

Syntetiske studier mot 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av 2-metoksiøstradiol

**Masteroppgave i Farmasi
Oktober 2012**

Arnfinn Strømme



**Seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk kjemi ved
Farmasøytisk institutt, det Matematisk Naturvitenskapelige Fakultet.**

UNIVERSITETET I OSLO

Syntetiske studier mot 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av 2-metoksiøstradiol

Masteroppgave i Farmasi

Arnfinn Strømme

Veileder: Professor Trond Vidar Hansen

Avdeling for farmasøytisk kjemi

Farmasøytisk institutt

Det Matematisk Naturvitenskapelige Fakultet

© Arnfinn Strømme

Syntetiske studier mot 1,4-disubstituerte 1,2,3-triazolanaloger av 2-metoksiøstradiol

2012

Arnfinn Strømme

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag :

I denne oppgaven ble det forsøkt å lage derivater av 1,4-triazolanaloger av forbindelsen 2-metoksiøstradiol. 2-metoksiøstradiol er en forbindelse som har vist effekt mot kreft, blant annet mot prostatakreft og Brystkreft, ⁽¹⁾ men har i studier dessverre vist en veldig kort halveringstid. ⁽²⁾

Ved å innføre triazolring i 17-posisjonen ønsket vi å se om vi kunne få en økt halveringstid og bedre farmakologisk profil av dette stoffet, og teste dette stoffet mot kreftceller.

Fremstillingen av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-bromo-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl) var vellykket i et utbytte på 57 %. Analogen 2-metoksi-17- β -(3-fluoro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl) ble forsøkt syntetisert, men ble ikke avbeskyttet i siste trinn.

Forord:

Denne oppgaven ble utført ved seksjon for legemiddelkjemi, avdeling for farmasøytisk kjemi.

I begynnelsen av arbeidet med oppgaven støtte jeg på mange utfordringer og jeg syntes arbeidet var krevende.

Jeg har gått gjennom en bratt læringskurve og takket være hardt arbeid har jeg nådd målet for oppgaven.

Først og fremst takker jeg min hovedveileder professor Trond Vidar Hansen for god veiledning, motivasjon og tilbakemeldinger i forbindelse med masteroppgaven.

Deretter vil jeg takke førsteamanuensis Anders Vik for særdeles god veiledning og oppfølging gjennom hele mitt arbeid med denne oppgaven. Jeg vil gjerne takke for all den hjelp jeg har fått, og uten din hjelp hadde jeg ikke klart å komme i mål.

En stor takk fortjener også stipendiat Eirik Johansson Solum for veldig god veiledning, spesielt i begynnelsen av perioden. Postdoktor Jens Mortansson J. Nolsøe vil jeg takke for gode råd og tips underveis. Stipendiat Marius Aursnes har også bidratt med interessante diskusjoner på lab og i det teoretiske arbeidet. Jeg vil også takke Alexander Åstrand som har vært til god hjelp med det praktiske i laboratoriearbeidet.

Jeg vil også benytte anledningen til å takke alle de andre ansatte på legemiddelkjemi som har bidratt med god hjelp og støtte underveis i arbeidet mitt.

Til slutt vil jeg takke min nærmeste familie for støtte og omsorg gjennom hele mitt arbeid med masteroppgaven.

Oslo, oktober, 2012

Arnfinn Strømme

Forkortelser

2-ME: 2-Metoksiøstradiol

Apaf-1 – apoptotisk protease aktiverende faktor 1

Al(OⁱPr)₃: aluminiumisopropoksid

Bcl-2 – B celle lymphoma 2

BAD : Bcl-2-assosiert døds promoter

bFGF : basisk fibroblast vekstfaktor

CAM : Cerium-ammonium-molybdate

Cytokinese : slutfasen i celledelingen der cellen deles i to.

COMT: Katekol-O-metyl-transferase

CuAAc: Kobber katalysert alkyn azid sykloaddisjon

CYP: Cytokrom P450

DMP : Dess-Martin Periodinane

DIPEA: Diisopropyletylamin

DMP : Dess Martin Periodinane

DR5 : dødsreseptor 5

EOtAc: Etylacetat

FADD :FAS-assosiert-protein med dødsdomene

J: Koblingskonstanten

JNK : c-Jun NH₂ terminal kinase

MOMCl: Metoksimetylklorid

MPVO : Meerwein Ponndorf reduksjon og Oppenauer oksidasjon

SAR: strukturaktivitetsforhold

TBAF : *Tert*-butyl ammonium fluorid

t-BuOH : *Tert*-butanol

TBDMCl : *Tert*-butyl-di-metyl ammonium silisiumklorid

TNF : Tumor nekrose faktor

THF : Tetrahydrofuran

TRAIL : Tumor relatert apoptotose induserende ligand

VEGF : Vaskulær endotelvekst faktor

VEGFR : Vaskulær endotel vekstfaktor reseptor

Innholdsfortegnelse

1. Innledning :	1
1.1. Kort om prosjektet.....	1
1.2. Utviklingen av kreft.....	2
2.Biologiske virkningsmekanismer for 2-Metoksiøstradiol	3
2.1.Apoptose :	3
2.1.1. Virkning av apoptosen.....	3
2.1.2.Signalveier for apoptosen	4
2.2. 2-ME sin effekt på mikrotubuli og proliferasjonshemmende egenskaper.....	5
2.2.1.Mikrotubuli sin rolle.....	5
2.2.2.Den mitotiske spindelen under celledelingen	7
2.2.3. Virkningsmekanisme til 2-ME på mikrotubuli.....	9
2.3.Virkning av 2-ME på angiogensesen	9
2.3.1.Hva er angiogenese	9
2.3.2.2-ME sin effekt på angiogenesisen	10
3. Metabolisme av 2-ME.....	11
3.1.Fokuset i mitt prosjekt.....	11
3.2.Hvordan 2-metoksiøstradiol metaboliseres	12
4.Studier av struktur aktivitetsforhold (SAR STUDIER).....	13
4.1. Tenkt effekt av 2-ME	13
4.2..Forstørrelse av A ringen til 7 ring	13
4.3..Modifikasjoner på de ulike ring elementene	15
A-ringen	15
B-ringen.....	16
C-ringen.....	16

D-ringen	17
5.Syntesemetoder :	18
5.1. Innledning.....	18
5.2.Oppenauer oksidasjon :	18
5.2.1.Innledning.....	18
5.2.2 Generelt om metoden :	19
5.2.3 Sidereaksjoner	20
5.2.4.Hvordan få optimale betingelser	21
5.3.Grignardreaksjon.....	21
5.3.1.Innledning.....	21
5.3.2.Tørre betingelser.....	22
5.3.3.Andre egenskaper til Grignardreagenset	23
5.3.4 Reaksjonsmekanisme for Grignardreaksjon på karbonylforbindelser.....	23
5.3.4.Begrensninger.....	25
5.4. Klikk kjemi.....	25
5.4.1 Innledning.....	25
5.4.2.Egenskaper til klikk reaksjoner	25
5.4.3.Reaksjonsmekanisme :	28
5.4.4 Katalysatoren og energibarriere	30
5.5.Beskyttelsesgrupper	30
5.5.1.Beskyttelse med metoksimetyl eter (MOM)	30
5.5.2. Avbeskyttelse av MOM.....	31
5.5.3. Beskyttelse med TBDMSCl:	31
5.5.4.Avbeskyttelse av TBDMS gruppen med TBAF.....	32
6.Resultat og diskusjonsdel	33
6.1.Grafisk fremstilling av synteserekkefølgen.....	33
6.2.Forsøk på Oppenauer oksidasjon	34
6.3.Forsøk på å oksidere 17- β -østradiol ved bruk av Dess-Martin metoden :.....	36
6.4.Forsøk på å syntetisere 17- β -etynyløstradiol fra Østron	36

6.5.Forsøk på MOM-beskyttelse av østron :	37
6.6.Forsøk på Grignardreaksjon ved å øke antall ekvivalenter med Grignardreagenset	39
6.7.Forsøk på Grignardreaksjon etter innførelse av beskyttelsesgruppen MOM	40
6.8.Forsøk på Grignardreaksjon på 3-O-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol	40
6.9.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron	42
6.10.Forsøk på utførelse av klikk kjemi	43
6.11.Nye testreaksjoner	45
6.11.1.Forsøk på Grignardreaksjon på 3-metyleter-østron.....	45
6.11.2.Forsøk på klikk kjemi på 3-metyleter 17- β -etynyløstradiol	46
6.12.Grignardreaksjon på 2-metoksi-3-metoksimetyl-østron.....	47
6.13.Klikk kjemi på 2-metoksi-3-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol.....	48
6.14.TBDMS beskyttetelse av 2-metoksiøstron.....	50
6.15.Utførelse av Grignardreaksjon på TBDMS beskyttet keton :.....	51
6.16.Klikk kjemi på TBDMS-beskyttet alkyn :.....	53
6.17.Syntese av sluttproduktet i siste trinn :.....	54
7.Konklusjon	58
8.Videre arbeid	58
9.Eksperimentelt.....	59
9.1.Materialer	59
9.2.Analyser	59
9.2.1. Smeltepunktet.....	59
9.2.2. Tynnsjikt-kromatografi.....	59
9.2.3 Kjernemagnetisk ressonans	59
9.3.Forsøk på å syntetisere 2-metoksiøstron fra 2-metoksiøstradiol	60
9.4.Forsøk på å oksidere 17- β -østradiol til østron ved bruk av Dess-Martin metoden :	63
9.5.Forsøk på å syntetisere 17- β -etynyløstradiol fra østron	64
9.6.Forsøk på å Syntetisere 3-O-metoksimetyl-østron	65
9.7.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på østron :	67
9.8.Forsøk på å syntetisere 3-O metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol fra 3-O-metoksimetyløstron...	68

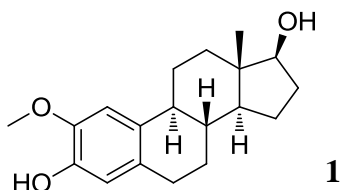
9.9.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron	70
9.10Forsøk 1 På å utføre klikk kjemi på 17- β -etynyløstradiol	74
9.11.Forsøk nr 2 På å utføre klikk kjemi på 17- β -etynyløstradiol.....	75
9.12.Forsøk på utføre klikk kjemi på 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol.....	77
9.13.Grignard reaksjon på 3-metyeter-østron :	79
9.14.Klikk kjemi på 3-metyleter-17- β -etynyløstradiol.....	82
9.15.Grignard reaksjon på 2-metoksi-3-metoksimetyl-østron.....	85
9.16.Klikk kjemi på 2-metoksi-3-metoksimetyl-etynyl-17- β -østradiol	89
9.17.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-østron	92
9.18.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-17- β -etynyløstradiol	94
9.19.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-17- β -(1-PARA-brom-fenyl-1,2,3-triazol-4yl)	98
9.20.Syntese av 2-metoksi-17- β -(1-para-brom,1,2,3-triazol-4-yl).....	102
10.Litteraturliste	105

1. Innledning :

1.1. Kort om prosjektet

I denne oppgaven har jeg arbeidet med forbindelsen 2-metoksiøstradiol (2-ME) som er en forbindelse som har vist effekt mot noen bestemte kreftformer bl.a. prostatakreft og brystkreft.

Strukturen til 2-ME er vist i figur 1.1.



Figur 1.1: 2-ME ⁽¹⁾

2-ME blir også dannet av kroppen gjennom metabolisme av østrogen, og det vil da eksistere som en endogen metabolitt. Ulempen med å bruke dette stoffet som et potensielt legemiddel er at kroppens enzymer er tilpasset til å bryte det ned og skille det ut av kroppen. ⁽¹⁾ Disse enzymene gjør at 2-ME raskt vil bli brutt ned i kroppen og gi en kortvarig effekt p.g.a. kort halveringstid. Dette har gjort at vi ønsker å gjøre endringer på molekylet slik at effekten mot kreft kan forbedres ved å syntetisere derivater av stoffet. ⁽²⁾

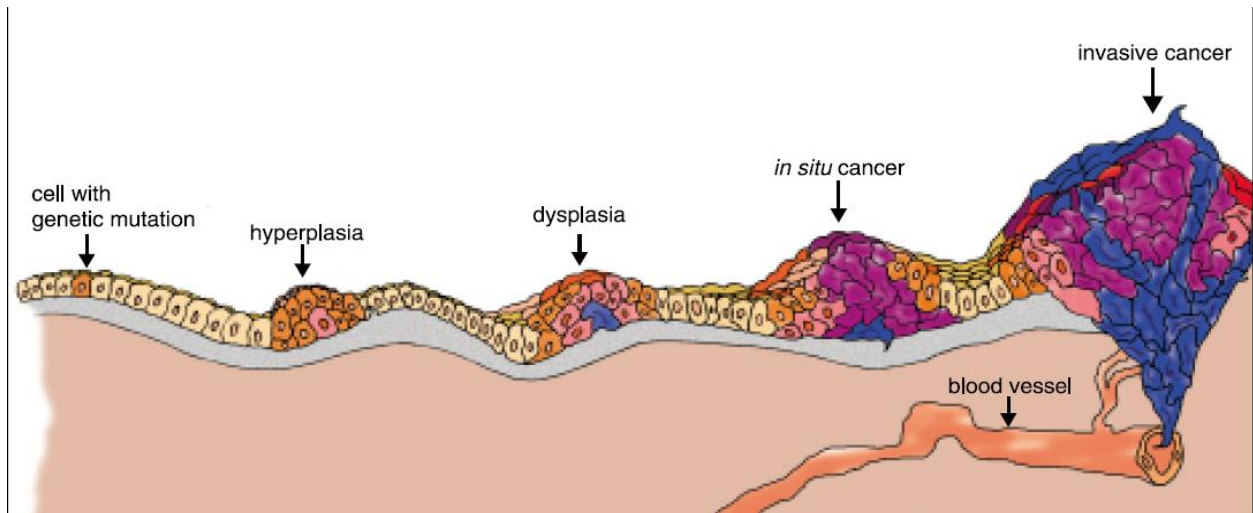
Målet med min masteroppgave er å prøve å lage noen triazolanaloger av denne forbindelsen som deretter kan testes biologisk mot kreftceller.

For øyeblikket er 2-ME under klinisk evaluering under navnet Panzem[®] NCD⁽³⁾

Kreft er en komplisert sykdom som forårsaker at mange mennesker dør. Derfor vil utvikling av legemidler mot kreft et viktig område å satse på for den farmasøytiske industrien. Det finnes ulike kreftformer og årsakene til kreft er mange. Likevel kjenner man nå til de viktigste utviklingstrinn i kreftutviklingen.

1.2. Utviklingen av kreft

Kreft er en samlebetegnelse for flere ulike typer kreftsykdommer. Når kreft utvikles innebærer det at celledelingsprosessen i kroppen har mistet kontrollen over celledelingen.⁽⁴⁾



Figur 1.2: Figuren viser de ulike steg i kreftutviklingen.⁽⁵⁾

Prosessen starter når cellen får en mutasjon. Dette gjør at cellen endrer seg genetisk og medfører økt delingshastighet slik at cellen går inn i hyperplasifasen. Flere mutasjoner gjør at cellen vil skifte form og utseende. Dette kalles dysplasi. Etter hvert som mutasjonene fortsetter vil enkelte kreftceller kunne spre seg til nabovæv. Dette skjer gjennom blod og lymfesystemet som gjør at kreften kan spre seg til andre steder i kroppen. Kreftsvulster klassifiseres i ulike grupper. Når en svulst får betegnelsen malign, betyr det at den kan spre seg til andre steder i kroppen. At mutasjoner skjer og danner kreftsvulster har mange årsaker. Normale celler som blir mutert får dannet proto onco gener som videre kan omdannes til oncogener. Når disse genene er med å styrer kontrollen av celleveksten kan disse mutasjonene gjøre at en kreftsvulst får utvikle seg. Suppresjonsgener har også en vekstregulerende egenskap. Dette til sammen gjør at en kreftsvulst kan bli utviklet når disse genene blir slått av.⁽⁵⁾ Cellens miljø som kjemikalier og virus kan være med å påvirke denne prosessen. Når cellen begynner å dele seg fortere vil dette øke sjansen for feil i celledelingen.⁽⁴⁾

2.Biologiske virkningsmekanismer for 2-Metoksiøstradiol

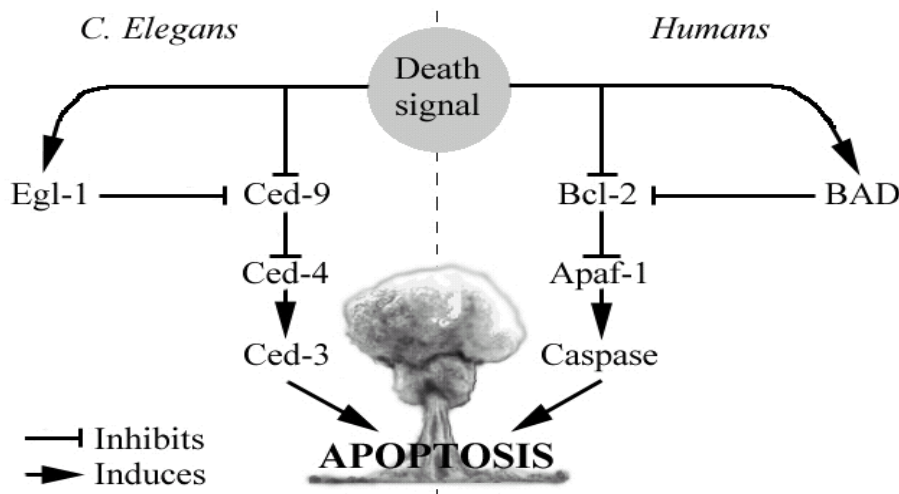
2.1.Apoptose :

2.1.1. Virkning av apoptosen

2-ME har vist seg å virke mot kreft gjennom ulike biologiske mekanismer. Disse biologiske mekanismene styres av biologiske prosesser som apoptosen, regulering av mikrotubuli og den angiogenetiske prosessen. En av måtene 2-ME virker mot kreft er å påvirke den apoptotiske prosessen. ⁽⁶⁾

Apoptosen forårsaker programmert celledød. Dette er en viktig regulerende prosess i kroppen for å sikre vevshomeostasen. Den er også regulert gjennom ulike signalveier og kan settes i gang gjennom endogene startsignaler, eller ved at cellen mottar stimuli utenfra. ⁽⁷⁾

Et eksempel på en ligand som har vist seg å spille en sentral rolle er TRAIL (TNF relatert apoptose induserende ligand). Denne induserer apoptose ved hjelp av dødsreseptorer i enkelte celler. ⁽⁸⁾



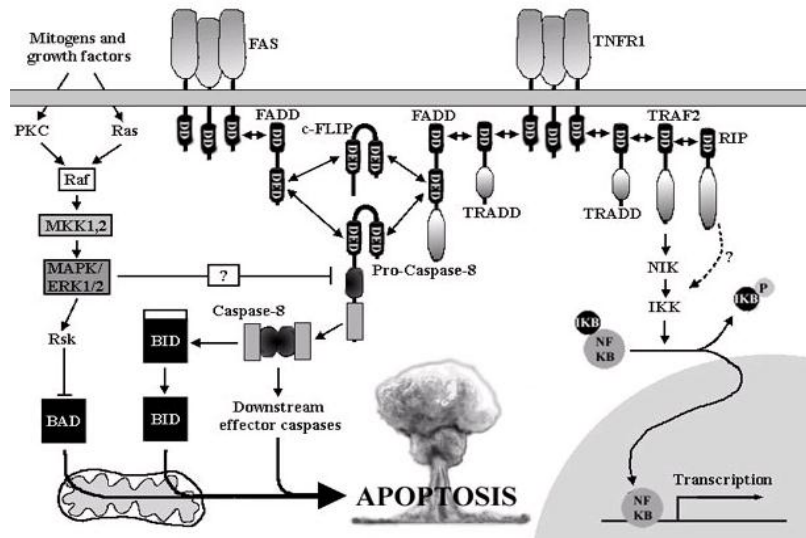
Figur 2.1 : Figuren viser hvordan apoptosen kan reguleres og noen faktorer som er involvert. ⁽⁹⁾

Hos mennesker kan apoptosen startes ved å hemme Bcl-2, som er et anti-apoptotisk protein. BAD kan hemme virkningen av anti-apoptotiske proteiner. Dette gjør at Apaf-1 (apoptotisk

protease aktiverende faktor 1) blir aktivert og som deretter kan aktivere caspasene som er proteolytiske enzymer som spiller en viktig rolle i apoptosen. Celledød styres ofte av en overvekt av induserende faktorer over de anti-apoptotiske faktorene.

Apoptosen er også koblet opp mot mitokondriene i cellene våre ved at cytokrom c, Apaf- 1 og procaspase 3 kan gå sammen og danne et enzym som kan aktivere caspasene som igjen medfører celledød.⁽⁹⁾

2.1.2. Signalveier for apoptosen



Figur 2.2: Figuren gir en oversikt over noen faktorer som regulerer de to ulike reaksjonsveiene for apoptosen. Den interne og den eksterne reaksjonsveien.⁽⁹⁾

Virkningsmekanismen til 2-metoksiøstradiol er å oppregulere blant annet DR5 i det ekstracellulære domenet som derfor vil gi en økt apoptotisk effekt.⁽⁶⁾

Det finnes to ulike måter apoptosen kan bli aktivert på, nemlig gjennom den eksterne eller interne signalveien.⁽⁶⁾ I den eksterne signalveien blir apoptosen startet gjennom aktivering av dødsreseptorer på celle overflaten. Dette kan skje gjennom aktivering av et ekstracellulært domene på dødsreseptoren DR5. En ligand som har vist seg å spille en sentral rolle her er TNF relatert induserende ligand (TRAIL). Signalovertøringen vil deretter gå videre til dødsadapteren FADD som ligger intracellulært. Dette gjør at flere caspaser blir aktivert. Til slutt blir caspase 3 aktivert.⁽⁶⁾

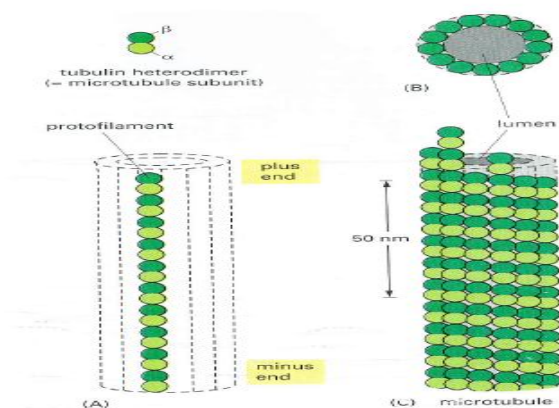
Apoptosen kan også aktiveres gjennom mitokondriene. Dette skjer ved at det blir sendt ut ett stress signal. Cytokrom c blir derfor frigjort som gjennom signaloverføring medfører aktivering av caspase 9 ⁽¹⁰⁾

2-ME kan påvirke apoptosen i enkelte celler blant annet i myeloma celler gjennom denne signalveien ved å fosforylere JNK. Gjennom transport til mitokondriene blir membranpotensialet redusert såpass mye at cytokrom c kan frigjøres. ⁽⁶⁾

2.2. 2-ME sin effekt på mikrotubuli og proliferasjonshemmende egenskaper

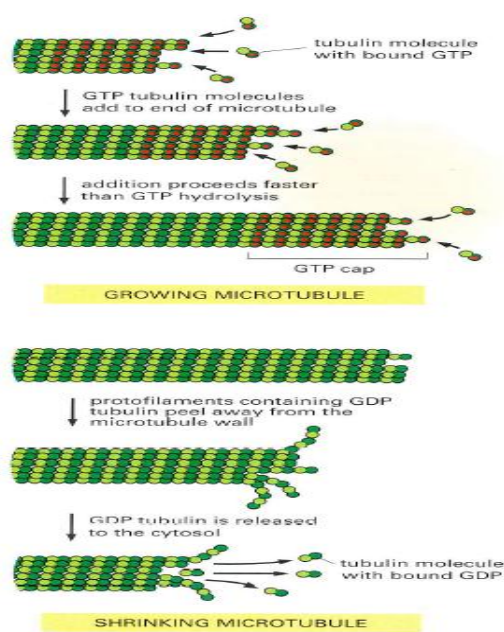
2.2.1. Mikrotubuli sin rolle

Mikrotubuli er dynamiske polymere. Tubulin kan adderes på endepunktene som gjør at veksthastigheten kan reguleres. Dette kalles for dynamisk ustabilitet. Det er viktig at denne prosessen er nøye kontrollert siden den spiller en viktig rolle i den mitotiske fasen i celledelingen. ⁽¹¹⁾



Figur 2.3 : Oppbygningen av mikrotubuli ⁽¹²⁾

Et annet viktig element som spiller en rolle i celledelingen er sentrosomet som også er bygget opp av mikrotubuli. Dette er et slags organiserende senter i cellen som styrer dannelsen av og hvor mikrotubuli blir lokalisert. Mikrotubuli er bygd opp av mange hulformede enheter. På samme måte er sentrosomet bygd opp av mange ringformede strukturer av γ tubulin. $\alpha\beta$ -dimerene adderes til γ tubulin på en måte slik at veksten vil foregå i plussenden.



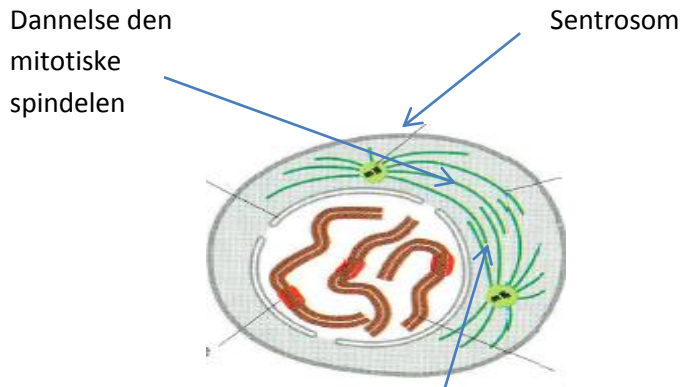
Figur 2.4: Viser hvordan mikrotubuli bygges opp og brytes ned. ⁽¹²⁾

Måten mikrotubuli bygges opp og brytes ned skjer gjennom hydrolyse av GTP til GDP. De enhetene som er bundet til GDP kobles svakere til hverandre. Dette er viktig for å forstå hvordan mikrotubuli bygges opp og brytes ned. Noen ganger dannes en GTP cap ved at enhetene bindes raskere til hverandre enn GTP blir hydrolysert som gjør at de fortsetter å vokse.

Andre ganger hydrolyseres GDP før den neste tubulin enheter har blitt tilkoblet. Når den frie enden derfor består av GDP tubulin gir dette depolymerisering. ⁽¹²⁾

2.2.2. Den mitotiske spindelen under celledelingen

I begynnelsen av mitosen vil mikrotubuli først dekomponere og deretter vil den mitotiske spindelen dannes. Mikrotubuli blir derfor under denne prosessen omdannet til den mitotiske spindelen som har en viktig rolle under celledelingen i den mitotiske fasen.



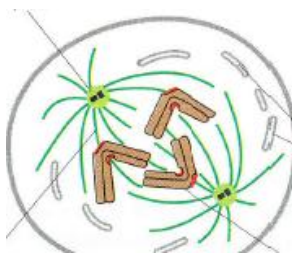
Figur 2.5 : Viser at den mitotiske spindelen blir montert. ⁽¹³⁾

Profase :

I profasen vil de to søsterkromatidene som har blitt replikert bli tykkere. I tillegg blir den mitotiske spindelen montert. Utenfor kjernen vil den mitotiske spindelen bli koblet mellom de to sentrosomene. ⁽¹³⁾

Prometafase :

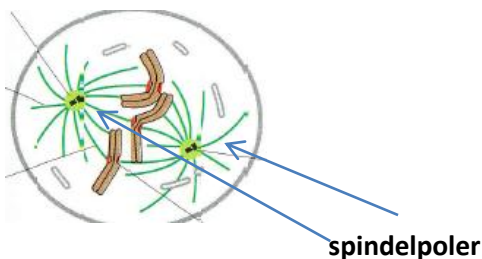
Det neste som skjer er at kjernemembranen blir brutt ned som gjør at kromosomet kan kobles til den mitotiske spindelen. ⁽¹³⁾



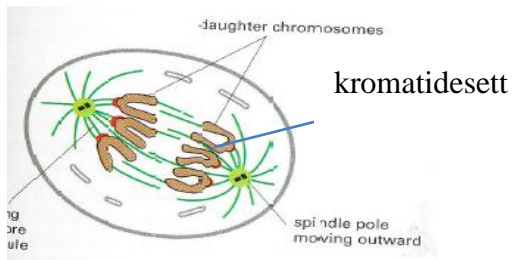
Figur 2.6: Viser fragmenter av cellekjernen etter at cellekjernen brytes ned. Deretter viser figuren hvordan spindelen monteres til kromosomene. ⁽¹³⁾

Meta fasen

I metafasen vil kromosomene bevege seg mot ekvator av spindel polene. ⁽¹³⁾



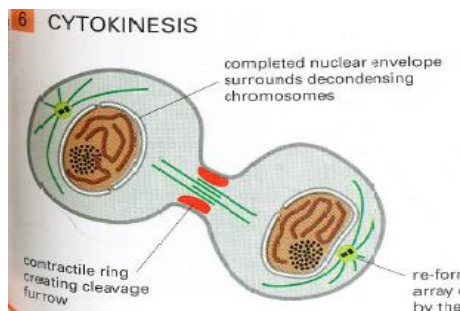
Figur 2.7 : Viser at kromosomene beveger seg mot ekvator av spindel polene. ⁽¹³⁾



Figur 2.8: De to sett av kromatidene vil forlyttes til hver sin spindelpol slik at kromatidesettene blir separert fra hverandre. ⁽¹³⁾

Anafasen og telofasen

I anafasen vil de to settene av datter kromatidene begynne og dras mot hver sin spindel pol og det dannes to sett med kromosomer. I telofasen vil de være ved hver sin spindelpol og det begynner å dannes ny membran rundt kromatidene. ⁽¹³⁾



Figur 2.9 : Viser det siste som skjer ved at cytoplasma blir delt og to datterceller dannes. ⁽¹³⁾

Sluttfasen :

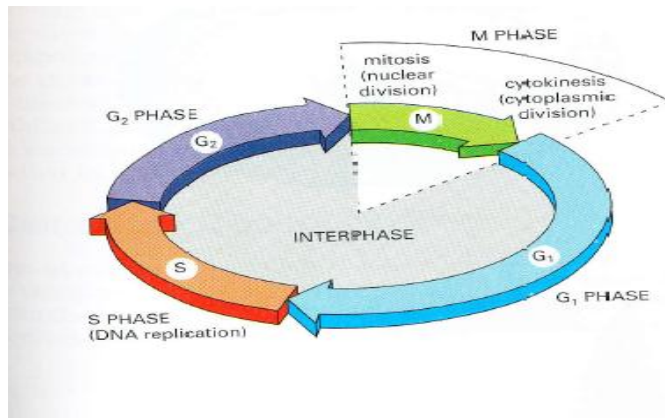
I sluttfasen eller under cytogenesen vil cytoplasma bli delt i to og dermed blir det dannet to datterceller, men hver sin kjerne. ⁽¹³⁾

2.2.3. Virkningsmekanisme til 2-ME på mikrotubuli

2-ME virker ved å hemme polymerisering av tubulin og kan ha effekt på grunn av at kolkisin bindingsetet kan fungere som et regulatorisk domene på tubulin.⁽¹⁴⁾

Den bindes til tubulin i nærheten av kolkisin bindingssættet, og hemmer på den måten tubulin sammenkobling. I høyere konsentrasjoner kan dette til og med medføre direkte depolymerisering.⁽¹¹⁾

En annen måte 2ME kan virke på er gjennom mitotisk arrestasjon i bestemte celler.



Figur 2.10: Viser sjekkpunkter i celledelingen⁽¹⁵⁾

Celler har kontrollsystemer for å stoppe celledelingen i bestemte sjekkpunkter som kan avgjøre om cellen vil gå inn i de ulike fasene i celledelingen. Når den mitotiske spindelen forstyrres kan det skje en celledelingsarrestasjon i den mitotiske fasen.⁽¹⁶⁾

2.3. Virkning av 2-ME på angiogenesen

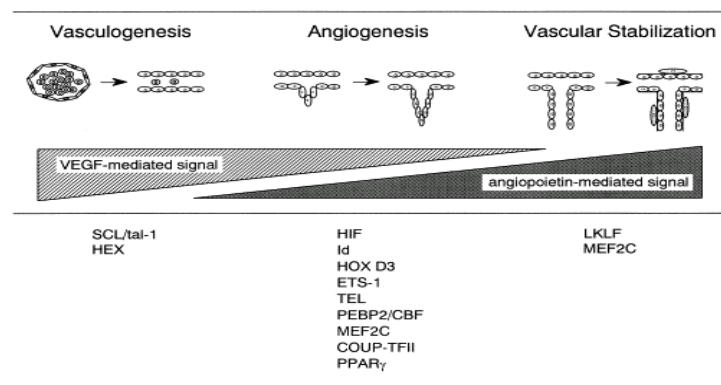
2.3.1. Hva er angiogenese

Gjennom den angiogenetiske prosessen dannes det nye blodkar ut fra de eksisterende. Dette spiller en viktig rolle i tumorvekst og styres i stor grad av positive og negative regulatorer.

Angiogenesen er en komplisert prosess og starter vanligvis på grunn av genetiske forandringer og en ubalanse mellom positive og negative regulatorer.

Tap av suppressor gener eller aktivering av oncogener gjennom mutasjon kan medføre økt sekresjon av faktorer som stimulerer til angiogenese. Hypoksi og betennelsestilstander kan øke uttrykket av angiogenetiske faktorer.

Angiogenesen skjer i 4 trinn. Først forekommer det en vaskulær diskontinuitet som skjer for eksempel ved vevsskade. Deretter vil endotelceller forflytte seg langs basalmembranen som styres av blant annet den angiogenetiske faktoren VEGF. Dette gjør at reseptorer på celleoverflaten av endotelceller blir aktivert. Cellens permeabilitet vil derfor økes som gjør at positive og negative regulatorer skilles ut. Dette ser ut til å reguleres blant annet av faktoren HIF-1- α ⁽¹⁷⁾



Det er en sammenheng mellom ulike transkripsjonsfaktorer og hvordan angiogenesen utvikler seg i ulike trinn.

En embryo kan utvikles til et ferdig blodåresystem der angiogenesen spiller en sentral rolle⁽¹⁸⁾

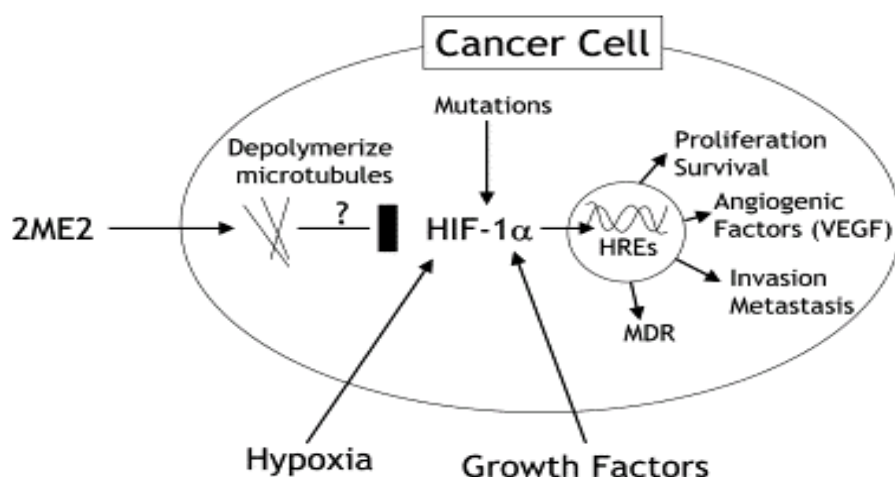
Figur 2.11 : Viser utvikling av den angiogenetiske prosessen og noen faktorer som er med å styrer.⁽¹⁸⁾

2.3.2.2-ME sin effekt på angiogenesen

2-ME har indirekte effekt på angiogenesen ved å hemme HIF-1- α ekspresjon i kreftceller.

HIF-1 er en heterodimer som består av α og β subenheter.

