

# Mekanistiske studier i kjemo-enzymatisk syntese av enantiomert rene byggestener for betablokkeren Atenolol

**Ingvild Teigen Lund**

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: juni 2015

Hovedveileder: Elisabeth Egholm Jacobsen, IKJ

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for kjemi



---

Jeg erklærer herved at denne masteravhandlingen er et uavhengig arbeid i henhold til eksamensreglementet ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU).

Trondheim, 1. Juni 2015

---

Ingvild Teigen Lund



## Forord

Denne masteroppgaven, «Mekanistiske studier i kjemo-enzymatisk syntese av enantiomert rene byggestener for betablokkeren Atenolol» er gjennomført ved Institutt for Kjemi ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU) i samarbeid med min veileder, førsteamanuensis Elisabeth Egholm Jacobsen. Arbeidet er blitt gjennomført fra januar 2015 til juni 2015 som en del av min utdanning i studieprogrammet Industriell kjemi og bioteknologi.

Jeg ønsker å takke Elisabeth for god faglig veiledning, og for hennes entusiasme og engasjement. I tillegg vil jeg gjerne takke Pål Bøckmann og Erik Tveit for godt selskap på laben, samt professor Thorleif Anthonsen for spennende foredrag og innspill på gruppemøtene våre. En takk rettes også til Fredrik Blindheim for verdifulle bidrag til prosjektet mitt.

Takk til Susana Villa Gonzalez for opptak av MS-spektre, til Roger Aarvik for hjelpelighet med henting av kjemikalier, og til Julie Asmussen for hjelp og opplæring i GC og HPLC.

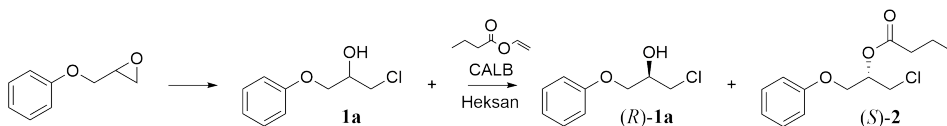
Til slutt ønsker jeg å takke Ingrid Ullestad Moen for hennes vennskap og støtte, og Fredrik Willumsen for all hjelp, støtte og motivasjon de siste årene.



## Sammendrag

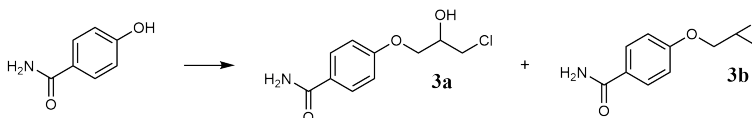
Målet i dette prosjektet har vært å syntetisere enantiomert rene byggestener for legemiddelet atenolol med lipasekatalyse, og samtidig studere mekanistiske og biokjemiske forhold som bestemmer enzymenes enantioselektivitet for ulike byggestener. Et delmål var å syntetisere rasemisk atenolol som substrat for lipaser.

Byggestenen **1a** ble syntetisert ved en epoksidåpning med konsentrert saltsyre med et utbytte på 76 %. Videre ble det utført kinetisk oppløsning på rasemisk **1a** med CALB (Novozym 435) som katalysator, med *E*-verdi på 228. Med en så høy *E*-verdi er det mulig å oppnå høyt enantiomert overskudd for begge enantiomerene. *E*-verdien avtok ved høyere omsetninger.



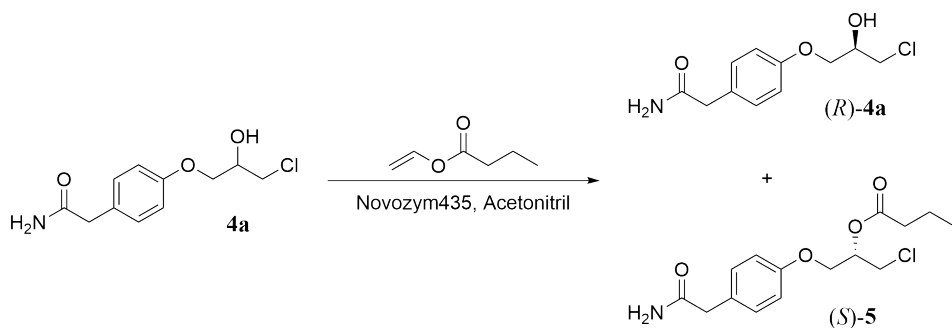
Skjema 1: Syntese av **1a** og videre omestring med vinylbutanat til (*R*)-**1a** og (*S*)-**2**.

Forbindelsen **3a** ble syntetisert ved substitusjon av 4-hydroksybenzamid med epiklorhydrin. Epoksidet i biproduktet **3b** ble åpnet med dilitiumtetraklorkuprat. Det totale utbyttet var på 34 %. Forbindelsen **3a** var ikke mulig å oppløse hverken på kiral GC eller kiral HPLC.



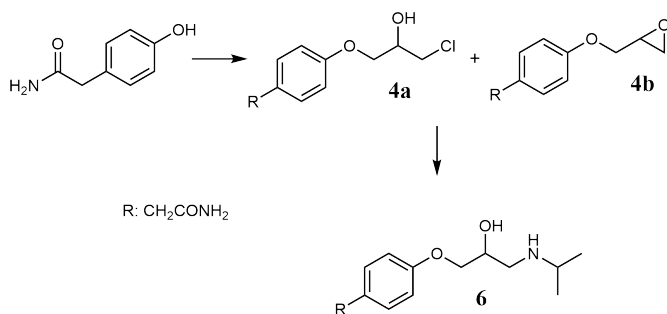
Skjema 2: Syntese av **3a** og biproduktet **3b**.

Byggestenen **4a** ble syntetisert ved å reagere 4-hydroksyfenylacetamid med epiklorhydrin i henhold til Skjema 1.2. Epoksidet i biproduktet **4b** ble åpnet med dilitiumtetraklorkuprat. Det totale utbyttet var på 22 %. Videre ble det utført kinetisk oppløsning på rasemisk **4a** med CALB som katalysator, med en *E*-verdi på 643. Den kinetiske oppløsningen i stor skala gav (*R*)-**4a** med *ee* = 90 %. Hydrolyse av esteren (*S*)-**5** gav (*S*)-**4a** med *ee* = 99 %.



Skjema 3: Den kinetiske oppløsningen av rasemisk **4a**.

Rasemisk atenolol **6** ble syntetisert ved å reagere **4a** og **4b** med isopropylamin med et utbytte på 34 %. Det ble videre forsøkt en kinetisk oppløsning med CALA som biokatalysator, men enzymet var ikke selektivt.



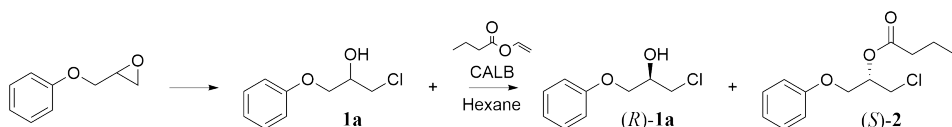
Skjema 4: Syntese av rasemisk **6**.



## Summary

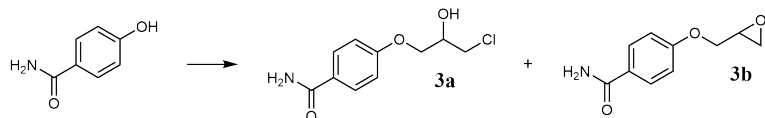
The objective of this project has been to synthesize enantiopure building blocks for the drug atenolol with lipase catalysis, and at the same time to study the mechanistic and biochemical parameters that determine the enantioselectivities of the enzymes towards different building blocks. A secondary objective was to synthesize racemic atenolol as a substrate for lipases.

The building block **1a** was synthesized by an epoxide opening with concentrated hydrochloric acid with a yield of 76 %. Further, racemic **1a** was used in a kinetic resolution with CALB (Novozym 435) as biocatalyst, with an *E*-value of 228. It is possible to achieve both enantiomers in high enantiomeric excess with such a high *E*-value. The *E*-value decreased as the conversion increased.



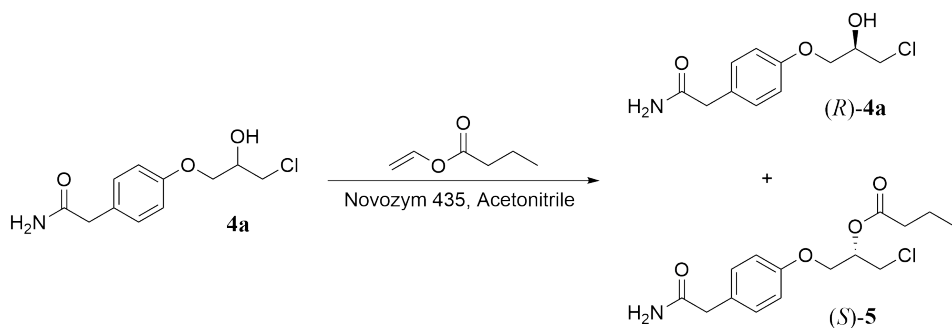
Scheme 5: Synthesis of **1a** and further transesterification with vinyl butanoate to *(R)*-**1a** and *(S)*-**2**.

Compound **3a** was synthesized by substitution of 4-hydroxybenzamide with epichlorohydrin. The epoxide in the byproduct **3b** was opened by dilithium tetrachlorocuprate. The final yield was 34 %. Resolution of **3a** was not achieved with chiral HPLC.



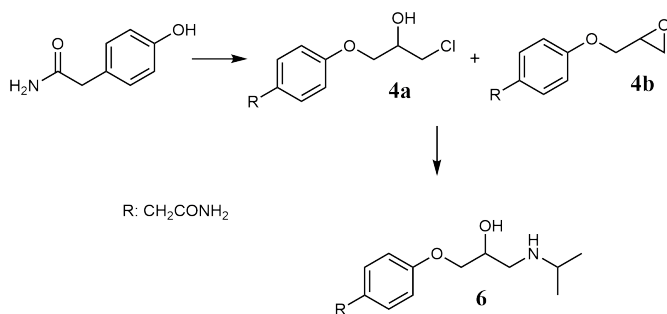
Scheme 6: Synthesis of **3a** and the byproduct **3b**.

The building block **4a** was synthesized by reacting 4-hydroxyphenylacetamide with epichlorohydrin according to Scheme 6. The epoxide in the byproduct **4b** was opened with dilithium tetrachlorocuprate. The total yield was 22 %. Further, racemic **4a** was studied in a kinetic resolution with CALB as biocatalyst, with an *E*-value of 643. The large scale kinetic resolution yielded *(R)*-**4a** with *ee* = 90 %. Hydrolysis of the ester *(S)*-**5** yielded *(S)*-**4a** with *ee* = 99 %.



Scheme 7: Kinetic resolution of racemic **4a**.

Racemic atenolol **6** was synthesized by reacting **4a** and **4b** with isopropylamine with a yield of 34 %. A kinetic resolution with CALA as biocatalyst was attempted, but the enzyme was not selective.



Scheme 8: Synthesis of racemic **6**.

## Forkortelser og symboler

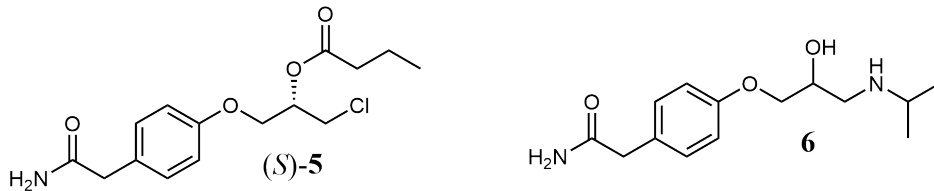
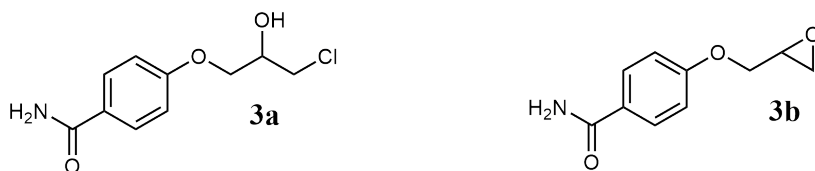
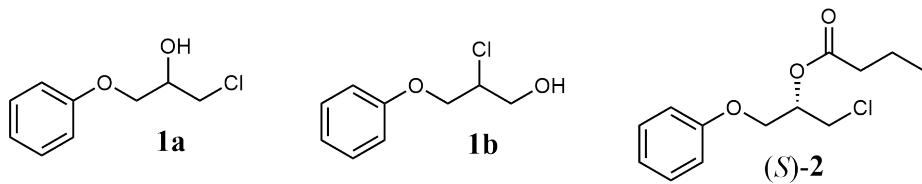
$\alpha$	optisk rotasjon
$\Delta$	Intervall
$\delta$	Kjemisk shift på NMR-spektrum
$\lambda$	bølgelengde i nanometer
API	Active pharmaceutical ingredient, aktiv substans
Asp	Aspartat
c	omsetning
c	konsentrasjon (optisk rotasjon)
CALA	<i>Candida antarctica</i> lipase A
CALB	<i>Candida antarctica</i> lipase B
CMC	Critical micelle concentration/kritisk micelle-konsentrasjon
DEA	Dietylamin
ECHA	European chemical agency, det europeiske kjemikaliebyrået
ee	Enantiomert overskudd
$ee_S$	Enantiomert overskudd av substrat
$ee_P$	Enantiomert overskudd av produkt
E	Det enantiomere forholdet
EMIM	1-Etyl-3-metylimidazolium
FID	Flammeioniseringsdetektor
GLC	Gas liquid chromatography
His	Histidin
HPLC	High performance liquid chromatography
Hz	Hertz
Int.	Integral
IR	Infrarød
J	Koblingskonstant
l	Cellenlengde (optisk rotasjon)
LAPS	Lipase amano PS
$k_{kat}/K_M$	spesifisitetskonstanten, andreordens ratekonstant i reaksjon mellom enzym og substrat
Mult.	Multiplisitet (NMR)

## *Forkortelser og symboler*

---

NME	New molecular entity
NMR	Kjernemagnetisk resonansspektroskopi
Obs.	Observert
$R_f$	Retensjonsfaktor
$R_S$	Oppløsning mellom to enantiomerer på GLC/HPLC
Ser	Serin
t	Temperatur (optisk rotasjon)
TFA	Trifluoreddiksyre
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tynnsjikt-kromatografi
$t_R$	Retensjonstid i minutter (GLC/HPLC)
US FDA	The United States Food and Drug Administration
UV	Ultrafiolett
Vol %	Volumprosent
W	Halvhøydebredde i minutter på GLC/HPLC

## Omtalte forbindelser i oppgaven





# Innhold

Forord	iii
Sammendrag	v
Summary	vii
Forkortelser og symboler	ix
Omtalte forbindelser i oppgaven	xi
<b>1 Innledning</b>	<b>1</b>
1.1 Behov for enantiomert rene legemidler	1
1.1.1 $\beta$ -Blokkere	2
1.1.2 Atenolol	3
1.2 Synteseruter for byggestener til atenolol	4
1.3 Biokatalyse i organisk kjemi	6
1.3.1 Kinetisk oppløsning	7
1.3.2 Det enantiomere forholdet, $E$	8
1.3.3 Klassifisering av enzymer	10
1.3.4 <i>Candida antarctica</i> lipase B	11
1.3.5 <i>Candida antarctica</i> lipase A	13
1.3.6 Effekt av løsningsmiddel	14
1.3.7 Effekt av acyldonor	16
1.4 Analytiske metoder for bestemmelse av enantiomert overskudd	16
1.4.1 Kiral kromatografi	16
1.4.2 Polarimetri	19
<b>2 Resultater og diskusjon</b>	<b>21</b>
2.1 Organiske synteser	21
2.1.1 Syntese av 1-fenoksi-3-klor-2-propanol ( <b>1a</b> )	21
2.1.2 Syntese av 4-(3-klor-2-hydroksypropoksy)benzamid ( <b>3a</b> )	22
2.1.3 Syntese av 1-[(4-karbamoylmetyl)fenoksi]-3-klorpropan-2-ol ( <b>4a</b> )	23
2.1.4 Syntese av atenolol ( <b>6</b> )	25
2.2 Metodeutvikling for kirale kromatografianalyser	26
2.2.1 Gasskromatografi (GLC)	26
2.2.2 Væskkromatografi (HPLC)	27
2.3 Enzymkatalyserte kinetiske oppløsninger av rasemater	30
2.3.1 Omestring av <b>1a</b> med CALB	31
2.3.2 Omestring av <b>4a</b> med CALB	33
2.3.3 Oppskalering av den kinetiske oppløsningen av <b>4a</b>	39
2.3.4 Omestring av atenolol ( <b>6</b> ) med CALA	41
2.4 Karakterisering av forbindelser	43
2.4.1 Karakterisering av <b>1a</b>	43
2.4.2 Karakterisering av <b>3a</b>	44

2.4.3	Karakterisering av <b>4a</b> . . . . .	45
2.4.4	Karakterisering av <b>6</b> . . . . .	48
<b>3</b>	<b>Konklusjon</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Videre arbeid</b>	<b>53</b>
<b>5</b>	<b>Eksperimentelt</b>	<b>55</b>
5.1	Generelle metoder . . . . .	55
5.1.1	Kjemikalier og løsningsmidler . . . . .	55
5.1.2	Kromatografiske analyser . . . . .	56
5.1.3	Spektroskopiske analyser . . . . .	56
5.1.4	Øvrige analyser . . . . .	57
5.2	Organiske synteser . . . . .	58
5.2.1	Syntese av 1-fenoksy-3-klor-2-propanol ( <b>1a</b> ) . . . . .	58
5.2.2	Syntese av 4-(3-klor-2-hydroksypropoksy)benzamid ( <b>3a</b> ) . . . . .	58
5.2.3	Syntese av 1-[p-karbamoylmetyl]fenoksy]-3-klorpropan-2-ol ( <b>4a</b> ) . . . . .	58
5.2.4	Syntese av atenolol ( <b>6</b> ) . . . . .	59
5.3	Enzymkatalyserte kinetiske oppløsninger av rasemater . . . . .	60
5.3.1	Generell prosedyre . . . . .	60
5.3.2	Derivatisering av rasemiske forbindelser . . . . .	60
5.3.3	Omestring av <b>1a</b> med CALB . . . . .	60
5.3.4	Omestring av <b>4a</b> med CALB . . . . .	60
5.3.5	Omestring av atenolol ( <b>6</b> ) med CALA . . . . .	61
5.3.6	Storskala enzymkatalysert kinetisk oppløsning av <b>4a</b> med CALB . . . . .	61
5.3.7	Enzymkatalysert hydrolyse av ( <i>S</i> )- <b>5</b> med CALB . . . . .	61
	<b>Bibliografi</b>	<b>62</b>
<b>A</b>	<b>Vedlegg 1: 1a</b>	<b>III</b>
<b>B</b>	<b>Vedlegg 2: 3a</b>	<b>IX</b>
<b>C</b>	<b>Vedlegg 3: 4a</b>	<b>XV</b>
<b>D</b>	<b>Vedlegg 4: 6</b>	<b>XXI</b>



# 1. Innledning

## 1.1 Behov for enantiomert rene legemidler

Andelen av nye rasemiske legemidler, såkalte New Molecular Entities (NME), har sunket i løpet av de siste 20 årene. Dette skyldes økt kunnskap om forskjell i de biologiske egenskapene mellom to enantiomerer, samt framskritt på området asymmetrisk syntese. Mellom 1992 og 2011 har tallet på rasemiske NME godkjent av The US Food and Drug Administration (FDA), gått ned fra 21 % til 5 %. På verdensbasis ble det ikke godkjent noen nye rasemiske NME i 2011, og nærmere 70 % var enantiomert rene. Resten var akirale. I USA var tallet noe lavere, og FDA godkjente også noen rasemater. [1, 2]

Et legemiddel består av forskjellige komponenter, og virkestoffet i et legemiddel kalles *active pharmaceutical ingredient* - den aktive substansen, forkortet API. Heretter når det refereres til legemiddelet, er det API det er snakk om.

Når et eksisterende legemiddel som blir solgt som rasematet blir markedsført som den ene enantiomeren, er det skjedd en såkalt «chiral switch». Dette kan gjøres av selskapet som har patenten på rasematet, og på den måten kan de lage en ny patent. Ofte er det derimot et annet selskap som kommer med det enantiomert rene legemiddelet. Dette er på grunn av at opphavsretten ofte er på rasematet og ikke hver enantiomer. [3] Et eksempel på et legemiddel som har gjennomgått en «chiral switch» er antidepressivaen citalopram, markedsført rasemisk som Celexa®. Patenten gikk ut i 2003, men i 2002 ble den enantiomert rene versjonen (*S*)(+)-citalopram utviklet. Denne ble markedsført som Lexapro® eller Cipralax® og hadde bedre effekt og færre bivirkninger enn det rasemiske legemiddelet. [4]

Enantiomerene av kirale forbindelser har identiske kjemiske og fysikalske egenskaper, men dreier planpolarisert lys i forskjellig grad. [5] Forskjellen i biologiske egenskaper mellom to enantiomerer kan derimot variere mye. Siden menneskekroppen er satt sammen av kirale molekyler, som L-aminosyrer og D-karbohydrater, fører det til at de større strukturene av DNA og proteiner bygges opp på spesielle måter knyttet til deres stereokjemi. Bindingssteder i enzymer blir dermed også stereospesifikke og vil favorisere binding av én enantiomer framfor en annen. [6]

Den ene enantiomeren kan ha ingen eller dårlig effekt sammenlignet med den andre; den kan motvirke ønsket effekt; de to enantiomerene kan ha helt forskjellig virkning, eller den uønskede enantiomeren kan forårsake alvorlige bivirkninger. Enantiomeren som har den ønskede biologiske effekten kalles eutomerer, mens den som forårsaker

den uønskede effekten kalles distomeren. Det eudismiske forholdet er et mål på den farmakologiske effekten til eutomeren i forhold til distomeren, og dess høyere det eudismiske forholdet er, dess høyere effekt har eutomeren i forhold til distomeren. [7]

Mange legemidler er blitt solgt som rasemiske blandinger, men dette kan i beste fall ha en dårligere effekt enn dersom det hadde vært enantiomert rent, eller i verste fall ha fatale følger. Det klassiske skrekkekspelet er legemiddelet thalidomid som ble hyppig brukt av gravide kvinner på slutten av 50- og begynnelsen av 60-tallet for å motvirke kvalme, men som forårsaket alvorlige misdannelser i fostrene. I ettertid er det bevist at den kvalmedependende enantiomeren rasemiserte *in vivo*, men hendelsen satte likevel søkelyset på viktigheten av enantiomert rene medisiner. [1]

### 1.1.1 $\beta$ -Blokkere

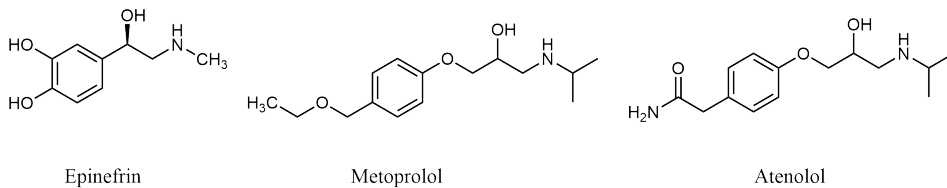
I dagens samfunn har mange i befolkningen problemer med høyt blodtrykk og andre hjerte- og karsykdommer som angina, hjertesvikt og hjerteinfarkt. [8, 9] I tillegg til dette finnes også psykiske lidelser som angst, som kan gi utslag i fysiske symptomer som hjertebank, kaldsvetting og skjjelving. Alle disse symptomene skyldes at  $\beta$ -adrenergiske reseptorer i hjertet og lungene stimuleres av katekolaminer, nærmere bestemt norepinefrin og epinefrin. Når epinefrin binder seg til  $\beta_1$ -reseptorene i hjertet vil man oppleve økt hjerterytme, høyere slagvolum og følgelig forhøyet blodtrykk. [10]

Spesielt er høyt blodtrykk utbredt blant befolkningen. I 2009 hadde 59 % av befolkningen i Norge over 40 år forhøyet blodtrykk, det vil si over 140/90 (systolisk trykk over diastolisk trykk, målt i mm Hg). [11, 12] Høyt blodtrykk er farefylt i og med at det ikke gir noen merkbare symptomer, men over tid vil man være mer utsatt for hjerteinfarkt, hjertesvikt, slag og nyresykdommer. Når blodtrykket er høyere, må ventriklene i hjertet jobbe hardere for å pumpe ut mer blod. Dette kan føre til at hjerteveggen vokser, som øker risikoen for hjertesvikt og farlige arytmier. I tillegg kan høyt blodtrykk skade blodårer i hjernen som igjen kan føre til slag. Man vil også være mer utsatt for åreforkalkning med høyt blodtrykk, som i seg selv er en risikofaktor for hjerte- og karsykdommer.

Sannsynligheten for å utvikle høyt blodtrykk øker med alderen. I tillegg spiller livsstilsfaktorer som overvekt, inaktivitet og kosthold inn. Mange med høyt blodtrykk kan redusere blodtrykket ved å gå ned i vekt, spise mindre salt og være fysisk aktive, men mye skyldes også genetisk predisposisjon, og derfor er det for mange

nødvendig å innta medisiner. [10] En type medisin som er benyttet i lang tid som blodtrykksmedisin, er  $\beta$ -blokkere.

$\beta$ -Blokkere er en type medisin som blokkerer de  $\beta$ -adreneriske reseptorene. De har en kjemisk struktur som ligner på katekolaminene, og vil dermed konkurrere mot dem om å binde seg til  $\beta$ -reseptoren. [13] Figur 1.1 viser strukturene til epinefrin og  $\beta$ -blokkerene metoprolol og atenolol. Når  $\beta$ -blokkeren er bundet til den andreneriske reseptoren, vil symptomer som høyt blodtrykk og hjertebank avta og hjertet må jobbe mindre for å pumpe blod ut i kroppen. [10]  $\beta$ -Blokkere har dermed ofte blitt brukt av pasienter med høyt blodtrykk, angina, hjertesvikt og pasienter som har hatt hjerteinfarkt.



Figur 1.1: Katekolaminet epinefrin og betablokkerne metoprolol og atenolol.

Til tross for den økte etterspørselen etter enantiomert rene legemidler er det fremdeles legemidler som selges som rasematet, og  $\beta$ -blokkere er en slik type medisin. I 2010 var det fortsatt en overvekt av  $\beta$ -blokkere som ble solgt som rasematet, til tross for at hovedsakelig er *S*-enantiomeren som gir ønsket effekt. [14]

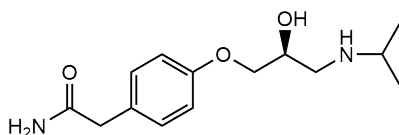
### 1.1.2 Atenolol

Atenolol er en kardioselektiv  $\beta$ -blokker, det vil si at den er selektiv mot  $\beta_1$ -reseptorer som finnes i hjertet. Høyere doser kan likevel gi bivirkninger som pustevansker, ettersom det også finnes  $\beta_1$ -reseptorer i lungene, og ved høyere doser vil selektiviteten avta og  $\beta$ -blokkeren vil også kunne reagere med  $\beta_2$ -reseptorer som finnes i lungene.

