coupling reactions where the resultant peptide is partially racemized [37]. Although additives besides HOBt have been proposed and utilized [32], HOBt is still the most widely used additive for the carbodiimide-mediated synthesis of peptides.

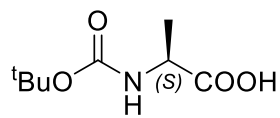
The rationale for the racemization suppression properties of HOBt and related compounds has been debated; however, no definitive explanation has been proposed which satisfactorily accounts for all of the experience with this additive. HOBt apparently forms an active ester intermediate which then reacts with amine nucleophiles to form the amide bond with concomitant regeneration of HOBt (Fig. 9). Although this mechanism implies that HOBt is functioning as a catalyst, it is generally added in equimolar amounts, and in some cases has been added at two or three times the molar level of the acid and amine components of the reaction. The benzotriazole ester that is formed between the acid and HOBt is relatively stable and can be isolated and purified before reaction with the

1° giorno

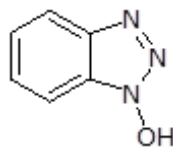


- Al termine si aggiunge una quantità equimolare (2.64 mmol, 0.48 g) di leucina metil estere·HCl (PM 181.66) e 2.2 eq (5.8 mmol, 0.587 g, 0,8 ml) di trietilammina (PM 101,19 g/mol, d = 0,728 g/mL). Si controlla che il pH della soluzione sia 8-8.5 con la cartina tornasole preventivamente bagnata di acqua. Si prosegue l'agitazione per ulteriori 12h.
- **Tutto sempre tappato! Si stappa solo per aggiungere i reattivi**

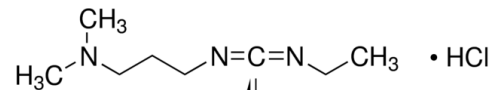
Reattivi: tutti solubili in diclorometano?



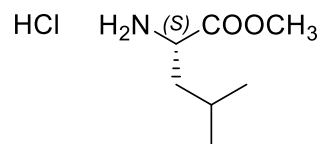
1 eq



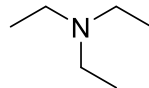
1 eq



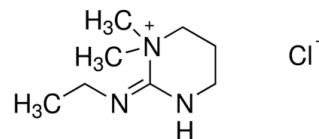
1.2 eq



1 eq

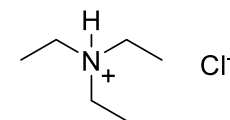
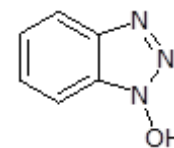
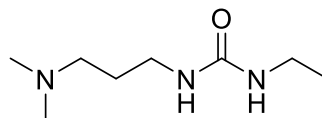
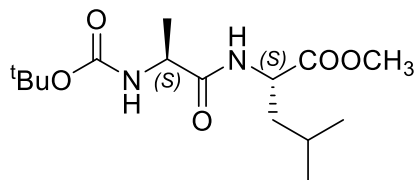


2.2eq

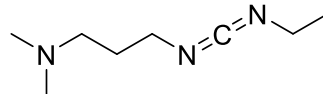
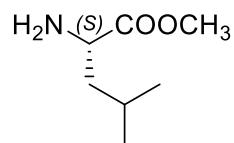


Cl⁻

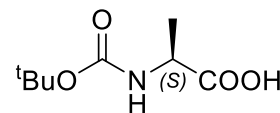
Prodotti e non reattivi: tutti solubili in diclorometano?



Cl⁻



non reagita



2° GIORNO

- Al termine della reazione si svapora il solvente al rotavapor e si aggiunge al residuo acetato di etile (6-10 ml).
- Secondo te, dopo aver svaporato il diclorometano, nel palloncino resterà un liquido o un solido?
- Quando si aggiungerà al residuo l'acetato di etile, si scioglierà tutto?
- Si lava quindi con una soluzione satura di idrogeno carbonato di sodio (6-10 ml), poi con una soluzione al 2% di acido citrico (2 volte), nuovamente con la soluzione satura di idrogeno carbonato di sodio e infine con acqua.
- La fase organica viene anidrificata su Na_2SO_4 anidro
- Successivamente si elimina il solvente al rotavapor
- Determinare la resa, il punto di fusione, **il potere rotatorio specifico in metanolo**, gli spettri ^1H NMR e IR del prodotto ottenuto, confrontare i dati spettroscopici ottenuti con quelli di letteratura

