

TARTU ÜLIKOOL
Loodus- ja täppisteaduste valdkond
Keemia instituut
Analüütilise keemia õppetool

Kairi Ojasoo

**Isotoopmärgistatud derivatiseeriva reagenti
dietüületoksümetüleenmalonaadi süntees ja rakendamine LC-MS analüüsis**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Keemia

Juhendajad: Koit Herodes, PhD
Lauri Toom, PhD

Tartu 2024

Infoleht

Isotoopmärgistatud derivatiseeriva reagenti dietüületoksümetüleenmalonaadi süntees ja rakendamine LC-MS analüüsis

Töös sünteesiti isotoopmärgistatud derivatiseerivat reagenti dietüületoksümetüleenmalonaati ($^{13}\text{C}_3$ -DEEMM). Derivatiseeriv reagent leiab kasutust vedelikkromatograaf-massispektromeetriga (LC-MS) analüüsil aminoühendite kromatograafilise eraldamise parandamiseks. Isotoopmärgistatud reagentiga derivatiseerimine võimaldab analüütide tuvastamist ja kvantiseerimist veelgi parandada.

Bakalaureusetöös optimeeriti olemasolevat reaktsiooni- ja saaduste puhastamise eeskirja väiksemate ainekoguste jaoks sobivaks. Optimeeritud sünteesieeskirja kasutades sünteesiti 92 mg $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-i (saagis ca 80%), millest piisab vähemalt 30-ks derivatiseerimiskorraks.

Isotoopmärgistatud DEEMM-i kasutamine tõstis LC-MS analüüsimeetodi selektiivsust. $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-i rakendati neutraali kao skanneeringul, kus selle kasutamine hõlbustas märkimisväärselt aminoühendite detekteerimist.

Märksõnad: DEEMM, derivatiseerimine, LC-MS, QqQ, neutraali kao skaneerimine

CERCS: P300 Analüütiline keemia

Synthesis of the isotope labelled derivatizing reagent diethyl ethoxymethylenemalonate and its application in LC-MS analysis

In this work, the isotopically labelled derivatizing reagent diethyl ethoxymethylenemalonate ($^{13}\text{C}_3$ -DEEMM) was synthesised. The derivatization reagent is used in liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis to improve the chromatographic separation of amino compounds. Isotopically labelled reagent derivatization allows further improvement of analyte identification and quantification.

In the thesis, the existing reaction and product purification protocol was optimised for smaller amounts of substances. Using the optimised synthesis procedure, 92 mg of $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM was synthesised (yield ca. 80%), which is sufficient for at least 30 derivatisation reactions.

The use of isotope labelled DEEMM increased the selectivity of the LC-MS analytical method. The $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM was applied in neutral loss scanning, where its use significantly facilitated the detection of amino compounds.

Keywords: DEEMM, derivatization, LC-MS, QqQ, neutral loss scan

CERCS: P300 Analytical chemistry

Sisukord

Kasutatud lühendid.....	5
1. Sissejuhatus.....	6
2. Kirjanduse ülevaade.....	7
2.1. DEEMM ja ¹³ C-märgistusega DEEMM.....	7
2.2. DEEMM-i süntees ja puhastamine.....	8
2.3. Derivatiseerimine LC-MS analüüsil.....	9
2.4. Tuumamagnetresonantspektromeetria.....	11
3. Töö eesmärgid.....	12
4. Eksperimentaalne osa.....	13
4.1. Kasutatud kemikaalid ja seadmed.....	13
4.2. Kasutatud reaktsioonisüsteem.....	15
4.3. DEEMM ja ¹³ C ₃ -DEEMM sünteesieeskiri.....	15
4.4. Reaktsiooni toimumise kontroll.....	22
4.5. Reaktsiooniproducti puhastamine.....	23
4.6. Aminohapete analüüs derivatiseerimisega LC-MS meetodil.....	24
5. Tulemused ja arutelu.....	27
5.1. Süntees.....	27
5.2. Derivatiseerimisega LC-MS analüüs.....	33
5.3. Edasiarendused.....	36
6. Kokkuvõte.....	37
7. Tänuavaldused.....	38
8. Kasutatud kirjandus.....	39
Lisad.....	41
1. Isotoopmärgistatud dietüülmalonaadi puhtuse sertifikaat.....	41
2. Sisestandardi puhtuse sertifikaat.....	42
3. Tolueeni puhtuse sertifikaat (veevaba).....	43

4.	Reaktsioonisüsteem	44
5.	Sünteesitud ^{13}C DEEMM-i HRMS analüüs	45
6.	^{13}C DEEMM-i ^1H TMR spekter koos mõõtmisparameetritega	46
7.	^{13}C DEEMM-i ^{13}C TMR spekter koos mõõtmisparameetritega	47
	Lihlitsents	48

Kasutatud lühendid

Töös kasutatud terminid vastavad IUPACi soovitudele ja KemTerm sõnastiku eestikeelsetele vastetele. ^{1,2}

a	– tähistab neutraalset osakest neutraali kao skaneeringu skeemil
Ac ₂ O	– äädikhappe anhüdriid
Ar	– argoon
DEEMM	– dietüületoksümetüleenmalonaat
GC-MS	– (<i>gas chromatograph mass spectrometer</i>) gaasikromatograaf-massispektromeeter
EIC	– (<i>extracted ion chromatogram</i>) valitud iooni kromatogramm
Ekv	– ekvivalent
ESI	– (<i>electrospray ionization</i>) elektropihustusionisatsioon
HRMS	– (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>) kõrglahutusega massispektromeeter
<i>I</i>	– spinnkvantarv
IUPAC	– (<i>The International Union of Pure and Applied Chemistry</i>) Rahvusvaheline Puhta ja Rakenduskeemia Liit
LC-MS	– (<i>liquid chromatograph mass spectrometer</i>) vedelikkromatograaf-massispektromeeter
MHz	– megaherts
m/z	– massi ja laengu suhe
ppm	– (<i>parts per million</i>) osa miljoni kohta, TMR-spektroskoopias kasutatakse signaalide sageduse esitamiseks miljondikku osa MHz-skaalast
q	– kvadrupool, mis toimib pörkerakuna
Q, Q1, Q3	– massianalüsaatorina toimivad kvadrupoolid
QqQ	– kolmekvadrupoolne massianalüsaator, esimene ja viimane kvadrupool on massianalüsaatorid, keskmine on pörkerakk
rpm	– (<i>revolutions per minute</i>) pööret minutis
rt	– (<i>retention time</i>) retentsiooniaeg
TEOF	– trietüülortoformaat
TICC	– (<i>total ion current chromatogram</i>) summaarse ioonvoolu kromatogramm
TLC	– (<i>thin layer chromatography</i>) õhukese kihi kromatograafia
TMR	– (<i>nuclear magnetic reconance</i>) tuumamagnetresonants

1. Sissejuhatus

Bakalaureusetöö eesmärk oli sünteesida vedelikkromatograafia-massispektromeetria (LC-MS) analüüsimeetodiga kasutatavat ^{13}C -märgistusega derivatiseerivat reagenti. Derivatiseerivat reagenti kasutatakse nii LC-MS kui ka gaasikromatograaf-massispektromeetria (GC-MS) analüüsides uuritavate ainete eristamiseks. See on oluline, sest kromatograafias elueeruvad sarnaste omadustega ained samal või väga lähedasel ajahetkel ja neid oleks keeruline eristada. Sellised ained on näiteks aminoühendid, millest koosnevad valgud ja mis on elutähtsad ühendid organismi töös. Derivatiseerimine muudab analüüsitavate ainete omadusi, mis muudab ka nende ühendite retentsiooniaegu (hetke, mil need detektorisse jõuavad), mistõttu on nende poolt tekitatavaid signaale (piike) teineteisest kergem eristada.

Aminohapete ja -ühendite analüüs on oluline, et hinnata toiduaineid, inimese tervislikku seisut, jälgida erinevaid bioloogilisi protsesse, haiguste põhjuslikkust ja palju muud.

Sünteesitav derivatiseeriv reagent oli dietüületoksümetüleenmalonaat (edaspidi DEEMM). Bakalaureusetöö raames oli eesmärgiks esmakordselt sünteesida ^{13}C -märgistatud DEEMM-i. $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-i sünteesi lähteaine kõrge hinna tõttu alustati sünteesitingimuste optimeerimist isotoopmärgistusega DEEMM-i sünteesiga. Isotoopmärgistatud ainete kõrge hinna tõttu oli oluline, et soovitud sünteesisaadus tekiks võimalikult kõrge saagisega.

Varasemast on teada, et DEEMM-derivatiseerimine aitab parandada aminohapete LC-MS analüüsil kromatograafilist lahutuvust ja võimaldab neid kõrgema tundlikkusega (madalama avastamispiiri mõistes) detekteerida. Püstitati hüpotees, et käesolevas töös sünteesitava $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-i kasutamine tõstab LC-MS analüüsi selektiivsust. Hüpoteesi testimiseks sünteesitakse vastav derivatiseeriv reagent ja kasutatakse seda LC-MS analüüsil.

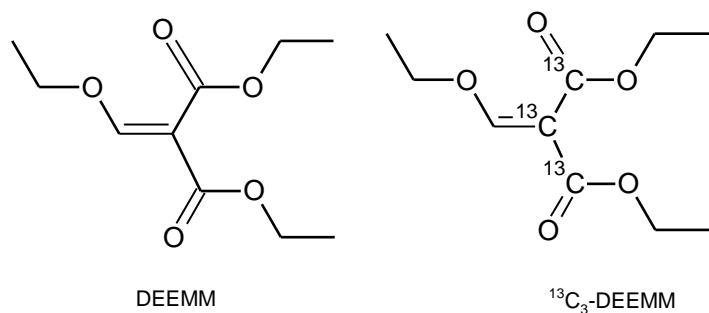
2. Kirjanduse ülevaade

2.1. DEEMM ja ^{13}C -märgistusega DEEMM

DEEMM on *push-pull* (lükka-tõmba) alkeen. Enim on levinud reaktsioon vinüülse etoksürühma asendamiseks nukleofiiliga (nt. aminohappega). Erinevatel tingimustel on sobivad nukleofiilid ka näiteks aniliinid, fenoolid ja teised alkoholid. Laialdasemat kasutust DEEMM-ga reageerimisel leiavad siiski aminoühendid. Seda kasutatakse näiteks aminorühmade kaitseks.³

Looduses esineb ^{12}C isotoope 98,90% ja ^{13}C isotoope 1,10%. Süsivesinike massispektrites vastab üks piik enim-levinud isotoobist koosnevale ühendile. Teine piik vastab ühendile, kus üks C aatom on asendatud ^{13}C isotoobiga (piigi suhteline kõrgus = $1,1\% \times n$, kus n vastab süsinike arvule molekulis. Seejuures mõjutab piigi kõrgust ka teiste elementide isotoopide olemasolu.⁴

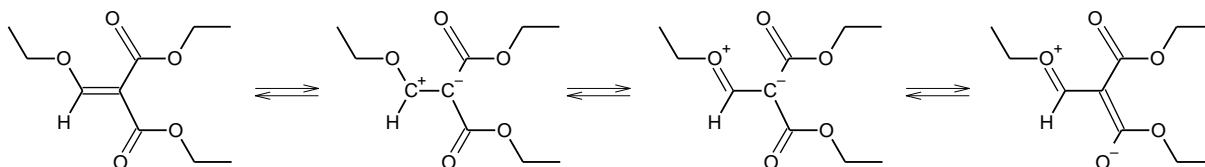
Isotoopmärgistusega reagenti sünteesil lähtuti kolme ^{13}C aatomiga lähteainet valides sellest, et märgistusega derivaadi piigid LC-MS analüüsi ei segaks. Töös kasutatakse nii isotoopmärgistusega kui ka isotoopmärgistusega DEEMM-i aminohapete derivatiseerimiseks. Joonisel 1 on välja toodud komertsiaalne DEEMM ja töös sünteesitud isotoopmärgistatud DEEMM.



Joonis 1. Isotoopmärgistusega (DEEMM) ja ^{13}C -märgistusega ühendi ($^{13}\text{C}_3$ -DEEMM) struktuurivalemid

Lükka-tõmba alkeenid on funktsionaalrühmadega alkeenid, millel on üks või kaks elektrondonoorset rühma ühes C=C sideme otsas ja teises üks või kaks elektronaktseptoorset rühma. Suurendatud π -elektroni delokalisatsioon muudab C=C sideme polaarsemaks ja π -side on võimeline moodustuma aktseptoorse ja dooorse rühmaga. Lükka-tõmba efekt mõjutab oluliselt ühendi reaktsioonivõimet.^{5,6}

Joonisel 2 on artikli^{5,6} põhjal toodud DEEMM-i resonantspiirstruktuurid. Donoorseks rühmaks on vinüülne etoksürühm, aktseptoorseid rühmad on mõlemad esterrühmad.



Joonis 2. DEEMM-i resonantspiirstruktuurid^{5,6}

2.2. DEEMM-i süntees ja puhastamine

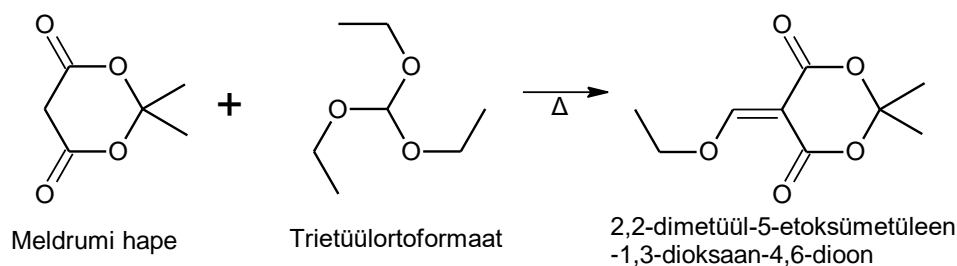
Kirjandusest eeskujuks võetud DEEMM-i sünteesi eeskiri:

Kolme kaelaga kolbi kaaluti veevaba ZnCl_2 (14 mg, 0,1 mmol, 0,007 ekv), trietüülortoformaat (TEOF) (4,45 g, 30 mmol, 2 ekv), äädikhappe anhüdriid (Ac_2O) (4,57 g, 45 mmol, 3 ekv) ja dietüülmalonaat (2,42 g, 15 mmol, 1 ekv). Ekvivalentides on aineid võetud vastavalt: 1 ekv malonaati, 2 ekv ortoestrit ja 3 ekv Ac_2O . Kolvi ühest kaelast juhiti sisse N_2 , teisega ühendati spiraaljahuti ja kolmandaga kuivatustuub. Reaktsioonisegu kuumutati 2 h 105–115 °C ja 7 h 120–127 °C juures. Seejärel jahutati segu toatemperatuurile ning lisati täiendav kogus ortoestrit (3 ml) ja Ac_2O (3 ml). Reaktsioonisegu kuumutati 2 h 140–145 °C ja 2 h 165–175 °C juures. Seejärel reaktsioonisegu jahutati ja destilleeriti mikro-Claiseni seadmega. Saagiseks hinnati 73%.^{7,8}

Vanemas, 1945. aasta artiklis⁹ uuriti põhjalikumalt etüülmalonaadi ja TEOF-i reaktsioonimehhanisme Ac_2O ja ZnCl_2 juuresolekul. Varasemalt arvati, et estrite vahel toimus kondensatsioonireaktsioon ja elimineerunud etanooli sidumiseks kasutati Ac_2O . Katsed kinnitasid, et ZnCl_2 puudumisel võib toimuda hoopis alküülimine, mille käigus moodustub etüülmalonaadi ja dietoksumetüülatsetaadi vaheline ester. ZnCl_2 lisamine nii pidurdas kõrvalprodukti teket, pööras alküülimisreaktsiooni ümber kui ka tõstis reaktsiooni saagist.⁹ Uuemates uurimistöodes on reaktsiooni saagiseks saadud üle 90%, kuid puudub ülevaade, kuidas reaktsioon läbi viidi. 2013. aastal avaldatud töös saadi saagiseks 97%.¹⁰

Reaktsioonis osalevate ainete eksperimentaalsed keemistemperatuurid on dietüülmalonaadil 200 °C, TEOF-i 147 °C, Ac_2O -i 139,5 °C.^{11–13} Sellest tulenevalt jäi selgusetuks, mis rolli osad temperatuuri muutmised etteantud reaktsioniskeemis mängisid ning vaadeldi antud etappide olulisust töö praktilises osas.

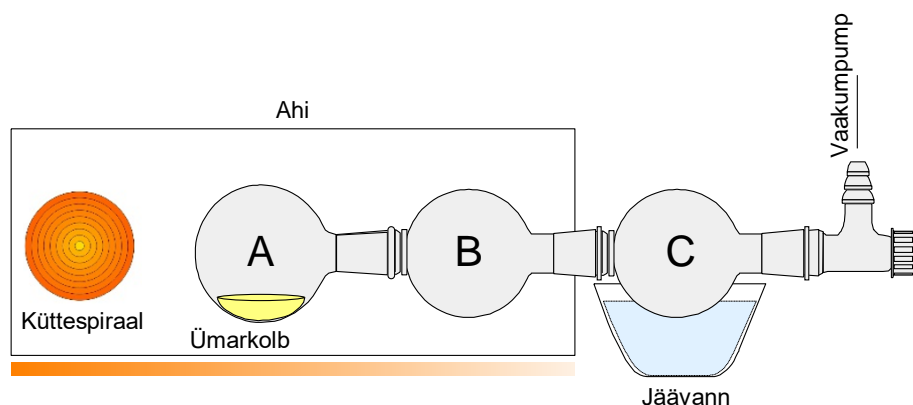
Kõrgeid saagiseid on saadud ka mitmetes malonaadi analoogi kasutanud töodes. Joonisel 3 toodud reaktsioniskeemi saagisteks on eri artiklites märgitud 86%¹⁴ ja 94%¹⁵. Kummaski reaktsioonis ei osalenud teisi reagente ja kuumutamine viidi läbi vaid mõne tunni jooksul 100–110 °C juures.^{14,15}



Joonis 3. Malonaadi analoogi ja ortoestri derivaadi sünteesireaktsioon^{14,15}

Produkti puhastamiseks kasutati *Kugelrorhi* (ka *bulb-to-bulb*) destillatsioonini. Tegu on lühitee destillatsiooniseadmega, mis on sobilik väikeste ainekoguste destilleerimiseks. Võimalikuks alternatiiviks reaktsioonisegu puhastamiseks on ka kromatograafia.