I lang tid har atenolol vært et populært valg når det gjelder behandling av høyt blodtrykk, men har blitt mer kontroversiell i de siste årene. [15] Studier viser at legemiddelet fungerer ikke nødvendigvis bra som blodtrykksmedisin [16, 17]. Atenolol brukes ved angina og etter hjerteinfarkt, [18] men sammenlignet med andre  $\beta$ -blokkere vil den ikke motvirke hjertedød. [16] En grunn til at atenolol ikke fungerer like bra som andre  $\beta$ -blokkere kan være dens høye vannløselighet, og at den

dermed ikke kan gå inn i sentralnervesystemet, som tar opp fettløselige forbindelser. I tillegg har atenolol mindre effekt på blodtrykket i aorta, i forhold til blodtrykket i arteriene. Det er førstnevnte som gir større risiko for hjerte- og karsykdommer. [19]

Atenolol blir solgt både enantiomert rent som *S*-enantiomeren under blant annet navnet Atpure®, og rasemisk under blant annet navnet Mylan®, men det har vist seg at kun *S*-enantiomeren, som vist i Figur 1.2 har ønsket effekt. [20] Dette gjelder også for de øvrige  $\beta$ -blokkerne. Enkelte av *R*-enantiomerene kan til og med ha uønskede effekter, i stedet for ingen effekt i det hele tatt. [14, 21]

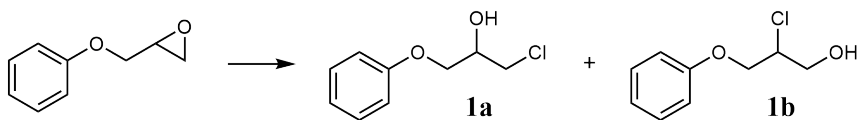


Figur 1.2: Strukturen av (*S*)-atenolol.

## 1.2 Synteseruter for byggestener til atenolol

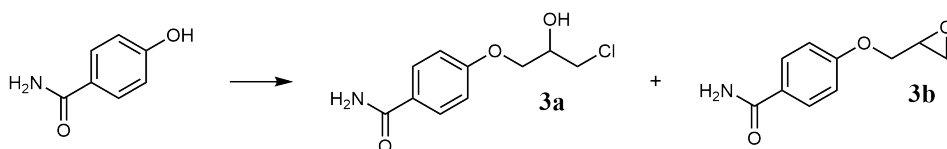
Fokuset i dette prosjektet var blant annet å syntetisere byggestener til (*S*)-atenolol og lignende derivater ved hjelp av biokatalyse. Metodene vil sannsynligvis også kunne være overførbare til andre lignende  $\beta$ -blokkere, som for eksempel metoprolol vist i Figur 1.1, som også blir arbeidet med i forskningsgruppen. [22]

Syntesen av **1a** er en epoksidåpning med konsentrert saltsyre der biproduktet **1b** dannes som vist i Skjema 1.1. Ved ringåpning med et hydrogenhalid vil halogenet i størst grad angripe på minst substituert karbon som vil resultere i **1a**, men angrep på mest substituert karbon kan også forekomme. [23]

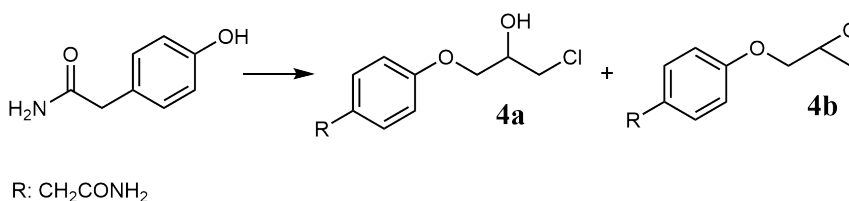


Skjema 1.1: Synteserute for forbindelsen **1a** med biproduktet **1b**.

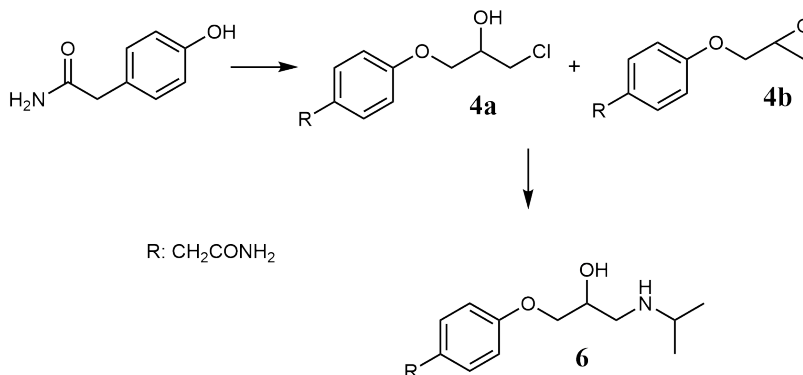
Syntesen av **3a** er en  $S_N2$ -reaksjon med 4-hydroksybenzamid som nukleofil og epiklorhydrin som elektrofil. Dette danner **3a** og biproduktet **3b** som vist i Skjema 1.2. Alkoholen **3a** kan dannes ved epoksidåpning av **3b**.

Skjema 1.2: Synteserute for forbindelsen **3a**.

Syntesen av **4a** er tilsvarende syntesen av **3a** og vises i Skjema 1.3. Nukleofilen er 4-hydroksyfenylacetamid. Epoksidåpningen av biproduktet **4b** skjer tilsvarende åpningen av **3b**.

Skjema 1.3: Synteserute for forbindelsen **4a**.

Rasemisk atenolol **6** kan syntetiseres ved epoksidåpning av **4b** og substitusjon av **4a** med isopropylamin som vist i Skjema 1.4.

Skjema 1.4: Synteserute for forbindelsen **6**.

(*S*)-Atenolol vil kunne syntetiseres ved å reagere (*R*)-**4a** med isopropylamin.

Tidligere er (*S*)-atenolol blitt syntetisert ved hjelp av koboltkatalysator [24]. Lege-middelfirmaet Emcure patenterte i 2006 en metode for produksjon av (*S*)-atenolol

ved å reagere med optisk aktiv epiklorhydrin. [25] Det er ønskelig å finne en metode for å syntetisere enantiomert ren (*S*)-atenolol som er mer skånsom og miljøvennlig, med enzym som katalysator. I tillegg er det ønskelig å studere mekanistiske trekk i reaksjonen.

(*S*)-Atenolol kan også syntetiseres ved hjelp av biokatalyse. Bevinakatti *et. al* syntetiserte i 1992 (*S*)-atenolol ved hjelp av enzymet *Pseudomonas cepacia* lipase amano PS (LAPS). De syntetiserte også **4a** på tilsvarende metode som i dette prosjektet. [26] Dwivedee *et. al* rapporterte i 2015 ringåpningen av **4b** med acetylklorid i metanol og vann. Videre syntetiserte de (*S*)-atenolol ved hjelp av enzymet *Candida antarctica* lipase A. [27] Det er også tidligere syntetisert (*S*)-atenolol med enantiomert overskudd på 96 % [28] og 94 % [29] ved oppløsning av rasemisk atenolol ved biokatalyse.

### 1.3 Biokatalyse i organisk kjemi

På grunn av den økte etterspørselen av enantiomert rene legemidler og andre biologisk aktive forbindelser er det nødvendig å finne enkle og effektive metoder for å syntetisere enantiomert rene forbindelser. En måte å oppnå dette er ved bruk enantiomert rene startmaterialer, som aminosyrer og karbohydrater - den såkalte «chiral pool». [5] Denne metoden var svært populær på 1990-tallet, og størsteparten av av legemidlene ble syntetisert fra kirale byggestener. I nyere tid er det derimot blitt benyttet mindre og mindre, og andre syntesemetoder blir benyttet hyppigere. [30] Ved å bruke organometalliske katalysatorer vil man også kunne få enantiomert anrikede forbindelser, men dette er ikke en ønskelig katalysator i medisinsk kjemi. [1]

Det europeiske kjemikaliebyrået (ECHA) opprettet i 2006, stiller strengere krav til import, produksjon, bruk og utslipp av kjemikalier, for å øke beskyttelsen av helse og miljø. [31] Derfor er det søkelyset satt på å finne miljøvennlige og skånsomme metoder for syntese av enantiomert rene forbindelser. Grønn kjemi tar hensyn til nettopp dette, og innebærer blant annet forebygging av utslipp, bruk av trygge kjemikalier og løsningsmidler, bruk av katalysatorer, nedbrytbarhet og gjenvinning. [32]

Enzymer er milde, skånsomme og effektive katalysatorer som oppfyller flere av kravene for å kunne benyttes i grønn kjemi. [33] Alle biokjemiske reaksjoner som finner sted i kroppen katalyseres av enzymer, og kjemiske prosesser der enzymer brukes som katalysatorer kalles biokatalyse. Siden byggestenene til enzymer, aminosyrene,

alltid forekommer naturlig i én enantiomer form, er enzymene også kirale, og vil foretrekke én enantiomer framfor den andre. Dermed vil man kunne syntetisere enantiomert rene stoffer ved hjelp av enzymer.

Historisk er enzymer blitt brukt i forbindelse med ølbrygging, ysting og brødbaking, men enzymer er i dag hyppig brukt i industrien. De tilsettes blant annet i mel for å forbedre det endelige bakverket i form av skorpestruktur og ferskhet, og i fruktjus for å oppnå høyere fruktkonsentrasjon i juskonsentratet. Enzymer er også mye brukt i vaskemidler, og kan gjøre det mulig å fjerne fettflekker også ved lavere temperaturer. Øvrig bruk av enzymer i industrien er blant annet i dyrefôr, tekstilproduksjon og papirproduksjon. [34]

Enzymer kan være fordelaktige å bruke blant annet av miljøhensyn; siden enzymer isoleres fra naturlige kilder, er de fullstendig nedbrytbare i naturen. De kan også brukes under milde betingelser; lavere temperaturer ned mot 30 °C, og nøytral pH, og fungerer i organiske løsningsmidler så vel som vanndige. De er svært enantioselektive. Enzymer kan katalysere nesten alle typer organiske reaksjoner: Hydrolyser; oksidasjon-reduksjon; addisjon-eliminasjoner; og halogenering- og dehalogenering av en rekke forskjellige forbindelser. I tillegg kan enzymet enkelt vaskes og brukes igjen etter endt reaksjon. [1, 35, 36]

Også av økonomiske hensyn kan biokatalyse være overlegent andre typer reaksjoner. Ofte kan flere reaksjonstrinn utelates i forhold til tradisjonelle prosesser, og man slipper kraftig oppvarming. Færre reaksjonstrinn fører også til mindre avfall, noe som igjen bidrar til miljøvennligheten.

Med biokatalyse kan man kan man syntetisere enantiomert rene forbindelser ved asymmetrisk syntese av prokirale stoffer; på den måten vil man kunne få 100 % av én enantiomer. Den andre metoden er ved kinetisk oppløsning av en rasemisk blanding av to enantiomerer.

### **1.3.1 Kinetisk oppløsning**

En kinetisk oppløsning er en reaksjon av en rasemisk blanding der den ene enantiomeren reagerer vesentlig raskere enn den andre. [37]

Enzymer kan brukes som katalysatorer i kinetisk oppløsning, da de vil binde og der ved katalysere transformasjonen av én enantiomer framfor den andre. Ved kinetisk oppløsning med enzymer tilsettes ofte en ester i reaksjonsblandingen, og enzymet katalyserer omestring av den enantiomeren som bindes lettest til enzymet. Det ideelle er om enzymet har så høy affinitet for den ene enantiomeren og ingen for den

andre, at kun esteren av den ene enantiomeren blir dannet. Dette er imidlertid ikke normalen, og det vil som regel dannes litt av den uønskede enantiomeren også, når det blir mindre igjen av den gode enantiomeren.

For å finne ut hvor mye man har av sin ønskede enantiomer, kan man regne ut det enantiomere overskuddet. Det enantiomere overskuddet,  $ee$ , er et uttrykk for hvor mye man har av den ønskede enantiomeren i forhold til den uønskede. Det enantiomere overskuddet kan regnes ut ved hjelp av Ligning 1.1.

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \cdot 100\% \quad (1.1)$$

Her er  $ee$  det enantiomere overskuddet,  $R$  er arealet til enantiomeren i overskudd og  $S$  er arealet til enantiomeren i underskudd.

For å finne mengde omdannet av de to enantiomerene kan man analysere reaksjonsblandingen med gass- eller væskechromatografi. Arealet til toppene på kromatogrammet brukes til å finne det enantiomere overskuddet.

Dersom enzymet er selektivt vil reaksjonen stoppe av seg selv når omsetningen er 50%. Siden kun den ene enantiomeren er ønsket, er det ikke mulig å oppnå høyere utbytte av denne enn 50%. [35]

### 1.3.2 Det enantiomere forholdet, $E$

Den andreordens ratekonstanten i en reaksjon mellom et enzym og et substrat, kalles spesifisitetetskonstanten og kan uttrykkes med  $k_{kat}/K_M$ . Det enantiomere forholdet,  $E$ , forteller om hvor enantioselektivt et enzym er.  $E$  er basert på forholdet mellom spesifisitetetskonstantene til de to enantiomerene, og vises i Ligning 1.2. [35, 38]

$$E = \frac{k_{sp}^R}{k_{sp}^S} = \frac{(k_{kat}/K_M)^R}{(k_{kat}/K_M)^S} \quad (1.2)$$

Her er  $k_{sp}^R$  og  $k_{sp}^S$  spesifisitetetskonstantene til henholdsvis  $R$ - og  $S$ -enantiomerene til substratet.

Det enantiomere forholdet kan knyttes til omdannelsen i reaksjonen og det enantiomere overskuddet av henholdsvis produktet og substratet. Ligningene 1.3 og 1.4 viser en måte å regne ut det enantiomere forholdet.



$$E = \frac{\ln[1 - c(1 + ee_P)]}{\ln[1 - c(1 - ee_P)]} \quad (1.3)$$

$$E = \frac{\ln[1 - c(1 - ee_S)]}{\ln[1 - c(1 + ee_S)]} \quad (1.4)$$

Her er  $ee_P$  enantiomert overskudd av produkt,  $ee_S$  er enantiomert overskudd av substrat, og  $c$  omsetningen. Omsetningen kan regnes ut i fra de enantiomere overskuddene ved hjelp av ligning 1.5.

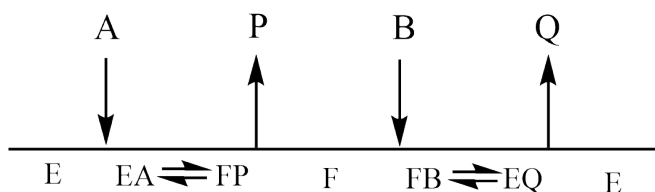
$$c = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P} \quad (1.5)$$

Ligningene 1.3 og 1.4 er i midlertid ikke pålitelige for svært lav eller høy omsetning, da det er større sannsynlighet for analysefeil. Det er bedre å bruke ligning 1.6, da denne tar kun i bruk relative verdier

$$E = \frac{\ln \frac{[ee_P(1 - ee_S)]}{(ee_P + ee_S)}}{\ln \frac{[ee_P(1 + ee_S)]}{(ee_P + ee_S)}} \quad (1.6)$$

Her er  $ee_S$  det enantiomere overskudd av substratet og  $ee_P$  er det enantiomere overskudd av produktet.

Ligningen 1.6 fungerer godt dersom det kun dannes ett produkt, og beskriver en såkalt «uni uni»-reaksjon. I en omestringsreaksjon med en acyldonor, derimot, dannes det et produkt mellom addisjonen av to substrater. Dette er en «bi-bi»-reaksjon som følger en ping-pong-mekanisme, og systemet vises i Figur 1.3. For reaksjonsmekanismen, se Skjema 1.5.



Figur 1.3: Ping-pong bi-bi mekanismen. E=fritt enzym; EA=enzym-substrat kompleks; FP=enzym-produkt kompleks; F=acylenzym; FB=acylenzym-substrat kompleks; EQ=enzym-produkt kompleks; A og B=substrater; P og Q=produkter. [39]

Selv om ligningene 1.3, 1.4 og 1.6 gjelder for uni-uni-mekanismer, antas det at de fortsatt kan brukes for forestringer med CALB som antas å følge en ping pong bi-bi mekanisme. Hvis  $E$  er under 100 vil eventuelle feil i utregningene være neglisjerbare. [40]

For å regne ut  $E$  i ping-pong bi-bi-mekanismen kan man også benytte seg av programmet *E & K calculator*. Der kan  $E$  regnes ut ved hjelp av  $ee_S$  og  $ee_P$  bestemt fra blant annet GC- og HPLC-analyser. [41]

### 1.3.3 Klassifisering av enzymer

Enzymene deles inn i seks undergrupper etter hva slags reaksjoner de katalyserer. De forskjellige klassene enzymer og hva de katalyserer vises i Tabell 1.1.

Tabell 1.1: Klassifisering av enzymer etter hva slags reaksjoner de katalyserer.

<b>Enzymklasse</b>	<b>Reaksjonstype</b>
Oksidoreduktaser	Oksidasjon-reduksjon
Transferaser	Overføring av aldehyd-, keton- acylgrupper m.m.
Hydrolaser	Hydrolysedannelse av estere, amider, laktoner m.m.
Lyaser	Addisjon-eliminering av små molekyler på dobbeltbindinger
Isomeraser	Isomeriseringer som rasemisering og epimerisering
Ligaser	Dannelse-kløyving av C-O, C-S, C-N og C-C-bindinger

Av de forskjellige enzymklassene er det hydrolasene som er hyppigst brukt. [35] Disse kan igjen deles inn i underklassene proteaser, esteraser og lipaser. Disse enzymerne kan katalysere reaksjoner som involverer hydrolyse eller dannelse av ester- og amid-bindinger. De er ofte brukt i industrien av forskjellige grunner; blant annet slipper man bruk av kofaktorer, som kan være svært kostbare; i tillegg er enzymene ikke selektive mot ett spesifikt substrat, men heller mot den funksjonelle gruppen. Derfor blir de anvendelige og kostnadseffektive.

Lipaser skiller seg fra de andre hydrolasene i at de ikke følger Michaelis Menten-kinetik. Normalt vil enzymet vise høyere aktivitet når konsentrasjonen av substratet øker. Lipaser, derimot, viser nærmest ingen aktivitet så lenge substratet er løst. En sterk økning i aktivitet finner sted når substratkonsentrasjonen øker utover dets løselighet; punktet der lipasen får denne økningen i aktivitet kalles kritisk micelle-konsentrasjon, eller CMC. [42]

Fenomenet kalles *interfacial activation*: Den løste lipasen foreligger i en inaktiv tilstand så lenge den ikke har kontakt med en vann-lipid-kontaktflate. Når enzymet

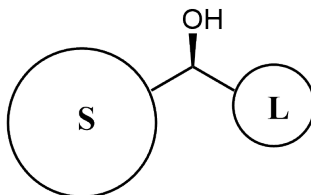
kommer i kontakt med denne kontaktflaten foldes en liten del av enzymet, en kort  $\alpha$ -heliks, tilbake, og lipasens aktive sted blottlegges. Dette gjelder imidlertid ikke alle lipaser. [43]

#### 1.3.4 *Candida antarctica* lipase B

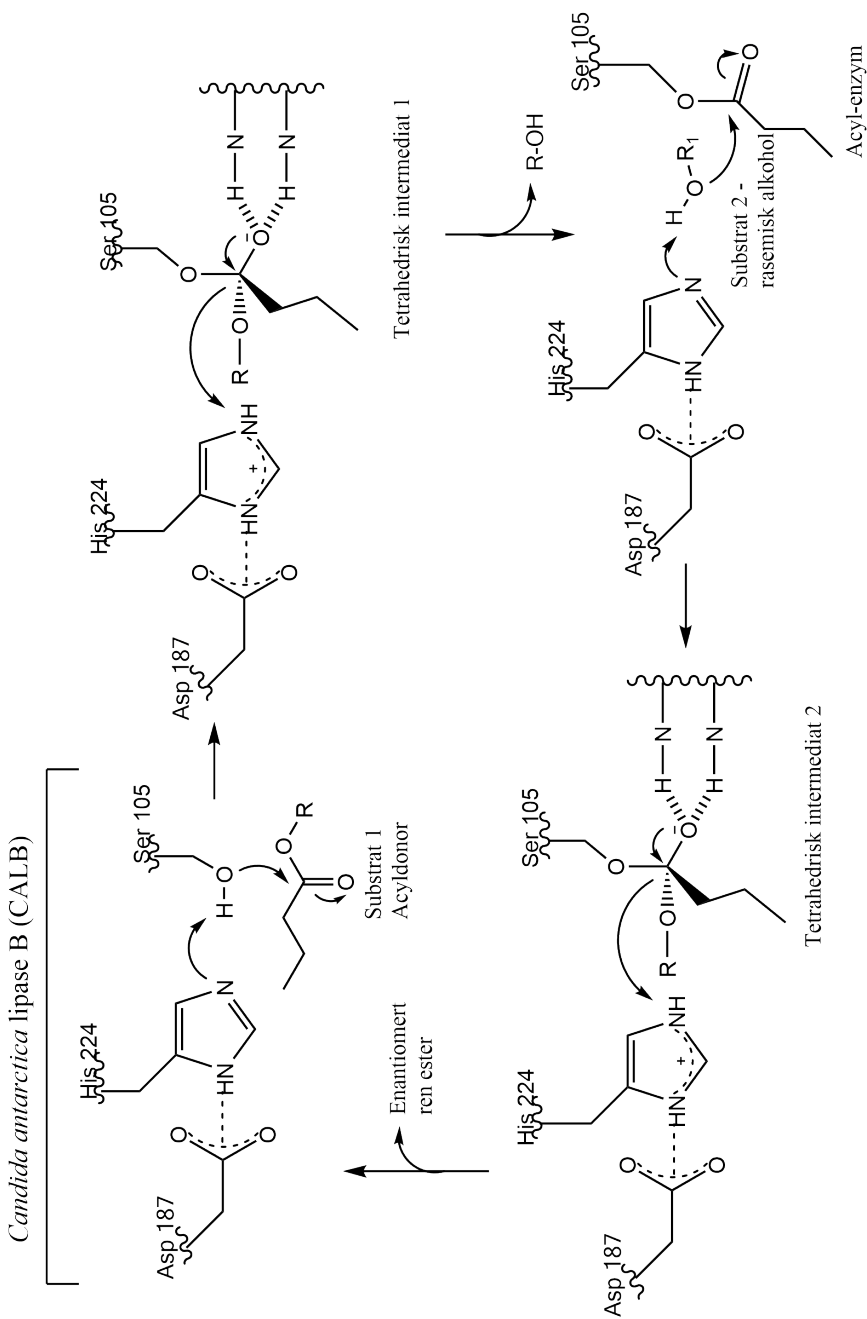
*Candida antarctica* lipase B, heretter kalt CALB, en serin hydrolase, er isolert fra den antarktiske gjærsoppen *Candida antarctica*. Enzymet er kjent for å være meget enantioselektivt og robust, samt ha en høy katalytisk aktivitet. Enzymet består av 317 aminosyrerester og den katalytiske aktiviteten bestemmes av en katalytisk triade av serin, histidin og aspartat. [44] Ved omestring følger den en såkalt ping-pong bi-bi-mekanisme, eller serin-hydrolase-mekanismen som sett i Skjema 1.5. [35, 45]

Strukturstudier av CALB viser et lite  $\alpha$ -heliks-lokk som ligger over inngangen til det aktive stedet, men lipasen viser ingen tegn til *interfacial activation*. Den trange inngangen til det aktive stedet samt mangelen på lokket som dekker for det aktive stedet, er trolig grunnen til den høye selektiviteten til CALB. [46, 47]

CALB har vist seg å være svært selektiv overfor sekundære alkoholer med en stor og en liten gruppe bundet til stereosenteret, av typen vist i Figur 1.4. [48] Gitt at den store gruppen har høyere prioritet enn den lille i henhold til IUPACs navngivningsregler, vil *R*-enantiomeren reagere raskest. Jacobsen *et. al* oppdaget at enantioselektiviteten gikk ned med økende lengde på karbonkjede på den lille gruppen. Den høyeste selektiviteten ble observert med en kjede på to karbonatomer, og sank dramatisk med kjeder med tre og fire karbonatomer. [49]

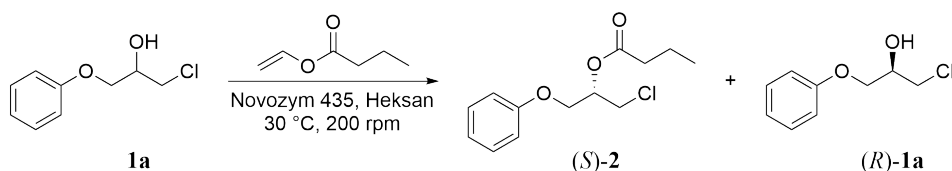


Figur 1.4: En sekundær alkohol med en stor og en liten gruppe bundet til stereosenteret. Her står «S» for stor gruppe og «L» for liten gruppe.



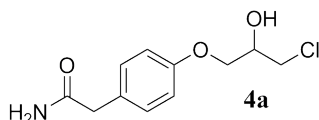
Skjema 1.5: Serin hydrolase-mekanismen [45]

Det er tidligere gjort kinetisk oppløsning på forbindelsen **1a** som vist i Skjema 1.6 med en *E*-verdi på 11 ved bruk av CALB som katalysator. [50] Under forhold med kontrollert vannaktivitet i løsningsmiddelet ble det oppnådd en *E*-verdi på 23. [51] Det ble antatt at forbindelsen **3a**, som vist i Figur 1.5, ville vise seg å være et godt substrat for CALB. Her er den lille gruppen lik som i Skjema 1.6, mens den store gruppen har en ekstra substituent. Lystvet *et. al* fikk svært gode resultater *E*-verdi >200 ved omestringen av en forbindelse med en stor substituent på den store gruppen [52]; mens Fuglseth *et. al* oppnådde lav omsetning og *E*-verdi med to mindre substituenten på den store gruppen. [53]



Skjema 1.6: Omestring av **1a**.

Jacobsen *et. al* oppdaget at dersom man beregner *E*-verdien for hvert enkelt analysepunkt i en omestring med CALB for forbindelser som **1a**, så synker den med økende omsetning. Ved tilsats av enantiomert ren beslektede *R*-alkoholer ble det observert en sterk økning i *E*-verdi. Ved hydrolyse økte *E*-verdien ved økende omsetning. [54, 55] Det var ønskelig å undersøke hvordan CALB oppførte seg med substratet **4a**.



Figur 1.5: Forbindelsen **4a** som det ble antatt kunne oppløses med CALB som katalysator.

CALB brukes i syntesen av byggestener til legemidler, blant annet kreftmedisiner, [56] og anti-innflammatoriske medisiner [57].

### 1.3.5 *Candida antarctica* lipase A

*Candida antarctica* lipase A, heretter kalt CALA er isolert fra den samme gjærsoppen som CALB, men de to har forskjellige egenskaper. I likhet med CALB reagerer

den etter mekanismen i Skjema 1.5. CALA kan også katalysere omestring av enkelte sekundære alkoholer på lik linje med CALB, og har god plass til å binde alkoholer. På de sekundære alkoholer der den lille gruppen er liten, fungerer den derimot ikke så bra. [58, 59]

I motsetning til CALB viser CALA grader av *interfacial activation*. [47] Det aktive stedet til CALA består av to fordypninger for substratene; én for for acylgrupper, og én for nukleofilen, eller alkoholen. Der CALB har god plass til acylgrupper og mindre plass til alkoholer, har CALA god plass til alkoholer men mindre plass til acylgruppen. [59] Lipasen har derfor en preferanse for acylgrupper med lange, rette karbonkjeder, og aksepterer mange forskjellige typer alkoholer og aminer. [60] Den kan til og med katalysere omestring av tertiære alkoholer. [61]

Ettersom CALA kan omestrene sekundære alkoholer med større grupper, ble det antatt at den også ville kunne brukes i en kinetisk oppløsning av atenolol. Atenolol har den samme store gruppen som **4a**, men den lille gruppen er en del større.