Potere rotatorio specifico

$$[\alpha]_D^{t^\circ\text{C}} = \frac{\alpha_{\text{letto}}}{lc}$$

l = lunghezza della cella in dm

c = concentrazione in g/mL

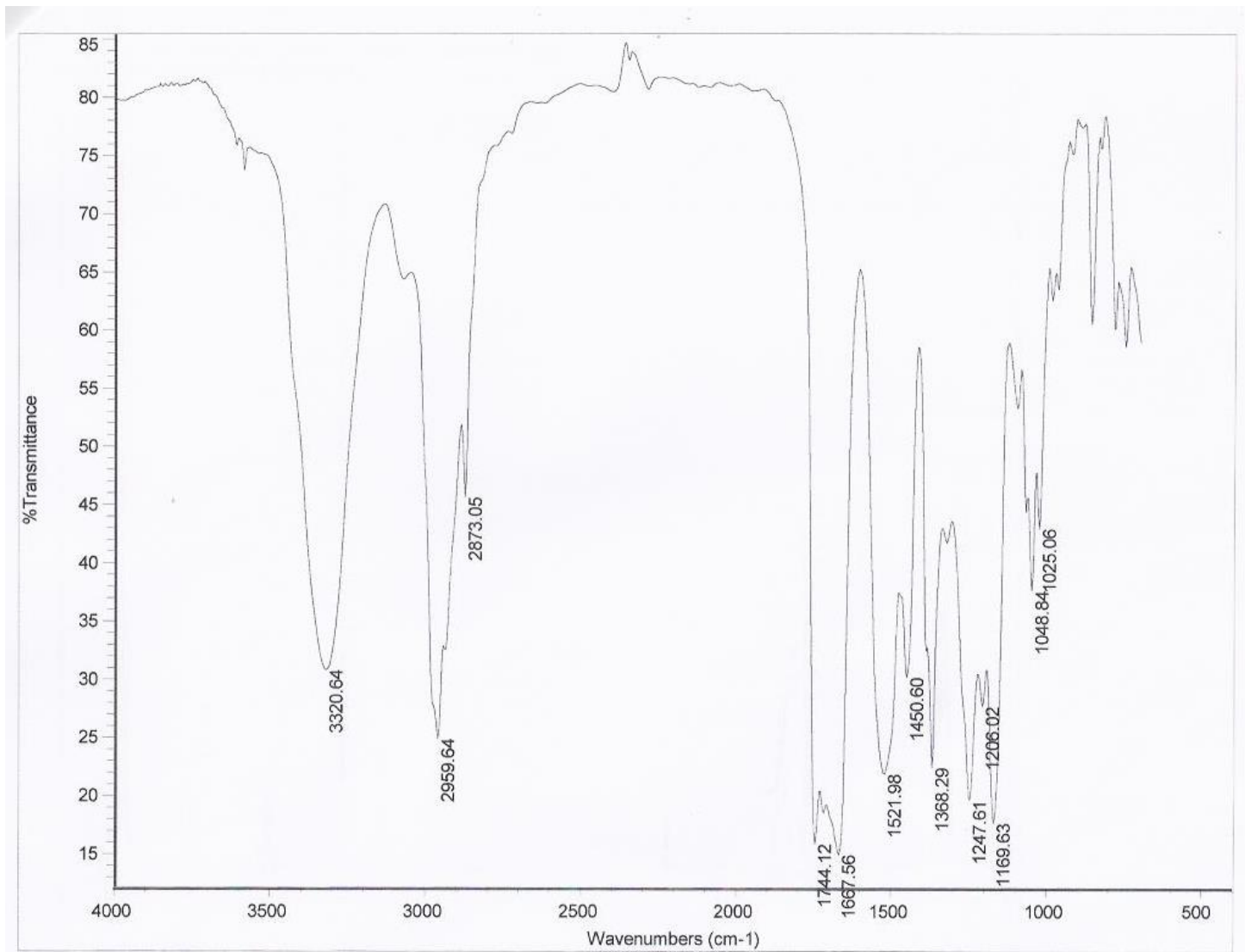
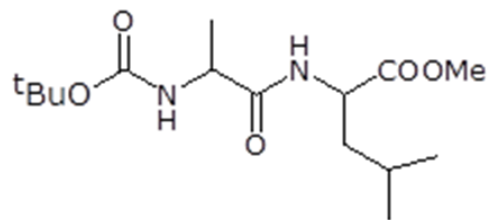
In realtà nelle pubblicazioni c = g/100mL

$$[\alpha]_D^{t^\circ\text{C}} = \frac{100 \times \alpha_{\text{letto}}}{lc}$$

$[\alpha]_D^{\text{rt}} = -54.4$ (*c* = 1.1, MeOH)

Helv. Chim. Acta **1994**, 2035-50

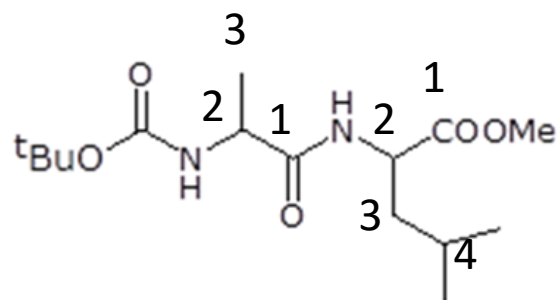
IR



DIPEPTIDE 1 (PROTETTO)

D. Seebach; A. Studer, E. Pfammatter, H. Widmer
Helv. Chim. Acta **1994**, 2035-50

N-(tert-Butoxycarbonyl)-alanyl-leucine Methyl Ester (Boc-Ala-Leu-OMe; 14). Coupling and workup according to G.P.J, with Boc-Ala-OH (3 g, 15.9 mmol), NMM (1.55 ml, 16.5 mmol), THF (80 ml), isobutyl chloroformate (2.07 ml, 15.9 mmol), H-Leu-OMe·HCl (3 g, 16.5 mmol), NMM (1.55 ml, 16.5 mmol), and DMF (30 ml). The resulting oil was purified by FC (AcOEt/hexane 1:1): 14 (4.25 g, 85%). Colorless solid. M.p. 66°. $[\alpha]_D^{25} = -54.4$ ($c = 1.1$, MeOH). IR (KBr): 3320s, 2980m, 2960m, 2940m, 2870w, 1760s, 1750s, 1630s, 1610s, 1535s, 1510s, 1455m, 1390m, 1370s, 1340w, 1310w, 1285m, 1275m, 1255m, 1220m, 1200m, 1160s, 1070w, 1005m, 855w, 790w. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.95 (d, $J = 5.7$, 2 Me-C(4.2)); 1.36 (d, $J = 6.9$, Me(3.1)); 1.45 (s, *t*-Bu); 1.5–1.7 (m, CH₂(3.2), CH(4.2)); 3.73 (s, MeO); 4.18 (m, CH(2.2)); 4.59 (m, CH(2.1)); 5.05 (d, $J = 6.9$, NHCOO); 6.59 (d, $J = 6.6$, NH). ¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): 17.92 (Me); 21.82 (Me); 22.85 (Me); 24.76 (CH); 28.29 (Me); 41.53 (CH₂); 49.92 (CH); 50.68 (CH); 52.28 (Me); 80.14 (C); 155.55 (C); 172.43 (C); 173.25 (C). FAB-MS: 318.1 (12.24), 317.1 (53.73, $[M + H]^+$), 262.1 (22.56), 261.1 (100), 229.1 (12.81), 218.1 (11.96), 217.1 (65.38), 201.1 (17.16), 146.1 (45.74), 144.1 (14.18), 87.9 (24.86), 86.0 (72.79), 56.9 (60.98).