Destillatsiooniseadet (Joonis 4) saab kasutada ainete eraldamiseks alandatud rõhul (nt 10 mbar (1 mbar = 100 Pa)). Klaaskuulid on järjestikku ühendatud (mõlemas kuuli otsas on klaaslihv).¹⁶



Joonis 4. Kugelrorhi destillatsiooniseadme skeem. A – ümarkolb destilleeritava seguga, B ja C – destillaadi kogumise kuulid.¹⁶

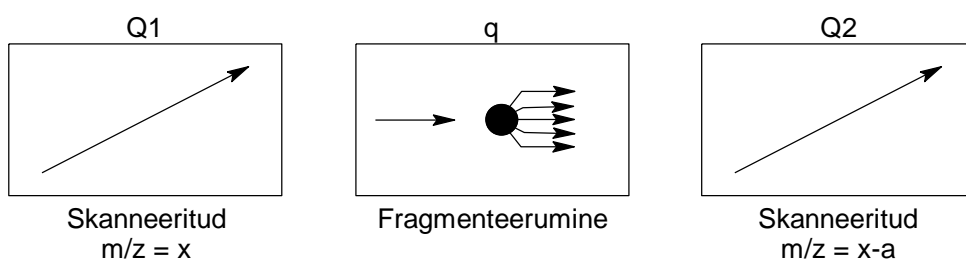
2.3. Derivatiseerimine LC-MS analüüsil

LC-MS analüüs on väga efektiivne, kui kasutada sihitud analüüsi (*targeted analysis*). Kui konkreetne otsitav aine pole teada, kuid otsitakse mingisse ainegruppi (nt. aminohapped) kuuluvaid ühendeis, siis on LC-MS võimalused märksa piiratamad. Tegu on avastusanalüüsiga (*non-targeted* või *un-targeted*). Kui kõigile ainegrupi ainetele liita ühesugune märgis (antud juhul amiinidele/aminohapetele DEEMM), saab LC-MS-i seadistada detekteerima vaid märgisega molekule. Selline analüüs võimaldab määrata selektiivselt kindasse ainegruppi kuuluvaid aineid väga tundlikult ja hea korratavusega.¹⁷

Kolme kvadrupoolse MS-ga saab detekteerimiseks kasutada neutraali kao skaneerimise (*neutral loss scan*) meetodit¹⁸. Sel juhul toimivad esimene ja kolmas kvadrupool massianalüsaatoritena (tähis Q) ning teine on pörkerakk (tähis q), kus toimub derivaadile iseloomulik fragmenteerumine. Seega on kvadrupoolid järjestuses QqQ. Fragmenteerumise

põhjustab pörkeraku kvadrupoolile rakendatud vahelduvpinge ja inertgaas, millega pörkuvad esimeses kvadrupoolis tekkinud ioonid.⁴

Neutraali kao skaneerimisel skaneerivad kvadrupoolid Q1 ja Q2 samaaegselt, kuid igal ajahetkel skaneerib Q2 kindla suuruse a võrra madalamat massi-laengu (m/z) suhet. Neutraali kao skaneerimist kasutatakse olukordades, kui pole ette teada kummagiiooni mass, aga on teada fragmenteerumisel eralduva neutraalse osakese mass a . Sel moel mõõdetakse Q1-s osakesi massi-laengu suhtega x ja Q2-s m/z $x-a$ (a tähistab neutraalse osakese massi) (vt. Joonis 5).⁴



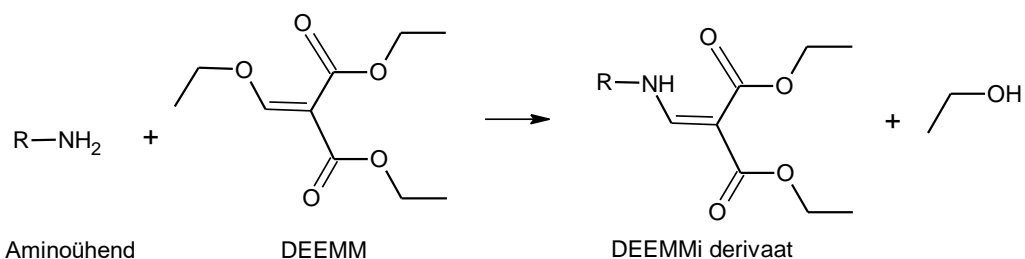
Joonis 5. Neutraali kao skaneering⁴

Aminohapped ja amiinid on elutähtsad ühendid. Pöördfaaskromatograafias on nende retentsiooniajad polaarsuse tõttu lühikesed, mistõttu on neid keeruline üksteisest ja teistest polaarsetest ühenditest lahutada. Derivatiseerimisega pikendatakse ainete retentsiooni, lisades aminohapetele mittepolaarsed osad. Lisaks parandab derivatiseerimine tänu hüdrofoobsuse suurendamisele ionisatsiooniefektiivsust elektropihustus-ioonallikas (ESI allikas).¹⁷

LC-MS puhul elueeruvad gradientelueerimisel derivatiseeritud aminohapped hiljem. Siis on ka orgaanilise komponendi sisaldus eluendis kõrgem, mis omakorda suurendab ioniseeruvust.¹⁷ See tuleneb sellest, et gradientelueerumisel on algul tilgad ESI allikas veerikkamad ja vee kogus väheneb vastavalt orgaaniliste eluendi komponendi osakaalu suurenemisele. Derivatiseeritud aminohapped elueeruvad aga piisavalt palju hiljem, et eluendi koostis oleks orgaanilise solventi poolest rikkam.

Ühtlasi võimaldab parem lahutus teistest komponentidest vähendada ESI maatriksiefekte. Olulisim maatriksiefekt antud metoodika puhul tuleneb asjaolust, et pöördfaas-kromatograafias elueeruvad väga paljud ained kiiresti (sealhulgas ka aminohapped), derivatiseerimine aga pikendab retentsiooniaega, millest tulenevalt mõjutab teiste komponentide poolt tekitatav maatriksiefekt analüüsi vähem.¹⁹

Derivatiseerimisreaktsioon toimub Gould-Jacobsi mehhanismi esimese kahe sammu alusel. Esmalt toimub kondensatsioonireaktsioon aminohappe ja DEEMM-i vahel, kus amiini nukleofiilne rühm ründab maloonhappe derivaati ja seejärel eraldub etanool (vt. Joonis 6).²⁰



Joonis 6. Derivatiseerimise reaktsiooniskeem ^{17,20}

2.4. Tuumamagnetresonantspektromeetria

Sünteesireaktsiooni optimeerimiseks jälgiti reaktsiooni kulgu tuumamagnetresonantspektromeetriga (TMR spektromeetriga). Vedelike TMR spektrist saab infot individuaalsete resonantside tugevuse (vastavuses vastava signaali andvate tuumade arvuga), keemiliste nihete (tuuma varjestatus tuuma ümbritseva elektronpilve tiheduse tõttu), spinn-spinn paardumine (omavahelise interaktsiooni, mis on otseses seoses signaalidelõhenemise, multiplertsusega jm), spinni relakseerumise (termilise tasakaalu taastamise) ja keemilise reaktsiooni (konformatsioonist ja keemilisest tasakaalust tulenevate efektide) kohta.²¹

Tuuma võimalike spinnolekute arvu määrab spinnkvantarv (I), mis on alati $\frac{1}{2}$ kordne (pool- või täisarv). Tuumad, mille $I = \frac{1}{2}$ on näiteks ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F . Oluline on ka ^2H (deuteerium D), mille $I = 1$. Tuumad, mille $I = 0$ on TMR jaoks inaktiivsed (nt ^{12}C , ^{16}O).²²

Tuumad ergastatakse, rakendades magnetvälja asetatud proovile raadiosagedusliku elektromagnetilise kiirguse impulssi. Spinnid saavad nüüd olla magnetväljaga samas või vastassihis. Keemilise nihkena võrreldakse uuritava tuuma signaali sageduse suhtelist erinevust standardtuuma signaali sagedusest. Sõltuvalt uuritavast tuumast on referentsageduseks vastavat tüüpi tuumade resonantsagedus. Keemilise nihke väljendamiseks kasutatakse ppm-i (miljondik osa).²²

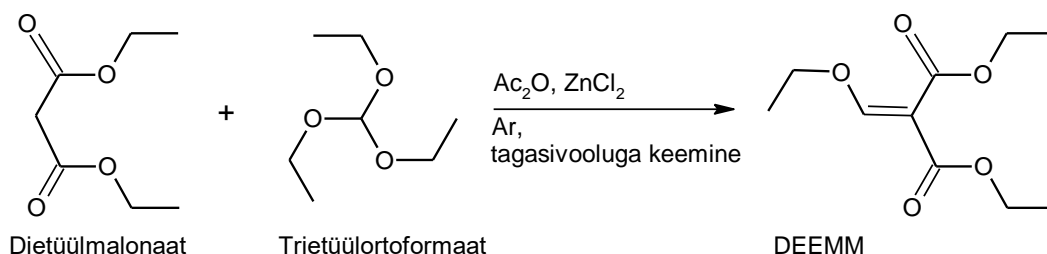
3. Töö eesmärgid

Bakalaureusetöös püstitatud eesmärgid:

- Optimeerida olemasolevat sünteesiprotokoll⁷ töös kasutatud ainekoguste jaoks sobivaks. Lõputöös teostati sünteesid kaaludes reagentide mmol-de suurusjärgus. Kõigi eri tingimustel läbi viidud sünteeside reagentide kogused jäid alla 1 grammi. Kirjanduses toodud eeskirjades kasutatud ainekogused olid aga tunduvalt suuremad, mistõttu oli oluline kohandada reaktsioon vastavaks, et seda saaks suure saagiseprotsendiga läbi viia ka väiksemate koguste korral.
- Leida efektiivseim viis algse sünteesi saaduse puhastamiseks, mis sobiks ka töö lõppjärgus ¹³C-märgistusega produkti puhul. Saaduse puhtus on oluline eelkõige derivatiseeriva reagenti kasutusel proovide kvalitatiivsel analüüsil LC-MS ja teiste sarnaste meetodite puhul.
- Sünteesida LC-MS analüüsimeetodiga kasutatavat ¹³C-märgistusega derivatiseeriv reagent. Sünteesitava ühendi ilma ¹³C-märgistusega ja ¹³C-märgistusega versioonid on välja toodud joonisel 1. See illustreerib, millised süsinikud isotoopasendatakse.
- Valmistatud ¹³C-märgistusega ühendi testimine aminohapete derivatiseerimiseks ja järgnev LC-MS analüüs.

4. Eksperimentaalne osa

Bakalaureusetöö eksperimentaalne osa koosnes DEEMM-i sünteesireaktsiooni optimeerimisest ja järgnevast puhastamisest. Reaktsioon põhines varasemalt kirjanduses kasutatud ja väga kõrget saagist saavutatud reaktsiooniskeemil (vt. Joonis 7).²³



Joonis 7. DEEMM-i sünteesiskeem²³

4.1. Kasutatud kemikaalid ja seadmed

Sünteesiks kasutatud reagentid ja nende puhtusastmed on esitatud tabelis 1. Reaktsiooni toimumise kontrolliks ning lõppühendi kinnitamiseks, iseloomustamiseks ja puhtuse kontrollimiseks kasutati Bruker Avance III 700 TMR spektromeetrit (¹H sagedus 700,1 MHz, ¹³C sagedus 176,0 MHz). ¹³C spektrite mõõtmisel kasutati kahte erinevat pulsiprogrammi, mille abil mõõdeti vastavalt ¹H-lahtisidestatud (tähistatakse {¹H}) ja ¹H-lahtisidestamata ¹³C TMR spektreid. Saaduse puhastamiseks kasutati BÜCHI klaasahju (*Glass Oven*) B-585. LC-MS analüüsiks kasutati Agilent 1290 Infinity vedlikkromatograafi ja Agilent 6495 QqQ massispektromeetrit ESI ionallikaga. Kromatograafiliseks analüüsiks kasutati kolonni ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1×50 mm, 1,8 μm), mida hoiti 40 °C juures, sisestatud proovi ruumala 2 μl. Mobiilne faas koosnes 0,1% sipelghappe vesilahusest (A) ja atsetonitriilist (2,5 l kohta lisatud 100 ml MilliQ vett) (B). Mõõtmistel kasutati lahusti B jaoks järgnevat gradienti: 0–2 min, 10%; 2–17 min, 10–100%; 17–19 min, 100%; 19–21 min, 100–10%¹⁷. Koos stabiliseerimisajaga kulus üheks mõõtmiseks 22 min. Eluendi voolukiirus oli 0,3 ml/min. Ioonallika parameetrid olid järgnevad: gaasi temperatuur 200 °C, pihustusgaasi (*nebulizer*) voolukiirus 14 l/min, pihustusgaasi rõhk 20 psi (137,9 kPa), ümbrisgaasi (*sheath gas*) temperatuur 350 °C ja voolukiirus 11 l/min, kapilaari pinge 3000 V, düüsi (*nozzle*) pinge 0 V. Neuraali kao skanneering mõõdeti neutraali kaoga 46 m/z piirkonnas 60–500. Fragmentatsioon 380 V ja pinge põrkerakus 8 V.

Tabel 1. Kasutatud ained ja nende puhtusaste

Aine	Tootja	Puhtusaste
Dietüülmalonaat Lot: STBB5657V	Sigma-Aldrich	99,7%
Dietüülmalonaat-1,2,3- ¹³ C ₃ Lot: MBBC3307	Aldrich	99% aatomitest ¹³ C (vt. Lisa 1)
TEOF Lot: STBC7977V	Fluka	≥98%
TEOF (UUS) Lot: 2348011	Thermo-scientific	99,34%
Ac ₂ O Lot: I354S	Honeywell/Fluka	≥99%
ZnCl ₂ Lot: SZBA2880V	Sigma-Aldrich	≥98%
3 Å molekulaarsõelad Lot: JWN7364	Wako	Aktiveerimata, otse purgist
p-tolueensulfohape Lot: BCCF5039	Sigma-Aldrich	99,5%
4 Å molekulaarsõelad Lot: 1706197	Fisher Scientific	Aktiveeritud, kuivkapis
Diklorometaan Lot: K3530S	Honeywell	≥99,9%
p-aniisaldehyüd Lot: 93F-3443	Sigma	Ei ole pakendil välja toodud
Deutereeritud kloroform Lot: B17122	Deutero	99,8%
1,4-dimetoksübenseen Lot: A0382270	Thermo-Fisher	≥99% (vt. Lisa 2)
Tolueen (veevaba) Lot: STBD4514V	Sigma-Aldrich	99,8% (vt. Lisa 3)
Tolueen (kuiv) Lot: QE637457	ROMIL Pure Chemistry	>99,9% <0,001% veesisaldus Molekulaarsõelte kohal, kuivkapis
Deutereeritud kloroform 99,95% + 0,03% TMS (¹³ C sünteesiproducti analüüs) Lot: B16936	Deutero	99,5%
Heksaan Lot: 34042	OmniSolv	88,62%
Etanool Lot: N2840	Honeywell	≥99,8%
Sipelghape (kasutati 0,1% vooluti tegemiseks) Lot: K0920	Honeywell	99,9%
Atsetonitriil, kuhu lisatud MilliQ Lot: N055M	Honeywell	>99,9%
MilliQ vesi		T = 28,7 °C R = 18,2 MΩ×cm @ 25 °C

		TOC = 1,8 ppb
membraanfilter d = 4 mm, d(poor) = 0,2 µm Lot: 223901037	Phenomenex	HPLC/GC heakskiit

4.2. Kasutatud reaktsioonisüsteem

Sünteesi optimeerimisel kasutati algselt kahte erinevat reaktsiooninõud: 5 ml ümarkolbi ja rõhunõud. Kolvi kohale seati jahuti ning peale juhiti argooni (Ar) inertgaasina. Rõhunõu täideti enne kuumutamist Ar inertgaasiga ning süntees viidi läbi kinnises süsteemis.

Alates 12. sünteesist kasutati reaktsioonisüsteemi²⁴, kus kolvi kohal oleva tilklehtri kraani kohal olid molekulaarsõelad (Lisa 4). Reaktsioonides 12–18 kasutati 3 Å ning 19–25 4 Å molekulaarsõelu.