Virkningsmekanismen til 2-ME går ut på at den påvirker HIF-1- α . Dette er en transkripsjonsfaktor som stimulerer til angiogenese og den reagerer med det hypoksiske responselementet HRE, ved hypoksiske tilstander. 2-ME reduserer nivået av HIF-1- α i cellen. Dermed vil den hemme ekspresjonen av VEGF og andre proangiogenetiske proteiner.⁽⁶⁾



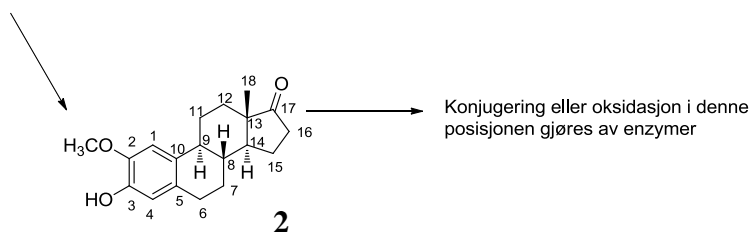
Figur 2.12: Ved hypoksiske tilstander vil nivået av HIF-1- α øke. Ved hemming av denne transkripsjonsfaktoren vil også uttrykket av angiogenetiske faktorer som VEGF reduseres. ⁽⁶⁾

3. Metabolisme av 2-ME

Ett av de store problemene med 2-ME er at halveringstiden er så kort. Halveringstiden til 2-ME er mindre enn 0,5 timer hos for eksempel gnagere. Dette er fordi at stoffet kan bli metabolisert av enzymer på ulike steder i molekylet. ⁽²⁾

3.1.Fokuset i mitt prosjekt

Enzymer utfører glukuronidering eller sulfonering i denne posisjonen



Figur 3.1: Viser hvor 2-ME blir konjugert og oksidert. ⁽¹⁹⁾

Som vist i figur 3.1 ved å innføre en triazolring i 17- posisjonen i molekylet håper vi å få analoger med mulig lengre halveringstid. Det er gjort forsøk på å gjøre endringer på 3- og 17- posisjonen og dette har vist positive resultater og har gitt økt aktivitet. ⁽²⁾ Ved å innføre triazolring i 17- posisjon håper vi å få lengre halveringstid og bedre legemiddelkandidater.

Vår hypotese er at ved å prøve å forhindre metabolismen i 3- og 17- posisjon med triazoler kan det tenkes at stabiliteten til stoffet i kroppen økes. Vi håper at en triazolring i denne posisjonen kan øke den steriske hindringen til de metabolske enzymerne. Ved å prøve å hindre

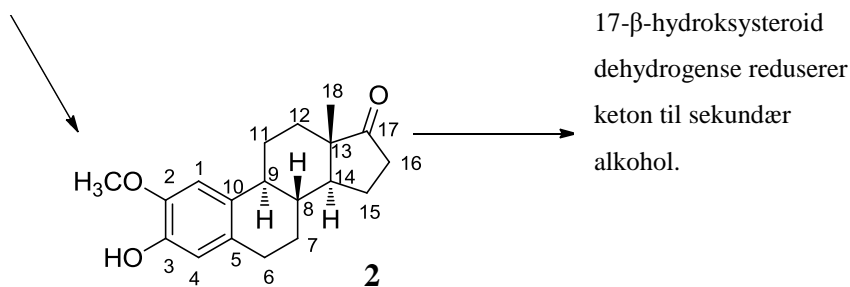
at disse enzymene ikke kommer til håper jeg derfor å kunne forbedre effekten og øke potensen av 2-ME.

Siden 2-ME er en østrogenmetabolitt blir den også dannet i kroppen gjennom spesifikke enzymer. Østrogener produseres i hovedsak i binyrene og skilles også ut i eggstokkene hos kvinner. ⁽¹⁾

3.2.Hvordan 2-metoksiøstradiol metaboliseres

Hydroksylering utføres av
CYP1A2 og CYP3A enzymer

Metyleringen utføres av katekol-
O-metyltransferase (COMT)



Figur 3.2 : Viser i hvilke posisjoner de ulike enzymene har effekt og metaboliserer østrogener til 2-metoksiøstradiol. ⁽¹⁾

2-ME syntetiseres fra østradiol ved at det skjer en hydroksylering på østradiol. Dette skjer av blant annet enzymene CYP1A2 og CYP 3A. Deretter vil enzymet (COMT) Katekol-O-metyl transferanse utføre en O-metylering ved 2- posisjonen i molekylet slik at det dannes en metoksigruppe i denne posisjonen. Denne metabolitten kan bli oksidert i 17- posisjon til østron og videre reduseres tilbake til en sekundær alkohol ved enzymet 17-β hydroksysteroid dehydrogenase.

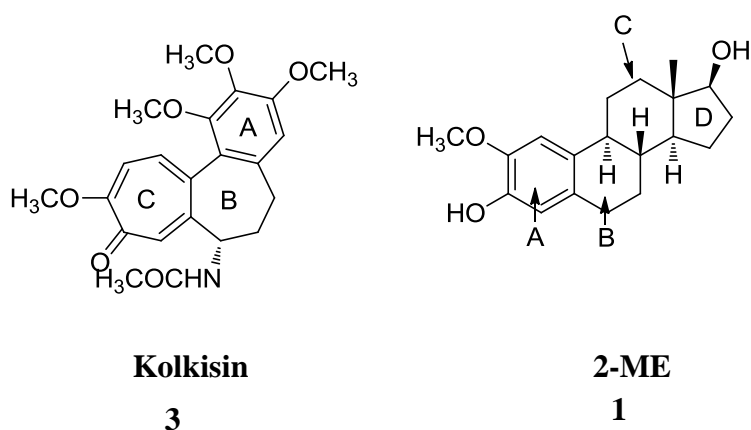
Det kan også skje konjugering til glukuronider og sulfonat estere. Oksidasjon i 17- posisjon og konjugering er viktige reaksjonsveier for metabolisme og deaktivering av 2-ME. ⁽¹⁾

4. Studier av struktur aktivitetsforhold (SAR STUDIER)

4.1. Tenkt effekt av 2-ME

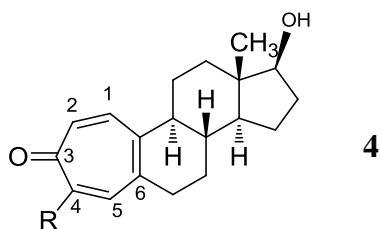
Det har blitt utført mange struktur-aktivitetsstudier for å prøve å forbedre effektene til 2-ME

Siden det er kjent at 2-ME sin mitotiske effekt kan være resultat fra interaksjon med kolkisinbindingsetet har (Verdier-Pinnard et al, 2000) lagt frem en hypotese om at C-ringen i kolkisin kan tilsvare A- ringen i 2-metoksiøstradiol. ⁽²⁰⁾



Figur 4.1 : En sammenlikning av kolkisin og strukturen til 2-ME. Vi ser spesielt at både C ringen til kolkisin og A ringen til 2-ME har en metoksigruppe på den aromatiske strukturen. ⁽²⁰⁾

4.2..Forstyrrelse av A ringen til 7 ring



Figur 4.2 : Eksempel på hybrid derivat av 2-ME. ⁽²¹⁾

Det har blitt gjort forsøk av (Miller et.al., 1997) å forstå selve bindingen til kolkisinbindingsetet og det har blitt syntetisert kolkisin/2-ME hybrider der A-ringen består av ketogruppe enten i C-2,C-3 eller C-4 posisjon.

De mest potente av disse viste en 5 ganger økning i aktivitet. Ulike substituenten på 7- ringen viste ulik aktivitet. De 3-substituerte 4-oxo-estratroponene med økt elektronegativitet på substituentene viste effekt i rekkefølgen $\text{Cl} \approx \text{Br} > \text{OCH}_3$ hvorav 4-substituerte 3-oxoestratroponer gav motsatt effekt, nemlig $\text{OCH}_3 > \text{Br} \approx \text{Cl}$.⁽²¹⁾

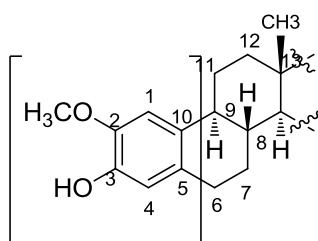
Det har også blitt gjort forsøk på å endre andre deler av strukturen til 2-ME for å få bedre effekt på de 4 ulike ringene.

4.3..Modifikasjoner på de ulike ring elementene

Modifikasjoner på A-ring

Ved å bytte ut metoksigruppen i 2-posisjon i molekylet med en etoksigruppe har det blitt vist en bedre hemmende effekt på tubulin polymeriseringen og en økning i den cytotoxiske effekten på opptil 10 ganger.⁽²⁰⁾

A-ringen



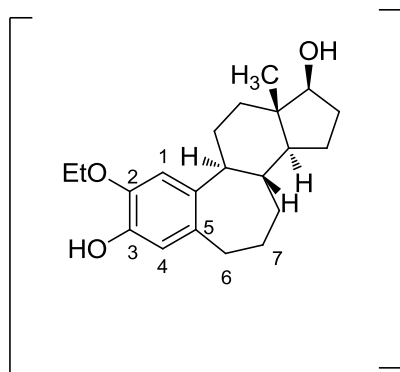
Figur 4.3 : Viser A ringen.

Optimal substituent i 2- posisjonen er en uforgreinet kjede av 3 atomer fra 2.rad i periodesystemet der aktiviteten øker med økende elektrontetthet nær den aromatiske ringen.⁽²²⁾ Videre har det vist seg at derivater med en oxim-gruppe i 6- posisjonen var mer cytotoxisk enn 2-ME.⁽²³⁾

Hydrogendonorevnen ser ut til å være kritisk for å oppnå antiproliferativ aktivitet. Dette kommer frem ved at isosterisk substitusjon av den fenoliske OH- gruppen av 2-ME med tiolgruppe medfører tap av aktivitet

Størrelsen på 3-substituenten har også vist seg å være svært viktig. 3-fluor analoger er det mest potente. π -elektroner i denne posisjonen ser ut til å være viktig.⁽²⁴⁾

B-ringen

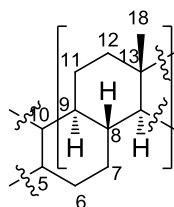


Figur 4.4 : Viser B ringen

Blant de mest aktive analogene som har blitt laget av 2-ME er hvor en etoksigruppe er innført i 2 posisjonen slik som i forbindelsen 2EE. Forstørrelse av ring B til en 7-ring resulterte i en forbindelse med bra effekt på tubulinhemming og binding til kolkisinbindingsetet.

Ved innføring av en ketongruppe i denne 7-ringen i posisjon 6 sammen med acetylering av OH grupper i posisjon 3 og 17 fikk man en forbindelse med aktivitet liknende til paclitaxel som gav økt tubulin polymerisering. Acetylgruppen ved C-17-posisjon var viktig for å få denne effekten ⁽²⁰⁾

C-ringen

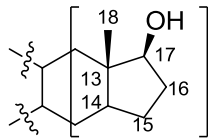


Figur 4.5: Viser C ringen

Inversjon av konfigurasjonen i C-13 posisjonen har også vist seg å medføre redusert cytotoxisk aktivitet. ⁽²⁵⁾

Det har blitt gjort forsøk på å erstatte metylgruppen i C-18- posisjon med en mer sterisk gruppe som kunne tenkes å gi beskyttelse mot metabolsk deaktivering av OH-gruppen i 17 posisjon. Likevel resulterte dette i en forbindelse med lik aktivitet. ⁽²⁶⁾

D-ringen



Figur 4.6: Viser D ringen

Videre har det blitt vist at cis substituering ved 15 og 16 posisjonen reduserer aktiviteten.⁽²⁵⁾

Det har blitt forsøkt å innføre umettede bindinger i D-ringen. Dette har gitt økning i cytotoxissitet i forhold til 2-ME. En mulig forklaring kan være at disse modifikasjonene medfører økt bindingsaffinitet til tubulin, eller muligens redusert metabolsk inaktivering av metabolske enzymer.

I tillegg har forbindelsene 2-metoksietynyløstradiol blitt testet og denne var inaktiv og gav ingen effekt på tubulin polymerisering.⁽²⁵⁾

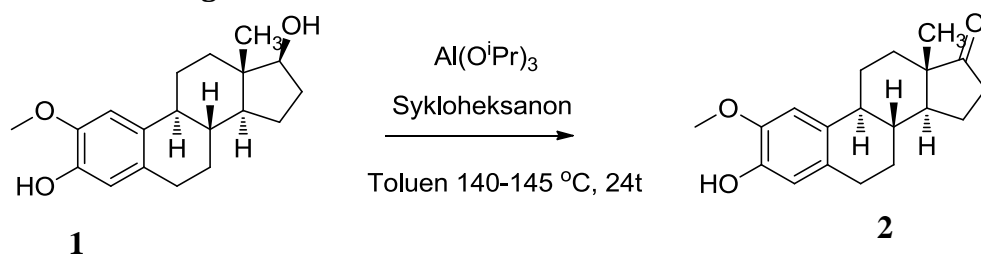
5.Syntesemetoder :

5.1. Innledning

I dette avsnittet følger en generell beskrivelse av de ulike syntesemetodene som er benyttet i denne oppgaven. Reaksjonene er beskrevet og det er blitt forsøkt vist hvordan metodene er brukt for å lage de ulike 2-metoksiøstradiol-analogene.

5.2.Oppenauer oksidasjon :

5.2.1.Innledning



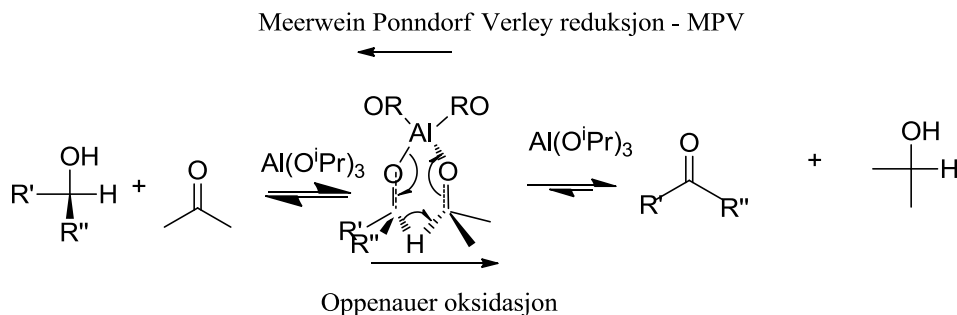
Skjema 5.1 : Reaksjonslikning for en Oppenauer oksidasjon utført i denne oppgaven.⁽²⁷⁾

Det første trinnet i syntesen var å oksidere 2-metoksiøstradiol til 2-metoksiøstron ved Oppenauer oksidasjon. Det som er viktig, er å ha god kjemoselektivitet på reaksjonen ved at den sekundære alkoholgruppen i D-ringene blir oksidert mens fenolen blir uberørt.

Det er en fordel å bruke oksidasjoner som ikke genererer store mengder uorganiske salter. Dessverre viste den eksperimentelle utførelsen at denne reaksjonen gjorde nettopp dette, og disse var vanskelig å fjerne under selve opparbeidelsen. Derfor hadde det vært en fordel om det hadde vært mulig å bruke en annen syntesemetode.

5.2.2 Generelt om metoden :

Dette er en hydrogenoverføringsreaksjon der hydrogen overføres fra en alkohol til keton der alkoholen dermed blir oksidert. Dette skjer gjennom en 6 rings overgangstilstand. Her er både alkoholen og ketonet koordinert med en alkoksid katalysator som er bundet til et metall.



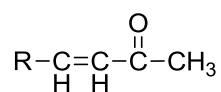
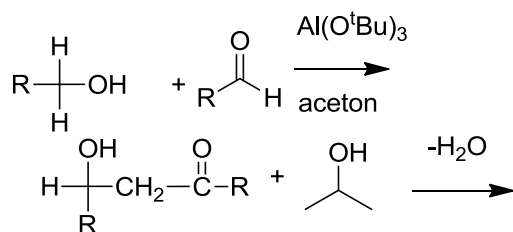
Skjema 5.2 : Overgangstilstanden i Oppenauer oksidasjonen. Her vises at reaksjonen er reversibel og viser retningen til Meerwein-Ponndorf reduksjonen og Oppenauer oksidasjonen henholdsvis. ⁽²⁸⁾

Siden dette er en kjemoselektiv metode er denne veldig nyttig å bruke til oksidasjonen av 2-metoksiøstradiol til 2-metoksisøtron. Som figuren illustrerer er dette en reversibel reaksjon som eksisterer i en likevekt. Reaksjonen ble først beskrevet i 1937 av Oppenauer. Siden dette er en likevektsreaksjon er det viktig at likevekten går riktig vei. Dette er mulig å styre ved å sørge for at ketonet vi bruker som oksidasjonsmiddel reduseres lettere enn det ønskede produktet.

Selv om det i følge teorien skal være mulig å utføre denne reaksjonen ved bruk av katalytiske mengder ser ut til å være vanskelig å få til i praksis. Derfor utføres normalt denne reaksjonen ved å bruke støkiometriske mengder av metalloksidet, eksempelvis $\text{Al}(\text{O}^i\text{Pr})_3$, og et lite overskudd av reduktanten, her sykloheksanon. I arbeidet med steroidet 2-ME kan sykloheksanon brukes som både løsemiddel og oksidasjonsmiddel.

5.2.3 Sidereaksjoner

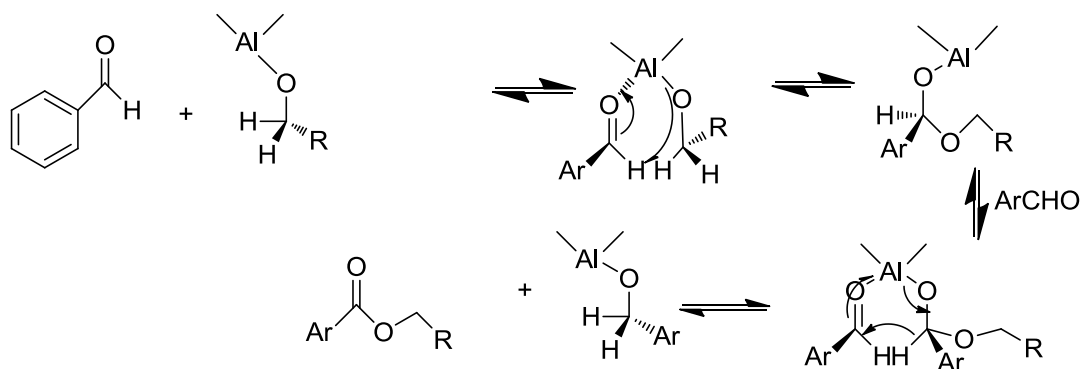
Enkelte bireaksjoner kan forekomme, spesielt hvis man prøver å oksidere primære alkoholer ved Oppenauer oksidasjon.



I reaksjonen blir det dannet aldol-kondensasjonprodukt og vann

Skjema 5.3 : Biprodukt dannelse ved oksidasjon av primære alkoholer ved Oppenauer oksidasjonen. ⁽²⁸⁾

I tillegg kan Tischenko reaksjon forekomme med aldehyder som mangler α -protoner:



Skjema 5.4: Reaksjonsmekanisme for Tischenko reaksjon, som kan forekomme ved forsøk på oksidasjon av aldehyd. ⁽²⁸⁾

5.2.4. Hvordan få optimale betingelser

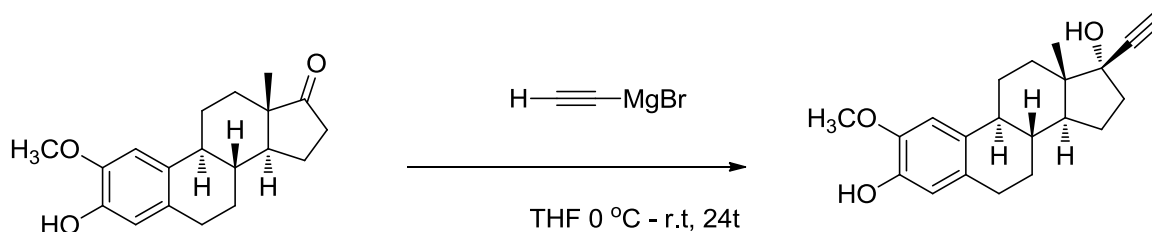
Sidereaksjoner kan unngås ved å bruke milde reaksjonsbetingelser som lav temperatur. En annen mulighet er å bruke et sterkere oksidasjonsmiddel.

I tillegg er det viktig å finne optimale reaksjonsbetingelser. Man kan for eksempel unngå sidereaksjonene ved å senke reaksjonstemperaturen. Siden enkelte polare løsemidler også kan redusere elektronegativiteten til metalloksidet, er det en fordel å bruke upolare løsemidler. I min oppgave ble sykloheksanon valgt. Fordelen med sykloheksanon som løsemiddel er at kokepunktet gjør at det kan fjernes ved destillasjon.⁽²⁸⁾

5.3. Grignardreaksjon

5.3.1. Innledning

2

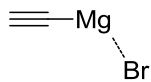


5

Skjema 5.5 : Viser eksempel på Grignardreaksjon.⁽²⁷⁾

I det neste trinnet er stereoselektivitet viktig, siden vi ønsker at etynylmagnesiumbromid skal reagere med 2-metoksiøstron og dannes det et alkyn ved den tertiære alkoholen i 17-posisjon. Det er også viktig å ikke utsette molekylet for sterk syre siden den tertiære alkoholen kan bli dehydrert.⁽²⁹⁾ Det alkynet vi får dannet i denne reaksjonen skal brukes videre for å utføre klikk kjemi.

Etter at vi har fått dannet 2-metoksiøstron ved hjelp av Oppenauer oksidasjon skulle vi utføre Grignardreaksjon på molekylet. Dette er en reaksjon der vi brukte reagenset etynylmagnesiumbromid. Slike forbindelser som inneholder karbon-metall bindinger kalles for organometalliske forbindelser.

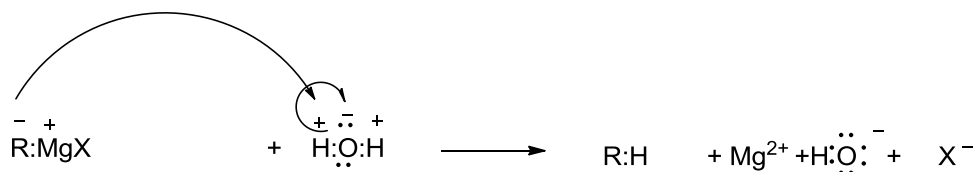


Figur 5.1: Figuren illustrerer C-MgBr bindingen i reagenset etynylmagnesiumbromid som er Grignard reagenset benyttet i denne oppgaven. På grunn av den sterke karbon-magnesium bindingen, vil denne forbindelsen både kunne fungere som en sterk base og nukleofil samtidig. ⁽³⁰⁾

Egenskapene til disse reagensene kan variere noe ut fra bindingsstyrken. Desto mer ioniske de er, desto mer reaktive vil de være. Karbon-magnesium bindingen som finnes i etynylmagnesiumbromid reagenset har en bindingsstyrke som ligger et sted mellom ionisk og kovalent karakter.

5.3.2. Tørre betingelser

Under utførelsen av disse forsøkene med Grignardreaksjon er det veldig viktig å unngå fuktighet og vann. Dette er fordi Grignardreagenser er veldig sterke baser, og vi vil unngå syre-base reaksjon.



Skjema 5.6 : Viser hvordan et Grignardreagens kan bli ødelagt når det reagerer med vann. ⁽³⁰⁾

Som vi ser skjer det en syre-base reaksjon der Grignardreagenset blir nøytralisert ved hjelp av et proton fra H₂O.

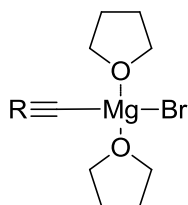
5.3.3. Andre egenskaper til Grignardreagenset

Grignardreagensene har en komplisert struktur og er mer komplisert enn den generelle formelen RMgX gir uttrykk for. Dette skyldes at det bl.a. finnes en likevekt mellom alkylmagnesium halid og dialkylmagnesium :



Skjema 5.7 : Likevekten Grignardreagensene foreligger i. ⁽³⁰⁾

En annen ting som er verdt å merke seg er at løsningsmidlet har også vist seg å spille en viktig rolle for stabiliteten til Grignardreagensene.

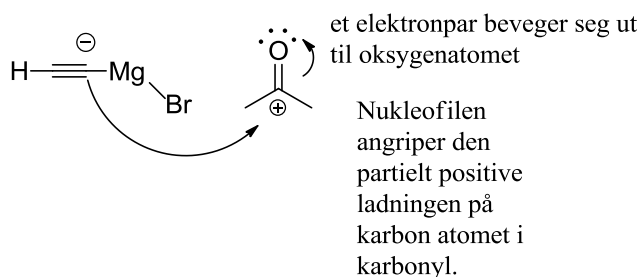


Figur 5.2 : Viser hvordan Grignardreagenset stabiliseres av tetrahydrofuran ⁽³⁰⁾

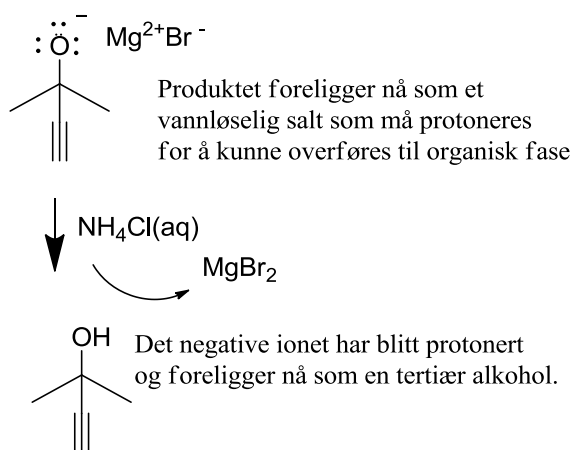
I mine forsøk valgte jeg å bruke tetrahydrofuran som løsemiddel. Dette løsemidlet stabiliserer Grignardreagenset. Denne stabiliseringen er viktig i denne typen reaksjoner og er grunnen til at det ofte velges ulike etere som løsemidler i denne typen reaksjoner.

5.3.4 Reaksjonsmekanisme for Grignardreaksjon på karbonylforbindelser

Grignardreagensene reagerer på følgende måte



Dermed dannes det et alkoksidion.
Magnesiumbromid kompenserer for den negative ladningen som dannes.



Skjema 5.8: Mekanisme for Grignardreaksjon på karbonylgrupper. ⁽³⁰⁾

Grignardreagenset vil bruke sine nukleofile egenskaper slik at det dannes en tertiær alkohol.

Det er viktig å til slutt å få protonert saltet ROMgX slik at ikke produktet blir vannløselig og tapes under opparbeidelsen.

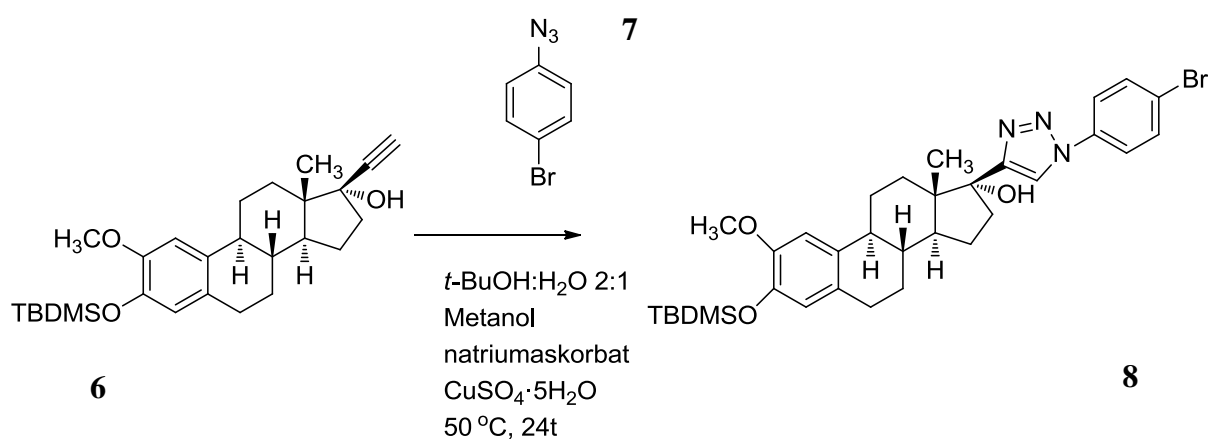
Et annet moment er at tertiære alkoholer vil være mottakelig for syre-katalysert dehydrering. I dette tilfellet, vil en vandig løsning av NH_4Cl i H_2O ofte være brukt på grunn at den er sur nok til å omdanne saltet til en alkohol uten at denne tertiære alkoholen blir dehydrert.

5.3.4. Begrensninger

Selv om Grignardreaksjonen er svært nyttig så har den noen begrensninger. Siden Grignardreagenser er sterke baser kan det ikke lages Grignardreagenser som inneholder sure protoner. I tillegg må det unngås å lage Grignardreagenser av grupper som er mottakelige for nukleofilt angrep.⁽³⁰⁾

5.4. Klikk kjemi

5.4.1 Innledning



Skjema 5.9 : Viser eksempel på klikkreaksjon som ble utført i oppgaven⁽³¹⁾

For å danne 1,4-triazolanalogen ble det utført en klikkreaksjon. Det som skjer i denne reaksjonen er at alkynet og azidet går sammen i dannelsen av triazolringen som er en heterosyklisk 5-ring. Ved å bruke Cu(I) som katalysator vil det dannes kun 1,4-triazolanalogen, slik at denne reaksjonen er stereospesifikk.

5.4.2. Egenskaper til klikk reaksjoner

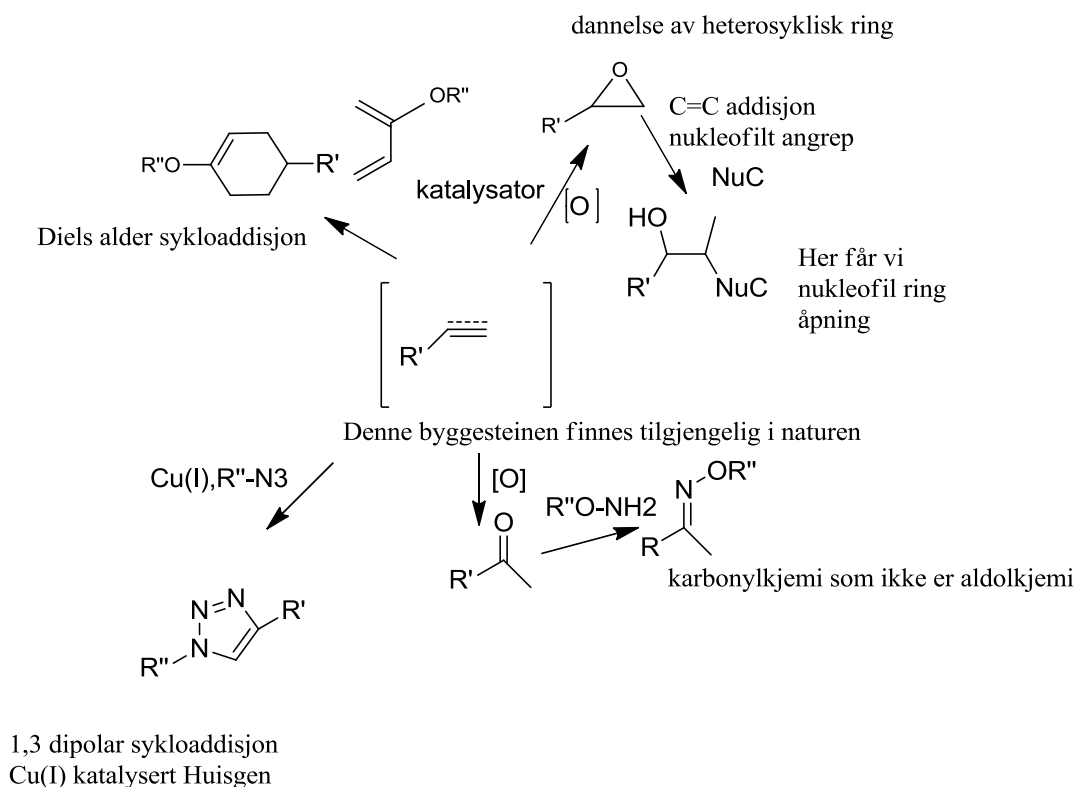
Klikk kjemi er en syntesemetode som går ut på å koble sammen to molekulære enheter. I mitt prosjekt har jeg forsøkt å danne 1,2,3-triazoler ved bruk av kobber som katalysator. Dette er et av de beste eksemplene på klikk kjemi. Her skjer det en koblingsreaksjon mellom azidet og alkynet slik at det dannes et triazol som er en heterosyklisk 5-ring.

Det stilles bestemte krav for at en reaksjon skal kunne klassifiseres som en klikk reaksjon. Denne definisjonen som er gitt av *Sharpless et.al.* Noen av de kravene som stilles er blant annet:

- Reaksjonen må gi et godt utbytte
- Det dannes milde biprodukter som må kunne fjernes uten kromatografi
- Må kunne utføres med milde løsemidler
- Stereospesifikk reaksjon

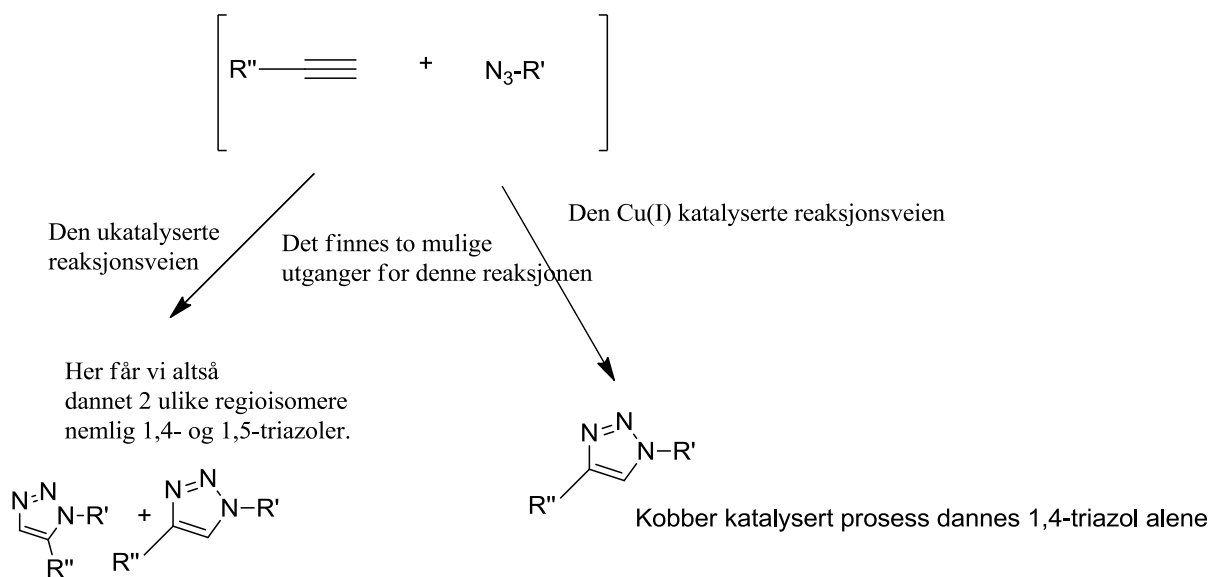
En del reaksjoner har blitt klassifisert som klikk reaksjoner. Eksempler som kan nevnes er:

- Nukleofil ringåpning av epoksider.
- Ikke aldol karbonyl kjemi som f.eks dannelsen av Urea.
- Dannelse av karbon-karbon dobbelt bindinger.



