NTNU
Det skapende universitet

Kjemo-enzymatisk syntese av enantiomert rene halogenerte syklopropaner og triflatestere

Sigve Eliassen

Master i realfag
Innlevert: desember 2014
Hovedveileder: Elisabeth Egholm Jacobsen, IKJ

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for kjemi

Forord

Denne masteroppgaven, "Kjemo-enzymatisk syntese av enantiomert rene halogenerte bisyklobutaner", ble gjennomført i samarbeid med min veileder, førsteammunensis Elisabeth Engholm Jacobsen ved Institutt for kjemi, Norges teknisk-naturvitenskpelige universitet (NTNU), Trondheim. Arbeidet har blitt gjennomført fra august 2014 til desember 2014, som en del av min Lektorutdanning i realfag.

Jeg vil takke Elisabeth for motiverende og god faglig veiledning. Jeg vil også takke de andre medlemmer i Elisabeth's gruppe for å skape en godt miljø på labratoriet og på gruppemøter. Jeg vil også takke professor Thorleif Anthonsen for inspirerende foredrag om naturstofkjemi og for interessante diskusjoner om stereokjemi og organisk kjemi generelt.

Jeg vil ellers takke mine medstudenter for hyggelig samvær av både faglig og sosial karakter.

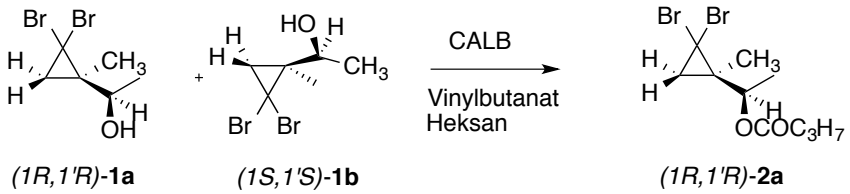
Til slutt vil jeg takke familien og kjæresten min Marit for all hjelp og støtte jeg har fått gjennom hele studiet.

S.E.

Sammendrag

Med utgangspunkt i en rasemisk blanding av 1-(2.2-dibrom-1-1-metylsyklopropyl)etanol har enantiomert rent dihalobisyklobutanol blitt forsøkt syntetisert og karakterisert.

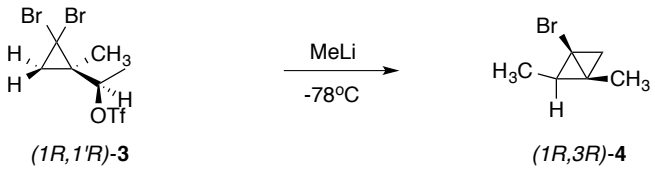
Først ble en rasemisk blanding av *(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b** omestret enzymatisk med *Candida antarctica* lipase B. Reaksjonen ble gjort i en risteinkubator ved 30°C (200 rpm). Det gav *(1R,1'R)*-**2a**, som vist i Skjema 1. Reaksjonen ble fulgt med gasskromatografi, og etter 6 dager var all *(1R,1'R)*-**1a** omdannet til butanatester *(1R,1'R)*-**2a**.



Skjema 1: Syntese av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletylbuturat (*(1R,1'R)*-**2a**).

Den korresponderende esteren ble hydrolysert videre til *(1R,1'R)*-**1a** med samme enzym i fosfatbuffer (pH = 7.1) i en risteinkubator ved 30°C. Reaksjonen ble fulgt med gasskromatografi, og etter 5 dager var all omdannet til ren *R*-alkohol, *(1R,1'R)*-**1a**.

Videre ble alkoholgruppen i *(1R,1'R)*-**1a** erstattet med triflatgruppe, som gav *(1R,1'R)*-**3**. Reaksjonen ble gjort ved -15°C. *(1R,1'R)*-**3** ble behandlet med metyl litium, hvor det var ønskelig å syntetisere bisyklobutan *(1R,3R)*-**4** (Skjema 2).

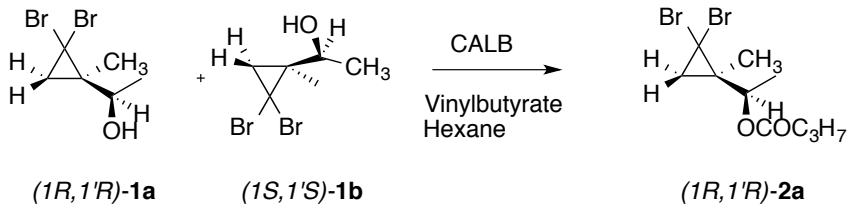


Skjema 2: Forsøk på å syntetese av *(1R,3R)*-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]butan (*(1R,3R)*-**4**)

Abstract

Starting from a racemic mixture of 1-(2.2-dibromo-1-1methylcyclopropyl)ethanol, enantiopure dihalobicyclobuthanol has been attempted synthesized and characterized.

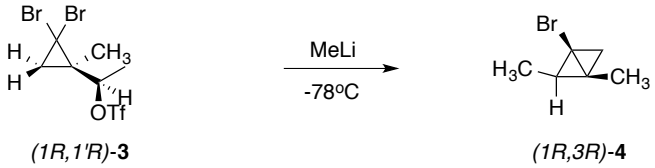
Firstly, the racemic mixture of *(1R,1'R)*-**1a** and *(1S,1'S)*-**1b** was esterificated with *Candida antarctica* lipase B. The reaction was preformed in a incubator shaker at 30°C (200 rpm) which gave *(1R,1'R)*-**2a** (Scheme 3). The reaction was controlled by gas chromatography, and after 6 days the butaneester was fully converted.



Scheme 3: Synthesis of *(1R,1'R)*-dibromo-1-methylcyclopropylethylbutyrate (*(1R,1'R)*-**2a**)

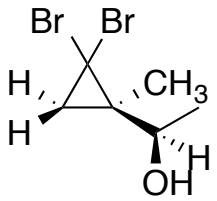
The corresponding ester was hydrolyzed further to *(1R,1'R)*-**1a** with the same enzyme in a phosphate buffer solution preformed in a incubator shaker at 30°C. The reaction was controlled by gas chromatography, and after 5 days the *R*-alcohol was fully converted, *(1R,1'R)*-**1a**.

Further, the hydroxygroup of *(1R,1'R)*-**1a** was replaced by trifluoromethanesulfonate, resulting in *(1R,1'R)*-**3**. The reactions was preformed by -15°C. *(1R,1'R)*-**3** was threated with methyl lithium, which we hoped would give the bicyclobutane *(1R,3R)*-**4** (Scheme 4).

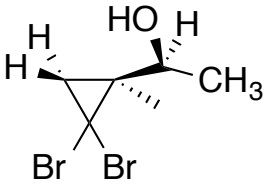


Scheme 4: Attempted synthesis of *(1R,3R)*-1-bromo-2,3-dimethylbicyclo[1.1.0]butane (*(1R,3R)*-**4**)

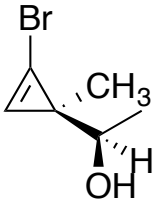
Omtalte forbindelser i oppgaven



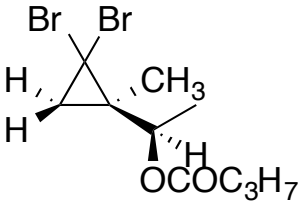
(1R,1'R)-**1a**



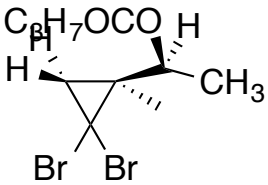
(1S,1'S)-**1b**



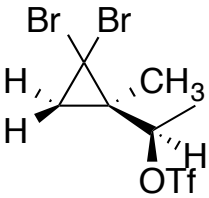
1c



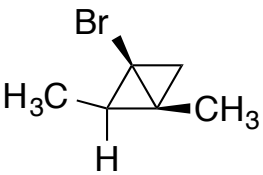
(1R,1'R)-**2a**



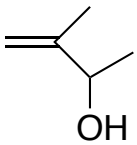
(1S,1'S)-**2b**



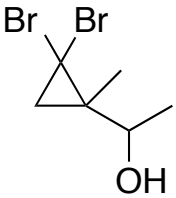
(1R,1'R)-**3**



(1R,3R)-**4**



5



6

Innhold

Forord i
Sammendrag iii
Abstract iv
Omtalte forbindelser i oppgaven v

1 Innledning **2**

2 Teori **9**
2.1 Kiralitet 9
2.2 Enantiomert overskudd 10
2.3 Biokatalyse i organisk kjemi 10
2.3.1 Kinetikk og termodynamikk i enzymkatalyse 12
2.3.2 Enzymklassifisering 15
2.3.3 Hydrolyse- og omestringsreaksjoner 16
2.3.4 Isolerte enzymer eller hel celle som katalysator 17
2.3.5 Lipaser som katalysatorer 18
2.4 Analytiske metoder for å bestemme enantiomert overskudd 21
2.4.1 Kromatografi 21
2.4.2 Kiral gasskromatografi 22
2.4.3 Polarimetri 24
2.4.4 Kjernemagnetisk resonansspektroskopi, NMR 24

3 Resultat og diskusjon **25**
3.1 Planlagt synteserute for arbeidet 25
3.2 Diskusjon 26
3.2.1 Syntese av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6) 26
3.2.2 Syntese av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletylbutanat (*(1R,1'R)*-**(2a)** 27
3.2.3 Syntese av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (1a) . . 30

3.2.4 Hydrolyse av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletyl- butanat *(1R,1'R)*-2a til *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol *(1R,1'R)*-1a . 31
3.2.5 Syntese av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl- etyl trifluormetan-sulfonat *(1R,1'R)*-3 32
3.2.6 Forsøk på syntese av *(1S,3R)*-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]- butan (*(1R,3'R)*-**4**) 32
3.3 Strukturoppklaring av synteseprodukter 33
3.3.1 Strukturoppklaring av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6) 33
3.3.2 Strukturoppklaring for *(1S,1'S)*-dibrom-1- metylsyklopropyletanol (*(1S,1'S)*-**1b**) 34
3.3.3 Strukturoppklaring for *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklo propyletyl butanat (*(1R,1'R)*-2a) 36
3.3.4 Strukturoppklaring av urent produkt etter forsøk på syklisering av *(1R,1'R)*-**3** med MeLi 37

4 Videre arbeid **40**

5 Eksperimentelt **43**
5.1 Generelle metoder 43
5.1.1 Løsningsmidler og reagenser 43
5.1.2 Diverse analyseinstrumenter 43
5.1.3 Kromatografiske analyser 44
5.1.4 Karakterisering 46
5.2 Syntese og karakterisering av forbindelser 47

Referanser **50**

A Kromatogram for identifikasjon av alkohol- og esterenatiomerer 1 og 2 **i**

B Kromatogram av hydrolysert 2a med antatt biprodukt 1c **ii**

C Kromatogram for forbindelse 6 **iii**

D Massespektra for forbindelse 6 **iv**

E Massespektra for forbindelse *(1S,1'S)*-1b **v**

F ^{1}**C-NMR for forbindelse *(1S,1'S)*-1b** **vi**

G ^{1}**H-NMR for forbindelse *(1S,1'S)*-1b** **vii**

H COSY for forbindelse *(1S,1'S)*-1b **viii**

I HMBC for forbindelse *(1S,1'S)*-1b **ix**

J IR for forbindelse *(1S,1'S)*-1b **x**

K ^{1}**H-NMR for forbindelse *(1R,1'R)*-2a** **xi**

L Massespektra for forbindelse *(1R,3R)*-4 **xii**

M ^{1}**C-NMR for forbindelse *(1R,3R)*-4** **xiii**

N ^{1}**H-NMR for forbindelse *(1R,3R)*-4** **xiv**

O HSQC for fobindelse *(1R,3R)*-4 **xv**

P COSY for forbindelse *(1R,3R)*-4 **xvi**

Q Estimert ^{1}**H-NMR for forbindelse *(1R,3R)*-4** **xvii**

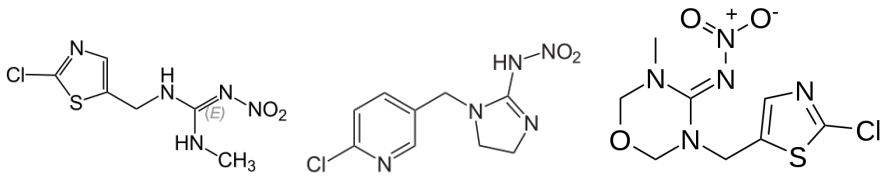
R Estimert ^{1}**C-NMR for forbindelse *(1R,3R)*-4** **xviii**

Kapittel 1

Innledning

Insektisider er pesticider som brukes for å drepe insekter. Pesticider er et fellesbegrep på en forbindelse, eller en blanding av forbindelser, som har til formål å drepe skadedyr [1].

Insektisider og pesticider har et bredt bruksområde; innenfor jordbruk og produksjon, prosessering og lagring av mat, i treproduksjon og i dyrefor. Med så mange bruksområder kan det oppstå noen uønskede bivirkninger som må taes alvorlig [2]. En slik bivirkning, og et resultat av bruk av neonikotinoider i jordbruk, har fått noe av skylden for at bier dør. Europakommisjonen vedtok i 2013 å forby bruken av tre pesticider som tilhører neonikotinfamilien (clothianidin (1.1a), imidacloprid (1.1b) og thiametoxam (1.1c) i to år [3]. Det er ikke bare i Europa bekymringen med neonikotinoider taes alvorlig; i et memo fra U.S Fish & Wildlife Service (FWS) skrives det at de vil gradvis slutte med neonikotinder i jordbruk, og fra januar 2016 skal all bruk av neonikotinoider stoppes [4].

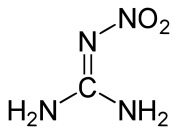


(a) Clothianidin (b) Imidacloprid (c) Thiamethoxam

Figur 1.1: Neonikotinfamilien

Neonikotinoider ble introdusert i 1990, og er dermed et relativt nytt insektisid. I EU er det fem neonikotinoider som er tillatt: clothianidin (1.1a), imidacloprid (1.1b) og thiametoxam (1.1c), som stammer fra *N*-nitroguanidingruppen (Figur 1.2), og thiaclo-

prid og acetamiprid, fra *N*-cyanoamidingruppen. Det er de tre førstnevnte som brukes mest, og er giftigere overfor bier enn de to andre.



Figur 1.2: N-Nitroguanidin

Neonikotinoider er utbredt i jordbruket for å beskytte avlinger mot pest, og i 2003 ble salget av neonikotinoier anslått til 1 milliard dollar. De kan enten sprayes på avlinger eller tilsettes direkte i frøene, slik at insektisidet blir tatt opp i planten. Insektisidet taes opp i røttene til planten, og spres gjennom karstrengene til alle plantdelene, inkludert nektar og pollen, som feks. bier tar opp. Det er vist at neonikotinene påvirker insektenes nikotin acetylkolin reseptor (nAChR), som er skadelig for insektenes ryggrad [5, 6]. I tillegg påvirker neonikotinoidene nervesystemet til biene, og dermed deres evne til å navigere i luften. Dermed er det usikkert om de kommer tilbake til bolet sitt, hvor de mater larver [7, 8]. Det er også vist at neonikotindene kan redusere vekstraten til humler, i tillegg til at produksjon av nye dronninger kan reduseres med 85 % (!) [9]. Labratorieundersøkelser viser også at imidacloprid er meget giftig for humler [10].

Disse opplysningene kan være bekymringsverdig da neonikotinoidene holder seg i jorda i opptil seks år etter det er tilsatt på avlinger. I tillegg er det avdekket resultater som viser at planter som ikke er behandlet med neonikotinoider absorberer de restene av neonikotinoider fra tidligere år [10].

Når en vet at bier er viktig for jordbruket for å pollinere mange ulike grønnsaker (eksempelvis tomater, mais), i økosystemer og i biologisk mangfold, har Xerced Society for Invertebrate Conservation presentert flere anbefalninger med tanke på benyttelsen av neonikotinoider. Hovedessensen i disse anbefalingene er å virkelig revurdere bruken av neonikotinoider i jordbruk før vi forstår risikoen med å bruke slike insektisider. Det er enda ikke gjort mange studier av hvilke konsekvenser anvendelsen av neonikotinoider i jordbruk, men konklusjonen fra Xerced Society er klar: bruken av neonikotinoider bør være så lav som mulig til vi vet hvordan en kan få plantene til å bekyttes mot skadeinsekter uten å skade nytteinsekter som pollinerer avlingene [10].

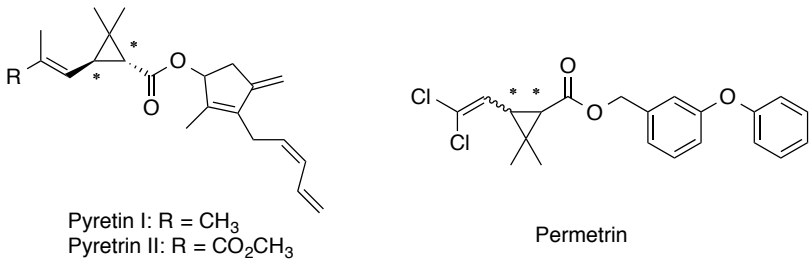
Til tross for disse resultatene stiller ikke Rothamsted Research seg bak opplysningene som vises fra flere forskere. Rothamsted Research er den forskningsinstitusjonen som har forsket kontinuerlig på jordbruk i 170 år. De mener at en del av forskningen som har blitt utført på bier ikke reflekterer den virkelige mengden neoniktotinoider bier blir utsatt for, og dermed kan en ikke konkludere at det er neonikotinoidene som er årsaken til bienes utryddelse [7].

Neonikotinoidene er bare et eksempel på hvor stor industri av fremstilling av insektisider er, og det brukes over hele verden. Noen av insektisidene er naturprodukter, og eksempeler på dette er pyretrin, insektisider som er funnet i planten *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Sykloproppanringen er en bestanddel i pyretrinene, og ofte er slike stoffer kirale. Disse insektisidene blir idag syntetisert industrielt i stor skala over hele verden [11]. Pyretrinenes aktivitet avhenger av eksakt stereokjemi, så syntese av disse forbindelsene kan være utfordrende.

Figur 1.3: *Chrysanthemum cinerariaefolium*

I insektsprayer holder det ofte ikke med det industriellt fremstillte insektisidet permetrin: i oversikten over ulike bekjempelsesmidler mot skadedyr på markede i Norge finnes flere insektisidmidler som inneholder en blanding av permetrin og pyretrin [12].

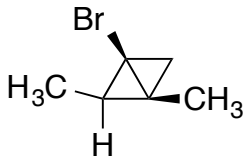
Pyretrin og permetrin har ulik stereokonfigurasjon, se Figur 1.4. På grunn av deres ulike stereokonfigurasjon vil de kunne virke på forskjellige plasser hos insekter, og dermed være mer effektiv enn stoffene alene.



Figur 1.4: Struktur av Pyretrin og Permetrin

Motivasjonen for å syntetisere enantiomert rene insektisider er først og fremst for å legge til rette slik at de virker på skadedyr og lar resten av økosystemet være uberørt. Det er flere kirale insektisider som har høy aktivitet mot organismer som ikke skulle være berørt [13], og bivirkninger av slike insektisider kan være fatale: giftig for mennesker, dyr og miljøet [14]. Målet er å minske risikoen for slike bivirkninger, men samtidig være selektiv mot skadedyrene.

Et av målene i denne oppgaven er å syntetisere enantiomert rene bisyklobutaner. Figur 1.5 viser strukturen til det ønskelige produktet.



Figur 1.5: Målmolekyl, *(1R,3R)*-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]butan (*(1R,3R)*-**4**).

For å oppnå enantiomert rene forbindeler kan man i prinsippet gjøre en enantioselektiv syntese eller en kinetisk oppløsning av en rasemisk blanding. Begge metodene har sine kjennetegn, fordeler og ulemper. Enantioselektiv syntese kan i prinsippet gi 100% utbytte av en ren enantiomer eller en rasemisk blanding som må separeres. Kinetisk oppløsning kan gi enantiomert rene produkter, men gir bare maksimalt 50% utbytte av den ønskede enantiomeren.

Sammenlignet med ikke-enzymatiske kjemiske katalysatorer, har biokatalysatorer (en-

zymer eller hele celler) flere fordeler: effektive, miljøvennlige, katalyserer et bredt spekter aav reaksjoner, og ikke minst viser de høy selektivitet (kjemo,- regio- og stereoselektivitet). Stereoselektiviteten som er observert av biokatalysatorer på naturlige substrater kan benyttes i organisk syntese av enantiomert rene forbindelser. Disse forbindelsene kan være nyttige legemidler eller jordbruksjemikalier.

Enantiomert rene forbindelser er nødvendige i legemiddelindustrien, da enantiomere former for kirale legemidler kan ha ulike farmakologiske egenskaper [15]. Menneskekroppen klarer å skille mellom enantiomere forbindelser, og det skyldes at alle levende organismener er bygd opp av kirale byggesteiner som kun eksisterer i en enantiomer form. Dette gjør at en enantiomer forbindelse kan passe inn og ha en effekt i kroppen, mens den andre enantiomeren kan være inaktiv, eller ha uønskede effekter. Syntese av enantiomert rene forbindelser er derfor svært viktig [16, 17], med tanke på medisiner og å kunne finne insektisider som dreper en type insekter men ikke den andre.

Det er interesse både for mer forskning med bruk av biokatalysatorer i organisk kjemi, og et sammarbeid mellom organisk kjemikere, biokjemikere og molekylærgenetikere er nødvendig for å utarbeide bedre metoder enzymkatalyserte reaksjoner. I Norge finnes det en av verdens mest avanserte bioraffineri i Borregård. I BALI-prosjektet deres benyttes blant annet lipaser for å bryte ned cellulose.