Reaktsioonisüsteem võeti kasutusele, sest väikeste ainekoguste puhul ei ole efektiivne reaktsioonisegust veest, etanoolist ja teistest ühenditest vabanemiseks kasutada üldlevinud *Dean-Starki* seadet. Väiksemate ainekoguste jaoks kohandatud reaktsioonisüsteemi puhul olid kirjanduses toodud reaktsioonisaagised vastavalt 67% võrreldes *Dean-Starki* seadmega 55–61% (olenevalt solvendikogusest 5–30 ml). Kasutatud reaktsioonisüsteemis asetatakse kolvi kohale tilklehter. Kraani kohal on vatt või klaasvill, mis tagab selle, et kraani avamisel ei kukuks molekulaarsõelad reaktsioonikolbi (kus need võivad laguneda olenevalt reaktsiooninõus olevast temperatuurist või magnetpulga pöörlemisest).²⁴

Artiklis toodi välja, et optimaalne reaktsiooninõus olev solvendi kogus võiks olla väikeste ainekoguste puhul 5–30 ml (vee sidumise protsent oli nende koguste juures 4 Å molekulaarsõelu kasutades võrdväärne). 2 ml puhul mõjutas efektiivsust solvendi keemise käigus ära lendamise hulk võrreldes suuremate ainekogustega.²⁴

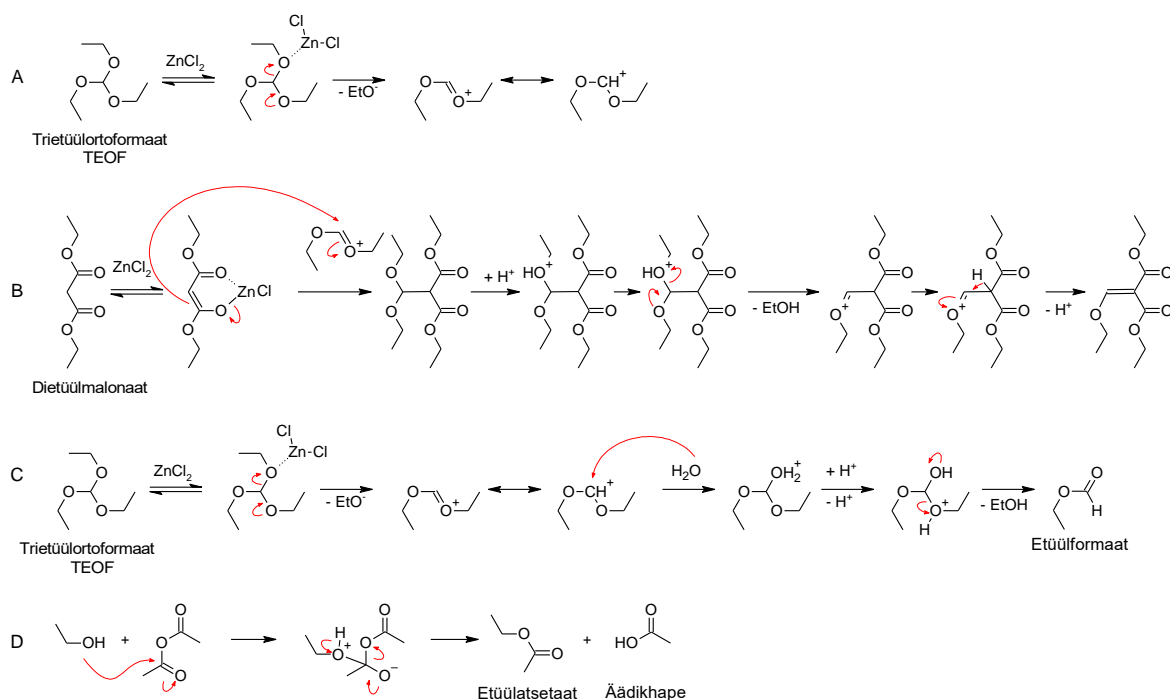
4.3. DEEMM ja ¹³C₃-DEEMM sünteesieeskiri

Reaktsiooni optimeerimiseks viidi reaktsiooni läbi korduvalt. Limiteerivaks reagendiks valiti dietüülmalonaat, sest töö edasistes etappides oli see ¹³C-märgistusega lähteaineks.

Üldjoontes saab reaktsiooniparameetrid jaotada kolmeks: reaktsioon viidi läbi kolvis, rõhunõus või kaaluti ained kuivkapis. Esimesena kaaluti ZnCl₂, sest seda kaaluti katalüütiline kogus ja vastasel korral oleks olnud raske hinnata lisatud kogust. Seejärel kaaluti dietüülmalonaat, mille koguse põhjal suurendati vajadusel vastavalt kaalutava TEOFi ja Ac₂O hulka. Üldjuhul kuumutati reaktsioonisegusid vähemalt ühe ööpäeva vältel. Reaktsioon viidi läbi argoonivoolus. Süsteemis olev õhk vahetati vakumeerimistsükli (600 mbar) ja Ar sissejuhtimise

abil välja. Tabelis 2 on tingimuste all välja toodud õlivanni temperatuur. Alates molekulaarsõelte kasutuselevõttust reguleeriti õlivanni temperatuuri vastavalt sellele, et toimuks tagasivooluga keemine. See oli oluline, et molekulaarsõelad saaksid aseptroopse tolueni poolt kaasa võetava vee endaga siduda. Selleks pidi aseptroopne toluen jahutis kondenseeruma. Tilklehtri lisamine süsteemi pikendas tunduvalt tolueni teekonda jahutini, mistõttu oli kasutatav temperatuur ka varasemast kõrgem.

Võimalikud reaktsioonimehhanismid on nähtaval joonisel 8. Reaktsioon A tähistab $ZnCl_2$ kui - Lewis happe rolli TEOFi reaktsioonivõimelise vaheühendi tekkel. Reaktsioonireal B sünteesireaktsiooni mehhanismi, kus TEOFi reaktsioonivõimeline vaheühend reageerib $ZnCl_2$ poolt aktiveeritud dietüülmalonaadiga ning etanooli elimineerimisel tekib DEEMM. C tähistab TEOF-i reaktsioonivõimelise vaheühendi reageerimist veega ning etüülformaadi teket. D näitab Ac_2O rolli kõrvalproduktina tekkiva etanooli (joonisel 8 reaktsioon B) sidumisel. $ZnCl_2$ roll Lewis happeks on sünteesieskirjas toimida elektrofiili ja katalüsaatorina. Lisaks joonistus TMR spektrites välja ka kõrvalproduktina tekkiva etüülatsetaadi piik.



Joonis 8. Reaktsioonimehhanismid. A – TEOF-i reaktsioonivõimelise vaheühendi teke, B – Dietüülmalonaadi aktiivse vaheoleku teke ja üleminek DEEMM-ks reageerimisel TEOF-ga, C – TEOF-i reaktsioonivõimelise vaheühendi teke ja reageerimine veega, D – Ac_2O roll etanooli sidumisel.

Algne reaktsiooneeskiri:

Ekvivalentides aineid vastavalt: 1 ekv dietüülmalonaati, 2 (+1,5) ekv ortoestrit (TEOF) ja 3 (+2) ekv Ac_2O . ZnCl_2 on katalüütiline kogus. Kuumutati 2 h 105–115 °C ja 7 h 120–127 °C juures, lisati TEOF-i ja Ac_2O ning kuumutati veel 2 h 140–145 °C ja 2 h 165–175 °C juures.⁷

Tabelis 2 on temperatuur (T) märgitud kui õlivanni temperatuur. Reaktsioonides, kus on kasutatud tolueni solvendina on piiravaks tolueni keemistemperatuur (110 °C). Tulemuste all on välja toodud tekkinud DEEMMi ja reageerimata jäänud dietüülmalonaati suhe.

Tabel 2. Reaktsiooni optimeerimise koonddtabel

Nr.	Reaktsiooni-nõu	Muutus ainekogustes võrreldes algeeskirjaga	Tingimused	Aeg	Tulemus	Kommentaariid
1.	Kolb	Algeeskiri	Ar voolus T = 110–115 °C T ~ 120 °C	1 h 21 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,65)	Eesmärk näha kui optimeeritud kirjandusest võetud eeskiri.
		(+0,5 ekv TEOF, 1 ekv Ac_2O)	T ~ 145 °C T ~ 155 °C	20 min 2 h 40 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,31)	Edasine kuumutamine parandas konversiooni, aga dietüülmalonaat ei reageerinud lõpuni.
2.	Kolb	1 ekv TEOF	T = 115–120 °C, Ar voolus	24 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:1)	DEEMM-i tekkinud võrdselt võrreldes dietüülmalonaadi reageerimise hulgaga.
		+ 1 ekv TEOF	T = 115–120 °C, Ar voolus	49 h 25 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,35)	Konversioon paranes, aga rohkem kõrvalsaadusi.
3.	Rõhunõu	2 ekv TEOF	T = 120–130 °C, suletud	48 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,25)	Rõhunõu kummifilter (FETFE) ülessulanud ja lagunened.
4.	Kolb	4 ekv TEOF 4 ekv Ac_2O	T = 120–125 °C, Ar voolus	47 h 5 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,55)	Ac_2O koguse suurendamine ei avaldanud reaktsiooni konversioonile positiivset mõju.
5.	Rõhunõu	3. kordus	T = 120–125 °C, suletud	46 h 35 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,95)	Kordusreaktsioon ei õnnestunud nii hea konversiooniga kui eelmisel korral.

6.	Kolb	4 ekv TEOF	T ~ 130 °C, Ar voolus	48 h 40 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:2,22)	Ac ₂ O koguse vähendamine võrreldes 4. reaktsiooniga, avaldas konversioonile negatiivset mõju.
7.	Rõhunõu	4 ekv TEOF	T ~ 130 °C, suletud	47 h 35 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:4,23)	Võrdluskatse 6. reaktsiooniga, rõhunõu kasutamine ei andnud paremat tulemust.
8.	Rõhunõu	6. kordus	Suletud T = 110–115 °C T ~ 120 °C	1 h 22 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,55)	Eesmärk näha TEOF-i lisamise ja T tõstmise mõju reaktsioonile.
		+ 1 ekv TEOF	T ~ 145 °C T ~ 155 °C	20 min 2 h 40 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,45)	TEOF-i lisamine parandas veidike DEEMM-i teket.
9.	Kolb	Lisamisreaktsioon: 2 ekv TEOF	T = 115–120 °C, Ar voolus	1 h 30 min	DEEMM-i ei tekkinud	TEOF-i lisamine läbi septimi. DEEMM-i ei tekkinud.
		+ 1,5 ekv TEOF, kat. kogus ZnCl ₂	T = 115–120 °C	1 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:28,13)	1 h kuumutamise jooksul tekib väga vähe produkti, vajalik pikem kuumutusaeg.
Kuivkapis kaalutud						
10.	Rõhunõu	2. kordus 0,07 ekv ZnCl ₂	T ~ 115 °C, suletud	22 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,41)	Reaktsioonisegu põhjas valge kogum, pinnal läbipaistev lahus.
			T ~ 115 °C	96 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:0,68)	Tekkinud DEEMM hakkas lagunema lähteaineteks ja kõrvalproduktideks.
11.	Rõhunõu	Ainult: 1 ekv malonaati 4 ekv TEOF	T ~ 155 °C, suletud, Foolium ümber	22 h 40 min	DEEMM-i ei tekkinud	Eesmärk näha Ac ₂ O ja ZnCl ₂ vajalikkust, Kollane läbipaistev lahus. Võrdluskatse Meldrumi happe reaktsiooniga ^{14,15} .
12.	Reaktsiooni- süsteem	4 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 3,5 ml tolueni	T ~ 155 °C, Ar voolus, 3 Å molekulaar- sõelad, Foolium ümber		Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks	Vee sidumine molekulaarsõeltega aseotroopse tolueni abil, helekollane läbipaistev lahus. Esimene kord kui konversioon täielik.

13.	Reaktsiooni-süsteem	3 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 4 ml tolueni	T ~ 155 °C, Ar voolus, 3 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	~ 96 h	Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks	Solvent lendus ära, alles tumepruun lahus. Kõrvalsaadusi rohkem.
Kuivkapis kaalutud, uus TEOF						
14.	Reaktsiooni-süsteem	3,5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 5 ml tolueni	T ~ 135 °C, Ar voolus, 3 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	39 h 45 min	DEEMM-i ei tekkinud	Valkjat tooni segu. DEEMM-i ei tekkinud
15.	Kolb	3,5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 5 ml tolueni 2 spaatlit 3 Å molekulaarsõelu	T ~ 135 °C, Ar voolus, Foolium ümber	47 h	Produkti ja malonaadi piigid ei olnud tavapärase kujuga, mistõttu ei saa tulemust anda (arvatavasti põhjustatud molekulaarsõelade sogast)	Eesmärk näha, kas molekulaarsõelad suudavad vett siduda reaktsioonikolvis olles. Molekulaarsõelad lagunesid magnetsegaja tõttu, mistõttu oli TMR spekter tavapärasest erinev ega tulemust ei saanud anda.
16.	Reaktsiooni-süsteem	3,5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 5 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 3 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	21 h 5 min	Lahuses: DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:2,67) Sade: DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:1,66)	12. kordus Kollane lahus, lahuse kohal kolvi seintel oranž sade – arvatavasti osa toluenist lendus (leke) ja seetõttu vähenes tase kolvis.
17.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 10 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 3 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	48 h 52 min	Lahuses: Dietüülmalonaat reageeris lõpuni Sade: DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (0,4:0,5)	12. kordus Oranž lahus, põhjas sade, kõrgemal kolvi seintel ka sade. Sade ei lahustunud ei kloroformis ega toluenis.
18.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,1 ekv p-toluensulfohapet	T = 50–55 °C, Ar voolus,	4 h	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:7,25)	Lewise hape asendatud toluensulfohappega ²⁵ . Ac ₂ O ei

			3 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber			lisatud. Konversioon võrreldes varasemaga kehv.
				50 h 52 min	DEEMM + reageerimata dietüülmalonaat (1:7,04)	Kuumutamist jätkati, et näha, kas see parandab reaktsiooni konversiooni – mitte märkimisväärselt.
19.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	49 h 35 min	Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks Saagis pärast puhastamist 192,9 mg (~ 86%)	12. kordus Kasutati aktiveeritud ja kuivkapis hoitud 4 Å molekulaarsõelu. Reaktsioonisegu kollane lahus. Kolvi ja tilklehtri lihvi ümber teflonteip kadude vähendamiseks. Viidi läbi puhastamine <i>Kugelrohri</i> destillatsioonil ning järgnev qTMR analüüs
20.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	42 h 50 min	TMR-i proov pärast puhastamist, DEEMM-i ei olnud	19. kordus Kollane lahus Kolvi ja tilklehtri lihvi ümber teflonteip kadude vähendamiseks. TMR-i proov võeti pärast puhastamist, DEEMM-i ei olnud.
21.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	49 h 55 min	Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks	19. kordus Lihvide ümber teflonteip kadude vähendamiseks. Kollane lahus, tunduvalt vähenenud (leke). Konversioon täielik.
22.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni	T = 160–165 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	46 h 45 min	Katse ebaõnnestus, sest kolvis oli mõra ja proov segunes õlivanni õliga.	19. kordus Lihvide vahel ja ümber teflonteip kadude vähendamiseks. Katse ebaõnnestus.

23.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni	T = 165–170 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	42 h 50 min	DEEMM-i ei tekkinud.	19. kordus Kolvi ja tilklehtri ning tilklehtri ja jahuti lihvide vahele teflonteip kadude vähendamiseks. Reaktsioonisegu värvusetu, silmnähtavat lahuse vähenemist ei ole. DEEMM-i ei tekkinud.
24.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 15 ml tolueni (kuivkapist)	T = 155–160 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	~ 24 h	Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks	19. kordus Lihvide vahel ja ümber teflonteip kadude vähendamiseks. tunduvalt langenud. Konversioon täielik.
25.	Reaktsiooni-süsteem	5 ekv TEOF 0,037 ekv ZnCl ₂ ~ 5 ml tolueni (kuivkapist)	T = 175–180 °C, Ar voolus, 4 Å molekulaar-sõelad, Foolium ümber	42 h 20 min	Dietüülmalonaat reageeris lõpuni DEEMM-ks	19. kordus Tolueni pandi tunduvalt vähem, et reaktsioonisegu oleks kontsentreeritum, sellest tulenevalt oli tagasivoolamiseks vajalik keemistemperatuur ka varasemaga võrreldes kõrgem. Lihvide vahel ja ümber teflonteip kadude vähendamiseks. Tolueni tase veidike langenud, kollane lahus. Konversioon täielik.

¹³C₃-DEEMM-i süntees

¹³C₃-dietüülmalonaadi (kogumass 250 mg) vial loputati kogu lähteaine kättesaamiseks ligi 10 ml kuiva toluueniga. Tolueeni ja lähteaine kogumass oli 9,27 g. Sünteesi ühekordseks läbiviimiseks oli mõõdeti 3,09 g lähteaine lahust toluuenis. Ühe reaktsiooni jaoks kasutatavale 1 ekv-le vastas 83 mg malonaati (0,52 mmol).

Reaktsioonisüsteemis kasutati 4 Å molekulaarsõelu. ¹³C₃-dietüülmalonaat (0,5 mmol, 1 ekv), TEOF (4,3 ekv), Ac₂O (2,14 ekv), 3 mg ZnCl₂ (0,04 ekv).

Solvendina kuiv toluuen ligikaudu 3,3 ml (mis kasutati varasemalt dietüülmalonaadi üleviimiseks, eraldi juurde ei lisatud).

Temperatuuriprogramm (46 h ja 30 min 170 °C), foolium ümber.

Reaktsioonisegu pärast kuumutamist: kollane lahus, solvendikogus alanenud.

4.4. Reaktsiooni toimumise kontroll

Reaktsiooni toimumise efektiivsust ja saaduse teket kontrolliti TMR spektromeetriga. Proovi analüüsiti deutereeritud kloroformis.