Skjema 5.10: Ett utvalg av reaksjoner som kommer inn undergruppen "klikk reaksjoner"⁽³²⁾

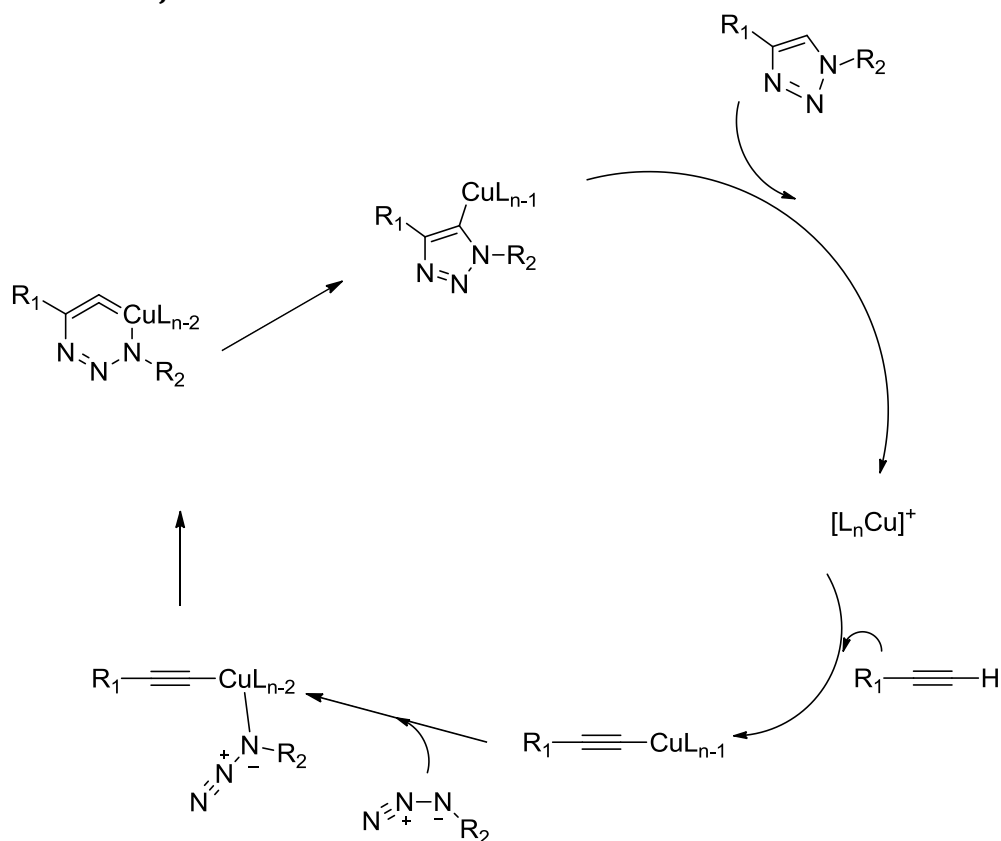
Selv om Huisgen 1,3-dipolar sykloaddisjonen der 1,2,3-triazoler er et godt eksempel på klikk reaksjon kan det ved å bruke kobber som katalysator gi en betydelig økning i reaksjonshastighet. Dette gjør også reaksjonen mer stereospesifikk.



Her representerer gruppen R' gruppene koblet til azidet og R'' gruppene koblet til akynen

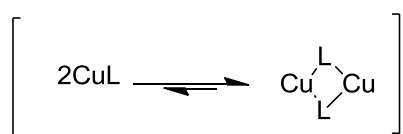
Skjema 5.11: Som figuren viser vil den ukatalyserte Huisgenreaksjonen danne to regioisomere nemlig 1,4 og 1,5 stereoisomere. Derimot så vil vi ved bruk av Cu(I) som katalysator kun dannelsen av 1,4-triazolet som er en stor fordel. ⁽³²⁾

5.4.3.Reaksjonsmekanisme :

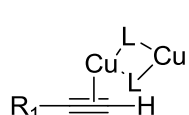
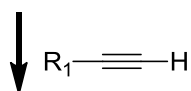


Skjema 5.12: Mekanismen for den Cu(I) katalyserte Huisgenreaksjonen der vi får dannelse av kun 1,4-triazoler (33)

Denne reaksjonen skjer gjennom en spesiell mekanisme og dette er en komplisert reaksjon. Først vil Cu(I) bli innsatt på det terminale alkynet på grunn π -kompleksring som ender med dannelse av en dimer :

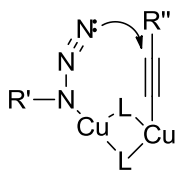


Illustrasjon av likevekten til Cu-katalysatoren



Her får vi kompleksring til det terminale alkynet

Skjema 5.13: illustrerer hvordan vi en tenkt Cu(I) dimer blir dannet og hvordan den kompleksrer til det terminale alkynet. (34)

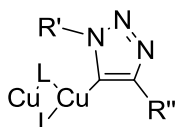


Figur 5.3: Dannelse av metasykel⁽³⁴⁾

Det skjer en deprotonering av terminalt hydrogen og dannelse av Cu-acetylid.

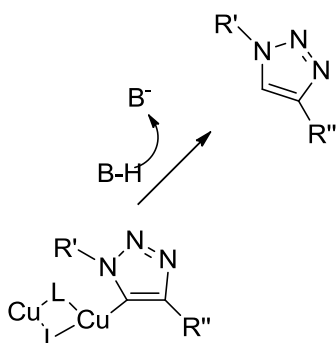
Grunnen til at π -kompleksering kan forekomme i vandig miljø er at Cu^+ binding til det terminale alkynet medfører en reduksjon av dette terminale hydrogenet med 9,8 pK_a enheter som gjør at deprotonering kan altså forekomme uten tilsetning av base. I det neste vil azidet medføre utkastelse av en ligand til Cu-acetylid komplekset.

Deretter skjer det ett nukleofilt angrep på alkyn strukturen der de elektroniske faktorene ser ut til å spille en rolle og vil få dannet en metasykel.



Figur 5.4: Sammentrukket triazolring.⁽³⁴⁾

Triazolringen blir dannet når metasykelen blir trukket sammen ved at det ledige elektronparet på nitrogen gjør et nukleofilt angrep.



Skjema 5.14 : Frigjørelse av triazolen⁽³⁴⁾

Protonering gjør at Cu-katalysatoren fjernes og den kan dermed angripe et nytt substrat og kan dermed gå gjennom den samme syklisen igjen i denne sykliske reaksjonen.

5.4.4 Katalysatoren og energibarriere

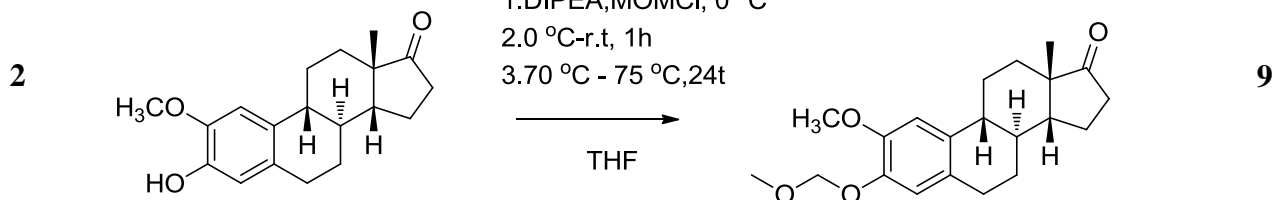
I denne masteroppgaven er en katalytisk mengde kobber benyttet og natriumaskorbat ble brukt som reduksjonsmiddel. Reagenset som brukes er Cu(II) som er kompleksbundet med vann. Natriumaskorbat reduserer Cu(II) til Cu(I). Fordelen med å gjøre det på denne måten er at reaksjonen ikke utføres under tørre betingelser.⁽³⁴⁾

Grunnen til at vi i den ukatalyserte reaksjonen får dannet 1,4- og 1,5- regioisomere forbindelser er fordi energibarrierene til disse ligger veldig nærme hverandre og er funnet til å være henholdsvis 25,7 og 26,0 kJ/cal per mol. Dette gjør at det vil observeres omtrent ett 1:1 forhold mellom de ulike regioisomere forbindelsene.

Det avgjørende trinnet i reaksjonen har vist seg å være der metasykelen blir dannet. Der energibarrieren for dette trinnet er mye lavere enn for den ukatalyserte varianten av reaksjonen. Hastighetsøkningen ved bruk av kobberkatalyse kan også forklares ved senkning av energien.⁽³³⁾

5.5.Beskyttelsesgrupper

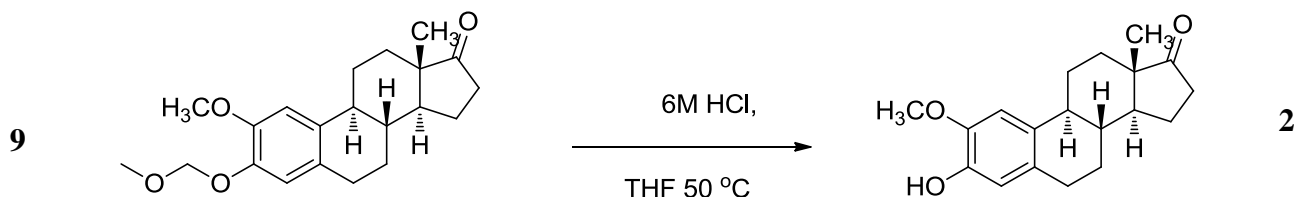
5.5.1.Beskyttelse med metoksimetyl eter (MOM)



Skjema 5.15: Her blir det vist hvordan beskyttelsesgruppen MOM kan innføres på 2-ME ved å tilsette DIPEA og MOMCl.⁽²⁷⁾

Grunnen til at beskyttelsesgrupper ble innført på molekylet var for å forsøke å øke utbytte. Dette ble gjort ved å beskytte den fenoliske OH-gruppen i molekylet. Dette i håp om å øke utbytte under Grignardreaksjonen og videre gjøre at vi får ut mer stoff i siste trinn. To ulike beskyttelsesgrupper ble forsøkt. Den første som ble forsøkt var metoksimetyleter (MOM).

5.5.2. Avbeskyttelse av MOM



Skjema 5.16: Figuren viser avbeskyttelse der det dannes en fri fenolisk OH-gruppe. ⁽³⁵⁾

Selve avbeskyttelsen utføres ved å bruke for eksempel saltsyre (HCl)(aq) og THF som løsemiddel. Sterk syre gjør at eterbindingen spaltes. ⁽³⁵⁾

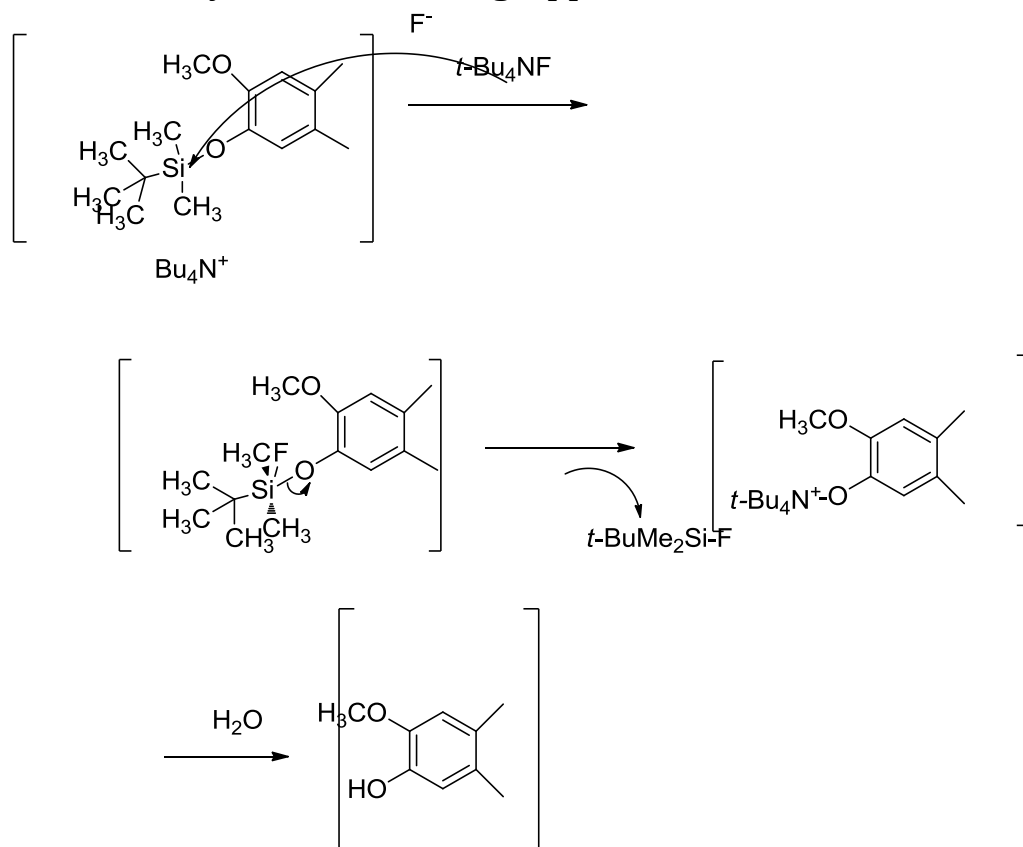
5.5.3. Beskyttelse med TBDMSCl:



Skjema 5.17: Figuren viser hvordan TBDMS kan innføres på den fenoliske OH-gruppen ved bruk av imidazol og TBDMSCl. Steriske faktorer avgjør hvor enkelt det er å innføre gruppen på molekylet. ⁽³⁶⁾

Siden de stoffene som ble laget i dette prosjektet viste seg å være veldig følsomme for syre ble det derfor forsøkt å bytte ut MOM beskyttelsesgruppen med TBDMS som er enklere å fjerne. TBDMS er en av de mest populære silylbaserte beskyttelsesgruppene. Det er mange grunner til dette. Den er enkel å fjerne ved bruk av mange ulike kjemiske reagenser og den er mer stabil. Den store fordelen med å bruke denne gruppen er at den kan fjernes på en måte som ikke påvirker andre funksjonelle grupper. Det er lurt å kjøre reaksjonen i konsentrert løsning. ⁽³⁶⁾

5.5.4. Avbeskyttelse av TBDMS gruppen med TBAF

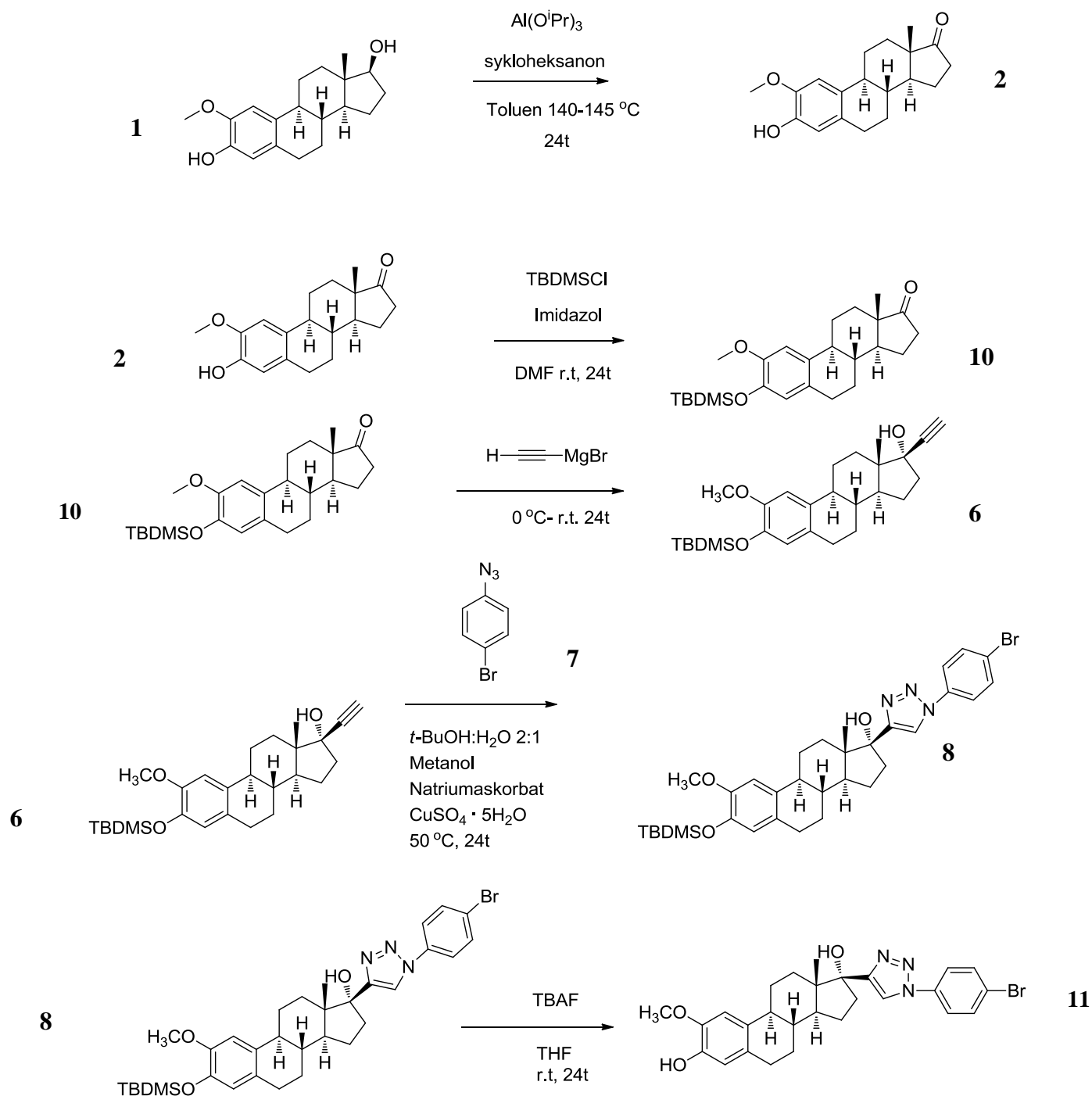


Skjema 5.18: illustrerer mekanismen for kløyvingen av TBDMS. Som figuren viser skjer kløyvingen grunnet fluorid ionet har høy termodynamisk affinitet til Si gruppen og Si-F binding dannes. Vi får spaltet av *tert*-butyl-dimetyl-silisiumfluorid, og ved etterfølgende protonering av saltet som dannes blir OH-gruppen dannet. ⁽³⁷⁾

En vanlig måte å fjerne en TBDMS-gruppe på er å utsette den for TBAF (*tetra*-butyl ammoniumfluorid). Selve spaltingen skjer ved nukleofilt angrep av fluoridionet som danner sterk binding til Si atomet. Dette er hva som driver reaksjonen. Termodynamisk sett er silikon sterkere bundet til fluorid enn til oksygen. ⁽³⁷⁾ Selve kløyvingen utføres ved å bruke TBAF i THF som løsningsmiddel i romtemperatur. ⁽³⁶⁾

6.Resultat og diskusjonsdel

6.1.Grafisk fremstilling av synteserekkefølgen



Skjema 6.1: Grafisk fremstilling av alle syntesetrinnene frem til sluttproduktet. Her vises det en kort oversikt over prosjektet og hvordan syntesen ble utført frem til sluttproduktet. ^{(27), (30),(38)}

Som skjemaet over viser gikk metoden ut på å bruke 2-metoksiøstradiol som utgangsmateriale og oksidere denne til 2-metoksiøstron ved Oppenauer oksidasjon.

Deretter ble den fenoliske OH-gruppen beskyttet med TBDMS. Så ble det utført en Grignardreaksjon slik at alkynet ble dannet. Huisgen-1,4 kobberkatalysert klikkreaksjon ble gjort slik at det dannes et 1,4-1,2,3-triazol. Til slutt ble TBDMS beskyttelsesgruppen fjernet og sluttproduktet, 2-metoksi-17-β-(1-*para*-bromo-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)-østradiol ble dannet.

6.2.Forsøk på Oppenauer oksidasjon



Skjema 6.2: Viser første syntesetrinn der 2-ME blir oksidert med Oppenauer oksidasjon.⁽²⁷⁾

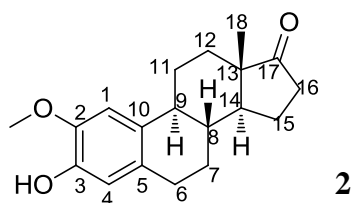
Det første trinnet i selve syntesen starter altså med å utføre Oppenauer oksidasjon. Dette viste seg å være en veldig krevende reaksjon, spesielt på grunn av at det ble dannet masse uorganiske salter fra den store mengden $\text{Al}(\text{O}^i\text{Pr})_3$ som ble brukt.

Derfor ville det være en fordel å bruke en oksidasjonsmetode som var enklere praktisk å utføre. Likevel ble Oppenauer oksidasjon utført på 2-metoksiøstradiol.

I stedet for å flashkromatografere stoffet, ble produktet forsøkt omkrystallisert med heksan. Det viste seg også å være vanskelig å få Dean-Stark fellen til å fungere og få den til å dryppe. Dette ble forsøkt løst ved å isolere den med bomull og varme forsiktig med varmepistol. På grunn av at stoffet felte ut under ekstraksjonen var det viktig å ta TLC underveis i opparbeidelsen for å være sikker på at alt stoffet hadde kommet over i den organiske fasen.

Da stoffet hadde blitt dampet inn på rotavapor gav dette et gulfarget oljeprodukt. Trolig skyldes dette forurensning med sykloheksanon og sykloheksanol. Disse ble forsøkt fjernet. Sluttproduktet ble først satt under destillasjon og deretter omkrystallisert med heksan og gav et hvitt fast stoff. Det har blitt rapportert et utbytte for denne reaksjonen i litteraturen på 89 %⁽²⁷⁾, men dette forsøket gav 20 % i utbytte. Det lave utbytte skyldes sannsynligvis dårlig teknikk.

Tolkning av spekter



Figur 6.1:Strukturen til produktet

¹H-NMR:

Spekteret gir 2 singletter som hver integrerer for 1H. Disse kommer ved 6.81 ppm og 6.66 ppm som kommer fra det aromatiske området. Disse kommer trolig fra de aromatiske protonene i aromatringsen (A-ringen) i 1- og 4- posisjon. Ved 5.60 ppm dukker det opp en singlett som integrerer for 1H. Det er mulig at dette signalet kommer fra OH-gruppen i 3- posisjon. Videre observeres det også en singlett ved 0.94 ppm som trolig kommer fra protonene på karbon 18. Siden metoksigrupeer erfaringsmessig gir signal i området 3-4 ppm vil singletten ved 3.88 ppm trolig ha sitt opphav fra protonene i metoksigruppen i 2- posisjon. Totalt gir spekteret integraler tilsvarende 28 hydrogen. Dette er 4 flere enn forventet. Derfor tyder dette på at produktet ikke er helt rent.⁽³⁹⁾

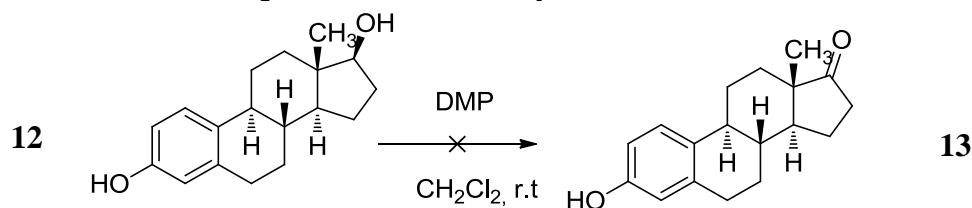
¹³C-NMR spekteret viser 18 signaler for forbindelsen. Da sees det bort fra de små toppene ved 14.53 ppm og 23.05 ppm som trolig er noe forurensning fra løsemiddelrester.⁽⁴⁰⁾

Det dukker opp 6 signaler i det aromatiske område som kommer fra de 6 aromatiske karbonatomene i molekylet. Det er vanskelig å avgjøre hvilke signaler som kommer fra hvilke topper. Dette kunne blitt identifisert med ett 2D-NMR spekter.

Forbindelsen har 19 karboner. Gruppen i 17- posisjon i molekylet er et keton som skal komme ved 185-220 ppm. Denne kommer ikke opp. Tatt dette i betraktning så stemmer antallet på 18 signaler fra forbindelsen i spekteret. Denne ketongruppen kunne ha blitt identifisert ved å ta opp et IR-spekter. Dette ble dessverre ikke utført.

Signalet ved 56.46 ppm kommer trolig fra karbonet på metoksigruppen i 2- posisjon. De resterende signalene representerer de gjenstående alifatiske signalene i forbindelsen. 14.28 ppm er det laveste signalet og kommer sannsynligvis fra metylgruppen på 18- posisjon. ⁽³⁹⁾

6.3.Forsøk på å oksidere 17-β-østradiol ved bruk av Dess-Martin metoden :

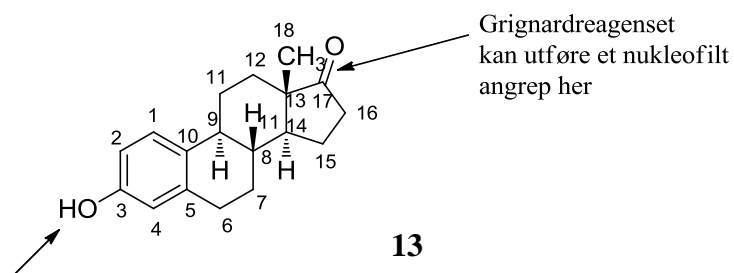


Skjema 6.3 : Viser forsøk på å oksidasjon ved bruk av DMP som ble mislykket. ⁽⁴¹⁾

Siden Oppenauer oksidasjon viste seg å være vanskelig å utføre ble det også forsøkt en annen oksidasjonsmetode, Dess-Martin oksidasjon.

Denne reaksjonen var ikke vellykket. Reaksjonsblandingen endret farge til gul og deretter til brun. Til slutt ble reaksjonsblandingen brunsvart. Reaksjonen ble avsluttet etter 3-4 timer. Mange flekker på TLC kan tyde på at stoffet hadde dekomponert. Emulsjonsdannelse ble observert under opparbeidelsen som gjorde selve opparbeidelsen vanskelig. På grunn av disse observasjonene ble denne strategien forlatt.

6.4.Forsøk på å syntetisere 17-β-etynyløstradiol fra Østron



Reagerer Grignardreagenset med fenolgruppen gir dette en syre-base reaksjon.

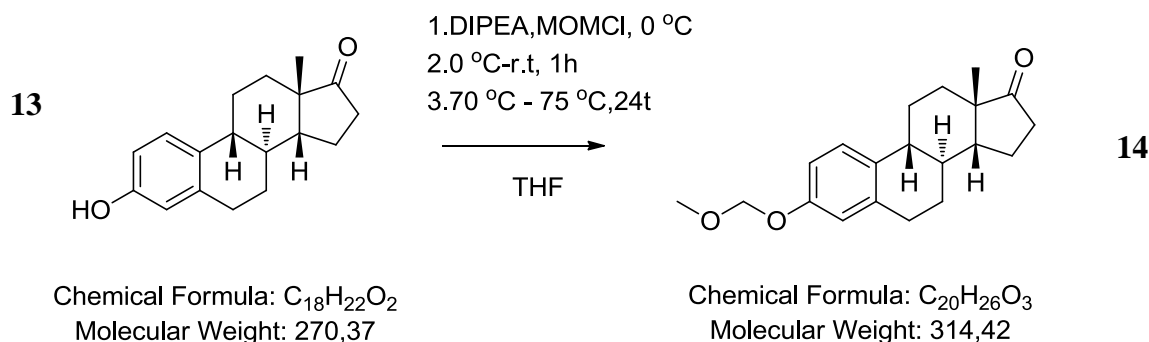
Figur 6.2:På figuren er det illustrert hvilke grupper på molekylet som kan tenkes å reagere med Grignardreagenset og dermed gi sidereaksjoner. ⁽³⁰⁾

Problemet med denne reaksjonen er at både den fenolen i 3- posisjonen og ketonet i 17- posisjonen reagerer med Grignardreagenset, etynylmagnesiumbromid som både har basiske og nukleofile egenskaper. Dette vil ødelegge reagenset. Når reaksjonen ble utført ble det sett antydning til varmeutvikling. Reaksjonen ble derfor utført ved å løse utgangsstoffet i tørr THF, og som deretter forsiktig ble tilsatt etynylmagnesiumbromid dråpevis mens reaksjonskolben stod på isbad.

De ulike sidereaksjonene som kan skje, kan tenkes å være en forklaring på hvorfor produktet som ble dannet i reaksjonen trolig så ut til å være en blanding av flere stoffer.

En mulig løsning på dette problemet er å innføre en beskyttelsesgruppe på fenolen. Dette vil muligens minke faren for sidereaksjoner, og kan bidra til økt utbytte. Et annet svært viktig moment er at etynylmagnesiumbromid også kan reagere med vann og derfor ble reaksjoner utført under tørre betingelser.⁽³⁰⁾ Noe galt kan ha skjedd under rensingen, kanskje fordi R_f verdien mellom utgangsstoffet og produktet var veldig liten som gjorde at det var vanskelig å se forskjell.

6.5.Forsøk på MOM-beskyttelse av østron :



Skjema 6.4: : Viser hvordan MOM-gruppe kan innføres på østron.⁽²⁷⁾

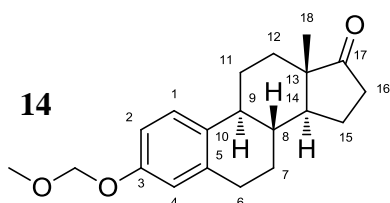
For å øke sjansen for bedre utbytte på Grignardreaksjonen ble det utført en testreaksjon der det ble forsøkt å innføre beskyttelsesgruppen MOM på den fenoliske-OH gruppen i østron.⁽³⁵⁾ Det ble observert røykutvikling ved tilsetning av MOM til reaksjonsblandingen.

For å unngå sidereaksjoner ble reaksjonen utført under tørre betingelser, og MOMCl ble tilsatt dråpevis mens kolben stod på isbad. Det lave utbyttet i denne reaksjonen skyldes trolig at teknikken ved tilsetning var for dårlig eller at reagensene var for gamle.

Videre ble det tatt opp ^1H -NMR og ^{13}C -NMR spektre av produktet.

Tolkning av NMR spektrene

^1H -NMR spekter:



Figur 6.3: Viser strukturen til produktet

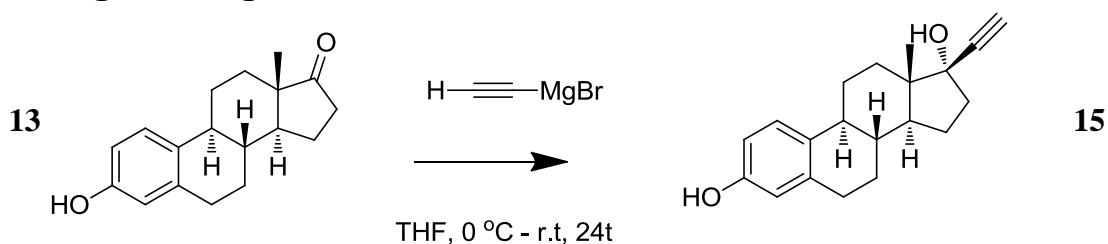
Det ble observert signaler som integrerer for 3 hydrogen i det aromatiske området. For å finne ut hvilke som tilsvarer de ulike protonene i strukturen måtte koblingskonstantene regnes ut. Dubletten ved 7.23 ppm har en koblingskonstant på $J = 8.51$ Hz som indikerer kobling til *orto*-posisjon som derfor trolig tilsvarer hydrogenet i 1- posisjon. Videre vil den doble dubletten ved 6.87 ppm gi koblingskonstanter på 2.61 Hz og 8.6 Hz som tyder på *orto* og *meta* kobling. Dette passer for protonet i 2- posisjon.⁽⁴²⁾ Mens singlettene ved 5.17 ppm og 3.50 ppm gir opphav til CH_2 og CH_3 i MOM gruppen som viser at reaksjonen har vært vellykket. Totalt integrerer spekteret for 28 hydrogen som tyder på litt forurensning i produktet.⁽³⁹⁾

¹³C-NMR :

¹³C-NMR spekteret gav også bra identifikasjon av stoffet. Det er 6 signaler i det aromatiske området som svarer til de 6 karbon atom i benzen ringen. Signalet ved 94.88 ppm kommer sannsynligvis fra CH₂-gruppen i MOM. Metoksigruppen i MOM kommer trolig ved 56.32 ppm.

¹³C-NMR spekteret gir totalt 19 signaler for forbindelsen. Karbonylgruppen i 17- posisjon dukker ikke opp. Tatt hensyn til dette gir spekteret riktig antall signaler fra forbindelsen i spekteret og stemmer med molekylformelen til stoffet. Karbonylgruppen kunne eventuelt blitt identifisert ved å ta opp et IR-spekter. Dette ble ikke utført. ⁽³⁹⁾

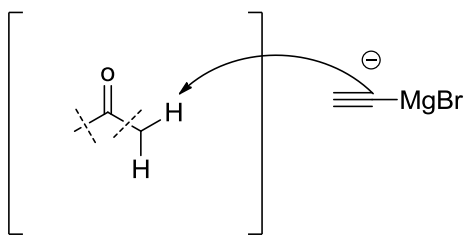
6.6.Forsøk på Grignardreaksjon ved å øke antall ekvivalenter med Grignardreagenset



Skjema 6.5 :Viser Grignardreaksjonen som ble utført ved å tilsette flere ekvivalenter med Grignardreagenset. ⁽²⁷⁾

Det ble gjort ett nytt forsøk på å utføre Grignardreaksjon uten beskyttelsesgruppe. Denne gangen ble metoden endret ved å øke antall ekvivalenter med etynylmagnesiumbromid til det doblete, fra 5 til 10 ekvivalenter. Dette ble gjort i håp om at hvis det er et stort overskudd av etynylmagnesiumbromid vil det være nok av reagenset igjen selv etter at det har reagert med de sure gruppene i molekylet til at det vil gi ett høyere utbytte. Dermed er det mulig å unngå ett trinn, nemlig beskyttelse av OH-gruppen, og det vil forkorte synteseveien til sluttproduktet. Videre viste ¹H-NMR at produktet var veldig forurenset.

Dette kan tyde på at det har forekommet en del sidereaksjoner som gjorde at reaksjonen ikke ble vellykket. For eksempel kan det tenkes at Grignardreagenset i stedet for å reagere som en nukleofil på karbonyl som vi ønsker, heller reagerer med α-protonet i 5-ringen på grunn av de sterkt basiske egenskapene. ⁽³⁰⁾

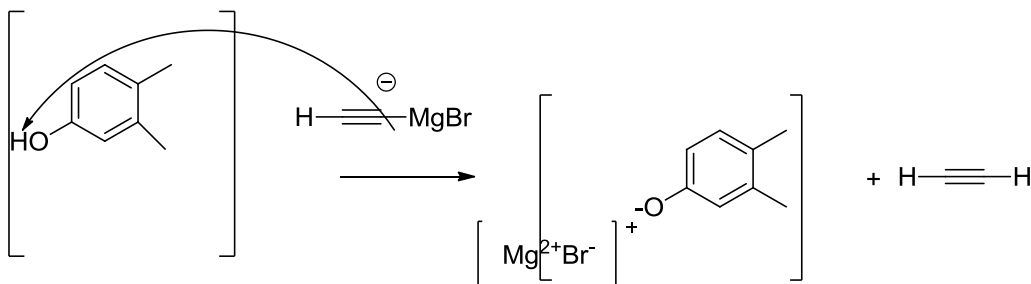


Skjema 6.6: Grignardreagenset kan angripe α protoner på molekylet. ⁽³⁰⁾

6.7. Forsøk på Grignardreaksjon etter innførelse av beskyttelsesgruppen MOM

Selv om utbyttet i foregående testreaksjon ble lavt ble det prøvd en Grignardreaksjon på dette produktet. Dette for å se om det var noe økning i utbytte etter innføring av denne beskyttelsesgruppen.

Dette burde forventes siden en av grunnene til det lave utbyttet kan være at Grignardreagenset reagerer med fenolgruppen :



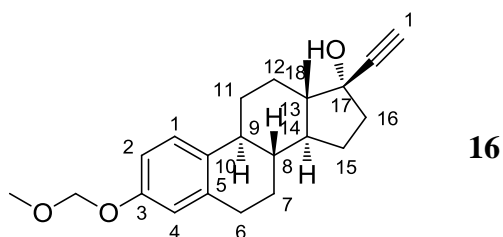
Skjema 6.7: Viser hva som skjer når Grignardreagenset reagerer med fenolgruppen ⁽³⁰⁾

Ved innførelse av MOM-gruppen vil denne sidereaksjonen bli blokkert. ⁽³⁰⁾

6.8. Forsøk på Grignardreaksjon på 3-O-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol

Siden det ikke ga noe bra resultat ved kun å øke antall ekvivalenter av etynylmagnesiumbromid direkte på østron ble det valgt å gå videre med 3-O-metoksimetyl-østron i håp om at Grignardreaksjon på denne ville øke utbyttet. Produktet av denne reaksjonen gav en orange olje.