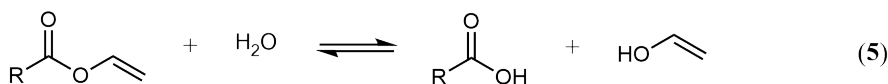
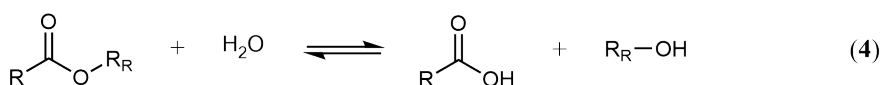
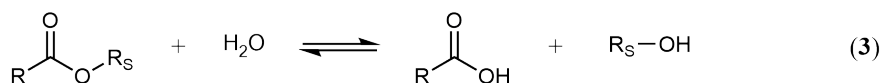
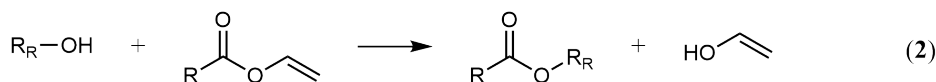
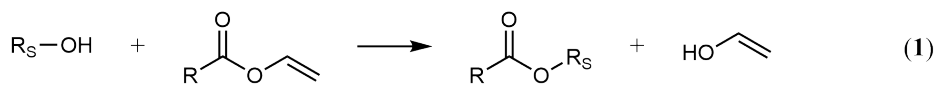
Dwivedee *et. al* rapporterte suksess CALA i omestringen av **4a** med  $E$ -verdi på 142. [27] På grunnlag av strukturen til **4a** og tidligere resultater oppnådd med CALB som katalysator ble det antatt at CALB ville fungere bedre som katalysator enn CALA i omestringen av **4a**. [50, 51]

### 1.3.6 Effekt av løsningsmiddel

Det finnes en del parametre som kan påvirke aktiviteten til et enzym, og valg av løsningsmiddel er én av dem. I de mest ekstreme tilfellene kan enzymet endre substratpreferanse i forskjellige løsningsmidler. [62] Generelt kan man si at enzymet har høyest aktivitet i svært upolare løsningsmidler som heksan, og lavest aktivitet i polare løsningsmidler. [63] Det enantiomere forholdet blir derimot høyere i løsningsmidler der enzymet har lavere aktivitet. [64]

Vanninnhold i løsningsmiddelet har også noe å si for reaksjonshastigheten og aktiviteten til enzymet. Høyere vanninnhold i løsningsmiddelet vil gjøre at reaksjonshastigheten avtar, men at enantioselektiviteten ikke nødvendigvis blir dårligere. I polare løsningsmidler kan høy vannaktivitet føre til at reaksjonen stopper opp ved svært lav omsetning. Dette er på grunn av at de i utgangspunktet irreversible reaksjonene kan reverseres og både dannede estere og acyldonorer kan hydrolyseres, se Skjema 1.7. I helt tørre løsningsmidler vil kun reaksjon 1 og 2 skje, men dersom vann er tilstede i større grad kan også de reversible reaksjonene finne sted, og reaksjonen vil stoppe opp. Polare løsningsmidler trenger et høyere vanninnhold for

å oppnå samme vannaktivitet som upolare, fordi de løser vann mye bedre enn de upolare. [51]



Skjema 1.7: Likevekter i en omestingsreaksjon. [51]

For å finne ut nøyaktig vanninnhold i løsningsmiddelet kan man bruke et coloumeter og bestemme vanninnholdet med Karl Fisher-metoden. [51] I dette prosjektet er det ikke blitt målt vanninnhold i løsningsmiddelet, men der det har vært mulig er det blitt brukt tørre løsningsmidler som i tillegg er tilsatt molekylærsiev.

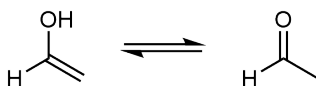
Simuleringer er blitt gjort av effekten av forskjellige løsningsmidler på CALB. Disse viste at CALB har en gjennomgående stabil konformasjon i både polare og upolare løsningsmidler. Det som derimot kan påvirkes av løsningsmiddelet, er det aktive stedet. Polare molekyler kan ha innvirkning på konformasjonen til det aktive stedet og blant annet ødelegge interaksjoner mellom den katalytiske triaden, da spesifikt Ser<sup>105</sup> og His<sup>224</sup>. [44]

Dwivedee *et. al* rapporterte kinetiske oppløsninger av **4a** i en rekke løsningsmidler og med forskjellige enzymer. For å få løst **4a** brukte de et ionisk løsningsmiddel, [EMIM]BF<sub>4</sub> med konvensjonelle løsningsmidler som kosolvent. Med acetonitril skjedde ingen reaksjon, og det beste løsningsmiddelet var toluen. [27] Tidligere har problemet med omestringen av **4a** vært nettopp dens mangel på løselighet i løsningsmidler egnet for enzymkatalyse, og man må ha benyttet alternative metoder. [26]

### 1.3.7 Effekt av acyldonor

Valg av acyldonor vil også ha mulighet til å påvirke aktiviteten til enzymet. Som sett i Skjema 1.7, vil reaksjonen være irreversibel i vannfritt miljø dersom en bruker vinylestere som acyldonorer. Ved bruk av andre estere vil det kunne skje reversible reaksjoner. Jacobsen *et. al* oppnådde likevel høye E-verdier ved bruk av halogenerte acyldonorer, men reaksjonen gikk da svært langsomt. [49]

En annen fordel ved bruk av vinylestere er tautomerisering av den utgående vinylalkoholen vist i Skjema 1.8. Tautomerisering av vinylestere gir acetaldehyd som damper av ved romtemperatur. Derfor blir opparbeidelsen også enklere.



Skjema 1.8: Tautomerisering av utgående vinylalkohol i en omestringsreaksjon.

## 1.4 Analytiske metoder for bestemmelse av enantiomert overskudd

### 1.4.1 Kiral kromatografi

Kiral gass- og væskkromatografi brukes for å bestemme verdiene  $ee_S$  og  $ee_P$  slik at man kan beregne det enantiomere forholdet.

Enantiomerene vil presenteres på kromatogrammet som to toppar. For at man skal kunne regne ut det enantiomere forholdet er det viktig at de to toppene har baselinjeseparasjon; hvis ikke de har det, er det for mye usikkerhet knyttet til resultatene. Ved å bruke ligning 1.7 kan oppløsningen i kirale kolonner beregnes. [65]

$$R_S = \frac{1,177(t_{R2} - t_{R1})}{W_1 + W_2} \quad (1.7)$$

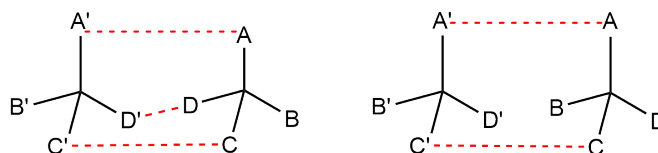
Her er  $R_S$  oppløsningen;  $t_{R1}$  og  $t_{R2}$  er retensjonstidene i minutter; og  $W_1$  og  $W_2$  er halvhøydebreddene i minutter. For å ha baselinjeseparasjon må oppløsningen være 1,50 eller høyere.

For å kunne separere enantiomerer med kiral kromatografi er det nødvendig å ha et kiralt miljø i form av kirale molekyler enten i mobil- eller stasjonærfasen. [66]



Forskjellige typer kirale forbindelser er blitt brukt til dette og inkluderer blant annet kron-etere, syklodekstriner og polysakkarider.

Separasjonsmekanismen baserer seg på forskjellene i interaksjonen mellom den kirale selektoren i stasjonærfasen og enantiomerene i prøven. Den stereoselektive interaksjonen kan baseres på flere typer interaksjoner som  $\pi - \pi$ -interaksjoner, kompleksering, dipol-stabling, hydrofobiske og steriske interaksjoner. [67] For at det skal kunne skje en separasjon, må den kirale selektoren i stasjonærfasen ha kontakt med den ene enantiomeren på tre punkter. [68] Dette kalles «the three-point interaction model», eller tre-punkts interaksjonsmodellen. Modellen er vist i Figur 1.6. [69]



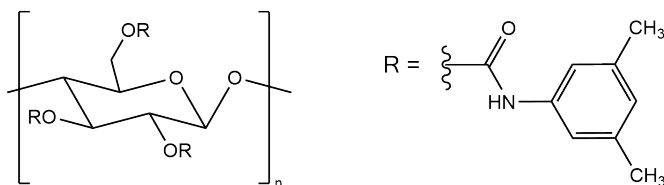
Figur 1.6: Tre-punkts interaksjonsmodellen. Den kirale selektoren har kontakt med den ene enantiomeren på tre punkter, mens den andre har kun kontakt på to punkter, og vil dermed få en annen retensjonstid på den kirale stasjonærfasen. [69]

Den sterkere interaksjonen mellom den ene enantiomeren og den kirale selektoren, legger til grunn den kirale separasjonen. [70]

### Kiral væskechromatografi (HPLC)

Polysakkarider er hyppig brukt som stasjonærfaser i kiral HPLC og derivater av polysakkaridene amylose og cellulose er populære valg på grunn av god separasjon av mange forskjellige typer kirale molekyler. [71] Nesten alle polysakkarider som finnes i naturen er kirale og optisk aktive, og de har ofte en høyere ordens struktur som kommer fra deres kiralitet. Denne asymmetriske strukturen har spor som ligger til grunn for den kirale separasjonen.

I denne oppgaven er det brukt en Chiralcel OD-H kolonne. Her er stasjonærfasen en cellulose, nærmere bestemt cellulose tris(3,5-dimetylfenylkarbammat), belagt på silikagel. Strukturen vises i Figur 1.7.



Figur 1.7: Stasjonærfasen til Chiralcel OD-H kolonnen, cellulose tris(3,5-dimetylfenylkarbammat). Stasjonærfasen er belagt på 5  $\mu\text{m}$  silikagel.

I denne stasjonærfasen er hovedstedene for binding de polare karbamatgruppene. Disse kan innvirke på rasemiske forbindelser via hydrogenbinding gjennom amino- og karbonylgruppen, og dipol-dipol-interaksjoner på karbonylgruppen. [71]

Chiralcel OD-H kolonnen passer bra til separasjon av alkaloider, tropiner, aminer og  $\beta$ -blokkere. Den er derfor en effektiv kolonne for forbindelsene i denne oppgaven.

### Kiral gass-væskekromatografi (GLC)

Dersom det er mulig, bør gasskromatografi benyttes for separasjon av kirale forbindelser. Metoden er sensitiv og enkel og bruke og den påvirkes heller ikke av urenheter. [5] Kiral gasskromatografi kan brukes for termisk stabile og flyktige forbindelser. Ettersom kirale kolonner ikke nødvendigvis tåler like høye temperaturer som akirale kolonner, og en vil ha problemer med å separere en stor, polar forbindelse med høyt smelte- og kokepunkt.

En vanlig stasjonærfase i gasskromatografi er syklodekstrinderivater. Syklodekstriner er naturlige makrosykliske oligosakkarider med seks, sju eller åtte D-glukosemonomerer som er forbundet via  $\alpha$ -(1,4)-bindinger. Glukoseringene er satt sammen som en hul kjegle med et hydrofobisk indre og et polart ytre, der hydroksylgruppene peker ut. Derivatisering av hydroksylgruppene kan endre egenskapene til syklodekstrinene og man kan få et bredere utvalg av kirale separasjoner. [70]

Syklodekstrinderivatene er ofte kjemisk bundet til, eller løst opp i, en poly(siloksan)-stasjonærfase. I Chirasil-Dex-kolonnen, som er benyttet i dette prosjektet, er syklodekstrinderivatet innlemmet i en poly(dimetylsiloksan)-polymer som er termisk immobilisert. Immobilisering har flere fordeler som økt effektivitet, inerthet, bedre kompatibilitet med injeksjonsteknikker og mye mer.

Syklodekstrinderivatene kan separere en rekke enantiomerer som blant annet alkoholer, aminer, epoksider, karboksylsyrer, estere og etere. Mange av disse er vans-

kelige og noen umulige å separere på andre måter. Gasskromatografi er dermed «gullstandarden» når det gjelder kiral separasjon. [70]

### 1.4.2 Polarimetri

En måte å bestemme det enantiomere overskuddet til en forbindelse, er ved hjelp av optisk rotasjon. En forbindelse som ikke er rasemisk kan beskrives som optisk aktiv, og kan dreie planpolarisert lys.

Målingen foregår under standardiserte betingelser; bølgelengden til lyset, temperaturen, løsningsmiddelet og konsentrasjonen til prøven er kjent. Prøven løses i et akiralt løsningsmiddel og plasseres i en celle med kjent lengde. Belysningen av går gjennom prøven og lyset dreies. Den spesifikke rotasjonen kan regnes ut ved hjelp av ligning 1.8:

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{100 \cdot \alpha'}{l \cdot c} \quad (1.8)$$

Her er  $\alpha'$  den observerte rotasjonen;  $l$  er cellens lengde i desimeter;  $c$  er konsentrasjonen i gram per 100 mL løsningsmiddel;  $t$  er temperaturen i celsius, og  $\lambda$  er bølgelengden til det innfallende lyset i nanometer.

Det enantiomere overskuddet til forbindelsen er forholdet mellom den målte optiske rotasjonen og den optiske rotasjonen til den enantiomert rene forbindelsen. [5]



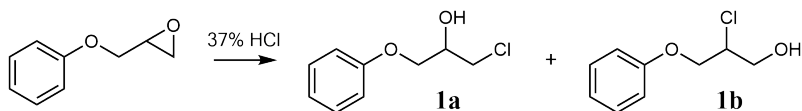
## 2. Resultater og diskusjon

### 2.1 Organiske synteser

Denne seksjonen omfatter syntesene av de rasemiske forbindelsene **1a**, **3a**, **4a** og **6**. Enzymkatalyserte kinetiske oppløsninger av rasematene **1a**, **4a** og **6** vises i Seksjon 2.3.

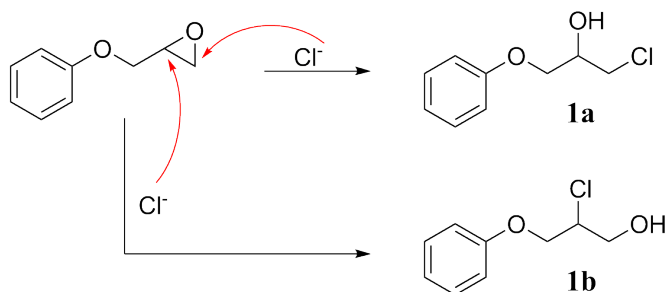
#### 2.1.1 Syntese av 1-fenoksi-3-klor-2-propanol (**1a**)

Syntesen av **1a** ble gjennomført i henhold til Chini *et. al* [72] med et utbytte på 76 %.



Skjema 2.1: Syntesen av **1a** med biproduktet **1b**.

En blanding av 1,2-epoksy-3-fenoksypropan og diklormetan ble langsomt tilsatt konsentrert saltsyreløsning. Full omsetning ble observert ved hjelp av tynnsjikt-kromatografi etter en time. Gasskromatografi viste at det var blitt dannet ca 6% av biproduktet **1b**. Ved reaksjon med syre og epoksid vil det først og fremst skje nukleofilt angrep på minst sterisk hindrede karbon, som gir produktet **1a**, men angrep kan skje på begge posisjoner. Mekanismen for denne reaksjonen vises i Skjema 2.2.



Skjema 2.2: Mekanisme for dannelse av **1a** og **1b**.

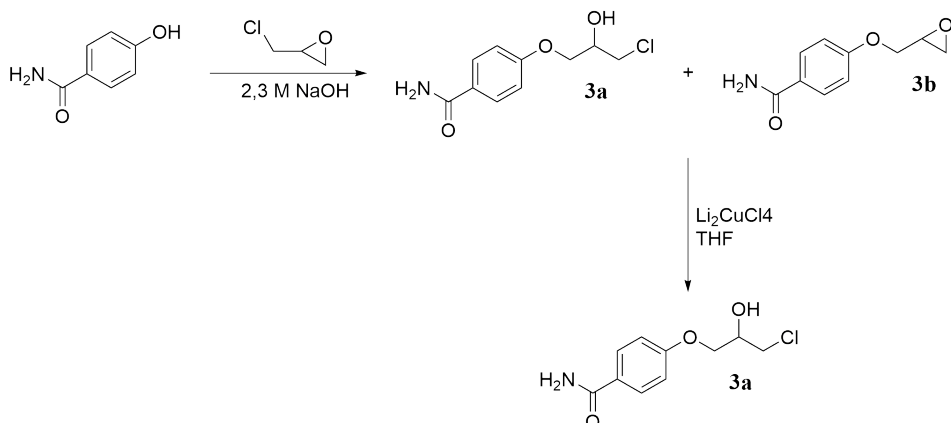
På grunn av dårlig separasjon på TLC ( $\Delta R_f = 0,1$ ) ble det først valgt å destillere reaksjonsblandingen. De to regioisomerene også hadde meget liten forskjell

i kokepunkt, på bakgrunn av GC-analyser, og destillasjonen førte ikke til renere produkt. Reaksjonen ble utført på nytt og separert med flash-kromatografi (40:1 diklormetan:acetonitril). Flash-kolonnen ga en renhet på >99%, bestemt med gasskromatografi.

Det ble utført enzymkatalysert kinetisk oppløsning av **1a**, se Seksjon 2.3.1.

### 2.1.2 Syntese av 4-(3-klor-2-hydroksypropoksy)benzamid (**3a**)

Syntesen av **3a** ble gjennomført i henhold til prosedyren til Bevinakatti *et. al* [26] og Jacobsen *et. al* [51], og hadde et utbytte på 34 %.



Skjema 2.3: Syntese av **3a**. Biproduktet **3b** kan omdannes til **3a** ved en ringåpningsreaksjon.

En blanding av 4-hydroksybenzamid og epiklorhydrin ble tilsatt en løsning av natriumhydroksid og vann. Full omsetning ble fastslått med TLC etter ca 24 timer. Det resulterende råproduktet var en blanding av **3a** og biproduktet **3b**. Blandingen var svært uhåndterlig med en grøtaktig konsistens og for å isolere reaksjonsproduktet, et fast hvitt stoff, ble reaksjonsblandingen vasket med diklormetan og filtrert.

For å åpne epoksidringen i **3b** ble det tilsatt en løsning av dilitiumtetraklorokuprat i tørr tetrahydrofuran, og reagert under nitrogenatmosfære atmosfære. Ved tilsats av kupratløsningen fikk reaksjonsblandingen en klar mørkegrønn farge. Da reaksjonen først ble forsøkt var omsetningen lav og reaksjonen fortsatte ikke ved tilsatt av mer dilitiumtetraklorokuprat-løsning. Reaksjonen ble stoppet ved tilsats av natriumfosfatbuffer for å deaktivere kupratet, og tetrahydrofuran ble dampet

av. Den nå turkise reaksjonsblandingen ble ekstrahert med etylacetat og vasket med mettet natriumkloridløsning.

Ettersom det ikke hadde skjedd full omsetning, ble det på ny tilsatt dilitiumtetraklorokuprat, denne gangen med full omsetning. Ved andre tilsats fikk reaksjonsblandingen en klar brungrønn farge. Opparbeidelsen ble gjort på tilsvarende måte som ovenfor.

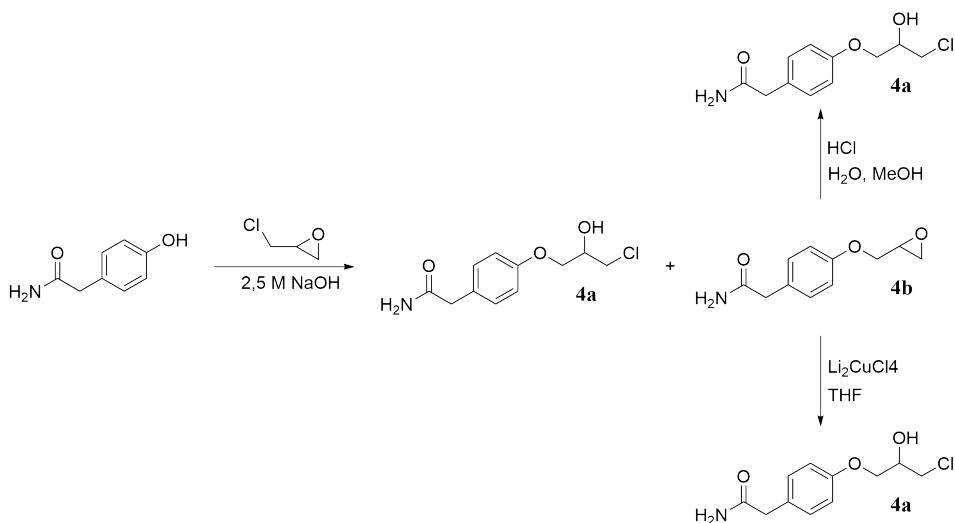
Tilstedeværelse av vann i reaksjonsblandingen er nok grunnen til den lave omsetningen i første forsøk. Det ble forsøkt å filtrere ut overskudd av væske med diklormetan etter det første reaksjonstrinnet, men det fjernet ikke overskuddet av vann. Det antas at vannet var i en emulsjon med **3a** og **3b**, også når produktet var tilsynelatende tørt.

I lys av reaksjonsblandingsens høyere reaktivitet etter ekstraksjon med etylacetat, kan dette være en mulighet for å fjerne overskuddsvann. Epiklorhydrin bør filtreres av med diklormetan først, da det har lav flyktighet og kan være vanskelig å fjerne senere.

### 2.1.3 Syntese av 1-[(4-karbamoylmetyl)fenoksi]-3-klorpropan-2-ol (**4a**)

Syntesen av **4a** ble gjennomført i henhold til prosedyren til Bevinakatti *et. al* [26] og Jacobsen *et. al* [51] og vises i Skjema 2.4. Reaksjonen ble gjort to ganger, én gang ved epoksidåpning med dilitiumtetraklorokuprat, og én gang ved epoksidåpning med konsentrert saltsyre. Den alternative reaksjonsmetoden ble utprøvd da ringåpningen med dilitiumtetraklorokuprat ikke gav et tilfredsstillende utbytte. Det ble antatt at ringåpningen med konsentrert saltsyre ville være en bedre reaksjonsmetode fordi den raskt gir full omsetning som sett i Seksjon 2.1.1, og en slipper problemene med vann i reaksjonsblandingen. Betingelser og utbytter for begge reaksjonene vises i Tabell 2.1.

En blanding av 4-hydroksyfenylacetamid og epiklorhydrin ble tilsatt en løsning av natriumhydroksid og vann. TLC viste full omsetning til **4a** og **4b** etter 48 timer. Produktet var et hvitt fast stoff og hadde samme grøtaktige konsistens som **3a** og **3b**. Det ble vasket med diklormetan og løsningsmidler ble forsøkt filtrert av. Det ble prøvd to forskjellige metoder for å utføre ringåpningen av **4b** for å kun få **4a**.



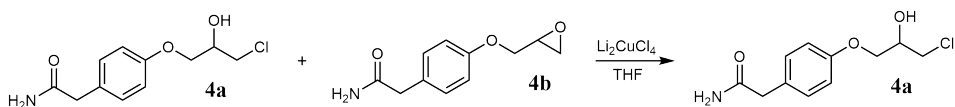
Skjema 2.4: Syntese av **4a**, med omdannelse av **4a** til **4b** ved hjelp av dilitiumtetraklorokuprat og konsentrert saltsyre.

Tabell 2.1: Betingelser for ringåpningsreaksjoner for åpning av epoksidet **4b**. Utgangsstoff er 4-hydroksyfenylacetamid. Begge reaksjonene er gjennomført ved romtemperatur. Ringåpningen med dilitiumtetraklorokuprat foregikk i nitrogenatmosfære.

Ringåpningsmetode	Mengde utg. stoff (mmol)	Mengde produkt (mmol)	Utbytte (%)	Reaksjonstid (t)
$\text{Li}_2\text{CuCl}_4$ (THF)	16,6	3,70	22	24
37 % HCl (aq)	16,5	1,73	10	1

### Ringåpning av **4b** for dannelse av **4a** fra dilitiumtetraklorokuprat-løsning

Reaksjonen for ringåpning av **4b** med dilitiumtetraklorokuprat vises i Skjema 2.5.



Skjema 2.5: Ringåpning av **4b** med dilitiumtetraklorokuprat for dannelse av **4a**.

Reaksjonen ble gjennomført med de samme reaksjonsbetingelsene som beskrevet i Seksjon 2.1.2. Ved tilsats av dilitiumtetraklorokuprat-løsning ble reaksjonsblandin-

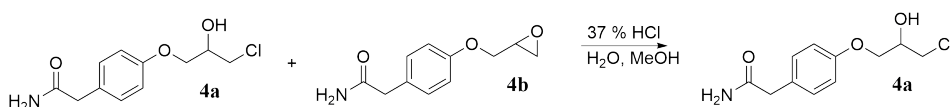


gen gul og blakket. Etter 24 timer var det ikke skjedd noe i reaksjonsblandingen og det antas at det var nettopp tilstedeværelse av vann i blandingen som var problemet. Reaksjonsblandingen ble opparbeidet som i 2.1.2 og gjort på ny, og reaksjonsblandingen var denne gangen en klarere, mørkere farge enn det første forsøket. Dette gav ønsket produkt, **4a**.

Problemene med ringåpning av **4b** med dilitiumtetraklorkuprat er de samme som for **3b**, og kan muligens løses med tiltakene foreslått ovenfor i Seksjon 2.1.2.

### Ringåpning av **4b** for dannelse av **4a** fra konsentrert saltsyre

Reaksjonen for ringåpning av **4b** med konsentrert saltsyre vises i Skjema 2.6.



Skjema 2.6: Ringåpning av **4b** med konsentrert saltsyre for dannelse av **4a**.

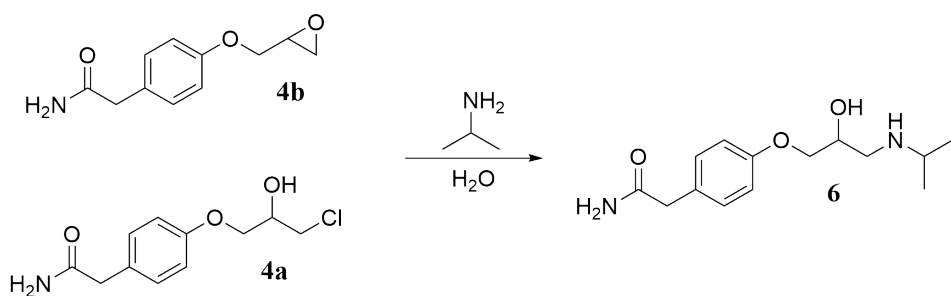
Det ble brukt konsentrert saltsyre som ble tilsatt en løsning av **4a** og **4b** i metanol. Etter full omsetning ble oppnådd ble metanol dampet av, og produktet ble ekstrahert med etylacetat. På grunn av polariteten til **4a** ble etylacetat brukt i ekstraksjonen. Dette var vanskelig fordi etylacetat og vann lett blandet seg sammen, og blandingen ble ekstrahert mange ganger for å få ut så mye av produktet som mulig. Selv om full omsetning med konsentrert saltsyre ble oppnådd, var isolering av produktet vanskelig.

Produktet **4a** ble krystallisert fra diklormetan og filtrert av. Dette gav et utbytte på 10 %. Produktet var rent, bestemt av HPLC-analyse.