Antud meetodika valiti, sest TMR on kasutatav nii kvantitatiivseks kui ka kvalitatiivseks analüüsiks. See ei vaja referentsaineid (analüüdile identset võrdlusainet), sest levinumatest ainetest on olemas andmebaasides spektrid, mille põhjal saab tulemusi interpreteerida. TMR-i eeliseks on, et lisaks ¹H ja ¹³C spektritele kergendavad mitmedimensionaalsed spektrid ka andmebaasides mitte leiduvate ainete tuvastamist. TMR signaalide põhjal jälgiti lähteainetele vastavate signaalide kadumist ja saadustele vastavate teket. DEEMM-i teket kontrolliti piigiga, mille keemiline nihe on ligikaudu 7,6 ppm-i ¹H spektris. See piik vastab etoksümetüleenrühma (Et-O-CH=C) vesinikule (vt. Joonis 16) ja ei lange oma asukohalt ühegi teise piigiga kokku, mistõttu on seda hea jälgida ja interpreteerida. Sama tingimuse alusel vaadeldi vastavalt 3,4 ppm juures dietüülmalonaadi ja 5,15 ppm juures ortoestri kadumist. Mõõdetud spektritel määrati kõik suuremad signaalid ja need omistati reaktsiooniseigus olevatele ning tekkivatele komponentidele. Interpreteerimiseks mõõdeti nii lähteainete (dietüülmalonaadi, TEOFi, Ac₂O) kui ka kommertsiaalse DEEMM-i TMR-i spektrid ning võeti eeskujuna andmebaasist *AIST: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)*²⁶.

Alternatiivsed meetodid reaktsiooni toimumise jälgimiseks on näiteks õhukese kihi kromatograafia (TLC), LC-MS ja GC-MS. Lihtsam variant reaktsiooni toimumise määramiseks oleks TLC plaat. Tänu sobivate referentsainete olemasolule viidi ka TLC-analüüs läbi. Sobivaks eluendiks osutus etüülatsetaat heksaanis (2%). Dietüülmalonaat pole UV tundlik, mistõttu kasutati ilmutamiseks esmalt fosfomolübdeenhapet etanoolis (1%). See aga ei andnud pärast

kuumutamist visuaalselt tuvastatavat tulemust. Uue ilmutina võeti kasutusele p-aniisaldehyüdi, etanooli, äädikhappe ja kontsentreeritud väävelhappe lahus. See andis kuumutamise järgselt õrna laigu. TLC plaadi kasutamisest loobuti, sest analüüsitavad laigud olid nõrgad ning nende põhjal ei olnud võimalik otsustada, kas reaktsiooni konversioon oli piisav.

LC-MS ja GC-MS oleksid samuti sobinud reaktsiooniseгу analüüsimiseks, aga segus olevate ainete rohkuse ja standardainete puudumise tõttu oleks olnud neid keerulisem interpreteerida.

4.5. Reaktsiooniproducti puhastamine

Reaktsioonisaaduse puhastamiseks kasutati *Kugelrohri* destillatsiooni. Destillatsioon viidi läbi rõhul 10 mbar ja kahe kuuliga (üks ahjus sees ja teine väljaspool) (vt. Joonis 4). DEEMM-i keemistemperatuur 10 torri (u 13,3 mbar) juures 135–140 °C²⁷.

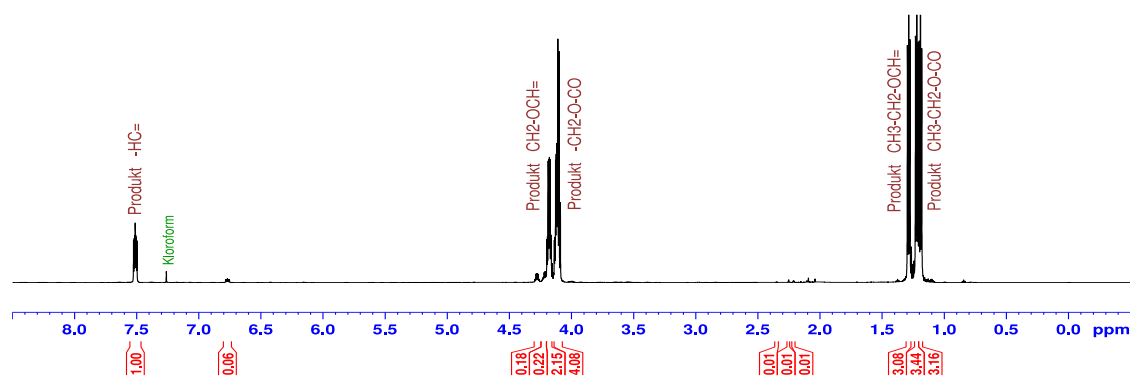
Eksperimentaalselt DEEMM-i keemistemperatuuri määramiseks alandatud rõhul (10 mbar), *Kugelrohri* seadme tundmaõppimiseks ja meetodi efektiivsuse hindamiseks viidi esmalt läbi kommertsiaalse DEEMM-i vaakumdestillatsioon. Algselt võeti ümarkolbi 194,6 mg DEEMM-i. Kuumutamist alustati 0 °C juures ning pöörlemiskiiruseks valiti 50 rpm-i. Kui ahju temperatuurinäidik tõusis 100 °C-ni jätkati temperatuuri tõstmist 10 °C võrra kuni 165 °C-ni. 140 °C juures oli märgata kolvi ja esimese kuuli vahelises kitsamas kohas udu teket. 150 °C juures tekkis esimene tilk ja kommertsiaalse DEEMM-i keemistemperatuur jäi vahemikku 150–155 °C. Destillatsiooni saagiseks oli 192,9 mg DEEMM-i (99,1%).

Reaktsiooniproducti täiemahuline puhastamine viidi läbi 19. reaktsiooniga. Esmalt kasutati rotaatoraurustit toluenenist vabanemiseks. Sellele järgnevalt viidi läbi *Kugelrohri* destillatsioon. Destillaatide väljapesemiseks kasutati diklorometaani, millest vabaneti rotaatoraurustil.

¹³C-märgistusega reaktsiooniproducti puhastamine viidi läbi järgnevalt. Esmalt analüüsiti proovi varem kasutamata kloroformis TMR-ga. Seejärel kasutati rotaatoraurustit toluenenist ja kloroformist vabanemiseks. Vesivanni temperatuur oli 41 °C, vaakumpump alustades 100 mbar, järk-järgult alandades 15 mbar-ni. Sellele järgnevalt viidi läbi *Kugelrohri* destillatsioon. Kuumutamist alustati 50 °C juures ning pöörlemiskiiruseks valiti 50 rpm-i. Küttekeha temperatuuri tõsteti 5 °C sammuga 105 °C-ni. Reaktsioonikolvis oli aurufaas nähtav 80 °C juures. 105 °C juures oli keskmises kuulis nähtav aur ja jäänõu kohal olevasse tekkinud tilk. Süsteemil lasti pööreldes jahtuda 57 °C-ni. Seejärel eemaldati kuulidest destillaat diklorometaaniga. Kuulid puhastati atsetooniga ning ühendati uuesti seadmega. Seejärel alustati kuumutamist 100 °C juures ning pöörlemiskiiruseks valiti 50 rpm-i. 133 °C juures täheldati reaktsioonikolvis auru teket ja tilku seintel. Kuumutamine lõpetati 165 °C juures. Reaktsioonikolvi seintel oli alles peenike pruun riba. Süsteemil lasti taas enne lahti ühendamist

pöörlemisrežiimis alla 60 °C jahtuda. Saadus pesti diklorometaaniga kolbi. Reaktsiooniprodukt puhastati rotaatoraurusti abil diklorometaanist ning sellele järgnevalt viidi läbi TMR analüüs. Proov pesti hiljem tagasi reaktsioonikolbi ning puhastati rotaatoraurusti abil lõplikult diklorometaanist ja kloroformist. Vesivanni temperatuuriks seadistati 41 °C, vaakumpump 700 mbar, alandades järk-järgult esmalt 600 mbar-ni ja edasi kuni 20 mbar-ni.

¹³C-märgistusega DEEMM-i süntees viidi läbi vastavalt optimiseeritud reaktsiooniskeemile. Lähteainena võeti 82,8 mg ¹³C-märgistusega dietüülmalonaati. TMR analüüsi ¹H spektri põhjal hinnati produkti lõplikuks puhtuseks 90% (vt. Joonis 9). Arvestades, et produktide kogumass puhastamise järgselt oli 102,2 mg, järeldati, et saadud ¹³C₃-DEEMM-i mass on 92 mg. Sellest tulenevalt saadi isotoopmärgistatud DEEMM-i sünteesireaktsiooni hinnanguliseks saagiseks 80%. Lisa 6 ja 7 on välja toodud kasutatud TMR-i mõõtmisparameetrid ¹³C-märgistusega DEEMM-i ¹H ja ¹³C spektrite mõõtmisel.



Joonis 9. Puhastatud isotoopmärgistatud sünteesiprodukti ¹H TMR-spekter

Isotoopmärgistatud reaktsioonisaadusele teostati ka kõrglahutuse-massispektromeetiline (HRMS) analüüs. Lisa 5 on välja toodud üleval proovi massispekter ning all simuleeritud massispekter. Analüüs kinnitab, et saadi õige produkt. Protoneeritud produkti täpseks massiks saadi 220,1190 m/z ja arvutuslikuks massiks 220,1171 m/z. ¹³C₃-DEEMM-i täpne mass on 219.109838 Da.

4.6. Aminohapete analüüs derivatiseerimisega LC-MS meetodil

Derivatiseerimisega pikendatakse aminotühendite retentsiooni, lisades aminohapetele mittepolaarsed osad. DEEMM-ga derivatiseerimise üldskeem on välja toodud joonisel 6.

Derivatiseerimiseks võeti eeskujuna Maciel et al. 2021. aasta artiklist ¹⁷. Derivatiseerimine viidi läbi toatemperatuuril 2 ml Eppendorfi viaalides. 588 µl proovile (tühiproovis 0,1 M HCl vesilahus) lisati 758 µl boraatpuhvit (0,75 M, pH 9), millele lisati 3 mg DEEMM-i (20 µl

DEEMM:EtOH 15:85 lahust, hiljem 60 µl DEEMM:EtOH 15:285 lahust). Segu segati ja sel lasti pimedas seista vähemalt 45 minutit. Reaktsioonisegu filtreeriti läbi 4 mm diameetriga, 0,20 µm poori diameetriga filtri.

Olulisim muudatus võrreldes artikliga¹⁷ oli 7 µl DEEMM-i asemel 3 µl kasutuselevõtt. See lähtus eelkõige soovist ¹³C-märgistusega DEEMM-i mitte liigselt kulutada. Nii väikest kogust ei saa aga analüütiliselt väga täpselt mõõta ja sellega võivad kaasneda teatavad produkti kaod (oluline isotoopmärgistuse puhul). Seetõttu tehti kommertsiaalse DEEMM-ga esmalt 100 µl lahused 5 proovi jaoks. Automaatpipetiga kanti viaali 85 µl etanooli, millele lisati 15 µl DEEMM-i, seejuures segati lahus esmalt pipetiga segi, et vältida kadusid. Seejärel kanti proovi 20 µl lahust. Hilisemate proovide puhul tehti DEEMM:EtOH 15:285 lahus, millest kanti proovi 60 µl.

¹³C₃-DEEMM oli algselt kollase värvusega lahuse kujul (102,2 mg, millest produkti ligikaudu 92 mg). See kanti kolvist analüütiliselt automaatpipetiga üle 1800 µl EtOH-ga (200 µl kaupa). Soovides proovi viia 3 mg ¹³C₃-DEEMM-i, tuleb lahust võtta 60 µl. Seega piisaks saadud produktist derivatiseerimise läbiviimiseks 30-l korral. ¹³C₃ DEEMM-i ja etanooli lahust säilitati -18 °C juures sügavkülmas.

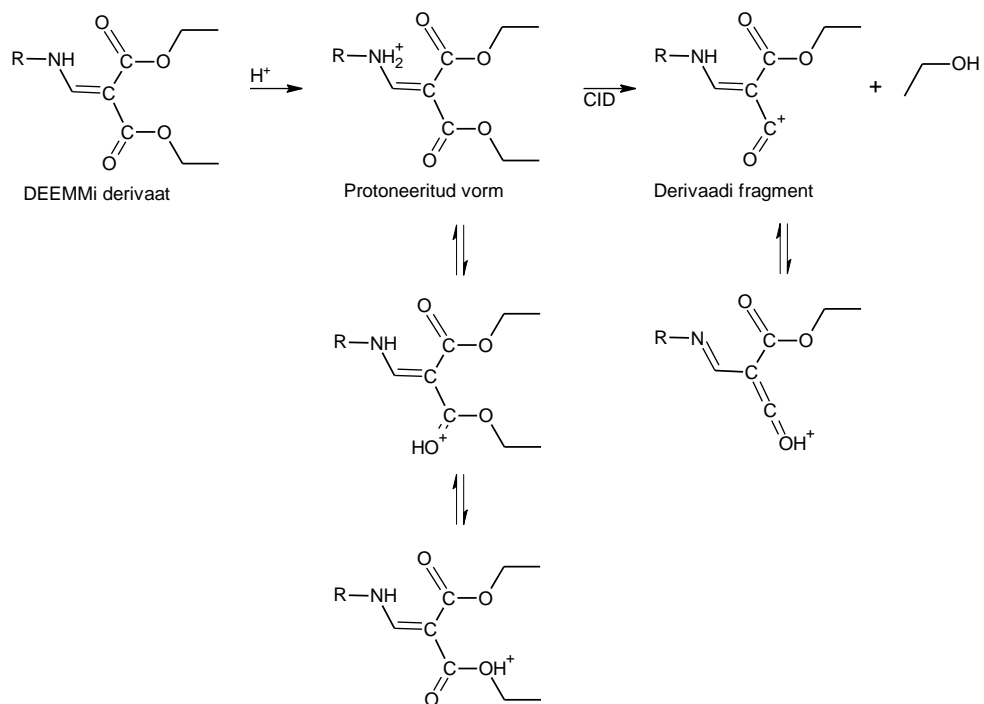
Esmalt viidi derivatiseerimine läbi standardlahustega. Seejuures testiti, kas 3 µl kommertsiaalset DEEMM-i on piisav proovikoguse derivatiseerimiseks.

Prooviks valiti FoodStudio valmis kanapuljong²⁸. Selle toitumisalase teabe all oli pakendil kirjas, et 100 ml kohta on keskmiselt 2,0 g valke ja 0,6 g rasvu. Rasvade eemaldamiseks kasutati vedelik-vedelik ekstraktsiooni. Mahuga 15 ml viaali kanti automaatpipetiga 2 ml heksaani ja 1 ml puljongit. Viaali loksutati, mille järel avati korraks kork ülerõhu vältimiseks. Neid samme korrati 4 korda. Seejärel lasti kihtidel 5–10 minutit eralduda. Kahe kihi vahele tekkis vahukiht. Alumisest kihist puljongi eraldamiseks kasutati süstalt. Süstlasse tõmmati esmalt veidike õhku, seejärel suunati süstal koos nõelaga viaali põhja, kus õhk asendati puljongiga. Viaali hoiti nurga all, et võimalikult suur osa proovist kätte saada.

Seejärel lahjendati puljongiproovi 2 milliliitrisel eppendorfi tuubis esimesel korral 10 korda ja järgnevatel kordadel 50 korda. Vastavalt võeti 900 µl MilliQ vett, millesse lisati 100 µl puljongit (edaspidi 4900 µl MilliQ vett ja 100 µl puljongit). Suurem lahjenduse kasuks otsustati LC-MS spektrite põhjal. Proovide kontsentratsioon ei tohiks olla liiga kõrge, et saada kvaliteetseid massispektreid ja instrumenti mitte reostada.

DEEMM-i fragmenteerumist on varasemalt uuritud. Kolme kvadрупoolse MS (vt. Joonis 5) puhul mõõdetakse esimeses kvadрупoolis derivatiseeritud reagenti protoneeritud vormi m/z,

teises toimub antud iooni fragmenteerumine ning kolmandas kvadrapoolis skaneeritakse fragmendi m/z. Fragmenteerumisel lahkub neutraalse osakesena etanool (vt. Joonis 10).¹⁷



Joonis 10. DEEMM-i derivaadi protoneerumine ja fragmenteerumine

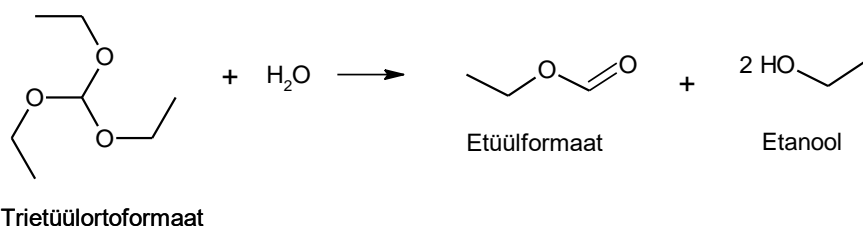
5. Tulemused ja arutelu

5.1. Süntees

Lõputöö käigus viidi süntees läbi 25 korda reaktsioonitingimuste optimeerimiseks. Lähteainete kogused on ekvivalentides (ekv) välja toodud (vt. Tabel 2). Saaduste kogused anti suhtena reageerimata jäänud dietüülmalonaadi suhtes. Antud tulemused on mõõdetud TMR-ga reaktsiooni toimumise määramiseks. Senised andmed on kogutud reaktsiooni konversiooni optimeerimise jälgimisel dietüülmalonaadi hulga vähenemise põhjal. Jälgiti produkti teket, dietüülmalonaadi hulga vähenemist ja võimalike kõrvalsaaduste teket ning osakaalusid. Reaktsiooni saagist analüüsiti optimeerimisel 19. reaktsiooni juures ja ^{13}C -märgistusega lõpliku produkti sünteesil.

Algeeskirja järgi teostatud reaktsiooni toimumise analüüsil TMR-ga ilmnas, et valitud limiteeriv reagent – dietüülmalonaat ei reageeri lõpuni. Selle parandamiseks modifitseeriti reaktsiooneeskirja. Hea tulemuse andis 3. reaktsioon, kus reageerimata dietüülmalonaadi ja tekkinud DEEMM-i suhe oli 0,25:1 (vt. Tabel 2). Kirjanduses saavutatud üle 90%-se saagisega pole see aga võrreldav. Esimest korda reageeris malonaat lõpuni 12. katsel, kus esmakordselt kasutati molekulaarsõelu reaktsioonisegu kohal (Lisa 4). TEOFi suurem liig kajastus saadud tulemuste põhjal otseselt ka dietüülmalonaadi reageerimise määras. See oli oluline töö hilisemas etapis ^{13}C -märgistusega DEEMM-i sünteesil, et limiteeriv reagent $^{13}\text{C}_3$ -dietüülmalonaat reageeriks lõpuni.