Tolkning av spekter



Figur 6.4: Viser strukturen til produktet

¹H-NMR spekteret viste 2 dubletter og 1 en dobbel dublett i det aromatiske område som tidligere og tilsvarer de 3 aromatiske protonene. Siden dubletten ved 7.14 ppm har en koblingskonstant på 8.6 Hz indikerer dette *orto*-kobling. Dette kommer sannsynligvis fra protonet i 1- posisjon. Ved 6.76 ppm kommer en dobbel dublett som har koblingskonstanter på 2.58 Hz og 8.6 Hz henholdsvis. Dette indikerer både *orto*- og *meta*- kobling. Dette må da være protonet i 2- posisjon. Til slutt kommer det en dublett ved 6.70 ppm med koblingskonstant 2.55 Hz som kan tyde på *meta*-kobling som tilsvarer protonet i 4- posisjon. ⁽⁴²⁾

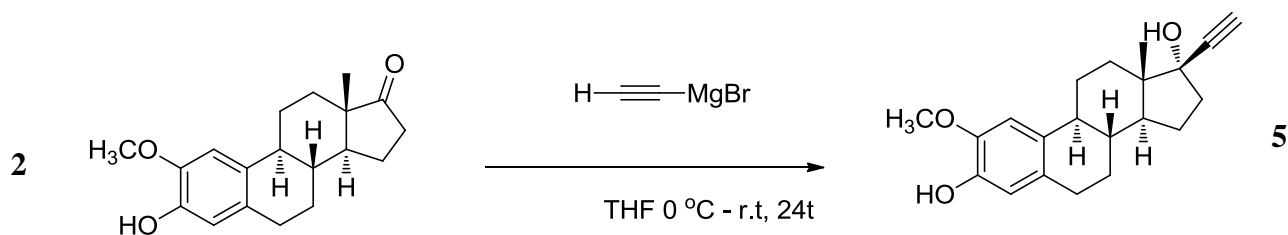
I tillegg vil singlettene ved 5.07 ppm og 3.40 ppm tilsvare CH₂ og CH₃ gruppene på MOM-gruppen siden disse kommer som singletter og integrerer for 2 og 3 hydrogen.

Den viktigste endringen i dette spekteret er toppen ved 2.53 ppm som er en singlett som integrerer for 1H og kommer i området for terminale alkyner. Siden denne singletten tilsvarer hydrogenet i alkynyl gruppen viser dette at reaksjonen har vært vellykket. Singletten ved 0.81 ppm som integrerer for 3H tilsvarer trolig hydrogenene på metylgruppene i 13- posisjon. Totalt integrerer spekteret for 29 hydrogen. Alt i alt gir spekteret god indikasjon på at riktig stoff har blitt syntetisert. ⁽³⁹⁾

Da denne reaksjonen fungerte bra ble det besluttet å bruke dette produktet i neste trinn i synteseveien. Resultatet av denne reaksjonen viser at denne metodikken sannsynligvis kan videreføres til 2-metoksiøstradiol.

6.9.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron

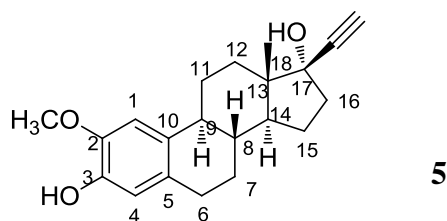
Det ble besluttet å prøve å utføre Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron ved å øke antallet ekvivalenter til 15.



Skjema 6.8: Viser Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron.⁽²⁷⁾

Produktet ble identifisert både med ^1H -NMR og ^{13}C NMR.

Tolkning av spekter:



Figur 6.5: Viser strukturen til sluttproduktet

^1H NMR spekteret viser 2 singletter ved 6.82 ppm og 6.67 ppm som hver integrerer for 1H som gir de to aromatiske H-atomene i 1- og 4- posisjon.

Videre kommer det en topp ved 5.46 ppm som sannsynligvis har opphav fra protonet fra den fenoliske OH-gruppen.

Den viktigste observasjonen i dette spekteret er singletten ved 2.63 ppm tilsvarer protonet i alkynyl gruppen som viser at reaksjonen har vært vellykket.

Til sist kommer protonene på metylgruppen i 18- posisjon ved 0.92 ppm som integrerer for 3H. Signalet fra metoksigruppen kommer ved 3.88 ppm som en singlett.⁽³⁹⁾

Som spekteret viser ble ikke alle rester av etylacetat fjernet. Det er forsøkt vist at disse kommer ved 3 karakteristiske topper.

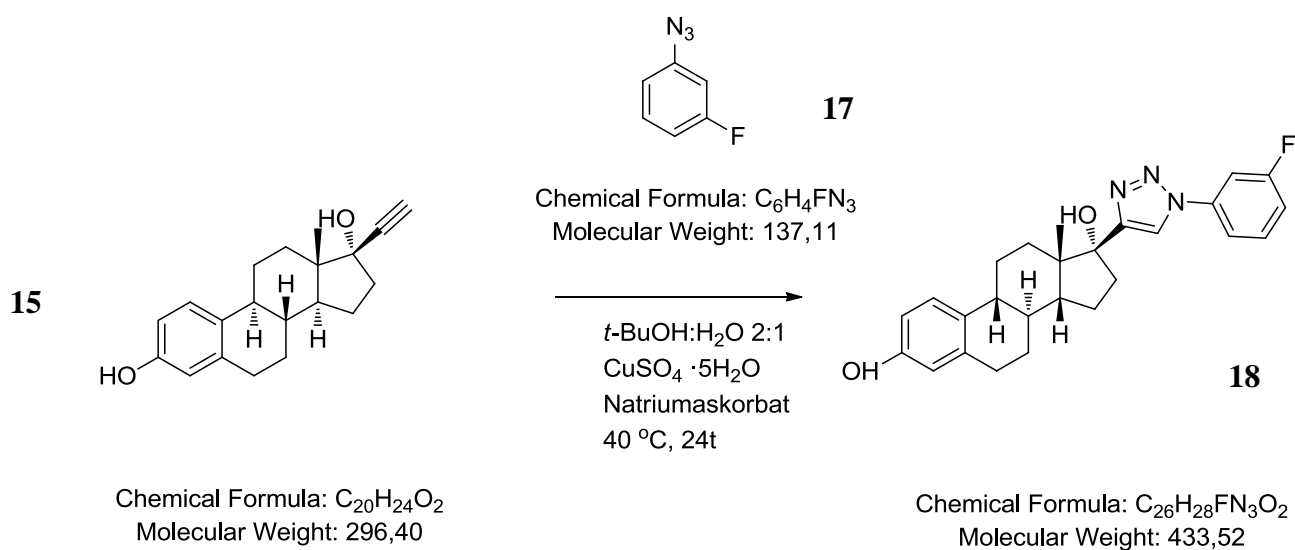
De resterende signalene kommer fra de alifatiske protonene. Hvis vi ser bort fra etylacetat toppene integrerer spekteret til sammen for 29 hydrogen som er litt mer enn antall hydrogen i molekylet. Dette skyldes trolig noen forurensninger.⁽⁴⁰⁾

¹³C-NMR spekteret gir 20 signaler totalt fra forbindelsen. Signalet for karbonatomet i 17- posisjon kommer trolig ikke frem i dette spekteret. Bortsett fra dette vil derfor antallet signaler fra forbindelsen stemme med molekylformelen som har 21 karbon. Spekteret viser de vanlige 6 signalene i det aromatiske området, men nå observeres også signaler ved 87.91 ppm og 74.44 ppm. Disse karbonatomene kommer fra alkynyl gruppen som bekrefter at riktig produkt er dannet.⁽³⁹⁾ Det kommer frem antydning til etylacetat forurensninger som kommer ved små topper ved 21.46 ppm og 60.80 ppm. Dette spekteret indikerer at det fortsatt er litt forurensning av etylacetat igjen i sluttproduktet. Disse løsemiddelrestene var dessverre vanskelig å få fjernet.⁽⁴⁰⁾

Denne reaksjonen viser at metoden med å øke antall ekvivalenter med etynylmagnesiumbromid til 15 har fungert. Det blir dyrt hvis hver reaksjon kjøres i så stor mengder med etynylmagnesiumbromid. For å prøve å gjøre metoden billigere ble det besluttet å innføre en beskyttelsesgruppe på fenolen i 2-metoksiøstron.

6.10.Forsøk på utførelse av klikk kjemi

Dette ble utført ved å tilsette CuSO₄·5H₂O og bruke Cu⁺ ioner som katalysator og reduksjonsmidlet natriumaskorbat. Azidet som ble forsøkt brukt var 1-Azid-3-fluorbenzen.⁽³⁴⁾ Det ble først utført en testreaksjon med 17-β-etynyløstradiol for å se hvordan metoden ville fungere.

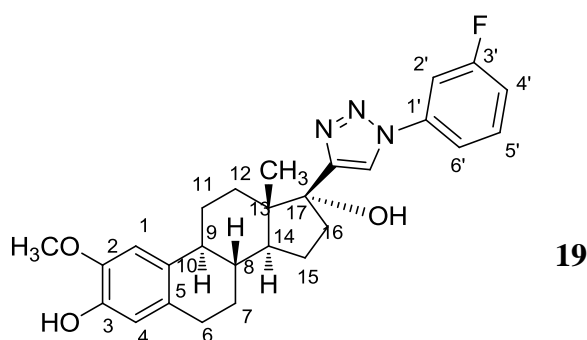


Skjema 6.9: Viser hvordan klikk reaksjonen ble utført.⁽³¹⁾

Først ble det forsøkt med utfelling ved å tilsette is og vann. Dette medførte at kolben eksploderte på grunn av overtrykk. Det er trolig vanskelig å utføre utfelling i så liten skala som disse reaksjonene ble utført i. Etter mye diskusjon med veileder ble det besluttet å gjøre denne reaksjonen om igjen, men denne gangen ble reaksjonsblandingen ekstrahert i stedet for å prøve å felle ut produktet i håp om at dette ville øke utbytte.

Dette ble forsøkt og produktet ble prøvd isolert. ^1H -NMR spekteret viste integraler tilsvarende 8 aromatiske protoner ⁽³⁹⁾ men det var likevel for lite stoff til at produktet kunne identifiseres med NMR. Derfor ble reaksjonen kjørt på nytt.

Det ble forsøkt å kjøre større skala av 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol. Det viste seg at dette også gav et svært lavt utbytte som indikerer at det kan eksistere et løselighetsproblem. Likevel gav reaksjonen nok utbytte til at produktet kunne identifiseres med ^1H -NMR. Det ble observert signaler for 7 aromatiske protoner. Det er litt vanskelig å avgjøre hvilke som tilsvarer de ulike protonene på grunn at fluor også vil være med å koble i benzenringen.



Figur 6.6: Struktur til produktet

Siden det er 2 aromatiske protoner i den aromatiske ringen innebærer dette at disse trolig vil komme som singletter med signaler fra posisjon 1- og 4-. Signalene er 6.62 ppm og 6.69 ppm.

Videre kommer sannsynligvis singletten ved 7.90 ppm fra hydrogenatomet i triazolringen. De resterende protonene i det aromatiske området kommer fra fenylingen. Resten av spekteret blir veldig komplisert. Dette er trolig fordi fluor kobler med hydrogen i den fenylike benzenringen.⁽⁴²⁾ Derfor er det vanskelig å si hvilke protoner som tilsvarer hvilke signaler. Dette kunne ha blitt identifisert ved å ha tatt opp 2D-NMR. Det totale antallet signaler i det aromatiske området gir integraler tilsvarende 7 hydrogen som stemmer med strukturen.

De 3 hydrogen atomer for metoksigruppen kommer trolig som singlett ved 3.81 ppm.

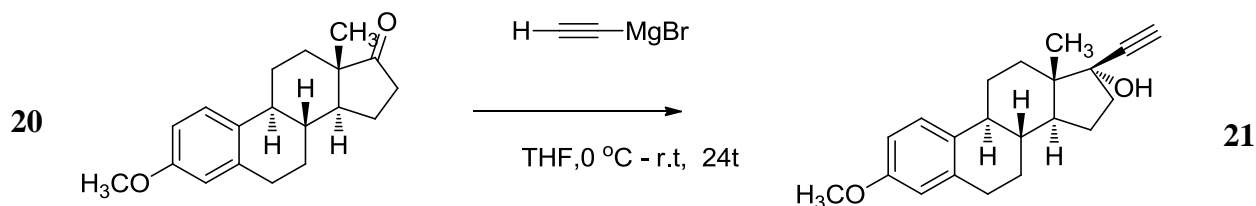
Singletten ved 1.09 ppm integrerer for 3H og kommer fra metylgruppen koblet til karbonet i

13-posisjon..⁽³⁹⁾ Totalt integrerer spekteret for ^1H som tyder på at det finnes noen forurensninger. Spekteret viser tydelige tegn til forurensning med etylacetat.⁽⁴⁰⁾

Totalt viser spekteret at riktig stoff er blitt syntetisert.

6.11.Nye testreaksjoner

6.11.1.Forsøk på Grignardreaksjon på 3-metyleter-østron

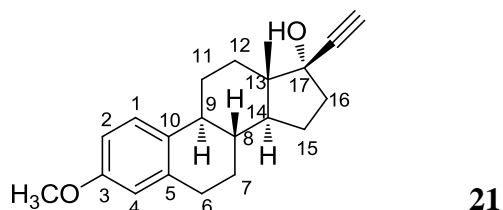


Skjema 6.10: Grignardreaksjon på 3-metyleter østron.⁽²⁷⁾

Her finnes det heller ingen ledige fenoliske OH-grupper som Grignardreagenset kan reagere med. Derfor ville vi forvente et høyt utbytte til denne reaksjonen.⁽³⁰⁾ Utbyttet ble 53 %.

Produktet ble analysert med ^1H -NMR

^1H -NMR:



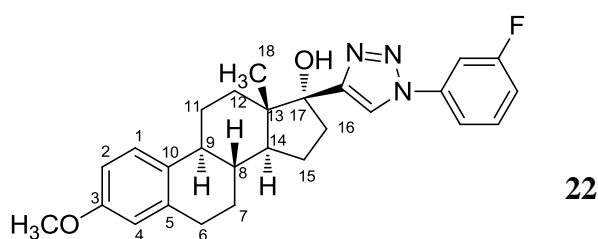
Figur 6.7: Strukturen til sluttproduktet

Det dukker opp integraler for 3 aromatiske protoner som kom ut som 2 dubletter og 1 dobbel dublett. Dubletten ved 7.22 ppm gir en koblingskonstant på $J = 8$ Hz. Dette gir *orto* kobling. Denne kommer sannsynligvis fra protonet i 1- posisjon. Videre kommer den doble dubletten ved 6.72 ppm og gir koblingskonstanter på $J_1 = 8$ Hz og $J_2 = 4$ Hz som tyder på *orto* og *meta* kobling. Dette tilsvarer da sannsynligvis protonet i 2- posisjon. Til slutt kommer dubletten

ved 6.63 ppm, som gir koblingskonstant på $J = 4$ Hz som tyder på *meta* kobling som sannsynligvis tilsvarer protonet i 4- posisjon. ⁽⁴²⁾ Metoksigruppen kommer som en singlett ved 3.78 ppm og integrerer for 3H mens singletten ved 2.60 ppm som integrerer for 1H og tilsvarer protonet på alkynyl gruppen. Dette viser at reaksjonen har vært vellykket. Ved 0.89 ppm kommer trolig protonene på metylgruppen i 13- posisjon som integrer for 3H. Totalt gir spekteret integraler for 27H. Dette tyder på noe forurensning i produktet. ⁽³⁹⁾

Det ble deretter utført klikk kjemi på dette produktet.

6.11.2.Forsøk på klikk kjemi på 3-metyleter 17- β -etynyløstradiol



Figur 6.8:Strukturen til produktet

¹H-NMR:

Spekteret til denne forbindelsen var som forventet. Signalene i det aromatiske området gir integraler tilsvarende 8 hydrogen som stemmer med antallet aromatiske hydrogen i strukturen. ⁽³⁹⁾

Det kommer også signaler fra triazolringen og fenylingen. På grunn av de elektronegative effektene så vil sannsynligvis protonet i triazolringen komme som singlett ved den høyeste ppm verdien og gir trolig opphav til singletten ved 7.94 ppm.

Det kommer 3 signaler fra fenylingen. Det kan være vanskelig å avgjøre hvilke protoner som kommer fra hvilke posisjoner her siden både fenylingen er koblet til nitrogen og fluor. Dette kunne blitt videre identifisert ved å ta opp ett 2D-NMR spekter. Likevel viser spekteret at antallet protoner stemmer i det aromatiske området som indikerer at riktig forbindelse er blitt fremstilt. ⁽⁴²⁾

Toppen ved 5.32 ppm kan være en diklormetan forurensning. ⁽⁴⁰⁾

Metoksigruppen i 3- posisjon integrerer for 3H og kommer ved 3.78 ppm. Metylgruppen i 13- posisjon gir signal ved 1.11 ppm som integrerer for 3H. Ved å se bort fra diklormetantoppen

gir spekteret integraler for 32H. Signal fra OH-gruppen i 17- posisjon ble heller ikke observert. Totalt sett gir spekteret god identifikasjon på at riktig stoff er blitt fremstilt.⁽³⁹⁾

¹³C-NMR

Det ble også tatt opp ett ¹³C-NMR spekter av forbindelsen. Spekteret viste kobling til fluor som gjorde at dette spekteret ble svært vanskelig å tolke i det aromatiske område.

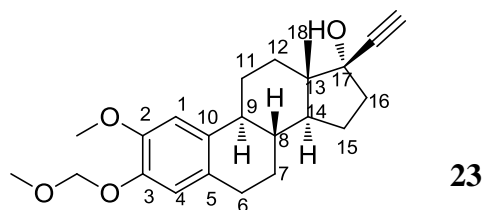
Likevel ga spekteret 19 signaler i det aromatiske område mens det er 14 aromatiske karbon i molekylet. Grunnen til at dette skjer er at det dannes kobling til fluor. Når fluor kobler gir dette en veldig høy koblingskonstant på det karbonet som er koblet direkte til fluor i området over 200 Hz og videre 2 *orto* koblinger som bør ligge i området rundt 20 Hz og 1 *meta* kobling rundt 7-10 Hz. *Para* koblingen som skal ligge rundt 2 Hz var vanskelig å se i karbonspekteret og ble ikke detektert. En dublett observeres ved 163.12 ppm med koblingskonstant på $J = 248.75$ Hz som kommer fra splittingen til karbonet koblet direkte til fluor. Splitting i *orto* posisjon gir dubletter ved 115.62 ppm og 108.19 ppm mens *meta* kobling gir splitting ved 138.19 ppm med koblingskonstant på 10.1 Hz. Den siste splittingen i *para* til fluor var vanskelig å detektere i dette spekteret. Sett i lys av disse 5 splittingene vil antallet med 14 aromatiske karboner stemme i henhold til spekteret.

Det er vanskelig å avgjøre hvilke karbonatomer som tilhører hvilke splittinger og dette kunne blitt videre karakterisert ved å ta opp 2D-NMR spekter.⁽⁴²⁾ Videre viser spekteret metoksigruppe ved 55.18 ppm og metylgruppen i 18- posisjon vil sannsynligvis gi et signal ved 14.24 ppm.⁽³⁹⁾ Videre vises en aceton forurensning ved 30.92 ppm og diklormetan rest ved 53.42 ppm.⁽⁴⁰⁾ Tas det hensyn til alt dette gir spekteret 27 signaler fra forbindelsen som stemmer med molekylformelen.

6.12.Grignardreaksjon på 2-metoksi-3-metoksimetyl-østron

For at det hele tiden skulle være et overskudd av Grignardreagenset ble det tilsatt til rundkolben først for å unngå minst mulig side reaksjoner. Dette kan gi utslag på utbytte. Reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette mettet NH₄Cl løsning. Dette var for å tilføre sure protoner slik at OH-gruppen dannes. Dermed kan stoffet komme over i den organiske fasen.⁽³⁰⁾ Utbytte kan økes ved å bruke en bedre eluent. Først ble det brukt en altfor svak eluent i rensingen av stoffet og måtte flashkromatograferes på nytt med en sterkere eluent.

Sluttproduktet ble identifisert ved bruk av ^1H -NMR og ^{13}C -NMR.



Figur 6.9: Struktur til forbindelsen

^1H -NMR spekteret viser to singletter ved 6.88 ppm og 6.87 ppm som representerer de aromatiske protonene i 1- og 4- posisjon.

Metoksigruppen i 2- posisjon og metoksigruppen på MOM-gruppen vil trolig gi opphav til singlettene ved 3.88 ppm og 3.54 ppm. Mens signalet ved 5.21 ppm trolig gir opphav til signalet for CH_2 gruppen i MOM.

Singletten ved 2.63 ppm integrerer for 1H som tilsvarer protonet i alkynyl gruppen som dermed indikerer at reaksjonen har vært vellykket. Til slutt kommer CH_3 -gruppen i 13- posisjon ved 0.91 ppm. Totalt integrerer spekteret tilsvarende 30 protoner og spekteret gir en god identifikasjon av stoffet.

^{13}C -NMR :

^{13}C -NMR spekteret viser 6 aromatiske signaler som kommer fra den aromatiske benzenringen i molekylet.

Det som er viktig å legge merke til er at signalene som kommer ved 87.52 ppm og 74.05 ppm som kommer fra alkynyl gruppen.

Signalet ved 95.55 ppm kommer sannsynligvis fra CH_2 -gruppen i MOM. Derimot vil signalene ved 56.06 ppm og 56.14 ppm trolig komme fra metoksigruppen i 2- posisjon og fra MOM-gruppen. Signalet ved 12.71 ppm kommer sannsynligvis fra metyl-gruppen i 13- posisjon. Molekylet har 23 karbonatomer og dette stemmer med antallet signaler fra forbindelsen i spekteret.⁽³⁹⁾ Det ble så utført klikk kjemi på dette produktet.

6.13.Klikk kjemi på 2-metoksi-3-metoksimetyl-17- β -etynyløstradiol

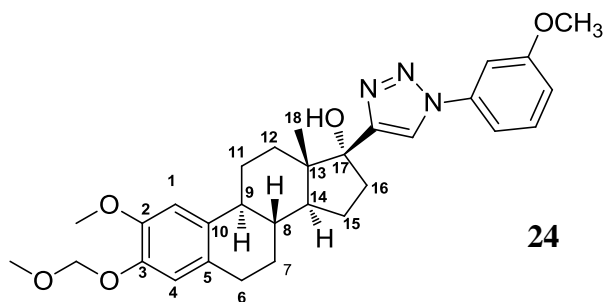
Det ble forsøkt å utføre klikk kjemi på dette molekylet for heller å prøve å gjøre avbeskyttelsen til slutt. Denne gangen var jeg nøye med å sørge for at alle stoffene var løst før

det ble tilsatt $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i siste trinn. Grunnen til at det har vært dårlig utbytte tidligere skyldes muligens løselighetsproblemer.

3-Azidanisolløsningen ble kjøpt som en løsning, og denne ble tilsatt i en egen rundkolbe og dampet forsiktig inn under redusert trykk på rotavapor like før bruk. Den ble deretter løst i metanol og tilsatt til reaksjonsblandingen. Min hypotese er at stoffet løser seg bedre i metanol enn i *tert*-butylmetyleter.

Siden det fortsatt var løsemiddelrester i stoffet etter flashkromatografi og ett døgn på høyvakuum, tyder dette på at disse løsemiddelrestene er svært vanskelig å fjerne. I tillegg ble omkrystallisering utført ved bruk av heksan og aceton. Deretter ble blandingen avkjølt gradvis først en time i romtemperatur, så i kjøleskap og deretter i fryser for å få så store krystaller som mulig. Under filtreringen ble det observert at stoffet inneholdt noe svart grums som tyder på at produktet ikke var helt rent. Etter omkrystallisering ble stoffet vasket med heksan. Dette gav utfelling av et orange fast stoff. Ved sammenlikning av ^1H -NMR før og etter omkrystallisering ble det observert signaler i alken-området i spekteret. Dette kan skyldes trolig dehydrering av den tertiære alkoholen i 17-posisjon. ⁽²⁹⁾. Derfor bør man unngå oppvarming av blandingen, som ved omkrystallisering og heller rense med en flashkromatografi renset metode.

Tolkning av spekter :



Figur 6.10:Strukturen til sluttproduktet

^1H -NMR spekter før omkrystallisering ble tatt opp. Dette spekteret viste integraler tilsvarende 7 hydrogen i det aromatiske området. Det vil si at 2 av dem gir opphav til de aromatiske protonene 1 og 4 posisjon i A-ringene ett i triazolringen og 4 av dem i fenylingen.

Signalene fra protonene i A-ringene vil gi singletter. Dette sees ved 6.86 ppm og 6.76 ppm. Singletten med høyest verdi ved 7.91 ppm kommer sannsynligvis fra hydrogenet i triazolringen. Totalt integrerer spekteret for 7 hydrogen i det aromatiske området, som

samsvarer med strukturen til molekylet.⁽⁴²⁾ Videre kommer CH₂ gruppen fra MOM ved 5.19 ppm. De tre metoksigrupperne i molekylet kommer ved 3.90 ppm, 3.82 ppm og 3.52 ppm. Metyl-gruppen koblet til karbon-13 kommer trolig ved 1.11 ppm. Summen av integralene gir 39H som indikerer at produktet ikke er helt rent.

¹³C-NMR:

Det ble også tatt opp ett ¹³C-NMR spekter av forbindelsen. Spekteret viser da 14 topper fra det aromatiske område som tilsvarer de 14 aromatiske karbonatomene. Metoksigrupperne kommer ved 56.52 ppm, 56.45 ppm og 56.05 ppm som tilsvarer de 3 metoksigrupperne i MOM-gruppen, 2- posisjonen på A-ringene, og en av dem i fenylingen. Det er vanskelig å tolke NMR-spekteret nøyaktig. Dette kunne eventuelt blitt strukturoppklart ved hjelp av ett 2D-NMR spekter. Ved 95.92 ppm kommer sannsynligvis CH₂ gruppen i MOM, mens 14.67 ppm gir trolig opphav til metylgruppen i 13- posisjon.

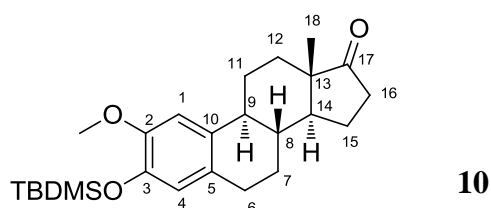
Totalt gir ¹³C-NMR spekteret 30 signaler fra forbindelsen, og indikerer at riktig stoff har blitt fremstilt.⁽³⁹⁾

6.14.TBDMS beskyttelse av 2-metoksiøstron

Siden stoffet er følsomt for varme ble det innført en TBDMS-gruppe i stedet for MOM.

Denne reaksjonen ble utført ved å bruke imidazol og TBDMSCl sammen med løsningsmidlet DMF. Denne reaksjonen ble utført under tørre betingelser.⁽³⁸⁾ Under forsøket ble en hvit suspensjon observert som tydet på saltdannelse.

Stoffet ble identifisert med ¹H-NMR og ¹³C-NMR.



Figur 6.11:Strukturen til sluttproduktet

Tolkning av spekter:

¹H-NMR :

Ved 6.78 ppm og 6.58 ppm kommer de aromatiske protonene. Videre vil toppen ved 0.17 ppm tilsvare de to metylgruppene koblet på Si i TBDMS-gruppen som sammen integrerer for 6H på grunn av symmetri. ⁽⁴²⁾ Ved 1.01 ppm kommer signalene som har sitt opphav fra *tert*-butylgruppen. Dette viser at reaksjonen var vellykket. Totalt integrerer spekteret for 40 H, og indikerer at produktet ikke var tilstrekkelig rent

Det ble også tatt opp ett ¹³C-NMR spekter for videre identifikasjon. Totalt sett gir dette spekteret 23 signaler fra forbindelsen. Dette var forventet siden det er symmetri i *tert*-butylgruppen på TBDMS-gruppen, og denne gir kun 3 signaler. Karbonylgruppen vises ved 207.27 ppm. I tillegg kommer 6 signaler fra aromatiske karboner. Signalet ved 56.20 ppm stammer trolig fra karbonatomet i metoksigruppen ⁽³⁹⁾, mens signalet ved 31.28 ppm trolig er forurensning. ⁽⁴⁰⁾ Det høye signalet ved 26.14 ppm gir sannsynligvis opphav til *tert*-butylgruppen, siden det er symmetri her, og det gir derfor et sterkere signal. Ved -4.19 ppm og -4.22 ppm skjer en splitting av signalet ved metylgruppene koblet til silisium. Metylgruppen i 13- posisjon kommer trolig ved 14.30 ppm. ⁽³⁹⁾

Toppen ved 31.28 ppm er trolig en urenhet. ⁽⁴⁰⁾

Totalt vises 23 sterke signaler som stammer fra forbindelsen og de indikerer at rett stoff er isolert.

6.15.Utførelse av Grignardreaksjon på TBDMS beskyttet keton :

Det ble bestemt å utføre Grignardreaksjonen på denne forbindelsen. Jeg bestemte meg for å gjøre dette og heller utføre avbeskyttelsen i siste trinnet. Tidligere har utbyttet til Grignardreaksjonen vært dårlig. Dette kan skyldes at rundkolben ikke har vært helt tørr. Det ble derfor tatt ekstra forholdsregler denne gangen. Rundkolben ble først satt i varmeskap for å tørke, og deretter ble den avkjølt i eksikator. Det ble brukt en dryppetrakt for tilsetting av Grignardreagenset i dette forsøket. Det viste seg i praksis vanskelig å få til jevn drypping over lang tid ved å bruke kanyle og sprøyte. Dette kan ha påvirket utbyttet i de tidligere reaksjonene. Derfor ble etynylmagnesiumbromid tilsatt dråpevis til reaksjonsblandingen ved hjelp av dryppetrakt. TLC-analysen viste at alt produkt var omsatt, og produktet så rent ut. Det ble derfor ikke flashkromatografert, men heller kjørt gjennom en plugg med silika. Selv på høyvakuum over natt ble produktet en orange olje med tegn til hvite krystaller som

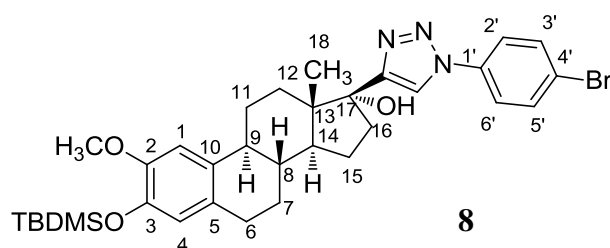
I dette tilfellet ser det ut til at signalet blir splittet i 2 signaler som gir to topper ved -4.16 ppm og -4.18 ppm. Antall signaler fra forbindelsen er 24, som er det man kan forvente. Det nye i dette spekteret er at det kommer 2 signaler for alkynylgruppen. Disse kommer ved 87.97 ppm og 74.36 ppm, der 87.97 ppm er trolig fra det kvarternære C-atomet siden det er nærmere hydroksylgruppen i 17- posisjon. Signalet koblet til OH-gruppen i 17-posisjon vises trolig ikke i spekteret. Videre kommer toppene fra de symmetriske metylgruppene i *tert*-butyl gruppen ved 26.16 ppm siden disse gir et veldig høyt signal.⁽³⁹⁾

¹³C-NMR spekteret gir god indikasjon på at riktig produkt har blitt fremstilt.

6.16.Klikk kjemi på TBDMS-beskyttet alkyn :

Jeg valgte å utføre klikk kjemi på alkynet før selve avbeskyttelsen.

Tolkning av ¹H-NMR spekter.



Figur 6.13: Struktur til sluttproduktet

Ved å studere ¹H-NMR spekteret viser dette at det er noen forurensninger.

Trolig kommer kvartetten ved 3.98 ppm, singletten ved 1.90 ppm og tripletten ved 1.12 ppm fra etylacetat.⁽⁴⁰⁾ Ved å se bort ifra disse toppene integrerer ¹H-NMR spekteret for 44H, som stemmer akkurat med molekylformelen til stoffet som har 44 protoner. ¹H-NMR spekteret gir først en singlett ved 7.79 ppm. Denne kommer sannsynligvis fra protonet i triazolringen. Videre blir det splitting av signalene i fenylingen. En multipllett dukker opp i området 7.53-7.48 ppm som integrerer for 4H. Denne vil med stor sannsynlighet komme fra protonene i posisjonene 2'-,3'- og 5'-,6'- i fenylingen siden disse elementene innehar symmetri. Singlettene ved 6.53 ppm og 6.39 ppm kommer fra protonene i 1 og 4 posisjon i A-ringene siden disse kommer som singletter. Videre kommer en singlett ved 3.58 ppm som integrerer for 3H. Dette skyldes metoksigruppen i 2-posisjon i A-ringene. Singlettene ved 0,84 ppm og 0,0 ppm som integrerer for 9H og 6H skyldes de symmetriske metylgruppene på *tert*-butyl, og

dimetyl-gruppene koblet på Si i TBDMS. Videre kommer en singlett ved 0.95 ppm. Dette skyldes hydrogenatomene på metylgruppen i 18- posisjon. De resterende toppene kommer trolig fra de alifatiske hydrogenatomene i molekylet. Alt dette indikerer at riktig molekyl har blitt fremstilt ⁽³⁹⁾

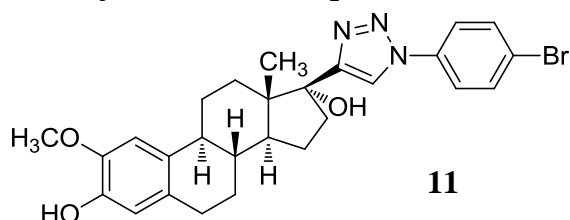
¹³C-NMR

Det kommer tydelig frem at det er forurensing i dette spekteret og spesielt karakteristiske etylacetat topper kommer frem. ⁽⁴⁰⁾ De nye strukturelementene i dette spekteret er de høye toppene ved 132.89 ppm og 121.79 ppm som trolig kommer fra disse symmetriske elementene i fenyrlingen ved 2',3' og 5',6' og vil derfor gi sterke signaler.