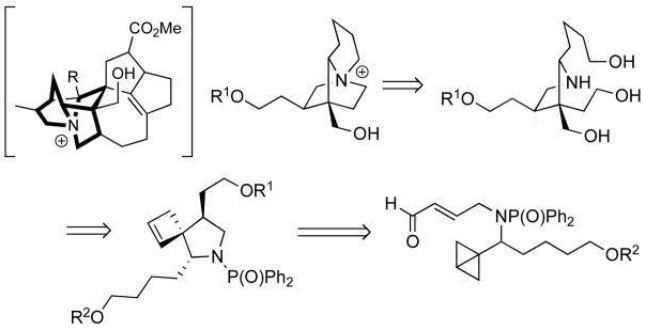
Utgangsstoffet som benyttes i dette prosjektet er en rasemisk blanding av *(1R,1'R)-(1S,1'S)*-dibrom-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (*(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b**), syntetisert av Kleveland og Skattebøl [18]. Det ble dannet dihalosyklopropaner ved addisjon av dihalokarbener. I slike reaksjoner benyttes en sterk base som kan generere karbenet, for eksempel *t*-BuOK. Ved bruk av en faseoverføringsreagens, er det mulig å danne karbenet på en enkel måte med feks. kloroform eller bromoform og vanndig natriumhydroksid. Uten faseoverføringsreagenset vil tillagingen av dihalokarbenet være ineffektiv da hydroksidionet vil fungere som en felle for dihalokarbenet, som resulterer i at det korresponderende hydroksidet dannes. Med en faseoverføringsreagens vil CX_3^--ionet vil overføres til den organiske fasen med et kvarternært ammoniumsalt før det omdannes til dihalokarbenet, som kan brukes videre i syntesen [19].

Syntesen er delt opp i fire trinn, hvorav det første trinnet er en enzymatisk kinetisk opp-

løsning. Som kiral katalysator brukes lipasen *Candida antarcitca* lipase B. Lipasene er en enzymklasse som er mest brukt i organiske synteser. De trenger ingen kofaktorer, og er derfor enkle å bruke. I naturen katalyserer lipasene hydrolysen av triglyserider. I organiske reaksjoner med organisk løsningsmiddel, katalyserer lipasene den motsatte reaksjonen, nemlig forestring av alkoholer (med tilsats av en acyldonor).

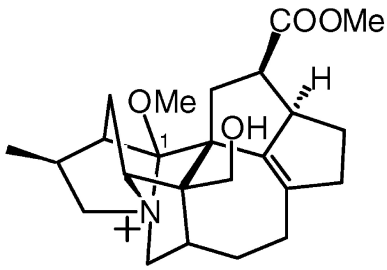
De resterende trinnene gjøres ikke-enzymatisk, men hydrolysetrinnet kan eventuelt gjøres enzymatisk.

Det ønskede produktet *(1R,3R)*-**4** har ingen (nåværende) kjent biologisk funksjon, men kan være utgangsstoff for nye insektisider. Bisyklo[1.1.0]butylmetylamin har imidlertidig vært en byggestein i syntesen av en syklisk kvaternær ammoniumbyggestein til daphniglacins, se Skjema 1.1 [20].



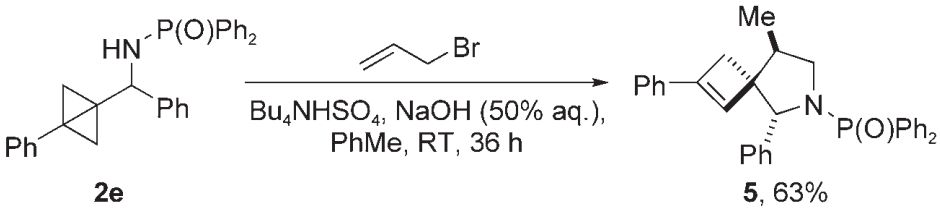
Skjema 1.1: Retrosyntetisk skjema for syntese til kvaternær ammoniumbyggestein til daphniglacins.

Daphniglacin ble isolert fra *Daphniphyllum glaucescens*, og karakteriseres som et alkaloid, se Figur 1.6 [21].



Figur 1.6: Struktur av Daphniglacin, isolert fra *Daphniphyllum glaucescens*.

Bisyklobutaner har en kalkulert ringspenning på 63.6 [22]. Det er flere måter å kunne gå videre med bisyklobutaner: elektrofil addisjon, enten syrekatalyserte reaksjoner eller addisjon av halogener [23]. Det vil kunne blant annet gi substituerte syklopropaner. I tilegg er det mulig å danne et dien med en karben C-H innsetting [24]. Forskning viser også at det er mulig å syntetisere relativt kompliserte bisykler fra bisykloaminer (Skjema 1.2) i en intramolekylær sykliseringsreaksjon [25].



Skjema 1.2: Spirosyklisk forbindelse **5** syntetisert fra bisykloamin i en Alder-ene reaksjon [25].

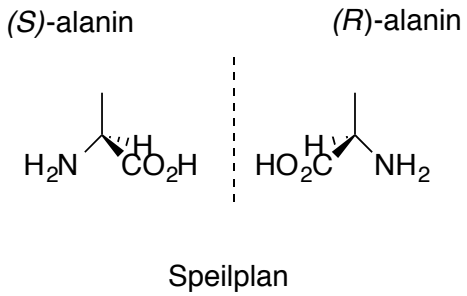
Kapittel 2

Teori

2.1 Kiralitet

Kiralitet er en egenskap knyttet til flerdimensjonale objekter. Hvis et objekt ikke kan overlappe sitt speilbilde (dvs. at objekte ikke har noen symmetrielementer, feks. speilplan eller inversjonssenter) er objektet kiralt [26].

Det er flere eksempler på objekter som er kirale. En høyrehånd og en venstrehånd er kirale, da de er speilbilder av hverandre, men ikke identiske. For kjemiske forbindelser knyttes kiralitet til molekylets tredimensjonale struktur. Molekyler som er identisk og i tillegg speilbilder av hverandre, kalles enantiomerer (Figur 2.1).

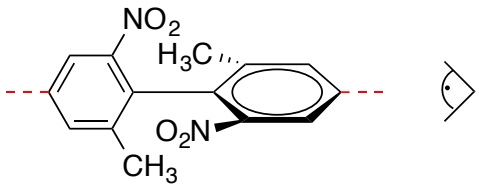


Figur 2.1: S og R-alanin.

Enantiomerer har identiske kjemiske egenskaper. Deres fysikalske egenskaper er også identiske (løselighet, kokepunkt, retensjonstid, etc.), men de kan ha meget forskjellig biologisk aktivitet (se over). En blanding med lik mengde *R* og *S*-enantiomer kalles en rasemisk blanding. En rasemisk blanding er ikke optisk aktiv selv om enantiomerene i blandingen er kirale. Blandingen vil også kunne ha forskjellige fysikalske egenskaper

enn enantiomerene i blandingen [27].

Aminosyren alanin på Figur 2.1 har ingen symmetriplan, og er derfor kiral. Alanin kan ikke ha noe symmetriplan, da molekylet også har et tetraedrisk karbonatom (NH_2,CO_2H, CH_3 og H). Det karbonatomet er et stereosenter, og vanligvis er det et tetraedrisk karbonatom. Det finnes også eksempler på molekyler som er kirale selv om de ikke har et tetraedrisk karbonatom. Stereogene akser gjennom molekylet (aksialt kiralt molekyl), eller stereogene plan som ordner substituentene i en fast posisjon i rommet slik at de ikke kan overlappe sitt speilbilde forekommer også (Figur 2.2).



Figur 2.2: Eksempel på en stereogen akse på et aksialt kiralt molekyl.

2.2 Enantiomert overskudd

Enantiomert overskudd (*ee*), er overskuddet av den ene enantiomeren med hensyn til den andre, og uttrykkes i prosent [28]. Enaniomert overskudd er definert i likning 2.1.

$$ee = \left[\frac{(R-S)}{(R+S)}\right] \times 100\% \tag{2.1}$$

Enantiomert overskudd kan bestemmes med flere forskjellige måter; kiral kromatografi, polarimetri og NMR.

2.3 Biokatalyse i organisk kjemi

Bruk av enzymer blir mer og mer utbredt i industriell fremstilling av mat, vaskemidler, til syntese av legemidler, i produksjon av landbrukskjemikalier og i kosmetikkbransjen.

Historisk sett har enzymene vært viktig i flere århundrer, blant annet i ostlaging og brygging av øl og vin [29].

Selv om enzymer har har en lang historie som naturlige katalysatorer, er det en viss forskjell på formålet til forskerne nå enn før. Å kunne forklare biokjemiske prosesser og enzymmekanismer har i mange tiår vært hovedmålet til forskere. Adrian Brown (1852-1919) arbeidet med enzymkinetikk, og ble sitert av Leonor Michaelis og Maud Menten når de publiserte sin teori i 1913 [30]. Gjennom 1980-tallet var det en økning i bruken av enzymer i asymmetrisk syntese i den hensikt å omdanne ikke-naturlige organiske forbindelser. På 1990 tallet økte interessen mer, og antall publiserte artikler økte voldsomt [31].

Det er flere grunner for at biokatalyse er blitt populært i organisk kjemi, men det er spesielt to hovedgrunner til dette[31]:

1. Enzymer reagerer under milde betingelser, og dermed regnet som miljøvennlige
2. Enzymer er har høy kjemo-, regio- og stereoselektivitet

I tilegg har enzymer vist seg å være meget effektive katalystatorer. De kan øke reaksjonshastigheten med en faktor på 10^8-10^{10}, og det er blitt gjort eksperimenter hvor enzymene økte reaksjonshastigheten med en faktor opp til 10^{20} [31, 32].

Grønn kjemi er et tema som er blitt mer og mer fokusert på de siste årene. Det er definert som kjemien som reduserer eller eliminerer bruken av miljøskadelige forbindelser i design, produksjon eller bruken av kjemiske produkter [33]. Her stiller enzymer i en egen klasse, da reaksjonene de inngår i utføres under milde betingelser (typisk pH 5-8, temperatur 20-40° C). I tillegg kan enzymene brytes ned i naturen, i motsetning til tungmetaller.

Det er også noen ulemper med bruk av enzymer som katalysatorer. Siden enzymene fungerer best under milde betingelser, vil det være vanskeligere å variere betingelser, da det kan endre aktiviteten til enzymene. Enzymer foretrekker vann som løsningsmiddel, som en organisk kjemiker helst velger bort pga. det høye temperaturen og den høy varme som kreves for fordaming. Ved å velge et organisk løsningsmiddel vil aktiviteten til enzymene gå ned. I tillegg vil reaksjoshastighet i mange enzymreaksjoner reduseres

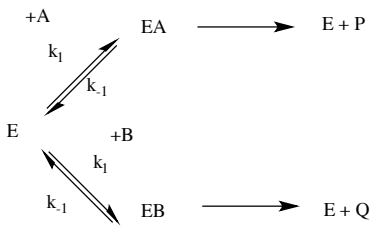
ved høye substrat eller produktkonsentrasjoner, da enzymeffektiviteten hemmes av substratet eller produktet. Det at enzymene er meget spesifikke, og ofte bare finnes i en enantiomert ren form, er også en utfordring. Heldigvis blir nye enzymer oppdaget, og det økes stadig i antall kommersielt tilgjengelige enzymer [34, 35].

2.3.1 Kinetikk og termodynamikk i enzymkatalyse

Kinetisk oppløsning

Det er i hovedsak tre forskjellige metoder å oppnå rene enantiomerer på: kjemisk transformasjon av enantiorene naturlige produkter, asymmetrisk syntese og kinetisk oppløsning. Felles for disse metodene er at det er enzymer som katalyserer reaksjonene. Valget for hvilken metode en skal bruke, avhenger av faktorer som substrat, antall syntetrinn og hvilken teknologi som er tilgjengelig. [36].

I reaksjoner hvor enzymer er katalysatorer i rasemiske blandinger, har den ene enantiomeren høyere spesifikk konstant ($\frac{k_{kat}}{K_M}$). Dette resulterer i en lavere aktiveringsenergi ($\Delta G^{\#}$) for overgangstilstanden for denne enantiomeren (Figur 2.3). En slik reaksjon er definert som kinetisk oppløsning.



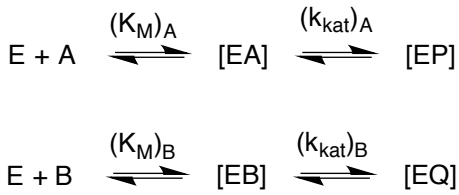
Figur 2.3: Enzymkatalysert enantioselektiv reaksjon. E = enzym, A og B = enantiomerer i et rasemisk substrat, EA og EB = enzymsubstrat komplekser, P og Q = enantiomere produkt.

Det enantiomere forholdet, E

Det enantiomere forholdet (E) beskriver enantioselektiviteten til et enzym i kinetisk oppløsning. E beskriver forholdet mellom hastighetskontantene for to enantiomerer, og vil holdes konstant for hele reaksjonen, hvis ikke K_M eller k_{kat} endrer seg [37]. Dette er

imidlertidig ikke helt fundamentalt; i enkelte hydrolyse- og omestringsreaksjoner med Novozym 435 og Novozym 525F har det vist seg at E-verdien varierte. Det er foreslått at denne endringen skyldes en binding mellom enzymet og en ligand. Dette kan føre til en konformasjonsendring i enzymet, slik at enzymet får en endret affinitet for enantiomerene [38, 39].

For en irreversibel reaksjon, kan Michaelis-Menten kinetikk beskrive hvordan en reaksjon med to enantiomere substrater reagerer med enzymet (Figur 2.4).



Figur 2.4: Irreversibel kinetisk oppløsning. A og B = enantiomere substrater, E = enzym, [EA] og [EB] = diasteromere enzymsubstrat komplekser, P og Q = enantiomere produkt.

Det enantiomere forholdet kan regnes ut ifra eksperimentelle kromatografiske verdier, hvor ee_s og ee_p er enantiomert overskudd av henholdsvis substrat og produkt (2.2, 2.3).

$$E = \frac{\ln\left[(1-c)\,(1-ee_s)\right]}{\ln\left[(1-c)\,(1+ee_s)\right]} \tag{2.2}$$

$$E = \frac{\ln\left[1-c\left(1+ee_p\right)\right]}{\ln\left[1-c\left(1-ee_p\right)\right]} \tag{2.3}$$

c er omsetningen av reaksjonen, og uttrykkes med enantiomert overskudd 2.4:

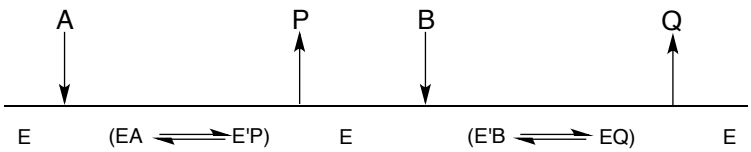
$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \tag{2.4}$$

Likningene 2.2 og 2.3 er ikke holdbar for reaksjoner som har veldig lav eller høy omsetning på grunn av usikkerheter som kan oppstå. For disse reaksjonene benyttes 2.5, der en bruker målinger fra enantiomert overskudd av produkt (ee_p) og substrat (ee_s) [40].

$$E = \frac{ln\frac{[ee_p(1-ee_s)]}{(ee_p+ee_s)}}{ln\frac{[ee_p(1+ee_s)]}{(ee_p+ee_s)}} \tag{2.5}$$

Utregning av det enantiomere forholdet kan blant annet gjøres på dataprogrammet E & K calculator. Her beregnes E og likevektskonstanten ut i fra en Ping-Pong Bi-Bi mekanisme [41, 42].

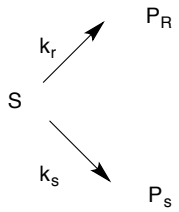
Likning 2.5 gjelder bare for et substrat som gir et produkt. En kinetisk oppløsning med to substrater som genererer to produkter, kalles for en bi-bi reaksjon. Bi-bi reaksjonene kan utledes med en ping-pong mekanisme. I en ping-pong mekanisme binder enzymet seg kovalent med det første substratet, frigir produktet før det reagerer med det andre substratet. For en omestringsreaksjon vil en ping-pong bi-bi mekanisme forløpes slik: enzymet (E) binder seg til acyldonoren (A), og danner et acyl-enzymintermediat. Alkoholen (P) frigis, og acyl-enzymet kan reagere med den neste alkoholen (B). Til slutt vil den acylerte alkoholen (Q) frigis med enzymet Figur 2.5.



Figur 2.5: Ping-pong bi-bi mekanisme. E = enzym, E' = acylenzym, A og B = substrater, P og Q = produkter.

Asymmetrisk syntese

En annen måte å oppnå enantiomere produktblandinger er asymmetrisk syntese. I en slik reaksjon er substratet akiralt, og produktet er en blanding med ulik mengde stereoisomerer. Målet er å få høyest mulig *ee* (Figur 2.6), og teoretisk er det mulig å få 100 % utbytte. Dette avhenger av selektiviteten og aktiviteten til katalysatoren (enzymet). I en asymmetrisk syntese er det enantiomere forholdet konstant, da *ee* er uavhengig av graden av konvertering eller omsetning [43].



Figur 2.6: Et akiralt substrat S konverteres til enantiomerer P_r og P_s, k_r og k_s er hastighetskontanter. Selektiviteten avhenger av forholdet mellom k_r og k_s.

For å få et akseptabelt utbytte i asymmetrisk syntese bør selektiviteten være høy, og katalysatoren bør være enkel å separere fra produktet. I valget mellom å gjøre en asymmetrisk syntese eller en kinetisk oppløsning må en vurdere hvilken katalysator, hvilket substrat og kostnaden på reaksjonen opp mot hverandre.

2.3.2 Enzymklassifisering

Enzymer er delt inn i seks kategorier, basert på hvordan reaksjon de katalyserer (se Tabell 2.1).

Tabell 2.1: Klassifisering av enzymer [31]

Enzymklasse	**Reaksjonsklasse**
1. Oksidoreduktaser	Oksidasjon - reduksjon
2. Tranferaser	Overføring av grupper: acyl, fosforyl, metyl, sukker, etc.
3. Hydrolaser	Hydrolysering av ester, amider, peptider, nitriler, etc.
4. Lyaser	Addisjon - eliminasjon av små molekyler til dobbelbindingg (C=C, C=N, C=O, etc.)
5. Isomeraser	Isomerisering (rasemisering, epimerisering, omorganisering)
6. Ligaser	Tilaging av C-O, C-S, C-N

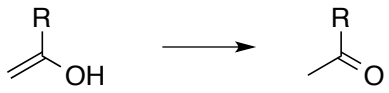
Omtrent to tredjedeler av biotransformasjonene i organisk kjemi kan kategoriseres som hydrolysetransformasjoner med ester eller amidbindinger ved bruk av proteaser, esteraser eller lipaser [44].

2.3.3 Hydrolyse- og omestringsreaksjoner

De mest populære og mest brukte enzymene i organisk kjemi er hydrolasene. De blir brukt i hydrolyse av estere, amider, laktoner og epoksider. I tillegg kan de brukes i syntese av estere, gitt at det ikke er vann til stede. En grunn til at hydrolasene blir brukt i stor grad er at de er selektive for estere som funksjonell gruppe, men ikke selektiv for den generelle strukturen til substratet. I tillegg er mange hydrolaser kommersielt tilgjengelige, enkle å bruke og kan brukes i organiske løsningsmidler [36].

For å gjøre en omestringreaksjon kreves det en acyldonor som danner et acylenzym. Mekanismen for en omestringsreaksjon er vist i Figur 2.7 med *Candida antarctica* som katalysator.

Omestringsreaksjoner uten acyldonorer tradisjonelt reversible, da reaktantene ofte er i lave konsentrasjoner. For å unngå reversibilitet må man bruke vinylestere som acyldonor. Derfor er valget av acyldonor viktig, da en ønsker en irreversibel reaksjon og høyest mulig E-verdi. Det har vist seg at vinylestere gjør reaksjonen irreversibel da den utgående alkoholen blir tautomerisert til et keton eller aldehyd (Skjema 2.1) [45].



Skjema 2.1: Tautomeriseing av vinylalkohol til korresponderende keton eller aldehyd.

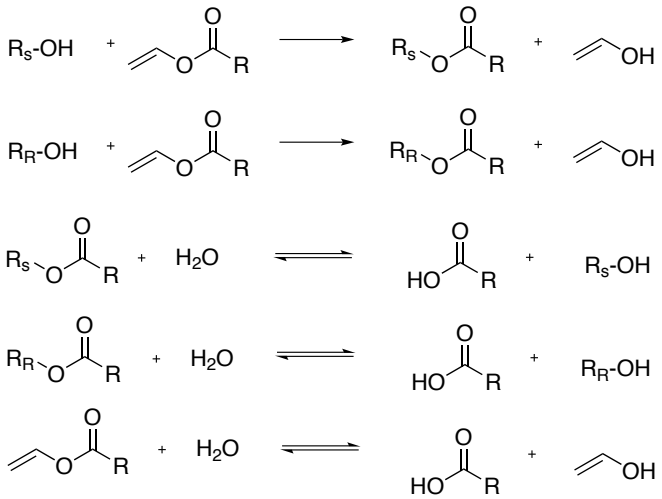
Ved bruk av vinylbutanat vil acetaldehyd produseres etter tautomerisering, som ikke har noen nukleofile egenskaper.

Det naturlige løsningsmiddlet til enzymene er vann, og tradisjonelt gjøres enzymreaksjoner i nettopp vann. I organiske reaksjoner kan det være en utfordring, da substratene ofte ikke er vannløselige. For å unngå dette problemet, gjøres ofte reaksjonene i et tofasesystem [46].

Hydrolasene derimot er de eneste enzymene som kan benyttes i tørre løsningsmidler. Arbeid i organiske løsningsmidler har flere fordeler: enkel opparbeidelse, bedre løse-

lighet for substrat og produkt, og likevekten er forskjøvet mot syntesen og ikke hydrolysen [47].

I en omestringsreaksjon vil det være fem ulike likevekter i samme system, se Skjema 2.2. To av reaksjonene er irreversible, da det er en vinylester som acyl donor til stede. Vann fører til at hydrolysen er reversibel. Hydrolyse av acyldonor vil også senke omestringsreaksjonen, og evt. stoppe den helt, som vil senke både ee_s og ee_p. Valget av organisk løsningsmiddel er derfor viktig med tanke på enantioselektiviteten, siden vanninnholdet varierer ut ifra polariteten av løsningsmiddlet.



Skjema 2.2: Likevekt for en omestringsreaksjon.

For å oppnå et vannfritt system må man bruke tørre løsningsmidler. Tørking ved bruk av molekylærsiv kan brukes for å minimalisere risikoen for at enzymet vil bli omringet av en vannfase, som gjør at enzymet og substratet blir separert fra hverandre [36].