Ajas kasvas ka reaktsiooniseguse etüülformaadi osakaal, mille tekke eelduseks on vee olemasolu (Joonis 11). See ajendas kasutusele võtma molekulaarsõelu, mis seoksid vee endaga ära.



Joonis 11. TEOFi ja vee vaheline reaktsioon²⁹

Kirjanduses on välja toodud, et TEOFi ja vee vaheline reaktsioon toimub lihtsamini kui vee sisalduse määramiseks kasutatava dimetoksüpropani ja vee vaheline reaktsioon²⁹. See kinnitab, et TEOF reageerib väga aktiivselt veega, millest tuleneb reagendi koguse ja reageerimisvõime vähenemine sünteesi kontekstis.

Seetõttu kontrolliti TMR-ga lähteainete puhtust. Üheski neist ei esinenud vee signaale, hüdrolüüsiprodukte ega teisi lisandeid. Vee/niiskuse juurdepääsu piiramiseks kaaluti lähteained

kuivkapis rõhunõusse (*pressure tube*). Kork isoleeriti teflonteibiga. See tagas välise niiskuse minimaliseerimise. Etüülformaadi teket see aga ei peatanud, millest järeldati, et see tekib kas ilma vee juuresolekuta (või juba vähese õhuniiskuse korral) või tekib reaktsioonil teiste lähteainete lagunemisel/reageerimisel kõrvalproduktina vesi, mis soodustab etüülformaadi teket. Joonisel 8 välja toodud reaktsioonimehhanismides vee teket aga ei täheldata, mistõttu säilib võimalus, et vesi pääses reaktsioonisegusse kuumutamise ajal või mõnel muul moel.

Etüülformaadi teke vähendab sünteesis osaleva TEOF-i hulka, aga etüülformaadi ise dietüülmalonaadiga ei reageeri.³⁰

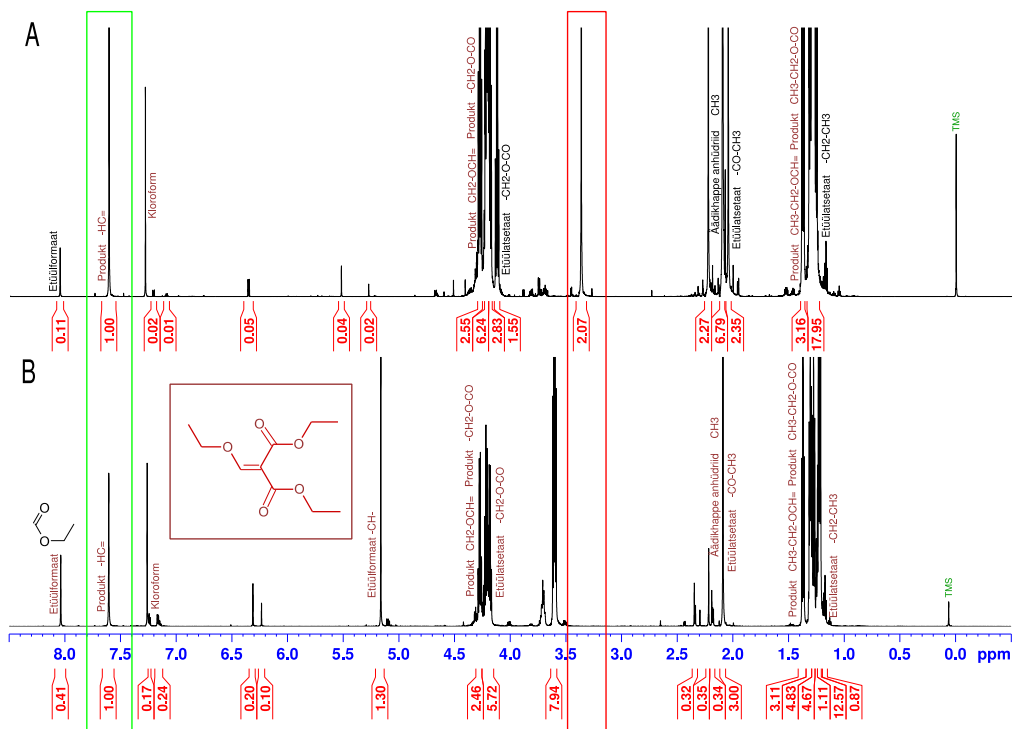
Sünteesi optimeerimisel katsetati ka varasemalt Meldrumi happega väljatoodud reaktsiooni (vt. Joonis 3.), kus reaktsioonisegusse täiendavaid reagente lisaks dietüülmalonaadile ja TEOF-le ei lisatud (Tabelis 2 reaktsioon nr 11). Antud reaktsioon umbes 23 h kuumutamise järel DEEMM-i ei andnud. Seda seletab erinevus dietüülmalonaadi ja Meldrumi happe pK_a väärtustes. Dietüülmalonaadi pK_a väärtus on 16,4 (DMSO-s), Meldrumi happe pK_a väärtus on 7,3 (DMSO-s) (vees 4,8)³¹. Madalam pK_a väärtus muudab Meldrumi happe palju happelisemaks ning seetõttu erinevad nende reaktsioonivõimed oluliselt.

Dietüülmalonaadi lõpuni reageerimine õnnestus esimest korda optimeerimisel 12. sünteesi korral. Reaktsiooni läbiviimisel kasutati solvendiks 99,8% tolueni (vt. Lisa 3). Eeldati, et aseotroopne toluen võtab aurustudes kaasa vee osakesed, mis püütakse 3 Å molekulaarsõeltega kinni. Eeskuju võeti Wright et al. artiklis toodud meetodist²⁴. Õlivanni temperatuuriks seadistati 155 °C ning süsteem kaeti soojuskadude vältimiseks ja tagasivooluga keemise saavutamiseks fooliumiga. Reaktsiooni saadus oli varasematele kordadele sarnaselt helekollane läbipaistev lahus. See kuivatati rotaatoraurustil (vesivann 41 °C, vaakumpump 45 mbar), et ülehulgas olevast toluenist vabaneda. Alles jäi oranžikas saadus, millest mõõdeti ¹H TMR spekter. Sellel oli selgelt näha dietüülmalonaadi signaalide täielik kadumine ja produkti teke (vt Joonis 12). Lisaks olid olemas ka tavapärase kõrvalsaaduste (etüülformaadi ja etüülatsetaadi) piigid. Hilisematel reaktsioonidel kasutati välise niiskuse tõkestamiseks lisaks ka teflonteipi reaktsioonikolvi ja tilklehtri vahelise lihvi vahel ja ümber. Teflonteipi kasutati ka tilklehtri ja jahuti vahelise lihvi isoleerimiseks. Tilklehtri ja jahuti ning jahuti ja inertgaasivooliku lihvide kinnitamiseks kasutati metallklambreid. Alumise süsteemiosa ümber kuni jahutini pandi soojuskadude vältimiseks ka foolium.

Algselt kasutati 3 Å molekulaarsõelu, mida kasutataksegi peamiselt vee sidumiseks ja ainete/segude kuivatamiseks veest. Need võeti otse purgist ja olid aktiveerimata, mistõttu võisid need olla ka eelnevalt õhuniiskusest mõjutatud. Hiljem võeti kasutusele 4 Å-sed aktiveeritud molekulaarsõelad, mida oli hoitud vaid kuivkapis. Need on võimelised lisaks veele siduma ka

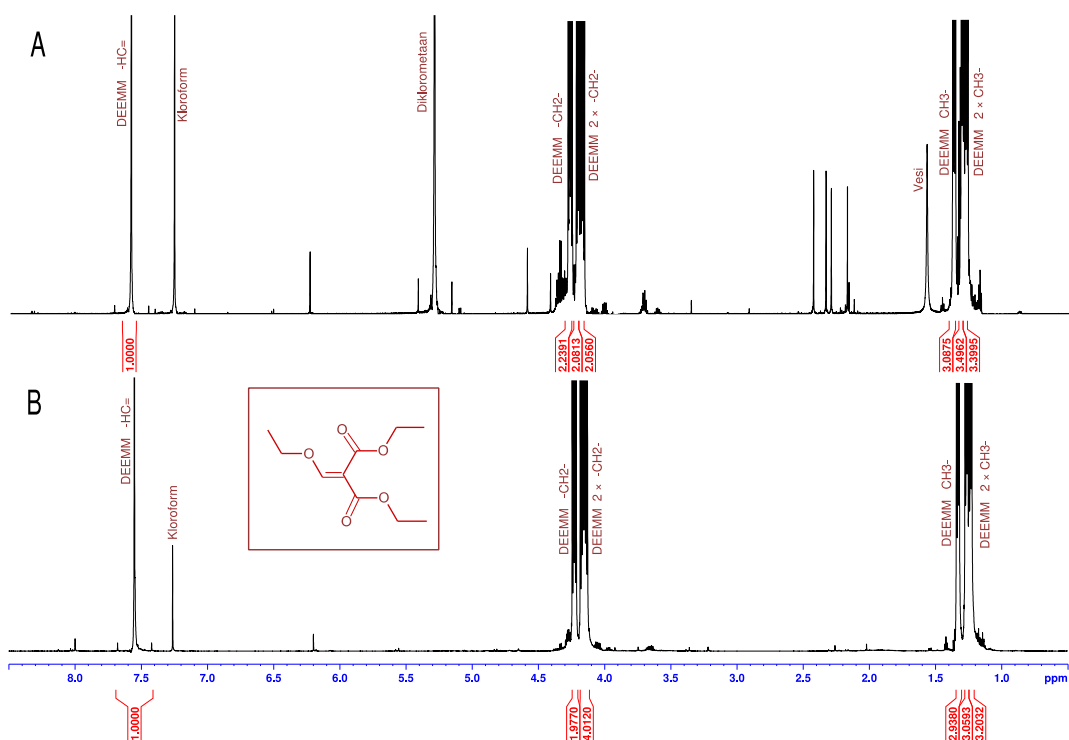
etanooli. Lisaks parandavad nii aktiveerimine kui ka kuivkapis hoidmine molekulaarsõelte sidumisvõimet, mistõttu eelistati neid töö hilisemates etappides.

Toatemperatuuril on 3 Å-sed molekulaarsõelad on valmis siduma molekulaarsõelad võimalised siduma kuni 19–20 massiprotsenti, 4 Å-sed molekulaarsõelad 19–20 massiprotsenti.³²



Joonis 12. 2. (A) ja 12. (B) sünteesi TMR analüüside võrdlus ¹H spektrite alusel

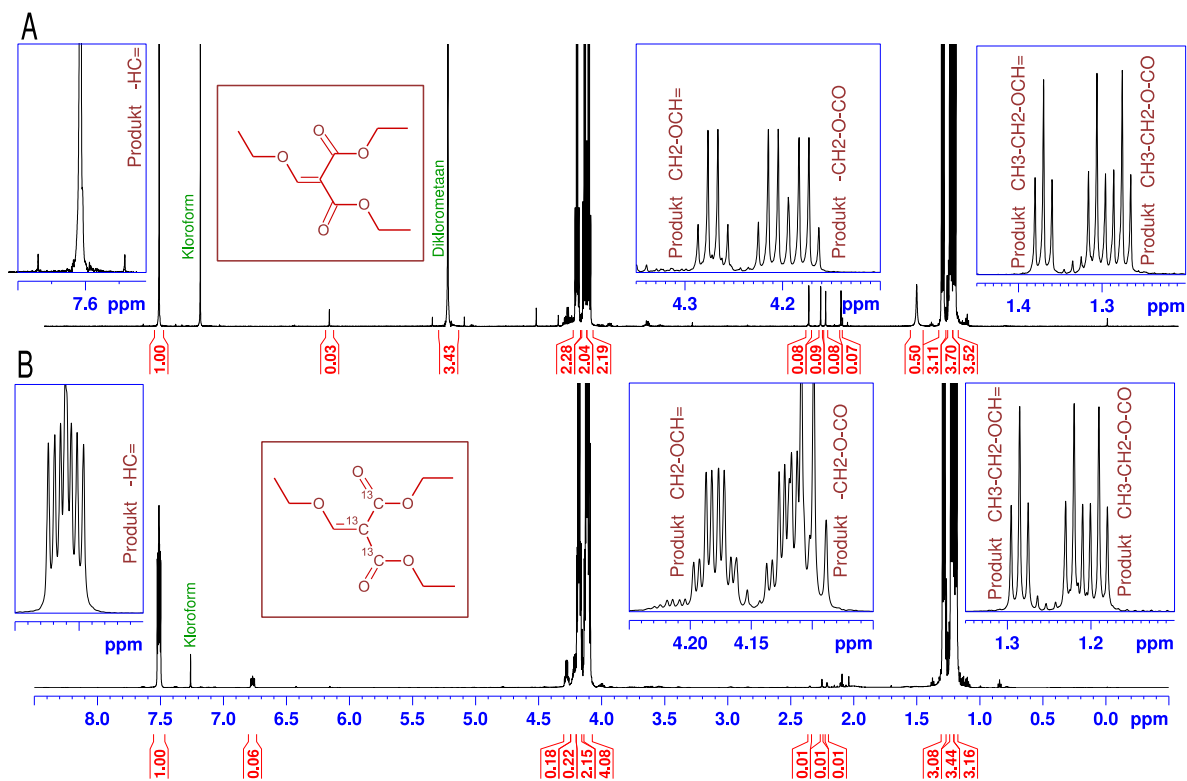
Joonisel 12 on välja toodud A 2. sünteesi ja B 12. sünteesi ¹H TMRi spektrid. Rohelise kastiga on välja toodud produktile omistatud tunnuspiik. Punane kast on reageerimata dietüülmalonaadi tunnussignaali omene. Ühtlasi võib 2. ja 12. sünteesi võrreldes näha märgatavat piigikasvu 5,0–5,5 ppm vahel. See on omene reageerimata jäänud TEOF-le, millest saab järeldada, et antud tingimustel on võimeline reaktsioon lõpuni minema ka väiksema koguse TEOFi juuresolekul. *Kugelrohri* destillatsioonil puhastati 19. reaktsiooni saadus ning produkti puhtust võrreldi kommertsiaalse DEEMM-iga ¹H TMR spektrite põhjal (vt. Joonis 13). Mõõtmised teostati kloroformis (piik 7,26 ppm). A on töö autori poolt sünteesitud ja hiljem puhastatud produkti ja B kommertsiaalse DEEMM-i spekter. Mõlemas on näha produktile iseloomulikud piigid 1,3, 1,4, 4,2, 4,3 ja 7,6 ppm juures. Lisaks on sünteesi saaduse spektril näha diklorometaani piik 5,3 ppm juures, mistõttu vajab reaktsioonisegu täiendavat kuivatamist. Piirkonnas 2,0–2,5 ppm võivad olla etüülatsetaadi ja sarnaste ühendite piigid, aga selle tõestamiseks vaja minevad teised piigid paiknevad produkti piikidega kohakuti.



Joonis 13. Puhastatud reaktsiooniprodukti (A) ja kommertsiaalse DEEMM-i (B) ^1H TMR spektrite võrdlus

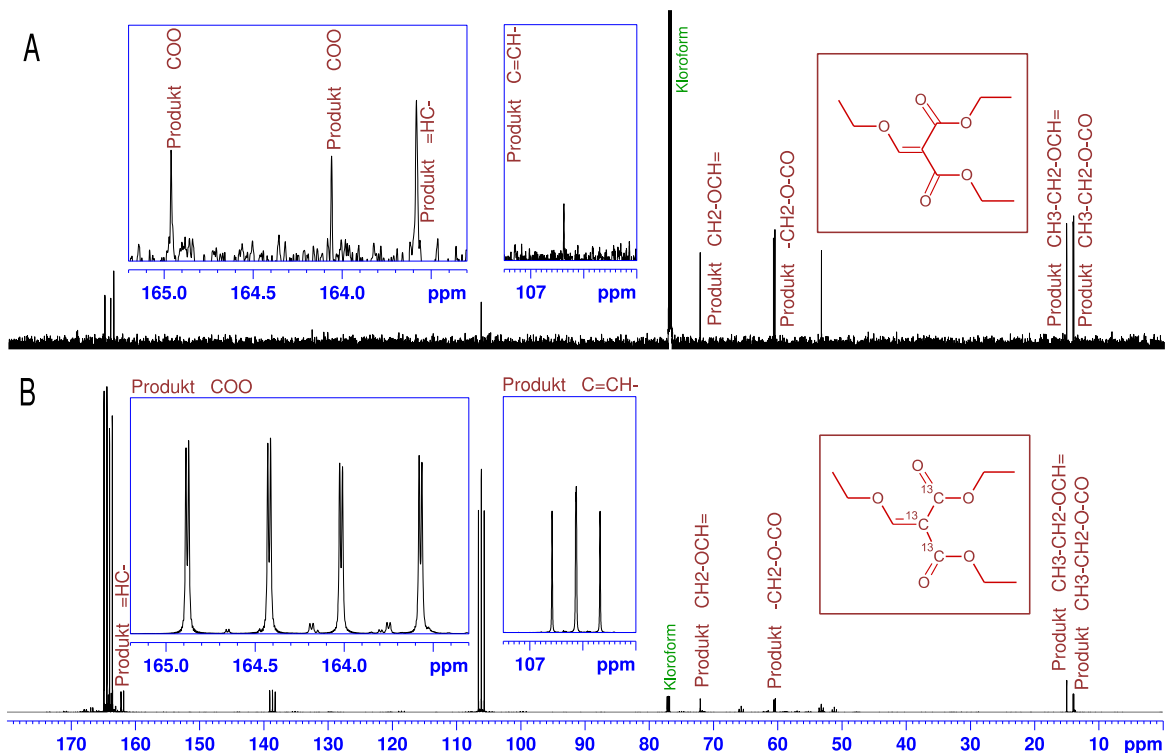
Lisaks leiti kvantitatiivse TMR kaudu sisestandardi abil 19. reaktsiooni produkti saagis. Sisestandardina kasutati 1,4-dimetoksubenseeni puhtusega 99,9% (vt. Lisa 2). Kuna *Kugelrohri* destillatsioonil jõudis produkti mõlemasse kuuli ja sisestandardiga viidi läbi mõõtmine vaid 1. kuuli puhul, on kogusaagis ligikaudne. Esimese kuuli TMR andmete põhjal arvutades on saagis selles kuulis 73%. Arvestades juurde teise kuuli eeldusel, et lisandite osakaal on sama, on kogusaagis ligi 80%.