Videre så vil dimetyl gruppene på Si atomet komme ved -4.54 ppm og -4.56 ppm som splittes i to. Normalt ville vi ha forventet ett signal i dette området på grunn av symmetrien, men spekteret viser to topper som gjør at dette signalet har blitt splittet. Ved 25.78 ppm kommer trolig signalet for de 3 symmetriske metylgruppene på *tert*-butyl gruppen. Dette signalet kommer ved en veldig høy topp på grunn av symmetri mellom 3 like grupper som gjør at dette signalet blir veldig sterkt. På samme måte som tidligere vil trolig metoksigruppen gi opphav til et signal som denne gangen trolig kommer ved 55.87 ppm

De resterende karbonatomene kommer trolig fra de gjenværende alifatiske signalene i molekylet. Totalt gir spekteret 29 signaler fra forbindelsen. Dette stemmer siden det er symmetri for 3 metylgrupper i *tert*butyl-gruppen på TBDMS og symmetri ved 1,6 og 3,5 posisjonene i fenyrlingen. ⁽³⁹⁾

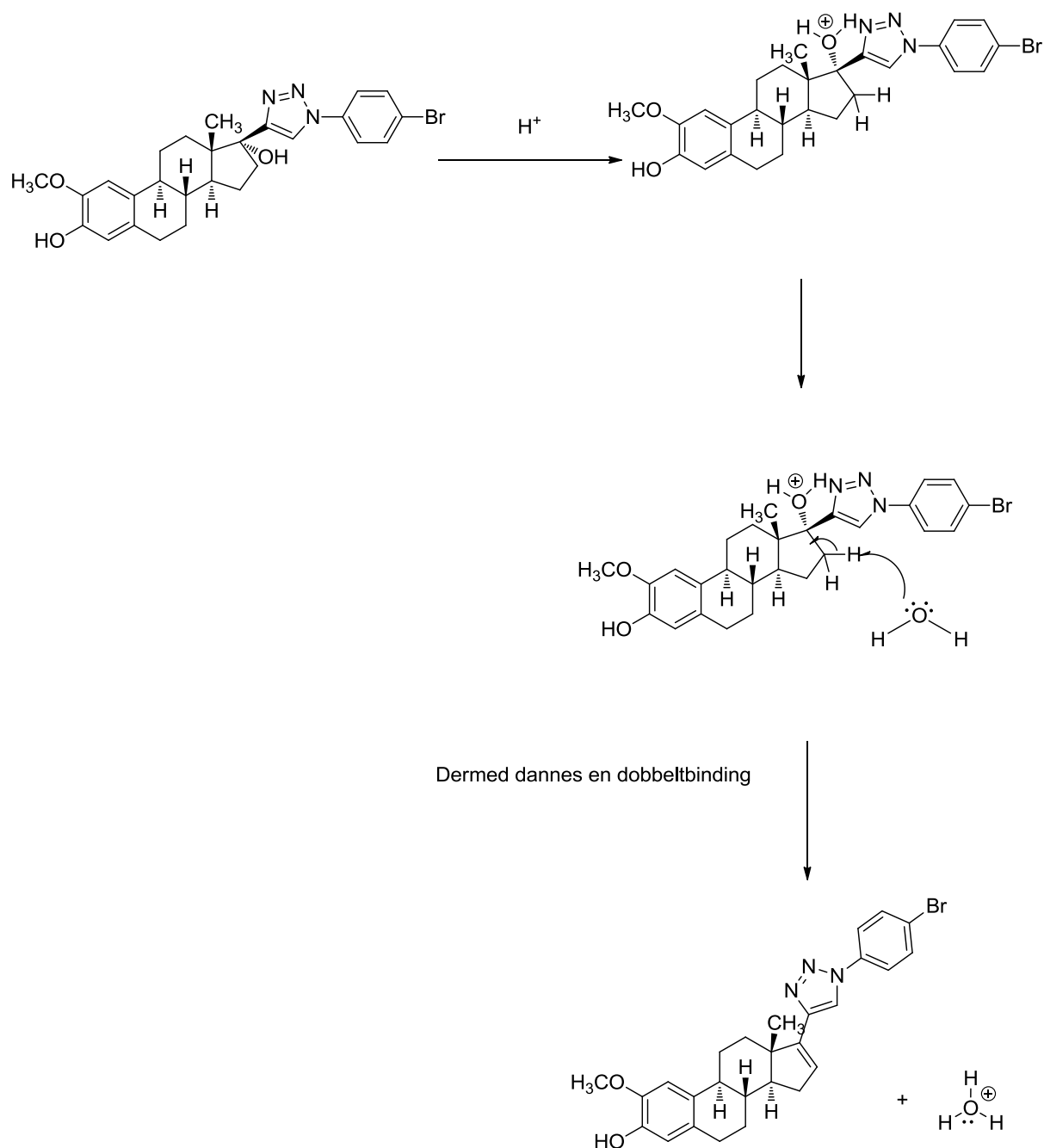
6.17.Syntese av sluttproduktet i siste trinn :



Figur 6.14: Strukturen til sluttproduktet

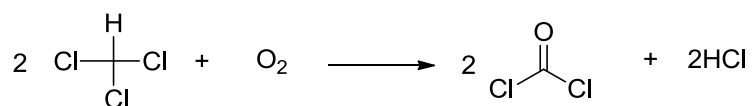
Siden det var store problemer med å få rensset produktet viste det siste ¹H-NMR spekteret topper ved 5.97 ppm og 5.93 ppm som kommer i alkenområdet ⁽³⁹⁾

Dette skyldes sannsynligvis dehydrering av den tertiære alkoholen og videre dannelsen av alken:



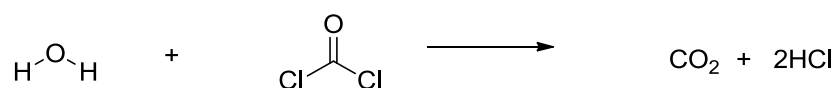
Skjema 6.11 : Figuren illustrerer hvordan man tenker seg at den tertiære alkoholen blir dehydrert gjennom en E-1 reaksjon⁽²⁹⁾

Dette skyldes sannsynligvis at produktet hadde blitt stående i deuterert kloroform der følgende reaksjon derfor kan skje:



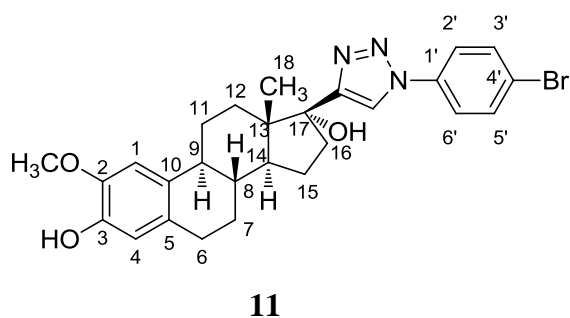
Skjema 6.12 : Kloroform kan bli oksidert⁽⁴³⁾

Fosgen kan også reagere med vann slik at det dannes CO₂ og saltsyre. Denne reaksjonen akselereres av syre.



Skjema 6.13 : Fosgen kan reagere med vann.⁽⁴⁴⁾

Siden ¹H-NMR spekteret også viser at det fantes små rester av etylacetat⁽⁴⁰⁾, ble krystallene til produktet løst i CH₂Cl₂ og dampet inn i håp om at mer av etylacetaten skulle forsvinne, og at diklormetan var lettere å få bort. Dette ble gjentatt et par ganger. Dette resulterte dessverre i en ny CH₂Cl₂ topp ved 5.22 ppm. Etter all bearbeidelsen av produktet og etter at nye NMR prøver ble tatt opp medførte dette at alkentoppen i spekteret økte før og etter vaskingen av krystallene⁽³⁹⁾. Den gjentatte inndampingen i diklormetan har trolig ført til eliminasjon av den tertiære alkoholen.⁽²⁹⁾



Figur 6.15: Strukturen til sluttproduktet

Tolkning av spektre :

¹H-NMR :

Først ble stoffet identifisert ved ¹H-NMR spekter. Det dukker opp integraler tilsvarende 7 protoner for det aromatiske området. Dette stemmer overens med strukturen. Videre viser strukturen at protonene i posisjonene 2',3' og 5',6' med de aromatiske protonene i fenylingen er symmetriske med hverandre, som trolig gir opphav til multipletten ved 7.75-7.64 ppm som integrerer for 4H. Dette signalet kommer trolig fra protonene i posisjonene 2',3',5' og 6'. Videre kommer et signal ved 7.92 ppm. Siden dette signalet kommer som en singlett ved veldig høy ppm verdi vil den trolig ha sitt opphav fra protonet i triazolringen. De resterende 2 protonene kommer fra proton på karbon 1 og 4. ved 6.70 ppm og 6.64 ppm.

Når det gjelder de andre gruppene så kommer metoksigrupeer erfaringsmessig i området 3.3-4 ppm. Signalet ved 3.82 ppm integrerer for 3H kommer trolig fra metoksigruppen i 2-posisjon. Ved 1.11 ppm kommer et integral på 3H og har sitt opphav fra hydrogen på metylgruppen på karbon 18.

Den viktigste endringen på dette spekteret i forhold til forrige reaksjon er at signalene fra TBDMS ikke er å finne i dette spekteret. Dette indikerer at avbeskyttelsen har vært vellykket. Totalt gir spekteret integraler tilsvarende 28 hydrogen atomer. Signalene for de to OH-gruppene sees ikke i spekteret. Spekteret gir totalt gode indikasjoner på at riktig stoff er blitt fremstilt.⁽³⁹⁾

Det ble også tatt opp et ¹³C-NMR spekter til forbindelsen. Siden dette spekteret ble tatt opp før krystallene ble rensset for løsemiddelrester vil det være enkelte forurensninger i spekteret som må identifiseres. Etylacetat forurensningene observeres ved 171.16 ppm, 60.40 ppm, 21.05 ppm og 14.20 ppm. I spekteret observeres en liten topp ved 52.14 ppm som kan ha sitt opphav fra diklormetan.⁽⁴⁰⁾ Sett bort fra disse forurensningene gir spekteret 25 signaler fra forbindelsen som stemmer akkurat med 27 karbon atom som er i molekylet hvor karbon 2', 6' - og 3', 5' - innehar symmetri. Dette er fordi det er symmetri i den aromatiske benzenringen. Det kommer 12 signaler i det aromatiske området som stemmer med 14 aromatiske karbonatomer i forbindelsen. Det er vanskelig med sikkerhet å avgjøre hvilke signaler som kommer fra hvilke karboner i det aromatiske området. Det kunne blitt bestemt mer nøyaktig ved å ta opp ett 2D-NMR spekter.

Signalene ved 132.89 ppm og 121.77 ppm kommer trolig fra karbonene i 2',6' - og 3',5' - posisjonene i fenylingen siden disse har symmetri og vil derfor gi sterkere signaler. Den

viktigste endringen i dette spekteret er at det ikke lenger observeres topper for TBDMS gruppen, som igjen viser at reaksjonen har vært vellykket.⁽³⁹⁾ Alt i alt ble slutt produktet 2-metoksi-17- β -(1-*para*-bromo-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl) fremstilt.

7.Konklusjon

I løpet av prosjektet ble det undersøkt hva som kunne være den mest effektive synteseveien for produktet vi ønsket å lage. Det viste seg at synteseveien som fungerte best, var å beskytte fenolen før Grignardreaksjonen. Beskyttelsesgruppen som til slutt ble valgt for fenolen var TBDMS. I starten gav klinkreaksjonen dårlige utbytter. Utbyttene i klinkreaksjonen ble forbedret ved å benytte metanol som løsningsmiddel i stedet for *tert*-butyl alkohol, samt å øke mengden Cu(II) og natriumaskorbat. Fremstillingen av 2-metoksi-17- β -(1-*para*-bromo-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl) var vellykket. Analogen 2-metoksi-17- β -(3-fluoro-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl) ble forsøkt syntetisert, men på grunn av tidsaspektet for denne oppgaven, så ble det ikke tid til å fjerne MOM-gruppen.

8.Videre arbeid

Det ble altså vellykket å syntetisere 1,4-Disubstituerte-1,2,3-triazoler ved bruk av 2-metoksiøstradiol som utgangsstoff. Dessverre så er 2-metoksiøstradiol en svært dyr forbindelse som koster 840 NOK for bare 5 mg.⁽⁴⁵⁾ En mulig forbedring av syntesestrategien kan derfor være å benytte østradiol som utgangsstoff i stedet for 2-metoksiøstradiol.

Siden utbyttene ble estimert til å være rundt 50 % burde det fortsatt være mulig å forbedre metoden ved for eksempel å prøve andre løsningsmidler. I tillegg viste forsøkene på å lage disse forbindelsene at produktet er både veldig følsomt for varme og for syre. Derfor er omkrystallisering ikke aktuell rensete metode i siste trinn. I stedet bør det nok heller jobbes med å finne optimale kromatografiske betingelser eller for eksempel en metode for fremstilling av 2-metoksiøstradiol fra østradiol. I litteraturen har det blitt rapportert en metode med MOM beskyttelse av østradiol og videre innføring av metoksigruppe ved bruk av *t*-BuLi og cumyl metyl peroksid.⁽⁴⁶⁾

9. Eksperimentelt

9.1. Materialer

Reagensene som ble benyttet i denne oppgaven ble kjøpt fra produsenten Sigma Aldrich.

9.2. Analyser

Synteseproduktene ble analysert ved hjelp av TLC, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR. Deretter ble alle spektrene forsøkt karakterisert.

9.2.1. Smeltepunktet

Det ble målt smeltepunkter for noen få produkter. Smeltepunktet ble målt med Stuart Scientific melting point apparatus SMP3.

9.2.2. Tynnsjikt-kromatografi

TLC ble utført med TLC aluminiumsplater med silika Gel 60 F₂₅₄ (Merck). Disse ble forsøkt analysert under UV-lys 256 nm og noen typer dip som CAM og kaliumpermanganat.

9.2.3 Kjernemagnetisk ressonans

Det ble tatt ^1H -NMR og ^{13}C -NMR av de fleste produkter. ^1H -NMR og ^{13}C -NMR ble tatt opp på DPX300 eller DPX400 hvor begge har prøvebeholdere under automatisering. Løsemidlet som ble brukt var CDCl_3 og prøvene ble analysert ved romtemperatur. Spektrene ble bearbeidet ved bruk av programvaren Mestrenova. Koblingskonstantene (J) blir rapportert i hertz (Hz), og kjemisk shiftverdi blir rapportert i parts per million (δ) i forhold til løsemidlet.

CDCl_3 har følgende kjemisk shiftverdi (δ) :

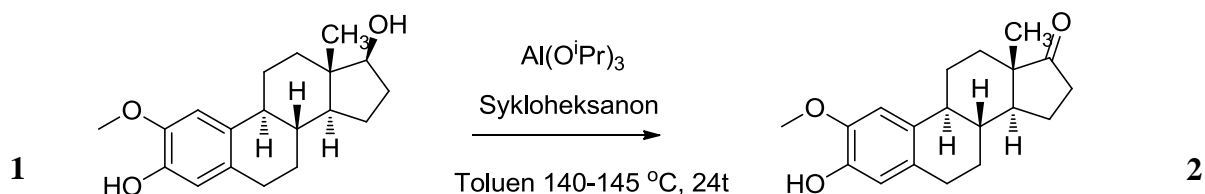
^1H -NMR δ 7.24 (s)

^{13}C -NMR δ 77.23 (t)

(40)

9.3.Forsøk på å syntetisere 2-metoksiøstron fra 2-metoksiøstradiol

Reaksjonslikning :



Chemical Formula: $C_{19}H_{26}O_3$
Molecular Weight: 302,41

Chemical Formula: $C_{19}H_{24}O_3$
Molecular Weight: 300,39

Referanse ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g/)	Volum (mL)	Mw (g/mol)	Tetthet (g/cm ³)	k.p (° C)
Forbindelse 1	4,00	1	1,21		302	N/A	
Al(O ⁱ Pr) ₃	20	5	4,09		204	N/A	
sykloheksanon	165,00	40	15,70	17	98	0,95	156
Toluen				50	92		111

Forbindelse 1 (4,0 mmol, 1,21 g) ble tilsatt en 250 ml 2-halset rundkolbe som var påmontert med en 10 ml Dean-Stark felle. Systemet ble deretter gjennomblåst med N₂ gass i 5 minutter før tolueen (50 ml) ble tilsatt. Blandingen ble satt til omrøring på varme mentel til stoffet løste seg. Deretter ble blandingen varmet til (140-150 °C). Al(OⁱPr)₃ (4,09g, 20 mmol) ble deretter tilsatt. Deretter ble sykloheksanon (17 ml, 165 mmol) tilsatt. Blandingen ble refluksert i ca 24 timer inntil TLC viste at alt startmateriale var omsatt. Blandingen ble avkjølt og overført til en skilletrakt og ionebyttet H₂O (100 ml) ble tilsatt. Løsningen ble surgjort med litt kons. HCl. Stoffet felte ut til bunnen i skilletrakten. Løsningen ble vasket med vandig HCl. Det ble

forsøkt å ekstrahere med EtOAc. Med det felte ut mange salter. Så ble det forsøkt å ekstrahere med dietyleter ($C_2H_5)_2O$. Deretter med diklormetan (CH_2Cl_2). Til slutt ble de samlede organiske fasene slått sammen, tørket over $MgSO_4$ og dampet inn under redusert trykk på rotavapor.

Sykloheksanol og sykloheksanon rester ble fjernet ved destillasjon.

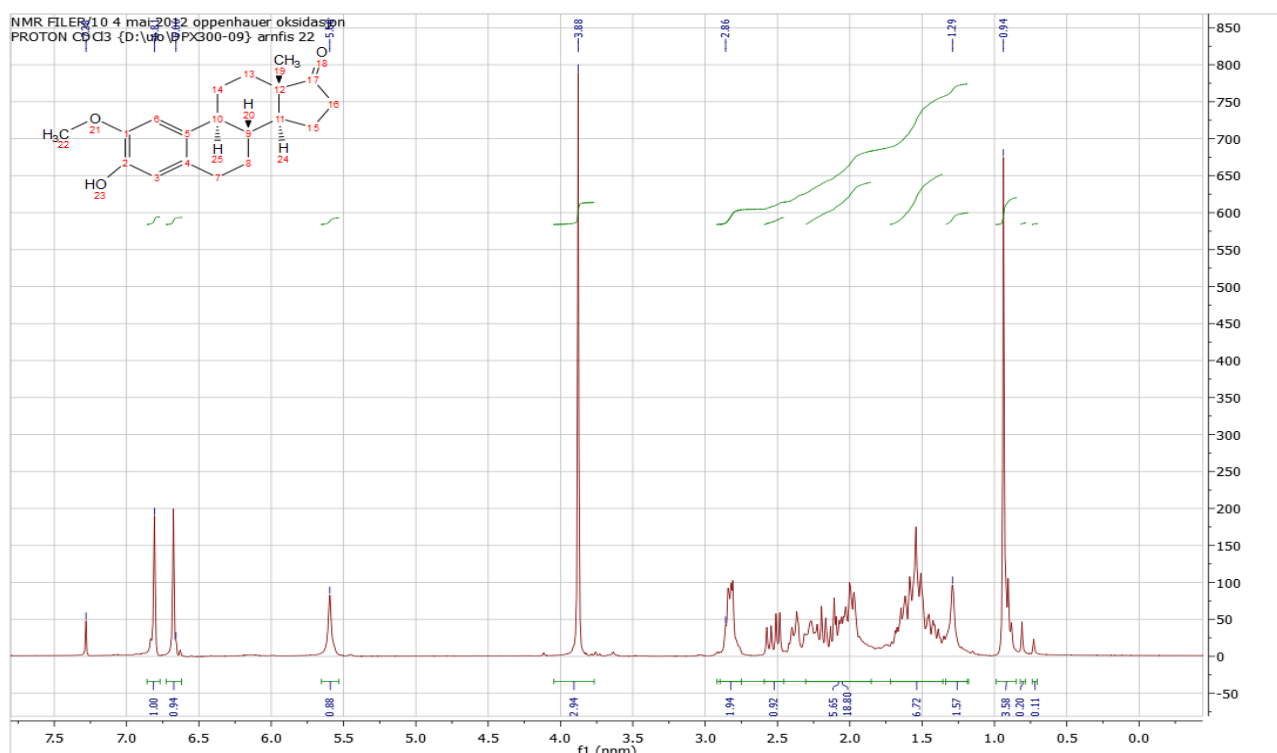
Det som var igjen etter destillasjonen ble til omkrystallisert med heksan og gav rett produkt.

Utbytte : 21%

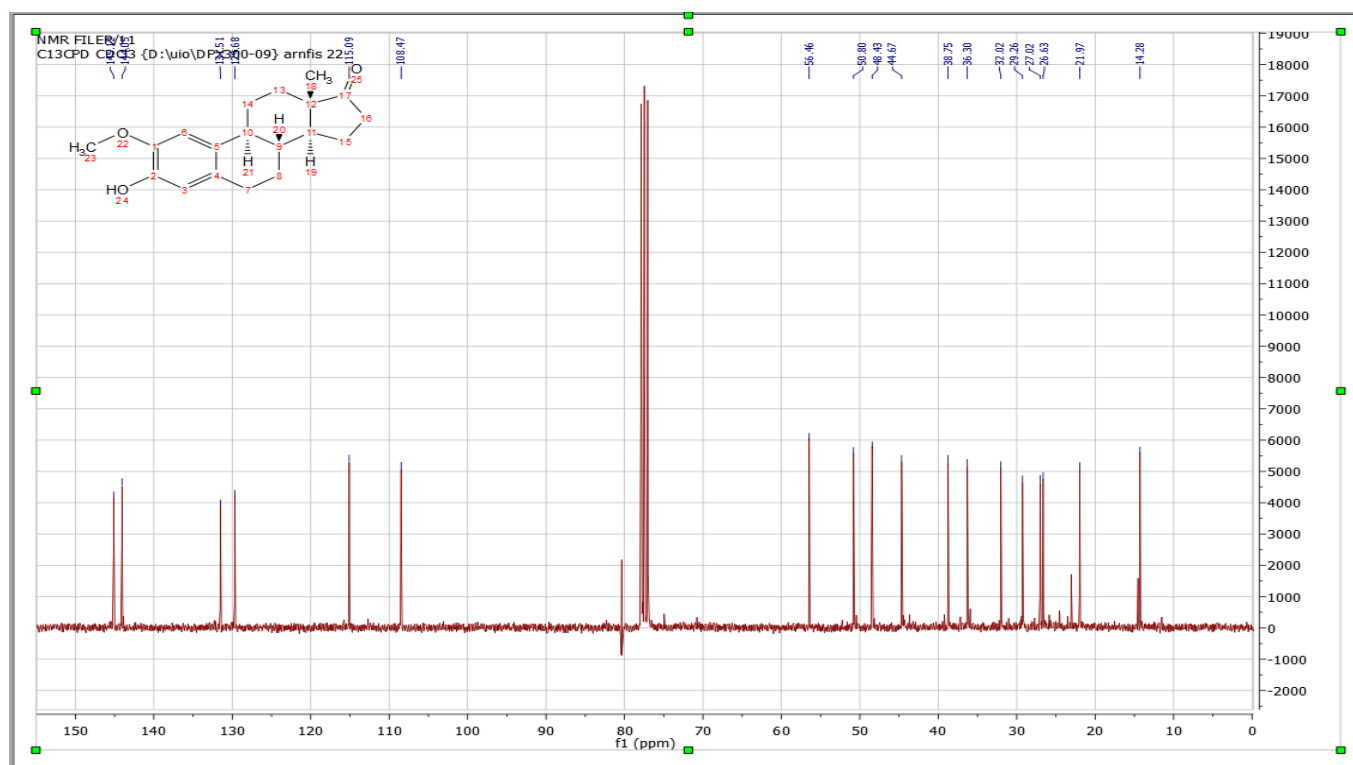
Produkt : Hvitt fast stoff

1H -NMR (300 Mhz, $CDCl_3$): δ 6.81 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.60 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.86-1.29 (m, 19H), 0.94 (s, 3H).

^{13}C -NMR (75 MHz, $CDCl_3$): δ 145.12, 144.05, 131.51, 129.68, 115.09, 108.47, 56.46, 50.80, 48.43, 44.67, 38.75, 36.30, 32.02, 29.26, 27.02, 26.63, 21.97, 14.28.



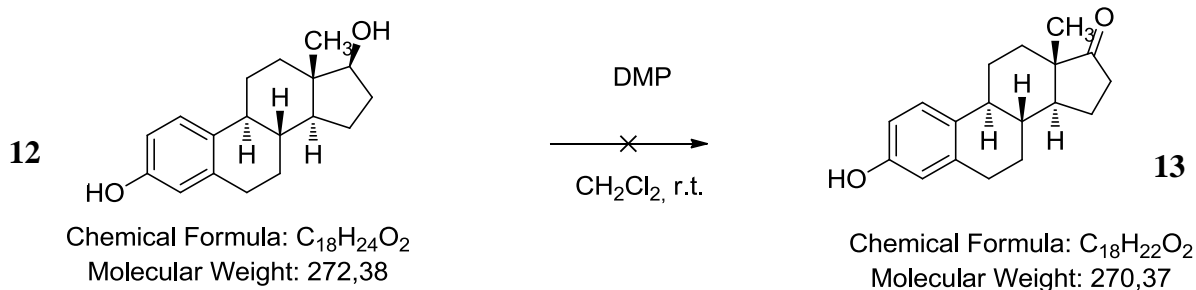
Spekter 9.1 : ^1H -NMR spekter av forbindelse 2



Spekter 9.2 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 2

9.4.Forsøk på å oksidere 17- β -østradiol til østron ved bruk av Dess-Martin metoden :

Reaksjonslikning :



Referanse ⁽⁴¹⁾

Fremgangsmåte :

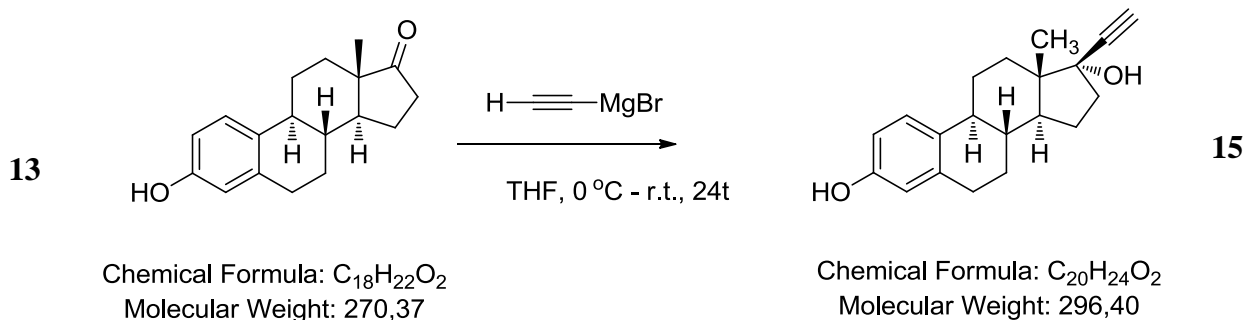
Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g)	Volum (ml)	Mw (g/mol)	tetthet	k.p (° C)
Forbindelse 12	1	1	0,272		272,38		
Des-Martin Periodiane	1,4	1,4	0,594		424,14	-	-
Diklormetan				10 ml			40

Forbindelse **12** (0,272 g, 1 mmol) ble løst i 10 ml diklormetan i en tørr 25 ml rundkolbe. Dess Martin Periodiane (0,594g, 1,4 mmol) ble tilsatt og blandingen ble rørt under nitrogen atmosfære i ca 3-4 timer. Reaksjonsblandingen ble overført til en skilletrakt og vasket med mettet vandig løsning av $Na_2S_2O_3$ (25 ml) etterfulgt av mettet $NaHCO_3$ (25 ml). Vannfasen ble så ekstrahert med CH_2Cl_2 (2 x 15 ml). De kombinerte vannfasene ble vasket med sat. aq. NaCl (2 x 15 ml) og deretter tørket over $MgSO_4$. Blandingen ble dampet inn under redusert trykk.

Inndampningsresten inneholdt ikke det ønskede produktet, så denne strategien ble forlatt.

9.5.Forsøk på å syntetisere 17- β -etynyløstradiol fra østron

Reaksjonslikning :



Referanse : ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse(g)	Volum(ml)	Mw(g/mol)	tetthet(g/cm3)	k.p ° C
Forbindelse 13	1	1	0,270		270,37		
0,5M etynylMgBr i							
THF	5	5		10	129,24	0,94	66
THF				10	72	0,89	66

En tørr 50 ml rundkolbe ble satt under nitrogenatmosfære og deretter avkjølt på isbad.

Etynylmagnesiumbromid (10 ml, 5 mmol) ble tilsatt. Deretter ble en ny 100 ml rundkolbe satt under N_2 -gass. Forbindelse **13** (0,270 g, 1 mmol) ble tilsatt denne rundkolben og kolben ble spylt med N_2 -gass i 10 minutter. Deretter ble tørr THF (10 ml) tilsatt og stoffet løst opp. THF-løsningen ble tilsatt dråpevis til 0,5M etynylmagnesiumbromid-løsningen ved 0°C .

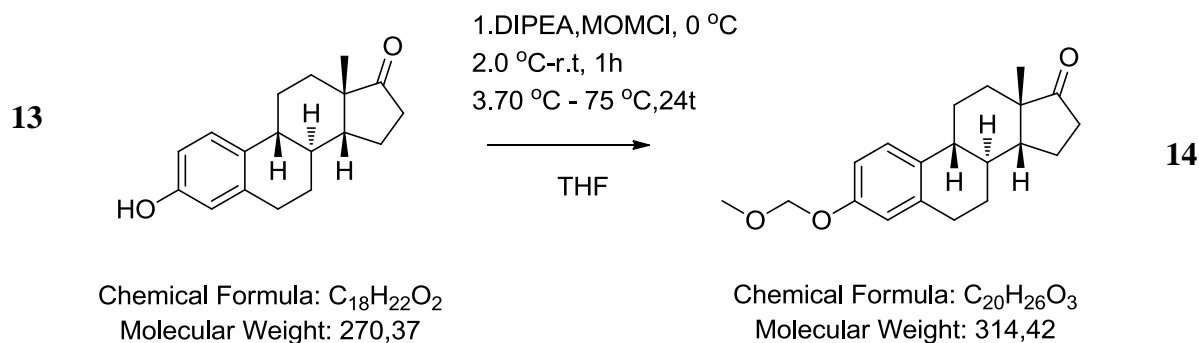
Blandingen ble rørt ved romtemperatur i ca 24 timer inntil TLC viste at det meste av utgangsstoffet var omsatt. Reaksjonsblandingen ble avkjølt på isbad og ble tilsatt 2M NH_4Cl langsomt, etterfulgt av ionebyttet H_2O (20 ml). Deretter ble blandingen ekstrahert med EtOAc (3 x 30 ml). Til slutt ble den organiske fasen vasket med ionebyttet H_2O (20 ml). Den organiske fasen ble dampet inn på rotavapor under redusert trykk. Inndampingsresten ble rensset ved flashkromatografi på silkagel med (heksan : EtOAc 9:2). Justerte eluenten til (heksan : EtOAc 9:4) siden det tok lang tid for å få stoffet helt ut. (heksan : EtOAc 9:4, $R_f=0.56$) CAM DIP

Produkt : Hvitt fast stoff

NMR-analyse viste at vi hadde en blanding av utgangsstoff og produkt. Reaksjonen ble avsluttet uten videre opprensning og sluttproduktet ble ikke renisolert.

9.6.Forsøk på å Syntetisere 3-O-metoksimetyl-østron

Reaksjonslikning :



Referanse : ⁽²⁷⁾

reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse(g)	Volum(ml)	Mw(g)	tetthet	kokepunkt
Forbindelse							
13	1,7	1	0,461		270,37		
DIPEA	4,2	2,5	0,542	0,73	129	0,74	127
MOMCl	4,2	2,5	0,339	0,34	81	1,06	57
THF				20	72	0,89	66

Forbindelse **13** (0,461g, 1,7 mmol) ble tilsatt en 50 ml rundkolbe som ble spylt med N_2 -gass i 5 minutter. Tørr THF (20 ml) ble tilsatt og blandingen ble rørt på isbad. DIPEA (0,73 ml, 4,2 mmol) ble tilsatt og omrørt i 5 minutter. Så ble MOMCl (0,34 ml, 4,2 mmol) tilsatt dråpevis til reaksjonsblanding og blandingen stod til omrøring 1 time i romtemperatur.

Så ble rundkolben satt til oppvarming til (70-75 °C) i ca 24 timer under N_2 -gass inntil TLC viste at mesteparten av startmaterialet var omsatt. Reaksjonsblanding ble så opparbeidet. Kolben ble avkjølt til romtemperatur og tilsatt H_2O (15 ml) og EtOAc (15 ml) til rundkolben og fasene ble ekstrahert. Vannfasen ble deretter ekstrahert med EtOAc (2 x 10 ml). De samlede organiske fasene ble så vasket med 10 % Eddiksyre (aq) (2 x 10 ml) og deretter med 10 ml mettet $NaHCO_3$. Blanding ble satt til omrøring inntil ingen tegn til gassutvikling ble observert. De organiske fasene ble vasket med sat. aq. NaCl, tørket over $MgSO_4$ og dampet inn under redusert trykk. Sluttproduktet ble omkrystallisert med EtOAc og heksan og deretter

renset ytterligere med flashkromatografi på silikagel med (heksan:EtOAc 7:3, R_f = 0,50)
CAM DIP og riktig produkt ble isolert.

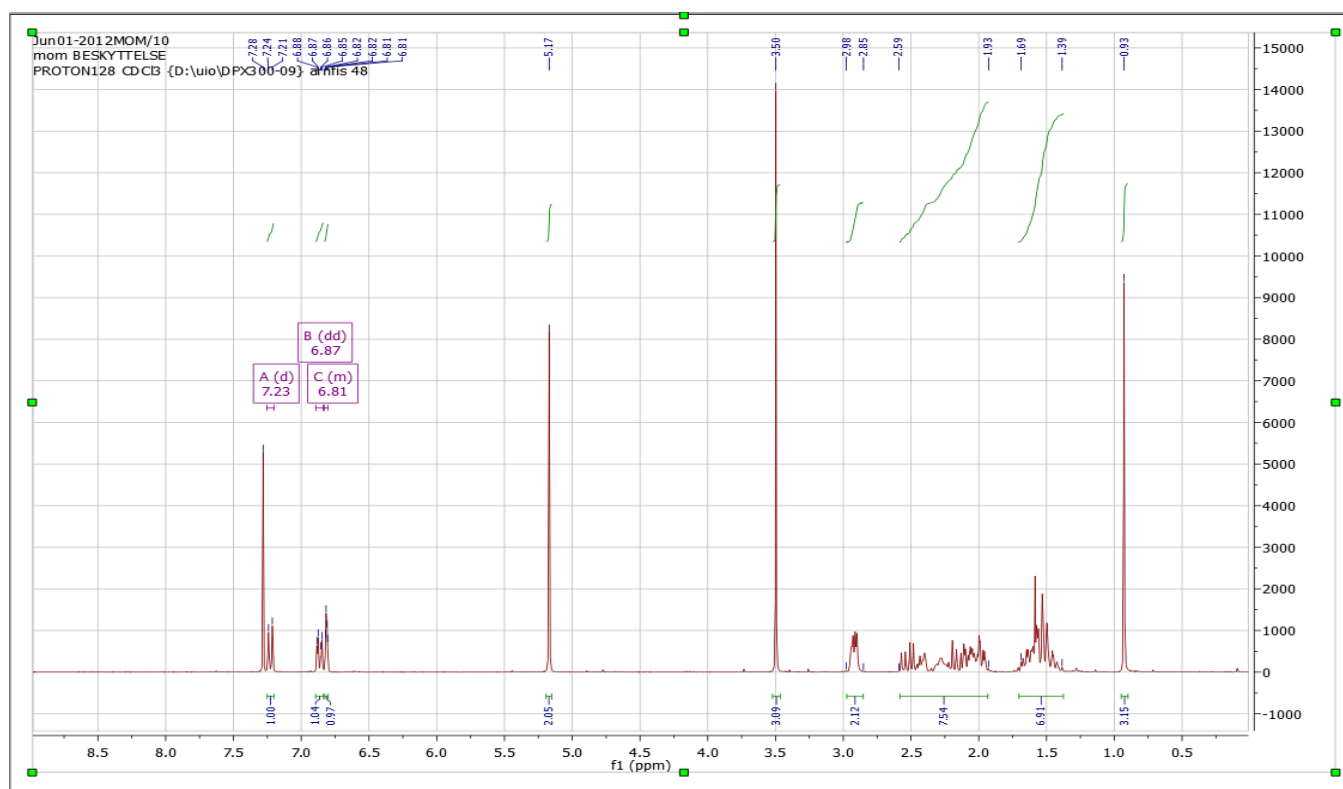
Data :

Utbytte : 33%

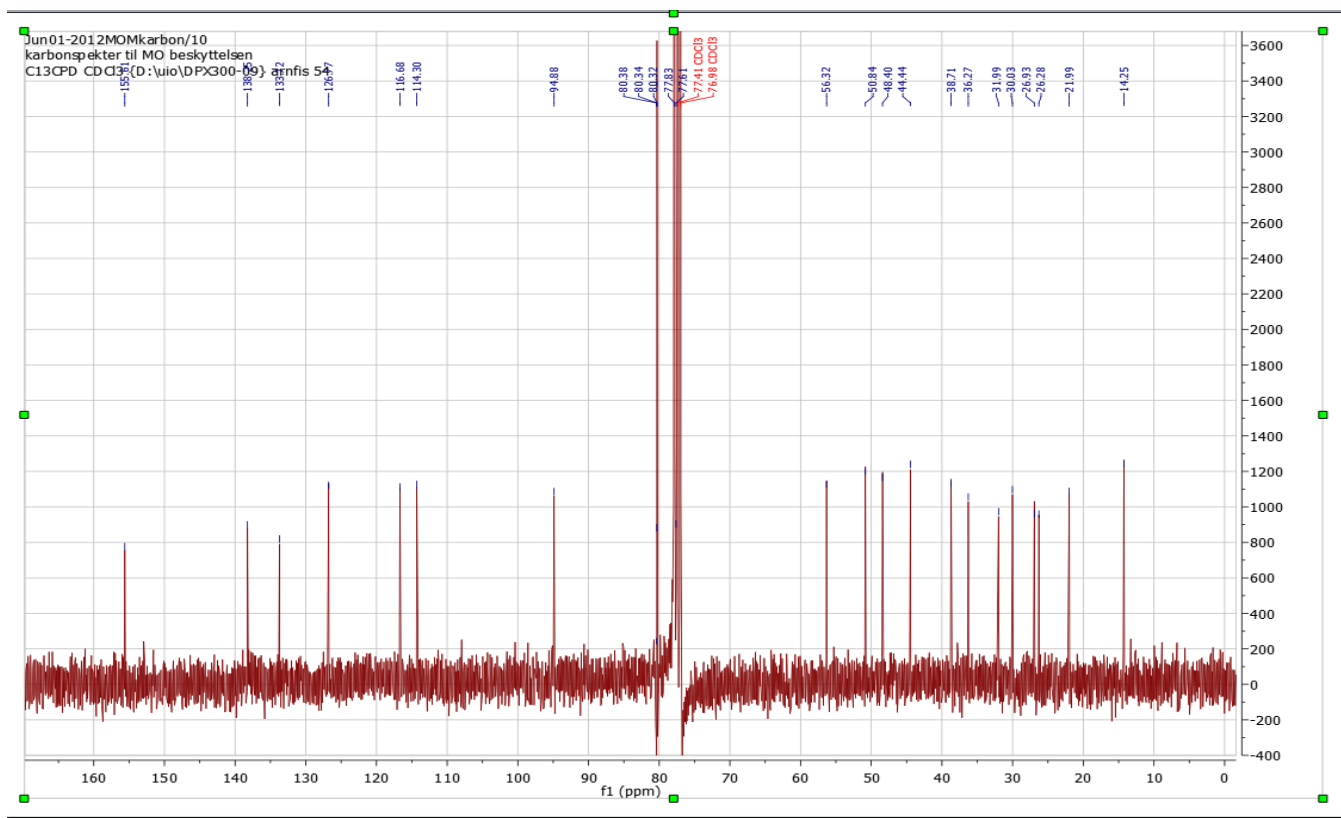
Produkt : Hvitt fast stoff

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.23 (d, 1H, *J*=8.51 Hz), 6.87 (dd, 1H, *J*₁=2.61 Hz, *J*₂=8.6 Hz), 6.83-6.80 (m, 1H), 5.17 (s, 2H), 3.50 (s, 3H), 2.98-2.85 (m, 2H), 2.59-1.92 (m, 8H), 1.70-1.38 (m, 7H), 0.93 (s, 3H)

¹³C-NMR (75 Mhz, CDCl₃) : δ 155.61, 138.25, 133.72, 126.77, 116.68, 114.30, 94.88, 56.32, 50.84, 48.40, 44.44, 38.71, 36.27, 31.99, 30.03, 26.93, 26.28, 21.99, 14.25.