2.3.4 Isolerte enzymer eller hel celle som katalysator

Det er i hovedsak to forskjellige måter å bruke enzymer i organiske reaksjoner på: isolerte enzymer eller hele celle som katalysatorer.

Isolerte enzymer har den fordelen over hel celle at det valgte enzymet katalyserer kun

en reaksjon, og uønskede reaksjoner observeres sjelden. Hel celle kan inneholde flere enzymer, og det kan oppstå situasjoner der det dannes uønskende biprodukter. I tillegg kan rene enzymer brukes i mindre løsningsmiddel enn hel celle, og dermed er også det enklere å opparbeide reaksjonen.

Hel celle krever ofte store mengder vann. Dermed kan vannløselige produkter være vanskelig å ekstrahere. På den andre side er også hel celle enzymer billigere enn isolerte enzymer. Dessuten trenger en ikke hel celle enzymer kofaktorer, da de allerede er i cellen.

Rene enzymer trenger kofaktorer for å fungere, med unntak av hydrolasene. Eksempelvis trenger oksireduktasene kofaktorer som nikotin adenin dinukleotid (NAD) og nikotin adenin dinukleotidfosfat (NADP) for å fullføre reaksjonen. Disse kofaktorene er ekstremt dyre, men det kan benyttes et regenereringssytem, slik at kofaktorene kun blir regenerert [48].

2.3.5 Lipaser som katalysatorer

Lipaser (triacylglycerol hydrolaser) er enzymer som katalyserer hydrolysereaksjoner av triglyserider til fettsyrer og glyserol. Lipasene brukes industriell fremstilling av paclitaxel (taxol) derivativer og til produksjon av kirale aminer, som kan være byggesteiner til andre bioaktive molekyler. Eksempelvis produserer BASF kirale aminer i storskala opp til flere hundre tonn, blant annet *S*-metoksyisopropylamin, som er en byggestein for det optiske kornugressmiddlet Frontier x2 [49–51].

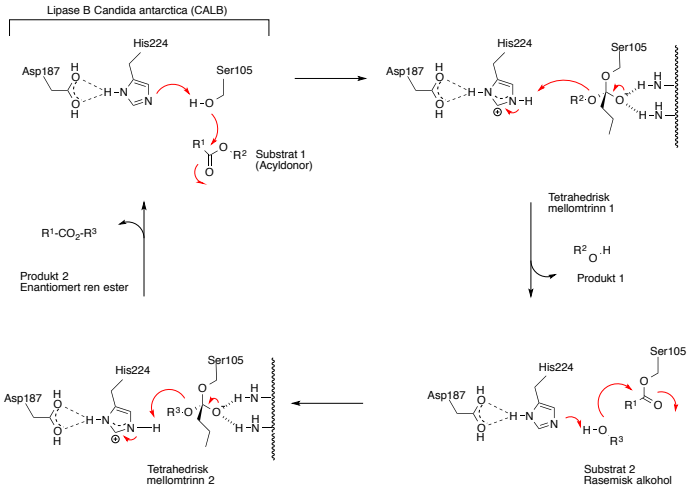
Lipasene skiller seg ut fra andre hydrolytiske enzymer (feks esteraser, proteaser) er at de ikke følger den vanlige Michaelis-Menten kinetikk: hvis konsentrasjonen til substratet øker, øker også enzymaktiviteten. Dette gjelder altså ikke lipasene, som viser nesten ingen aktivitet så lenge substratet er løst i en enkelt system. Først når substratkonsentrasjonen blir så høy at det lenger ikke er løselig i reaksjonsmediet, øker lipaseaktiviteten. Dette punktet hvor aktiviteten øker, kalles for en kritisk micelle - konsentrasjon, da det er her substratet danner en lipofil fase [31].

Det er en omleiringsprosess som er forklaringen på dette fenomenet. Det er vist at

det aktivet stedet til lipasene er dekket av et lokk (en α-helix). Når enzymet kommer i kontakt med vann - oljefasen blir denne α-helixen foldet tilbake, og dermed åpner det aktive hulrommet seg, slik at substratet kan nå inn og katalysen kan starte. Dette fenomenet kalles for "interfacial activation" [52].

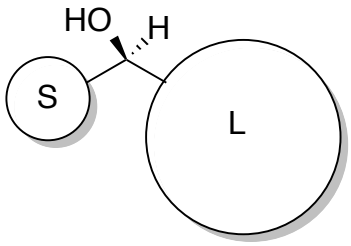
Lipasene viser mindre aktivitet i organiske løsningsmidler enn når de reagerer i vann som løsningsmiddel. I organisk fase vil ikke enzymene komme i kontakt med vann - olje fasen, og dermed vil α-helixen blokkere det aktive stedet [51]. Det finns unntak som er observert, og det er lipase B fra *Candida antarctica* og lipase fra *Pseudomonas aeruginosa* [50].

Mekanismen til lipasene er tilsvarende til serinproteasenes mekanismer. Aminosyrene serin, aspartat og histidin utgjør en katalytisk triade. På grunn av den romlige strukturen av disse aminosyrene, vil pK_a-verdien av OH-gruppen på serin senkes, og fungerer deretter som en nukleofil overfor acyldonor-substratet. Det dannes et tetraedisk intermediat, og den korresponderende alkoholen til acyldonoren spaltes av. Acyl-enzymkomplekset er åpent for et nytt nukleofilt angrep, enten av vann (hydrolyse) eller alkohol (omestring), og enzymet blir frigjort sammen med produktet.



Figur 2.7: Mekanisme for lipasekatalysert forestring av alkoholer [53].

Det har vist seg at lipasene viser en større stereospesifisitet for sekundære alkoholer som har substituenter av forskjellig strørrelse rundt stereosenteret. Både for hydrolyse- og omestringsreaksjoner kan man forutsi hvilken enantiomer som reagerer raskest. Undersøkelser har vist at *(R)*-enantiomeren, gitt at den store gruppen (L) har prioritet over den lille (S), vil reagere raskere enn *(S)*-enantiomeren (Figur 2.8) [54, 55].



Figur 2.8: Orientering av substituentene rundt et stereosenter til den raskest reagerende enantiomeren hos en sekundær alkohol. S = lille substituenten, L = store substituenten.

Candida antarctica lipase B (CALB)

Soppen *Candida antarctica* produserer to lipaser; lipase A og lipase B. Gjærsoppen ble først funnet i Antarktis for å finne enzymer med ekstreme egenskaper. Begge lipasene er renset og karakterisert [56, 57], og de har ganske forskjellige egenskaper. Lipase A er kalsiumavhengig og termisk stabil, mens lipase B er mindre termisk stabil og kalsiumuavhengig. I tillegg er lipase A aktiv mot triglyserider, mens lipase B er aktiv mot estere, amider og tioler, og er mindre aktiv mot triglyserider. CALB består av 317 aminosyrer, har en molekylvekt på 33 kD, og det isoelektriske punktet er 6.0 [58].

Som andre lipaser følger CALB den samme mekanismen som serinproteasene Figur 2.7, men det er ikke blitt observert "interfacial activation" hos *Candida antarctica*. CALB kan derfor sees på som en mellomting av lipaser og esteraser [59]. CALB har litt mindre åpning til det aktive stedet enn andre lipaser. Tidligere forskning viser at CALB også har et α-helix lokk over det aktive stedet. Det er antatt at det er dette lokket som kontrollerer inngangen til det aktive stedet [60]. Dette, kombinert med den lille åpningen, som gjør at CALB har så høy enantioselektivitet. Dette gjelder spesielt overfor sekundære alkoholer med en liten og en stor gruppe bundet til stereosenteret. [57, 59].

CALB er 30 × 40 × 50 Å, og den optimale pH-verdien for katalysatoren er 7. Likevel er CALB stabil i vanndig fase fra pH 3.5 - 9.5. I tillegg er katalysatoren termisk stabil, da den kan bli brukt i et temperaturområde helt opp til 80°C uten å miste aktivitet [61, 62].

2.4 Analytiske metoder for å bestemme enantiomert overskudd

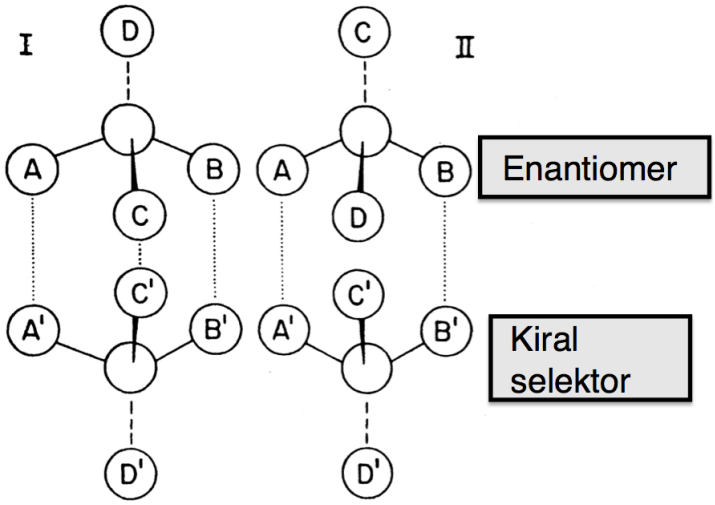
Som nevnt over har enantiomer like fysikalske egenskaper, og kan kun skilles i et kiralt system. Måling av optisk renhet i et polarimeter er også mulig, men da må en ha homogene, enantiomert rene produkter og høy konsentrasjon [63].

2.4.1 Kromatografi

For måling av enantiomert overskudd (*ee*) brukes gass-væske kromatografi (GLC) eller væskekromatografi (HPLC). GC brukes for termisk stabile og flyktige enantiomerer, mens HPLC er den viktigste teknikken for vannløselige enantiomerer med lav flyktighet.

Den stasjonære fasen som benyttes er kiral, og raske reversible diastereomere interaksjoner fører til separasjon for enantiomerene [64]. Denne mekanismen blir oppsummert i det som kalles for tre-punkts interaksjonsmodell. Med det menes det at enantioselektivitet krever minimum tre interaksjoner mellom en kiral stasjonærfase og (minst) en enantiomer samtidig, hvor minst en av disse interaksjonene er stereokjemisk bestemt. Vanligvis oppstår en slik stereokjemisk interaksjon med hydrogenbinding, ulik ladning, dipol-dipol, hydrofobisk eller elektrostatisk interaksjon [65, 66].

I Figur 2.9 vises to enantiomerer som påvirkes gjensidig med en kiral stasjonærfase. Her er det enantiomer I som danner en tre-punkts interaksjon med den kirale stasjonærfasen, mens enantiomer II bare danner en to-punkts interaksjon, pga. forskjellig konfigurasjon. Resultatet blir at enantiomer I danner et mer stabilt kompleks enn enantiomer II, og dermed kan de separeres.



Figur 2.9: Stereoselektiv tillaging av diastereomere komplekser mellom to enantiomerer og en kiral stasjonærfase i.h.t. tre-punkts interaksjonsmodellen [66].

2.4.2 Kiral gasskromatografi

Gasskromatografi er en viktig analysemetode å separere enantiomerer på, da metoden ikke påvirkes av urenheter, er enkel å bruke og er sensitiv [63]. En vanlig akiral kolonne vil naturligvis ikke kunne skille enantiomerene fra hverandre, så det er nødvendig med en kiral kolonne. I gasskromatografi er de mest vanlige stasjonærfasene enten aminosyre- derivater, metall chelater eller syklodekstrinderivater.

Syklodekstriner er naturlige oligosakkarider med 6 α, 7 β eller 8 γ D-glukosemonomerer. Glukosemolekylene er ordnet som en avkortet kjegle, med en hydrofob hul indre del og en polar ytre del. De primære C-6 hydroksygruppene ligger i den minste delen av kjegla, hvor de kan rotere fritt og dermed blokkerer denne inngangen. De sekundære C-2 og C-3 hydroksygruppene er lokalisert i den store åpningen av kjegla. De er mer rigid, og spiller en viktig rolle i enantioselektiviteten til syklodekstrinene.

Syklodekstrin er enten løst i, eller kjemisk bundet til en poly(siloxan)-stasjonær fase. Vanligvis er de løst i en mild polar viskøs poly(siloxan) stasjonærfase, og retensjonstiden og enantioselektiviteten avhenger av poly(siloxan) løsemiddlet, samt konsentrasjonen av syklodekstranderivaten [66].

Syklodekstrinderivater har vist seg å være effektive for å separere mange ulike forbindelser: små alkoholer, aminer, aminosyrer, epoksider, karboksylsyrer, estere, laktoner, etere, haloalkaner og hydrokarbonenantiomerer. Flere av disse er vanskelig eller umulig å separere på andre måter [66, 67].

En forutsetning for å bergene *ee* er at toppene for enantiomerene er grunnlinjeseparert. Kromatografisk oppløsningsevne, R_s, utregnes ut ifra likning 2.6, og må være større enn 1.5. Oppløsningsevnen er forskjellig fra en akiral kolonne, og for Chirasil Dex kolonner er den gitt som:

$$R_s = \frac{1.177(t_2 - t_1)}{W_1 + W_2} \tag{2.6}$$

hvor t_1 og t_2 er retensjonstid til komponent 1 og 2, W_1 og W_2 er halvhøydebredden til toppene.

Bæregassen sin oppgave er å transportere prøven gjennom den kirale kolonna. Gassen må være inert slik at den ikke påvirker prøven eller den stasjonære fasen. De vanligste bæregassene er nitrogen, hydrogen og helium. Hvilken gass en bruker påvirker tiden og effektiviteten til analysene.

Temperaturen påvirker retensjonstiden. Jo høyere temperatur, jo kortere retensjonstid. Temperaturprogram utvikles for å finne den optimale kombinasjonen mellom retensjonstid og separasjon. Et optimalt program kjennetegnes med tynne, spisse og symmetriske topper med en analysetid som er mindre enn en isoterm analyse [68].

Gasskromatografi har også noen begrensninger: prøven må være flyktig og termisk stabil ved de temperaturene som skal brukes i analysen. I tillegg må prøven være kvantitativt oppløst (evt. bundet til) i en viss grad på stasjonærfasen [63].

Kvantitative undersøkelser med god reproduserbarhet i gasskromatografi har vist seg å være vanskelig. Kvantitative undersøkelser baserer seg på mengde stoff som går gjennom kolonna, og detektorresponsen for den mengden. For å kompensere for variasjonene som kan oppstå, brukes en intern standard. Intern standarden og prøven som skal analyseres må være mest mulig lik (responstid, ved inndamping, ved ekstraksjon og derivatisering), og blir injisert samtidig. Arealet under toppene sammenlignes mot

standardtoppene, og konsentrasjonen av prøven kan bestemmes [69].

2.4.3 Polarimetri

En klassisk metode å bestemme enantiomert overskudd på er polarimetri. Enantiomerer har den egenskapen at de dreier polarisert lys, og en blanding av ulike mengder enantiomerer beskrives som optisk aktiv.

Målingen av dreining skjer under standariserte betingelser, det vil si at temperatur, bølgelengde av lyset, løsningsmiddel og konsentrasjon er definert. Målingen er rask og enkel: prøven løses i et akiralt løsningsmiddel og plassert i en celle med kjent lengde fra lyset. Den optiske dreiningen regnes ut fra likning 2.7.

$$[\alpha]_{\gamma}^{t} = \frac{100 \cdot \alpha^{'}}{l \cdot c} \tag{2.7}$$

hvor $[\alpha]$ er optisk dreining, t er temperatur, l er lengde av celle i dm, c er konsentrasjon av løsemiddel i g/dl, γ er bølgelendre til lyskilden (nm) og $\alpha^{'}$ er observert rotasjon.

For å bestemme *ee* sammenlignes den målte optiske dreiningen med dreiningen til den rene enantiomeren ($[\alpha]_0$) (2.8, [63]):

$$ee = \frac{[\alpha]_{\gamma}^{t}}{[\alpha]_0} \tag{2.8}$$

2.4.4 Kjernemagnetisk resonansspektroskopi, NMR

Et NMR spektrum av to enantiomerer vil være helt like. Derfor må enantiomerer omdannes til diastereomerer ved å tilsette et kiralt diamagnetisk eller paramagnetisk deriatiseringsreagens. Diastereomerere forbindelser har forskjellige egenskaper, og vil dermed gi forskjellig NMR-spekter. De enantiomere overskuddet kan regnes ved å integrere toppene [63, 70].

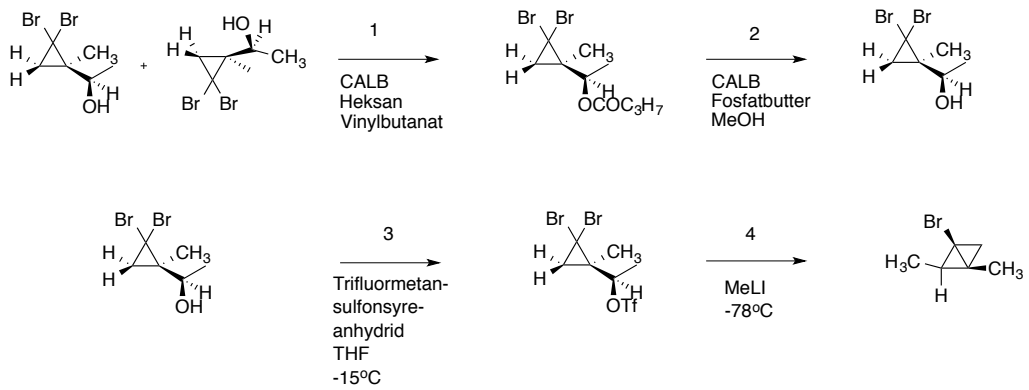
Kapittel 3

Resultat og diskusjon

Dette kapitlet handler om syntesen av målmolekylene, mellomprodukter og biprodukter. Det blir også tatt opp noen problemstillinger som omhandler hvert trinn i syntesen mot målmolekylene.

3.1 Planlagt synteserute for arbeidet

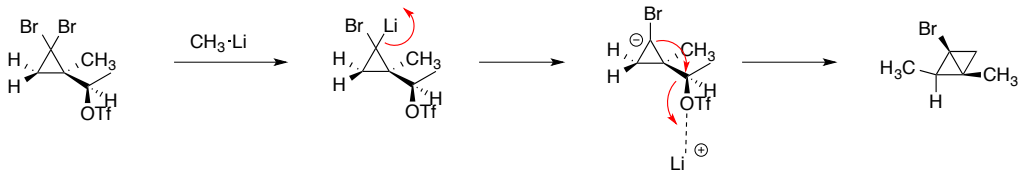
Skjema 3.1 viser planlagt synteserute for oppgaven.



Skjema 3.1: Planlagt synteserute for syntese av enantiomert rent halogenere bisyklobutaner. Trinn (1) kinetisk oppløsning med CALB, (2) hydrolyse, (3) triflatsubstitusjon , (4) syklisering.

Trinnvis synteserute for målprodukt er vist i Skjema 3.1. Trinn 1 er enzymatisk oppløsning, og prosedyre er kjent fra før [71]. Trinn 2 er utført både enzymatisk og ikke-enzymatisk. I trinn 3 introduseres en triflatgruppe, som er en god utgående gruppe, før det siste trinnet 4 hvor selve sykliseringen antas å skje.

En foreslått reaksjonsmekanisme for (4) er vist i Skjema 3.2.



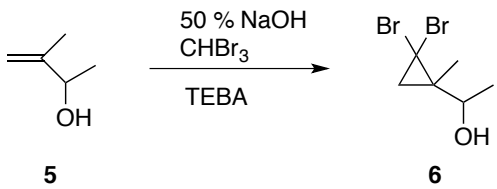
Skjema 3.2: En foreslått mekanisme for syklisering av **3** til **4**

Drivkraften for brom-litium utskiftningen er dannelse av et mer stabilt organo-litium forbindelse. Triflatgruppen er en god utgående gruppe, som vil være nødvendig for at sykliseringen skal kunne skje. Stereokjemien til **4** må nødvendigvis bli slik det er presentert, med brom gruppen stående cis til metylgruppen. Hvis feks. bromgruppen skulle stå trans til metylgruppen ville det blitt et mye mer spent molekyl. Det er gjort 3D-simulering av **4** på ChemDraw, og det bekrefter stereokjemien. I tillegg er det laget fysisk modell av molekylet med molekylbyggesett, og er trolig bare denne stereokonformasjonen som er fysisk mulig

3.2 Diskusjon

3.2.1 Syntese av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6)

1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6) ble syntetisert fra **5** via en karbenreaksjon med 50% NaOH, $CHBr_3$ og trietylbenzylammoniumklorid (TEBA) som faseoverføringsreagens (Skjema 3.3).



Skjema 3.3: Syntese av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6).

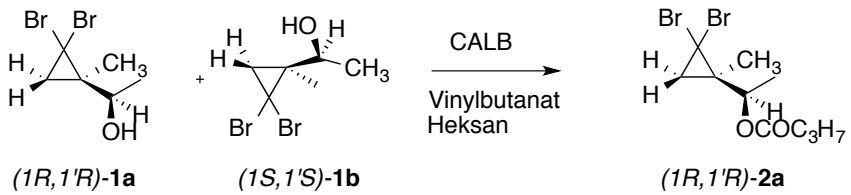
Etter kraftig røring i 19 timer ble reaksjonen opparbeidet, med et utbytte av **6** på 6%. Tidligere er det obsertvert et ubytte på hele 62% ([18]). Reaksjonen ble bare forsøkt en gang, og et forsøk til med endrede betingelser ville kunne medført bedre utbytte.

Reaksjonen avhenger av kraftig røring. Med lite utgangsstoff og lite reagenser kan det rett og slett ha vært vanskelig at det har vært nok røring, slik at ikke all CBr_3^- har blitt overført til den organiske fasen. Lars Skattebøl er spesialisten på karbenreaksjoner, og ved bedre tid ville det vært hensiktsmessig å konsultere han.