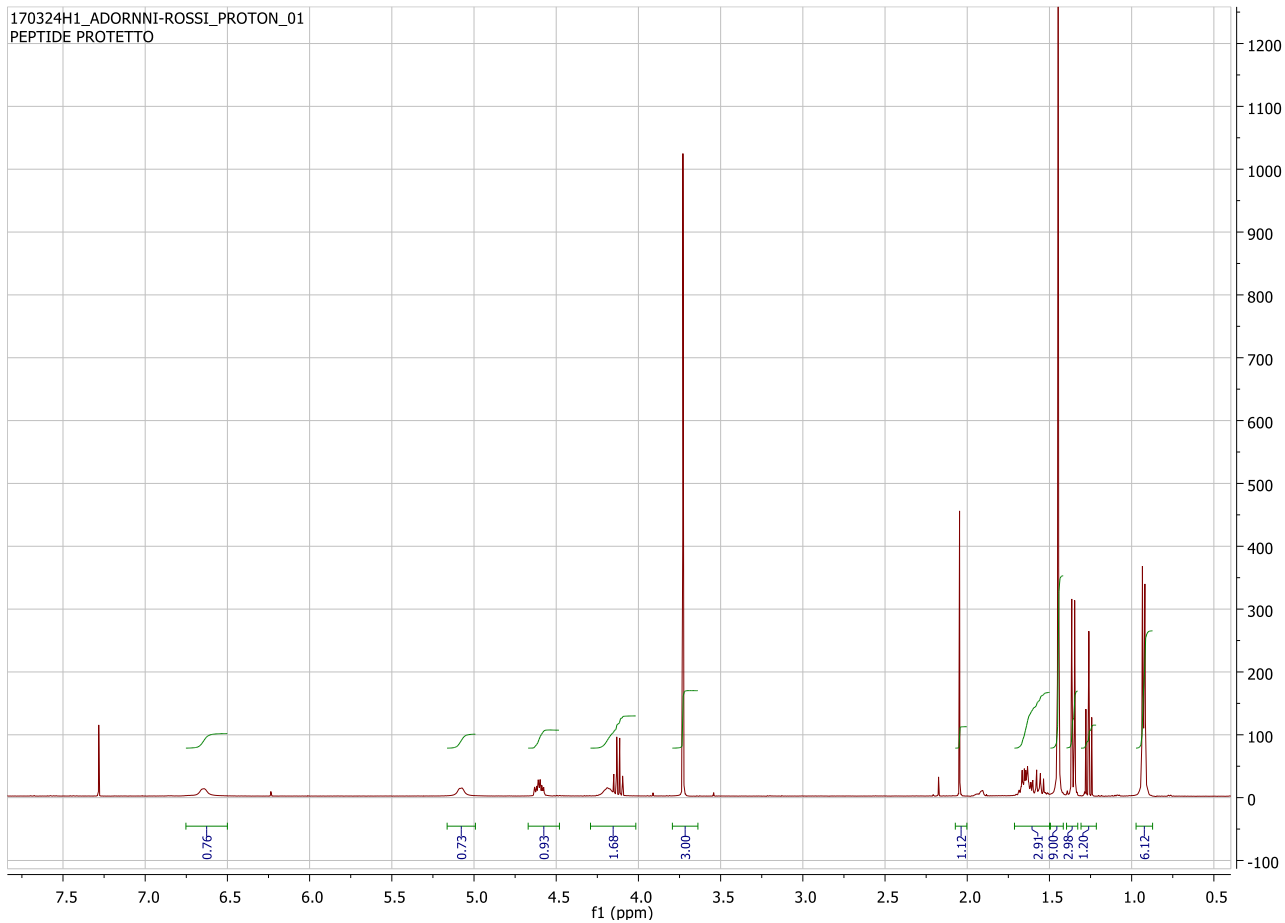
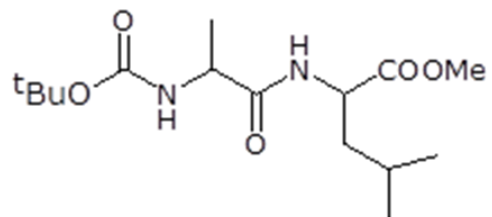
AA 1 Boc-Ala