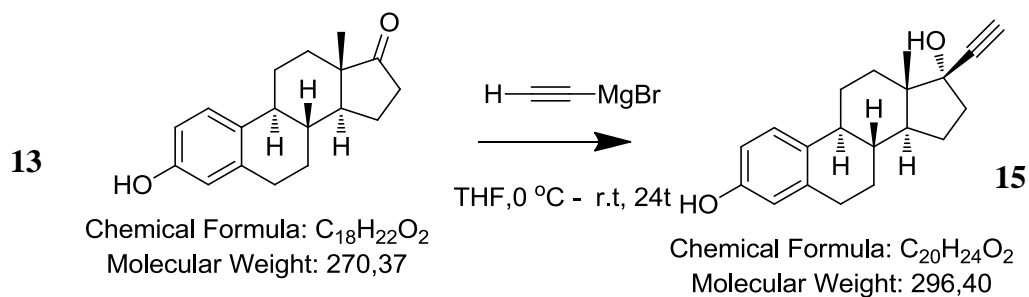
Spekter 9.3 : ¹H-NMR spekter av forbindelse 14



Spekter 9.4 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 14

9.7.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på østron :

Reaksjonslikning :



Referanse : ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Volum(ml)	Mw(g/mol)	Masse(g)	tetthet	K.p
Forbindelse 13	1	1		270,37	0,275		
0,5M etynylMgBr i THF	10	10	20,1	129,24		0,94	66
THF			10	72		0,89	66

Fremgangsmåte :

En 50 ml rundkolbe ble spylt gjennom med N₂-gass i 5 minutter. etynylmagnesiumbromid (20,1 ml, 10 mmol) ble tilsatt rundkolben. Kolben ble deretter satt på isbad under omrøring. Deretter ble forbindelse **13** (0,275g, 1 mmol) tilsatt en ny 50 ml rundkolbe, og tilsatt N₂- gass i 5 minutter og løst opp i tørr THF (10 ml). Når alt av forbindelse **13** var oppløst ble den overført dråpevis til reaksjonsblandingen under omrøring på isbad. Reaksjonen stod over natt inntil alt utgangsmateriale var blitt omsatt og reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette 2M NH₄Cl (20 ml) til rundkolben.

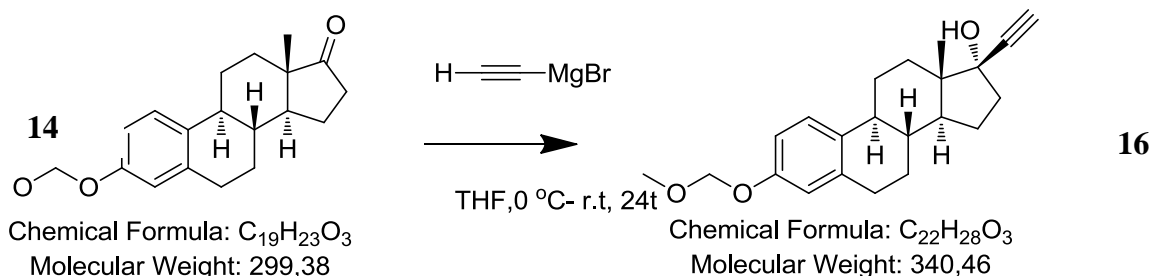
Den ble så ekstrahert med EtOAc (3 x 30 ml) og vasket med ionebyttet H₂O (20 ml) og deretter tørket over MgSO₄. Sluttproduktet ble dampet inn under redusert trykk og renset med flashkromatografi på silikagel med (EtOAc : Heksan 8:2; R_f= 0,21). CAM DIP og deretter omkrystallisert med heksan.

Kommentar til forsøket :

¹H-NMR viste et veldig forurenset sluttprodukt. Dette ble derfor ikke renisolert.

9.8.Forsøk på å syntetisere 3-O metoksimetyl-17-β-etynyløstradiol fra 3-O-metoksimetyløstron

Reaksjonslikning :



Referanser : ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Volum(ml)	Mw(g/mol)	Masse (g)	tetthet	K.p
Forbindelse 14	0,28	1		314,42	0,087		
0,5M etynylMgBr i THF	3,68	13,31	7,35	129,24		0,94	66
THF			5	72		0,89	66

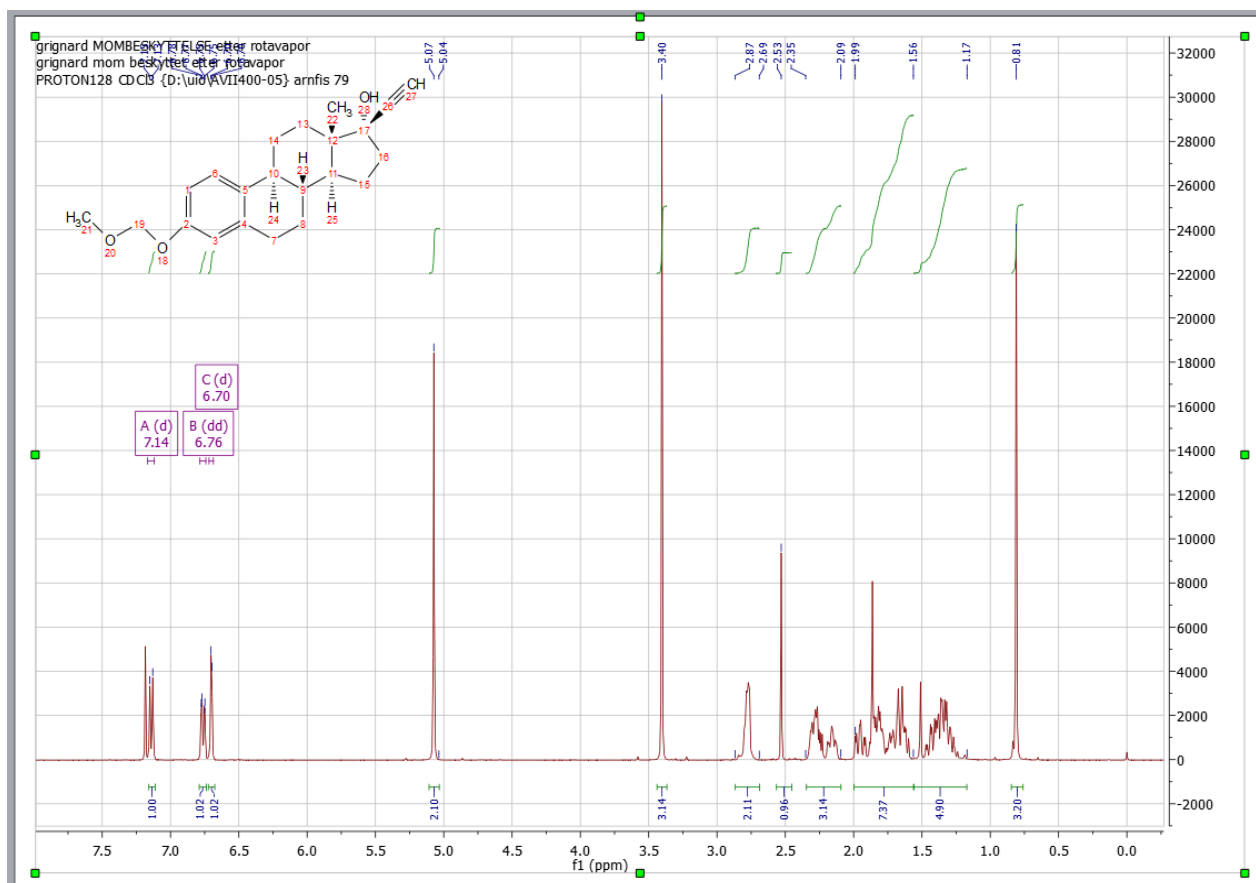
Forbindelse **14** (0,087g, 0,28 mmol) ble tilsatt en tørr 50 ml rundkolbe og kolben ble spylt med N₂-gass i 5 minutter. Deretter ble tørr THF (5 ml) tilsatt for å få stoffet løst. En ny tørr 50 ml rundkolbe satt under N₂-gass i 5 minutter og tilsatt etynylmagnesiumbromid (7,35 ml, 3,675 mmol). Til denne kolben ble forbindelse **14** tilsatt dråpevis mens kolben stod under omrøring på isbad. Den ble videre satt under omrøring i ca 24 timer inntil TLC viste at mesteparten av utgangsmaterialet var omsatt. Deretter ble reaksjonsblandingen opparbeidet. Reaksjonen ble slukket ved å tilsette 2M NH₄Cl (20 ml). Den ble videre ekstrahert med (3 x 30 ml) EtOAc og vasket med ionebyttet H₂O (20 ml). De samlede organiske fasene ble tørket med MgSO₄ og renset med flashkromatografi med (heksan : EtOAc 8:2, R_f= 0,18) CAM DIP

Data :

Utbytte : 88%

Produkt : Orange olje

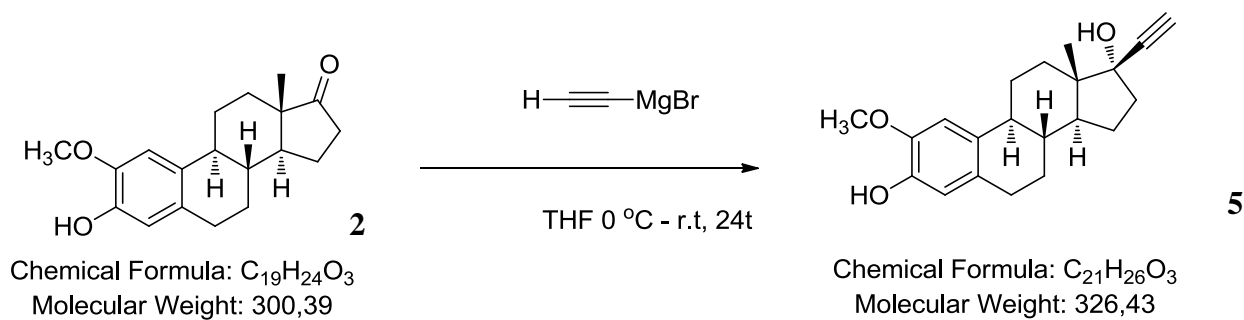
¹H-NMR (400 Mhz, CDCl₃): δ 7.14 (d, 1H, *J*=8.6 Hz), 6.76 (dd, 1H, *J*₁=8.6 Hz, *J*₂=2.58 Hz), 6.70 (d, 1H, *J*=2.55 Hz), 5.07 (s, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.87-2.69 (m, 2H), 2.53 (s, 1H), 2.35-2.09 (m, 3H), 1.99-1.56 (m, 7H), 1.52-1.17 (m, 5H), 0.81 (s, 3H).



Spekter 9.5 : ^1H -NMR spekter av forbindelse **16**

9.9.Forsøk på å utføre Grignardreaksjon på 2-metoksiøstron

Reaksjonslikning



Referanse : ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum(ml)	Mw(g/mol)	tetthet	k.p. °C
Forbindelse 2	0,77	1	0,23		300,39		
0,5M EtynylMgBr i THF	11,55	15		23,11		0,94	66
THF				10		0,89	66

En tørr 100 ml rundkolbe ble spylt med N₂-gass i ca 5 minutter og tilsatt etynylmagnesiumbromid (23,11 ml, 11,55 mmol). Deretter ble kolben satt til omrøring på isbad. Forbindelse **2** (0,231g, 0,77 mmol) ble tilsatt en ny 100 ml kolbe og denne ble spylt med N₂-gass. Tørr THF (10 ml) ble tilsatt for å få stoffet løst. Forbindelse **2** ble tilsatt dråpevis til reaksjonsblandingen og ble deretter satt til omrøring ved romtemperatur i ca 24 timer inntil TLC viste at mesteparten av utgangsstoffet var omsatt. Reaksjonsblandingen ble så opparbeidet.

Reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette 2M NH₄Cl (20ml). Den ble ekstrahert med (3 x 30 ml) EtOAc. Organisk fase ble vasket med ionebyttet H₂O (20 ml). De samlede organiske fasene ble tørket med MgSO₄ og dampet inn under redusert trykk. Sluttproduktet ble rensset med ARMEN automatisert kromatografisystem med gradienteluering med EVFD24 30g silika Götec Carbotechnite GmbH kolonne med Heksan:EtOAc og flowhastighet 36ml/min. R_f=0,2 CAM DIP

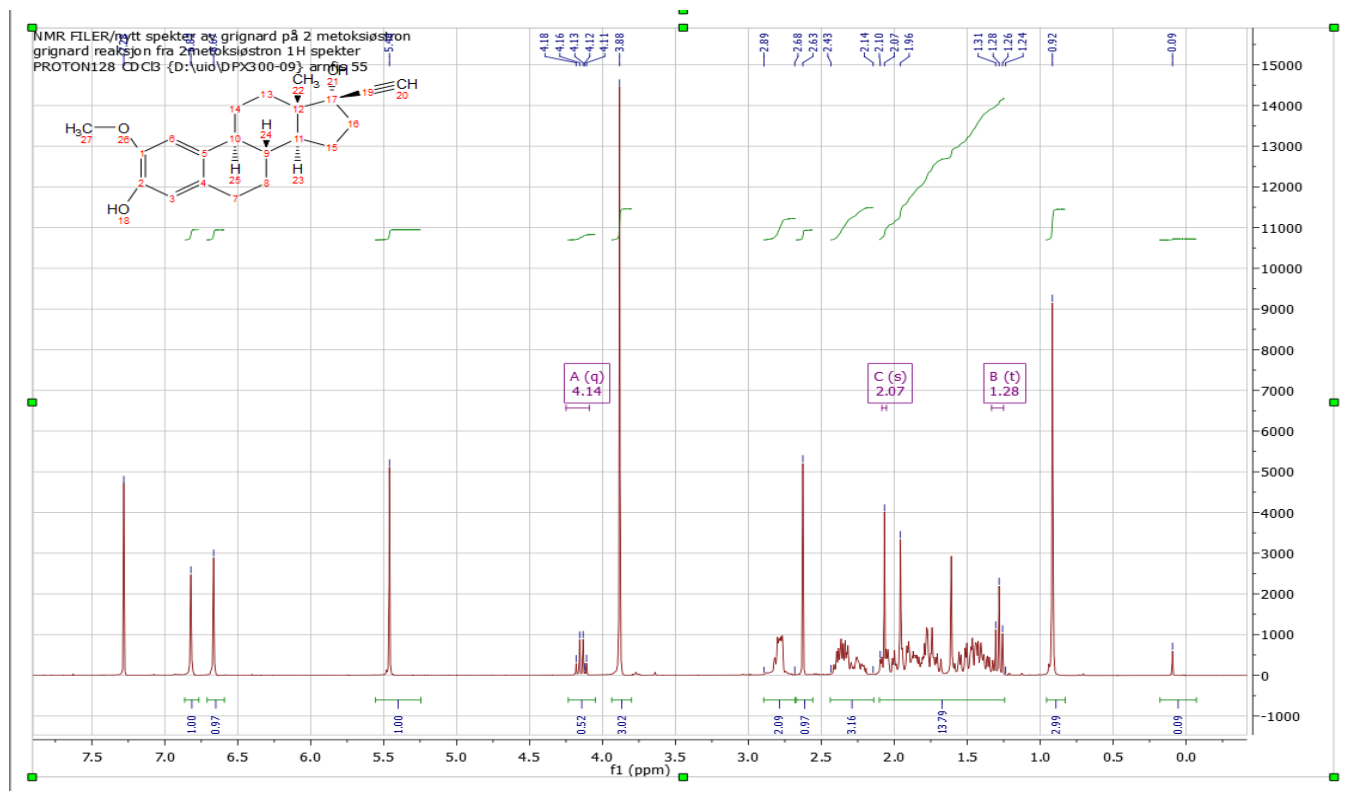
Data :

Produkt : Gul Olje

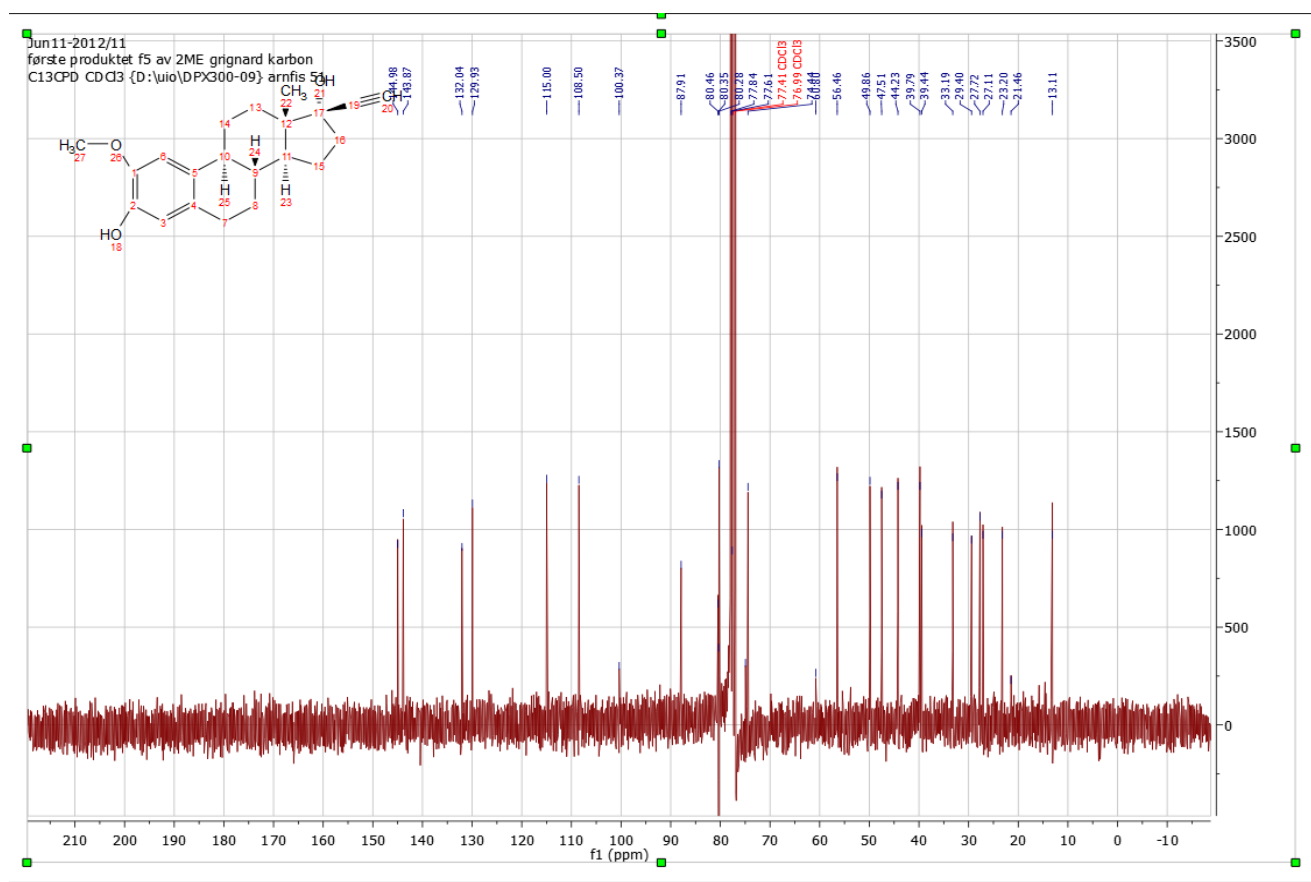
Utbytte : 67 %

¹H-NMR (300 Mhz, CDCl₃): δ 6.82 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.46 (s, 1H), 3.88 (s, 3H), 2.89-2.68 (m, 2H), 2.63 (s, 1H), 2.43-2.14 (m, 3H), 2.10-1.24 (m, 14H), 0.92 (s, 3H)

¹³C-NMR (75 Mhz, CDCl₃): δ 144.98, 143.87, 132.04, 129.93, 115, 108.50, 87.91, 74.44, 56.46, 49.86, 47.51, 44.23, 39.79, 39.44, 33.19, 29.40, 27.72, 27.11, 23.20, 13.11



Spekter 9.6 : ^1H -NMR spekter av forbindelse 5

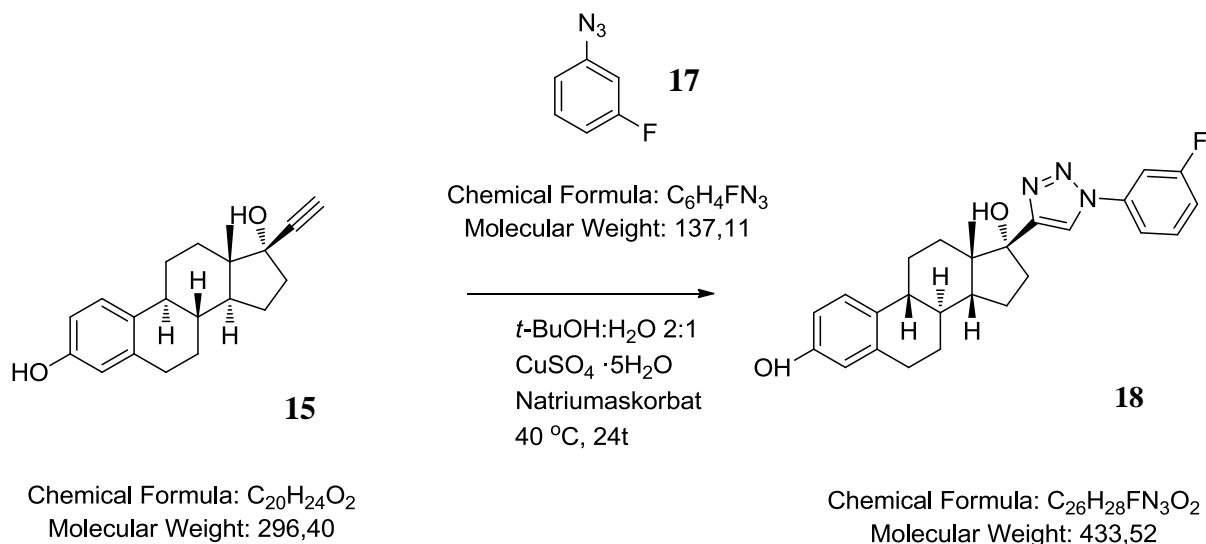


Spekter 9.7: ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 5

:

9.10Forsøk 1 På å utføre klikk kjemi på 17- β -etynyløstradiol

Reaksjonslikning :



Referanse⁽³¹⁾

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 15	0,24	1,00	0,070		296,40		
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,05	0,21	0,012		250		
Natriumaskorbat	0,11	0,46	0,022		198		
<i>Tert</i> - butanol				2	74	0,74	82
H ₂ O				1	18	1	100
0,5M 1-Azido-3-fluorobenzene i <i>Tert</i> -butylmetyleter	0,28	1,15		0,55	149,15		55,2

Forbindelse **15** (0,070 g, 0,24 mmol) ble tilsatt en 10 ml rundkolbe og tilsatt *tert*-butanol (2 ml) til rundkolben og satt under omrøring på rørementel. CuSO₄·5H₂O (0,012g, 0,05 mmol) ble løst i ionebyttet H₂O (1 ml) og tilsatt reaksjonsblandingen. 1-Azido-3-fluorobenzene (0,55 ml, 0,28 mmol) ble deretter tilsatt reaksjonsblandingen.

Til slutt ble natriumaskorbat (0,022g, 0,11 mmol) tilsatt. Deretter ble reaksjonsblandingen rørt ved 40 °C under N₂-atmosfære over natt. TLC viste dessverre at ikke alt startmaterialet hadde blitt omsatt. Valgte likevel å starte opparbeidelsen.

1 ml mettet NH_4Cl løst i ionebyttet H_2O (9 ml) ble tilsatt reaksjonsblandingen. Deretter ble det tilsatt litt is for å prøve å få utfelling. Etter påsettelse av kork eksploderte kolben.

Produktet ble derfor ikke isolert.

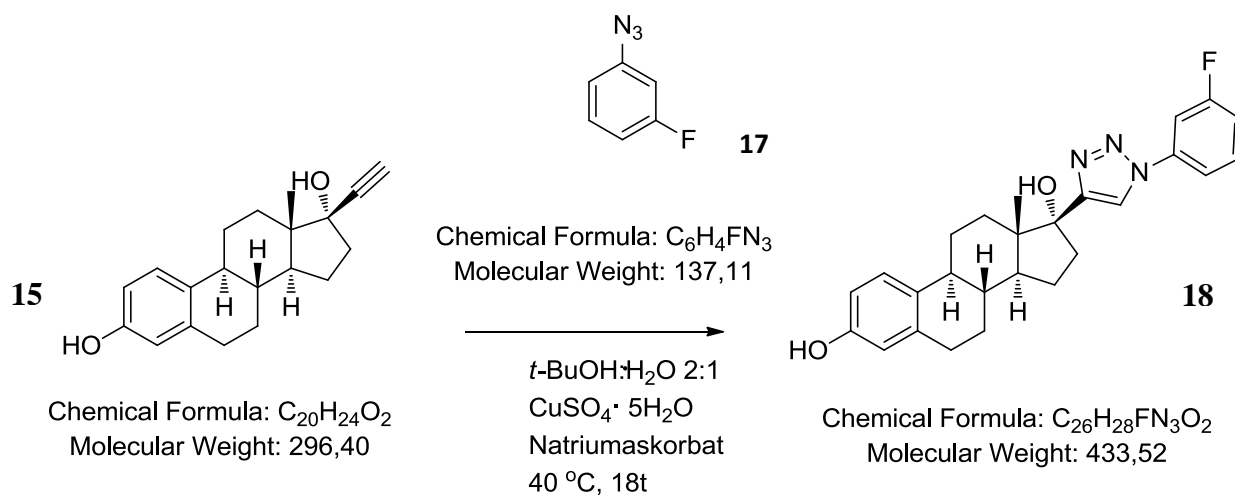
Kommentarer til forsøket :

Veldig lite av startmaterialet hadde blitt omsatt i denne reaksjonen etter omrøring over natt.

Siden metoden med utfelling var vanskelig å få til ble denne strategien forlatt.

9.11.Forsøk nr 2 På å utføre klikk kjemi på 17- β -etynyløstradiol

Reaksjonslikning :



Referanse⁽³¹⁾

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 15	0,23	1,00	0,067		296,40		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,05	0,22	0,013		250		
Natriumaskorbat	0,13	0,57	0,026		198		
<i>Tert</i> -butanol				2	74	0,74	82
H_2O				1	18	1	100
0,5M 1-Azido-3-fluorobenzene i <i>Tert</i> -butylmetyleter	0,28	1,21		0,55	149,15		55,2

Forbindelse **15** (0,067g, 0,23 mmol) ble tilsatt en 5 ml rundkolbe. *Tert*-Butanol (2 ml) ble tilsatt. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,013g, 0,05 mmol) ble veid på veieskip. Deretter ble 1-Azido-3-fluorobenzene (0,55 ml, 0,28 mmol) tilsatt reaksjonsblandingen. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,013g, 0,05 mmol) ble løst på veieskipet i ionebyttet H_2O (1 ml) og tilsatt til reaksjonsblandingen. Til slutt ble natriumaskorbat (0,026 g, 0,13 mmol) tilsatt og reaksjonsblandingen rørt ved 40 °C og N_2 -gass i ca 18 timer inntil TLC viste at mesteparten av utgangsstoffet var omsatt.

Så ble reaksjonsblandingen opparbeidet. Først ble det tilsatt mettet NH_4Cl (10 ml) og ionebyttet H_2O (10 ml) og deretter ble blandingen ekstrahert med EtOAc (3 x 20 ml). Til slutt vasket med sat. aq. NaCl (10 ml) og tørket med MgSO_4 . Sluttproduktet ble dampet inn under redusert trykk og ble rensset med flashkromatografi (CH_2Cl_2 :EtOAc 9:1, $R_f=0.28$) CAM DIP.

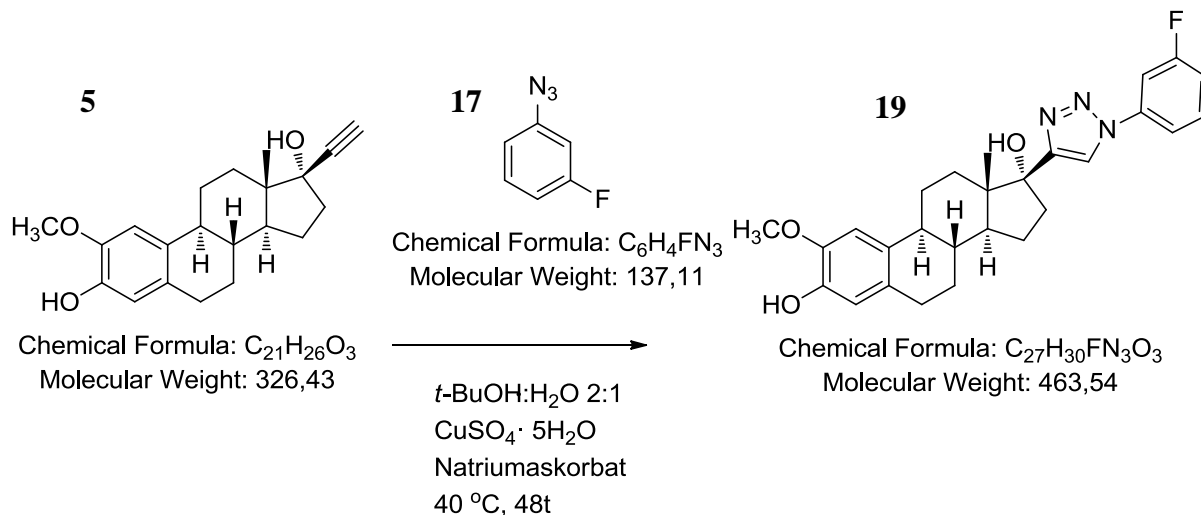
Kommentar til forsøket :

Var veldig uheldig i dette tilfellet og fikk tilsatt mettet NaHCO_3 mens blandingen stod under omrøring. Den ble derfor ekstrahert på nytt med EtOAc (3 x 20 ml) og kontrollert med TLC at stoffet var kommet over i organisk fase. Det er mulig at noe stoff har gått tapt i dette trinnet. Det ble forsøkt å ta opp ^1H -NMR spekter men det var for lite stoff for identifikasjon.

9.12.Forsøk på utføre klikk kjemi på 2-metoksi-17- β -etynyløstradiol

Referanse : ⁽³¹⁾

Reaksjonslikning :



Fremgangsmåte

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 5	0,47	1,00	0,152		326,43		
CuSO ₄ ·H ₂ O	0,06	0,13	0,015		250		
Natriumaskorbat	0,29	0,62	0,057		198		
<i>Tert</i> - butanol				6	74	0,74	82
H ₂ O				3	18	1	100
0,5M 1-Azido-3-fluorobenzene i <i>Tert</i> -butylmetyleter	1,80	3,82		3,60	137,11		55,2

Forbindelse **5** (0,152g, 0,47 mmol) ble tilsatt en 25 ml rundkolbe og tilsatt *tert*-butanol (6 ml). Deretter ble 1-Azido-3-fluorobenzene (3,60 ml, 1,80 mmol) tilsatt til reaksjonsblandingen. CuSO₄·5H₂O (0,015g, 0,06 mmol) ble veid ut på veieskip og løst i ionebyttet H₂O (3 ml) og tilsatt reaksjonsblandingen. Til slutt ble Natriumaskorbat (0,057g, 0,29 mmol) tilsatt. Deretter ble kolben satt under oppvarming ved 40 °C under N₂-gass i ca 2 døgn inntil TLC viste at mesteparten av startmaterialet var omsatt.

Så ble blandingen opparbeidet. En løsning av mettet NH_4Cl (1 ml) løst i ionebyttet H_2O (9 ml) ble tilsatt reaksjonsblandingen og ekstrahert med CH_2Cl_2 (2 x 25 ml). Til slutt ble det vasket med sat. aq. NaCl (20 ml) og tørket med MgSO_4 . Sluttproduktet ble dampet inn under redusert trykk og renset med flashkromatografi (heksan:EtOAc 50:50, $R_f=0,10$) CAM DIP

Kommentar til forsøket :

Utbyttet var veldig lite i denne reaksjonen som trolig skyldes et løselighetsproblem. Det viste seg at reaksjonen tok veldig lang tid siden den måtte stå over 2 døgn for å få omsatt mesteparten av utgangsstoffet.

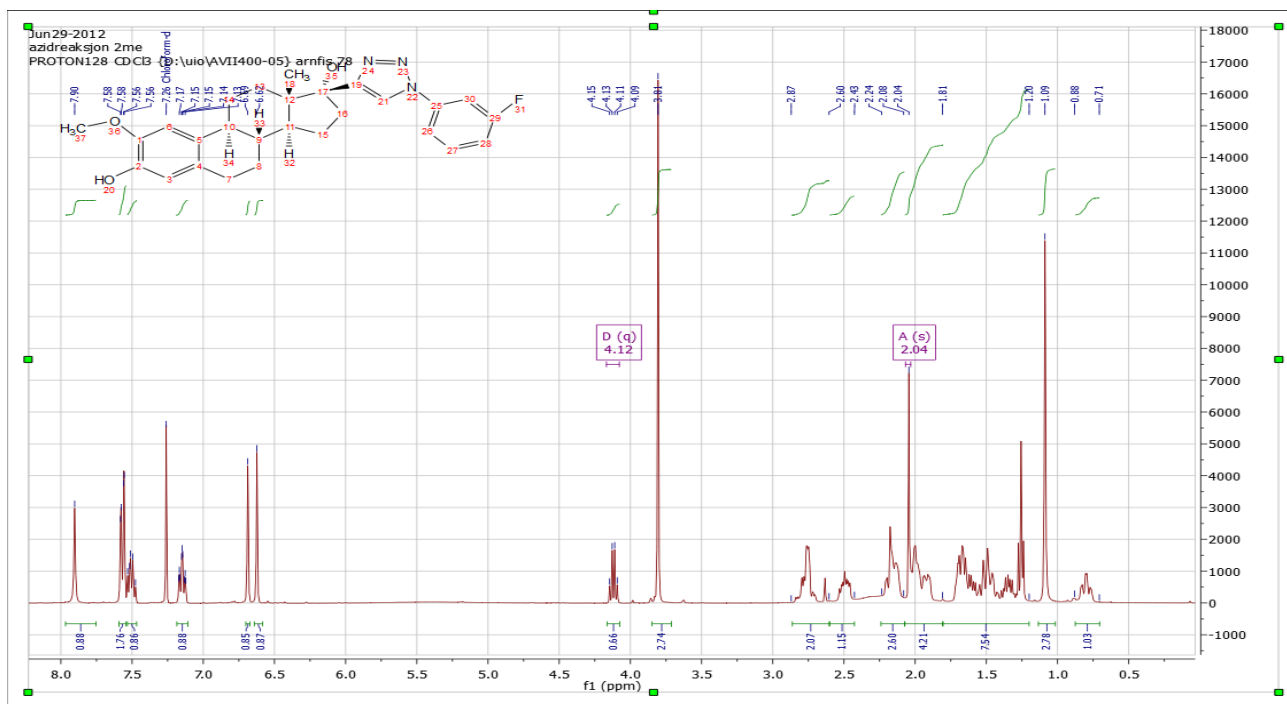
Før opparbeidelsen viste TLC på UV at mesteparten av utgangsstoffet var omsatt mens CAM dip viste at mye utgangsstoff var igjen. Med kaliumpermanganat dip var det vanskelig å konkludere. Noe av produktet kan også ha gått tapt under opparbeidelsen.