3.2.2 Syntese av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletylbutanat (*(1R,1'R)*-(2a)

Omestringsreaksjon av rasemisk blanding av *(1R,1'R)*-1a og *(1S,1'S)*-1b

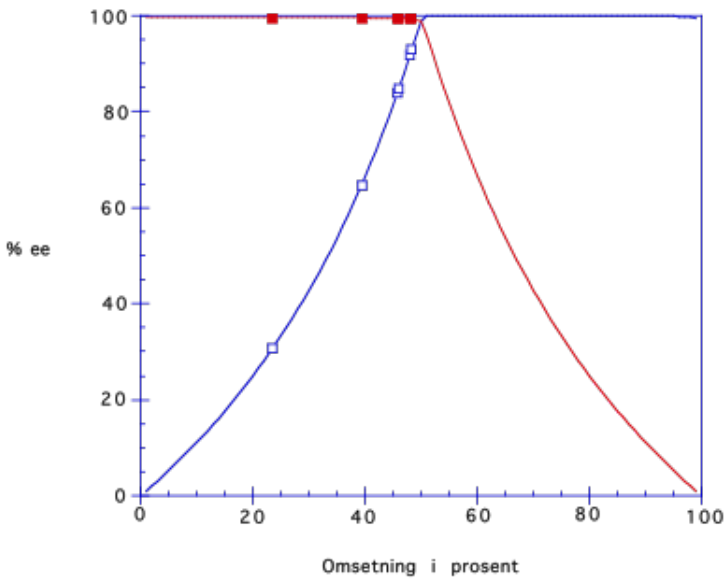
(1R,1'R)-dibrom-1-metylsyklopropyletylbutanat *(1R,1'R)*-**2a** ble dannet i en enzymatisk kinetisk oppløsning med *Candida antactica* lipase B som katalysator og med tørr heksan som løsningsmiddel (Skjema 3.4). Det ble benyttet vinylbutanat som acyldonor. Det kan tenkes at en mindre vinylester, feks vinylpropanat, vil orientere seg seg dårligere i forhold til det aktive stedet hvor serin utfører det nukleofile angrepe på acyldonorkarbonatomet. En større vinylester vil kunne gjøre orienteringen lettere. Denne reaksjonen har også blitt gjort med vinylacetat som acyldonor, som gav god selektivitet [72].



Skjema 3.4: Syntese av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletylbutanat (*(1R,1'R)*-**2a**)

Omestringsreaksjonen ble gjort i en risteinkubator ved 30°C, og *ee* av gjenværende alkohol og produkter ble analysert med gasskromatografi fra ca 20% omsetning til reaksjonen stopped ved 50% omsetning. Etter 6 dager var all *(1R,1'R)*-**1a** konvertert. Enzymet gav meget god enantioselektivitet (E = 1000), se Figur 3.1. Utregning av enantiomert

overskudd ble basert på ping-pong-bi-bi kinetikk, og utført på dataprogrammet E&K Calculator 2.1b0PCC [42].



Figur 3.1: Grafisk fremstilling av enantiomert overskudd av produkt (ee_p, rød kurve) og gjenværende substrat (ee_s, blå kurve)

Separasjon av *(1S,1'S)*-1b og *(1R,1'R)*-2a

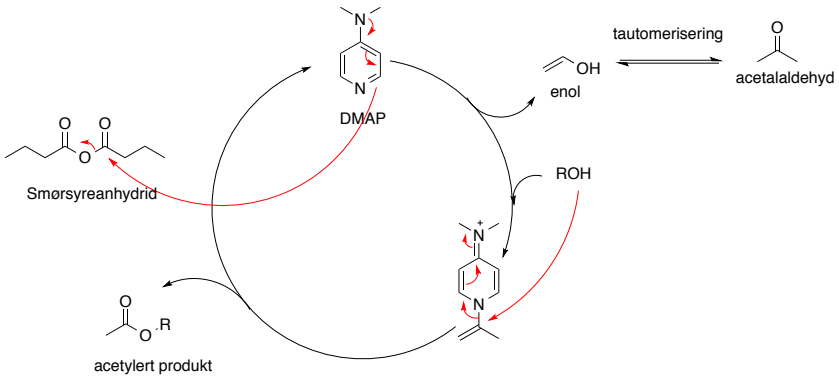
Enzymet ble filtrert fra reaksjonsblandingen og renset på silikagelkolonne. Da det ikke ble godt nok separert ble det gjort på gravimetrisk kolonne (petroleumeter/etylacetat, 8:2). Det gav god separasjon (R_f = 0.6 *(1R,1'R)*-**2a**, R_f = 0.3 *(1S,1'S)*-**1b**), med utbytte på 48.5%.

Da det var flere fraksjoner som inneholdt både *(1R,1'R)*-**2a** *(1S,1'S)*-**1b** ble det gjort flere forsøk på å separere enantiomerene. Ny mobilfase (petroleumeter/aceton, 8:2) gav høyere utbytte. GC-analyser viste at det var 10% *(1S,1'S)*-**1b** igjen i løsningen, men på grunn av tidsnød ble videre syntese utført med denne reaksjonsblandingen. Det vil bety en lavere *ee* for videre reaksjoner.

Som fremkalling av *(1S,1'S)*-**1b** på tynnsjiktskromatografi (TLC) ble det sprayet en 50% H_2SO_4-løsning på en silikagelplate. Deretter ble platen varmet forsiktig på en varmeplate. Det var noen problemer knyttet til fremkalling av alkoholen på TLC, så det ble forsøkt noen andre metoder: vanilin i svovelsyre, cerium ammonium molybdat-løsning (CAM) og jodkammer. Vanilin viste ingenting, men cerium ammonium molybdatløsningen og jodkammeret ga tydelige flekker som antas å være alkoholen.

Identifikasjon av alkohol- og esterenantiomerer for GC-analyser med smørsyreanhydrid og dimetylaminopyridin (DMAP)

Forbindelsene i syntesen av *(1R,1'R)*-**2a** ble identifisert ved å sammenligne med en derivatisert prøve av *(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b** analysert med kiral kolonne med gasskromatografi. Reaksjonen ble gjort ved å bruke dimetylaminopyridin (DMAP) som katalysator. En foreslått mekanisme er vist i Figur 3.2.



Figur 3.2: Foreslått katalytisk syklus for acetylering av en alkohol med vinylbutanat som acyldonor og DMAP som katalysator. Utgående enol tautomeriseres til acetalaldehyd.

Det ble observert to topper etter 17,5 min og 19 min (R_S = 4.2). Fra tidligere forskning kan vi anta at disse signalene tilhører henholdsvis *(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b** [71]. Det ble også observert to topper etter 29.8 min og 30.2 min, (R_S = 1.30) som er henholdsvis *(1R,1'R)*-**2a** og *(1S,1'S)*-**2b**. Videre optimalisering ble forsøkt uten hell.

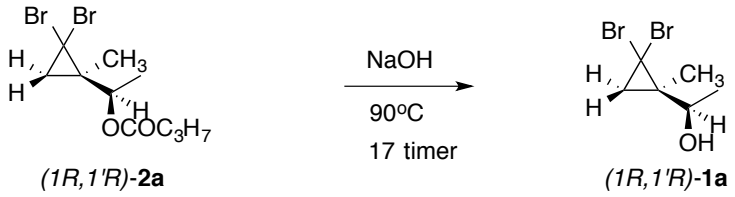
Signalene til textit(1R,1'R)-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b** og *(1R,1'R)*-**2a** og *(1S,1'S)*-**2b** er noe forskjel-

lig fra det som tidligere er registrert [71]. Det antas at det skyldes forskjellig betingelser under GC-analyser. Det ble brukt helium (He) som bæregass i dette arbeidet, mens tidligere er det brukt hydrogengass (H_2, 5.0). Kromatogram ligger i vedlegg A.

3.2.3 Syntese av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (1a)

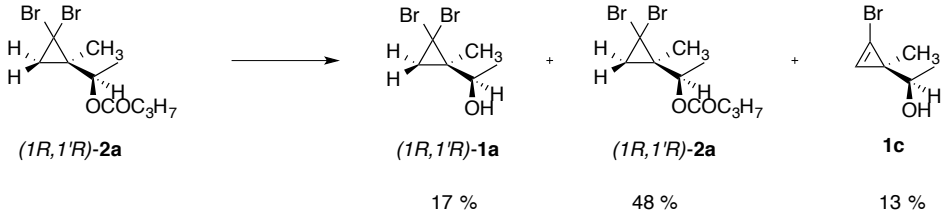
Hydrolyse av *(1R,1'R)*-2a

(1R,1'R)-dibrom-1-metylsyklopropyletyl-1-ol *(1R,1'R)*-**1a** ble dannet i en enzymatisk hydrolyse i fosfasbuffer (pH = 7.1). Ikke-enzymatisk hydrolyse ble først utført med 1 M NaOH, under reflux i 90°C i 17 timer (Skjema 3.5).



Skjema 3.5: Hydrolyse av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (1a).

Kiral GC-analyse viser at det ble dannet et biprodukt, som antas å være et resultat av E2-eliminasjon av brom, se Skjema 3.7. Videre viste GC-kromatogrammet at 48% av utgangsstoffet ikke var omsatt.



Skjema 3.6: Produkter og biprodukter dannet fra hydrolyse av *(1R,1'R)*-**2a**.

Det ble dannet et brunt bunnfall som ble filtrert vekk. Bunnfallet antas å være NaBr, som styrker antakelsen for at det har skjedd en eliminasjon. Det antas at **1c** og *(1R,1'R)*-

1a er vanskelig å separere. Forskjellen i retensjonstid er bare på 1 minutt. Det styrker også antakelsen for at det ikke er en syklopropenester, siden den ville mest sannsynlig hatt en lengre retensjonstid. Retensjonstidene til *(1R,1'R)*-**1a**, *(1R,1'R)*-**2a** og **1c** ble registrert til henholdsvis 17.6 min, 29.4 min og 19.2 min, og ligger i vedlegg B.

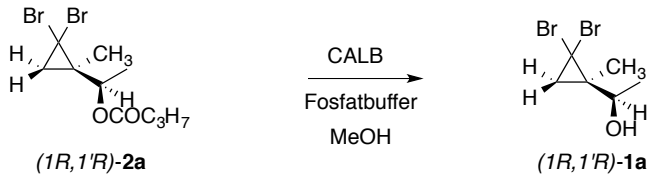
1c er et molekyl som ikke har blitt registrert før og kan være utgangsstoff for nye produkter. Syklopropenringen forekommer også i naturstoff: syklopropenringen en bestanddel i sterculisyre, isolert fra *Sterculia foetida* [73].

På grunn av problemet med eliminasjon gjøres videre hydrolyser enzymatisk i fosfatbuffer. Det ble ikke gjort forsøk på å skille **1c** fra *(1R,1'R)*-**1a**. Ny hydrolyse av denne reaksjonsblandingen ble utført med CALB som katalysator.

Det ble gjort et forsøk på å idetifisere *(1R,1'R)*-**1a**, *(1R,1'R)*-**2a** og **1c** med GC/MS, men uten resultat. Det antas at elektron impakt (EI) som ioniseringsmetode er for kraftig, slik at molekylene ødelegges. Det vises heller ingen bromfragmenter på GC/MS, men dette vises klart på MS spekteret av *(1S,1'S)*-**1b**.

3.2.4 Hydrolyse av *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletyl- butanat *(1R,1'R)*-2a til *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol *(1R,1'R)*-1a

(1R,1'R)-**1a** ble dannet i en enzymatisk hydrolyse med CALB som katalysator. Reaksjonen ble utført i fosfatbuffer (pH = 7.1) med metanol (5 mL) som ko-solvent, se Skjema 3.7.



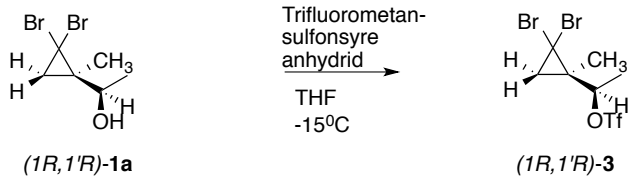
Skjema 3.7: Hydrolyse av esteren *(1R,1'R)*-**2a** til *(1R,1'R)*-**1a**.

Reaksjonen ble gjort i en risteinkubator, og kiral GC-analyse viste 100 % omsetning etter 5 dager. Det ble brukt et 1:2 forhold med substrat og enzym. GC-kromatogrammet

viser at syklopropenalkoholen fortsatt er til stede, og det er et forhold på 60:40 med henholdsvis *(1R,1'R)*-**1a** og **1c**. Da produktet ikke er rent ble det ikke tatt opp NMR-spektra av løsningen.

3.2.5 Syntese av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl- etyl trifluormetansulfonat *(1R,1'R)*-3

Til reaksjonsblandingen med *(1R,1'R)*-**1a** og **1c** ble det tilsatt trifluormetansulfonsyre anhydrid med tørr THF og Et_3N ved -15°C.

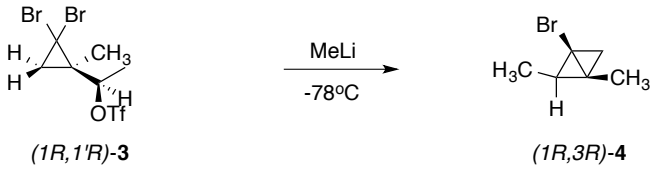


Skjema 3.8: Syntese av *(1R,1'R)*-**3**

Det ble dannet et mørkt, oljete produkt. GC-analyser viser at det er en omsetning på 70% av *(1R,1'R)*-**3** (retensjonstid: 25.0 min). Det ble forsøkt å analysere *(1R,1'R)*-**3** på GC/MS, men GC/MS-kromatografi viste ikke sannsynlig produkt. Det kan skyldes den kraftige ioniseringsmetoden (EI), slik at det er blitt fragmentert i analysen. FID-detektoren og MS-detektoren er ikke identisk, så det kan være en rimelig antakgelse. Det ble i tillegg bare prøvd en gang med GC/MS, da instrumentet ikke var tilgjengelig før sent i november. Det er nødvendig å gjøre analysen på nytt med en chemical ionization (CI) som ioniseringsmetode, men instrumentet er ikke tilgjengelig for bruk.

3.2.6 Forsøk på syntese av *(1S,3R)*-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]-butan (*(1R,3'R)*-4)

Til triflatesteren *(1R,1'R)*-**3** ble det tilsatt metyllitium i tørr dietyleter. Sykliseringsreaksjonen ble utført på kjølebad (tørris i aceton til -78°C). Metyllitium var løst i eter med konsentrasjon på 1.6 M.



Skjema 3.9: Syntese av (1R,3'R)-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]butan.

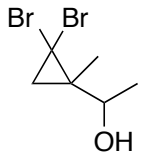
Reaksjonsblandingen som ble dannet var en mørkbrun, oljete løsning. Blandingen er noe mørkere enn triflatesteren *(1R,1'R)*-**3**. GC-analyser viser en topp etter 24.7 minutter, og har en renhet på 88%. Det ble tatt NMR og MS av produktet. Høytoppløselig MS viser ikke m/z 160 eller 162 som molmassen til *(1R,1'R)*-**4**, og syntesen er derfor ikke vellykket. NMR-spektra viser ikke topper som kan korrelerer til de estimerte spektra fra ChemDraw. Det tyder på at *(1R,3'R)*-**4** ikke har blitt syntetisert. En mulig forklaring på at brom ikke sees i MS kan være at begge bromatomene ble byttet ut med MeLi, og at sykliseringen ikke skjedde på grunn av det.

3.3 Strukturoppklaring av synteseprodukter

Forbindelsene *(1R,1'R)*-**1a**, *(1S,1'S)*-**1b** og *(1R,1'R)*-**2a** er tidligere kjent [18, 71]. ^{1}H-NMR og ^{13}C-NMR ble benyttet for å tilordne skiftsverdiene for alle forbindelsene. I tillegg ble forbindelsene *(1S,1'S)*-**1b** og *(1R,3R)*-**4** analysert med massespektroskopi, IR for forbindelse *(1S,1'S)*-**1b** og optisk rotasjon ble målt for *(1R,1'R)*-**1a**, *(1S,1'S)*-**1b** og *(1R,1'R)*-**2a**.

3.3.1 Strukturoppklaring av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6)

Forbindelsen ble karakterisert med MS, kokepunkt og analysert ved gasskromatografi.



Massespektroskopianalyser av 6

Høyoppløselig MS viser m/z 240.9059 $[M]^+$ med tap av OH for forbindelse **6** (vedlegg D). Den teoretiske verdien for **6** er 257.9645, men vises ikke. Antakeligvis er det på grunn av ustabilitet av molekylet under analysen.

Kokepunkt

Kokepunktet for **6** var 50.5 °C. Det ble utført tre paralleller, og stemmer med tidligere rapporterte data [18].

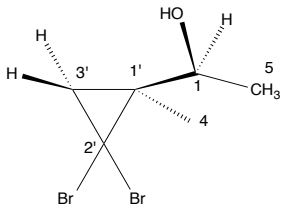
Gasskromatografi

Det ble registrert to topper på henholdvis 17.25 min og 18.70 min. Det stemmer overens med utgangsstoff rasemisk blanding av *(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b**) for trinn (1), med retensjonstider på henholdsvis 17,5 min og 19 min. Det tyder på at *(1R,1'R)*-**1a** og *(1S,1'S)*-**1b** er dannet, og ikke de andre to isomerene.

Det også vises en topp etter 54 min, som vises på vises på de fleste kromatogrammene. Det antas å være på grunn av dibromerte prøver som henger igjen i kolonna. Se vedlegg C for kromatogram for **6**.

3.3.2 Strukturoppklaring for *(1S,1'S)*-dibrom-1- metylsyklopropyletanol (*(1S,1'S)*-1b)

Forbindelsen ble karakterisert med NMR, MS, IR og optisk rotasjon. Strukturen til forbindelse *(1S,1'S)*-**1b** med nummerering er vist i Figur 3.3.



Figur 3.3: Nummerering av forbindelse *(1S,1'S)*-**1b**

Massespektroskopianalyser av *(1S,1'S)*-1b

Høyoppløselig MS viser m/z 238.9071 $[M]^+$-H_2O for forbindelse *(1S,1'S)*-**1b** (vedlegg E). Den teoretiske verdien for *(1S,1'S)*-**1b** er 257.9645, men vises ikke. Antakeligvis er det på grunn av ustabilitet av molekylet under analysen. Det ble gjort en analyse av utgangstoffet (**6**), som viser helt likt fragmenteringsmønster, og bekrefter dermed molekylformelen.

NMR-analyser av *(1S,1'S)*-1b

^{1}H-NMR og ^{1}C-NMR-spektra for *(1S,1'S)*-**1b** er blitt sammenlignet med estimerte verdier fra Chem Draw. Ekspermientelle data for forbindelse *(1S,1'S)*-**1b** stemmer overens med dette. ^{1}H-NMR og ^{1}C-NMR data er gitt i Tabell 3.1. Vedlagt ligger henholdsvis ^{1}C-NMR, ^{1}H-NMR, COSY og HMBC spekter i vedlegg F, vedlegg G, vedlegg H og vedlegg I.

Tabell 3.1: ^{1}H-NMR og ^{1}C-NMR for forbindelse *(1S,1'S)*-**1b**

Posisjon	^{1}C [ppm]	^{1}H [ppm]	Multiplisitet	Integral
1	73.71	3.40, 2.02 (OH)	q	1 H
1'	38.03	-	-	-
2'	34.22	-	-	-
3'	32.79	1.51, 1.45	d	2 H
4	19.19	1.32	d	3 H
5	15.63	1.42	s	3 H

Infrarød spektroskopianalyser av *(1S,1'S)*-1b

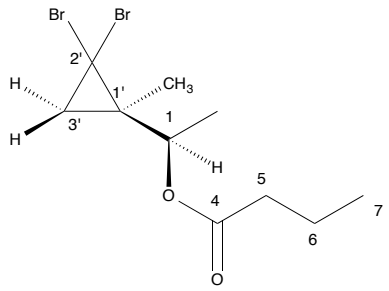
IR analysen av forbindelsen *(1S,1'S)*-**1b** viser karakteristisk absorpsjon for en hydroksylgruppe 3500-3200 cm^{-1}, OH. C-H strekk fra metylgruppen vises på 2800-3000 cm^{-1}. En sterk absorpsjon vises på 686 cm^{-1} på grunn av C-Br strekk.

Optisk rotasjon

Optisk rotasjon for *(1S,1'S)*-**1b** ble mål til +0.01, som gir $[\alpha]_{\gamma}^{20}$ +22.2 (c 0.045, $CHCl_3$). Det stemmer overens med hva som tidligere er observert [71].

3.3.3 Strukturoppklaring for *(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklo propyletyl butanat (*(1R,1'R)*-2a)

(1R,1'R)-**2a** ble karakterisert med NMR og optisk rotasjon. Strukturen til forbindelse *(1R,1'R)*-**2a** med nummerering er vist i Figur 3.4.



Figur 3.4: Nummerering av forbindelse *(1R,1'R)*-**2a**

NMR-analyser av *(1R,1'R)*-2a

^{1}H-NMR har blitt sammenlignet med tidligere rapportert data [71]. Ekspermientelle data for forbindelse *(1R,1'R)*-**2a** stemmer overens med dette. ^{1}H-NMR er gitt i Tabell 3.2. ^{1}H-NMR spekter ligger i vedlegg K.

Tabell 3.2: ^{1}H-NMR for forbindelse *(1R,1'R)*-**2a**

Posisjon	^{1}H [ppm]	Multiplisitet	Integral
1	1.48 (CH_3), 4.8	d, q	3H, 1 H
1'	0.9	s	3 H
2'	-	-	-
3'	1.57, 1.37	s, d	2 H
4	-	-	-
5	2.32	t	3 H
6	1.7	sekst	4 H
7	0.98	t	3 H

Integralene tyder på at forbindelsen ikke er helt ren, og det antas å være rester fra acyldonoren til stede. Flere av signalene til vinylbutanaten interfererer med signalene til *(1R,1'R)*-**2a**.

Optisk rotasjon

Forbindelsen hadde en målt rotasjon på +0.03, som gir $[\alpha]_{\gamma}^{20}$ +38.5 (c 1.1, $CHCl_3$). Dette stemmer ikke helt overens med hva som tidligere er observert (+45.2) [71]. Det kan tyde på at produktet ikke er helt rent, som også sees på NMR.