Rasemisk **4a** ble brukt videre til enzymkatalysert kinetisk oppløsning med hensikt om å få renframstille enantiomerene, se Seksjon 2.3.2.

### 2.1.4 Syntese av atenolol (**6**)

Forbindelsen **6** ble syntetisert fra en blanding av **4a** og **4b**, som ble syntetisert som i Seksjon 2.1.3. Produktene **4a** og **4b** ble filtrert og brukt videre i syntesen av **6**, som vist i Skjema 2.7, med et utbytte på 34 %.



Skjema 2.7: Syntese av **6** fra en blanding av **4a** og **4b**.

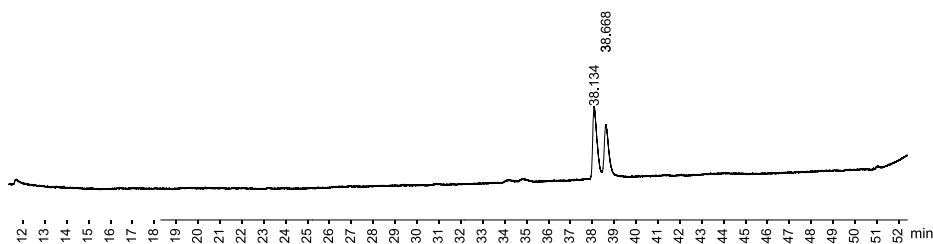
Reaksjonen gav full omsetning etter 48 timer, bestemt med TLC. Overskudd av isopropylamin ble dampet av, men det var fortsatt et stort overskudd av forurensninger i råproduktet. For rensing av råproduktet ble det først vurdert en flash-kolonne, men det var problematisk å finne et løsningsmiddel som både egnet seg til en kolonne og som løste **6**. Det ble derfor gjort en omkrystallisering i acetonitril.

## 2.2 Metodeutvikling for kirale kromatografianalyser

Det har vært store utfordringer i separasjonen av enantiomerene, spesielt forbindelsene **3a** og **4a**. Det har derfor vært tidkrevende metodeutvikling av analyser. For å oppnå tilfredsstillende separasjon av enantiomerene på gass- og væskechromatografi, må  $R_S$ -verdien være over 1,50.

### 2.2.1 Gasskromatografi (GLC)

For separasjon av **1a** ble det tatt utgangspunkt i en tidligere utviklet metode på et Varian 3380-instrument med en CP Chirasil DEX-kolonne. Temperaturprogrammet vises i Seksjon 5.1.2. Med dette temperaturprogrammet ble det oppnådd en  $R_S$ -verdi på 1,50 av den rasemiske **1a**. Kromatogrammet for rasemisk **1a** vises i Figur 2.1.



Figur 2.1: Rasemisk **1a** oppløst på kiral GC med en CP Chirasil DEX-kolonne. (*R*)-Alkoholen eluerer på 38,134 min, (*S*)-alkoholen eluerer på 38,668 min.

### 2.2.2 Væskekromatografi (HPLC)

Kiral HPLC ble brukt som analysemetode for forbindelsene **3a**, **4a** og **6**. Det ble forsøkt flere kolonner; tre Chiralcel OD-H kolonner fra 2004, 2015, og én med ukjent dato, men trolig eldre, samt en Chiralpak AD-kolonne. Gruppen mottok sin nye Chiralcel OD-H kolonne i april 2015.

#### Separasjon av **3a**

For **3a** ble det først forsøkt å separere på kiral GC med en CP Chiracel DEX-kolonne, men forbindelsen var altfor lite flyktig for dette. Det ble deretter forsøkt separasjon med kiral HPLC, men det var ikke mulig å separere enantiomerene med noen av kolonnene gruppen hadde til disposisjon. Løsningsmidlene som var brukt var heksan og 2-propanol. For å oppnå bedre separasjon ble det forsøkt tilsats av modifikatorene trifluoreddiksyre (TFA) og dietylamin (DEA). Tabell 2.2 viser resultatene som ble oppnådd ved å holde konsentrasjonene av heksan og 2-propanol konstant, og variere flow og hvilken modifikator som var tilsatt.

Det ble også forsøkt med høyere og lavere konsentrasjon av 2-propanol og TFA, men ingen tilfredsstillende separasjon ble oppnådd. Prøvens konsentrasjon ble også endret på, men det ga ingen bedring. I tillegg ble det prøvd forskjellige kolonner som gruppen har til disposisjon: En eldre Chiralcel OD-H kolonne og en Chiralpak AD-kolonne. Disse kolonnene ga enda dårligere separasjon enn hovedkolonnen. Uten tilstrekkelig separasjon av enantiomerene ville en kinetisk oppløsning vært nytteløs, så det ble besluttet å fokusere på forbindelsene **4a** og **6**.

Alderen på kolonnen ble antatt å ha en negativ effekt på graden av separasjon av enantiomerene. Dette ble også underbygd av resultatene til Dwivedee *et. al* som

Tabell 2.2: Forsøk på å separere **3a** ved hjelp av kiral HPLC. Effekt av flow og tilsats av DEA (dietylamin) og TFA (trifluoreddiksyre) til mobilfasen.

$R_S$	2-prop. (vol %)	Heksan (vol %)	TFA (vol %)	DEA (vol %)	Flow (mL min <sup>-1</sup> )
0,71	20,0	80,0	0	0	0,600
1,04	19,9	80,0	0,1	0	0,500
0,95	19,9	80,0	0,1	0	0,600
0,88	19,9	80,0	0,1	0	0,800
0,90	19,9	80,0	0	0,1	0,800
0,97	19,9	80,0	0,05	0,05	0,800
0,93	19,9	80,0	0,1	0	1,000

fikk separert tilsvarende forbindelser på samme kolonne.

### Separasjon av **4a**

For **4a** ble det tatt utgangspunkt i parametrene rapportert fra Dwivedee *et. al* [27]. Resultatene av separasjonen vises i Tabell 2.3.

Tabell 2.3: Separasjon av **4a** med ulik mobilfasesammensetning, modifikator og flow. TFA er trifluoreddiksyre. Separasjonene ble gjennomført med Chiralcel OD-H-kolonner.

$R_S$	2-prop. (vol %)	Heksan (vol %)	TFA (vol %)	Flow (mL min <sup>-1</sup> )
1,47	17	83	0	0,800
1,55	16,86	83	0,17	0,800
1,45	16,83	83	0,17	1,000
1,68 <sup>a</sup>	17	83	0	0,800
1,84 <sup>a</sup>	17	83	0	1,000
1,50 <sup>a</sup>	20	80	0	1,000

<sup>a</sup>Resultat oppnådd med Chiralcel OD-H kolonne fra 2015. De øvrige resultatene er oppnådd med Chiralcel OD-H kolonne fra 2004.

Tilsats av TFA i mobilfasen gav en bedring i separasjonen med den eldre kolonnen, men på den nye kolonnen ble separasjonen mellom enantiomerene dårligere enn uten TFA. Med DEA ble separasjonen enda dårligere. Derfor ble det ikke benyttet noen modifikatorer i mobilfasen under analysene med den nye kolonnen. Den nye kolonnen trengte også noen kjøringar før den fungerte optimalt, og tilsats av mo-

difikator i mobilfasen ble kun forsøkt under noen av de første kjøringene. Det er mulig at modifikator i mobilfasen vil forbedre separasjon nå.

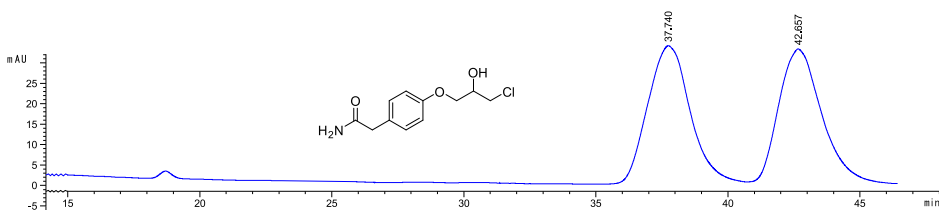
Til tross for tilfredsstillende separasjon av enantiomerene med en høyere konsentrasjon av isopropanol, noe som førte til en kortere analysetid, ble det valgt å bruke de parameterne som gav den høyeste  $R_S$ -verdien. Dette var fordi separasjonen av enantiomerene ble noe dårligere under den kinetiske oppløsningen, og det var ønskelig å ha en så god separasjon som mulig under analysen av hele reaksjonsforløpet.

I tillegg til analysebetingelsene i Tabell 2.3 ble det også observert en klar sammenheng mellom høyde på toppene, altså prøvens konsentrasjon, og grad av separasjon. Best separasjon ble oppnådd når topphøyden var rundt 30 mAU og arealet var mellom 3000-4000. Det ble ikke prøvd lavere konsentrasjon enn dette, da en tilfredsstillende separasjon var observert ved denne konsentrasjonen. I tillegg var denne konsentrasjonen forholdsvis lik konsentrasjon i den kinetiske oppløsningen, ca 0,044 mM. Effekten av prøvekonsentrasjonen på den nye og den gamle kolonnen vises i Tabell 2.4.

Tabell 2.4: Effekt av prøvekonsentrasjon, her representert ved topphøyde, ved separasjon av **4a**. Topphøyden er gjennomsnittet av topphøyden til de to enantiomerene. Konsentrasjon av 2-propanol og heksan er holdt konstant på henholdsvis 17 vol % og 83 vol %. Kolonnene brukt i begge kjøringene var Chiralcel OD-H kolonner, den ene fra 2004 og den andre fra 2015.

$R_S$	Topphøyde (mAU)	Kolonne	Flow (mL min <sup>-1</sup> )
1,29	72,3	2004	0,800
1,40	47,1	2004	0,800
1,47	27,1	2004	0,800
1,68	33	2015	0,800
1,84	26	2015	1,000

Kromatogrammet for rasemisk **4a** med optimalisert konsentrasjon og mobilfase-sammensetning vises i Figur 2.2.



Figur 2.2: Rasemisk **4a** oppløst på kiral HPLC med en Chiralcel OD-H kolonne, mobilfasesammensetningen 17:83 2-propanol:heksan og flow på 1,000 mL min<sup>-1</sup>. (*S*)-Alkoholen eluerer på 37,740 min, (*R*)-alkoholen eluerer på 42,657 min.

### Separasjon av atenolol (**6**)

Zhou *et. al* hadde allerede utviklet en analysemetode for å separere **6**. [73] Dette systemet ble først bruk i separasjonen av **6** med en tilfredsstillende  $R_S$ -verdi. Ved derivatisering med smørsyreanhydrid ble det derimot klart at esteren ikke var separert fra alkoholen. Problemet var ikke dårlig separasjon mellom enantiomere, men ester-enantiomere og alkohol-enantiomere overlappet. Tabell 2.5 viser betingelser på metoden og oppnådd  $R_S$ -verdi.

Tabell 2.5: Separasjon av **6** med ulike mobilfasesammensetning, derivatiseringsreaksjon og flow. DEA er dietylamin. Separasjonene ble gjennomført med Chiralcel OD-H-kolonner.  $R_S$ -verdien er av enantiomere av **6**.

$R_S$	2-prop. (vol %)	Heksan (vol %)	DEA (vol %)	Flow (mL min <sup>-1</sup> )
2,65	29,85	70	0,15	0,700
4,77	19,90	80	0,10	0,800

### 2.3 Enzymkatalyserte kinetiske oppløsninger av rasemater

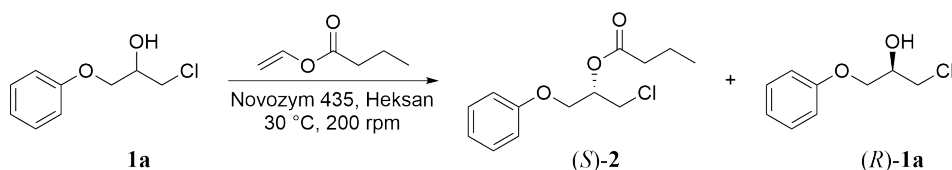
De kinetiske oppløsningene ble gjennomført med utgangspunkt i substrat- og acyl-donorkonsentrasjonene til Jacobsen & Anthonsen [51]. Acyl-donoren var vinylbutanat i alle reaksjonene.

CALB har en selektivitet mot sekundære alkoholer med *R*-konfigurasjon. Med et halogen som den lille gruppen bundet til stereosenteret endrer konfigurasjonen seg som følge av IUPAC-regler, og i de følgende reaksjoner vil CALB foretrekke *S*-alkoholene. [51, 52]

For å forsikre om reproduserbare resultater, er hver kinetiske oppløsning gjort to ganger. *E*-verdiene skal ikke avvike mer enn 10 % fra hverandre.

### 2.3.1 Omestring av **1a** med CALB

Reaksjonsskjemaet for omestringen av **1a** med CALB vises i Skjema 2.8.



Skjema 2.8: Kinetisk oppløsning av **1a**

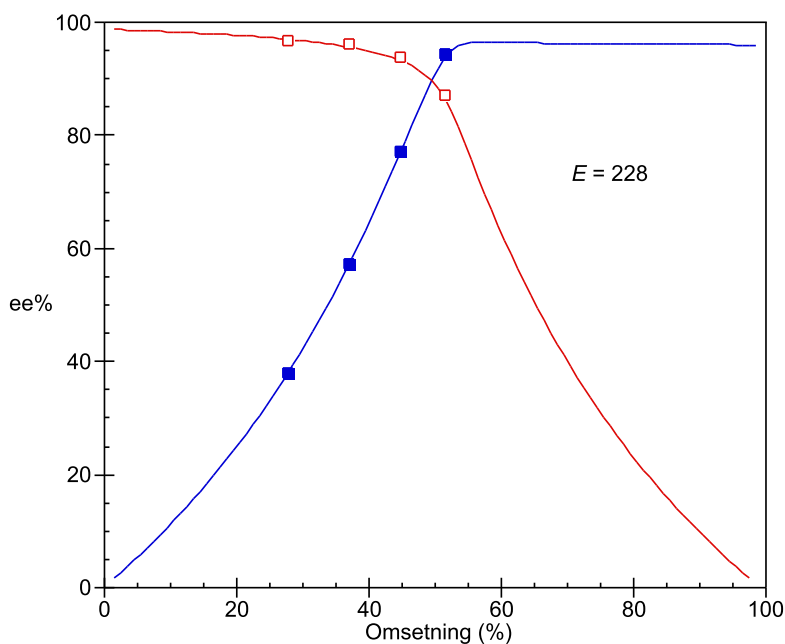
I omestringen av **1a** ble det brukt en substratkonsentrasjon på 0,044 mM (millimolar) og acyldonorkonsentrasjon på 0,22 mM. Mengden Novozym435 var 20 mg og det ble brukt 3 mL løsningsmiddel, som var heksan. Betingelsene for de to parallellene vises i Tabell 2.6.

Tabell 2.6: Reaksjonsbetingelser for omestring av **1a**. Acyldonoren er vinylbutanat og det ble tilsatt 20 mg CALB i hver reaksjon.

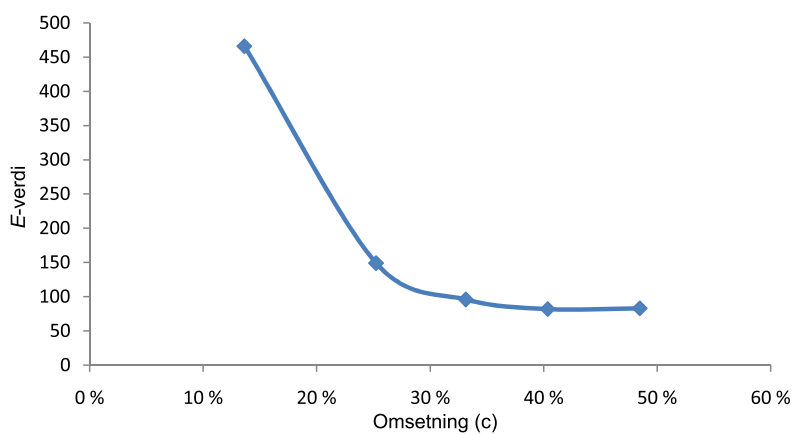
Parallell nr	Mengde substrat (mmol)	Mengde acyldonor (mmol)	Tid til 50 % omsetning (t)	<i>E</i> -verdi
1	0,163	0,745	3	228
2	0,166	0,736	3	226

Verdien av *E* påvirkes lett av selv små endringer i  $ee_S$  og  $ee_P$ . Derfor er det knyttet usikkerhet til noen av datapunktene spesielt ved lave og høye omsetninger. *E*-verdier over 200 usikre på grunn av at det er vanskelig å integrere korrekt når det er lite av en enantiomer. Kurven for den første parallellen vises i Figur 2.3.

*E*-verdien er beregnet for hele reaksjonen med programvaren *E & K Calculator*, men beregner man på *E*-verdiene for hvert enkelt analysepunkt, ser man at *E*-verdien synker når omsetningen blir høyere. Jacobsen *et. al* har tidligere sett denne trenden med **1a** og lignende forbindelser, og at enzymet blir mer selektivt dess mer *R*-alkohol som er tilstede. [54]



Figur 2.3: Grafisk fremstilling av den enzymatiske kinetiske oppløsningen av rase-misk **1a** med  $E$ -verdi på 228. Figuren viser enantiomert overskudd av gjenværende substrat ( $ee_S$ , ( $R$ )-**1a**, blå punkter) og dannet produkt ( $ee_P$ , ( $S$ )-**2**, røde punkter) ved økende omsetning. Den blå og den røde kurven er generert ut i fra de eksperimentelle verdiene av  $ee_S$  og  $ee_P$ .



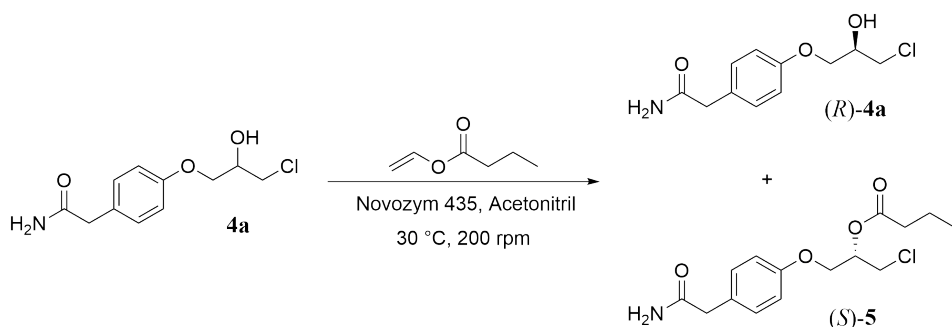
Figur 2.4: Grafisk fremstilling av synkende  $E$ -verdi ved økende omsetning for om-estringen av **1a** med CALB i heksan og vinylbutanat som acyldonor.



*E*-verdien av denne reaksjonen er mye høyere enn tidligere rapportert *E*-verdi på 11 i kinetisk oppløsning av **1a**. [50] Novozym 435 ble brukt i begge tilfellene, men preparatet brukt i dette prosjektet er av nyere dato. Dette tyder på at selektiviteten til et enzympreparat kan variere i forskjellige partier.

### 2.3.2 Omestring av **4a** med CALB

Reaksjonsskjemaet for omestringen av **4a** med CALB vises i Skjema 2.9.



Skjema 2.9: Omestring av **4a** med vinylbutanat og CALB.

Alkoholen **4a** hadde en viss løselighet i acetonitril og den ble valgt å gjennomføre enzymreaksjonen i, til tross for tidligere rapporterte resultater fra Dwivedee *et. al.* [27] Acetonitril ble valgt av praktiske årsaker ettersom mange løsningsmidler som kan løse **4a**, som etylacetat og tetrahydrofuran, ikke er kompatible med den stasjonære fasen i en Chiralcel OD-H kolonne. Det ble brukt tørr acetonitril og i tillegg ble det tilsatt molekylærsiev i reaksjonsblandingen.

For den kinetiske oppløsningen ble det tatt utgangspunkt i en løsning med substratkonsentrasjon 0,044 mM og en konsentrasjon av acyldonor på 0,22 mM. Mengden enzym var 20 mg.

Under disse betingelsene viste enzymet meget høy selektivitet ( $E = 643$ ), men reaksjonen gikk svært langsomt. Etter en uke var omsetningen fortsatt under 50 %. For at reaksjonen skulle gå fortere ble det besluttet å doble enzymkonsentrasjonen. Substratkonsentrasjonen ble også økt i én av parallellene. Reaksjonsbetingelser samt tiden det tok til ca 50 % omsetning vises i Tabell 2.7.

Tabell 2.7: Reaksjonbetingelser for omestring av **4a**. Alle reaksjonene ble gjennomført ved 30 °C og 200 rpm. Acyldonoren var vinylbutanat og løsningsmiddelet var acetonitril. Reaksjonsforløpet ble analysert med HPLC på en Chiralcel OD-H kolonne, og betingelsene vises i Seksjon 2.2.2.

Substrat- kons. (mM)	Acyldonor- kons. (mM)	Mengde enzym (mg)	Tid til 50 % omsetning (t)
0,044	0,22	20	>170
0,044	0,22	40	>27
0,066	0,33	40	24

Når substratkonsentrasjonen økte var ikke lenger **4a** helt løselig i acetonitril. Ved uttak av prøver ble det passet på at reaksjonsblandingen var helt homogen. Deretter ble prøven tilsatt én dråpe metanol for å kunne analyseres på HPLC. Etter reaksjonen hadde gått en stund var alt løst i acetonitril, som tydet på at alkohol ble omsatt, ettersom esteren trolig var mer løselig i acetonitril.

Med denne nye substratkonsentrasjonen og 40 mg enzym oppnådde reaksjonen 50 % omsetning etter 24 timer.

Den langsomme reaksjonshastigheten kan være forårsaket av blant annet løsningsmiddelet, da acetonitril er et løsningsmiddel med høy polaritet som kan bidra til langsommere reaksjonshastighet. Sammenlignet med omestring av **1a**, som hadde 50 % omsetning allerede etter tre timer er det en vesentlig forskjell. I tillegg er enzymet forholdsvis gammelt, noe som også kan føre til lavere aktivitet. Resultatene er også motsatt av det Dwivedee *et. al* oppnådde, altså ingen reaksjon, med deres omestring av **4a** med CALA i det samme løsningsmiddelet. Dwivedee *et. al* oppnådde også lav *E*-verdi ved bruk av CALB som katalysator. [27] Det er lite trolig at forskjellen i reaktivitet mellom CALB og CALA er så dramatisk.

Resultatene ovenfor tyder på at acetonitril slett ikke er et dårlig løsningsmiddel for å løse opp **4a**, men det er nok viktig å passe på at den inneholder så lite vann som mulig. Jacobsen & Anthonsen har tidligere testet effekten av vannaktivitet i løsningsmiddel på selektiviteten og aktiviteten til CALB. Det viste seg at ved høyere vannaktivitet i acetonitril skjedde det nesten ingen omsetning i reaksjonen. [51] Substratet var imidlertid 1-fenoksi-3-brom-2-propanol, men det er forholdsvis likt **4a**, og meget likt **1a**, med den eneste forskjellen i halogensubstituenten. Det er naturlig å tro at en lignende effekt kan skje med **4a** som substrat. Derfor ble det sørget for at løsningsmiddelet er så vannfritt som mulig ved å ta det ut tørt fra solventrenser og tilsette molekyllærsiev i reaksjonsblandingen.

## Valg av acyldonor

I utgangspunktet var vinylbutanat valgt som acyldonor, men ved derivatisering av **4a** med smørsyreanhydrid ble ikke enantiomerene av butanatesteren av **4a** separert med det endelige programmet sett i Tabell 2.4. Dwivedee *et. al* rapporterte separasjon på HPLC med vinylacetat som acyldonor med samme program. [27] Vinylacetat ble derfor vurdert som acyldonor, men ved derivatisering av **4a** med eddiksyreanhydrid ble heller ikke enantiomerene av acetatesteren separert. Dette gir unøyaktige resultater da det blir umulig å regne ut korrekt  $ee_P$ .

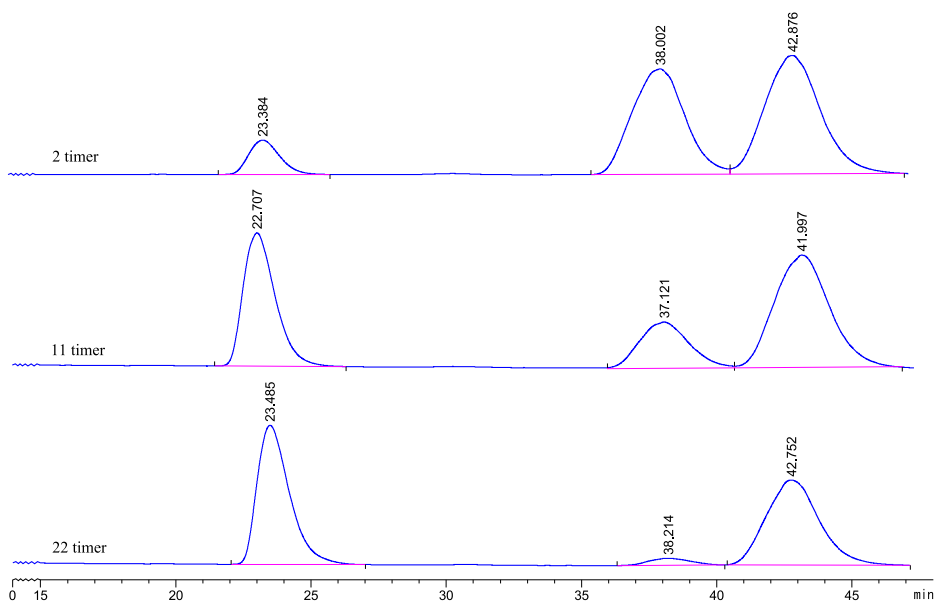
Det ble kun observert én topp av acetatesteren, mens det var antydning til separasjon av enantiomerene av butanatesteren og to topper var synlige. Derfor ble vinylbutanat valgt som acyldonor.

Det kan settes spørsmålstegn ved den manglende separasjonen av acetatesteren, spesielt da den er blitt rapportert som separert tidligere. Retensjonstiden til alkoholen er forskjøvet noe sammenlignet med tidligere rapporterte resultater, mens esterene eluerer til samme tid. I følge tidligere rapporterte resultater skulle *R*-esteren ha eluert like før *S*-alkoholen, men den er ikke synlig på kromatogrammet. En mulighet er også at den gjemmer seg under toppen til *S*-alkoholen, men det ble ikke gjort noen ytterligere forsøk på å separere esterene.

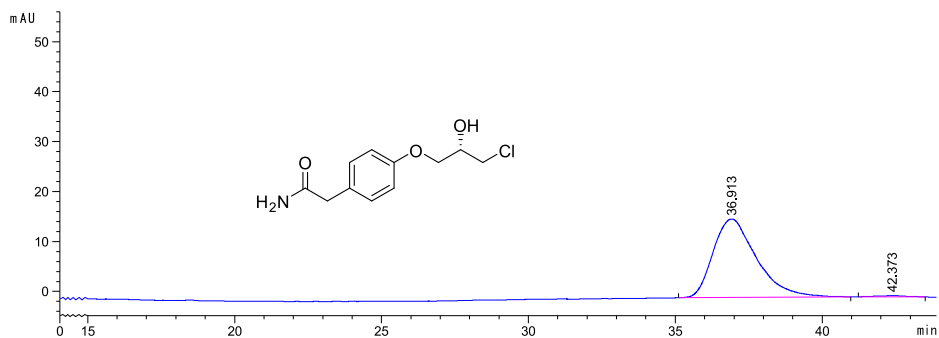
## Selektivitet til CALB overfor **4a**

Til tross for den manglende separasjonen av butanatesteren **5** på HPLC med Chiralcel OD-H kolonne, ble likevel den kinetiske oppløsningen av **4a** gjennomført og prøver ble tatt ut hver time i elleve timer, og deretter i et tidsintervall fra 21-27 timer. Prøvene ble analysert på HPLC og på bakgrunn av den konstante topphøyden av arealet til gjenværende alkohol, samt minkende *S*-alkohol og økende *S*-ester ble det antatt at enzymet var selektivt. HPLC-kromatogrammer tatt av reaksjonsblandingen etter 2, 11 og 22 timer vises i Figur 2.5.