Omavahel võrreldi ka isotoopmäärgistamata DEEMM-i $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-ga ^1H ja ^{13}C TMR spektrite põhjal. Joonisel 14 on välja toodud A–isotoopmäärgistusega DEEMM-i ja B– $^{13}\text{C}_3$ -DEEMM-i ^1H TMR-i spektrid. Välja on toodud ka suurendused olulisematest piikidest. Näiteks on produkti tekke iseloomustamiseks kasutatud piik 7,6 ppm-i juures esimesel juhul singlet, teisel juhul aga multiplet. See tuleneb otseselt aatomite varjestatusest TMR-i aktiivsete aatomite poolt. Isotoopmäärgistatud DEEMM-s olevad ^{13}C aatomid on TMR-i aktiivsed, mistõttu igaüks neist lõhestab isotoopmäärgistusega kaksiksidemega süsiniku küljes oleva vesiniku piigi kaheks (dupletiks). Oluline on seejuures ka tähelepanek, et cis-trans isomeeria tõttu on esterrühma küljes olevad ^{13}C aatomid erinevad (mitte-ekvivalentsed) ja seetõttu lõhestavad need mõlemad HC= vesinikule kuuluvat piiki erineva tugevusega ($^3J_{\text{trans}} > ^3J_{\text{cis}}$). Seega on isotoopmäärgistusega produkti piik 7,6 ppm-i juures singlet ja isotoopmäärgistusega produkti korral dupleti-dupleti-duplett (ddd).



Joonis 14. Isotoopmargistusega DEEMM-i (A) ja isotoopmargistusega DEEMM-i (B) ¹H TMR spektrite võrdlus

Joonisel 15 on toodud A – isotoopmargistusega DEEMM-i ja B – ¹³C₃-DEEMM-i ¹³C TMR-i spektrid. Tegem on ¹H lahtisidestatud süsinikspektri versiooniga (tähistatakse ¹³C{¹H}). Välja on toodud ka suurendused olulisematest piikidest. Välja joonistub kaks olulist erinevust. Esiteks on isotoopmargistusega DEEMM-i spektri korral produkti piigid tunduvalt madalamad võrreldes kloroformiga (7,26 ppm) milles mõõtmised teostati. ¹³C₃-DEEMM-i puhul on olukord vastupidine, sest ¹³C on TMR-i aktiivne isotoop. Teine oluline erinevus tuleb taas piikide kujust. Isotoopmargistusega DEEMM-i puhul on näiteks karbonüülised süsinikud singletid, isotoopmargistusega DEEMM-s mõjutavad piigi kuju kaks teist ¹³C aatomit, mis lõhestavad selle dubleti-dupletiks (dd).

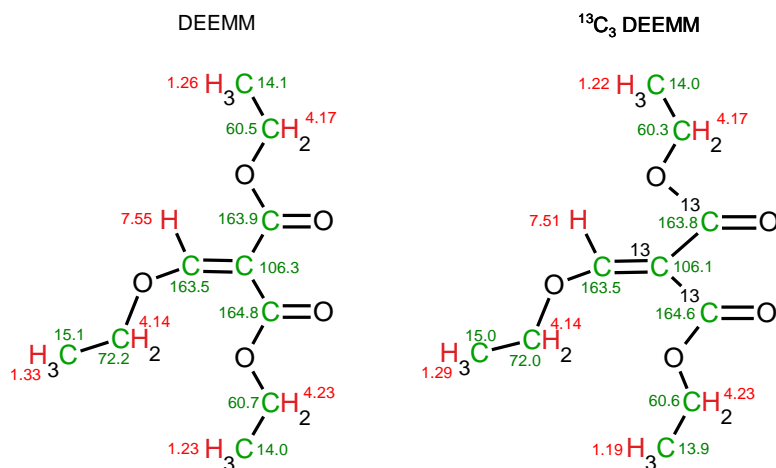


Joonis 15. Isotoopmärgistusega DEEMM-i (A) ja isotoopmärgistusega DEEMM-i (B) $^{13}\text{C}\{\text{H}\}$ TMR spektrite võrdlus

Isotoopmärgistusega ja -märgistusega DEEMM-i TMR spektriandmed on välja toodud joonisel 16 ja selle all koos lõhenemiskonstantidega. Joonisel on punasega märgitud vesinikuspektri ja rohelisega süsinikuspektri keemilise nihke (δ) väärtused (ppm-des) vastavate aatomite juures.

Vastab ^1H spektri keemilistele nihetele

Vastab ^{13}C spektri keemilistele nihetele



Joonis 16. Isotoopmärgistusega DEEMM-i TMR spektrile vastavate piikide asukohad

Isotoopmärgistusega DEEMM-i TMR andmed:

^1H TMR (700.1 MHz, CDCl_3 , +25 °C) δ : 7,55 (s, 1H, $-\text{CH}=\text{C}$); 4,23 (q, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 2H, CH_2-CH_3); 4,17 (q, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 2H, CH_2-CH_3); 4,14 (q, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 2H, CH_2-CH_3); 1,33 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, CH_3); 1,26 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, CH_3); 1,23 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ TMR (176.0 MHz, CDCl_3 , +25 °C) δ : 164,8 (1C, $\underline{\text{COO}}$); 163,9 (1C, $\underline{\text{COO}}$); 163,5 (1C, $\underline{\text{CH=}}$); 106,3 (1C, $\text{CH}=\underline{\text{C}}$); 72,2 (1C, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,7 (1C, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,5 (1C, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 15,1 (1C, $\underline{\text{CH}_3}$); 14,1 (1C, $\underline{\text{CH}_3}$); 14,0 (1C, $\underline{\text{CH}_3}$).

^{13}C TMR (176.0 MHz, CDCl_3 , +25 °C) δ : 164,8 (td, $^2J_{\text{CH}}=3,3$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=3,2$ Hz, $\underline{\text{COO}}$); 163,9 (dt, $^2J_{\text{CH}}=9,1$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=3,3$ Hz, $\underline{\text{COO}}$); 163,5 (dt, $^1J_{\text{CH}}=180,1$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=4,6$ Hz, $\underline{\text{CH=}}$); 106,3 (d, $^2J_{\text{CH}}=6,7$ Hz, $\text{CH}=\underline{\text{C}}$); 72,2 (tdq, $^1J_{\text{CH}}=146,3$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=6,1$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=4,4$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,5 (tq, $^1J_{\text{CH}}=147,6$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=4,4$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,3 (tq, $^1J_{\text{CH}}=147,7$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=4,5$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 15,1 (qt, $^1J_{\text{CH}}=127,5$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=2,6$ Hz, $\underline{\text{CH}_3}$); 14,1 (qt, $^1J_{\text{CH}}=127,0$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=2,7$ Hz, $\underline{\text{CH}_3}$); 14,0 (qt, $^1J_{\text{CH}}=127,0$ Hz, $^2J_{\text{CH}}=2,7$ Hz, $\underline{\text{CH}_3}$).

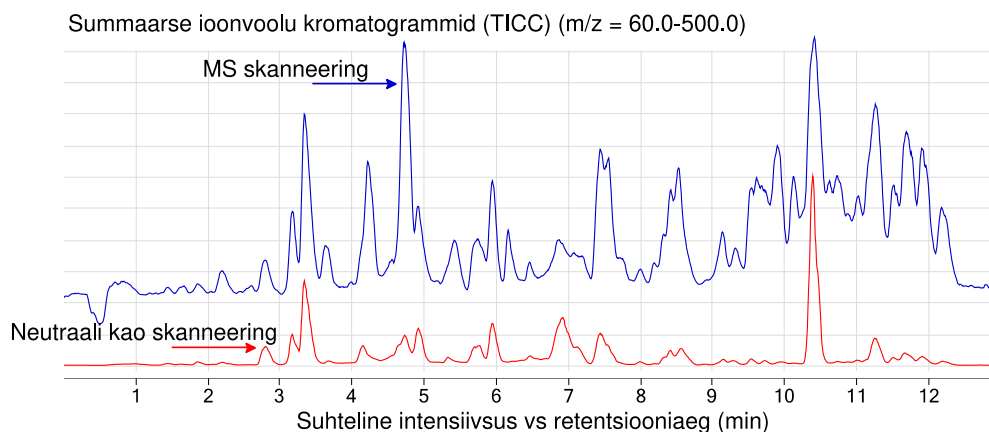
Isotoopmargistusega ^{13}C DEEMM-i TMR andmed:

^1H TMR (700.1 MHz, CDCl_3 , +25°C) δ : 7,51 (ddd, $^2J_{\text{CH}}=9,1$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=6,6$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=3,4$ Hz, 1H, $-\underline{\text{CH}}=\text{C}$); δ : 4,23 (qd, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=3,4$ Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 4,17 (qd, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, $^3J_{\text{CH}}=3,2$ Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 4,14 (q, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 2H, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 1,29 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$); 1,22 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$); 1,19 (t, $^3J_{\text{HH}}=7,2$ Hz, 3H, $\underline{\text{CH}_3}$).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ TMR (176.0 MHz, CDCl_3 , +25°C) δ : 164,6 (dd, $^1J_{\text{CC}}=80,9$ Hz, $^2J_{\text{CC}}=2,8$ Hz, $\underline{\text{COO}}$); 163,8 (dd, $^1J_{\text{CC}}=78,6$ Hz, $^2J_{\text{CC}}=2,8$ Hz, $\underline{\text{COO}}$); 163,5 (m, $\underline{\text{CH=}}$); 106,1 (dd, $^1J_{\text{CC}}=80,9$ Hz, $^1J_{\text{CC}}=78,6$ Hz, $\underline{\text{C=CH}}$); 72,0 (d, $^3J_{\text{CC}}=3,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,6 (m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 60,3 (m, $\underline{\text{CH}_2\text{-CH}_3}$); 15,0 (s, $\underline{\text{CH}_3}$); 14,0 (d, $^3J_{\text{CC}}=2,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_3}$); 13,9 (d, $^3J_{\text{CC}}=2,2$ Hz, $\underline{\text{CH}_3}$).

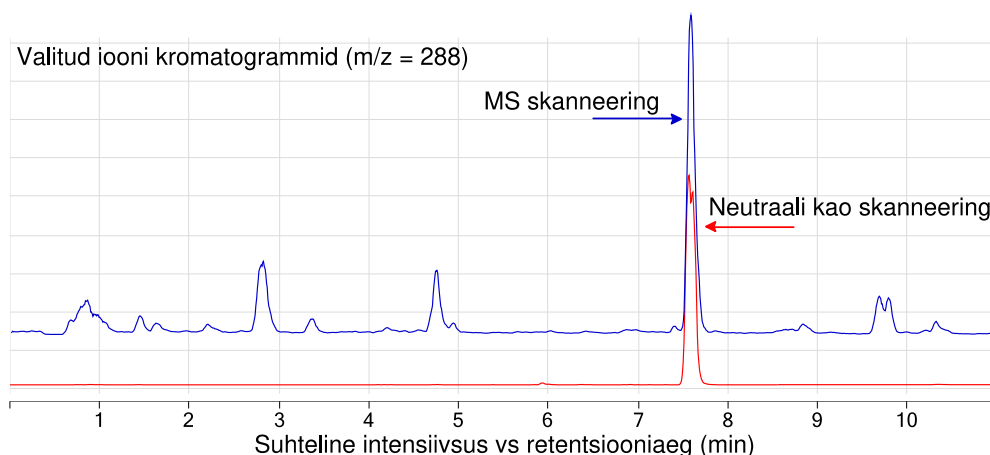
5.2. Derivatiseerimisega LC-MS analüüs

LC-MS analüüs viidi läbi MS-skaneeringu ja neutraali kao meetoditega. Sealjuures tõestati derivaadi neutraali kao skaneerimisega, et sünteesitud isotoopmargistatud DEEMM käitub analüüsil nagu eeldati. Neutraali kao meetodi eelisena tõestati, kuidas see võimaldab kergemini tuvastada aminoühendite piigid. Joonisel 17 on summaarse ioonvoolu kromatogramm (TICC). Sinisega on märgitud derivatiseeritud proovi MS skaneering ja punasega sama proovi neutraali kao skaneering.



Joonis 17. Sinine - proovi MS skanneering, punane - neutraali kao skanneering

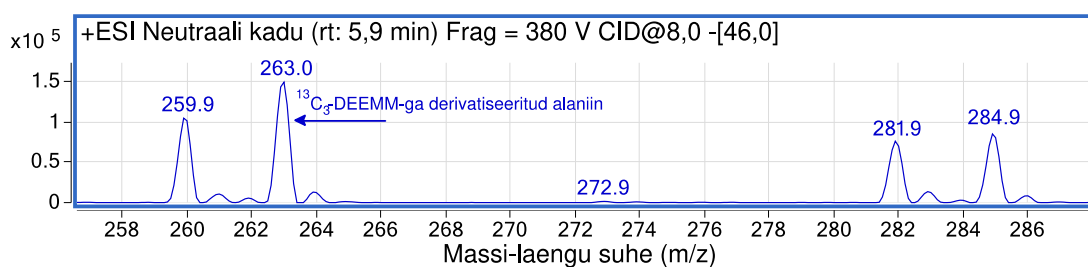
Joonisel 18 näidatud valitud iooni (m/z 288) kromatogramm. Sellele ioonile vastab protoneeritud valiini derivaat m/z -ga 288. Vaadeldes MS-skaneeringu kromatogrammi vahemikus (60 – 500 m/z) ja eraldades saadud spektrist valiini derivaadi protoneeritud vormi kromatogrammi, näeme, et antud massilaengu (m/z) suhtele vastavad mitu piiki (märgistatud sinisega joonisel 18). Võrdluseks, vaadeldes neutraali kao kromatogrammi m/z suhte 288 juures on vaid üks piik (märgistatud punasega joonisel 18).



Joonis 18. Sinine - proovi MS-skaneering (m/z 288), punane - proovi neutraali kao skanneering (eellasioon m/z 288)

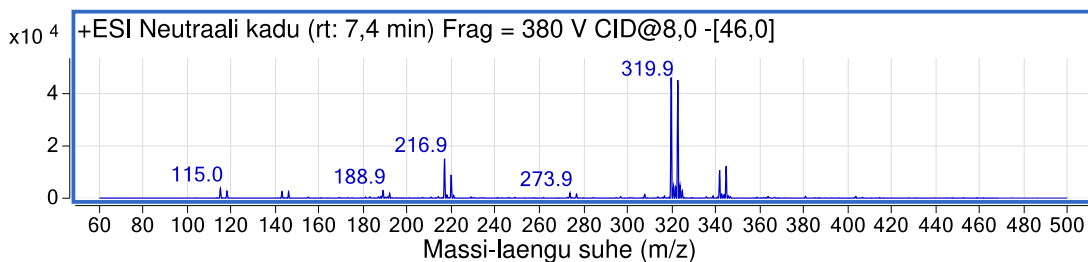
Isotoopmärgistatud derivatiseeriva reagenti kasutamine võimaldab kasutada sisestandardi meetodit, kus teadaoleva aminohappe/aminohapete emalahust derivatiseeritakse isotoopmärgistatud DEEMM-iga. Paralleelselt derivatiseeritakse proovi isotoopmärgistamata DEEMM-iga. Enne analüüsimist võetakse mõlemat derivatiseeritud segu võrdselt ja tehakse neist ühine LC-MS-i proov, mida analüüsitakse neutraali kao režiimis. Kuna nii isotoopmärgistamata kui -märgistatud derivaatide retentsiooniajad on võrdsed, on need piigid kromatograafiliselt kohakuti, aga massipiigid 3 ühiku m/z erinevuse tõttu piisavalt palju eristatavad, et süsiniku looduslikud isotoobid ei mõjutaks seda enam märkimisväärselt. Sel

moel on võimalik tuvastada, kas proovis leidub standardlahuses olevaid aminoühendeid. Protoneeritud isotoopmärgistusega derivaadile massiga 263, mida leidis sisestandardis vastabalaniin (vt. Joonis 19). Vasakpoolne piik ($m/z = 320$) vastab isotoopmärgistuseeta DEEMM-iga derivatiseeritudalaniini protoneeritud vormile. Selle põhjal joonistub ka välja, et 3 korda lahjendatud sisestandardis onalaniini veidike enam, kui 50 kordses proovi lahjenduses. Seeläbi saab anda ka hinnanguline kogus proovis leiduvale aminohappele.