3.3.4 Strukturoppklaring av urent produkt etter forsøk på syklisering av *(1R,1'R)*-3 med MeLi

Etter opprensing ble reaksjonsproduktet analysert ved NMR og MS.

Massepektroskopianalyser av *(1R,3R)*-4

Høyoppløselig MS viser ikke m/z på 160.04 eller 162.04, og heller ingen tegn til at brom er tilstede. Det signalet med høyest intensitet har m/z 300.0333. Det kan være mulig at det har skjedd en polymerisering etter at *(1R,1'R)*-**4** ble dannet. En anionisk polymerisering med alkyl litiumforbindelser som initiator er mulig. Tradisjonelt er de mest vanlige forbindelsene som polymeriseres under en anionisk mekanisme alkener, men det

er også mulig med andre forbindelser, som etylenoksid og tetrahydrofuran [74]. Forskning har vist at det er mulig å gjøre en anionisk polymerisering med metyl-bisyklobutan-1-karboksylat (MBCB) med *t*-butyl litium (*t*-BuLi) og bis(2,6-di-*tert*-nutylfenoksy)etylaluminium ($EtAl(ODBP)_2$) med høyt utbytte [75]. MS spekter ligger i vedlegg L.

NMR-analyser av *(1R,3R)*-4

Det vises lett tydelig fra spektrene at stoffet *(1R,3R)*-**4** ikke er dannet. ^{1}H-NMR og ^{1}C-NMR har blitt sammenlignet med estimerte verdier av forbindelsen *(1R,3R)*-**4** fra ChemDraw. ^{1}H-NMR, ^{1}C-NMR spekter, COSY og HSQC-spekter samt estimerte spekter fra ChemDraw ligger henholdsvis i vedlegg M, vedlegg N, vedlegg O, vedlegg P vedlegg R og vedlegg Q.

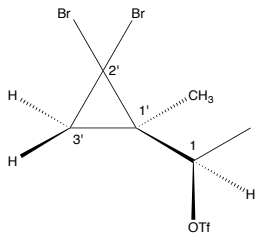
De simulerte NMR-spektraene for *(1R,3R)*-**4** stemmer ikke overens med observerte spektra. Datasimuleringer av spekter trenger ikke nødvendigvis å være rett, men kan gi en pekepinn på hvordan spektret skal se ut. Det at produktet som er blitt syntetisert har høy molekylmasse på MS, kombinert med NMR-spekter som ikke korrelerer med estimerte verdier, tyder på at det er en blanding av stoffer i løsningen.

Tidligere forskning viser at i reaksjoner med dihalogenerte syklopropanringer og metyllitium dannes det flere biprodukter [76]. Når MS-spekteret i tillegg ikke viser at det er brom til stede i blandingen, tyder det på at *(1R,3R)*-**4** ikke er en del av produktenen som er dannet. Det forsterkes av den dyp mørke fargen på produktblandingen, som kan være at begge bromatomene har blitt byttet ut.

Signalene i protonspekteret viser at det kan være etylgrupper til stede. Kvartetten på 3.5 ppm og tripletten på 1.20 stemmer overens med spekteret for dietyleter, som ble brukt som løsningsmiddel. De korrelerer også til karbon på henholdsvis 65.75 og 15.00 ppm, som passer det estimerte dietyleter-spektrumet meget godt. Det tyder på at det er rester av det igjen i blandingen.

Signalet på 3.41 ppm i protonspekteret viser korrelasjon til karbon 70.53 (HSQC). Det kan være rester fra *(1R,1'R)*-**3**, og vil antageligvis være karbonatom 1 (Figur 3.5). I tillegg viser COSY korrelasjon mellom protonsignalet på 3.41 til proton 1.61 ppm. Dette

signalet er en kvintett, og ikke en dublett som en skulle forvente. Det tyder på at det er flere protoner i det signalet. Det bekreftes av HSQC, hvor en ser karbon - hydrogen korrelasjon. Her er protonene på 1.61 knyttet til karbon på 26.42, 70.53 og en CH_2-gruppe på 126 ppm.



Figur 3.5: Nummerering av karbonatomer for *(1R,1'R)*-**3**

COSY spekter viser at protonsignaler på 3.41 og 1.61 ppm korrelerer til hverandre. Protonene på 1.260 ppm korrelerer til 3.411 signalet. Siden protonene på 1.260 viser en klar triplett i protonspekteret kan en anta at det er nabo til en CH_2. Det betyr at signalet på 3.41 ppm ivertfall er en CH_2. I tabeller over hvilke mulige metylenforbindelser som har signal på 3.4, viser oversikten at det må være nabo med et bromatom, alkohol eller en eter [77]. Med tanke på at protonsignalet på 3.41 er koblet til karbon på 70.53, kan en anta at det mest sannsynlig er nabo til en eter eller alkohol. Det kan mulig være rester igjen fra ureagert *(1R,1'R)*-**1a**.

Tidligere forskning har vist at bisyklobutaner som ikke inneholder halogener har et kokepunkt på 30-36°C [76]. En mulig årsak til at *(1R,3R)*-**4** ikke sees i verken MS eller NMR kan være at produktet ble dampet vekk. Etter opparbeidning med dietyleter ble blandingen dampet inn under redusert trykk på rotorvapor (rotating evaporator). Dette styrker også antakelsen om at bromatomene har blitt byttet ut under reaksjonen med metyllitium.

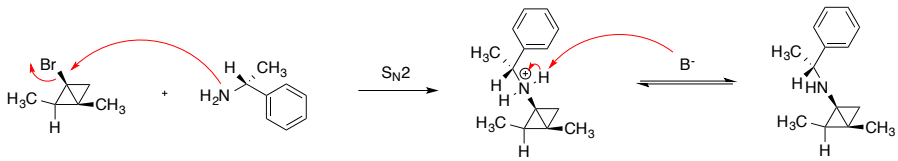
Kapittel 4

Videre arbeid

På grunn av tidsnød ble det ikke gjort et nytt forsøk på å syntetisere *(1R,3R)*-**4**. Det kan være hensiktsmessig å bruke mindre mengde metyl litium, for å forhindre en eventuell utbytting av begge bromatomene.

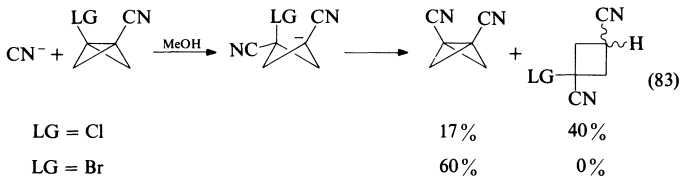
Stereokjemien til *(1R,3R)*-**4** ikke er bekreftet, men på grunn av ringstress ved syklisering fra andre siden antas det at dette er den eneste mulige struktur.

For at stereokjemien skal kunne bekreftes må brom byttes ut med noe enantiomert rent, krystalliseres, og røntgen-analyse må utføres. Stereokjemien til bisyklobutanen er imidlertid en utfordring; en S_N2-reaksjon vil gi inversjon av konfigurasjon, og det kan være vanskelig å se hvordan syklobutanen vil se ut. En S_N1-reaksjon krever at brom går ut før et nukleofilt angrep skjer, men et tertiært karbokation ligger i planet, noe som kan vise seg å være vanskelig. Brom er i utgangspunktet en relativt god utgående gruppe. Et forslag kan være å bruke *R*-α-fenyletylamin i en aminalkylering (Skjema 4.1).



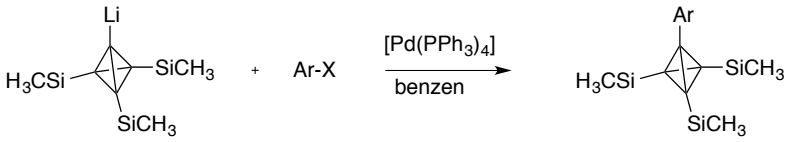
Skjema 4.1: Mekanisme for aminalkylering

Det er gjort nukleofile angrep på bisyklobutaner før [23], som kun ga syklobutan som produkt. Det er også prøvd en addisjon-eliminasjonsreaksjon, med en utgående gruppe og en CN gruppe som substituent, se Skjema 4.2 [23].



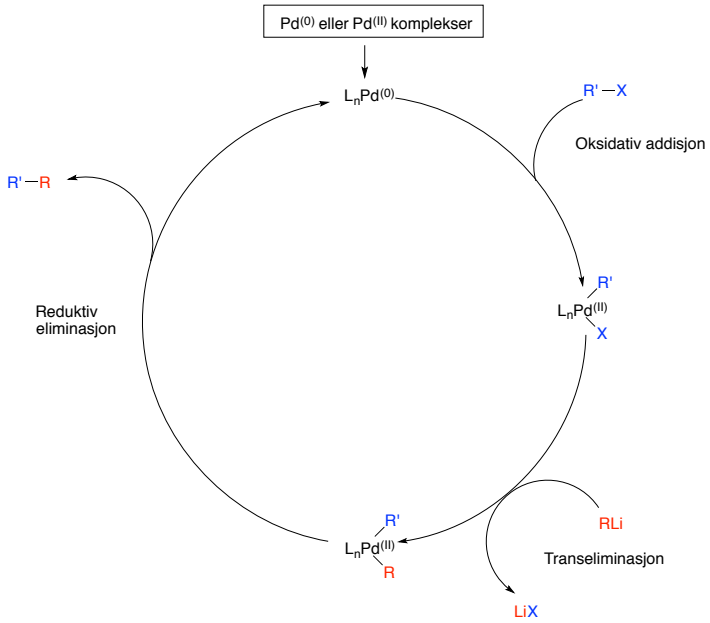
Skjema 4.2: Addisjon-eliminasjons reaksjon med bisyklobutan substituert med en utgående-gruppe (LG) og CN

Eventuelt kan det vurderes å gjøre en palladiumkrysskobling med Ar-X (Skjema 4.3). Det er tidligere gjort på spente molekyler som tetrahedryllitium [78]. Her vil riktig nok de tre $SiCH_3$-gruppene være elektrondonerende og dermed stabiliserende til ringstrukturen, men det kan være verdt et forsøk. Her har produktene også blitt karakterisert med røntgen krystallografi. I tillegg er det en rask reaksjon med milde reaksjonsbetingelser med bra utbytte.



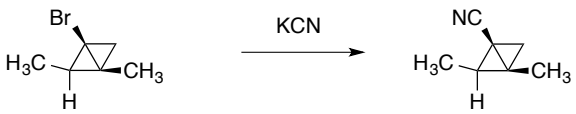
Skjema 4.3: Reaksjon av arylhalid med tetrahedryllitium

Mekanismen for en generell Kumadakobling er vist i Figur 4.1. Kumadakoblingen er en metal-katalysert kryss-kobling med et alkenyl som substrat ([79]), men det var utgangspunktet for undersøkelsen av tetrahedryllitium [78]. Dermed antas det at mekanismen er relativt lik for den reaksjonen som for Kumadakoblingen.



Figur 4.1: Foreslått katalytisk syklus for Kumada krysskobling

En røntgenanalyse av 1.3-dicyanobisyklo[1.1.0]butan er kjent [80]. Det kan være en mulighet å bytte ut Br med CN, se figur Skjema 4.4. Mekanisme vil være tilsvarende som vist i Skjema 4.1.



Skjema 4.4: Bisyklobutan reaksjon med KCN

Kapittel 5

Eksperimentelt

5.1 Generelle metoder

5.1.1 Løsningsmidler og reagenser

Kjemikalier og løsningsmidler

Alle kjemikalier var kommersielt tilgjengelig og av analytisk kvalitet (p.a., purum eller puriss). Alle kjemikalier er kjøpt av Sigma-Aldrich, Norway.

Enzymer

Den immobiliserte lipasen som ble benytter er *Candida antarctica Lipase B* (Novozymes 435 (CALB), 2% vanninnhold, LC200204) og var kommersielt tilgjengelig.

5.1.2 Diverse analyseinstrumenter

Risteinkubator

Inkubatoren som ble benyttet ved enzymreaksjoner var en New Brunswick G24 Enviromental Incubator Shaker.

Rotavapor

Det ble benyttet en rotorvapor av typen Büchi R-200 koblet til en vakumpumpe av type CVC2, Diaphragrm Vacuum Pump fra Vacuubrand, og varmebad Büchi Heating Bath

B-490.

Smeltepunktanalyser

Til smeltepunktsanalyser ble det benyttet Stuart automatic melting point SMP40.

pH-analyser

Til pH-analyser ble det benyttet WTW Multi 350i.

5.1.3 Kromatografiske analyser

Tynnsjiktskromatografi (TLC)

Tynnsjiktplater av typen Merk Silicagel 60 F254 ble benyttet ved tynnsjiktskromatografi. Observasjoner ble gjort under UV-lys, 50 % H_2SO_4, cerium ammonium molbydat (CAM, Hanessians stain) og i et jodkammer.

Cerium ammonium molbydat, CAM

I et mørkt avtrekkskap ble cerium sulfat tilsatt en nedkjølt (0°) løsning av ammonium molbydat (25 g) i vann (450 mL). Det resulterte i en lysgul løsning som ble rørt kraftig og konsentrert svovelsyre (50 mL) ble sakte tilsatt over 90 min. Løsningen ble varmet til romtemperatur, plassert i et glass med skrukork for øyeblikkelig bruk, og resten ble lagret kjølig.

Gasskromatografi

GLC

GLC analyser ble utført på gasskromatografer av typen Varian 3380 og Agilent 7890A med autosampler. Det ble benyttet en splittinjektor (200°C) og flammeioniseringsdetektor (FID, 250 °C). Kirale analyser ble utført på kolonne av typen CP-Chiralsil-DEX (25 m × 0.25 mm, d_f = 0.25 µm , med helium som bæregass. Tempraturprogram ved

GC-analyse: 80-100°C (10°C/min), 100-140°C (1°C/min, holdtid 5 min), 140-145 °C (1°C/min), 145-200°C (25°C/min, og holdtid 5 min).

GC/MS

GC/MS analyser ble utført på gasskromatografer av typen Thermo Fisher Scientific ITQ GC-Ion Trap MS (Trace GC Ultra), med autosampler. Det ble benyttet splittlessinjektor (250°C), utført på kolonne av typen Agilent J&W DB-5 GC kolonne (30 m × 0.25 mm, d_f = 0.25 μm). Betingelsene ved GC/MS-analyse-: oppvarming 35-200°C (10°C/min, hold tid 5 min).

5.1.4 Karakterisering

NMR

Alle NMR spekter er analysert med $CDCl_3$ (99,8%) som løsningsmiddel med TMS tilsatt som standard (0,05%). TMS gir et singlettsingal som er kalibrert til 0.00 ppm. Skift er dermed relativ til TMS signalet.

Alle analyser er utført på Bruker Avance DPX 400.

Massespekter

MS ble tatt opp på et Synapt G2-s Q-TOF instrument fra Waters. Prøvene ble ionisert med elektrospray (ESI) eller med ASAP søker (APCI).

Optisk rotasjon

Spesifikk rotasjon ble bestemt med Optical Activity, AA-10 Automatic Polarimeter. Forbindelsene ble løst i $CHCl_3$, og en 10 cm celle ble brukt for å måle rotasjonen ved 20°C. Den spesifikke rotasjonen ble beregnet ut i fra den optiske rotasjonen med likning 2.7.

5.2 Syntese og karakterisering av forbindelser

Syntese av 1-(2.2-dibrom-1-1metylsyklopropyl)etanol (6)

En blanding av 50% NaOH (1.5216 g, 19.02 mmol), $CHBr_3$ (0.8..g , mmol), 3-metyl-3-buten-2-ol (0.142 g, 1.64 mmol) og TEBA (0.1 g, 0.4390 mmol) ble rørt kraftig i 20 timer. Det gav en brun løsning som ble ekstrahert med $CHCl_2$, vasket med vann, tørket over $MgSO_4$ og dampet under redusert trykk. Restene ble desillert (50°C, 35 mbar). Det gav 0.0120 g (6%) av et hvitt krystallinsk stoff, sp: 55.8°C.

Enzymatisk syntese av*(1R,1'R)*-dibrom-1-metylsyklopropyletylbuturat (2a)

En rasemisk blanding av *(1R,1'R)-(1S,1'S)*-dibrom-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (**6**) (0.5 gr, 1,93 mmol) ble løst i tørr heksan (5 mL) med molekylærsikt. Vinylbutanat (5 eq) og enzym (0.7 g) ble tilsatt og reaksjonen ble satt på risteinkubator (30°C, 200 rpm). Reaksjonen ble fulgt med GC (50 μL). E-verdien ble funnet til 1000, og nådde 50 % omsetning etter 6 dager. Løsningen ble filtrert og renset med gravimetrisk kolonne (silikagel, porestørrelse 60 Å, 230-400 mesh partikkel størrelse, 40-63 μm, petroleter/etylacetat (8:2) som eluent). Det gav 0.1212 g av **2a**, 48.5%: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 4.8 q, 2.32 t, 1.7 sekst, 1.57 s, 1.48 d, 1.37 d, 0.98 t, 0.9 s.

Den samme prosedyren ble forsøkt en gang til, med rasemisk blanding av *(1R,1'R)-(1S,1'S)*-dibrom-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (**6**) som substrat. Løsningen med *R*-**2a** og gjenværende alkohol *S*-**1b** ble renset med gravimetrisk kolonne (silikagel, porestørrelse 60 Å, 230-400 mesh partikkel størrelse, 40-63 μm, petroleter/aceton (8:2) som eluent). Det gav 0.2016 g av *R*-**2a**, 80,64 %. Denne prøven inneholt 10% **1b** (GC). **2a**: $[\alpha]_\gamma^{20}$ +38.5 (c 1.1, $CHCl_3$). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 4.8 q, 2.32 t, 1.7 sekst, 1.57 s, 1.48 d, 1.37 d, 0.98 t, 0.9 s. **1b**: $[\alpha]_\gamma^{20}$ +22.5 (c 0.04, $CHCl_3$). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): 3.4 q, 2.02 (OH), 1.51 d, 1.45 d, 1.42 s, 1.32 d.

Syntese av *(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (1a)

(1R,1'R)-dibrom-1-metylsyklopropyletylbutanat (*R*-**2a**) (0.2549 g, 0.77 mmol) ble tilsatt en løsning av NaOH (7 mL, 1M) og rørt i 17 timer (90°C) under refluks. En gul blanding med brunt bunnfall ble filtrert, ekstrahert med $CHCl_3$ og dampet under redusert trykk. Det gav 0.1936 g, 76 % utbytte.

Enzymatisk syntese av*(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etan-1-ol (1a)

Blandingen fra hydrolyse med NaOH (0.1936 g, 0.75 mmol) ble løst i MeOH (5 mL) og overført til en fosfatbuffer (pH 7,1, 25 mL). Reaksjonskoblen ble dekket med aluminiumsfolie, og CALB (0.5 g) ble tilsatt. Reaksjonen ble satt på inkubator (30°C) i 6 dager. Løsningen ble filtrert, ekstrahert med $CHCl_3$, tørket over $MgSO_4$ og dampet inn under redusert trykk. Det gav 0.1288 g, 66.5 %. GC: viser to topper.

Det samme prosedyren ble forsøkt en gang til. Det gav 0.0973 g (48 %) av **1a**.

Tillaging av 0.1 M fosfatbuffer

KH_2PO_4 (68.045 g) ble løst i 500 mL (1 M). $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (114.10 gr) ble løst i 500 mL (1 M). Det ble tatt ut 38.5 mL av KH_2PO_4-løsningen og 61.5 mL av K_2HPO_4-løsningen. Det gav en 0.1 M fosfatbuffer med pH 7.1.

***(1R,1'R)*-dibromo-1-metylsyklopropyl-etyltrifluormetansulfonat (3)**

Trifluorometansulfat anhydrid (12,5 mL, 20 g, 70.88 mmol) ble tilsatt en nedkjølt løsning (-15°C) av blandingen fra enzymatisk hydrolyse (0.1288 g, 0.499 mmol), Et_3N (41 mL, 294 mmol) og THF (200 mL). Etter 45 min røring på samme temperatur, ble vann tilsatt og løsningen ble ekstrahert med dietyleter. Den organiske fasen ble separert og vasket med iskald 1% NaOH løsning, vann og brine. Løsningen ble dampet inn under redusert trykk, som gav et svart, oljete produkt.

Den samme prosedyren ble forsøkt en gang til med triflatanhydrid (12,5 ml, 20 g, 80.88 mmol), **2a** (50 mg), Et_3N (20.5 mL, 146 mmol) og THF (100 ml). Det ble rørt i 2 timer på

samme temperatur. Det gav også et svart, oljete produkt.

***(1R,3R)*-1-brom-2,3-dimetylbisyklo[1.1.0]butan (4)**

Metyllitium (5 ml, 8 mmol, 1.6 M i eter) ble tilsatt en nedkjølt løsning (-78°C) av **2b** i tørr dietyleter med molekylærsiv. Etter 3 timer røring ved samme temperatur, ble løsningen rørt i romtemperatur i 20 timer. Vann ble tilsatt, den organiske fasen ble separert og ekstrahert med eter. Den organiske fasen ble vasket med mettet natriumkloridløsning og vann, tørket over $MgSO_4$ og dampet inn under redusert trykk, som gav et svart, oljete produkt: ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) dietyleter: 3.47 q 1.20 t, bisyklobutan: 3.41 s, 1.62 s, 1.25 t

Referanser

[1] Stephenson G., Ferris I., Holland P., and Nordberg M. Glossary of terms relating to pesticides. *Pure Appl. Chem.*, 78:2075–2154, 2006.

[2] Jeyaratnam J. Acute pesticide poisoning: A major global health problem. *World Health Statistics Quarterly*, 43:139–144, 1990.

[3] Barroso J.M. Commission implementing regulation (eu) no 485/2013, 2013. URL `http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:139:0012:0026:EN:PDF`.

[4] Kurth J. W., 2014. URL `http://www.centerforfoodsafety.org/files/agricultural-practices-in-wildlife-management_20849.pdf`.

[5] Nishiwaki H., Kuriyama M., Nagaoka H., Kato A., Akamatsu M., Yamauchi S., and Shuto Y. Synthesis of imidacloprid derivatives with a chiral alkylated imidazolidine ring and evaluation of their insecticidal activity and affinity to the nicotinic acetylcholine receptor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20:6305–6312, 2012.