For å bevise selektiviteten til CALB overfor **4a** ble også (*S*)-**5** hydrolysert for å gi (*S*)-**4a**. Kromatogrammet som vises i Figur 2.6 viser høy enantiomer renhet og man kan dermed fastslå at Novozym 435 er en meget selektiv katalysator i omestringen av **4a**.



Figur 2.5: HPLC-kromatogrammene for reaksjonsforløpet til omestringen av **4a**. Kromatogrammene viser reaksjonen etter 2, 11 og 22 timer. Det er brukt Chiralcel OD-H kolonne fra 2015.



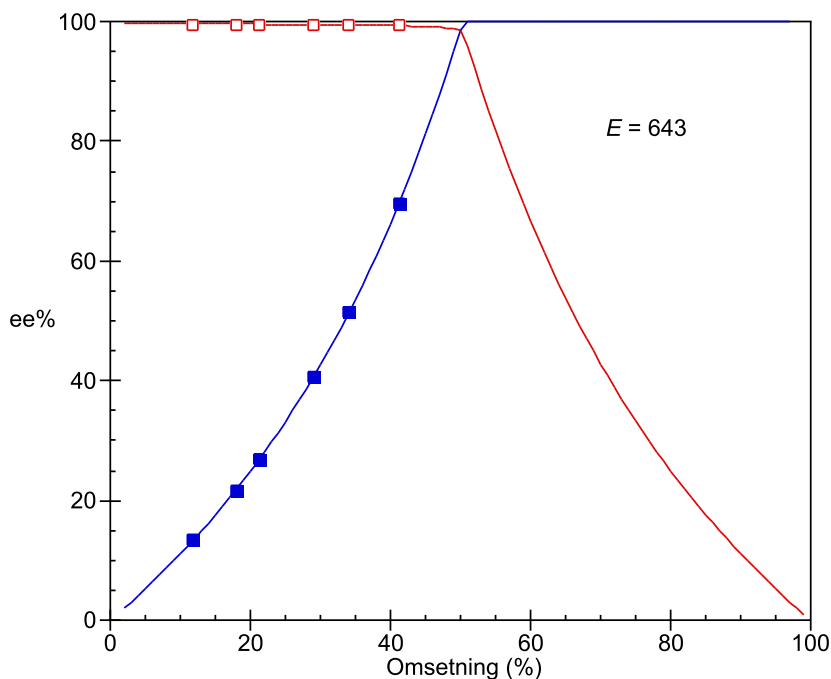
Figur 2.6: Kromatogram for (*S*)-**4a** etter hydrolyse. Det er brukt Chiralcel OD-H kolonne fra 2015.

Det ble gjennomført to paralleller av denne reaksjonen. Betingelser for begge parallellene vises i Tabell 2.8. For å få reaksjonen til å gå litt raskere ble det brukt ca 50 mg enzym.

Tabell 2.8: Reaksjonsbetingelser for omestring av **4a**. Acyldonoren er vinylbutanat og det ble tilsatt ca 50 mg Novozym 435 i hver reaksjon. *E*-verdiene avviker med 4 % fra hverandre.

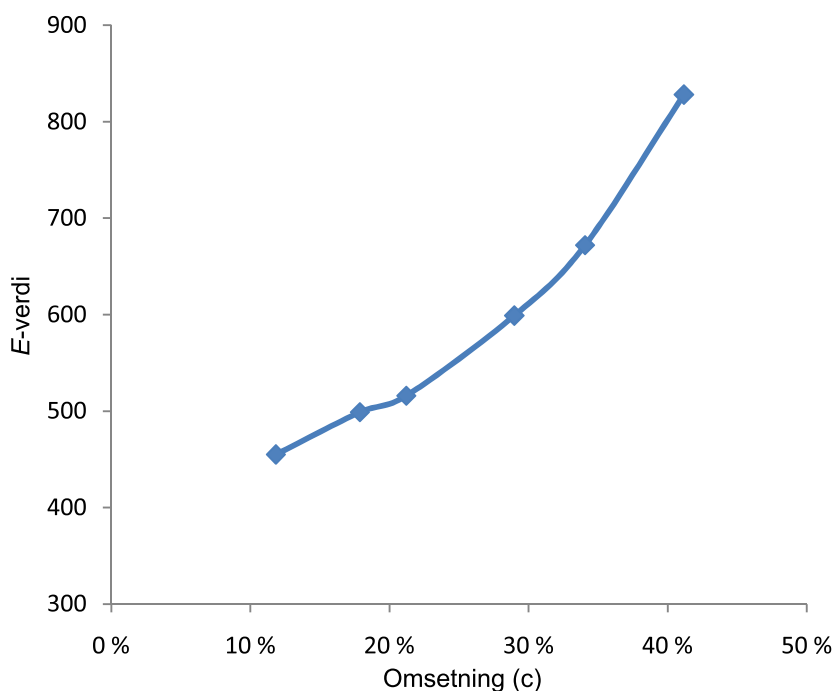
Parallell nr	Mengde substrat (mmol)	Mengde acyl-donor (mmol)	<i>E</i> -verdi
1	0,134	0,673	701
2	0,166	0,736	643

*E*-verdier over 200 er generelt upålitelige, på grunn av feilkilder i analysen. Selv små endringer i det enantiomere overskuddet kan gi store utslag i utregningen av *E*-verdi. Trolig blir resultatene mindre pålitelige jo nærmere man kommer en omsetning på 50 %. Resultatene ansees å være reproducerbare med et akseptabelt avvik på 4 %. Kurven for den andre parallellen vises i Figur 2.7.



Figur 2.7: Grafisk fremstilling av den enzymatiske kinetiske oppløsningen av rase-misk **4a** med *E*-verdi på 643. Figuren viser gjenværende substrat ( $ee_S$ , (*R*)-**4a**), blå punkter) og dannet produkt ( $ee_P$ , (*S*)-**5**, røde punkter) ved økende omsetning. Den blå og den røde kurven er genererte ut i fra de eksperimentelle verdiene av henholdsvis  $ee_S$  og  $ee_P$ .

Dersom man ser på  $E$ -verdiene for hvert enkelt datapunkt, vil man se at de øker med økende omsetning. Dette er motsatt av trenden til forbindelser som **1a** og lignende forbindelser uten substituent på benzenringen. Forskjellen mellom **1a** og **4a** er at **4a** har en substituent på benzenringen. Figur 2.8 viser den økende  $E$ -verdien med økende omsetninger.



Figur 2.8: Grafisk fremstilling av økende  $E$ -verdi ved økende omsetning for omsetningen av **4a** med CALB i acetonitril og vinylbutanat som acyldonor

Dette er meget interessante resultater sett i lys av tidligere rapporterte resultater [54] og den synkende trenden for **1a**. Det antyder at den store gruppen bundet til stereosenteret spiller en større rolle for selektiviteten til CALB enn tidligere antatt. Det må undersøkes videre hva den molekylære årsaken er, og gjennomføre studier med tilsetning av forskjellige enantiomert rene forbindelser. Det vil også være interessant å se om trenden blir motsatt for hydrolysereaksjoner. Ettersom  $E$ -verdien er regnet ut med programvaren *E & K Calculator* kan det også hende at det kan være noen feil i utregningen ved så høye  $E$ -verdier.

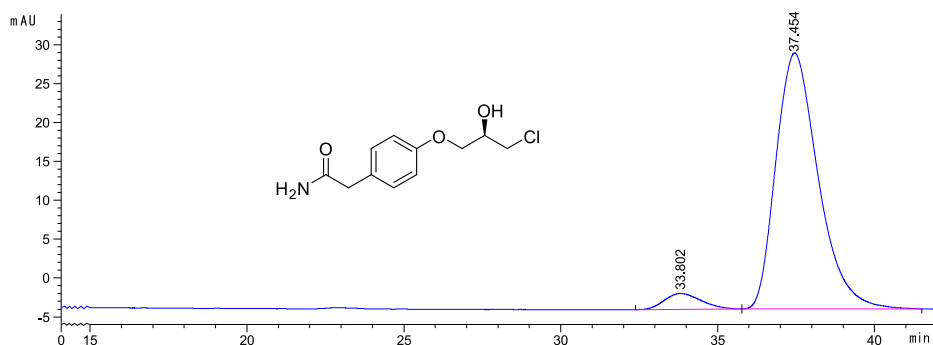
Resultatene i den kinetiske oppløsningen av **4a** viser at CALB er en utmerket

biokatalysator for omestringen av **4a**. Dette er strider i mot tidligere rapporterte resultater av Dwivedee *et. al* som rapporterte en *E*-verdi på 16 med CALB, samt ingen reaksjon i acetonitril. I tillegg rapporterer de at CALB har en selektiv mot *R*-enantiomeren. [27] Dette er motsatt av observasjonene i dette prosjektet, samt generell kunnskap om selektiviteten til CALB. Enzympreparatet Dwivedee *et. al* benyttet er et annet enn Novozym 435. Dette antyder at det kan være stor forskjell i selektivitet mellom ulike preparater av samme enzym, som også ble sett i den enzymkatalyserte oppløsningen av **1a** i Seksjon 2.3.1. Det ble i dette prosjektet ikke forsøkt å utføre reaksjonen med CALA som biokatalysator, men det er ikke trolig at den vil være bedre enn CALB.

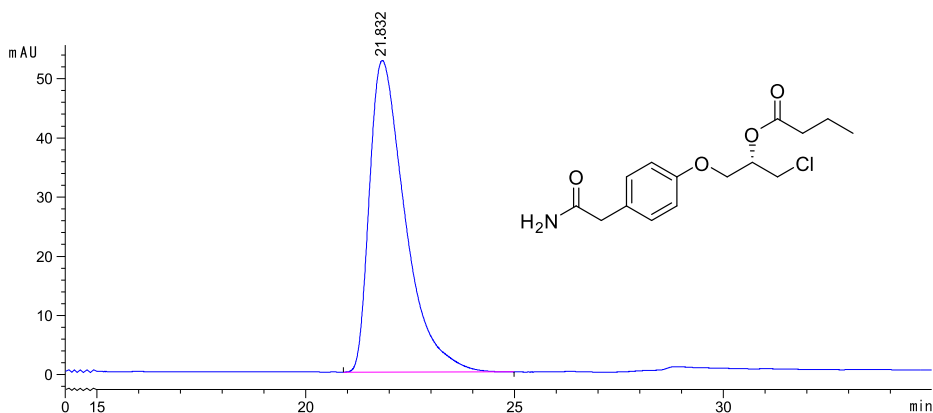
### 2.3.3 Oppskalering av den kinetiske oppløsningen av **4a**

Reaksjonen ble oppskalert og på grunn av den langsomme reaksjonshastigheten ble også mengden enzym skalert opp vesentlig, til ca 0,7 gram. Reaksjonen ble gjennomført i en flaske med ca 40 mL acetonitril og den ble stoppet etter 26 timer. På bakgrunn av tidligere analyser ble det antatt at reaksjonen da hadde nådd full omsetning, men det hadde den ikke. Den kinetiske oppløsningen gav et utbytte på 16 % av alkoholen (*R*)-**4a** og 18 % av esteren (*S*)-**5**.

Ettersom det var ønskelig å oppnå høyt enantiomert overskudd av begge enantiomerene, ble opprensingen gjennomført med Flash-kolonne. På grunn av den høye polariteten til spesielt (*R*)-**4a** var det utfordrende å finne et eluentsystem som løste begge og samtidig gav bra nok separasjon. Med etylacetat ble  $\Delta R_f$  ca 0,15, så det ble brukt, men mye produkt gikk tapt med dette systemet. Kromatogrammet for gjenværende alkohol (*R*)-**4a** vises i Figur 2.9 og kromatogrammet for butanatesteren (*S*)-**5** vises i Figur 2.10.



Figur 2.9: Kromatogram for (*R*)-**4a** etter opprensing med kolonne.

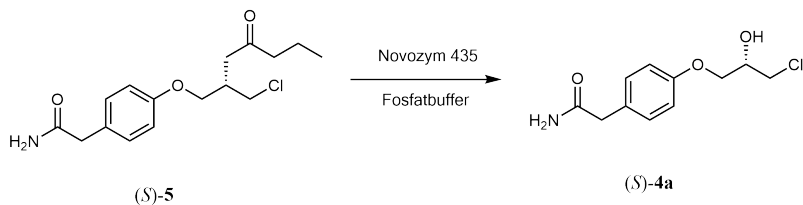


Figur 2.10: Kromatogram for (*S*)-**5** etter opprensing med kolonne.

På grunn av at så mye av produktene gikk tapt under opprensingen, bør metoden for opparbeidelse optimaliseres. Omkrystallisering kan også være en mulig opprensningsmetode for å isolere **4a**. Esteren **5** vil være mer løselig enn alkoholen **4a** i en rekke løsningsmidler enn **4a** som diklormetan og også etylacetat og acetonitril. Dersom man har svært lite stoff, kan man vurdere preparativ HPLC som opprensing etter den kinetiske oppløsningen. Dette er imidlertid en tidkrevende metode og vil ikke fungere for reaksjoner med større mengder stoff.

### Hydrolyse av (*S*)-**5** med CALB

Hydrolysen av esteren (*S*)-**5** vises i Skjema 2.10. Dette gav alkoholen (*S*)-**4a** med et enantiomert overskudd på 99 % og et utbytte på 48 %.



Skjema 2.10: Hydrolyse av esteren (*S*)-**5** med CALB.

Hydrolysen ble gjennomført med utgangspunkt i betingelsene til Jacobsen *et. al.*, [74] og ble oppskalert deretter. Dette resulterte i en svært stor mengde enzym og



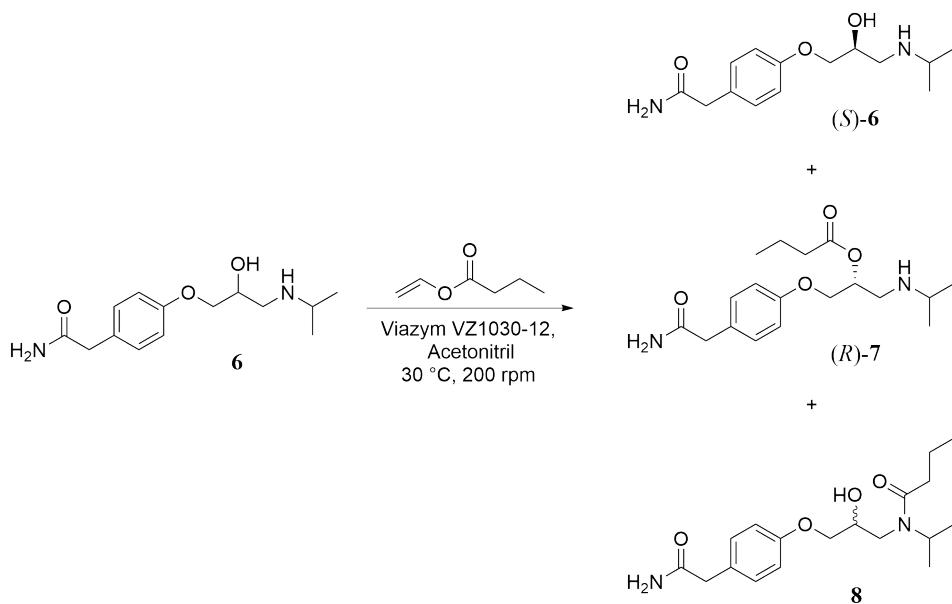
ved senere anledninger bør sannsynligvis mengden enzym skaleres ned for enklere håndtering av reaksjonsblandingen. Reaksjonsmediet var 0,1 M fosfatbuffer med pH 7. Hydrolysen fikk reagere i 48 timer. Det ble da tatt ut en prøve, som ble ekstrahert med etylacetat og undersøkt med HPLC. Denne viste full omsetning og analysen tydet også på meget høyt enantiomert overskudd av alkoholen (*S*)-**4a**. Kromatogrammet for (*S*)-**4a** vises i Figur 2.6.

Reaksjonsblandingen ble ekstrahert gjentatte ganger med etylacetat og det gav 30 mg av (*R*)-**4a**. Mer kunne muligens blitt ekstrahert, men den store mengden enzym gjorde blandingen vanskelig å håndtere.

### 2.3.4 Omestring av atenolol (**6**) med CALA

Det ble først gjort en derivatisering av **6** med smørsyreanhydrid. Det ble valgt å prøve omestring med CALA ettersom **6** så ut til å passe preferansene til CALA godt med den to forholdsvis romstore grupper på hver side av stereosenteret.

Tørr acetonitril ble igjen brukt som reaksjonsmedium og prøver ble jevnlig tatt ut og analysert på HPLC. Skjema 2.11 viser den forventede reaksjonen for omestringen av atenolol med CALA.



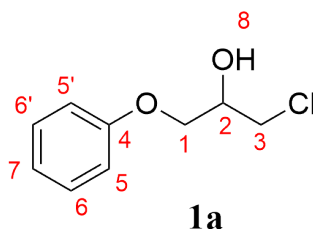
Skjema 2.11: Omestringen av atenolol med med mulig biprodukt.

HPLC-analyser viser klart at CALA ikke er selektiv i denne omestringen. I tillegg til topper for både *R*- og *S*-esteren var det flere topper på HPLC-kromatogrammet noe som tydet på at en bireaksjon hadde skjedd. Det ble ikke gjort noen ytterligere analyser av omestringsreaksjonen utover HPLC-analyser, men CALA har tidligere blitt brukt til å acetylere sekundære aminogrupper med gode resultater. [75] Det er en mulighet for at enzymet har *N*-acetyleret en viss mengde av substratet.

## 2.4 Karakterisering av forbindelser

### 2.4.1 Karakterisering av **1a**

Forbindelsen **1a** ble karakterisert med NMR, MS og IR. Figur 2.11 viser **1a** med nummerering av atomene. Alle spektrene for **1a** vises i Vedlegg A.



Figur 2.11: Forbindelsen **1a** med nummerering.

### NMR-analyser av **1a**

Det ble gjort en fullkarakterisering av **1a** med NMR. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY, HSQC- og HMBC-spekteret av forbindelsen. Tilordninger av kjemiske skift for  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ , samt deres korrelasjoner med hverandre, vises i Tabell 2.9.

En liten topp på 5,30 ppm indikerer en rest av diklormetan i produktet. [76] To topper under 2 ppm indikerer en annen forurensing, men det er uvisst hvilken.

Tabell 2.9: Tabell for karakterisering av forbindelsen **1a** ved hjelp av  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY- og HMBC NMR. Prøven ble løst i  $\text{CDCl}_3$ . Forbindelsen karakteriseres ved hjelp av kjemisk skift i  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ ; multiplisitet, integral og koblingskonstant i  $^1\text{H}$ -spekteret; og koblinger mellom proton og karbon.

Posisjon nr	$^1\text{H}$ [ppm], (mult., int., $J$ )	$^{13}\text{C}$ [ppm]	COSY	HMBC
1	4,08-4,03 (m, 2H)	68,5	2	2, 3, 4
2	4,21-4,17 (m, 1H)	70,0	1, 3, 8	1, 3, 4
3	3,77-3,68 (m, 2H)	46,0	2	1, 2
4	-	158,3	-	-
5	6,91-6,89 (m, 2H)	114,6 (2C)	6	4, 6
6	7,29-7,27 (m, 2H)	129,7 (2C)	5, 7	4, 5, 7
7	6,98-6,96 (m, 1H)	121,5	6	4, 5, 6
8	2,81-2,80 (d, 1H, 6.0)	-	2	1, 2, 3

### Massespektroskopi av 1a

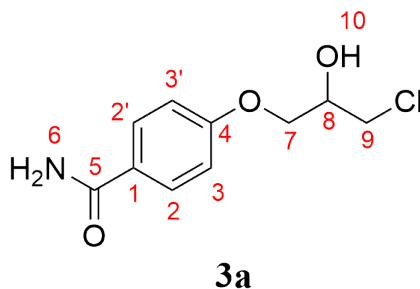
Høyoppløselig MS viser  $[M-OH]^+ = 169,0424$ . Det molekylære ionet vises ikke, noe som er vanlig for sekundære alkoholer. [77] Den teoretiske massen var 186,04. MS bekrefter molekylformelen.

### Infrarød spektroskopi av 1a

Infrarød spektroskopi viser en karakteristisk topp på  $3400\text{ cm}^{-1}$  som kommer av strekk fra O-H-bindingen. I tillegg viser spekteret to sterke signaler på rundt  $700\text{ cm}^{-1}$  som er karakteristiske for aromatiske forbindelser og  $\text{CH}_2\text{-Cl}$ -strekk. [77]

#### 2.4.2 Karakterisering av 3a

Forbindelsen **3a** ble karakterisert med NMR, MS, IR og smeltepunkt. Figur 2.12 viser **3a** med nummerering av atomene. Alle spektrene for **3a** vises i Vedlegg B. Det ble ikke funnet noen tidligere eksperimentelle data på **3a**.



Figur 2.12: Forbindelsen **3a** med nummerering.

### Smeltepunkt av 3a

Smeltepunktet til **3a** ble bestemt til  $116\text{-}118\text{ }^\circ\text{C}$ .

### NMR-analyser av 3a

Det ble gjort en fullkarakterisering av **3a** med NMR. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY, HSQC- og HMBC-spekteret av forbindelsen. Tilordninger av kjemiske skift for  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ , samt deres korrelasjoner med hverandre, vises i Tabell 2.10.

Prøven ble løst i MeOD, og metanoltoppen er kalibrert til 3,31 ppm. Toppen på 4,87 kommer av vann. [76]

Tabell 2.10: Tabell for karakterisering av forbindelsen **3a** ved hjelp av  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY- og HMBC NMR. Prøven ble løst i MeOD. Forbindelsen karakteriseres ved hjelp av kjemisk skift i  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ ; multiplisitet, integral og koblingskonstant i  $^1\text{H}$ -spekteret; og koblinger mellom proton og karbon.

Posisjon nr	$^1\text{H}$ [ppm], (mult., int., $J$ )	$^{13}\text{C}$ [ppm]	COSY	HMBC
1	-	127,4	-	-
2	7,86-7,84 (m, 2H)	130,7 (2C)	3	2', 3, 4, 5
3	7,03-7,01 (m, 2H)	115,3 (2C)	2	1, 4, 3'
4	-	163,1	-	-
5	-	172,0	-	-
6	Ikke obs.	-	-	-
7	4,17-4,10 (m, 2H)	70,3/70,8	8	4, 8
8	4,17-4,10 (m, 1H)	70,3/70,8	7	7, 9
9	3,78-3,68 (m, 2H)	46,6	8	8
10	Ikke obs.	-	-	-

### Massespektroskopi av **3a**

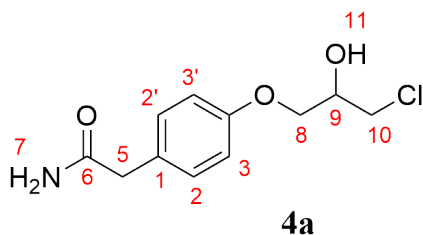
Høyoppløselig MS viser  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 230,0584$ . Den teoretiske massen var 229,05 og MS bekrefter molekylformelen.

### Infrarød spektroskopi av **3a**

Infrarød spektroskopi viser karakteristisk O-H strekkfrekvens ved  $3352\text{ cm}^{-1}$ . I tillegg er det en topp ved  $3176\text{ cm}^{-1}$  som kommer av N-H strekk. En sterk topp på  $1662\text{ cm}^{-1}$  kommer av C=O-strekk i amidet. [77] Absorpsjon fra vibrasjoner i den aromatiske ringen og klor er de samme som for **1a**.

#### 2.4.3 Karakterisering av **4a**

Forbindelsen **4a** ble karakterisert med NMR, MS, IR og smeltepunkt. Enantiomere-*(R)*-**4a** og *(S)*-**4a** ble også karakterisert ved hjelp av optisk rotasjon. Figur 2.13 viser **4a** med nummerering av atomene. Alle spektrene for **4a** vises i Vedlegg C.

Figur 2.13: Forbindelsen **4a** med nummerering.

### NMR-analyser av **4a**

Det ble gjort en fullkarakterisering av **4a** med NMR. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY, HSQC- og HMBC-spektre av forbindelsen. Tilordninger av kjemiske skift for  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ , samt deres korrelasjoner med hverandre, vises i Tabell 2.11.

NMR-spekteret ble tatt av (*R*)-**4a**. Det ble observert noen urenheter på NMR som trolig kommer av rester av vinylbutanat. I tillegg viser spekteret rester av løsningsmiddel i form av etylacetat. Metanoltoppen er på 3,31 ppm og vann er på 4,87 ppm. [76]

### Massespektroskopi av **4a**

Høyopløselig MS viser  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 244,0744$ . Den teoretiske massen var 243,07 og MS bekrefter molekylformelen.

### IR-spektroskopi av **4a**

Infrarød spektroskopi viser karakteristisk O-H strekkfrekvens ved  $3349\text{ cm}^{-1}$ , samt N-H strekk ved  $3164\text{ cm}^{-1}$ . En meget sterk topp på  $1633\text{ cm}^{-1}$  kan komme av C=O-strekk i amidet. [77] Absorpsjon fra vibrasjoner i den aromatiske ringen og klor er de samme som for **1a** og **3a**.

### Smeltepunkt av **4a**

Smeltepunktet ble bestemt til  $129\text{--}132\text{ }^\circ\text{C}$ . Dette er vesentlig høyere enn tidligere rapporterte verdier som ligger rundt  $120\text{ }^\circ\text{C}$ . Smeltepunktet ble tatt av (*R*)-**4a** og det kan hende verdien avviker noe fra tidligere rapporterte verdier. Ellers var det

noen urenheter i prøven sett fra NMR, som løsningsmiddel og muligens vinylbutanat. Tilstedeværelse av løsningsmiddel gir normalt lavere smeltepunkt.

Tabell 2.11: Tabell for karakterisering av forbindelsen **4a** ved hjelp av  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY- og HMBC NMR. Prøven ble løst i MeOD. Forbindelsen karakteriseres ved hjelp av kjemisk skift i  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ ; multiplisitet, integral og koblingskonstant i  $^1\text{H}$ -spekteret; og koblinger mellom proton og karbon.

Posisjon nr	$^1\text{H}$ [ppm], (mult., int., $J$ )	$^{13}\text{C}$ [ppm]	COSY	HMBC
1	-	129,4	-	-
2	7,23-7,21 (m, 2H)	131,3 (2C)	3	2', 3, 4, 5, 6
3	6,92-6,90 (m, 2H)	115,7 (2C)	2	1, 3', 4, 5
4	-	159,2	-	-
5	3,44 (s, 2H)	42,5	-	1, 2, 3, 6
6	-	177,4	-	-
7	Ikke obs.	-	-	-
8	4,06-4,02 (m, 2H)	70,2	9	4, 9, 10
9	4,13-4,10 (m, 1H)	71,0	8, 10	8, 10
10	3,77-3,66 (m, 2H)	46,8	9	8, 8
11	Ikke obs.	-	-	-

### Optisk rotasjon av (*R*)-**4a**

Optisk rotasjon til (*R*)-**4a** ble bestemt til  $[\alpha]_{589}^{23\text{C}}(1,0 \text{ MeOH}) = - 2,7^\circ$ .