AA 2 Leu-OMe

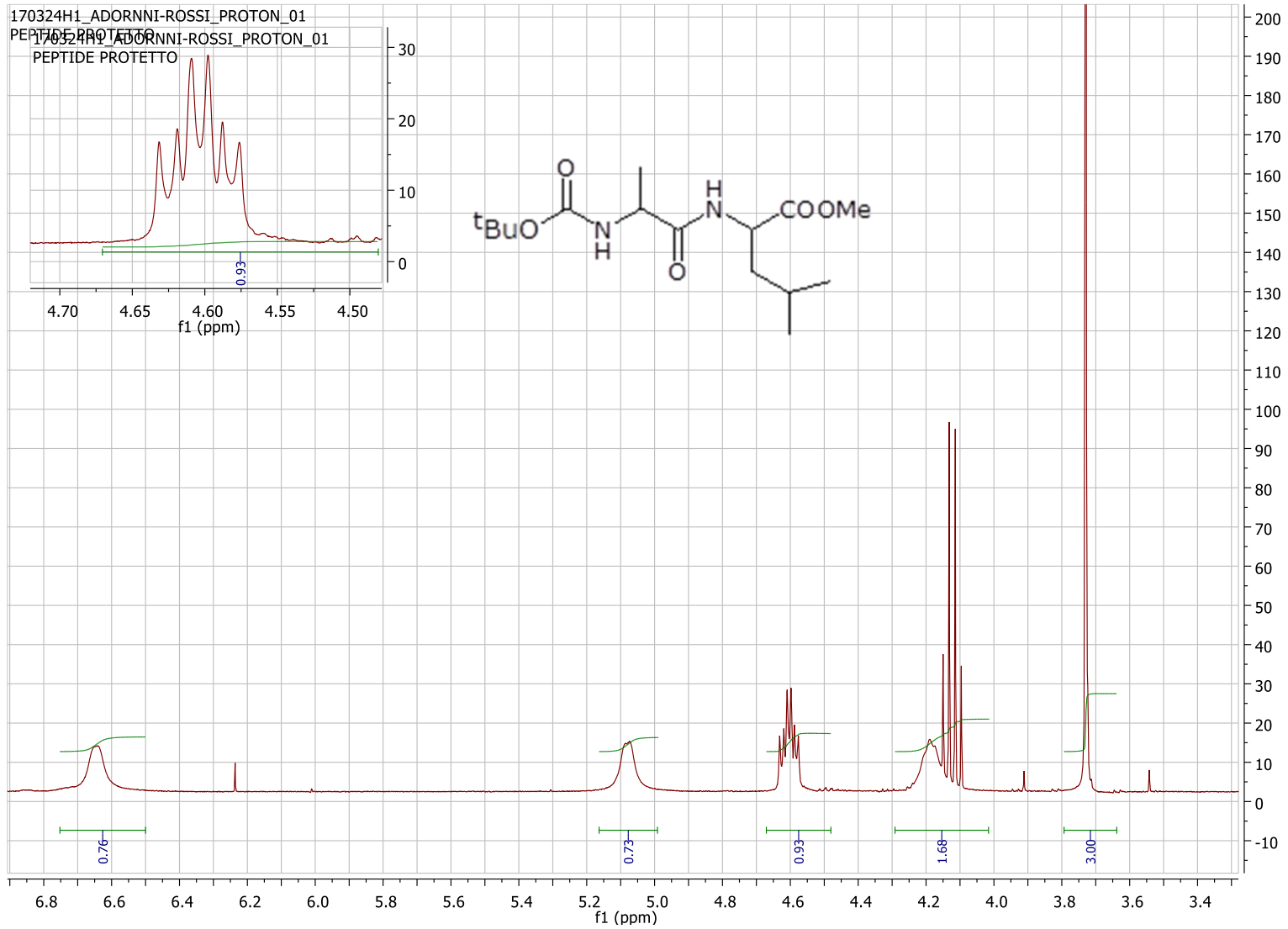
IR:

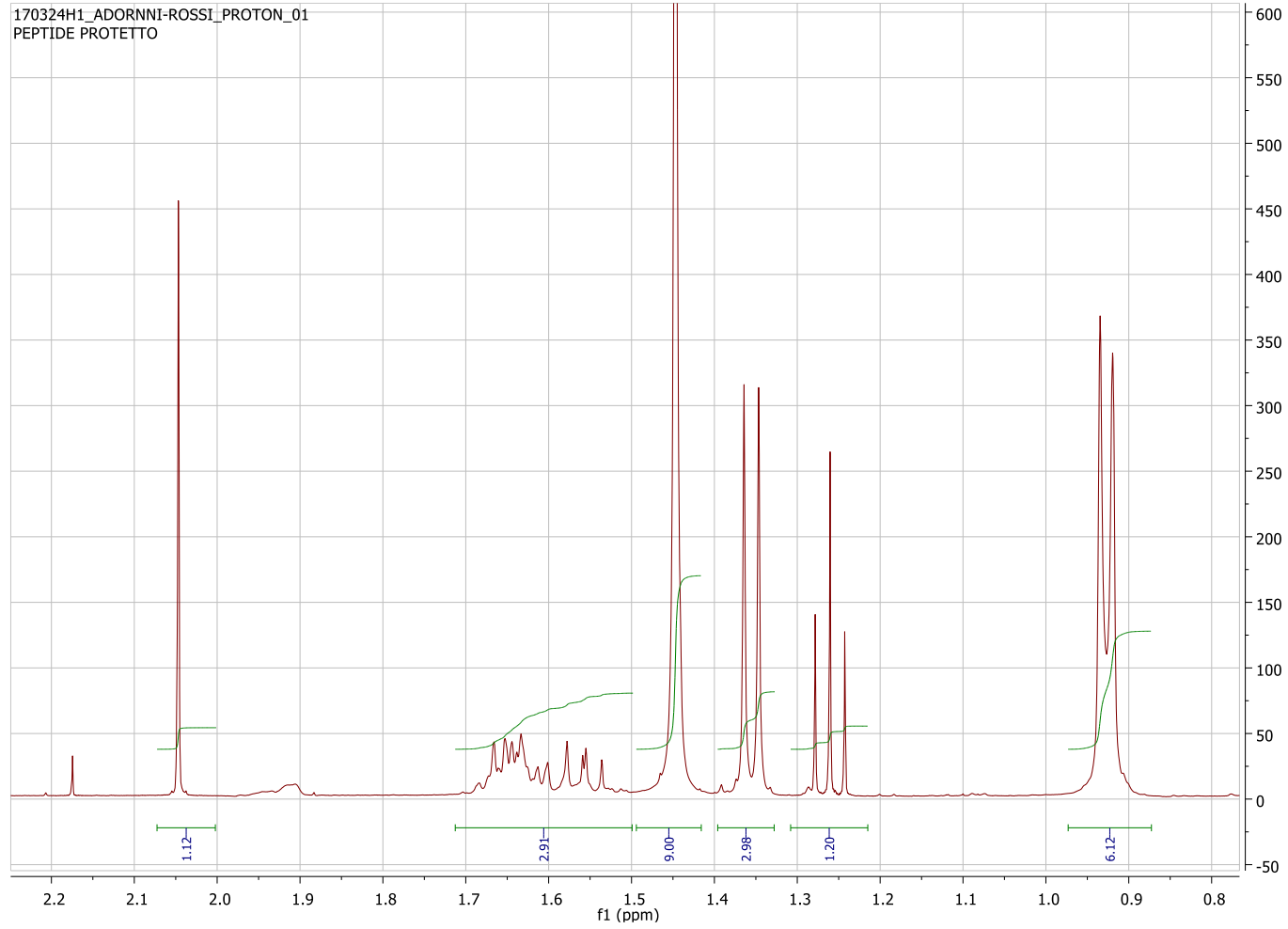
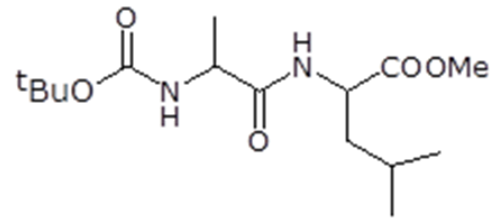
s = *strong*, o *forte*
m = *medium* o *medio*
w = *weak* o *debole*