[6] Maienfisch P. Synthesis and properties of thiamethoxam and related compounds. *ZEITSCHRIFT FUR NATURFORSCHUNG*, 4:353–359, 2006.

[7] Godfray H. C. J., Petrokofsky G., McLean A. R., Blacquiere T., Field L. M., Hails R. S., Potts S. G., Raine N. E., and Vanbergen A. J. A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc. R. Soc. B*, 281, 2014.

[8] Fischer J., Müller T., Spatz A-K., Greggers U., Grünewald B., and Menzel R. Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *Plos One*, 9:353–359, 2014.

[9] Whitehorn P. R., O'Connor S., Wackers F. L., and Goulson D. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. *Science*, 336: 351–352, 2012.

[10] Hopwood J., Vaughan M., Shepherd M., Bidinger D., Mader E., Hoffman S. B., and Mazzacano C. Are neonicotinoids killing bees? a review into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action, 2012. URL `http://www.xerces.org/wp-content/uploads/2012/03/Are-Neonicotinoids-Killing-Bees_Xerces-Society1.pdf`.

[11] Martel J. The development and manufacture of pyrethroid insecticides. *Chirality in Industry*, 16:465–470, 1992.

[12] Birkemoe T., Mehl R., Ottesen P., Riddervold K. W., Soleng A., and Aak A., 201. URL `http://www.fhi.no/dav/12BECA1917.pdf`.

[13] Liu W., Gan J., Schlenk D., and Jury W. A. Enantioselectivity in environmental safety of current chiral insecticides. *proc. natl. acad. sci. usa*, 102:701–706, 2005.

[14] A. W. Garrison, Gan J., and Liu W. *Chiral Pesticides: Stereoselectivity and Its Consequences.* Oxford University Press, 1st edition, 2011.

[15] Williams K.M. Chirality: pharmacokinetics and pharmacodynamics in 3 dimensions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 16:465–470, 1989.

[16] Lam Y.W. Stereoselectivity: an issue of significant importance in clinical pharmacology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 8:147–157, 1988.

[17] Andersen S., Refsum H., and Tanum L. Kirale legemidler. *Tidsskr Nor Lægeforen*, 123:2055–2056, 2003.

[18] Kleveland K., Skattebøl L., and Sydnes L. K. Chemistry of *gem*-dihalocyclopropanes. xi. reactions of dihalocarbenes with allylic alcohols. *Acta. Chem. Scand.*, B31:463–468, 1977.

[19] Harwood L. M., Moody C. J., and Percy J. M. *Experimental Organic Chemistry.* Blackwell Science Ltd, 2th edition, 1999.

[20] Ueda M., Walczak M. A. A., and Wipf P. Formal alder-ene reaction of a bicyclo[1.1.0]butane in the synthesis of the tricyclic quaternary ammonium core of daphniglaucins. *Tetrahedron Lett.*, 49:5986–5989, 2008.

[21] Kobayashy J., Takatsu H., Shen Y., and Morita H. Daphniglaucins a and b, novel polycyclic quaternary alkaloids from daphniphyllum glaucescens. *Org. Lett.*, 5: 1733–1736, 2003.

[22] Wiberg K. B. The concept of strain in organic chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 25: 312–322, 1986.

[23] Hoz S. *The Chemistry of the Cyclopropyl Group.* Wiley, 1st edition.

[24] Jackson J. E., Mock G. B., Tetef M. L., Zheng G-x., and Jones M. Jr. Reactions of carbenes with bicyclobutanes and quadricyclane : Cycloadditions with two σ bonds. *Tetrahedron*, 41:1453–1464, 1985.

[25] Wipf P. and Walczak M. A.A. Pericyclic cascade reactions of (bicyclo[1.1.0]butylmethyl)amines. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45:4172–4175, 2006.

[26] Anslyn E.V. and Dougherty D.A. *Modern Physcical Organic Chemistry.* University Science Books, 1st edition, 2006.

[27] Mitschell A.G. Racemic drugs: Racemic mixture, racemic compound, or pseudo-racemate? *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 1:8–12, 1998.

[28] Clayden J., Greeves N., and Warren S. *Organic Chemistry.* Oxford : Oxford University Press, 2th edition, 2001.

[29] Aehle W. *Enzymes in Industry.* Wiley, 3th edition, 2007.

[30] Armstrong H. E. Adrian brown memorial lecture. the particulate nature of enzymic and zymic change. *J. Inst. Brewing*, 27:197–260, 1921.

[31] Faber K. *Biotransformations in Organic Chemistry.* Springer, 6th edition, 2011.

[32] Borman S. Much ado about enzyme mechanisms. *Chem. & Eng. News*, 82:35–39, 2004.

[33] Anastas P.T. and Warner J.C. *Green chemistry : theory and practice.* Oxford : Oxford University Press, 1st edition, 1998.

[34] Mugford P., Wagner U., Jiang Y., Faber K., and Kazlauskas R. Enantiocomplementary enzymes: classification, molecular basis for their enantiopreference, and prospects for mirror-image biotransformations. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 47:8782–93, 2008.

[35] Klibanov A.M. Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. *Acc. Chem. Res.*, 23:114–120, 1990.

[36] Ratledge C. and Kristiansen B. *Basic Biotechnology*. Carmbridge University Press, 2th edition, 2001.

[37] Straathof A.J.J. and J.A. Jongejan. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.*, 21:559–571, 1997.

[38] Jacobsen E. E., van Hellemond E.W., Moen A.R, Prado L.C.V., and T. Anthonsen. Enhanced selectivity in novozym 435 catalyzed kinetic resolution of secondary alcohols and butanoates caused by the (r)-alcohols. *Thetrahedron Lett.*, 44:8453–8455, 2003.

[39] Jacobsen E. E., Andresen L.S., and Anthonsen T. Immobilization does not influence the enantioselectivity of cal-b catalyzed kinetic resolution of secondary slcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16:847–850, 2005.

[40] Rakels J.L.L, Straathof A.J.J, and Heijnen J.J. A simple method to determine the enantiomeric ratio in enantioselective biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.*, 15: 1051–1056, 1993.

[41] Anthonsen H.W., B. Hoff, and Anthonsen T. A simple method for calculating enantiomer ratio and equilibrium constants in biocatalytic resolutions. *Thetrahedron: Asymmetry*, 6:3015–3022, 1995.

[42] Anthonsen H.W., Hoff B., and Anthonsen T. Calculation of enantiomer ratio and equilibrium constants in biocatalytic ping-pong bi-bi resolutions. *Thetrahedron: Asymmetry*, 7:2633–2638, 1996.

[43] Gawley R. E. and Aube J. *Principles and Applications of Asymmetric Synthesis*. Elsevier, 2th edition, 2012.

[44] Loughlin W.A. Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*, 74:49–62, 2000.

[45] Wang Y. F., Lalonde J. J., Momongan M., Bergbreiter D. E., and Wong C. H. Lipase-catalyzed irreversible transesterifications using enol esters as acylating reagents: preparative enantio- and regioselective syntheses of alcohols, glycerol derivatives, sugars and organometallics. *J. Am. Chem. Soc.*, 110(21):7200–7205, 1988.

[46] Klibanov, A. M., and Cambou B. Enzymic production of optically active compounds in biphasic aqueoussorganic systems. *Methods in Enzymology*, 136:117–37, 1987.

[47] Jacobsen E. E. and Anthonsen T. Water content influences the selectivity of calb-catalyzed kinetic resolution of phenoxymethyl-substituted secondary alcohols. *Can. J. Chem.*, 80:577–581, 2002.

[48] Davies H. G. and R. H. Green. *Biotransformations in Prepartive Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis.* Academic Press, 1st edition, 1989.

[49] Schmid A., Dordick J. S., Hauser B., Kiener A., M. Wubbolts, and B. Witholt. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409:258–268, 2001.

[50] Uppenberg J., Hansen M. T., Parkar S., and Jones T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from candida antarctica. *Structure*, 2:293–308, 1994.

[51] Louwrier A., Dritina G. J., and Kilbanov A. M. On the issue of interfacial activation of lipase in nonaqueous media. *Biotechnol. Bioeng.*, 50:1–5, 1996.

[52] Verger R. 'interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *TIBTECH*, 15:32–38, 1997.

[53] Anthonsen T. *Synthesis of Chemicals Using Enzymes, Basic Biotechnology.* Cambridge University Press, 1st edition, 2001.

[54] Kazlauskas R. J., Weissfloch A. N. E., Rappaport A. T., and Cuccia L. A. A rule to predict which enantiomer of a secondary alcohol reacts faster in reactions catalyzed

by cholesterol esterase, lipase from pseudomonas cepacia, and lipase from candida rugosa. *J. Org. Chem.*, 56:2656–2665, 1991.

[55] Kazlauskas R. J. and Weissfloch A. N. E. A structure-based rationalization of the enantiopreference of subtilisin toward secondary alcohols and isosteric primary amines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 3:65–72, 1997.

[56] Parkar S. A., Bjoerking F., Zundel M., Schulein M., Svendsen A., Heldt-Hansen H. P., and Gormsen E. Purification of two lipases from candida antarctica and their inhibition by various inhibitors. *Indian Journal of Chemistry, Section B: Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 32B:76–80, 1993.

[57] Uppenberg J., Öhrner N., Norin M., Hult K., Kleywegt G.J., Patkar S., Waagen V., Anthonsen T., and A. Jones. Crystallographic and molecular modeling studies of lipase b from candida antarctica reveal a stereospecific pocket for secondary alcohols. *Biochem.*, 34:16838–51, 1995.

[58] Anderson E. M., Larsson K. M., and Kirk O. One biocatalyst–many applications: The use of candida antarctica b-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16:181–204, 1998.

[59] Martinelle M. and Hult K. On the interfacial activation of candida antarctica lipase a and b as compared with humicola lanuginosa lipase. *BBA*, 1258:272–6, 1995.

[60] Verger R. 'interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *TIBTECH*, 15:32–38, 1997.

[61] Heldt-Hanse H. P., Ishii M., Parkar S.A., Hansen T., and Eigtved P. A new immobilized positional nonspecific lipase for fat modification and ester synthesis. *ACS Symposium Series*, 389:158–72, 1998.

[62] Arroyo M. and Sinisterra J. V. High enantioselective esterification of 2-arylpropionic acids catalyzed by immobilized lipase from candida anturctica: A mechanistic approach. *J. Org. Chem.*, 59:4410–4417, 1994.

[63] Aitken R.A. and Kilényi S.N. *Asymmetrick Synthesis.* Blackie A & P, 1st edition, 1995.

[64] Volker S. Chiral separations using gas chromatography. *Trends Anal. Chem.; TrAC*, 21:647–661, 2002.

[65] Pettersson C. and Josefsson M. Chiral separation of aminoalcohols by ion-pair chromatography. *Chromatographia*, 21:321–326, 1986.

[66] Poole C. F. *The Essence of Chromatographt.* Elsevier Science B.V, 1st edition, 2003.

[67] Konig W. A. and Gehrcke B. Gas chromatographic enantiomer separation with modified cyclodextrins: Carboxylic acid esters and epoxides. *Journal of High Resolution Chromatography*, 16:175–181, 1993.

[68] Lundanes E., Reubsaet L., and Greibrokk T. *Chromatography.* Wiley, 1st edition, 2014.

[69] Lundanes E. and Greibrokk T. *Kromatografi.* Universitetsforlaget, 3th edition, 1998.

[70] Friebolin H. *Basic One-and Two-Dimensional NMR Spectroscopy.* Wiley-Vch, 5th edition, 2013.

[71] Jacobsen E. E., Farrag el Behairy M., Skattebøl L., and Anthonsen T. Enantiopure dihalocyclopropyl alcohols and esters by lipase catalyzed kinetic resolution. *J. Biotechnol.*, 168:284–288, 2013.

[72] Rian J. K. Prosjektoppgave for emnet tkj4130, 2014.

[73] Nunn J. R. The structure of sterculic acid. *J. Chem. Soc.*, 65:313–318, 1952.

[74] Painter P. C. and Coleman M. M. *Fundamentals Of Polymer Science.* CRC Press, 2th edition, 1997.

[75] Kawauchi T., Nakamura M., Kitayama T., Padias A. D., and Hall Jr H. K. Structural analyses of methyl bicyclobutane-1-carboxylate oligomers formed with *tert*-butyllithium/aluminum bisphenoxide and mechanistic aspect of the polymerization. *Polymer Journal*, 37:439–448, 2005.

[76] Sydnes L. K. and Skattebøl L. Chemistry of *gem*-dihalocyclopropanes. xiv. reacions of *gem*-dibromocyclopropyl ketones and alkyl *gem*-dibromocycloprpanecarboxylates with methyllithium. *Acta. Chem. Scand.*, B32:547–552, 1978.

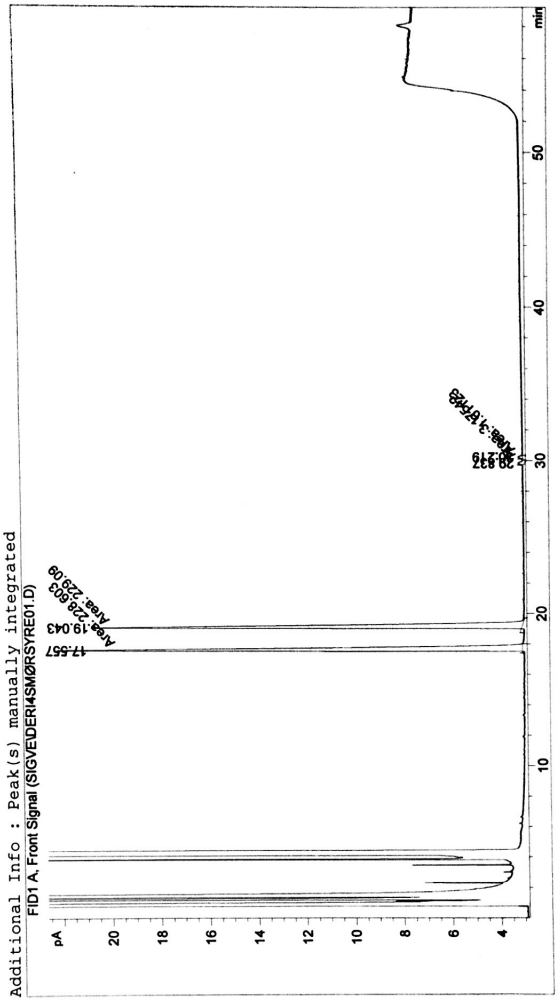
[77] Silverstein R. M., Webster F. X., and Kiemle D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* Wiley, 7th edition, 2005.

[78] Kobayashi Y., Nakamoto M., Inagaki Y., and Sekiguchi A. Cross-coupling reaction of a highly strained molecule: synthesis of σ-π conjugated tetrahedranes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 52:10740–10744, 2013.

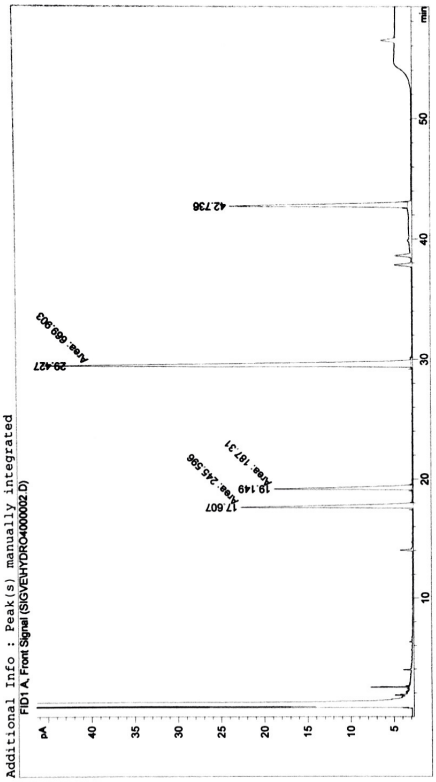
[79] Kürti L. and Czakó B. *Strategic Applications of Names Reactions in Organic Synthesis.* Elsevier Academix Press, 1st edition, 2005.

[80] Johnson P. L. and Schaefer J. P. Structure of 1,3-dicyanobicyclo[1.1.0]butane using x-ray analysis. *J. Org. Chem.*, 37:2762–2763, 1972.

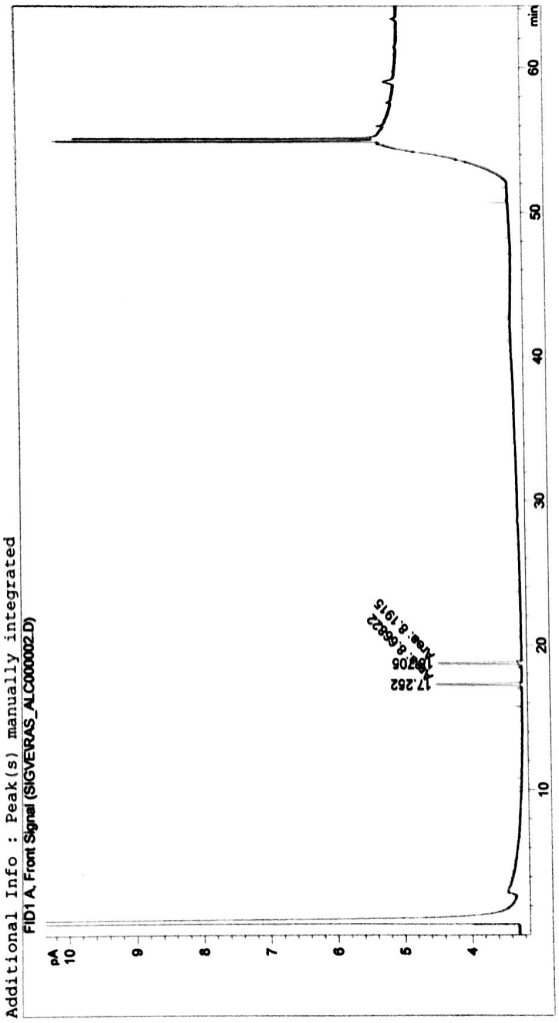
Vedlegg



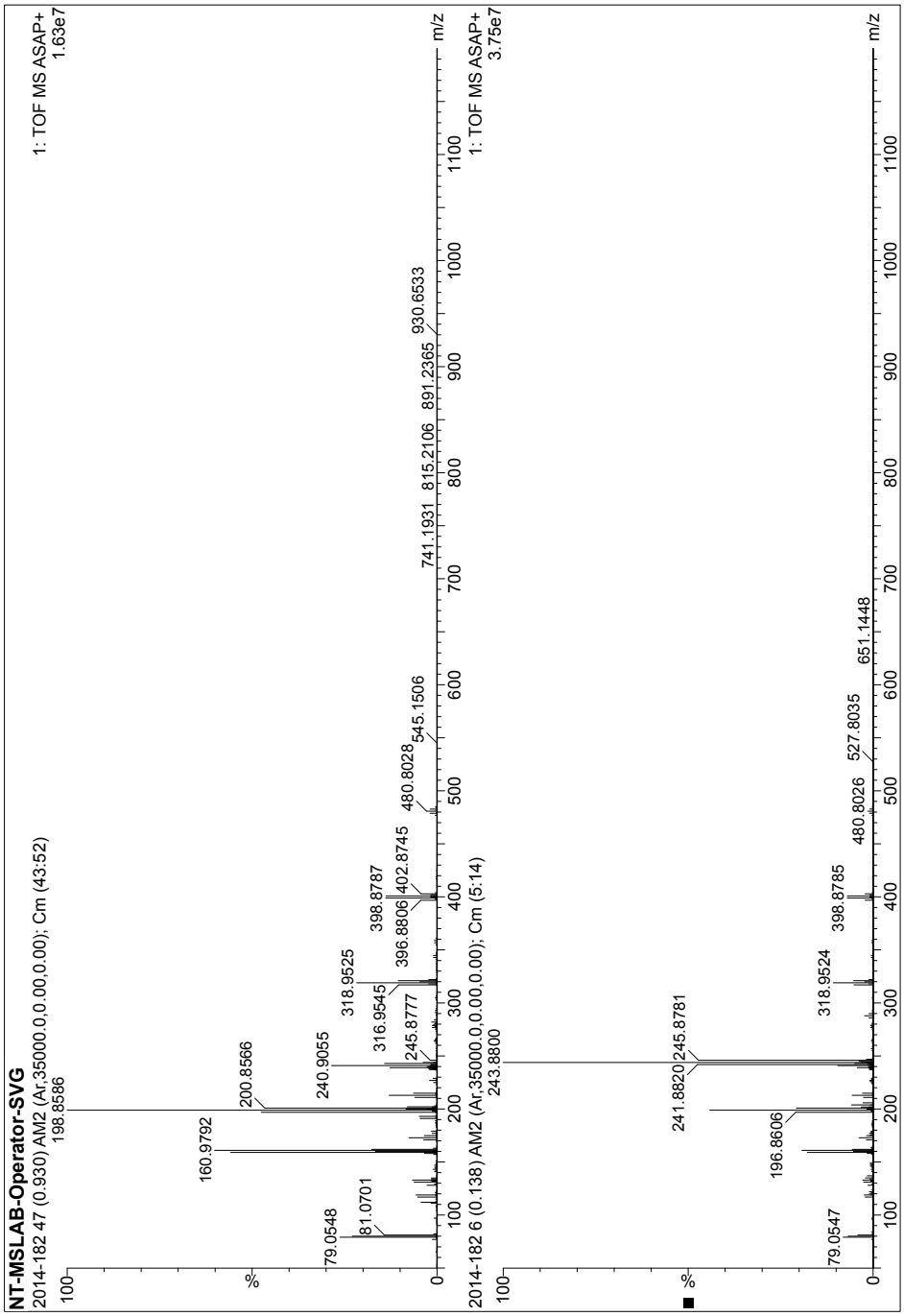

```
==========================================================
                    Area Percent Report
==========================================================

Sorted By             :      Signal
Multiplier:                  :      1.0000
Dilution:                    :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A, Front Signal

Peak RetTime Type  Width    Area      Height     Area
  #   [min]      [min]    [pA*s]      [pA]       %
----|-------|----|-------|----------|----------|--------|
   1  17.557 MM   0.1988  228.60329   19.16856 49.42987
   2  19.043 MM   0.2166  229.09012   17.63121 49.53513
   3  29.837 MM   0.2042    3.17542 2.59164e-1  0.68661
   4  30.219 MM   0.1409    1.61123 1.90623e-1  0.34839

Totals :                  462.48006   37.24955

==========================================================
                   *** End of Report ***
==========================================================
```




```
==========================================================
                    Area Percent Report
==========================================================

Sorted By             :      Signal
Multiplier:                  :      1.0000
Dilution:                    :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A, Front Signal

Peak RetTime Type  Width    Area      Height    Area
  #   [min]      [min]    [pA*s]     [pA]       %
---|--------|----|--------|----------|----------|--------|
   1  17.607 MM   0.2052  245.59610   19.94733 17.63506
   2  19.149 MM   0.1960  187.31049   15.92441 13.44985
   3  29.427 MM   0.2621  669.90308   42.60500 48.10248
   4  42.736 BB   0.1950  289.84848   20.54069 20.81261

Totals :                  1392.65814   99.01743
```




```
==========================================================
                     Area Percent Report
==========================================================

Sorted By             :      Signal
Multiplier:                  :      1.0000
Dilution:                    :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: FID1 A, Front Signal

Peak RetTime Type  Width    Area      Height    Area
  #   [min]      [min]    [pA*s]      [pA]      %
----|-------|----|-------|----------|---------|---------|
   1 17.252 MM   0.1141   8.66822    1.26665  51.41378
   2 18.705 MM   0.1131   8.19150    1.20744  48.58622

Totals :                  16.85971    2.47410

==========================================================
                    *** End of Report ***
==========================================================
```