Data :

Produkt : Hvite krystaller

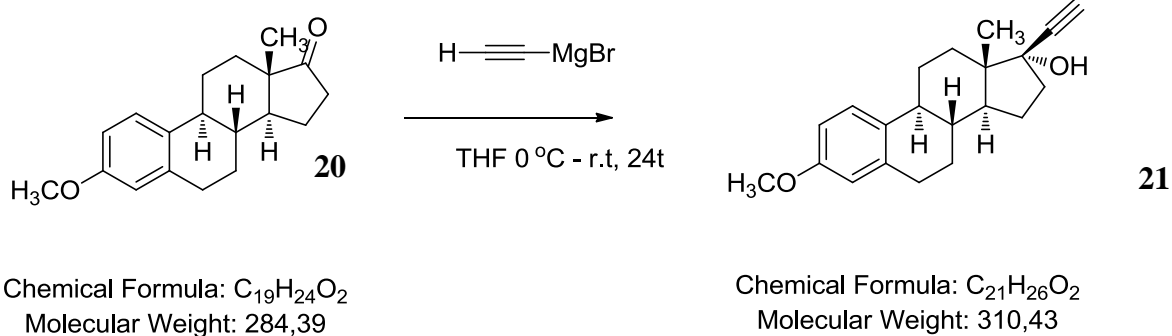
Utbytte : 3%

(400 Mhz, CDCl_3): δ 7.90 (s, 1H), 7.59-7.54 (m, 2H), 7.53-7.47 (m, 1H), 7.19-7.11 (m, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 2.86-2.42 (m, 3H), 2.23-1.80 (m, 6H), 1.80-1.19 (m, 8H), 1.09 (s, 3H), 0.87-0.60 (m, 1H).



Spekter 9.7 : ^1H -NMR spekter av forbindelse **19**

9.13. Grignard reaksjon på 3-metyeter-østron : Reaksjonslikning:



Referanse : ⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g)	Volum(ml)	Mw(g/mol)	tetthet	k.p.
Forbindelse 20	5,64	1	1,604		284,39		
0,5M EtynylMgBr i THF	28,13	5		56,26		0,94	66
THF				85		0,89	66

Fremgangsmåte :

Først ble etynylmagnesiumbromid (56,26 ml, 28,13 mmol) tilsatt en tørr 3 halset 250 ml rundkolbe under N₂-gass.

Forbindelse **20** (1,604g, 5,64 mmol) ble veid ut i en annen 250 ml rundkolbe og løst i tørr THF (85 ml)

En 25 ml dryppetrakt ble montert på den første 3-halsede 250 ml rundkolben og satt på isbad under omrøring med N₂-gass i noen minutter. Oppløst forbindelse **20** ble tilsatt til dryppetrakten og dryppet forsiktig til reaksjonsblandingen mens den stod på isbad under omrøring. Reaksjonen stod over natt i ca 24 timer inntil utgangsstoffet var omsatt.

Reaksjonsblandingen ble så opparbeidet. Kolben ble satt på et nytt isbad og reaksjonen ble avsluttet ved å tilsette 2M NH₄Cl (2 x 20 ml) forsiktig. Deretter ble reaksjonsblandingen ekstrahert med ionebyttet H₂O (30 ml) og EtOAc (2 x 50 ml). Videre med CH₂Cl₂ (25 ml). De samlede organiske fasene ble så vasket med ionebyttet H₂O (20 ml) og sat. aq. NaCl (20 ml). Sluttproduktet ble tørket med MgSO₄ og dampet inn under redusert trykk. Produktet ble rensset med flashkromatografi (CH₂Cl₂:EtOAc 18:1, R_f= 0,3).CAM dip.

Kommentar til forsøket

Noe stoff gikk tapt på grunn av gassutvikling i skilletrakten slik at proppen føk av og det bruset over fordi det ble overtrykk. Produktet ble ikke helt rent etter første rensing med flashkromatografi som gjorde at det måtte renses to ganger. Dette kan ha medført redusert utbytte for reaksjonen.

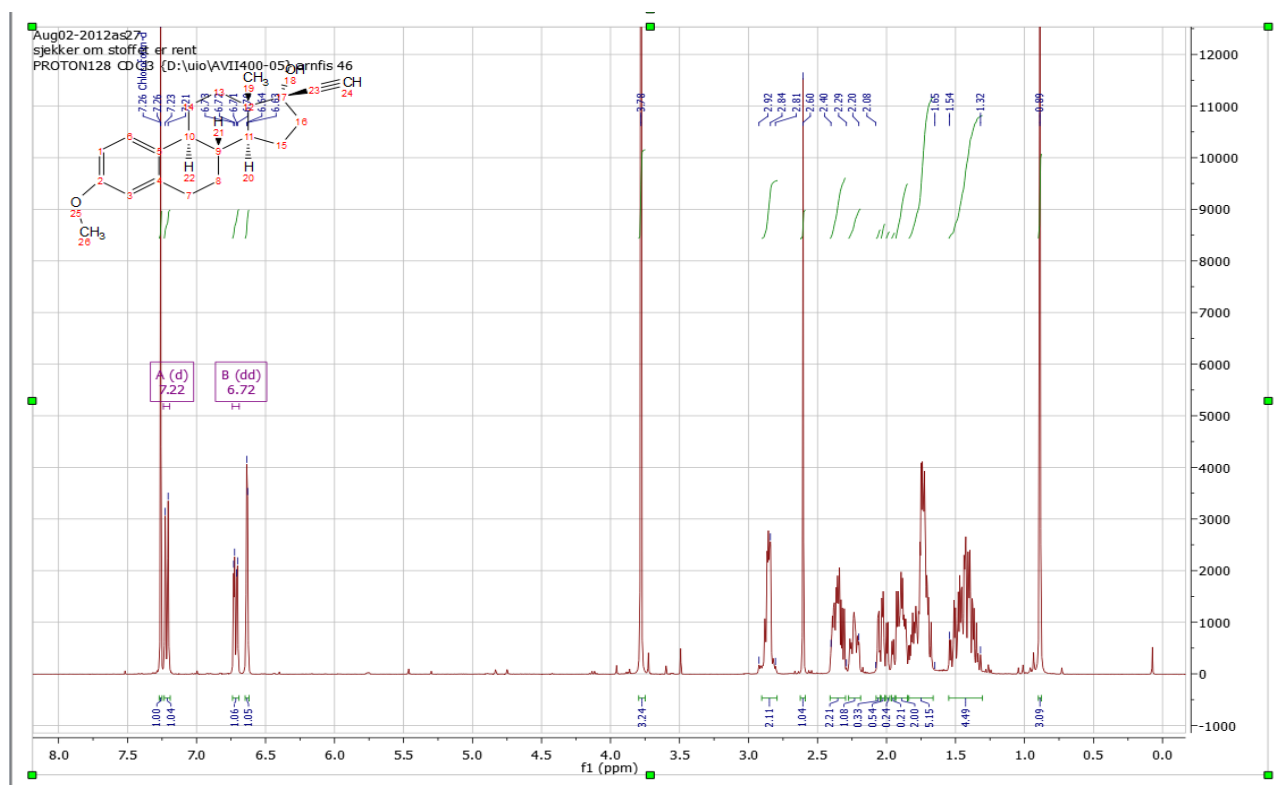
Data :

Produkt : Hvitt fast stoff

Utbytte : 53%

Smeltepunkt : 155 - 156,5 °C

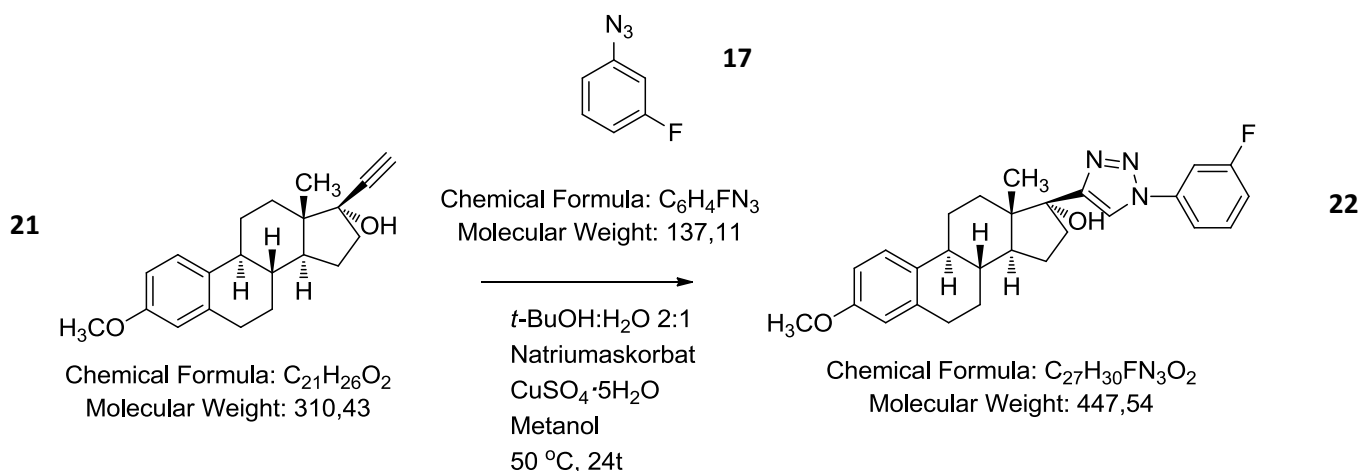
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.22 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 6.72 (dd, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.92-2.81 (m, 2H), 2.60 (s, 1H), 2.40-2.29 (m, 2H), 2.08-1.65 (m, 8H), 1.54-1.32 (m, 5H), 0.89 (s, 3H).



Spekter 9.8 : ¹H-NMR spekter av forbindelse **21**

9.14.Klikk kjemi på 3-metyleter-17-β-etynyløstradiol

Reaksjonslikning :



Referanse :⁽³¹⁾

Fremgangsmåte :

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 21	0,50	1,00	0,154		310,43		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,58	1.16	0,146		250		
Natriumaskorbat	0,63	1,26	0,126		198		
<i>Tert</i> -butanol				4	74	0,74	82
H_2O				2	18	1	100
Metanol				3	32	0,79	65
0,5M 1-Azido-3-fluorobenzene i <i>Tert</i> -butylmetyleter	3,00	6,00		6	137,11		55,2

Forbindelse **21** (0,154g, 0,50 mmol) ble tilsatt en 25 ml rundkolbe sammen med magnetrører. Deretter ble ionebyttet H_2O (2 ml) og *tert*-butanol (4ml) tilsatt. 1-Azido-3-fluorobenzene (6 ml, 3 mmol) ble tilsatt til en annen 25 ml rundkolbe og dampet forsiktig inn på rotavapor under redusert trykk ved romtemperatur. Dette ble løst i metanol (1 ml) og tilsatt reaksjonsblandingen.

Videre ble natriumaskorbat (0,126g, 0,63 mmol) og $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,146g, 0,584 mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen ble satt under oppvarming ved 50 °C. Det ble tilsatt metanol (2ml) ekstra til blandingen

Kolben ble satt til omrøring over natt inntil TLC viste at mesteparten av utgangsmaterialet var omsatt. Deretter ble produktet opparbeidet. Først ble det tilsatt ionebyttet H_2O (20 ml) og litt NaCl sat.aq som ble ekstrahert med CH_2Cl_2 (100 ml) og deretter med CH_2Cl_2 (20 x 2 ml). De samlede organiske fasene ble vasket med mettet NaHCO_3 (20 x 2 ml) og deretter med mettet NH_4Cl (20 x 2 ml). Blandingen ble vasket med ionebyttet H_2O (20 ml). De samlede vann fasene ble ekstrahert på nytt med EtOAc (50 ml) og CH_2Cl_2 (50 ml) før sluttproduktet ble tørket med MgSO_4 og dampet inn under redusert trykk.

Produktet ble renset med flashkromatografi (CH_2Cl_2 , $R_f = 0,2$). CAM dip.

Data :

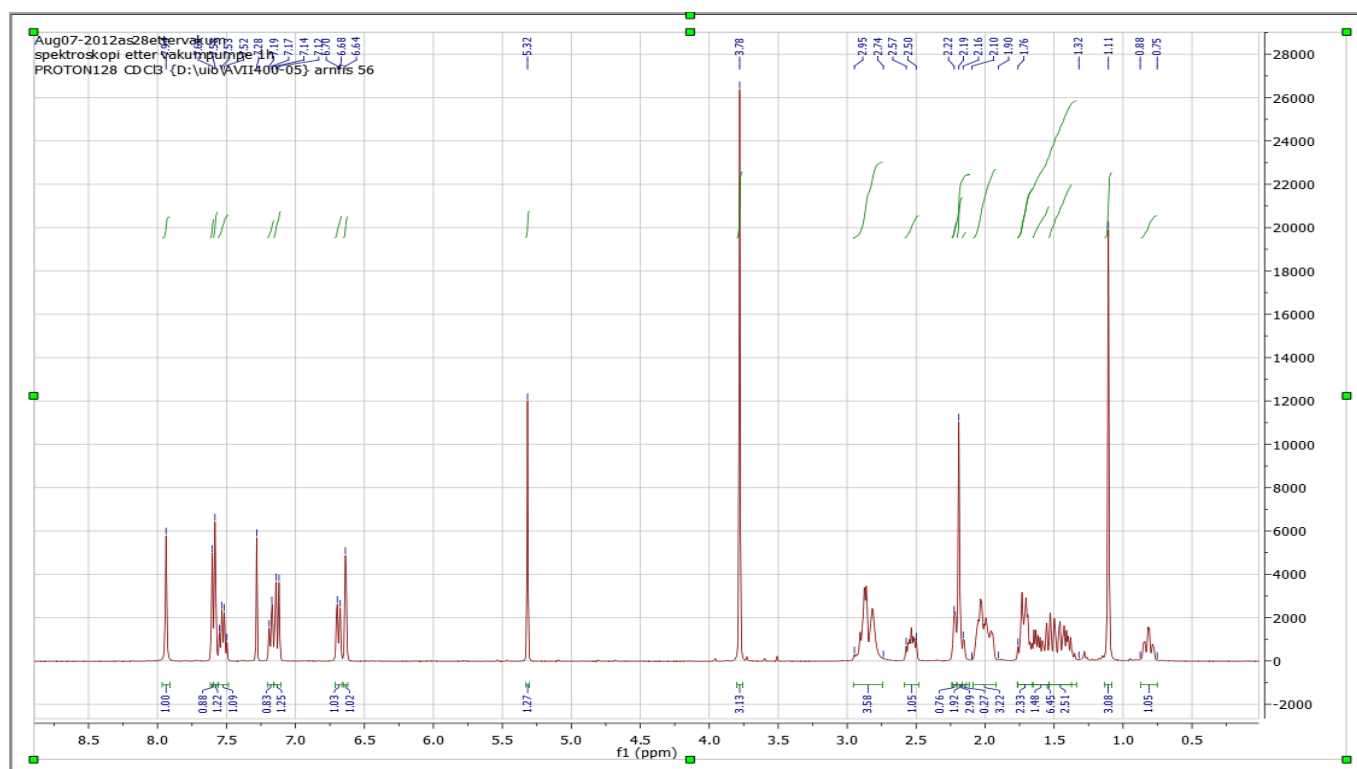
Produkt : Hvitt fast stoff

Smeltepunkt : 149,8-153,9 °C

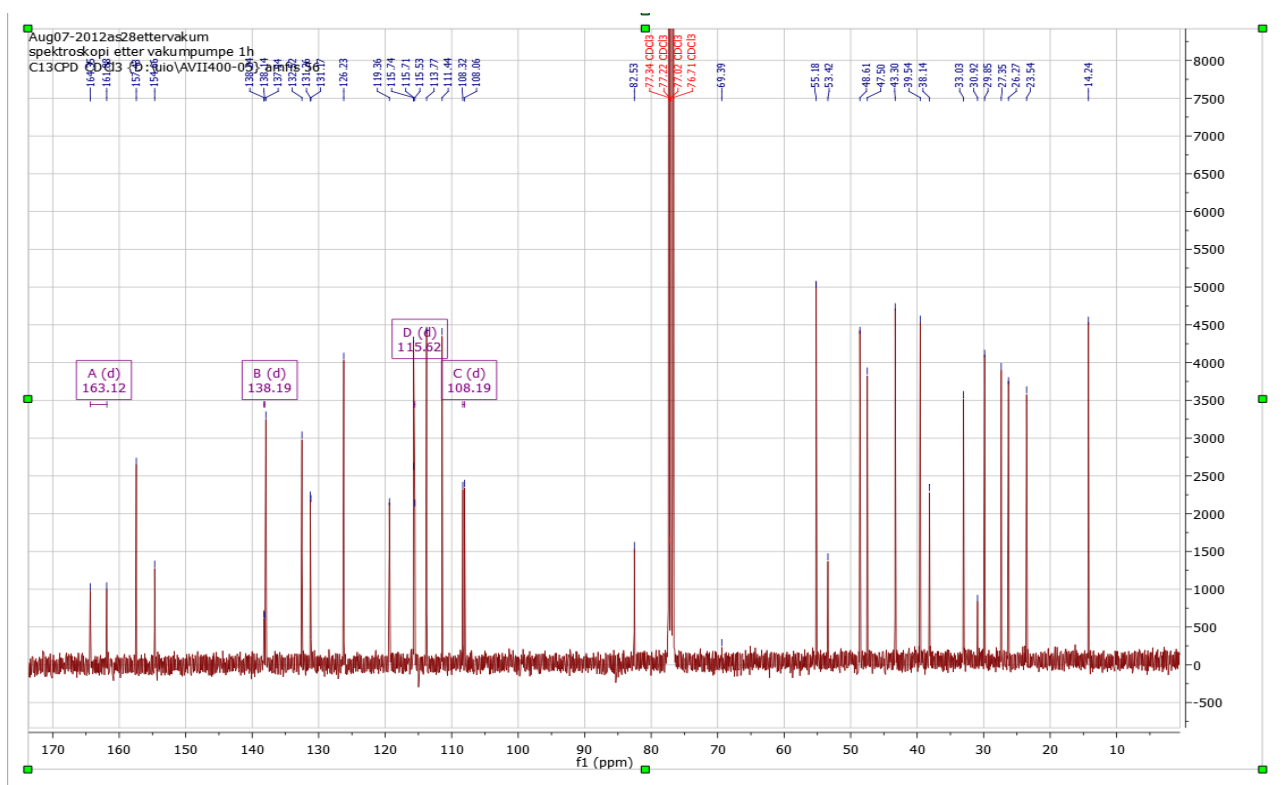
Utbytte : 79%

$^1\text{H-NMR}$ (400Mhz, CDCl_3) : δ 7.94 (s, 1H), 7.62-7.56 (m, 2H), 7.56-7.49 (m, 1H), 7.20-7.11 (m, 2H), 6.71-6.66 (m, 1H), 6.65-6.62 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.95-2.74 (m, 4H), 2.58-2.48 (m, 1H), 2.25-2.10 (m, 3H), 2.10-1.90 (m, 3H), 1.76-1.32 (m, 6H), 1.11 (s, 3H), 0.88-0.75 (m, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400 Mhz, CDCl_3) : δ 163.12(d, $J=248.75\text{Hz}$), 161.88, 157.43, 154.66, 138.19 (d, $J=10,1\text{Hz}$), 137.94, 132.52, 131.26, 131.17, 126.23, 119.36, 115.74, 115.62 (d, $J= 18 \text{ Hz}$), 113.77, 111.44, 108.19 (d, $J=26.21 \text{ Hz}$), 82.53, 55.18, 48.61, 47.50, 43.30, 39.54, 38.14, 33.03, 29.85, 27.35, 26.27, 23.54, 14.24.



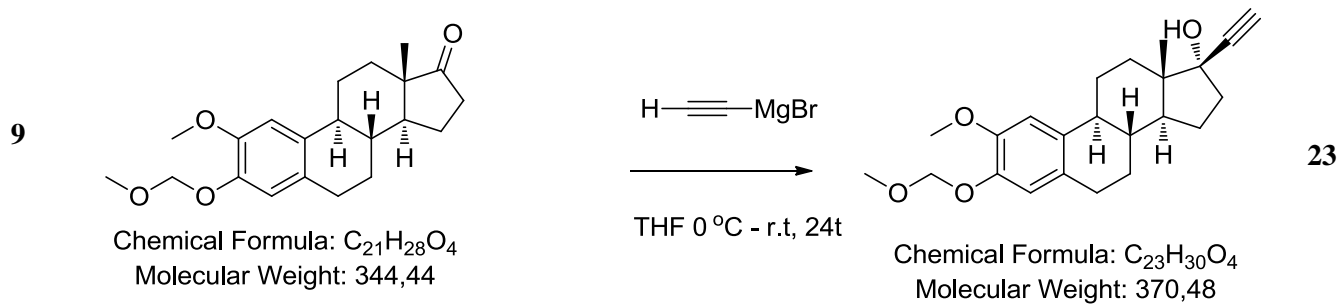
Spekter 9.9 : ^1H -NMR spekter av forbindelse 22



Spekter 9.10 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 22

9.15. Grignard reaksjon på 2-metoksi-3-metoksimetyl-østron

Reaksjonslikning :



Referanse :⁽²⁷⁾

Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum(ml)	Mw(g/mol)	tetthet	k.p.
Forbindelse 9	1,76	1	0,605		344,44		
0,5M EtynylMgBr i THF	8,70	5		17,40		0,94	66
THF				17,44		0,89	66

Forbindelse **9** (0,605, 1,76 mmol) ble veid ut og tilsatt til en tørr 100 ml rundkolbe og løst i tørr THF (17,44 ml). Rundkolben ble ristet forsiktig til alt var løst opp.

EtynylMgBr (17,40ml, 8,70 mmol) ble tilsatt en tørr 3-halset 100 ml rundkolbe. Deretter ble 25 ml dryppetrakt montert. Kolben ble satt på isbad under N₂- gass i 5 minutter, før løsningen med forbindelelse **9** (0,605g, 1,76 mmol) og fylt i dryppetrakten. Lot dette dryppe forsiktig ned i reaksjonsblandingen. Reaksjonen stod under omrøring inntil i ca 24 timer inntil TLC viste at alt utgangsstoffet var omsatt. Deretter ble reaksjonsblandingen opparbeidet. Kolben ble satt på nytt isbad og 2M NH₄Cl (20 ml) og ionebyttet H₂O (30ml) ble tilsatt.

Reaksjonsblandingen ble så ekstrahert med EtOAc (2 x 50 ml) og CH₂Cl₂ (25 ml). Deretter med EtOAc (50 ml) og CH₂Cl₂ (25 ml) på nytt. Til slutt ble de organiske fasene vasket med sat.aq NaCl (20 ml) og tørket med MgSO₄. Produktet ble dampet inn under redusert trykk og rensset med flashkromatografi (heksan:EtOAc 9:2, R_f= 0,2). Elueringsstyrken ble økt (heksan: EtOAc 8:4) for å få stoffet hurtigere ut fra kolonnen.

Kommentar til forsøket :

Flash kromatograferingen tok lang tid. Derfor ble eluenten økt til (heksan:EtOAc 8:4) etter hvert for at stoffet skulle komme ut.

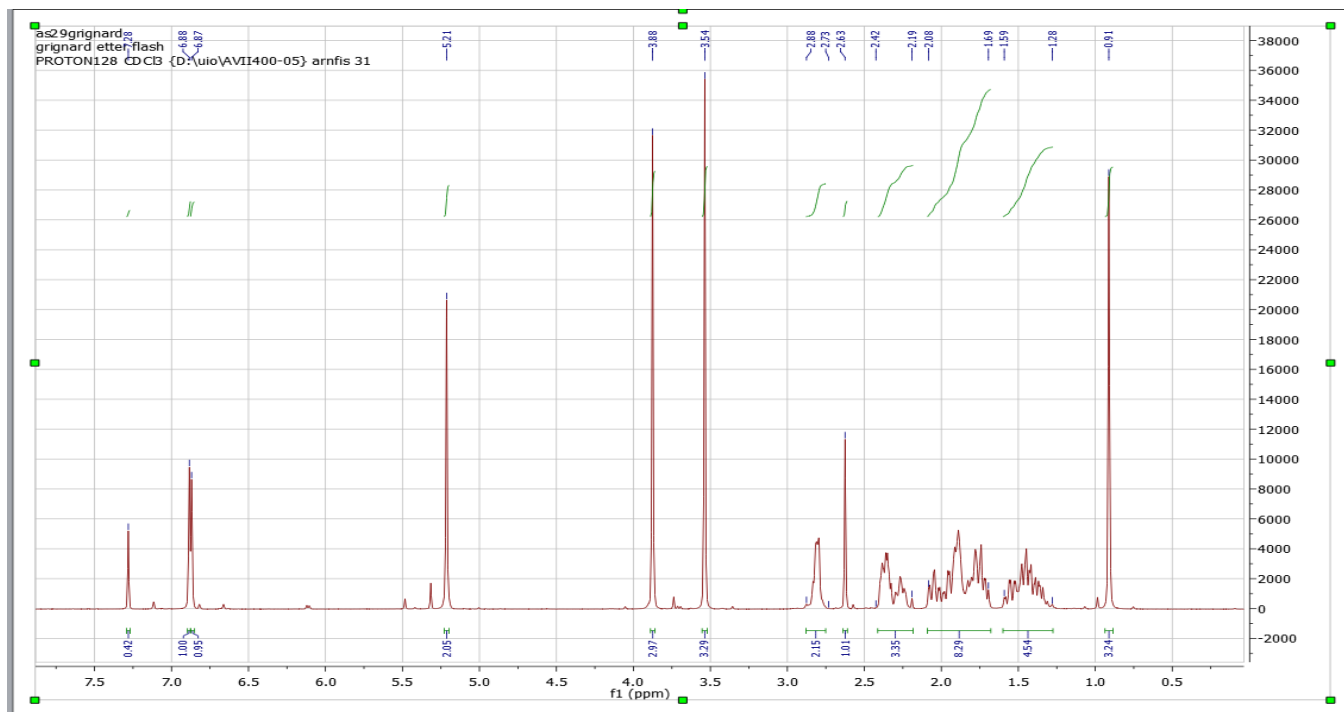
Data :

Produkt : Hvitt stoff

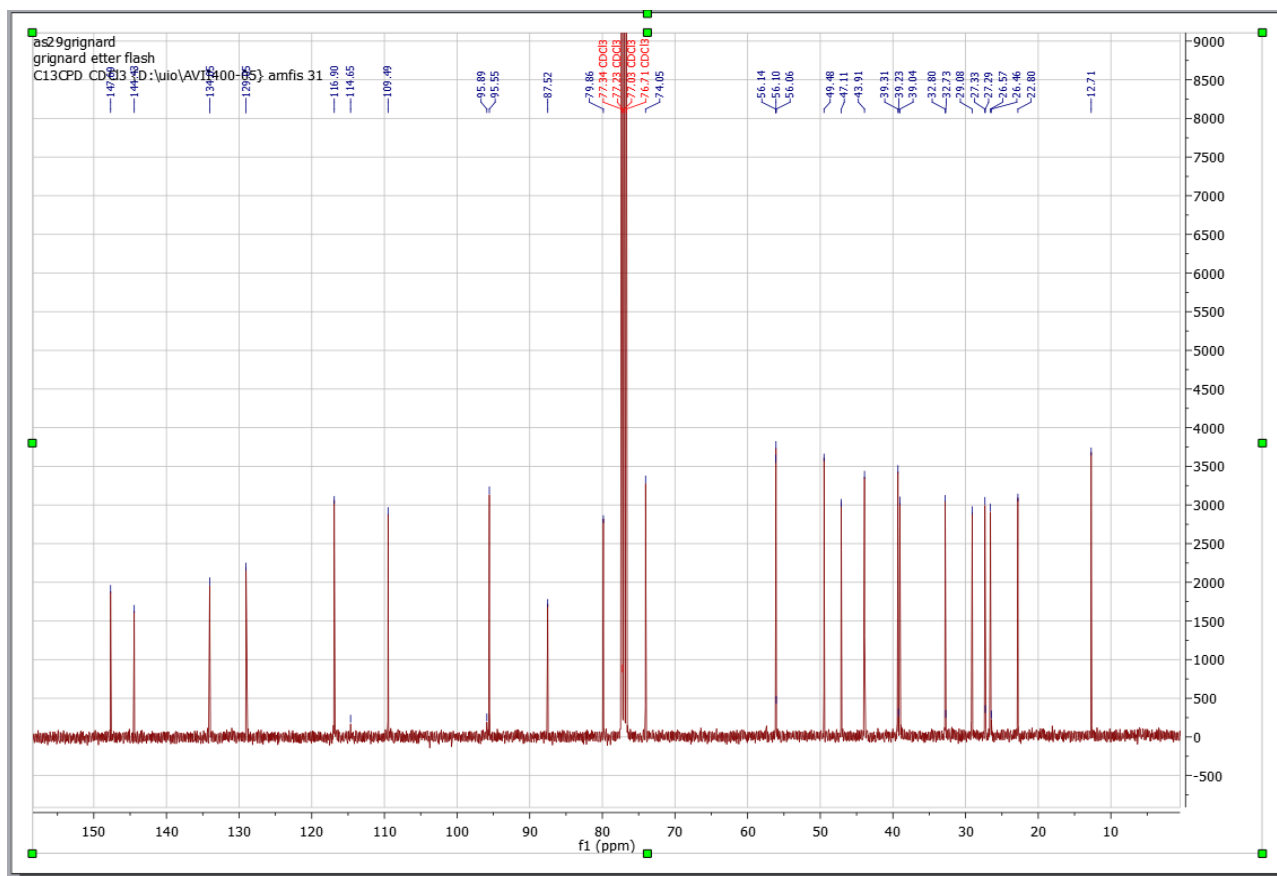
Utbytte : 48%

¹H-NMR (100 Mhz, CDCl₃) : δ 6.88 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 5.21 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 2.88-2.73 (m, 2H), 2.63 (s, 1H), 2.42-2.19 (m, 3H), 2.08-1.69 (m, 8H), 1.59-1.28 (m, 4H), 0.91 (s, 3H).

^{13}C -NMR (100 Mhz, CDCl_3) : δ 147.69, 144.43, 134.05, 129.05, 116.90, 109.49, 95.55, 87.52, 79.86, 74.05, 56.14, 56.06, 49.48, 47.11, 43.91, 39.31, 39.04, 32.80, 29.08, 27.33, 26.57, 22.80, 12.71.



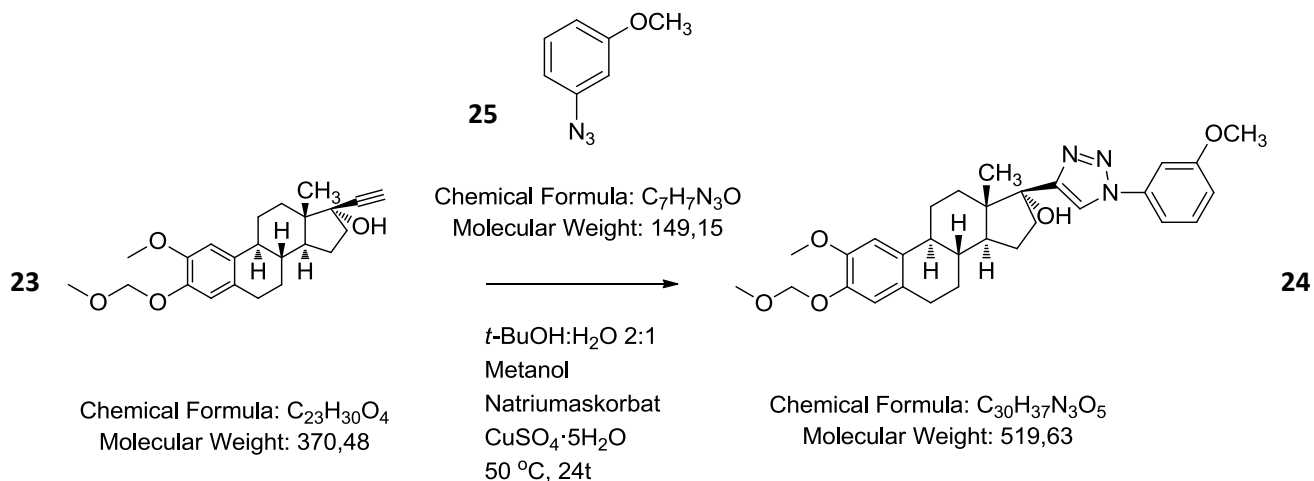
Spekter 9.11 : ^1H -NMR spekter av forbindelse **23**



Spekter 9.12 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse **23**

9.16.Klikk kjemi på 2-metoksi-3-metoksimetyl-etynyl-17-β-østradiol

Reaksjonslikning :



Fremgangsmåte :

Referanse : ⁽³¹⁾

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 23	0,32	1,00	0,120		370,48		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,57	1,78	0,142		250		
Natriumaskorbat	0,65	2	0,128		198		
<i>Tert</i> -butanol				4	74	0,74	82
H_2O				2	18	1	100
Metanol				4	32	0,79	65
3-Azidoanisol 0,5M i <i>Tert</i> -butylmetyleter	3,00	9,37		6	149,15		55,2

Forbindelse **23** (0,120g, 0,32 mmol) ble tilsatt en 25 ml rundkolbe sammen med ionebyttet H_2O (2 ml) og *tert*-butanol (4 ml). 3-Azidoanisol (6ml, 3 mmol) ble tilsatt annen 25 ml rundkolbe og dampet inn forsiktig under redusert trykk i romtemperatur. Dette ble så løst i metanol (2 ml) og tilsatt reaksjonsblandingen. Deretter ble kolben etterskyllet med metanol (2 ml) og deretter tilsatt til reaksjonsblandingen for å få med alt stoffet.

Til slutt ble natriumaskorbat (0,128g, 0,65 mmol) og $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,142g, 0,57 mmol) overført til kolben. Den ble rørt ved 50 °C under N_2 -gass over natt inntil TLC viste at alt startmateriale var omsatt.

Deretter ble reaksjonsblandingen opparbeidet. Det ble ekstrahert CH_2Cl_2 (100 ml) og H_2O (20 ml). Vannfasen ble ekstrahert på nytt med CH_2Cl_2 (2 x 20 ml) og vasket med mettet NaHCO_3 (2 x 20 ml). De samlede organiske fasene ble så vasket med mettet NH_4Cl (2 x 20 ml) og ionebyttet H_2O (20 ml). Til slutt ble de samlede vannfasene vasket med EtOAc (50 ml) og CH_2Cl_2 (50 ml).

De organiske fasene ble tørket med MgSO_4 og dampet inn under redusert trykk.

Sluttproduktet ble rensset ved flashkromatografi med (heksan:EtOAc 50:50, $R_f=0,2$) .CAM Dip.

Produkt ble forsøkt omkrystallisert ved heksan og aceton på vannbad som ble varmet opp til 90 °C. Deretter ble produktet filtrert med foldefilter for å få bort urenheter. Etter omkrystallisering ble krystallene vasket med heksan som gav fast stoff.

Kommentar til forsøket :

Dessverre viste det seg etter omkrystallisering at stoffet hadde blitt degradert. Stoffet er ustabilt og egner seg ikke for omkrystallisering.