^1H NMR

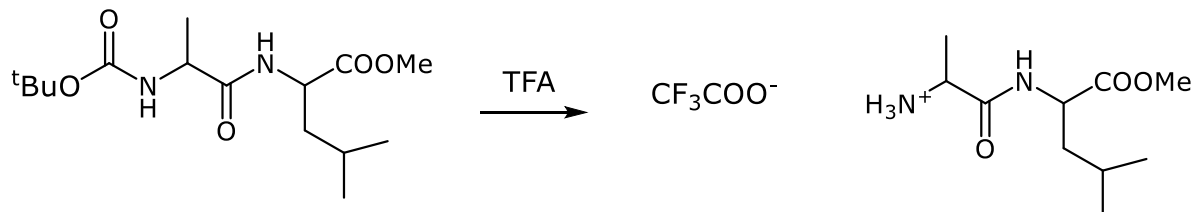


170324H1_ADORNNI-ROSSI_PROTON_01
PEPTIDE PROTETTO





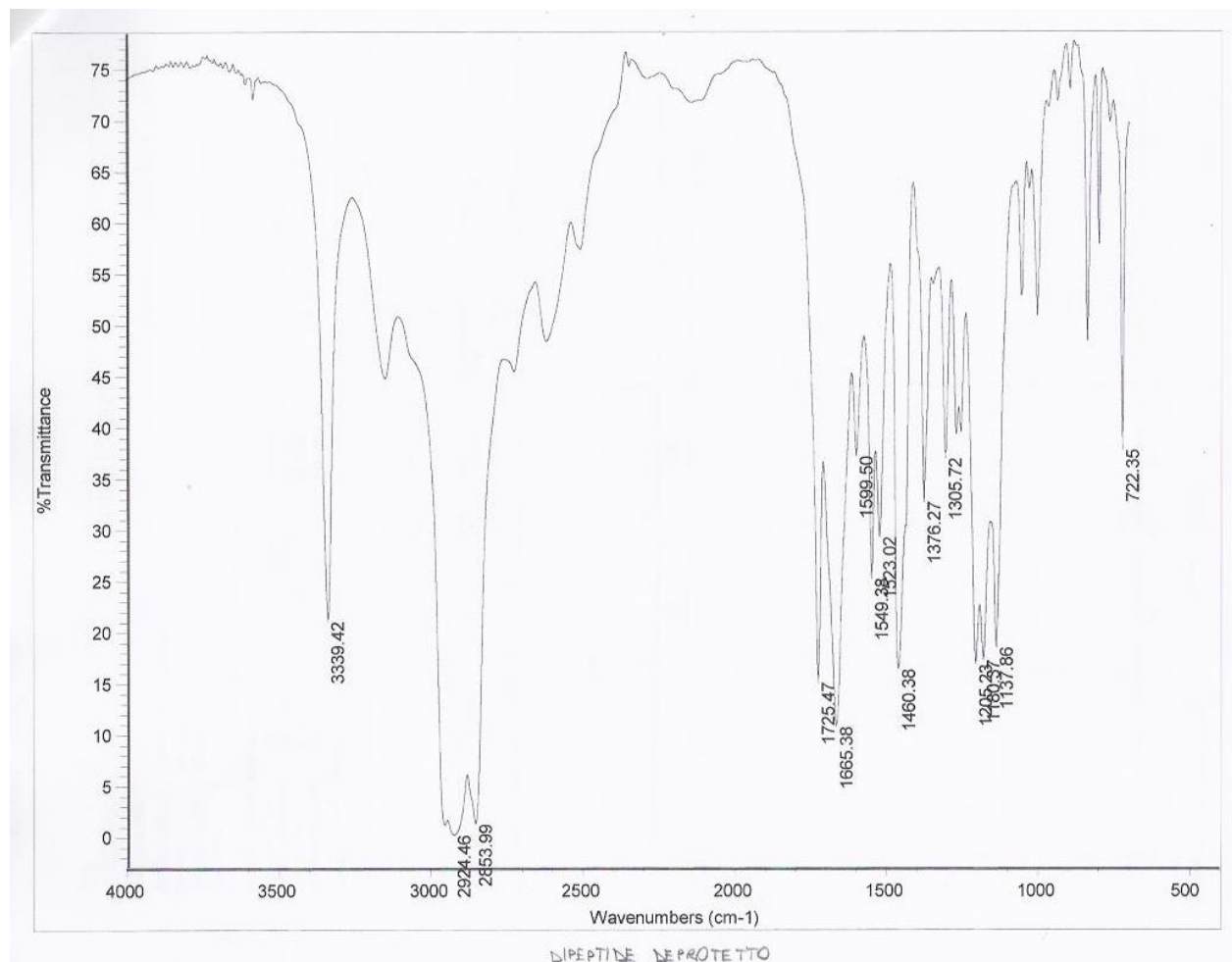
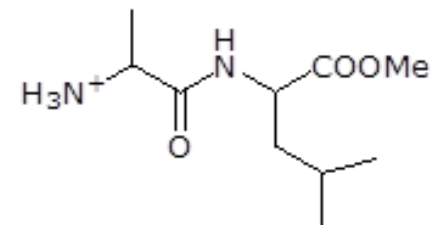
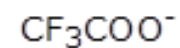
Sintesi del dipeptide Ala-Leu-OMe