NT-MSLAB-Operator-SVG
2014-182 47 (0.930) AM2 (Ar,35000.0,0.00,0.00); Cm (43:52)
1: TOF MS ASAP+
1.63e7
198.8586
160.9792
200.8566
240.9055
79.0548
81.0701
318.9525
316.9545
245.8777
398.8787
396.8806
402.8745
480.8028
545.1506
741.1931
815.2106
891.2365
930.6533
2014-182 6 (0.138) AM2 (Ar,35000.0,0.00,0.00); Cm (5:14)
1: TOF MS ASAP+
3.75e7
243.8800
241.8820
245.8781
196.8606
79.0547
318.9524
398.8785
480.8026
527.8035
651.1448
m/z

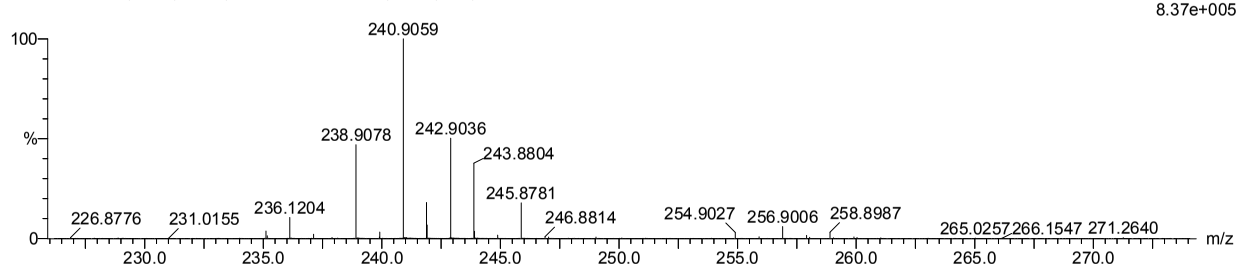
Single Mass Analysis

Tolerance = 10.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
Element prediction: Off
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

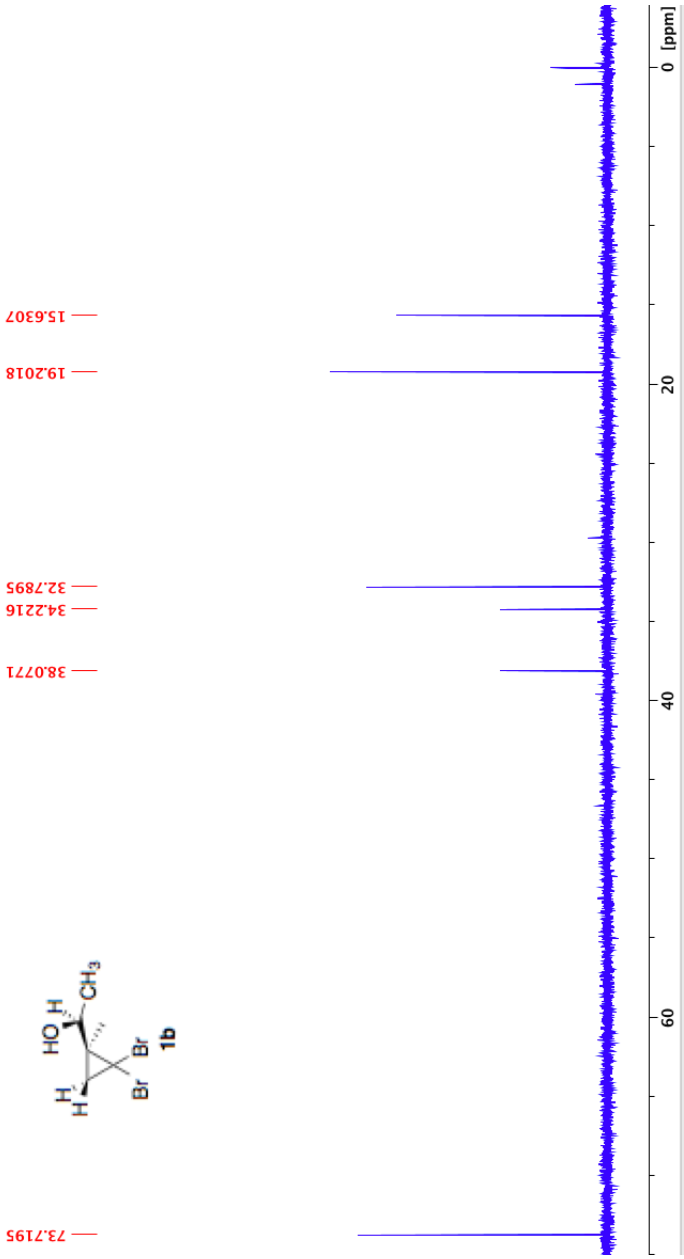
Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
504 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)
Elements Used:
C: 0-500 H: 0-1000 N: 0-15 O: 0-200 Br: 0-4

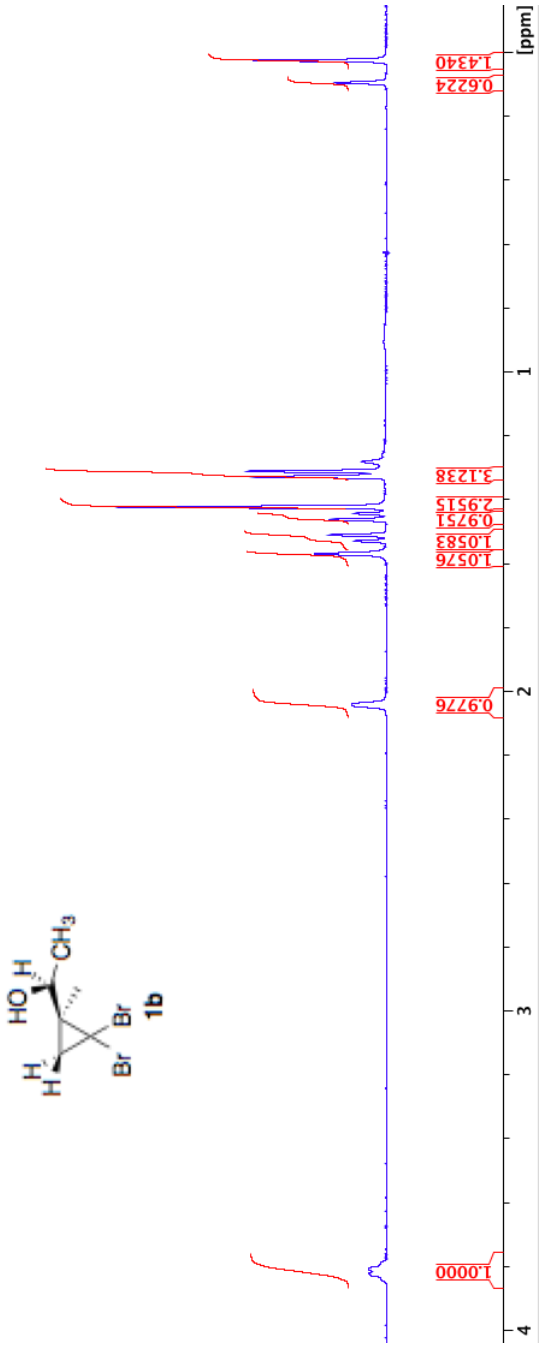
NT-MSLAB-Operator-SVG
2014-164 NY 4 (0.104) AM2 (Ar,35000.0,0.00,0.00); Cm (4:12)

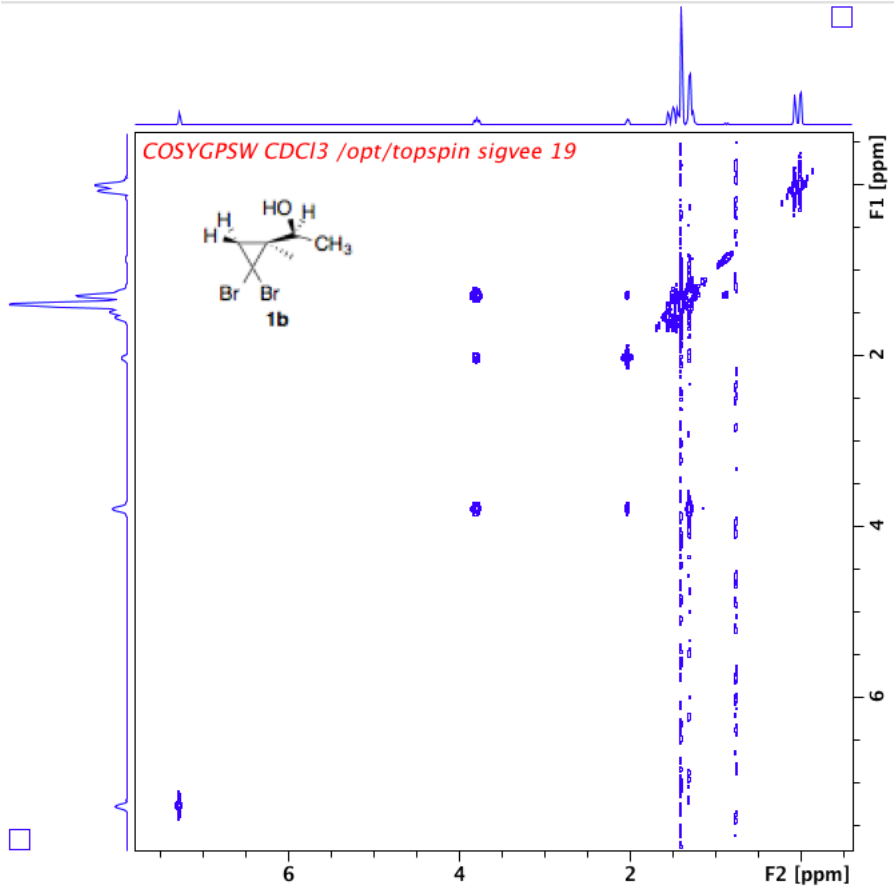
1: TOF MS ASAP+
8.37e+005

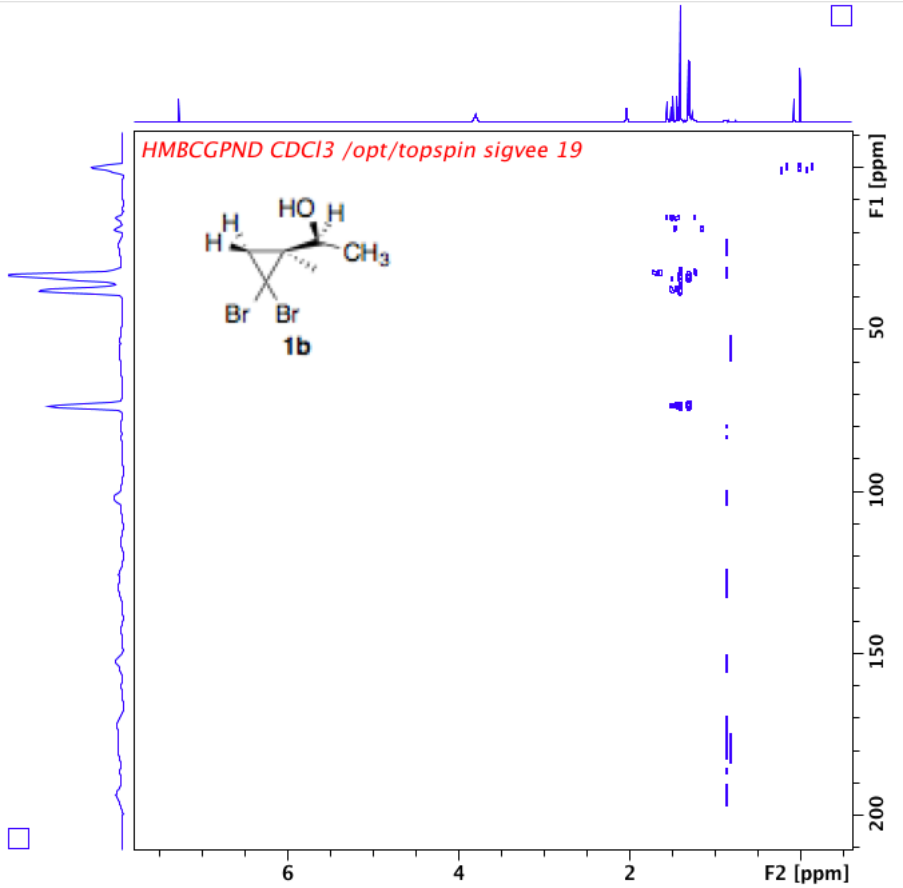


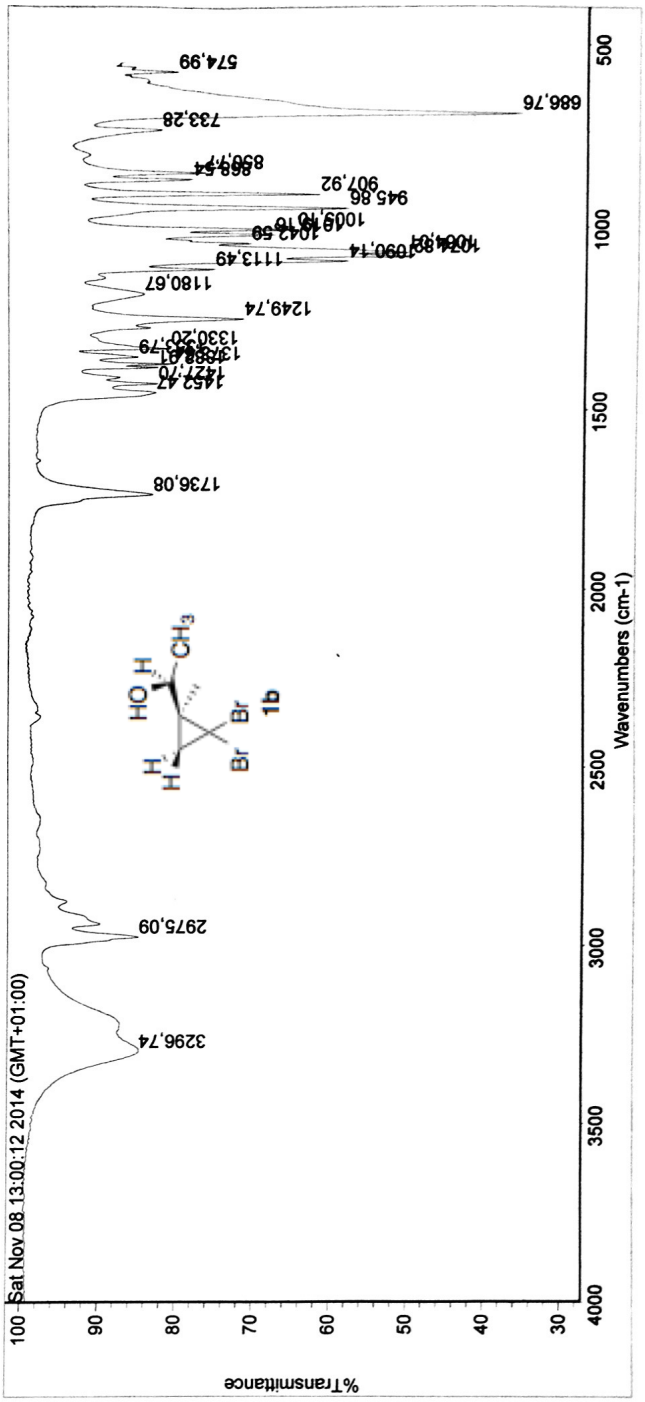
Minimum:				-1.5				
Maximum:		5.0	10.0	50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf(%)	Formula
238.9078	238.9071	0.7	2.9	1.5	1508.0	0.000	99.98	C6 H9 Br2
	238.9092	-1.4	-5.9	8.5	1516.4	8.341	0.02	C7 N2 O3 Br

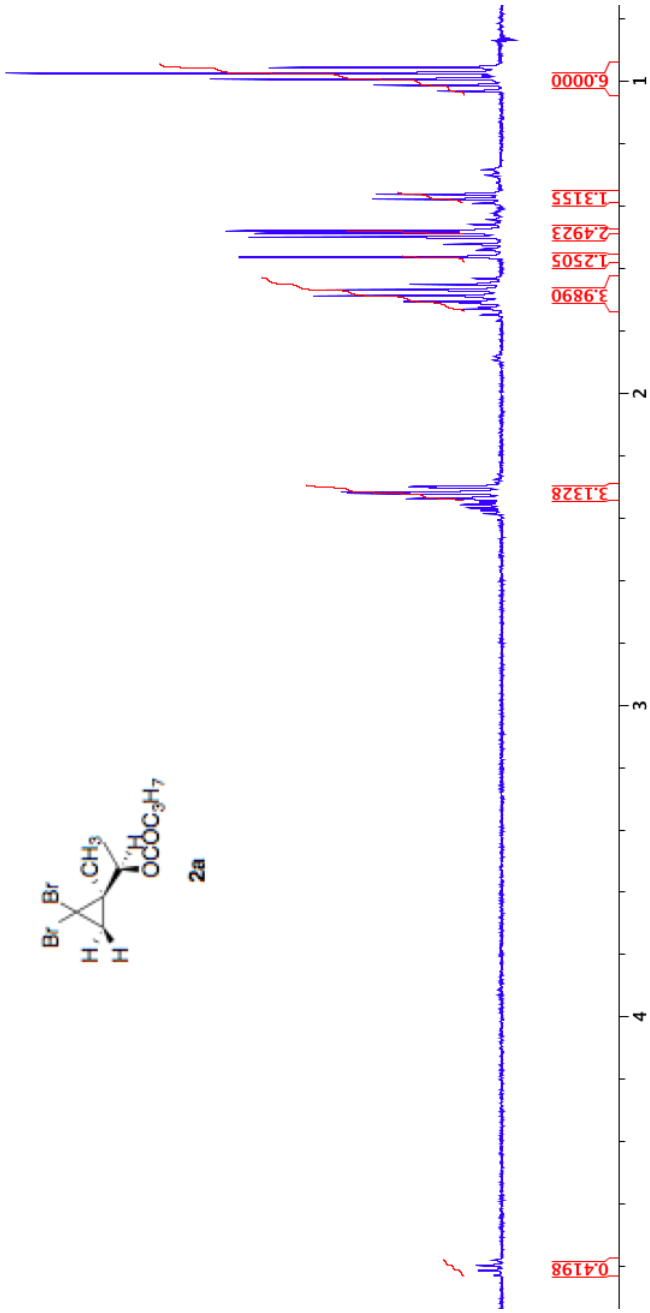

73.7195
38.0771
34.2216
32.7895
19.2018
15.6307
Br
Br
1b
H
H
HO
H
CH3
60
40
20
0
[ppm]

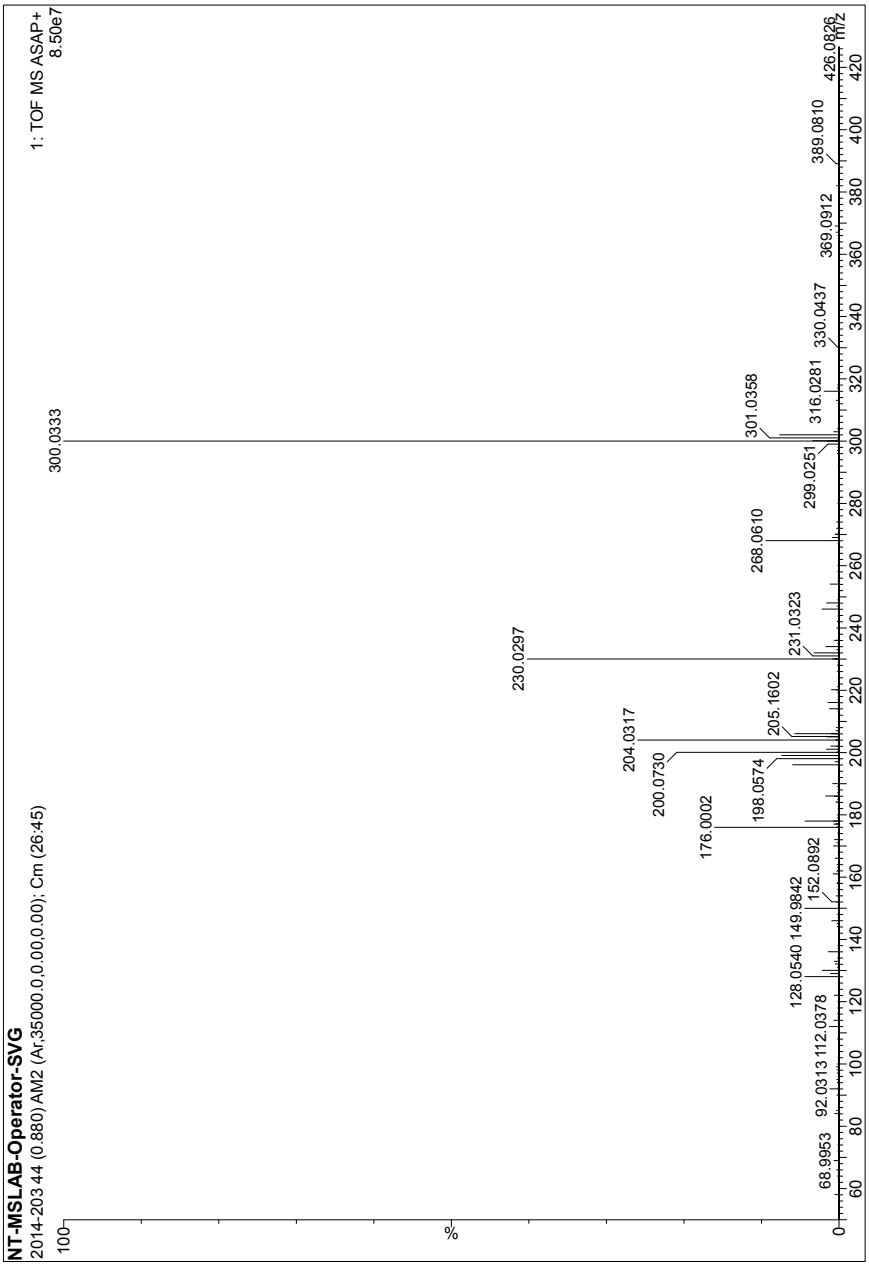

HO
H
CH3
H
H
Br
Br
1b
[ppm]
1.4340
0.6224
3.1238
2.9515
0.9751
1.0583
1.0576
0.9776
1.0000
4
3
2
1