Det er ikke funnet noen tidligere rapporterte verdier for den optiske rotasjonen til (*R*)-**4a**. På bakgrunn av urenheterne observert på NMR kan det antas at verdien skal være litt mindre. I følge HPLC-analyser er det omtrent 90 % enantiomert overskudd av (*R*)-**4a** i prøven.

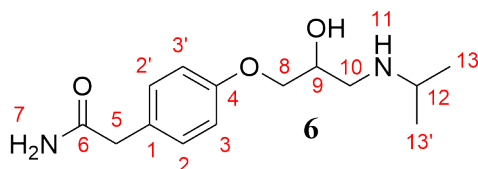
### Optisk rotasjon av (*S*)-**4a**

Optisk rotasjon til (*S*)-**4a** ble bestemt til  $[\alpha]_{589}^{23\text{C}}(1,0 \text{ MeOH}) = + 3,0^\circ$ .

Det er ikke funnet noen tidligere rapporterte verdier for den optiske rotasjonen til (*S*)-**4a**. Det ble ikke gjort noen NMR-analyser av (*S*)-**4a**, men det er ikke usannsynlig at det er noen løsningsmiddelrester. Prøven av (*S*)-**4a** løste seg mye bedre i metanol enn prøven av (*R*)-**4a**. I følge HPLC-analyser er det omtrent 99 % enantiomert overskudd av (*S*)-**4a** i prøven og verdiene for (*R*)-**4a** og (*S*)-**4a** stemmer overens med hverandre med et forhold på 0,9.

#### 2.4.4 Karakterisering av **6**

Forbindelsen **6** ble karakterisert med NMR, MS, IR og smeltepunkt. Figur 2.14 viser **6** med nummerering av atomene. Alle spektrene for **6** vises i Vedlegg D.



Figur 2.14: Forbindelsen **6** med nummerering.

#### NMR-analyser av **6**

Det ble gjort en fullkarakterisering av **6** med NMR. Det ble tatt  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -, COSY, HSQC- og HMBC-spektre av forbindelsen. Tilordninger av kjemiske skift for  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ , samt deres korrelasjoner med hverandre, vises i Tabell 2.12.

#### Massespektroskopi av **6**

Høyoppløselig MS viser  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 267,1710$ . Den teoretiske massen var 266,16 og MS bekrefter molekylformelen.

#### IR-spektroskopi av **6**

Infrarød spektroskopi viser karakteristisk O-H strekkfrekvens ved  $3351\text{ cm}^{-1}$ , samt N-H strekk ved  $3163\text{ cm}^{-1}$ . Toppen ved  $2964\text{ cm}^{-1}$  kommer av metylgruppene. [77] Øvrige topper for amidet og den aromatiske ringen er tilsvarende som for forbindelsene **3a** og **4a**.

Prøven ble løst i MeOD. Metanoltoppen er på 3,31 ppm og vann er på 4,87 ppm. NMR indikerer at produktet er rent.



Tabell 2.12: Tabell for karakterisering av forbindelsen **6** ved hjelp av  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY- og HMBC NMR. Prøven ble løst i MeOD. Forbindelsen karakteriseres ved hjelp av kjemisk skift i  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$ ; multiplisitet, integral og koblingskonstant i  $^1\text{H}$ -spekteret; og koblinger mellom proton og karbon.

Posisjon nr	$^1\text{H}$ [ppm], (mult., int., $J$ )	$^{13}\text{C}$ [ppm]	COSY	HMBC
1	-	129,3	-	-
2	7,23-7,21 (m, 2H)	131,2	3	2', 3, 4, 5, 6
3	6,92-6,90 (m, 2H)	115,7	2	1, 3', 4
4	-	159,2	-	-
5	3,44 (s, 2H)	42,5	-	1, 2, 6
6	-	177,3	-	-
7	Ikke obs.	-	-	-
8	3,97-3,96 (d, 2H, 5,3)	71,8	9	4, 9, 10
9	4,10-4,06 (m, 1H)	69,2	8, 10	8, 10
10	2,95-2,75 (m, 2H)	50,4	9	8, 9
11	1,25-1,24 (d, 1H, 6,5)	-	-	13
12	3,00-2,96 (m, 1H)	50,3	13	13
13	1,17-1,15 (m, 6H)	21,8/21,7	12	12, 13
14	Ikke obs.	-	-	-

### Smeltepunkt til **6**

Smeltepunktet av **6** ble bestemt til 139-141 °C. Dette er noe lavere enn tidligere rapporterte smeltepunkt. I følge NMR er produktet rent og relativt fritt for løsningsmiddel.



### 3. Konklusjon

I dette prosjektet ble **1a** syntetisert med et utbytte på 76 % og studert i en kinetisk oppløsning. *E*-verdien var 226. Trenden med synkende *E*-verdi ved økende omsetning stemte overens med tidligere resultater.

For omestringen av **4a** med vinylbutanat viste CALB (Novozym 435) seg å være en ypperlig biokatalysator. Reaksjonen hadde en *E*-verdi på 643 og resulterte i (*R*)-**4a** med enantiomert overskudd på 90 %. Hydrolysen av (*S*)-**5** gav (*S*)-**4a** med enantiomert overskudd på 99 %. *E*-verdien steg ved økende omsetning.

Forbindelsen **6** ble enkelt syntetisert fra **4a** og **4b**. Omestringen av **6** med CALA (Viazym VZ1030-12) som katalysator var ikke selektiv.



## 4. Videre arbeid

Syntesen av forbindelsen (*R*)-**4a** bør optimaliseres for å kunne syntetisere enantiomert ren (*S*)-atenolol. En helt korrekt dreiningsverdi av (*R*)-**4a** bør også bestemmes.

I tillegg bør det gjøres flere analyser av omestringen av **4a** med CALB for å undersøke trenden med økende *E*-verdier ved høyere omsetninger nøyere. Det er også ønskelig å utføre den CALB-katalyserte hydrolysen av (*S*)-**5** for å se om trenden blir det motsatte av omestringen.

Tilsats av enantiomert ren alkohol eller ester som er forskjellig fra **4a** i en enzymatisk omestringsreaksjon av **4a** vil kunne være med å bestemme hva den molekylære årsaken til endring i selektivitet i CALB kan være.

Omestringen av atenolol (**6**) med CALA bør optimaliseres. Muligens kan reaksjonen gjennomføres i andre typer reaksjonsmedier og med andre preparater av CALA enn Viazym VZ1030-12.



## 5. Eksperimentelt

### 5.1 Generelle metoder

#### 5.1.1 Kjemikalier og løsningsmidler

##### Løsningsmidler og reagenser

Alle kjemikalier brukt til syntesene i oppgaven er kommersielt tilgjengelige og av analytisk kvalitet. Kjemikaliene er kjøpt fra Sigma Aldrich Norway, Oslo, Norge.

For HPLC-analyser ble det brukt løsningsmidler med HPLC-kvalitet.

##### Tørre løsningsmidler

Tørre løsningsmidler (acetonitril og tetrahydrofuran) ble hentet fra en solventrenser (MBraun MB-SPS 800) og oppbevart på en flaske tilsatt molekylærsiev. Ved uttak av løsningsmiddel ble flasken flushet med nitrogengass.

Heksan ble tørket ved oppbevaring på en flaske tilsatt molekylærsiev. Flasken ble flushet ved uttak av løsningsmidler.

##### Enzymer

*Candida antarctica* lipase A (CALA) (Viazym; aktivitet 725 U/g, VZ1030-12, batchnr 080116) immobilisert på mikroporøse beads. Gave fra Viazym BV, Delft, Nederland.

*Candida antarctica* lipase B (CALB) (Novozym 435; 1-2 % vanninnhold; aktivitet ca 10 000 PLU/g; LC200204) immobilisert på en makroporøs akrylresin. Gave fra Novozymes AS, Bagsværd, Danmark.

##### Tørking av molekylærsiev

Molekylærsiev (1/8 pellets, porediameter 3 Å) ble plassert i en porselensskål som ble tørket ved 1000 °C i 24 timer, og deretter oppbevart i eksikator.

### 5.1.2 Kromatografiske analyser

#### Gasskromatografi

GC-analyser ble gjennomført på et Varian 3380-instrument, begge med autosamplere. Det ble benyttet splittinjektor (200°C) og flammeioniseringsdetektor (FID, 250°C). Kolonnen som ble brukt var en CP Chirasil DEX-kolonne (25 m · 0.25 mm,  $d_f$  0,25  $\mu\text{m}$ . Gassflow 7,5 mL min<sup>-1</sup>; Splitflow: 60 mL min<sup>-1</sup>. Temperaturprogram: 100-110 °C (10 °C/min); 110-120 °C (2 °C/min); 120-140 °C (1 °C/min); 140-150 °C (0,5 °C/min); 150-200 °C (20 °C/min).

#### HPLC

HPLC-analyser ble gjennomført på et Agilent-væskeskromatografi-instrument (1100). Manuell injektor (Rheodyne 77245i/Agilent, 10  $\mu\text{L}$  -loop). Det ble brukt to Chiralcel OD-H kolonner (2004, 2015) (Daicel, Chiral Technologies Europe, 250 · 4,6 mm ID), og en Chiralpak AD-kolonne.

For separasjon av **4a**: 83:17 heksan:2-propanol, 1,000 mL min<sup>-1</sup>, UV 254 nm. For separasjon av **6**: 70:28,5:0,15 heksan:2-propanol:dietylamin, 0,800 mL min<sup>-1</sup>, UV 276 nm.

#### Tynnsjikt-kromatografi

TLC ble gjennomført med plater av Merck silika 60 F<sub>254</sub> og detektert med UV ved  $\lambda = 254$  nm.

#### Flash-kromatografi

Flash-kromatografi ble gjennomført med silikagel kjøpt fra Sigma-Aldrich Norway, Oslo, Norge (porestørrelse 60 Å, 230-400 mesh partikkelstørrelse, 40-63  $\mu\text{m}$  partikkelstørrelse).

### 5.1.3 Spektroskopiske analyser

Alle analysene ble tatt opp på et Bruker Advance DPX 400-instrument.

Alle NMR-spektre (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC og HMBC)-spektre vises i vedleggene.



## **Massespektroskopi**

Nøyaktig massebestemmelse i positiv og negativ innstilling ble gjennomført på et «Synapt G2-S» Q-TOF instrument fra Waters<sup>TM</sup>. Prøver ble ionisert ved bruk av en ASAP probe (APCI). Beregnet masse og spekterprosessering ble gjort med Waters<sup>TM</sup> Software (Masslynx V4.1 SCN871).

Alle MS-spektre vises i vedleggene.

## **Infrarød spektroskopi**

Infrarød spektroskopi ble gjennomført på et Nexus FT-IR instrument.

Alle IR-spektre vises i vedleggene.

### **5.1.4 Øvrige analyser**

#### **Optisk rotasjon**

Optisk rotasjon ble gjennomført på et PerkinElmer (modell 341) polarimeter, med en 10 cm lang celle. Prøvene ble løst i metanol ved romtemperatur (23 °C). Lyset hadde en bølgelengde på 589 nm.

#### **Smeltepunkt**

Smeltepunktsanalyser ble gjennomført på et Stuart SMP40 «automatic melting point»-apparat.

#### **Risteinkubator**

Det ble benyttet en New Brunswick G24 Environmental Incubator Shaker til enzymreaksjonene.

## 5.2 Organiske synteser

### 5.2.1 Syntese av 1-fenoksy-3-klor-2-propanol (1a)

I henhold til prosedyren til Chini *et. al* og Bevinakatti *et. al* [26, 72] Saltsyre (37%, 50 mL) ble tilsatt en kolbe med en løsning av 1,2-epoksy-3-fenoksypropan (3,31 g, 22,02 mmol) og diklormetan (25 mL) under omrøring ved 0°C. Full om-dannelse ble bekreftet med TLC (40:1 diklormetan:acetonitril,  $R_f=0,42$ ) etter 30 minutter. Den organiske fasen ble dampet inn og rensset med kolonne (40:1 diklor-metan:acetonitril). Dette resulterte i produktet **1a**, en fargeløs væske (3,11 g, 16,7 mmol, 76 % utbytte).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz,  $\delta$ ): 7,29-7,27 (m, 2H, aroma-tisk); 6,98-6,96 (m, 1H, aromatisk); 9,91-6,89 (m, 2H, aromatisk); 4,21-4,17 (m, 1H, -CH-); 4,08-4,03 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-); 3,77-3,68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Cl); 2,81-2,80 (d, 1H, OH;  $J=6,0$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR: 158,3; 129,7 (2C); 121,5; 114,6 (2C); 70,0; 68,5; 46,0. IR ( $\text{cm}^{-1}$ , uforynnet): 3405, 751, 690. GC ( $t_R=38,13$  min (*R*); 38,67 min (*S*)).

### 5.2.2 Syntese av 4-(3-klor-2-hydroksypropoksy)benzamid (3a)

Reaksjonen ble gjennomført i henhold til Bevinakatti *et. al* og Jacobsen *et. al* [26, 51] 4-Hydroksybenzamid (1,013g, 7,39 mmol) og epiklorhydrin (7 mL) ble blandet og tilsatt en løsning av natriumhydroksid (0,44 g) og vann (15 mL). Reaksjonen stod under omrøring i ca 24 timer. Det hvite faste stoffet ble vasket i diklormetan og filtrert, og deretter tilsatt 25 mL dilitiumtetraalkylammoniumklorid i THF (0,1 M) og tørr THF (5 mL). Reaksjonen stod under omrøring i ca 72 timer. Reaksjonsblan-dingen ble deretter tilsatt natriumfosfatbuffer (0,1 M, 15 mL). THF ble dampet av og den gjenværende blandingen ble ekstrahert med etylacetat (5x15 mL) og vasket med mettet natriumkloridløsning (2x15 mL). Den organiske fasen ble dampet inn og resulterte i det gulbrune faste stoffet **3a** (0,578 g, 2,52 mmol, 34 %).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 400 MHz,  $\delta$ ): 7,86-7,84 (m, 2H, aromatisk); 7,03-7,01 (m, 2H, aromatisk); 4,17-4,10 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-); 4,17-4,10 (m, 1H, -CH-); 3,78-3,68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Cl).  $^{13}\text{C}$  NMR: 172,0; 163,1; 130,7 (2C); 127,4; 115,3 (2C); 70,8; 70,3; 46,6. IR ( $\text{cm}^{-1}$ , uforynnet): 3352, 3176, 1662. Sm. p: 116-118 °C.

### 5.2.3 Syntese av 1-[p-karbamoylmetyl]fenoksy]-3-klorpropan-2-ol (4a)

Reaksjonen ble gjennomført i henhold til Bevinakatti *et. al* og Jacobsen *et. al* [26, 51] 4-Hydroksyfenylacetamid (2,52 g, 16,6 mmol) og epiklorhydrin (13 mL) ble

blandet og tilsatt en løsning av natriumhydroksid (0,50 g, 12,3 mmol) og vann (5 mL). Reaksjonen stod under omrøring i 48 timer i romtemperatur til full omsetning målt med TLC (4:1 diklormetan:metanol). Dette gav **4a** og **4b**. Det hvite faste stoffet ble vasket i diklormetan og filtrert, og deretter tilsatt 30 mL dilitiumtetraklorokupratløsning i THF (0,1 M). Reaksjonen stod under omrøring i 24 timer under inert atmosfære. Reaksjonsblandingen ble tilsatt natriumfosfatbuffer (0,1 M, 30 mL). THF ble dampet av og den gjenværende blandingen ble ekstrahert med etylacetat (5x20 mL) og vasket med mettet natriumkloridløsning (2x20 mL). Etylacetat ble dampet av som resulterte i produktet **3a** (0,901 g, 3,70 mmol, 22 %).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 400 MHz,  $\delta$ ): 7,23-7,21 (m, 2H, aromatisk); 6,92-6,90 (m, 2H, aromatisk); 4,13-4,10 (m, 1H, -CH-); 4,06-4,02 (m, 2H, -O-CH<sub>2</sub>-); 3,77-3,66 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-Cl); 3,44 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR: 177,4; 159,2; 131,3 (2C); 129,4; 115,7 (2C); 71,0; 70,2; 46,8; 42,5. IR (cm<sup>-1</sup>, ufortynnet): 3349, 1633, 1241, 706. HPLC:  $t_R = 37,74$  min (S); 42,66 min (R). Sm. p: 129-132 °C.

#### 5.2.4 Syntese av atenolol (6)

Reaksjonen ble utført med utgangspunkt i prosedyren til Bevinakatti *et. al.* [26] 4-Hydroksyfenylacetamid (2,52 g, 16,6 mmol) og epiklorhydrin (13 mL, 165 mmol) ble blandet og tilsatt en løsning av natriumhydroksid (0,33 g, 8,2 mmol) og vann (5 mL). Reaksjonen stod under omrøring i 48 timer i romtemperatur til full omsetning målt med TLC (4:1 diklormetan:metanol). Dette resulterte i en blanding av **4a** og **4b** som ble filtrert av. Blandingen ble reagert uten videre opparbeidelse ved å tilsette isopropylamin (10 mL) og vann (3 mL). Reaksjonsblandingen stod under omrøring i 24 timer i romtemperatur til TLC viste full omsetning (4:1 diklormetan:metanol,  $R_f=0,09$ ). Overskudd av løsningsmiddel ble dampet av og av råproduktet (5,49 g) ble 1,027 g (3,86 mol) omkrystallisert i acetonitril. Dette gav produktet **6** (0,3474 g, 1,30 mmol, 34 % (av omkrystalliseringen)).  $^1\text{H}$  NMR (MeOD, 400 MHz,  $\delta$ ): 7,23-7,21 (m, 2H, aromatisk); 6,92-6,90 (m, 2H, aromatisk); 4,10-4,06 (m, 1H, -CHOH-); 3,97-3,96 (d, 2H,  $J=5,3$  Hz, OCH<sub>2</sub>-); 3,00-2,96 (m, 1H, -CH-); 2,95-9,75 (m, 2H, CH<sub>2</sub>NH); 1,25-1,24 (d, 1H,  $J=6,5$  Hz); -NH-); 1,17-1,15 (m, 6H, Me).  $^{13}\text{C}$  NMR: 177,3; 159,2; 131,2; 129,3; 115,3; 71,8; 69,2; 50,4; 50,3; 42,5; 21,8; 21,7. IR (cm<sup>-1</sup>, ufortynnet): 3351, 3163, 2964, 1634, 1238, 795. HPLC (80:20:0,1 heksan:isopropanol:DEA, 0,800 mL min<sup>-1</sup>),  $t_{R1}=18,16$  min;  $t_{R2}=26,40$  min).

## 5.3 Enzymkatalyserte kinetiske oppløsninger av rasemater

### 5.3.1 Generell prosedyre

Rasemisk substrat ( $1,31 \cdot 10^{-4}$  mol) og vinylbutanat ( $6,5 \cdot 10^{-4}$  mol) ble tilsatt et glass med løsningsmiddel (3 mL). Reaksjonen ble startet ved å tilsette enzym (20 mg) og ved å sette prøven inn i risteinkubator. Prøver ble tatt ut ved jevne mellomrom og analysert med HPLC eller GC.

Det enantiomere forholdet ble regnet ut ved hjelp av programvaren *E&K Calculator 2.1b0 PCC*. [41]

### 5.3.2 Derivatisering av rasemiske forbindelser

I et GC-glass med egnet løsningsmiddel (heksan, metanol eller acetonitril) ble det tilsatt ca 20 mg substrat, én dråpe pyridin og én dråpe derivatiseringsreagens (smørsyreanhydrid eller eddiksyreanhydrid). Prøven ble satt på varmeplate på  $60^{\circ}\text{C}$  i én time og deretter analysert på GC eller HPLC.

### 5.3.3 Omestring av **1a** med CALB

I tørr heksan (3 mL) ble det tilsatt **1a** og vinylbutanat. Deretter ble det tilsatt CALB (23 mg) og reaksjonsglasset ble plassert i en inkubator ( $30^{\circ}\text{C}$ , 200rpm). Prøver ble tatt ut hvert 30. minutt de første to timene, og deretter hver time. Det ble tatt ut en prøve etter fem timer og etter 23 timer. Prøvene ble analysert ved hjelp av gasskromatografi, og omsetning,  $ee_S$  og  $ee_P$  ble regnet ut fra kromatogrammene. Disse verdiene ble brukt i *E&K Calculator* for å finne det enantiomere forholdet til reaksjonen. Det ble gjennomført to paralleller av denne reaksjonen.  $E_1 = 228$ ,  $E_2 = 226$ .

### 5.3.4 Omestring av **4a** med CALB

I tørr acetonitril (3 mL) ble det tilsatt **3a** (32,7 mg, 0,134 mmol) og vinylbutanat (76,8 mg, 0,673 mmol). Det ble også tilsatt molekylærsieve for å holde løsningen tørr. Deretter ble det tilsatt CALB (49 mg) og reaksjonsglasset ble plassert i en risteinkubator ( $30^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm). Prøver ble tatt ut hver time i seks timer, deretter etter to timer, og tre timer. Etter det ble det tatt ut prøver fra 21 til 27 timer.

Prøvene ble analysert ved hjelp av HPLC, og omsetning,  $ee_S$  og  $ee_P$  ble regnet ut fra kromatogrammene. Disse verdiene ble brukt i *E&K Calculator* for å finne det enantiomere forholdet til reaksjonen. Det ble gjennomført to paralleller av denne reaksjonen.  $E_1 = 701$ ,  $E_2 = 643$ .

### 5.3.5 Omestring av atenolol (6) med CALA

I tørr acetonitril (3 mL) ble det tilsatt **6** (35,1 mg, 0,132 mmol) og vinylbutanat (81,3 mg, 0,712 mmol) og én molekylær sievepellett. Deretter ble det tilsatt CALA (24 mg) og reaksjonsglasset ble plassert i en risteinkubator (30 °C, 200 rpm). Det ble hentet ut prøver regelmessig over 4 døgn og prøvene ble analysert med HPLC (80:20:0,1 heksan:isopropanol:DEA, 0,800 mL min<sup>-1</sup>).

### 5.3.6 Storskala enzymkatalysert kinetisk oppløsning av 4a med CALB

Alkoholen **4a** (0,56 g, 2,3 mmol) og vinylbutanat (1,43 g, 12,5 mmol) ble tilsatt til en flaske med tørr acetonitril (40 mL) og molekylær sieve. For å starte reaksjonen ble CALB (0,71 g) ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble satt i risteinkubator (30°C). Etter 24 timer ble reaksjonen stoppet, enzym og molekylær sieve filtrert av og reaksjonsblandingen dampet av. Esteren *S*-**5** og alkoholen *R*-**4a** ble separert med flash-kolonne (etylacetat). Dette gav (*S*)-**5** (0,13 g, 0,41 mmol, 18 %). HPLC ( $t_R=21,83$  min), og (*R*)-**4a** (0,090, 0,37 mmol, 16 %). HPLC ( $t_R=33,80$  (*S*); 37,45 min (*R*),  $ee = 90$  %.  $[\alpha]_{589}^{23^\circ C}(1,0 \text{ MeOH}) = -2,7^\circ$ .

### 5.3.7 Enzymkatalysert hydrolyse av (*S*)-**5** med CALB

Hydrolysen ble gjennomført med utgangspunkt i prosedyren til Jacobsen *et. al* [55]. (ref.)*S*-**5** (0,092 g, 0,29 mmol) og fosfatbuffer (0,1 M, pH=7, 4 mL) ble overført til en flaske. Det ble tilsatt enzym (0,8 g) og reaksjonsflasken ble satt i risteinkubator (30°C). Etter 48 timer ble reaksjonen stoppet. Det ble tatt en prøve som ble ekstrahert og analysert på HPLC. Enzym ble filtrert av og blandingen ble ekstrahert med etylacetat (5x2 mL). Blandingen ble dampet inn for å gi av *S*-**4a** (0,034 g, 0,14 mmol, 48 %). HPLC (80:20 heksan:isopropanol, 1,000 mL min<sup>-1</sup>):  $t_R=36,91$  min,  $ee = 99$  %.  $[\alpha]_{589}^{23^\circ C}(1,0 \text{ MeOH}) = +3,0^\circ$ .



## Bibliografi

- [1] L. Guo-Qiang, Y. Qi-Dong, C. Jie-Fei, *Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action*, John Wiley & Sons Ltd., **2011**.
- [2] I. Agranat, S. R. Wainschtein, E. Z. Zusman, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 972–973.
- [3] J. C. Israel Agranat, Hava Caner, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 2002, 753–768.
- [4] R. A. Glennon, R. Young i *Drug Discrimination*, John Wiley & Sons, Inc., **2011**, kap. Role of Stereochemistry in Drug Discrimination Studies, s. 129–161.
- [5] R. A. Aitken, S. N. Kilenyi, *Asymmetric Synthesis*, Blackie Academics & Professional, **1992**.
- [6] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H.Freeman & Co Ltd, **2013**.
- [7] T. Liljefors, P. Krogsgaard-Larsen, U. Madsen, *Textbook of Drug Design and Discovery*, CRC Press, **2002**.
- [8] M Klouman, A Aasberg, T.-E. Wideroe, *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **2011**.
- [9] R. Selmer, G. E. Hovda, S. Graff-Iversen, S. Sakshaug, *Norsk Folkehelseinstitutt* **2014**.
- [10] S. I. Fox, *Human Physiology*, McGraw Hill, **2013**.
- [11] T. Johannesen, Hypertensjon - en omstridt tilstand, Norges Helseinformatikk, **2013**, <http://nhi.no/seminarer/hypertensjon/nyhetsartikler/hypertensjon-en-omstridt-tilstand-39403.html>.
- [12] Q&As on Hypertension, Verdens Helseorganisasjon (WHO), **2013**, <http://www.who.int/features/qa/82/en/>.
- [13] M. G. Khan, *Cardiac Drug Therapy*, Humana Press, **2007**.
- [14] J. Agustian, A. H. Kamaruddin, S. Bhatia, *Process Biochem.* **2010**, *45*, 1587–1604.
- [15] Q. Che, M. J. Shreiber, M. A. Rafey, *Cleve. Clin. J. Med.* **2009**, *76*, 533–542.
- [16] B. Carlberg, O. Samuelsson, L. H. Lindholm, *The Lancet* **2004**, *364*, 1684–1689.
- [17] I. B. Wilkinson, C. M. McEniery, J. R. Cockcroft, *The Lancet* **2006**, *367*, 627–629.
- [18] Felleskatalogen, <http://www.felleskatalogen.no/medisin/atenolol-mylan-546528>.
- [19] K. Landmark, *Indremedisineren* **2014**.
- [20] K. Stoschitzky, G. Egginger, G. Zernig, W. Klein, W. Lindner, *Chirality* **1993**.