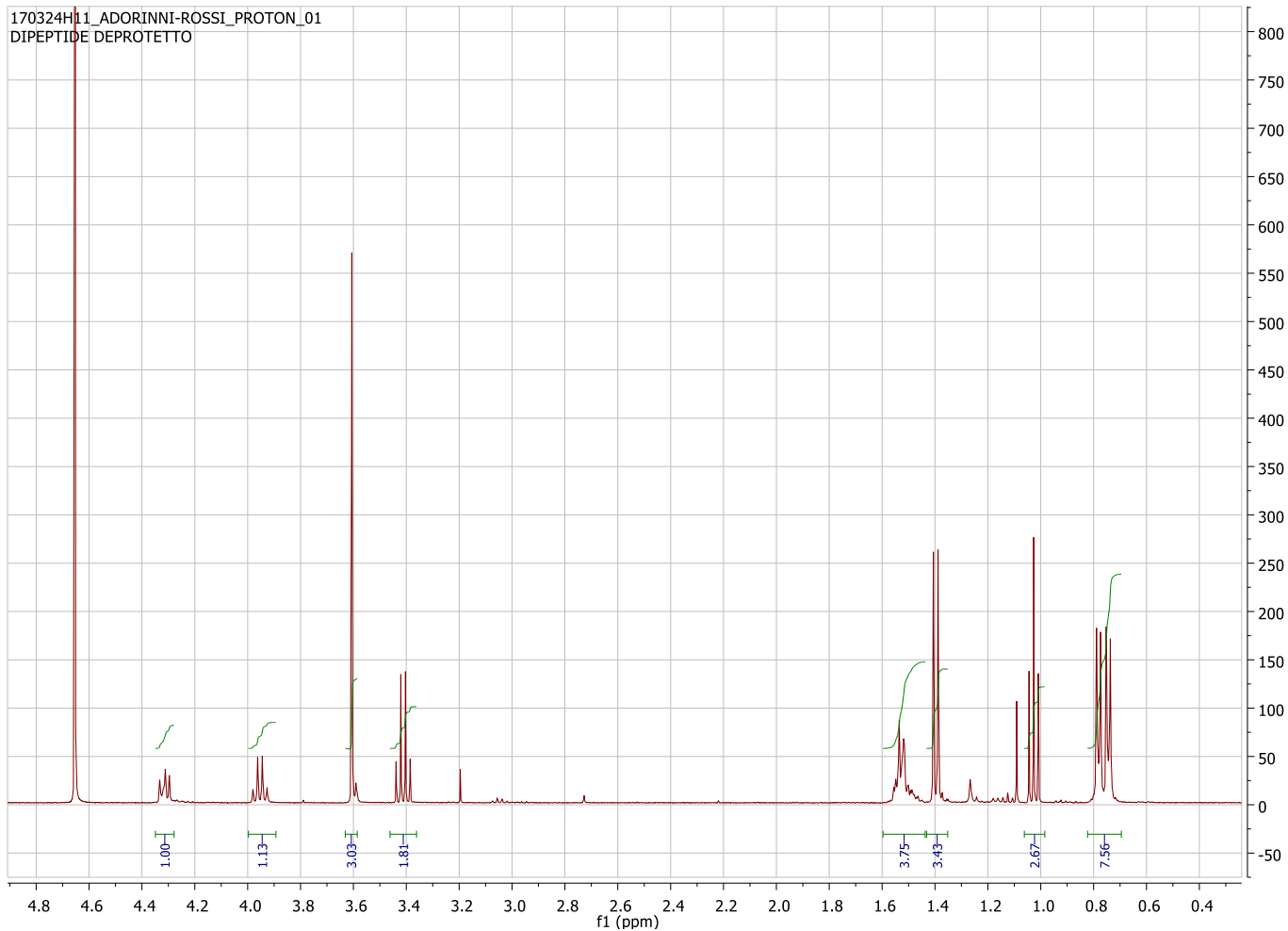
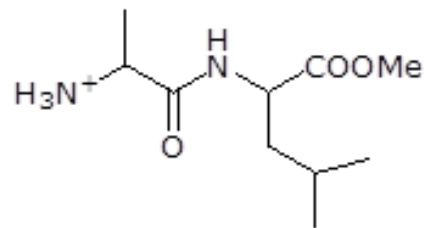
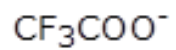
In un palloncino da 50 mL pesato, alla Boc-Ala-LeuOMe vengono aggiunti 5 ml di diclorometano e 1 mL di TFA (attenzione!!! sotto cappa e usare i guanti). Riflussare per 10 minuti, svaporare l'acido trifluoroacetico, aggiungere 10-20 mL di etere etilico e risvaporare. Ripetere l'operazione per 3 volte in modo da eliminare completamente l'acido trifluoroacetico. Determinare la resa, lo spettro ¹H NMR (in D₂O o CD₃OD), IR e di massa (ESI-MS, sciogliere qualche mg in 1-2 ml di metanolo) del prodotto ottenuto. Confrontare i dati spettroscopici ottenuti con quelli di letteratura (D. Seebach; A. Studer, E. Pfammatter, H. Widmer *Helv. Chim. Acta* **1994**, 2035-50)