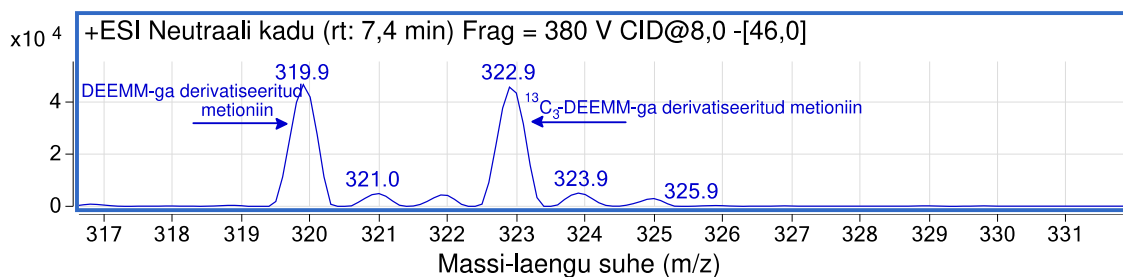
Joonis 19. Sisestandardi meetodiga mõõdetud massispekter

Võimalik variant on ka sama proovi kaht alikvooti derivatiseerida eraldi ühte isotoopmärgistatud, teist märgistamata derivatiseeriva reagentiga. Kui derivatiseeritud alikvoodid segada ja analüüsida LC-MS-ga neutraali kao režiimis saame tuvastada, kas kõik ja millised piigi andnud neutraali massiga 46 kaotanud ühenditest, on aminohapped või mitte. Seeläbi saab 3 ühiku võrra erinevate m/z suhtega piikide korral kindlaks teha, kas tegu on huvipakkuva aminoühendiga või mitte. Näide selliste piigipaaride kohta on esitatud joonisel 20.



Joonis 20. Massispektri näidis retentsiooniajaga 7,4 min proovist, mida on võrdsest derivatiseeritud isotoopmärgistuseeta ja -märgistusega DEEMM-ga.

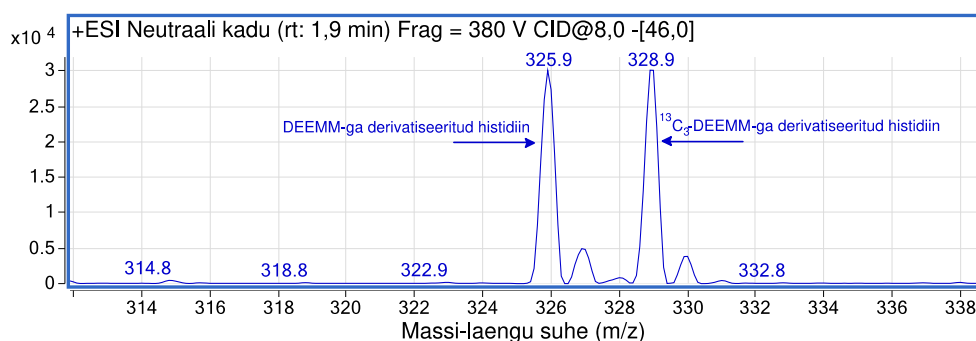
Kui piigid on mõlema puhul sama kõrged, siis on tegu aminoühendiga, kui mitte, siis võis tegu olla mõne sellise proovi komponendiga, mis fragmenteerumisel andis samuti neutraalse fragmendi 46 Da. Joonisel 21 on välja toodud massispektri näide eellasioonide 319,9 ja 322,9. Protoneeritud isotoopmärgistusega derivaadile massiga 323 vastab metioniin. Vasakpoolne piik ($m/z = 320$) vastab isotoopmärgistuseeta DEEMM-iga derivatiseeritud metioniini protoneeritud vormile. Kuna mõlemad piigid on ka võrdse kõrgusega, saame väita, et tegu on tõepoolest aminohappe piigiga.



Joonis 21. Neutraali kao skaneeringu massispektri näidis metioniinist

Kolmas variant on võrrelda omavahel näiteks haige ja terve isendi proove, et tuvastata muutusi aminoühendite sisalduses. Selles töös võrreldi värsket puljongi proovi vanandatuga. Värsket proovi derivatiseeriti isotoopmärgistatud ja vanandatud proovi isotoopmärgistamata DEEMM-ga. Seeläbi saab jälgida, kuidas proovi aminoühendite sisaldus ajas muutub. Joonisel 22 on välja toodud massispektri näide eellasioonide 325,9 ja 328,9 puhul. Antud eellasioonid võiksid vastata derivatiseeritud histidiinile.

Kahjuks ei joonistunud aga nädal aega toatemperatuuril seisnud ja värsket (sügavkülmutatud) puljongiproovi vahel olulisi erinevusi. Proovides polnud ka visuaalseid erinevusi, mis viitab, et konservantide (nt soola) või varasema termilise töötlemise tõttu ei pruukinud proov nädala jooksul piisavalt rikneda.



Joonis 22. Neutraali kao skaneeringu massispektri näidis m/z suhete 325,9 ja 328,9 juures proovist, kus on võrdselt isotoopmärgistusega derivatiseeritud värsket ja isotoopmärgistusega DEEMM-ga derivatiseeritud vanandatud proovi.

5.3. Edasiarendused

Tulevikus võtta kasutusele derivatiseerimise eeskiri, mis sisaldab endas enne LC-MS analüüsi proovile derivatiseerimisreaktsiooni lõpetava reagenti lisamist. Reagent seob DEEMM-i reageerimata osa ära ja see elueerub kromatograafilise piigina, mis ei sega muude komponentide tuvastamist. Varasemalt¹⁷ on kasutatud derivatiseerimisreaktsiooni lõpetava reagentina, näiteks hüdroksüülamiini.

6. Kokkuvõte

Bakalaureusetöö raames keskenduti esmalt DEEMM-i sünteesireaktsiooni konversiooni optimeerimisele. Seda tehti jälgides produkti teket, dietüülmalonaadi hulga vähenemist ja võimalike kõrvalsaaduste teket ning osakaalusid. Sünteesi optimeerimine viidi läbi, sest hiljem kasutatava ^{13}C -märgistusega dietüülmalonaadi maksumus seadis ainekogustele piirangud. Töö käigus selgus, et reaktsioonis osalev TEOF reageerib kergesti veega, mistõttu kahaneb selle reaktsioonis osalemise osakaal. Kõrvalproduktina tekkis etüülformaat. Põhiprobleemiks oli dietüülmalonaadi mitte lõpuni reageerimine.

Reaktsioonisüsteemi ja molekulaarsõelte kasutuselevõtt võimaldas dietüülmalonaadi lõpuni reageerimist. Lähteainetena võeti 1 ekv dietüülmalonaati, 4 ekv TEOF-i, 2 ekv Ac_2O ja katalüütiline kogus ZnCl_2 . Solvendina võeti kasutusele toluen, et see aseptroopses vormis viiks reaktsioonikeskkonnast välja vee, mis seotakse molekulaarsõeltega. Reaktsiooni saagis optimeeritud tingimustel oli ligikaudu 86%. Reaktsioonisaaduste puhastamiseks kasutati *Kugelrohr*'i destillatsiooni.

^{13}C DEEMM-i süntees viidi läbi optimeeritud tingimustel. 1 ekv-le ^{13}C dietüülmalonaadile vastas 92 mg ainet. Pärast puhastamist hinnati TMR analüüsi põhjal ^{13}C DEEMM-i saagiseks 80%. Produktile viidi läbi HRMS analüüs.

^{13}C DEEMM-i kasutati paralleelselt kommertsiaalse DEEMM-ga nii aminohapetest koosneva standardlahuse kui ka neid sisaldava reaalse proovi derivatiseerimiseks. Mõlemal juhul olid neutraali kao skaneeringus ootuspärased tulemused. Võrdluses MS-skaneeringuga kergendas neutraali kao skaneeringu kasutamine oluliselt aminoühendite tuvastamist. Neutraali kao skaneeringus elueerusid ühe ja sama aminoühendi isotoopmärgistusega ja -märgistusega derivaadid samaaegselt. Massispektris eristusid need aga 3 m/z võrra. Demonstreeriti isotoopmärgistusega derivatiseerimise LC-MS analüüsi kolme rakendust. Esiteks derivatiseeriti sama proovi alikvoote nii $^{13}\text{C}_3$ kui ka kommertsiaalse DEEMM-ga. Isotoopmärgis võimaldas kindlaks teha, millised piigid vastavad aminohapetele. Teiseks võrreldi isotoopmärgistusega DEEMM-ga derivatiseeritud standardlahust kommertsiaalse DEEMM-ga derivatiseeritud prooviga, kus vaadeldi, kas standardlahuses olevad aminoühendid on ka proovis olemas. Viimaks võrreldi samal moel värsket ja vanandatud puljongiproovi.

Töö hüpotees leidis kinnitust ja püstitatud eesmärgid said täidetud.

7. Tänuavaldused

Soovin tänada oma juhendajad Koit Herodest (PhD) ja Lauri Toomi (PhD), kes olid abiks antud bakalaureusetöö elluviimisel. Eriline tänu Lauri Toomile, kes andis häid soovitusi sünteesiprotokollide parandamiseks ja viis läbi põhjalikku väljaõppe TMR-i kasutamiseks.

Soovin tänada ka Ernesto De Jesus Zapata Flores-t ja Larissa Macieli, kes aitasid sobiva derivatiseerimiseeskirja valida. Lisaks oli Ernesto abiks LC-MS instrumendiga tutvumisel ja standardlahus pärines Larissalt. Täna ka Marta-Lisette Pikmad, kes tutvustas kuivkapis töötamise põhitõdesid.

8. Kasutatud kirjandus

- (1) Murray, K. K.; Boyd, R. K.; Eberlin, M. N.; Langley, G. J.; Li, L.; Naito, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85* (7), 1515–1609. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-06-04-06>.
- (2) KemTerm, Keemia-Alased Terminid. <https://kemterm.chem.ut.ee/>.
- (3) Tietze, L. F.; Geissler, H.; Downey, C. W. Diethyl Ethoxymethylenemalonate. In *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Ltd, 2013. <https://doi.org/10.1002/047084289X.rd194.pub2>.
- (4) Hoffmann, E. de; Stroobant, V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Kolmas.; John Wiley & Sons Ltd: West Sussex, Inglismaa, 2007.
- (5) Kleinpeter, E.; Schulenburg, A. Quantification of the Push–Pull Effect in Substituted Alkenes. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46* (36), 5995–5997. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2005.07.030>.
- (6) Kleinpeter, E. Push–Pull Alkenes: Structure and π -Electron Distribution. *J. Serbian Chem. Soc.* **2006**, *71* (1), 1–17. <https://doi.org/10.2298/JSC0601001K>.
- (7) Wang, T. S. T.; Fawwaz, R. A.; Van Heertum, R. L. Preparation of 1-Methyl-4-[4-(7-Chloro-4-Quinolyl-[3-14C]-Amino)Benzoyl]Piperazine. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **1995**, *36* (4), 313–320. <https://doi.org/10.1002/jlcr.2580360403>.
- (8) Ethyl Ethoxymethylenemalonate. *Org. Synth.* **1948**, *28*, 60. <https://doi.org/10.15227/orgsyn.028.0060>.
- (9) Fuson, R. C.; Parham, W. E.; Reed, L. J. Alkylation of Ethyl Malonate with Diethoxymethyl Acetate. *J. Org. Chem.* **1946**, *11* (2), 194–198. <https://doi.org/10.1021/jo01172a014>.
- (10) Cui, S.-F.; Ren, Y.; Zhang, S.-L.; Peng, X.-M.; Damu, G. L. V.; Geng, R.-X.; Zhou, C.-H. Synthesis and Biological Evaluation of a Class of Quinolone Triazoles as Potential Antimicrobial Agents and Their Interactions with Calf Thymus DNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23* (11), 3267–3272. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.118>.
- (11) Razzaq, T.; Kappe, C. O. Rapid Preparation of Pyranoquinolines Using Microwave Dielectric Heating in Combination with Fractional Product Distillation. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48* (14), 2513–2517. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.02.052>.
- (12) Erickson, J. G. Alkyl Orthoformates. *J. Org. Chem.* **1955**, *20* (11), 1573–1576. <https://doi.org/10.1021/jo01128a017>.
- (13) Voronkov, M. G.; Trukhina, A. A.; Vlasova, N. N. Acyl Iodides in Organic Synthesis: V. Reactions with Carboxylic Acid Esters. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40* (3), 357–359. <https://doi.org/10.1023/B:RUJO.0000034970.98036.03>.
- (14) Grotjahn, D. B.; Miranda-Soto, V.; Kragulj, E. J.; Lev, D. A.; Erdogan, G.; Zeng, X.; Cooksy, A. L. Hydrogen-Bond Acceptance of Bifunctional Ligands in an Alkyne–Metal π Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (1), 20–21. <https://doi.org/10.1021/ja0774616>.
- (15) Zhang, L.; Cheng, C.; Li, J.; Wang, L.; Chumanevich, A. A.; Porter, D. C.; Gorbunova, S.; Roninson, I. B.; Chen, M.; McInnes, C. A Selective and Orally Bioavailable Quinoline-6-Carbonitrile-Based Inhibitor of CDK8/19 Mediator Kinase with Tumor-Enriched Pharmacokinetics.
- (16) Hasegawa, T. Separation of Odor Constituents by Microscale Fractional Bulb-To-Bulb Distillation. In *Distillation - Advances from Modeling to Applications*; Zereshki, S., Ed.; InTech, 2012. <https://doi.org/10.5772/37932>.
- (17) Maciel, L. S.; Marengo, A.; Rubiolo, P.; Leito, I.; Herodes, K. Derivatization-Targeted Analysis of Amino Compounds in Plant Extracts in Neutral Loss Acquisition Mode by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2021**, *1656*, 462555. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462555>.

- (18) Huang, Y.-Q.; Wang, Q.-Y.; Liu, J.-Q.; Hao, Y.-H.; Yuan, B.-F.; Feng, Y.-Q. Isotope Labelling – Paired Homologous Double Neutral Loss Scan-Mass Spectrometry for Profiling of Metabolites with a Carboxyl Group. *The Analyst* **2014**, *139* (13), 3446–3454. <https://doi.org/10.1039/C4AN00312H>.
- (19) Oldekop, M.-L.; Rebane, R.; Herodes, K. Dependence of Matrix Effect on Ionization Polarity during LC–ESI–MS Analysis of Derivatized Amino Acids in Some Natural Samples. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2017**, *23* (5), 245–253. <https://doi.org/10.1177/1469066717711026>.
- (20) Li, J.-J. Name Reactions in Heterocyclic Chemistry.
- (21) Hore, P. J. NMR Principles. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*; Academic Press, 2000; p 2581.
- (22) Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, Jr., G. S. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. In *Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*; Saunders College Publishing, 1979; pp 81–102.
- (23) Jin, G.; Li, Z.; Xiao, F.; Qi, X.; Sun, X. Optimization of Activity Localization of Quinoline Derivatives: Design, Synthesis, and Dual Evaluation of Biological Activity for Potential Antitumor and Antibacterial Agents. *Bioorganic Chem.* **2020**, *99*, 103837. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103837>.
- (24) Wright, A. C.; Du, Y. E.; Stoltz, B. M. Small-Scale Procedure for Acid-Catalyzed Ketal Formation. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (17), 11258–11260. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01541>.
- (25) Demekhin, O. D.; Burov, O. N.; Kletskii, M. E.; Lisovin, A. V.; Kurbatov, S. V.; Bereznyak, E. A.; Trishina, A. V. New 13-Vinyl Derivatives of Berberine: Synthesis and Characterization. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2022**, *58* (2), 144–152. <https://doi.org/10.1007/s10593-022-03067-w>.
- (26) *AIST: Spectral Database for Organic Compounds, SDBS*. https://sdb.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi (accessed 2023-04-24).
- (27) Leonard, N.; Tarsio, P. J.; Herbert, B. Process for Preparation of Oxy Alkylidene Compounds. US2824121A, February 18, 1958. <https://patents.google.com/patent/US2824121A/en> (accessed 2024-05-26).
- (28) *Puljongid Archives*. FoodStudio Tooted. https://foodstudio.ee/tooted/product_category/puljongid/ (accessed 2024-05-26).
- (29) Chen, Jian.; Fritz, J. S. Gas Chromatographic Determination of Water after Reaction with Triethyl Orthoformate. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (18), 2016–2020. <https://doi.org/10.1021/ac00018a022>.
- (30) Jones, R. G. Reactions of Orthoesters with Active Methylene Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74* (19), 4889–4891. <https://doi.org/10.1021/ja01139a046>.
- (31) Bordwell, F. G. Equilibrium Acidities in Dimethyl Sulfoxide Solution. *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21* (12), 456–463. <https://doi.org/10.1021/ar00156a004>.
- (32) *Molecular Sieve Desiccant | Desiccant Supplier & Manufacturer*. <https://www.molecularsievedesiccants.com/blogs/how-much-moisture-can-molecular-sieve-adsorb> (accessed 2024-05-26).

Lisad

1. Isotoopmärgistatud dietüülmalonaadi puhtuse sertifikaat

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

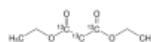
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name:

Diethyl malonate-1,2,3-¹³C₃ - 99 atom % ¹³C

Product Number: 488771
Batch Number: MBBC3307
Brand: ALDRICH
CAS Number: 53051-81-3
MDL Number: MFCD00083938
Formula: 13C3C4H12O4
Formula Weight: 163.13 g/mol
Quality Release Date: 17 NOV 2017



Test	Specification	Result
Appearance (Clarity)	Clear	Clear
Appearance (Color)	Colorless	Colorless
Appearance (Form)	Liquid	Liquid
Purity (GC)	≥ 99 %	100 %
Proton NMR Spectrum	Conforms	Conforms
¹³ C NMR Spectrum	Conforms	Conforms
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.5 %	0.0 %
¹³ C Enrichment	≥ 99 %	99 %

Greg Abernathy, Supervisor
Quality Control
Miamisburg, Ohio US

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Version Number: 1

Page 1 of 1

2. Sisestandardi puhtuse sertifikaat

Certificate of Analysis

Page 1 of 1

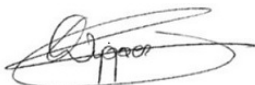
ThermoFisher
SCIENTIFIC

Version 01
Molecular weight 138.17
Molecular Formula C8 H10 O2
CAS No 150-78-7
Linear Formula C6H4(OCH3)2
Flash Point (C°) 98

Certificate of Analysis

Products are processed under ISO 9001:2015 quality management systems and samples are tested for conformance to the noted specifications. Certain data may have been supplied by third parties. We disclaim the implied warranties of merchantability and fitness for a particular purpose, and the accuracy of third party data or information associated with the product. Products are for research and development use only. Products are not for direct administration to humans or animals. It is the responsibility of the final formulator or end user to determine suitability, and to qualify and/or validate each product for its intended use.