- [21] K. Stoschitzky, W. Lindner, G. Zernig, *J. Clin. Bas. Cardiol.* **1998**, *1*, 15–19.
- [22] P. Bøckmann, masteroppg., Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet, **2014-2016**.
- [23] F. A. Carey, R. J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry Part B: Reaction and Synthesis*, Springer, **2007**.
- [24] R. B. Kawthekar, W.-T. Bi, G.-J. Kim, *Appl. Organomet. Chem.* **2008**, *22*, 583–591.
- [25] S. R. Mehta, B. M. Bhawal, V. H. Deshpande, M. K. Guriar, English, *patent*, US 6,982,349 BI, **2006**.
- [26] H. S. Bevinakatti, A. A. Banerji, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6003–6005.
- [27] B. P. Dwivedee, S. Ghosh, J. Bhaumik, L. Banoth, U. Chand Banerjee, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 15850–15860.
- [28] O. Barbosa, C. Ortiz, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 124–132.
- [29] S. V. Darnle, P. N. Patil, M. M. Salunkhe, *Synth. Commun.* **1999**, *29*, 3855–3862.
- [30] A. Rouf, S. Taneja, *Chirality* **2014**, *26*, 63–78.
- [31] ECHA - European Chemicals Agency, <http://echa.europa.eu/about-us>.
- [32] P. T. Anastas, J. C. Warner, *Green chemistry : theory and practice*, Oxford University Press, **1998**.
- [33] P. Hoyos, V. Pace, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, *Current Green Chemistry* **2014**.
- [34] W. Aehle, *Enzymes in Industry: Production and Applications*, Wiley, **2007**.
- [35] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, **1997**.
- [36] A. R. Moen, B. H. Hoff, L. K. Hansen, T. Anthonsen, E. E. Jacobsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1551–1554.
- [37] H. B. Kagan, J. C. Fiaud, *Topics in Stereochemistry. Kinetic Resolution*, *bd. 18*, (red.: E. L. Eliel, S. H. Wilen), Wiley, **1988**.
- [38] A. Straathof, J. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559–571.
- [39] I. H. Segel, *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons Ltd., **1993**.
- [40] T. Anthonsen, J. A. Jongejan i *Lipases Part B: Enzyme Characterization and Utilization*, (red.: E. A. D. Byron Rubin), Methods in Enzymology, Academic Press, **1997**, s. 473–495.
- [41] H. W. Anthonsen, B. H. Hoff, T. Anthonsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2633–2638.
- [42] L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochim. Biophys. Acta* **1958**, *30*, 513–521.
- [43] R. Verger, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32–38.
- [44] H. Z. Cong Li, Tianwei Tan, W. Feng, *J. Biol. Chem.* **2010**, 28434–28441.

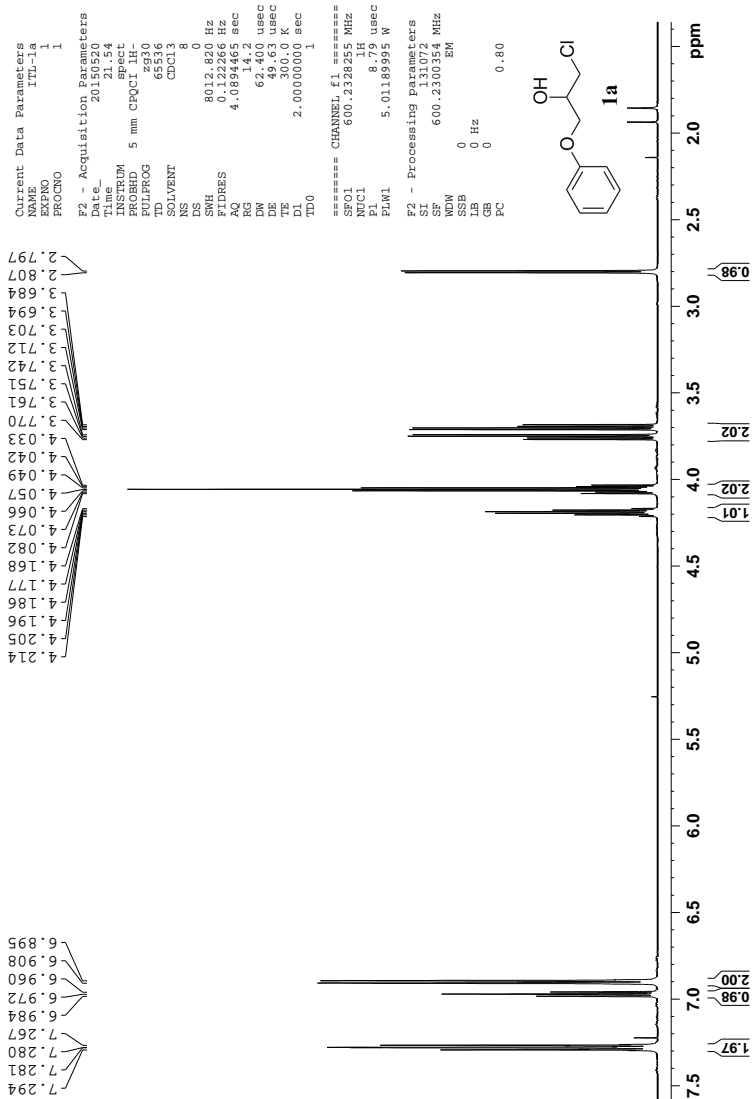


- [45] T. Anthonsen, *Basic Biotechnology - Synthesis of Chemicals using Enzymes*, (red.: C. Ratledge, B. Kristiansen), Cambridge University Press, **2001**.
- [46] J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293–308.
- [47] M. Martinelle, M. Holmquist, K. Hult, *BBA - Lipid Lipid Met.* **1995**, *1258*, 272–276.
- [48] D. Rotticci, J. C. Rotticci-Mulder, S. Denman, T. Norin, K. Hult, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 766–770.
- [49] E. E. Jacobsen, B. H. Hoff, T. Anthonsen, *Chirality* **2000**, *12*, 654–659.
- [50] B. H. Hoff, L. Ljones, A. Rønstad, T. Anthonsen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *8*, 51–60.
- [51] E. E. Jacobsen, T. Anthonsen, *Can. J. Chem.* **2002**, *80*, 577–581.
- [52] S. M. Lystvet, B. H. Hoff, T. Anthonsen, E. E. Jacobsen, *Biocatal. Biotransform.* **2010**, *28*, 272–278.
- [53] E. Fuglseth, T. Anthonsen, B. H. Hoff, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1290–1295.
- [54] E. E. Jacobsen, E. van Hellemond, A. R. Moen, L. C. V. Prado, T. Anthonsen, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8453–8455.
- [55] E. E. Jacobsen, L. S. Andresen, T. Anthonsen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 847–850.
- [56] E. Busto, L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernandez, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013*, 4057–4064.
- [57] A. Sikora, T. Siódmiak, M. P. Marszall, *Chirality* **2014**, *26*, 663–669.
- [58] Y. Wikmark, M. Svedendahl Humble, J.-E. Backvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4284–4288.
- [59] S. Naik, A. Basu, R. Saikia, B. Madan, P. Paul, R. Chatterjee, J. Brask, A. Svendsen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, Selected Papers from the {IXth} International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations, 18–23.
- [60] D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandstrom, J.-E. Backvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109–119.
- [61] S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2693–2696.
- [62] C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1629–1631.
- [63] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81–87.
- [64] A. Ducret, M. Trani, R. Lortie, *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 212–216.
- [65] S. Mayer, V. Schurig, *Journal of High Resolution Chromatography* **1992**, *15*, 129–131.

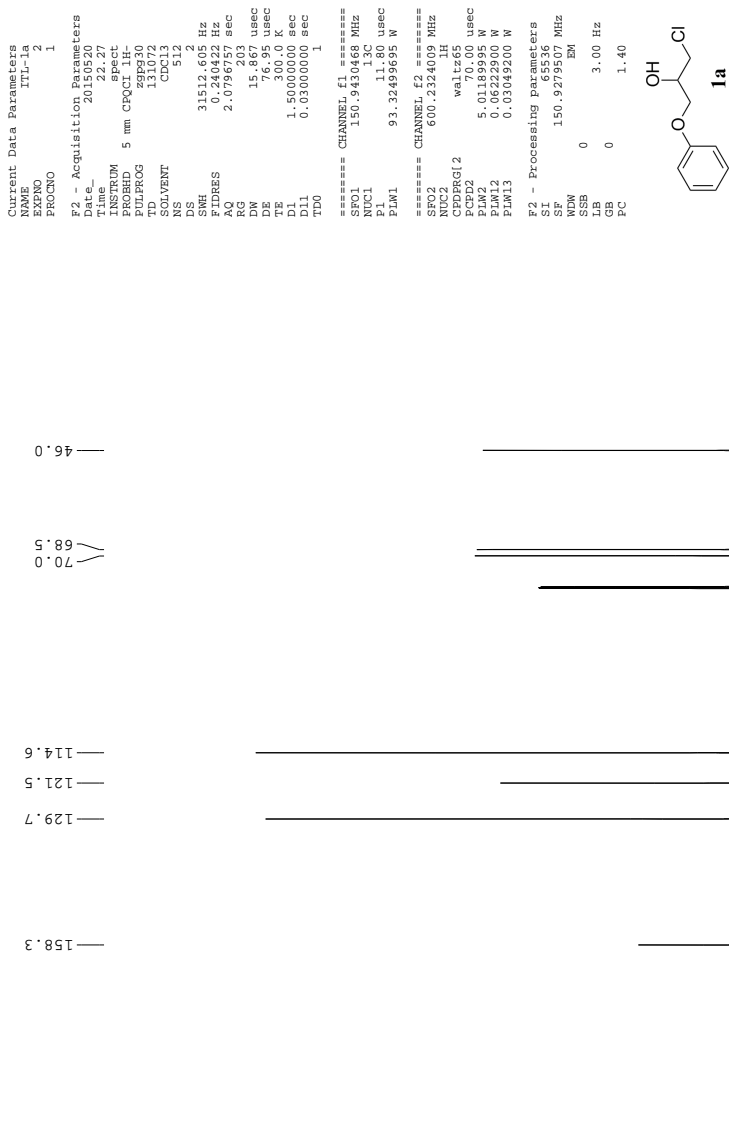
- 
- [66] I. Ali, H. Y. Aboul-Enein i *Chiral Separation Techniques*, (red.: G. Subramanian), Wiley, **2007**.
- [67] Y. Hedeland, K. Pettersson i *Handbook of HPLC*, (red.: D. Corradini), CRC Press, 2nd, **2011**.
- [68] V. A. Davankov, *Chirality* **1997**, *9*, 99–102.
- [69] U. J. Meierhenrich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4252–4253.
- [70] C. F. Poole, *The Essence of Chromatography*, Elsevier, **2003**.
- [71] Y. Okamoto, Y. Kaida, *J. Chromatogr. A* **1994**, *666*, Chiral Separations Fundamental Aspects and Applications, 403–419.
- [72] M. Chini, P. Crotti, C. Gardelli, F. Macchia, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 3805–3812.
- [73] Y. Zhou, C. Ma, Y. Wang, Q.-M. Zhang, Y.-Y. Zhang, J. Fu, H. Gao, L.-X. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *2*, 48–55.
- [74] E. E. Jacobsen, T. Anthonsen, M. F. El-Behairy, E. Sundby, M. N. Aboul-Enein, M. I. Attia, A. A. E.-S. El-Azzouny, K. M. Amin, M. Abdel-Rehim, *Int. J. Chem.* **2012**.
- [75] W. Ding, M. Li, R. Dai, Y. Deng, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1376–1379.
- [76] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [77] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Wiley & Sons Inc, **2005**.



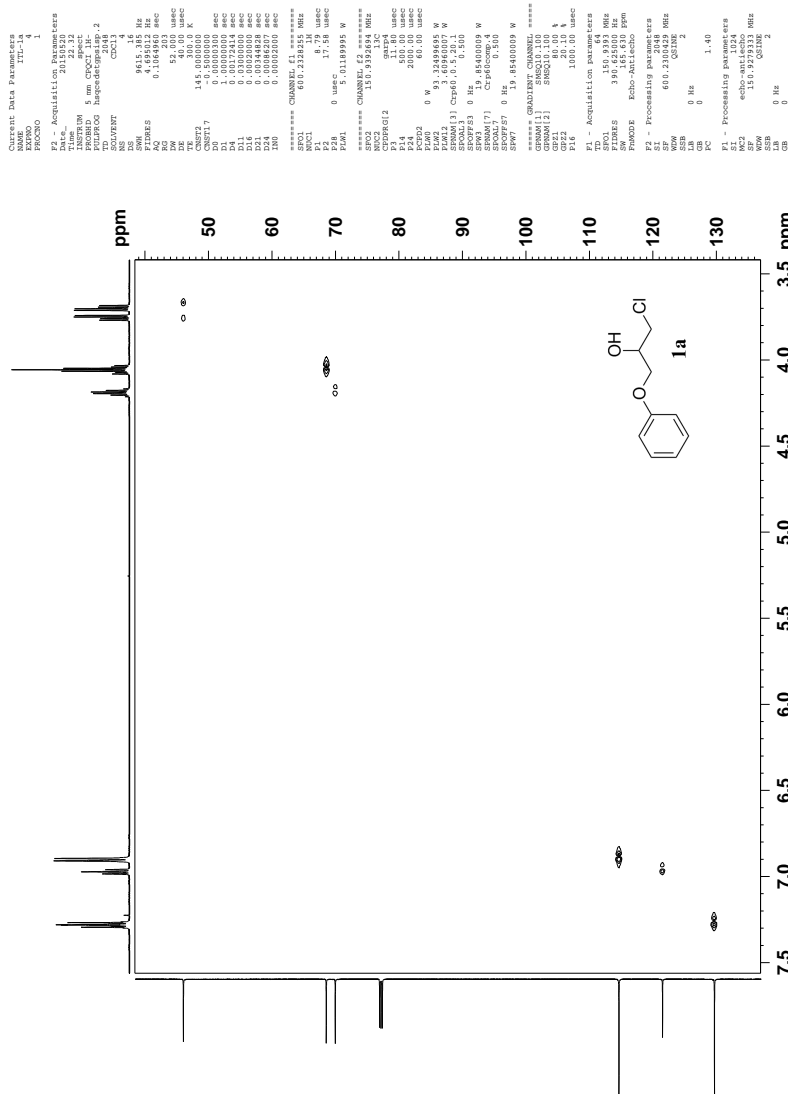
# A. Vedlegg 1: 1a



Figur A.1:  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av 1a.



Figur A.2:  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrum av **1a**.