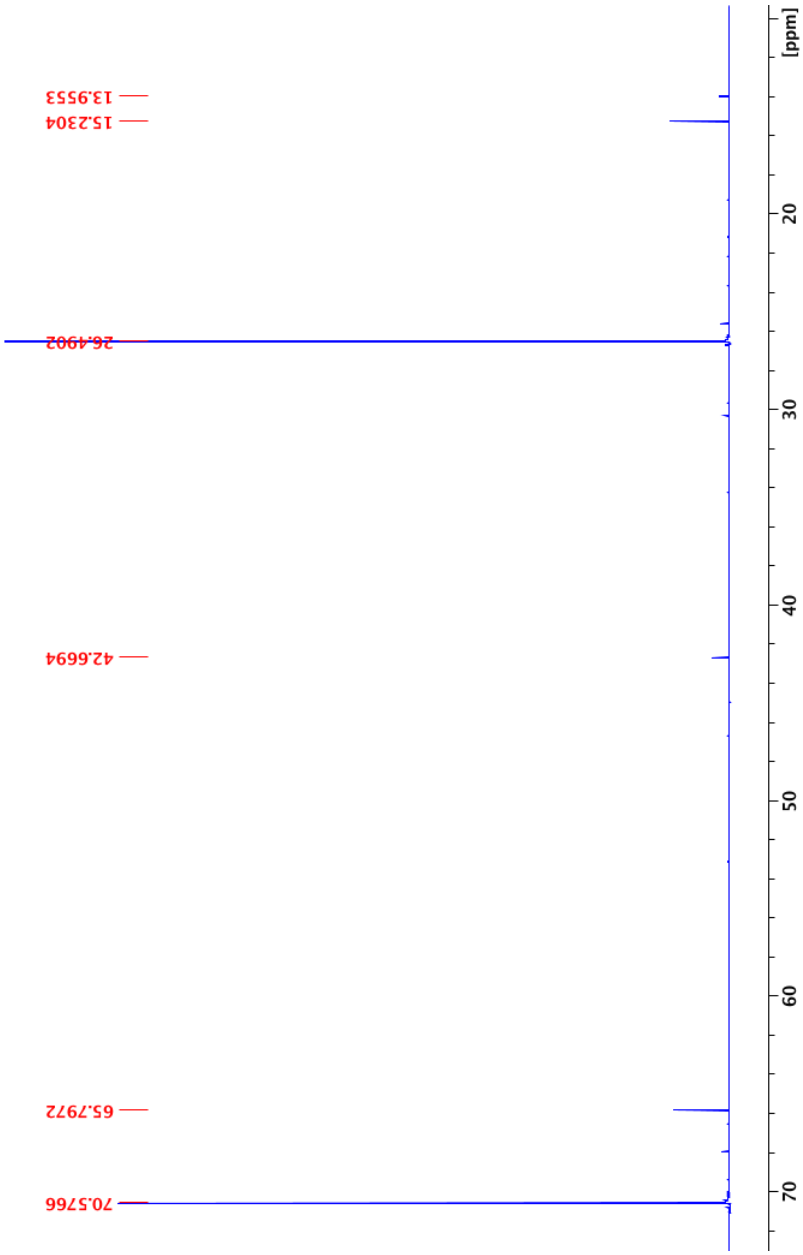

COSYGPSW CDCl3 /opt/topspin sigvee 19
HO
H
H
CH3
Br
Br
1b
F1 [ppm]
F2 [ppm]
6
4
2

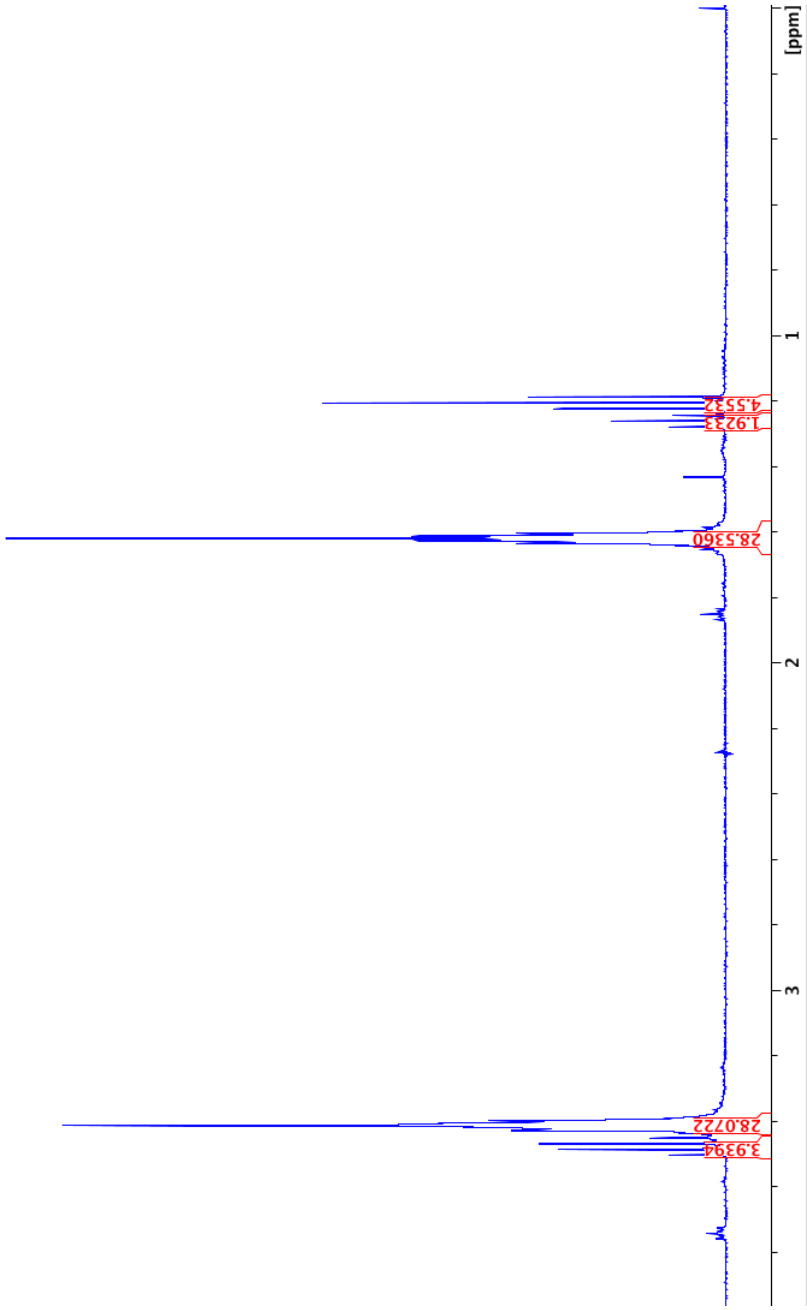

HMBCGPND CDCl3 /opt/topspin sigvee 19
HO
H
H
H
CH3
Br
Br
1b
F1 [ppm]
50
100
150
200
6
4
2
F2 [ppm]

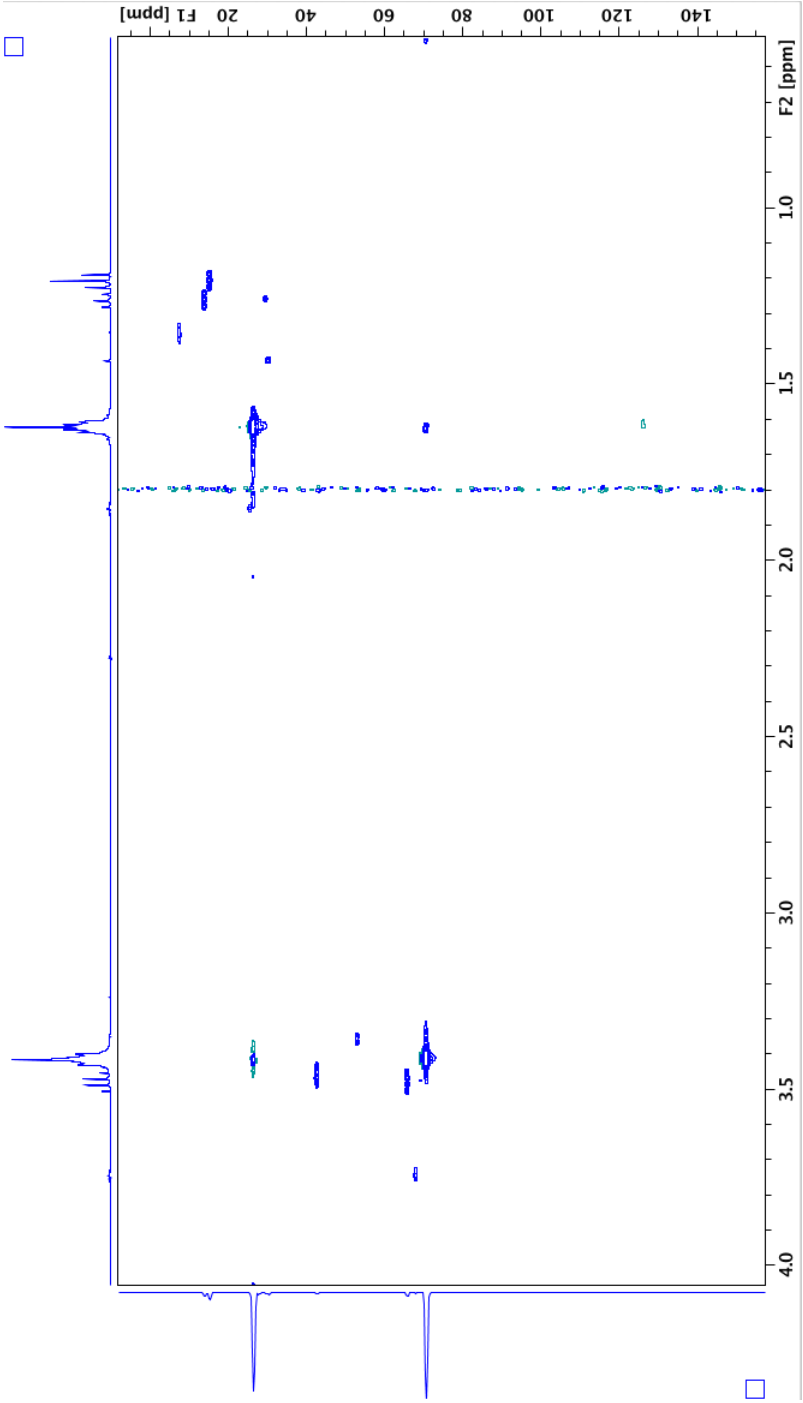

Sat Nov 08 13:00:12 2014 (GMT+01:00)
%Transmittance
Wavenumbers (cm-1)
100
90
80
70
60
50
40
30
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
3296,74
2975,09
1736,08
1452,47
1427,70
1330,20
1249,74
1180,67
1113,49
1090,14
1042,59
945,86
907,92
733,28
686,76
574,99
H
HO
H
CH3
H
Br
Br
1b

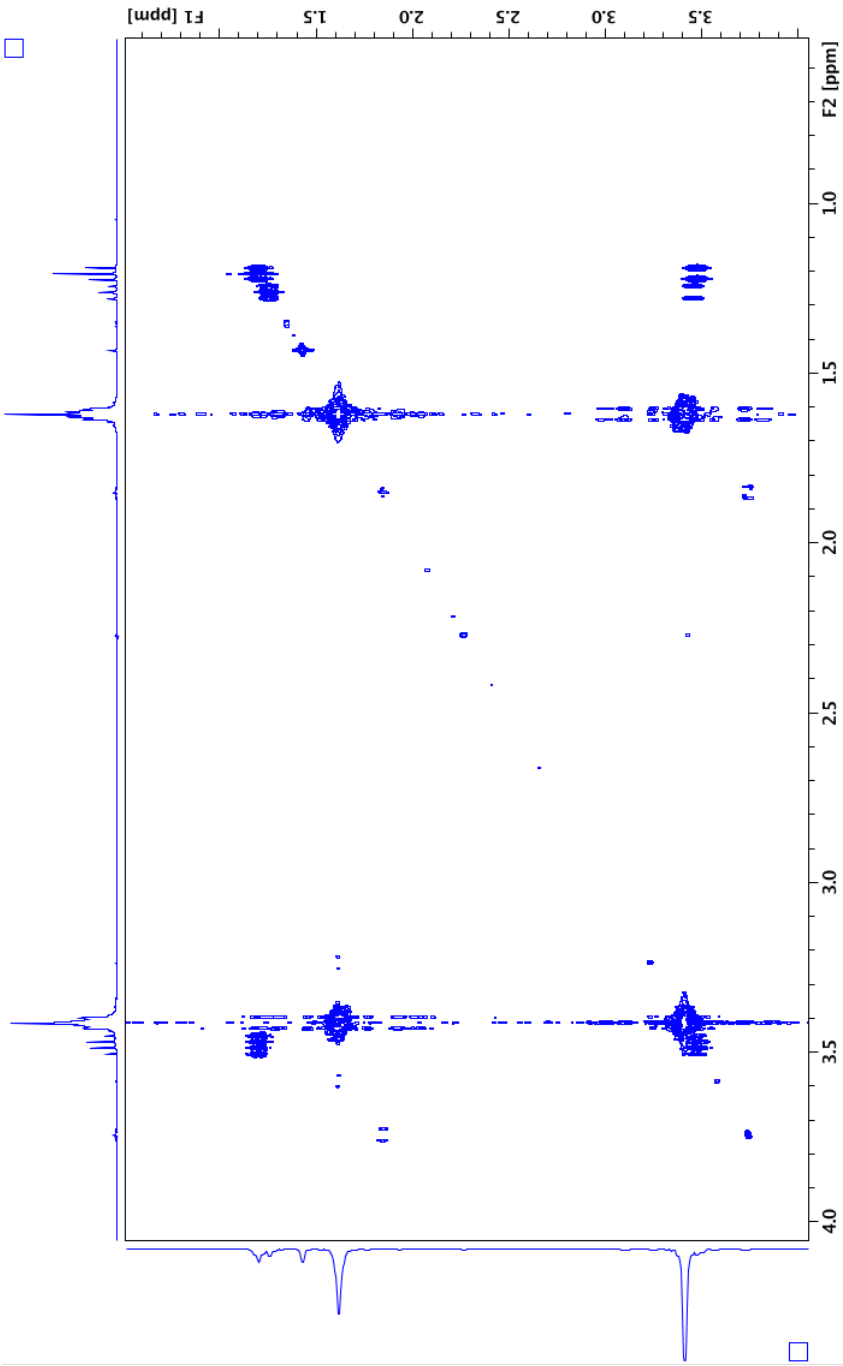

Br
Br
H
H
CH3
H
OCOC3H7
2a
6.0000
1.3155
2.4923
1.2505
3.9890
3.1328
0.4198
1
2
3
4


NT-MSLAB-Operator-SVG
2014-203 44 (0.880) AM2 (Ar,35000.0,0.00,0.00); Cm (26:45)
1: TOF MS ASAP+
8.50e7
100
%
0
300.0333
230.0297
204.0317
200.0730
176.0002
301.0358
316.0281
330.0437
369.0912
389.0810
426.0826
268.0610
299.0251
231.0323
205.1602
198.0574
152.0892
149.9842
128.0540
112.0378
92.0313
68.9953
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
320
340
360
380
400
420
m/z

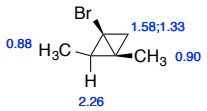

70.5766
65.7972
42.6694
26.4902
15.2304
13.9553
70
60
50
40
30
20
[ppm]


[ppm]
1
2
3
4.5532
1.9233
28.5360
3.9394
28.0722

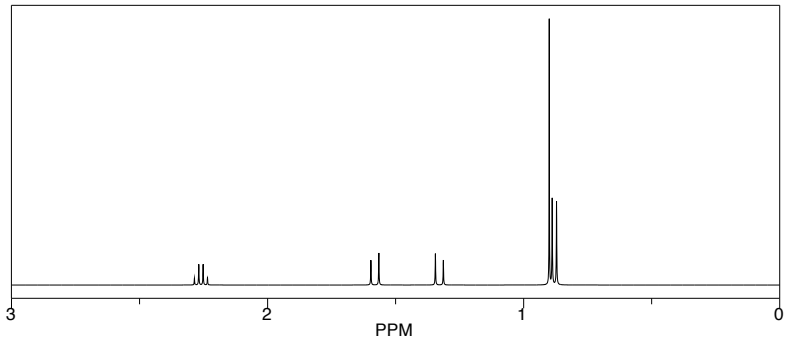

F2 [ppm]
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
F1 [ppm]
20
40
60
80
100
120
140


4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
F2 [ppm]
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
F1 [ppm]

ChemNMR ^{1}H Estimation

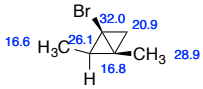


Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

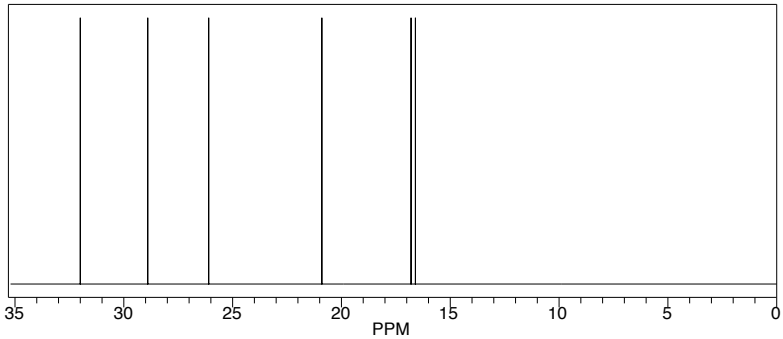



```
Protocol of the H-1 NMR Prediction (Lib=SU Solvent=CDCl3 400 MHz):

Node      Shift     Base + Inc.   Comment (ppm rel. to TMS)

CH2 1,58;1,335000         0,22      cyclopropane
                          0,05      1 -C
                          0,69      1 -Br
                          0,10      2 -C
                          0,46      1 beta -Br from methylene
                         -0,06      1 beta -C from methylene
CH3 0,90               0,86      methyl
                          0,10      2 beta -CC
                          0,05      1 beta -C
                         -0,11      general corrections
CH3 0,88               0,86      methyl
                          0,10      2 beta -CC
                         -0,08      general corrections
H   2,26               0,22      cyclopropane
                          0,05      1 -C
                          0,69      1 -Br
                          0,10      2 -C
                          0,80      1 -C
                          0,10      1 alpha -C from methine
                          0,41      1 beta -Br from methine
                         -0,10      1 beta -C from methine
                         -0,01      general corrections

1H NMR Coupling Constant Prediction

shift   atom index  coupling partner  constant and vector

1,46        4 diastereotopic -12,4  H-C-H
0,90        7
0,88        6
                      5   6,8  H-CH2-C-H
2,26        5
                      6   6,8  H-C-CH2-H
```

ChemNMR ^{13}C Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough




```
Protocol of the C-13 NMR Prediction: (Lib=S)

Node     Shift    Base + Inc.   Comment (ppm rel. to TMS)

C   32,0             -21,0      cyclopropane
                         27,3      3 alpha -C from aliphatic
                         18,9      1 alpha -Br from aliphatic
                         18,8      2 beta -C from aliphatic
                        -12,0      general corrections
C   16,8             -21,0      cyclopropane
                         36,4      4 alpha -C from aliphatic
                          9,4      1 beta -C from aliphatic
                         11,0      1 beta -Br from aliphatic
                        -19,0      general corrections
CH  26,1             -21,0      cyclopropane
                         27,3      3 alpha -C from aliphatic
                         18,8      2 beta -C from aliphatic
                         11,0      1 beta -Br from aliphatic
                        -10,0      general corrections
CH2 20,9             -21,0      cyclopropane
                         18,2      2 alpha -C from aliphatic
                         18,8      2 beta -C from aliphatic
                         11,0      1 beta -Br from aliphatic
                         -2,5      1 gamma -C from aliphatic
                         -3,6      general corrections
CH3 28,9              -2,3      aliphatic
                          9,1      1 alpha -C
                         28,2      3 beta -C
                         -2,5      1 gamma -C
                         -3,8      1 gamma -Br
                          0,2      general corrections
CH3 16,6              -2,3      aliphatic
                          9,1      1 alpha -C
                         18,8      2 beta -C
                         -5,0      2 gamma -C
                         -3,8      1 gamma -Br
                         -0,2      general corrections
```