Catalog Number	11541	Quality Test / Release Date	24 March 2017
Lot Number	A0382270	Suggested retest date	March 2022
Description	1,4-Dimethoxybenzene,99+%		
Country of Origin	CHINA		
Declaration of Origin	synthetic		
BSE/TSE			
Origin Comment			
Result name	Specifications	Test Value	
Appearance (Color)	White to off-white to grey	off-white	
Appearance (Form)	Crystals of flakes	Crystals	
Infrared spectrum	Authentic	Authentic	
Melting point	54°C to 58°C	56.4°C	
GC	>=99.0 %	99.9 %	



C. Wygaerts, QA Manager

Issued: 31 October 2023

Acros Organics BV
ENA23, zone1, nr 1350, Janssen Pharmaceuticaan 3a, B-2440 Geel, Belgium
Tel +32 14/57.52.11 - Fax+32 14/59.34.34 Internet: <https://www.thermofisher.com>
1 Reagent Lane, Fair Lawn, NJ 07410, USA Fax 201-796-1329

3. Toluene puhtuse sertifikaat (veevaba)

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: TOLUENE
anhydrous, 99.8 %
Product Number: 244511
Batch Number: STBD4514V
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 108-88-3
Formula: C₆H₅CH₃
Formula Weight: 92.14
Quality Release Date: 16 SEP 2013

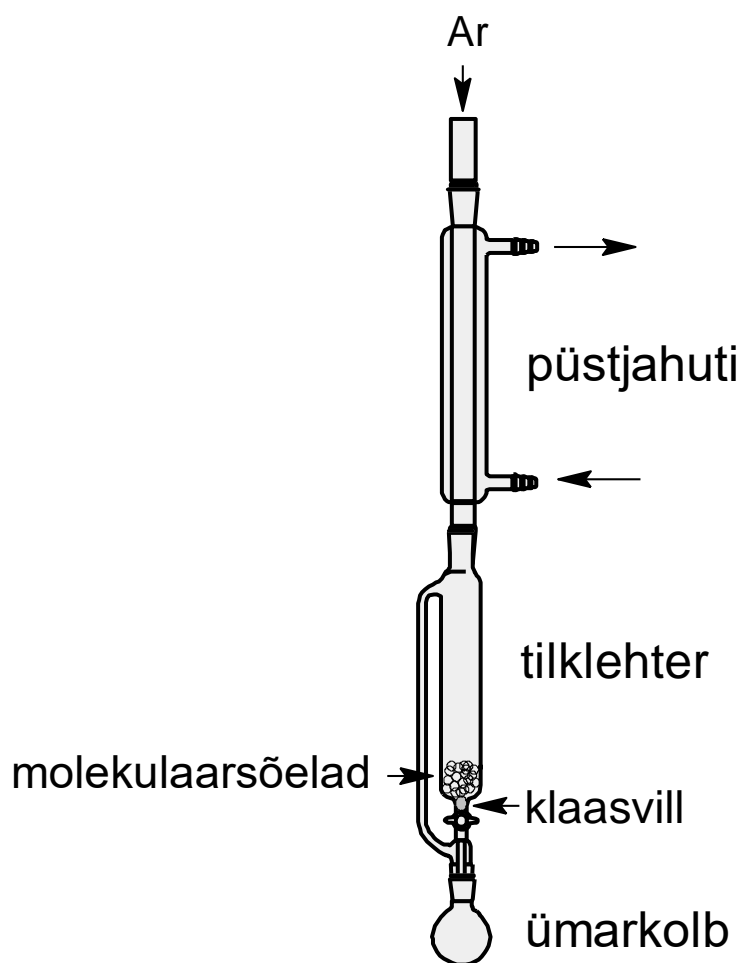
TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS	COLORLESS
APPEARANCE (FORM)	LIQUID	LIQUID
PURITY (GC AREA %)	≥99.75 %	99.92 %
WATER (COULOMETR.)	≤0.005 % H ₂ O (100 ML UNIT SIZE ONLY), ≤0.001 % (REMAINING UNIT SIZES)	< 0.001 %
RESIDUE (EVAPORATION)	≤0.0005 %	0.0001 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Beril Eray, Manager
Quality Control
Steinheim, Germany

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

4. Reaktsioonisüsteem

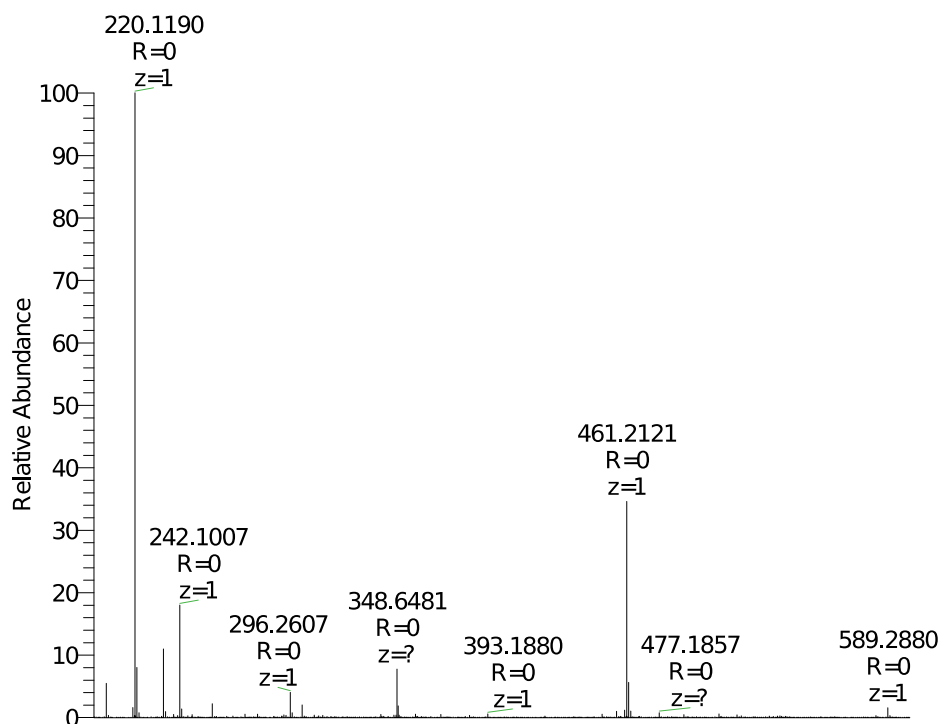


5. Sünteesitud ¹³C DEEMM-i HRMS analüüs

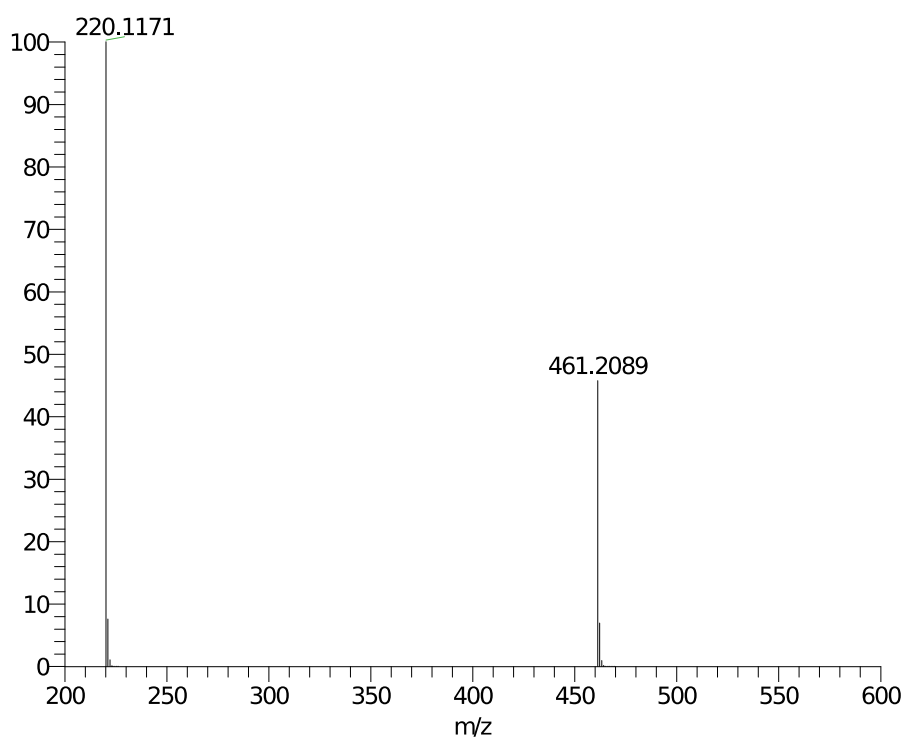
E:\DATA\SM\LSM_2024May13_24046_2
13C DEEMM m/z 200-600

2024-05-13 12:04:29 PM

Sample 24046

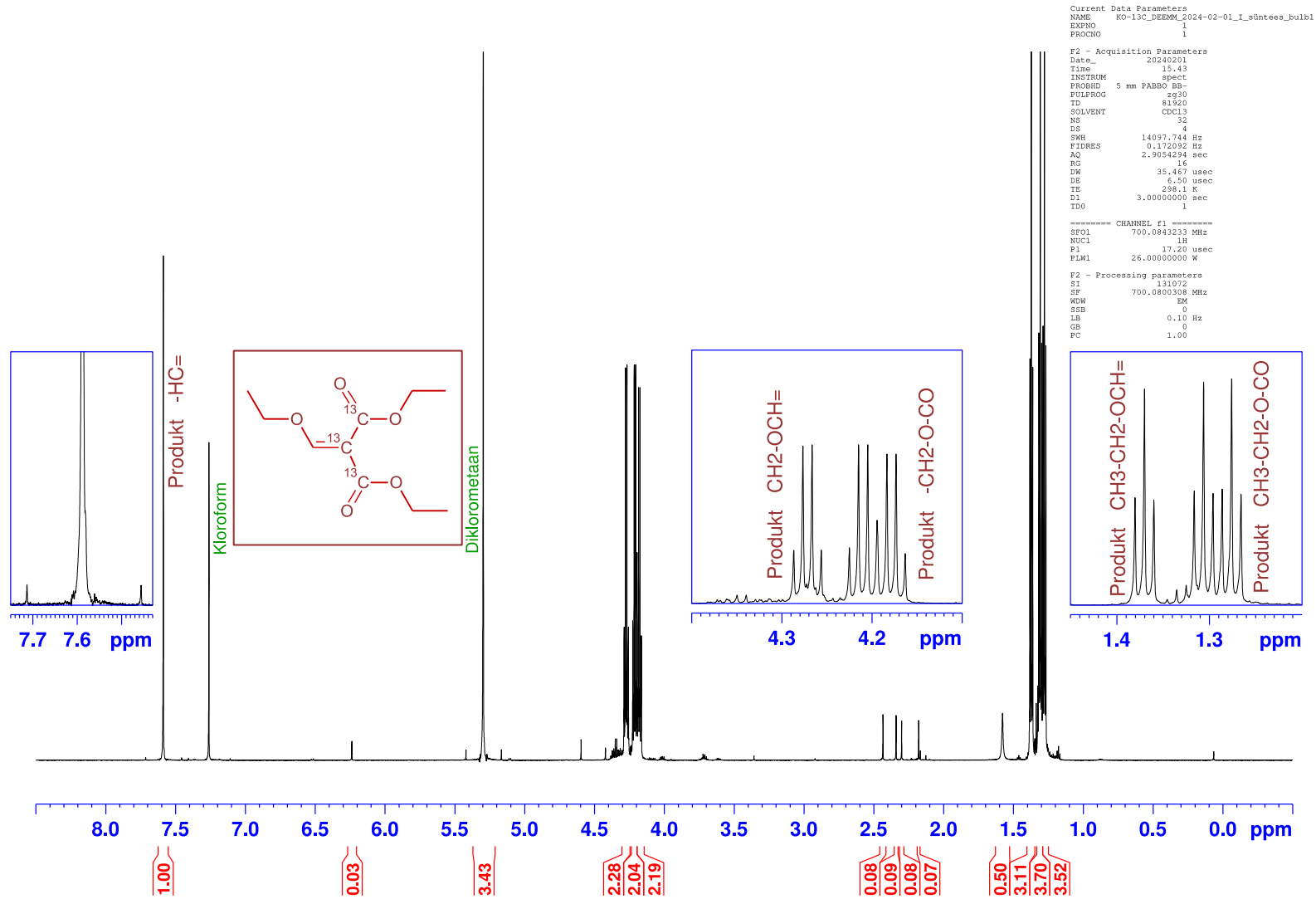


NL: 2.20E8
LSM_2024May13_2404
6_2#39-66 RT:
0.30-0.52 AV: 28 T:
FTMS +c ESI Full ms
[200.00-600.00]

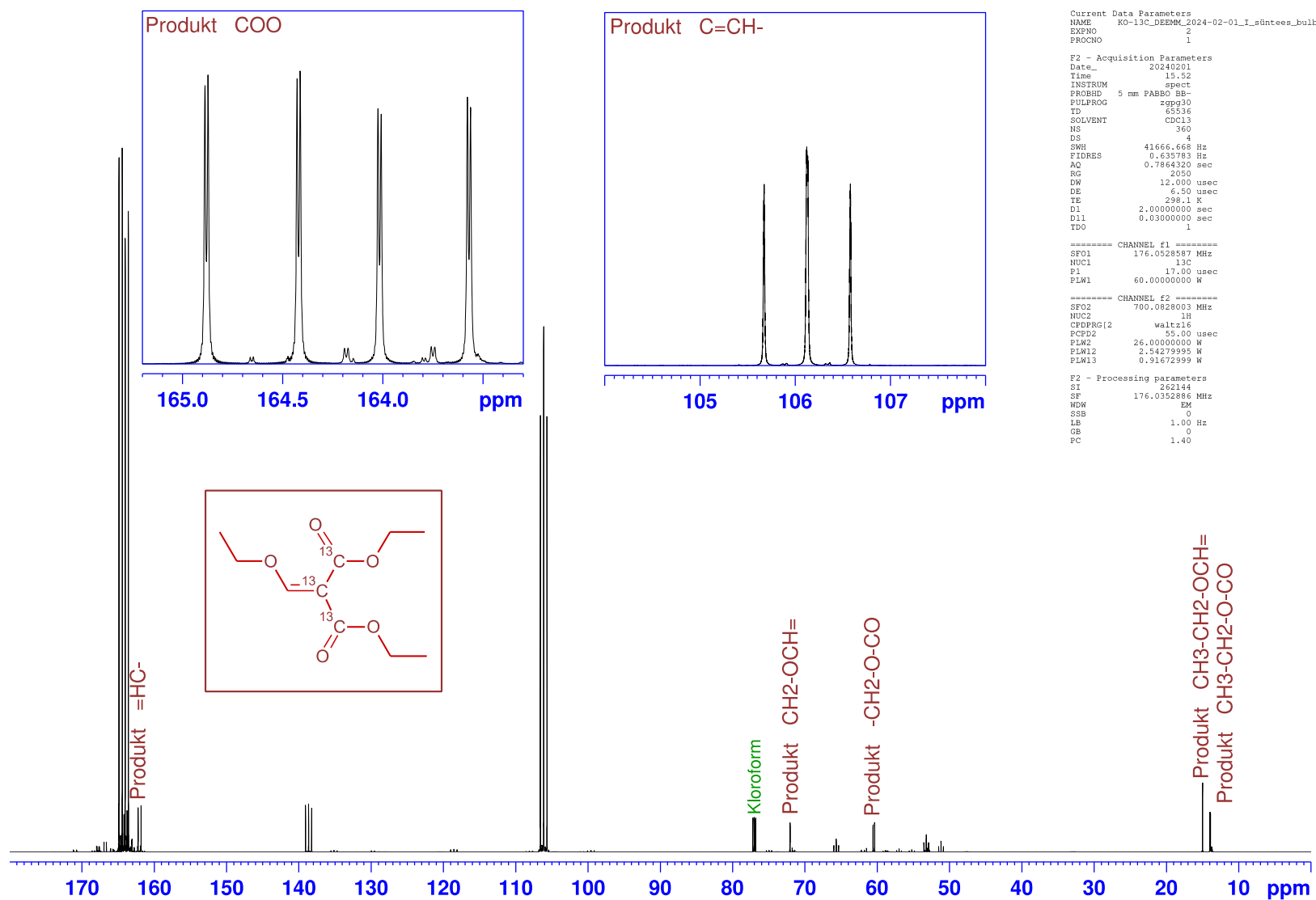


NL: 9.14E5
C7[13]C3H17O5*1.00 +
(C7[13]C3H16O5)2Na*0
.50: pa Chrg 1

6. ¹³C DEEMM-i ¹H TMR spekter koos mõõtmisparameetritega



7. ^{13}C DEEMM-i ^{13}C TMR spekter koos mõõtmisparameetritega



Lihtlitsents

Mina, **Kairi Ojasoo**,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
**„Isotoopmärgistatud derivatiseeriva reagenti dietüületoksümetüleenmalonaadi süntees
ja rakendamine LC-MS analüüsis“**,

mille juhendajad on **Lauri Toom (PhD)** ja **Koit Herodes (PhD)**,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni
autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu
Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commonsi
litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada
ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni
autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega
isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Kairi Ojasoo

28.05.2024