Figur A.3: HSQC NMR-spektrum av 1a.

```

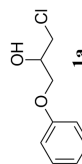
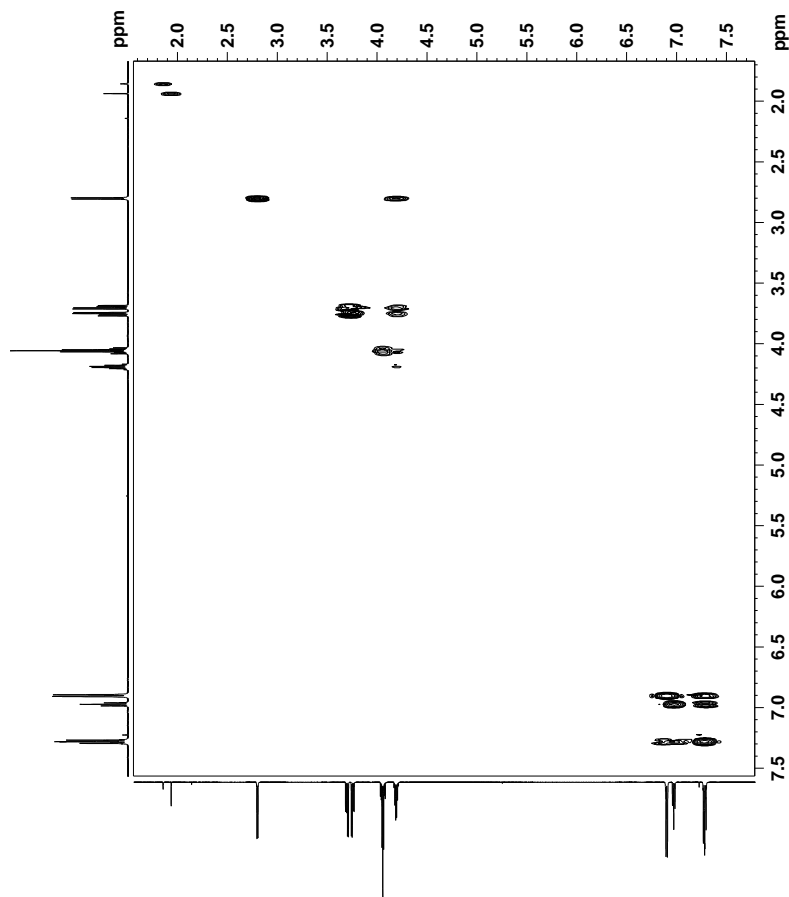
Current Data Parameters
NAME      TTL-1a
EXPNO    3
PROCNO   1

=====
Date_ Acquired      20150520
Date_ Time          22.28
PROBHD1  5 mm CBO-1H
PULPROG  zgpg30
PCPDPRG2  cosyprf
SOLVENT  CDCl3
NS        1
DS        1
SWH        9615.385 Hz
FIDRES    2.347516 Hz
AQ        0.2129729 sec
RG         9
WDW        EM
SSB        0
LB         300.0 usec
TE         300.0 K
D0         0.0000300 sec
D1         0.0001000 sec
D2         0.0001000 sec
D3         0.0001000 sec
D4         0.0001000 sec
D5         0.0001000 sec
D6         0.0020000 sec
D7         0.0001000 sec
D8         0.0001000 sec
D9         0.0001000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1         8.79 usec
PL1        0.00 dB
PC1        1.00
===== CHANNEL g1 =====
NUC2      13C
P2         8.79 usec
PL2        0.00 dB
PC2        1.00
===== GRADIENT CHANNEL =====
GENDM1(1) SMSO10.100
GZ21      20.00 %
P10       1000.00 usec

F1 - Acquisition Parameters
SFO1      600.2328 MHz
FIDRES    150.240387 Hz
AQ        0.2129729 sec
RG         9
WDW        EM
SSB        0
LB         300.0 usec
TE         300.0 K
D0         0.0000300 sec
D1         0.0001000 sec
D2         0.0001000 sec
D3         0.0001000 sec
D4         0.0001000 sec
D5         0.0001000 sec
D6         0.0020000 sec
D7         0.0001000 sec
D8         0.0001000 sec
D9         0.0001000 sec

F2 - Processing Parameters
SI         2048
SF         600.2300311 MHz
WDW        0
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing Parameters
SI         2048
SF         600.2300311 MHz
WDW        0
SSB        0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```



Figur A.4: COSY NMR-spektrum av 1a.





## Elemental Composition Report

Page 1

Tolerance = 5.0 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

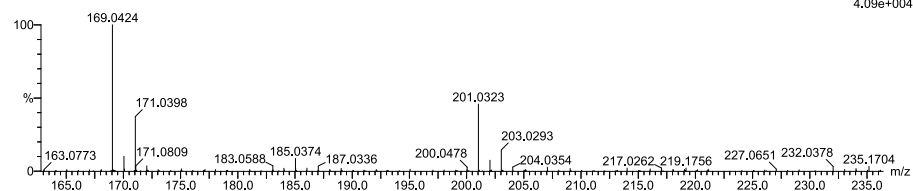
48 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 O: 0-100 Cl: 0-2

NT-MSLAB-Operator-SVG

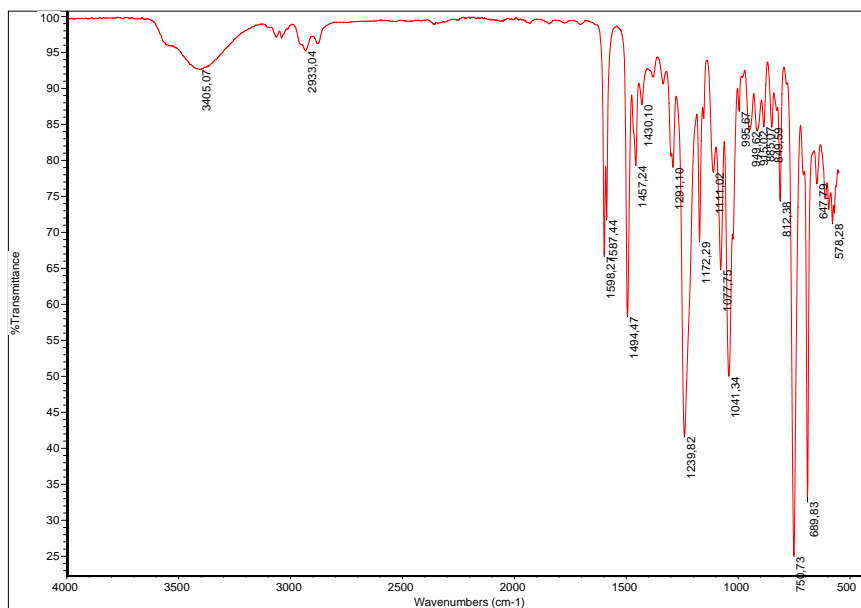
2015-190 107 (2.103) AM2 (Ar,35000,0,0,00,0,00)

1: TOF MS ASAP+  
4.09e+004

Minimum: 80.00  
Maximum: 100.00

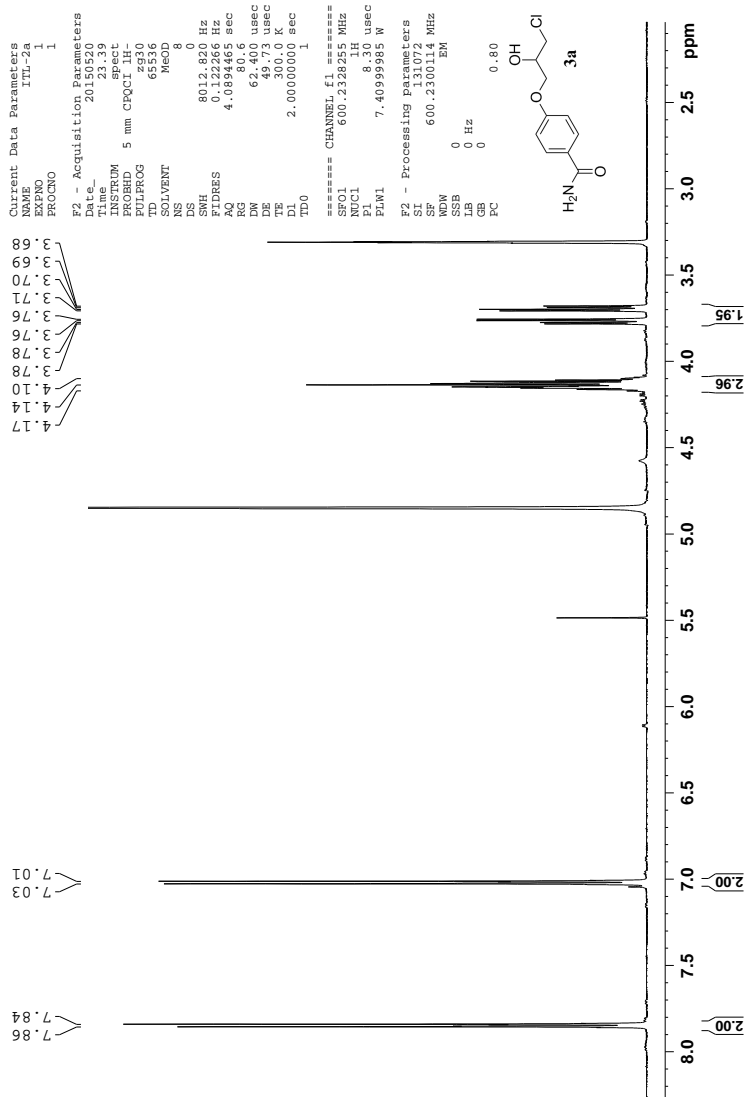
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
169.0424	100.00	169.0420	0.4	2.4	4.5	214.5	n/a	n/a	C9 H10 O Cl

Figur A.6: MS-spektrum av 1a.

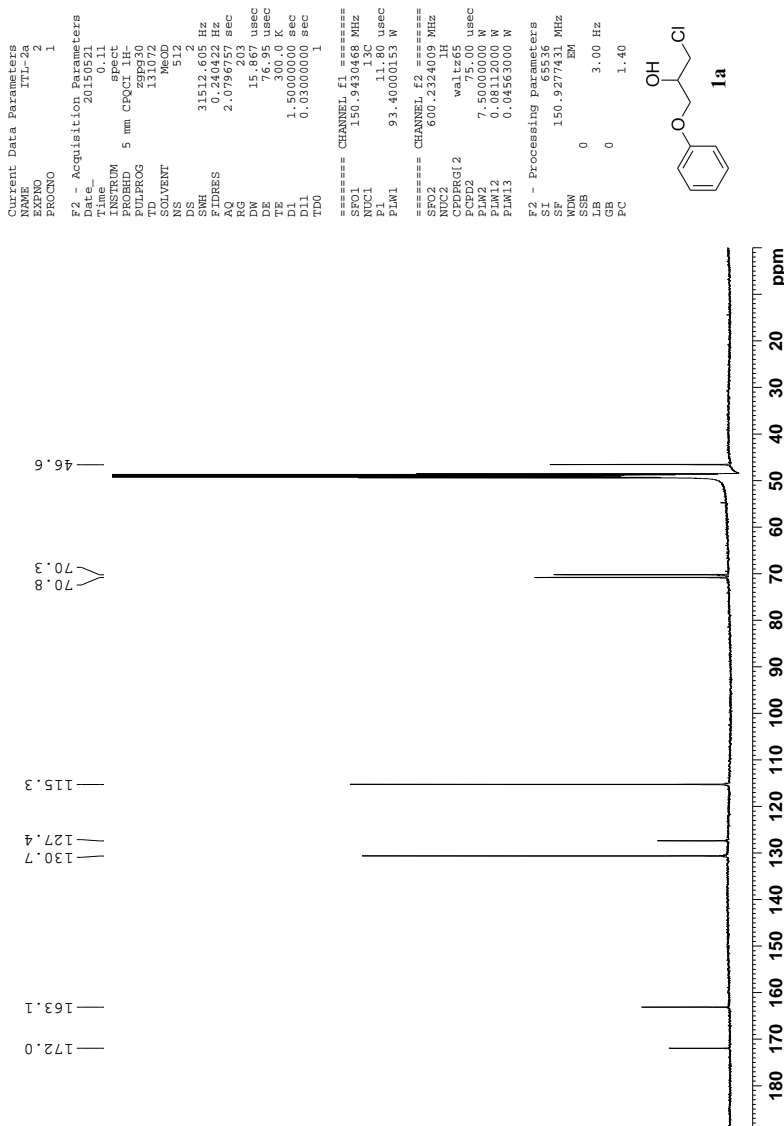


Figur A.7: IR-spektrum av 1a.

## B. Vedlegg 2: 3a

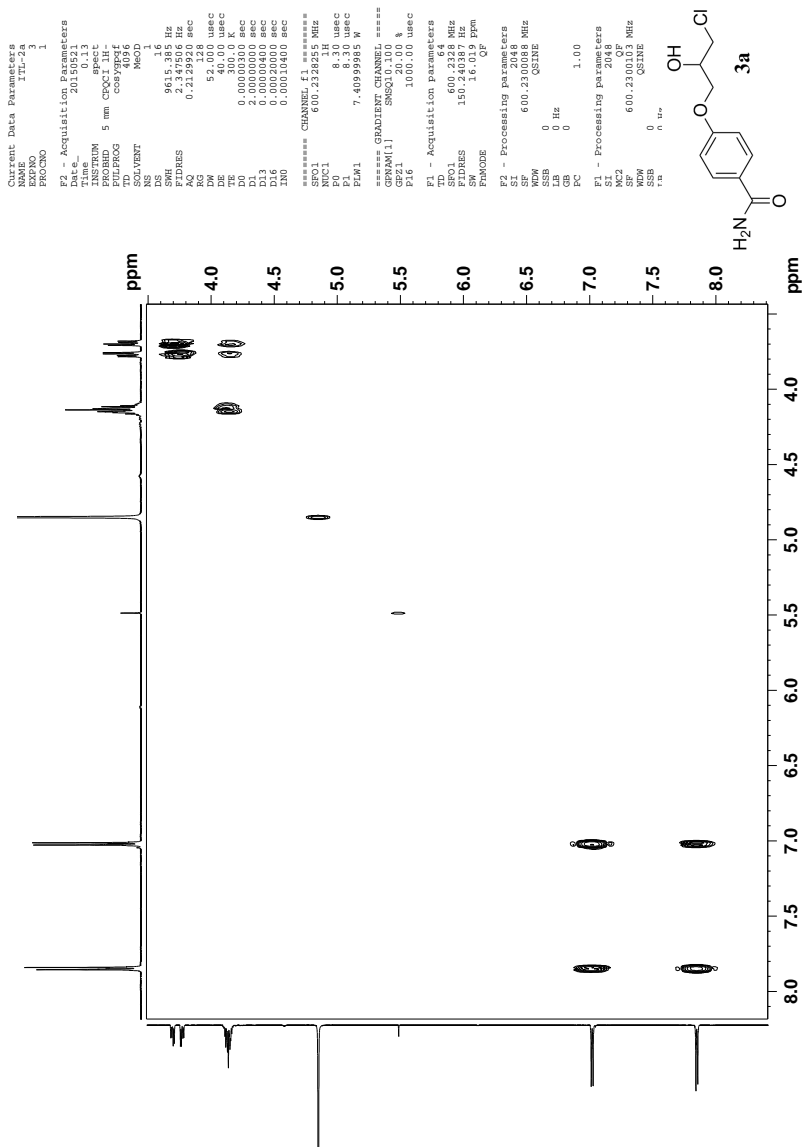


Figur B.1:  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av **3a**.



Figur B.2: <sup>13</sup>C NMR-spektrum av 3a.





Figur B.4: COSY NMR-spektrum av 3a.



## Elemental Composition Report

Page 1

## Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 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

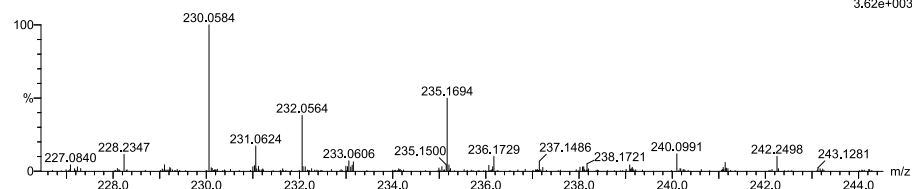
626 formula(e) evaluated with 2 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 N: 0-50 O: 0-100 Cl: 0-2

NT-MSLAB-Operator-SVG

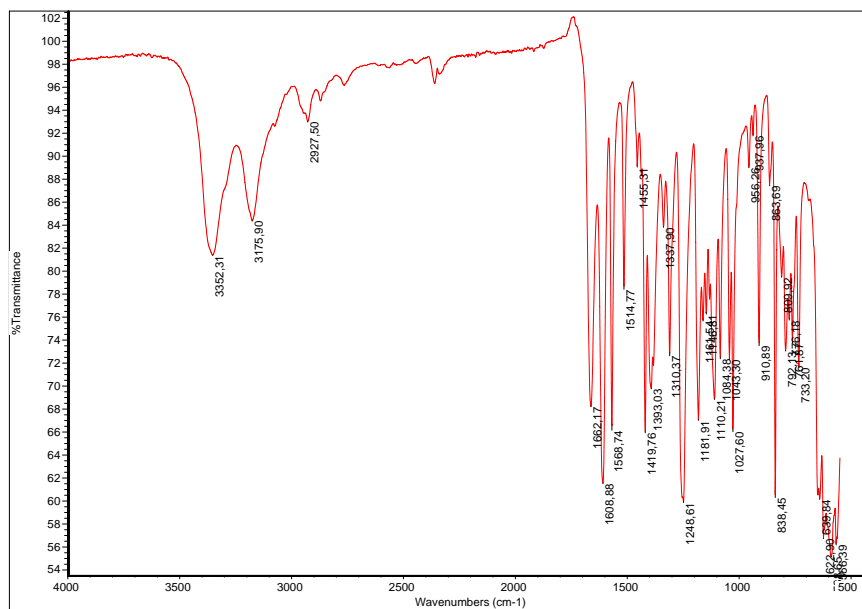
2015-191 44 (0.880) AM2 (Ar,35000,0,0,00,0,00); Cm (44)

1: TOF MS ASAP+  
3.62e+003

Minimum: -1.5  
Maximum: 5.0 5.0 50.0

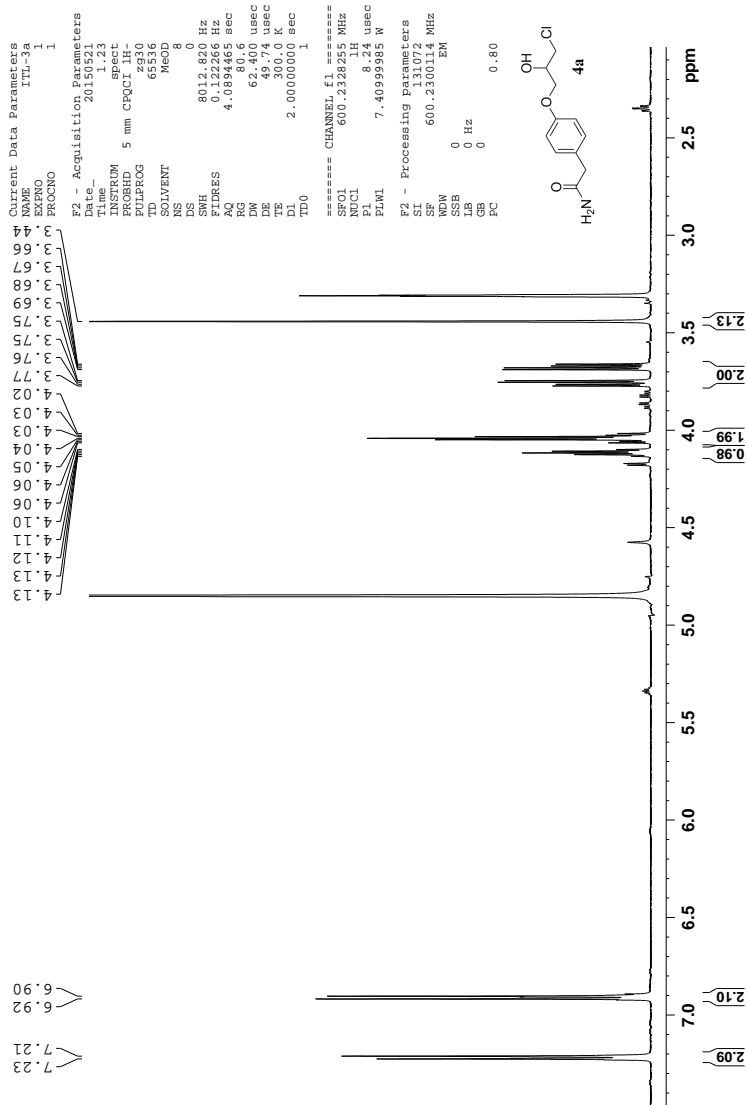
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
230.0584	230.0584	0.0	0.0	4.5	292.0	0.000	99.97	C10 H13 N O3 Cl
	230.0575	0.9	3.9	0.5	300.1	8.105	0.03	C5 H14 N5 O Cl2

Figur B.6: MS-spektrum av 3a.



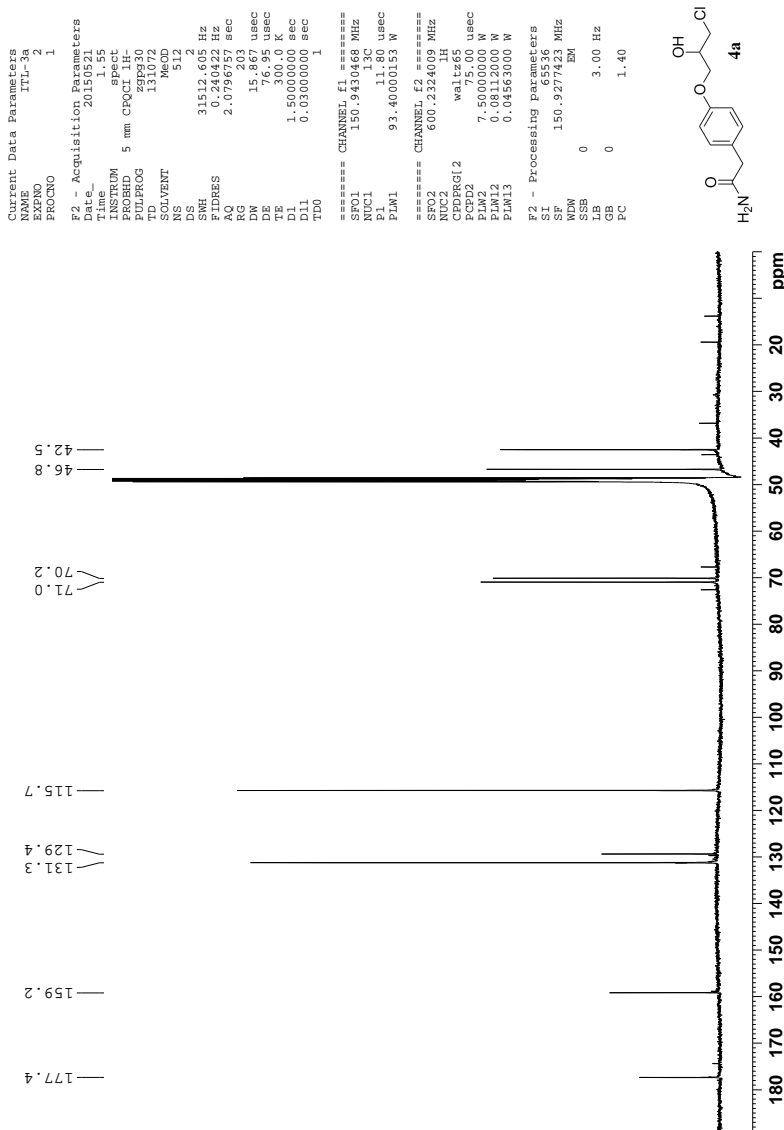
Figur B.7: IR-spektrum av 3a.

## C. Vedlegg 3: 4a



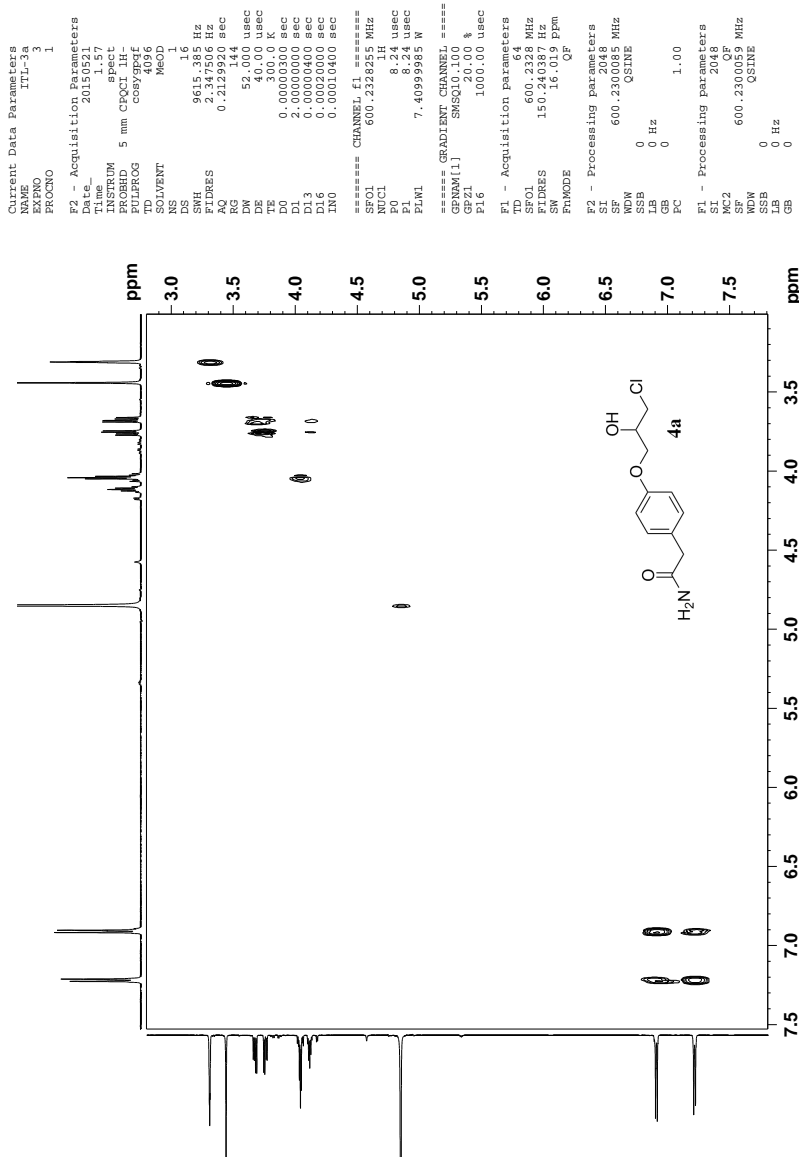
Figur C.1:  $^1\text{H}$  NMR-spektrum av **4a**.





Figur C.2:  $^{13}\text{C}$  NMR-spektrum av 4a.





Figur C.4: COSY NMR-spektrum av 4a.



## Elemental Composition Report

Page 1

## Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 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

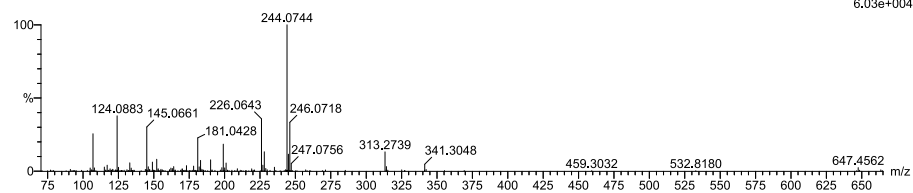
738 formula(e) evaluated with 3 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 N: 0-50 O: 0-100 Cl: 0-2

NT-MSLAB-Operator-SVG

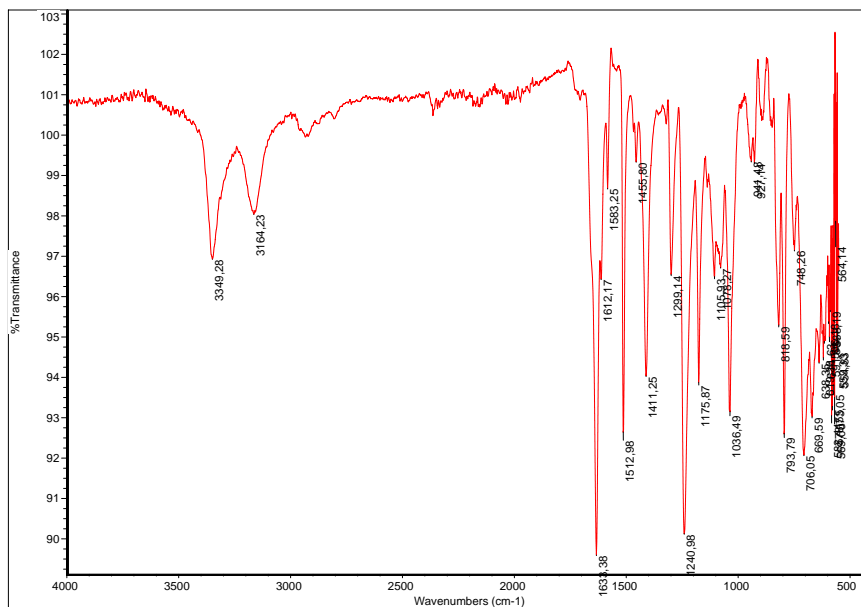
2015-192 144 (2,808) AM2 (Ar,35000,0,0,0,0,0)

1: TOF MS ASAP+  
6.03e+004

Minimum: -1.5  
Maximum: 5.0 5.0 50.0

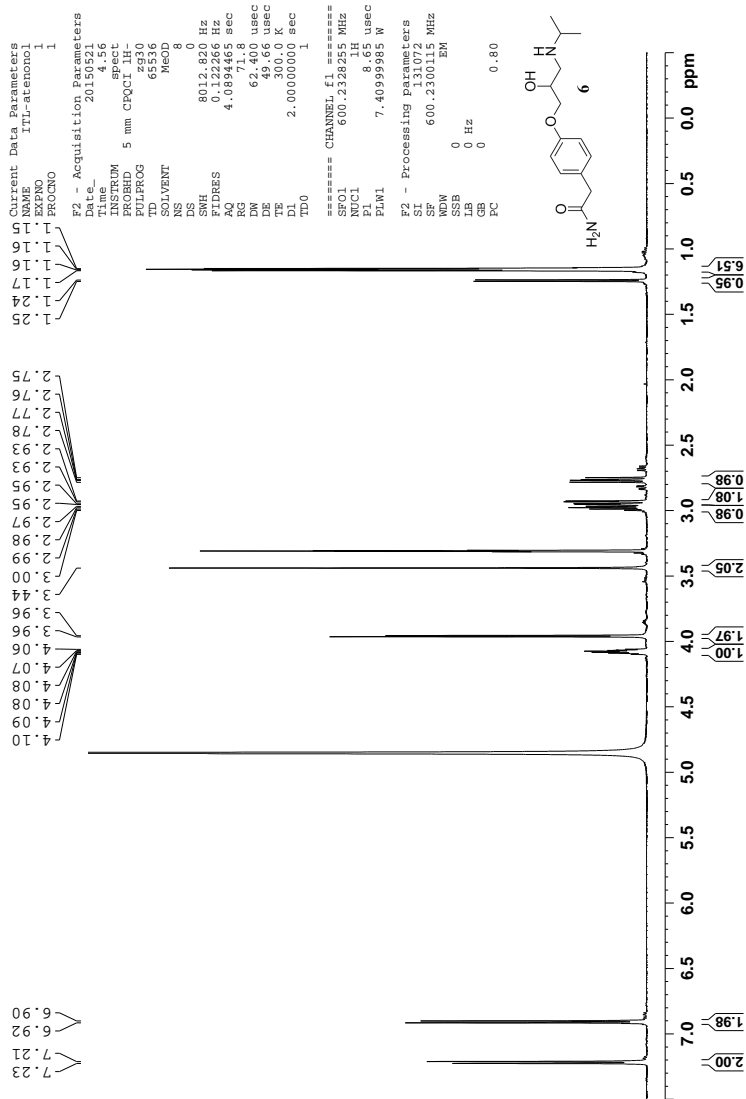
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
244.0744	244.0740	0.4	1.6	4.5	176.1	0.000	100.00	C11 H15 N O3 Cl
	244.0754	-1.0	-4.1	1.5	201.0	24.945	0.00	C H10 N9 O6
	244.0732	1.2	4.9	0.5	191.5	15.443	0.00	C6 H16 N5 O Cl2

Figur C.6: MS-spektrum av 4a.

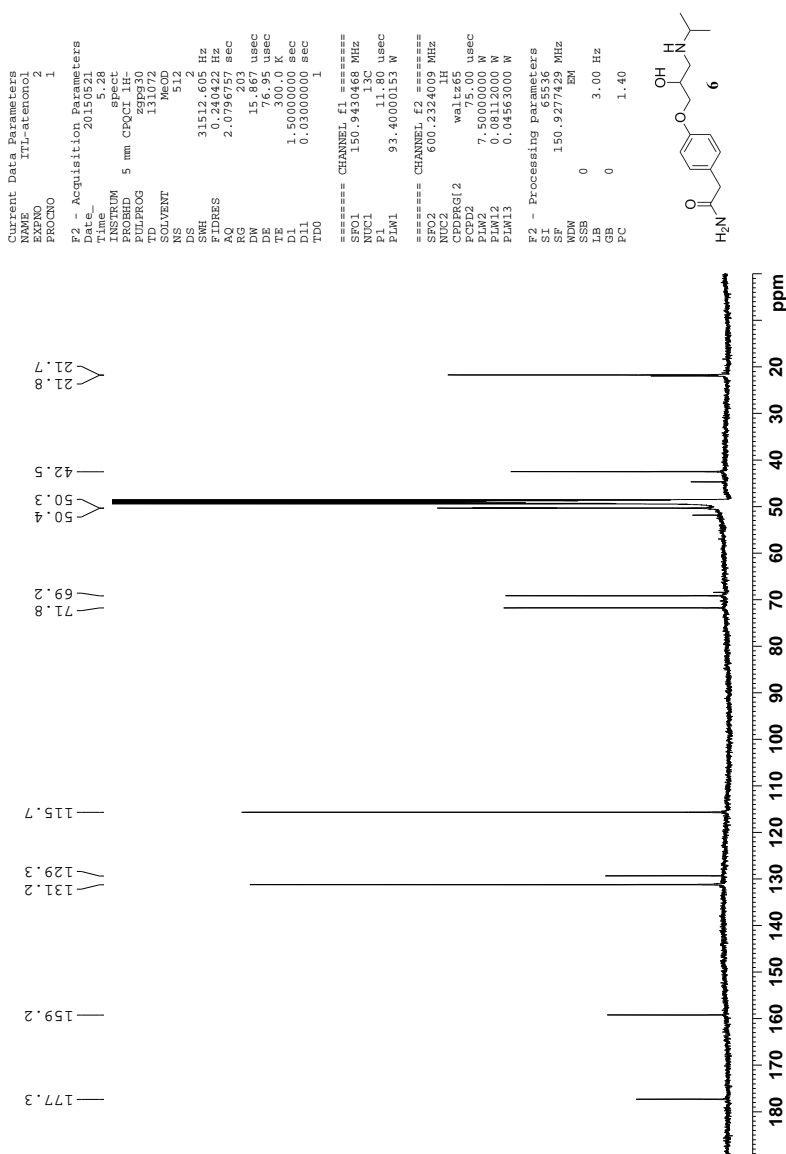


Figur C.7: IR-spektrum av 4a.

# D. Vedlegg 4: 6



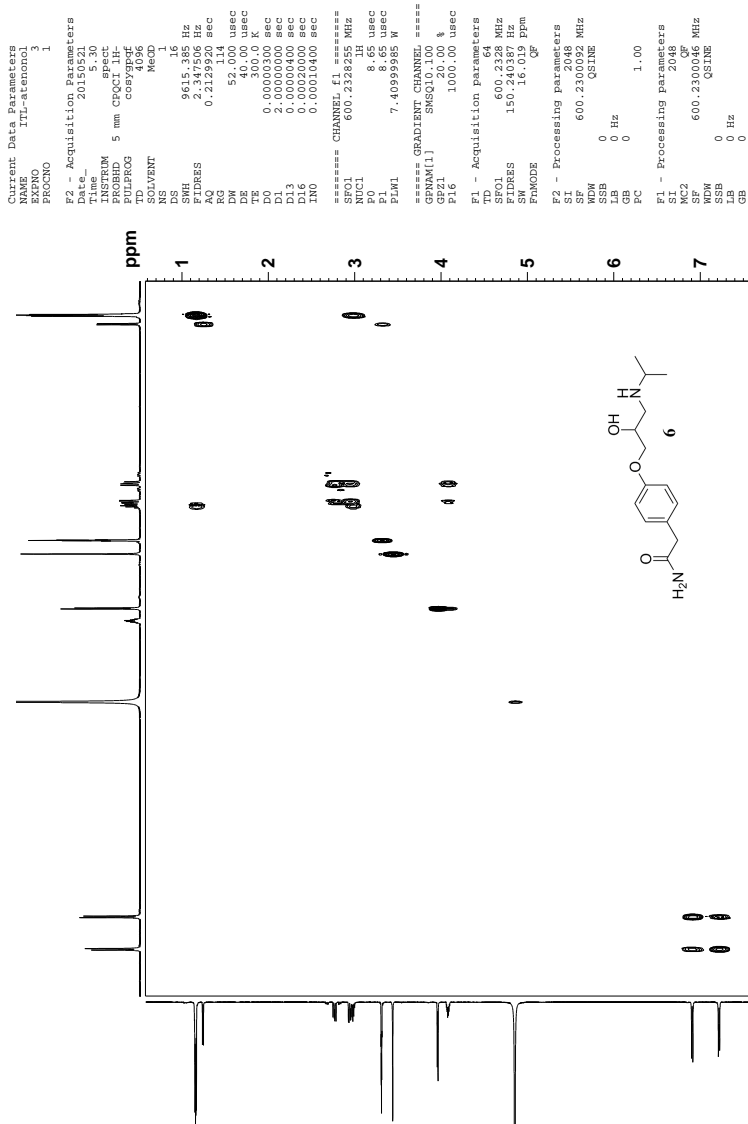
Figur D.1: <sup>1</sup>H NMR-spektrum av 6.



Figur D.2: <sup>13</sup>C NMR-spektrum av 6.







Figur D.4: COSY NMR-spektrum av 6.



Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 3.0 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

948 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

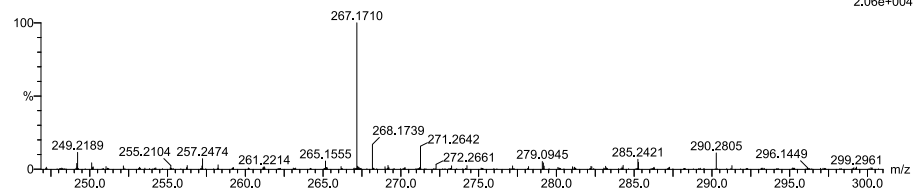
Elements Used:

C: 0-500 H: 0-1000 N: 0-50 O: 0-100 Cl: 0-2

NT-MSLAB-Operator-SVG

2015-194 97 (1.915) AM2 (Ar,35000,0,0,00,0,0); Cm (96:112)

1: TOF MS ASAP+  
2.06e+004

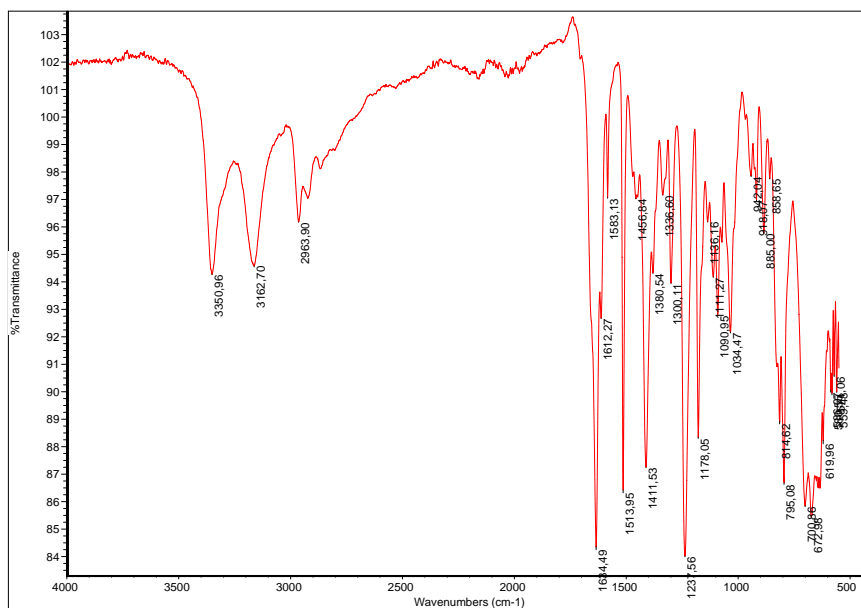


Minimum:  
Maximum:

5.0 3.0 -1.5  
0.1 0.4 4.5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Norm	Conf (%)	Formula
267.1710	267.1709	0.1	0.4	4.5	231.1	n/a	n/a	C14 H23 N2 O3

Figur D.6: MS-spektrum av 6.



Figur D.7: IR-spektrum av 6.