- **Sintesi del dipeptide**
- Schede di sicurezza con domande da consegnare entro il 18 aprile 2021
- Due articoli scientifici
- Quiz sull'esperienza
- Relazione di laboratorio da consegnare entro il primo aprile 2022

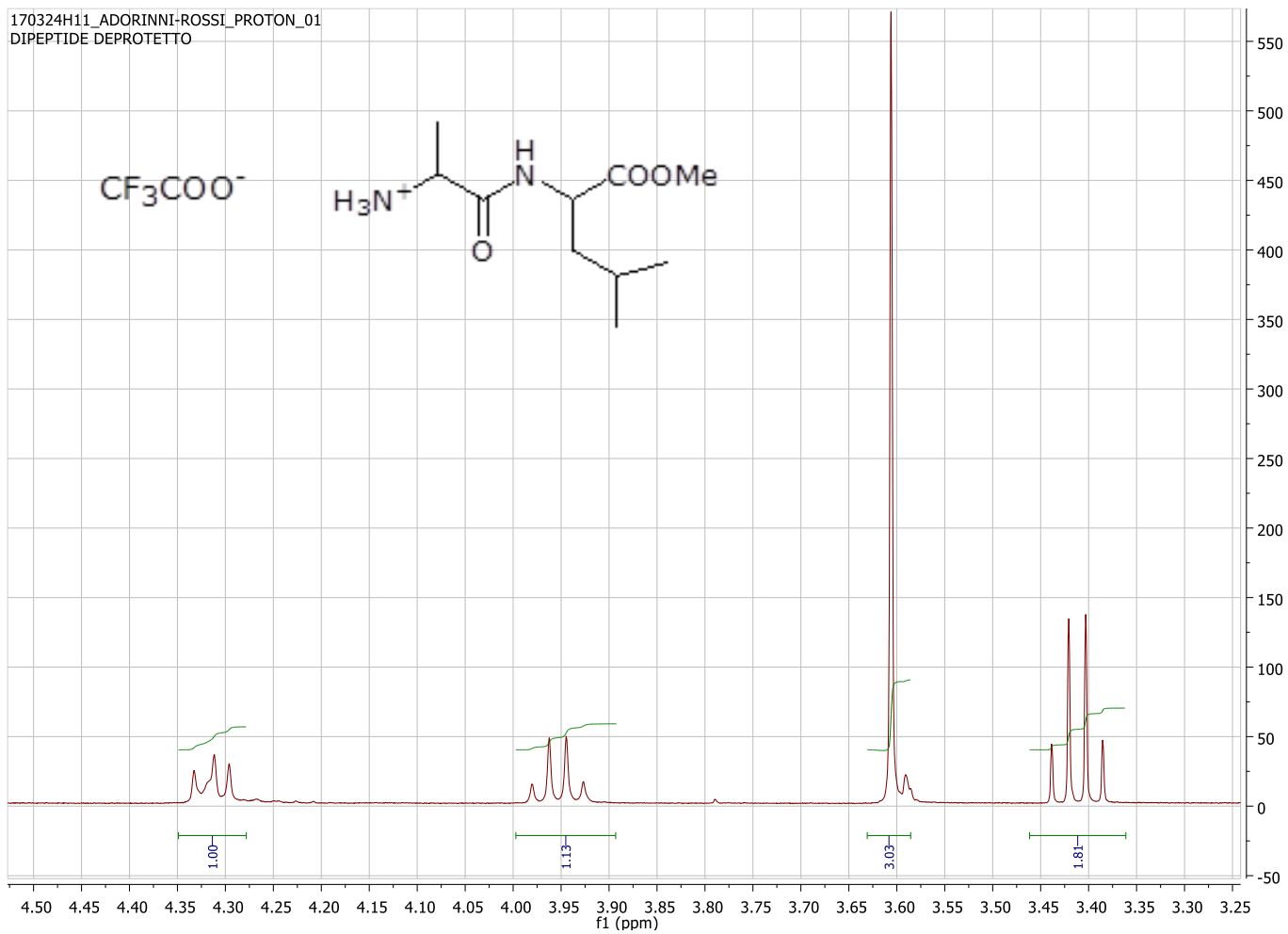
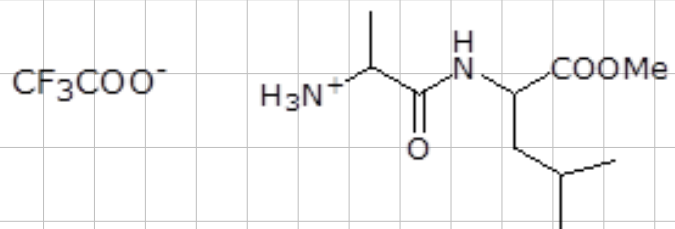
IR dipeptide deprotetto



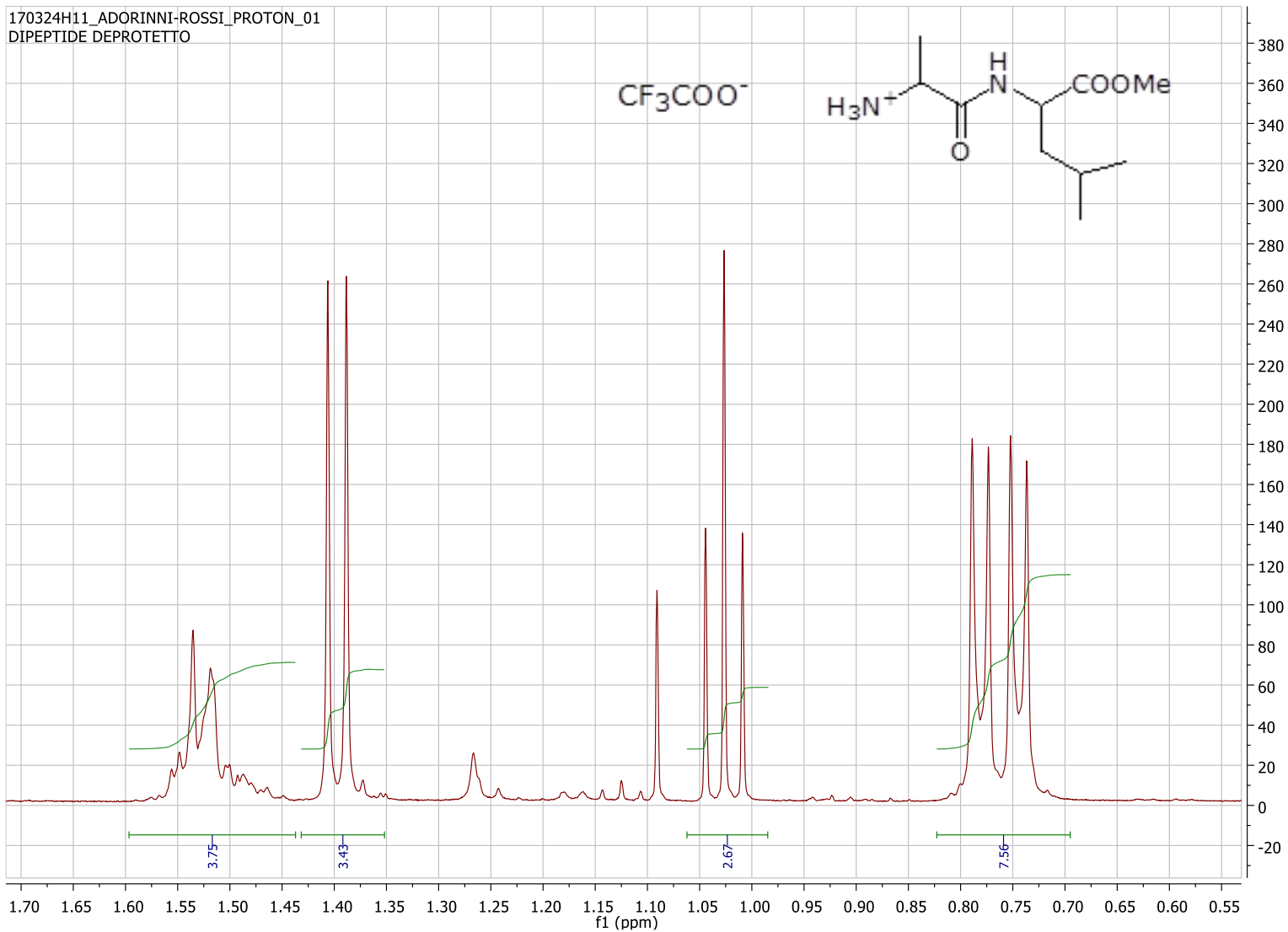
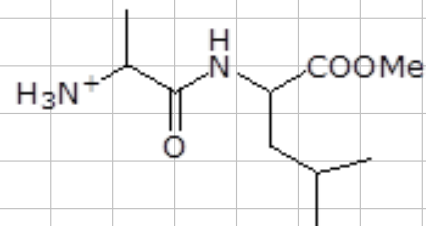
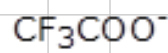
^1H NMR



170324H11_ADORINNI-ROSSI_PROTON_01
DIPEPTIDE DEPROTETTO



170324H11_ADORINNI-ROSSI_PROTON_01
DIPEPTIDE DEPROTECTED

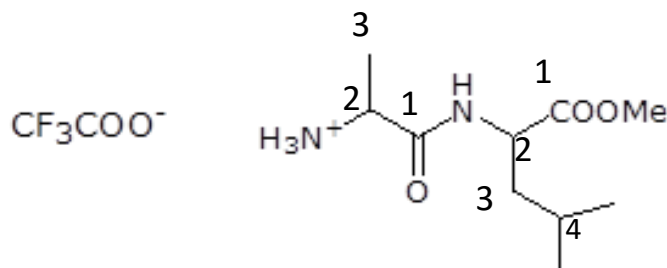


D. Seebach; A. Studer, E. Pfammatter, H. Widmer *Helv. Chim. Acta* **1994**, 2035-50

Alanyl-leucine Methyl Ester Hydrochloride (H-Ala-Leu-OMe·HCl; 15·HCl). A soln. of 14 (3.75 g, 11.86 mmol) in 3 ml of an Et₂O soln. sat. with HCl was stirred at r.t. for 2 h and then evaporated: 2.95 g (99%) of 15·HCl. Colorless powder. M.p. 62°. $[\alpha]_D^{25} = -25.8$ ($c = 1.0$, MeOH). IR (KBr): 3500-2500 (br.), 1740s, 1680s, 1555s, 1500m, 1470m, 1440m, 1390w, 1370w, 1160m, 1125m. ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): 0.9-1.0 (m, 2 Me-C(4,2)); 1.53 (d, $J = 6.9$, Me(3,1)); 1.6-1.8 (m, CH₂(3,2), CH(4,2)); 3.71 (s, MeO); 3.96 (m, CH(2,1)); 4.48 (t, $J = 7.2$, CH(2,2)). ¹³C-NMR (75 MHz, CD₃OD): 17.64 (Me); 21.72 (Me); 23.29 (Me); 25.96 (CH); 41.24 (CH₂); 50.11 (CH); 52.31 (CH); 52.80 (Me); 171.27 (C); 174.19 (C). FAB-MS: 649.2 (13.55, [3M - HCl] + H⁺), 434.1 (15.27), 433.1 (48.83, [2M - HCl] + H⁺), 218.1 (23.30), 217.1 (100, [M - HCl] + H⁺), 146.1 (44.70), 85.9 (25.21).

AA 1 H-Ala

AA 2 Leu-OMe



ESI-MS dipeptide deprotetto