Data :

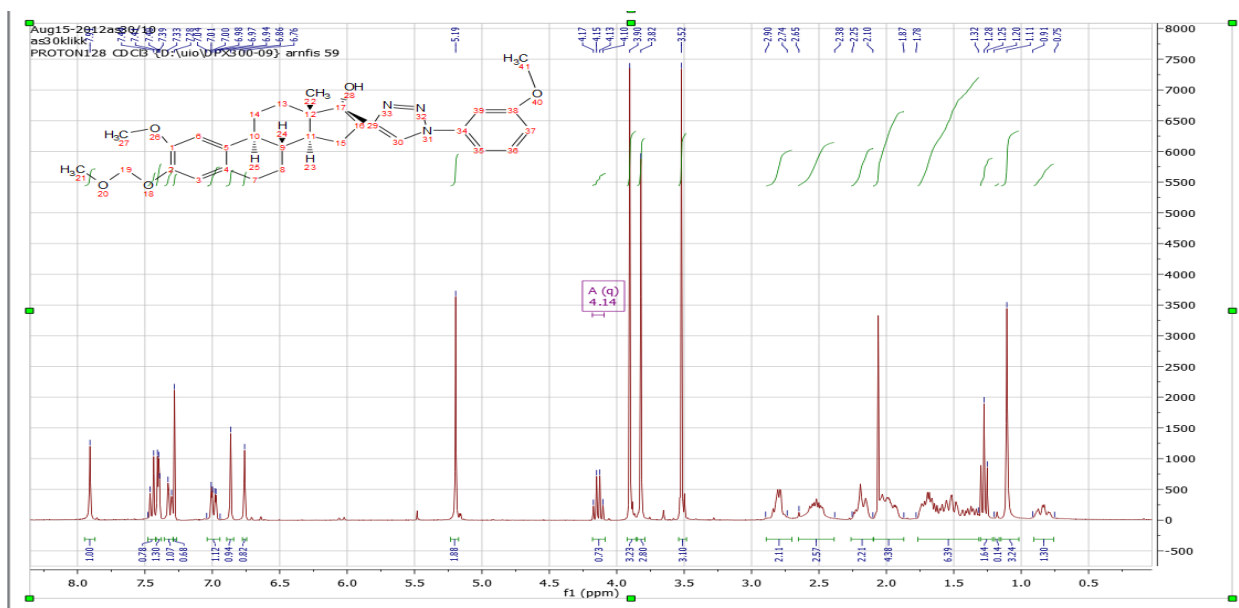
Produkt : Orange fast stoff

Utbytte : 46%

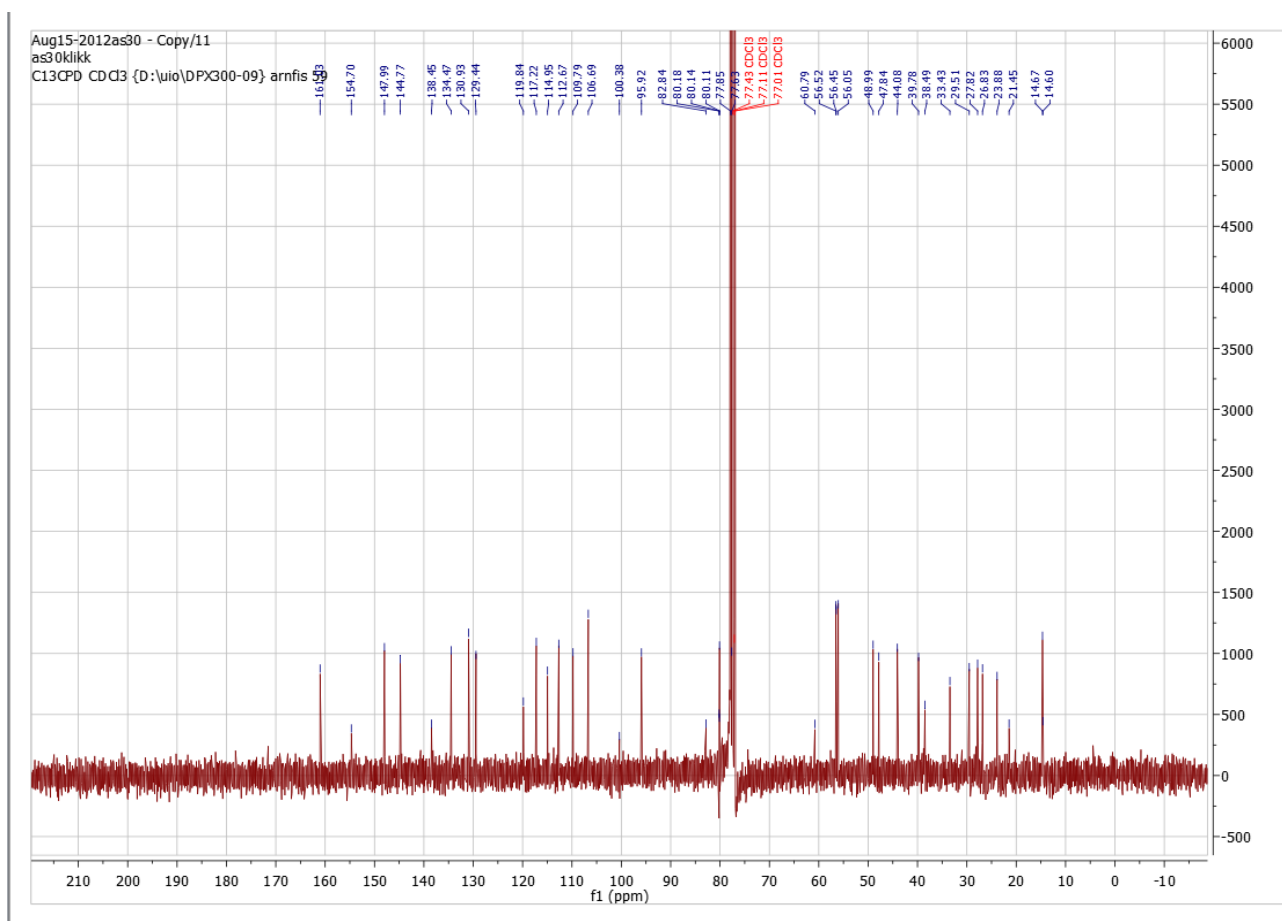
$^1\text{H-NMR}$ (300Mhz, CDCl_3): δ 7.91 (s, 1H), 7.48-7.42 (m, 1H), 7.42-7.38 (m, 1H), 7.36-7.29 (m, 1H), 7.04-6.94 (m, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.19 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.52 (s, 3H), 2.90-2.70 (m, 2H), 2.65-2.39 (m, 3H), 2.26-2.10 (m, 2H), 2.10-1.87 (m, 4H), 1.78-1.31 (m, 6H), 1.11 (s, 3H), 0.90-0.79 (m, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300Mhz, CDCl_3) :

δ 161.03, 154.70, 147.99, 144.77, 138.45, 134.47, 130.93, 129.44, 119.84, 117.22, 114.95, 112.67, 109.79, 106.69, 95.92, 82.84, 56.52, 56.45, 56.05, 48.99, 47.84, 44.08, 39.78, 38.49, 33.43, 29.51, 27.82, 26.83, 23.88, 14.67.



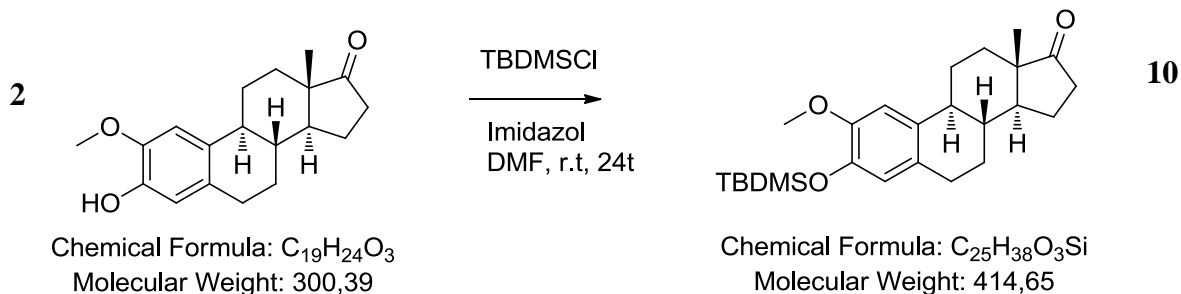
Spekter 9.13 : ^1H -NMR spekter av forbindelse 24



Spekter 9.14 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 24

9.17.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-østron

Reaksjonslikning :



Referanse :⁽³⁸⁾

Fremgangsmåte :

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	MW(g/mol)	tetthet(g/ml)	K.p °C
Forbindelse 2	3,50	1,00	1,05		300,39		
Imidazol	8,37	2,39	0,57		68,08		
TBDMSCl	4,98	1,42	0,75		150,73		
DMF				11	72,11	0,94	152

Forbindelse **2** (1,05g, 3,50 mmol) og imidazol (0,57 g, 8,37 mmol) ble overført i en 25 ml rundkolbe som deretter ble spylt med N₂-gass i 5 min. DMF (11 ml) ble tilsatt og stoffene ble løst. TBDMSCl (0,75g, 4,98 mmol) ble tilsatt reaksjonsblandingen. Kolben ble satt til omrøring i ca 24 timer inntil TLC viste at alt utgangsstoffet var omsatt. Deretter ble reaksjonsblandingen opparbeidet. Det ble først ekstrahert med sat. aq. NaCl (30 ml) og EtOAc (3 x 30 ml). Deretter med 10 % eddiksyre (20 ml). Til slutt med mettet NaHCO₃ (30 ml). Deretter ble de organiske fasene tørket med MgSO₄ og flash kromatografert med (heksan EtOAc: 8:2, R_f= 0,3).CAM DIP.

Kommentar til forsøket :

Det ble dannet veldig mye salter under den første fasen av reaksjonen. Det ble derfor benyttet ekstra sterk omrøring under reaksjonen.

Data ;

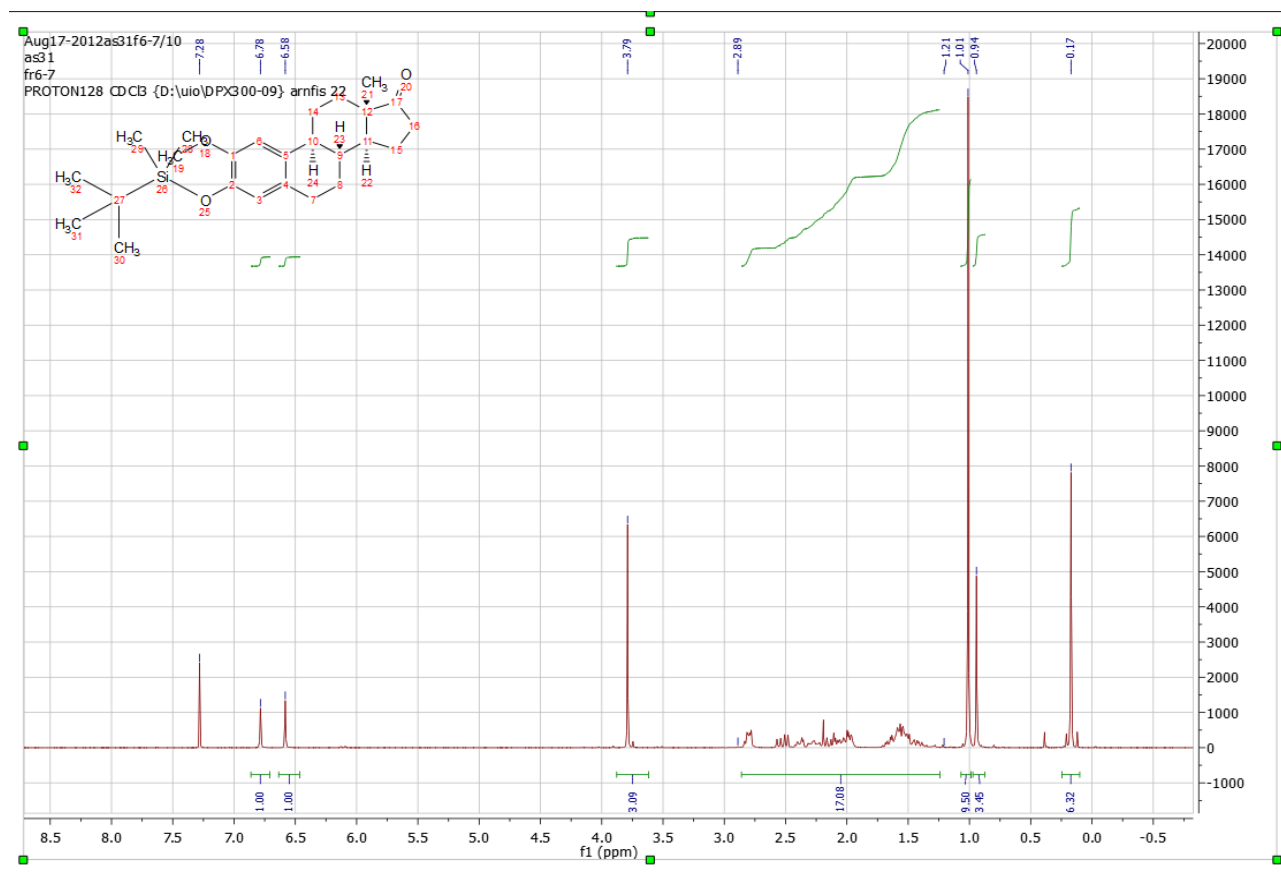
Utbytte : 58%

Smeltepunkt : 163-165.9 °C

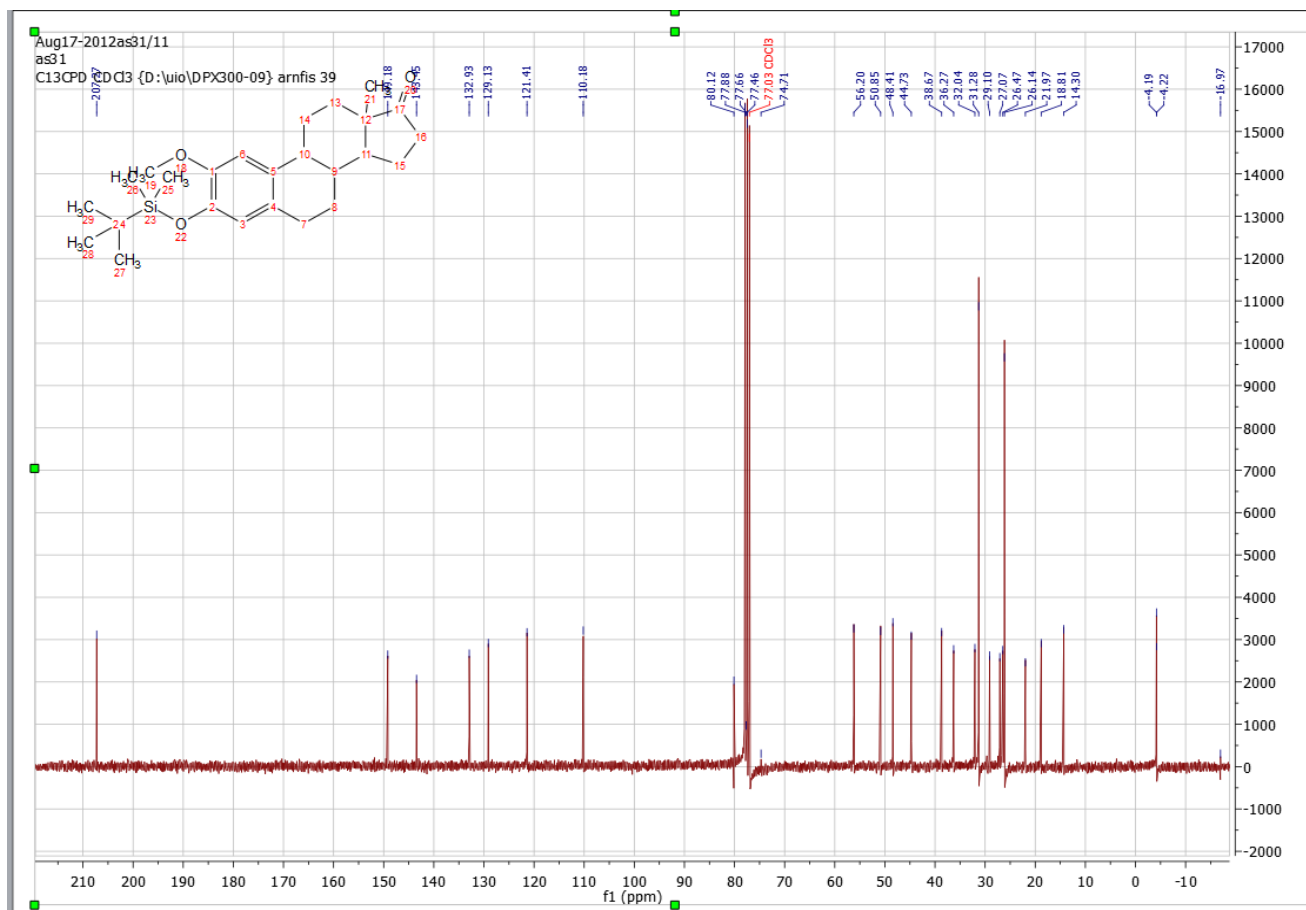
Produkt : Hvitt fast stoff

$^1\text{H-NMR}$ (300Mhz, CDCl_3): δ 6.78 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.89-1.21 (m, 17H), 1.01 (s, 9H), 0.94 (s, 3H), 0.17 (s, 6H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (300Mhz, CDCl_3): δ 207.27, 149.18, 143.45, 132.93, 129.13, 121.41, 110.18, 56.20, 50.85, 48.41, 44.73, 38.67, 36.27, 32.04, 29.10, 27.07, 26.47, 26.14, 21.97, 18.81, 14.30, -4.19, -4.22.



Spekter 9.15 : $^1\text{H-NMR}$ spekter av forbindelse 10

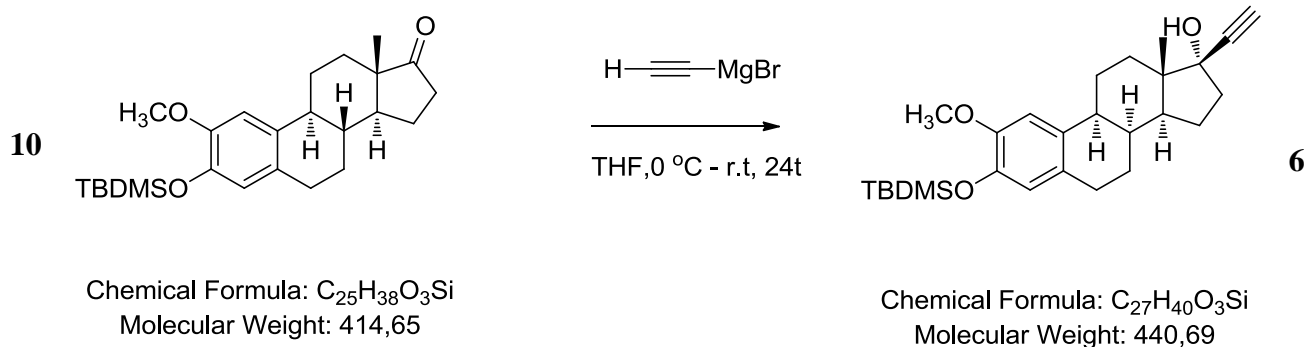


Spekter 9.16 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 10

9.18.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-17- β -etynyløstradiol

Referanse : ⁽²⁷⁾

Reaksjonslikning :



Fremgangsmåte :

Reagenser	mmol	ekvivalenter	Masse (g/mg)	Volum(ml)	Mw(g/mol)	tetthet	k.p. °C
Forbindelse 10	0,99	1	0,412		414,65		
0,5M EtynylMgBr i THF	4,97	5		10			66
THF				16,00			66

En rundkolbe på 50 ml ble spyllt med N₂- gass og deretter påmontert en dryppetrakt på 25 ml og tilsatt etynylmagnesiumbromid (10 ml, 5 mmol). Forbindelse **10** (0,412g, 0,99 mmol) ble tilsatt i en ny kolbe på 50 ml og løst i THF (10 ml). THF (6 ml) ble brukt til å etterskylle kolben. Løsningen ble forsiktig dryppet ned i reaksjonsblandingen mens den stod under omrøring på isbad. Kolben ble satt til omrøring over natt inntil TLC viste at alt utgangsstoffet var omsatt. Deretter ble reaksjonsblandingen opparbeidet. 2M NH₄Cl (20 ml) ble tilsatt dråpevis gjennom dryppetrakten. Reaksjonsblandingen ble deretter ekstrahert med ionebyttet H₂O (30 ml) og EtOAc (2 x 50 ml). Deretter med CH₂Cl₂ (25 ml). Videre med EtOAc (2 x 50 ml) og CH₂Cl₂ (25 ml) på nytt. Til slutt ble de organiske fasene vasket med ionebyttet H₂O (20 ml) og sat. aq. NaCl. (20 ml) og tørket med MgSO₄. De samlede organiske fasene ble dampet inn under redusert trykk. TLC etter opparbeidelsen (EtOAc:Heksan 2:8) viste en flekk både i CAM dip og kaliumpermanganat. R_f=0,2. Sluttproduktet ble filtrert gjennom en plugg med silikagel ved bruk av sintertrakt og filter papir (heksan:EtOAc 50:50) og dampet inn på nytt under redusert trykk.

Kommentar til forsøket :

Siden stoffet viste kun en flekk på TLC og alt utgangsstoffet var omsatt ble ikke produktet rensert med flashkromatografi. I stedet ble det filtrert gjennom en plugg med silika. Dette resulterte i en orange olje.

Ulempen i dette forsøket var at dryppetrakten ikke ble satt i varmeskap før bruk, noe som kan ha redusert utbyttet.

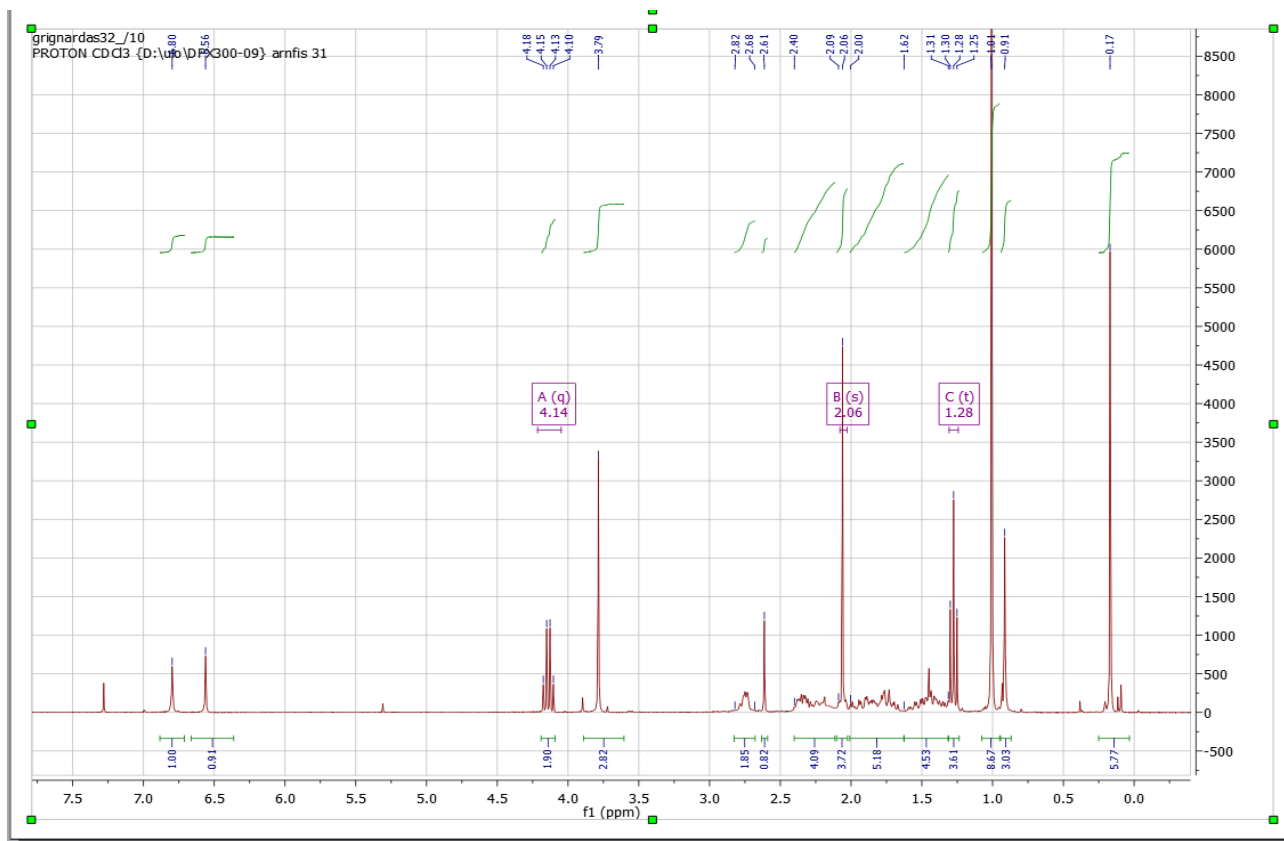
Data :

Utbytte : 70%

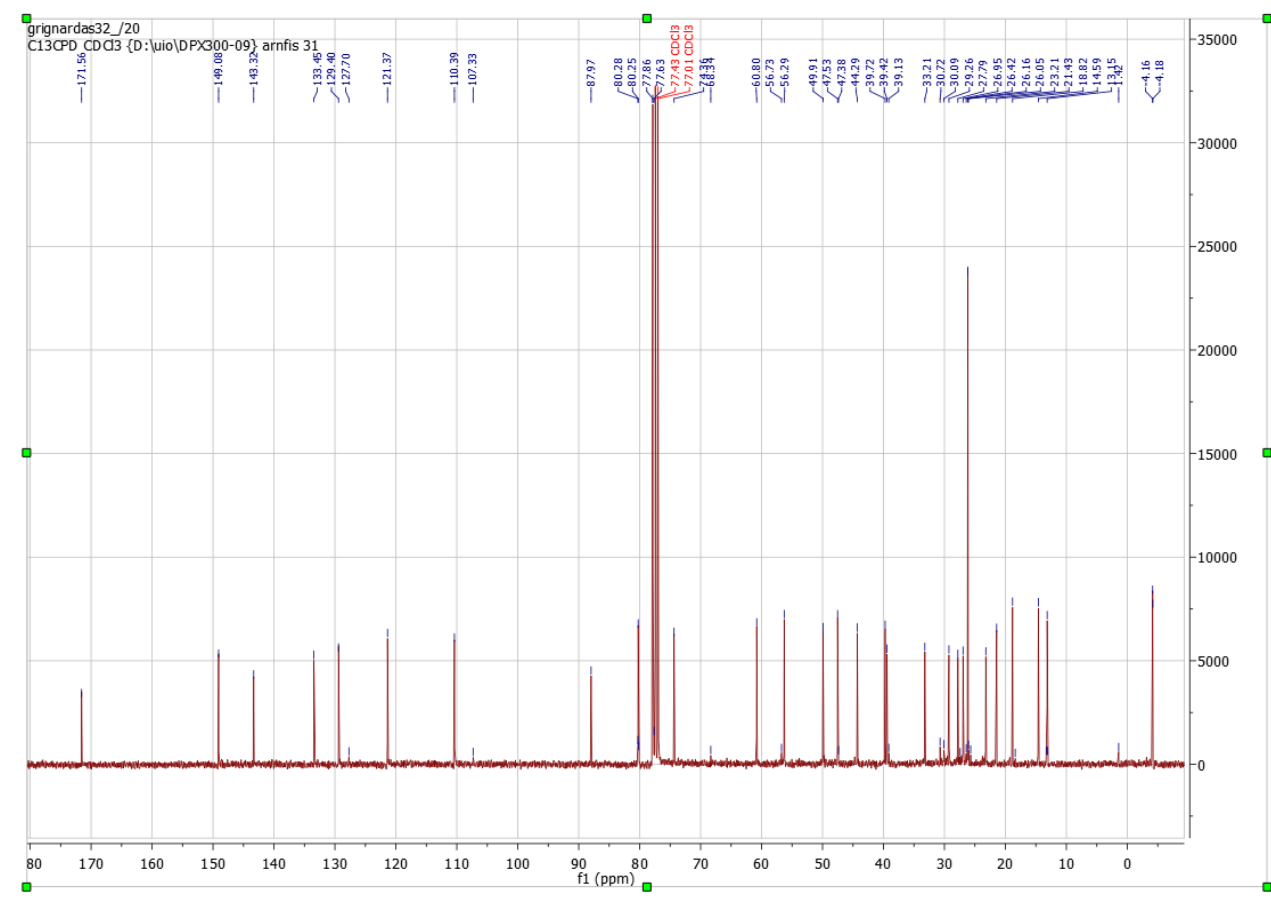
Produkt :orange olje

¹H-NMR(400Mhz,CDCl₃) : δ 6.80 (s, 1H), 6.56 (s, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.82-2.68 (m, 2H), 2.61 (s, 1H), 2.40-2.09 (m, 4H), 2.0-1.62 (m, 5H), 1.62-1.31 (m, 5H), 1.01 (s, 9H), 0.91 (s, 3H), 0.17 (s,6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (400, CDCl_3) : δ 149.08, 143.32, 133.45, 129.40, 121.37, 110.39, 87.97, 74.36, 56.29, 49.91, 47.53, 44.29, 39.72, 39.42, 33.21, 29.26, 27.79, 26.95, 26.16, 23.21, 18.82, 13.15, -4.16, -4.18.



Spekter 9.17 : $^1\text{H-NMR}$ spekter av forbindelse **6**

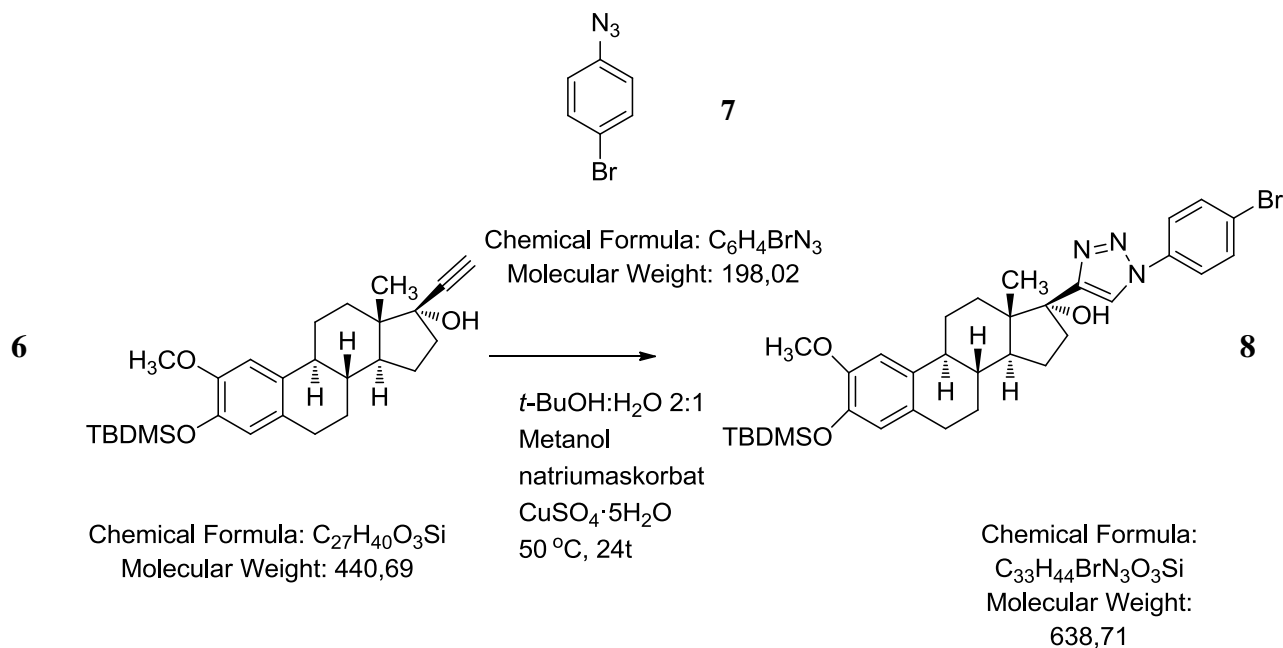


Spekter 9.18 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 6

9.19.Syntese av 2-metoksi-3-TBDMS-17-β-(1-PARA-brom-fenyl-1,2,3-triazol-4-yl)

Referanse : ⁽³¹⁾

Reaksjonslikning :



Referanse : ⁽³¹⁾

Fremgangsmåte :

reagenser	mmol	ekv.	masse(g)	volum(ml)	(Mw)g/mol	tetthet	k.p.(°C)
1-Azido-4-bromobenzene i <i>Tert</i> -butylmetyl eter løsning	2,75	4,23		5,50	198,02		55,2
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,94	1,45	0,234		250	-	
Natriumaskorbat	1,04	1,60	0,205		198	-	
<i>Tert</i> -butanol				6,5	74		82
H_2O				3,1	18	1	100
Metanol				5,0	32	0,79	65
Forbindelse 6	0,65	1	0,288		440,69	-	-

Forbindelse 6 (0,288g, 0,65 mmol) ble overført til en 25 ml rundkolbe ved å løse den opp i metanol. Deretter ble det tilsatt ionebyttet H_2O (3,1 ml) og *tert*-butanol (6,5 ml). 1-Azido-4-bromobenzene (5,5 ml, 2,75 mmol) ble så målt ut i en ny 50 ml rundkolbe og dampet inn under redusert trykk og løst i metanol (2,5 ml) som ble tilsatt til reaksjonsblandingen og etterskylt med metanol (2,5 ml). Observerte at alt stoffet var løst. Tilsatte natriumaskorbat (0,205g, 1,04 mmol) og deretter $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,234g, 0,94 mmol). Ble deretter varmet ved

50 °C under N₂- gass over natt og omrørt inntil TLC viste at startmaterialet var omsatt. Reaksjonsblandingen ble så opparbeidet. Først ble det ekstrahert med CH₂Cl₂ (100ml) og H₂O (30 ml) . Videre med CH₂Cl₂ (2 x 20 ml). De organiske fasene ble vasket med mettet NaHCO₃ (2 x 20 ml) og vasket med med NH₄Cl (2 x 20 ml) . Vannfasen ble igjen vasket med EtOAc (30 ml) og CH₂Cl₂ (30 ml). Vasket til slutt alle organiske faser med ionebyttet H₂O (20 ml). Tørket med MgSO₄ og produktet bble dampet inn under redusert trykk. Deretter ble stoffet rensset med flashkromatografi (heksan:EtOAc 7:3, R_f= 0,2). CAM DIP.

Kommentar til forsøket :

Det var litt rest av etylacetat i prøven som var vanskelig å fjerne. Ved igangsetting av reaksjonen ble den først svart og deretter gulbrun igjen etter kort tid. Hadde problemer med oppvarming oppvarmingen underveis på grunn av lekkasje av olje fra oljebadet på varmentelen. Dette medførte at det begynte å ryke fra varmeplata og det tok tid for å få innstilt temperaturen riktig.

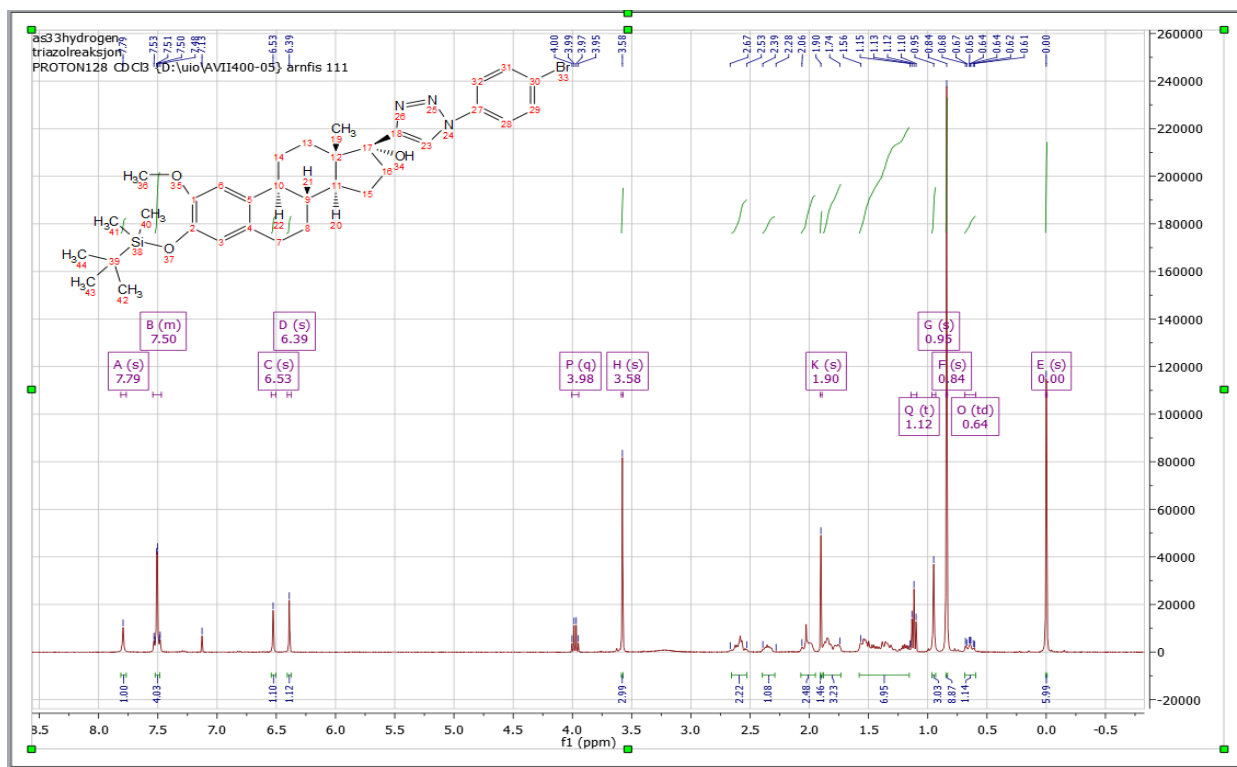
Data :

Produkt : Gule krystaller

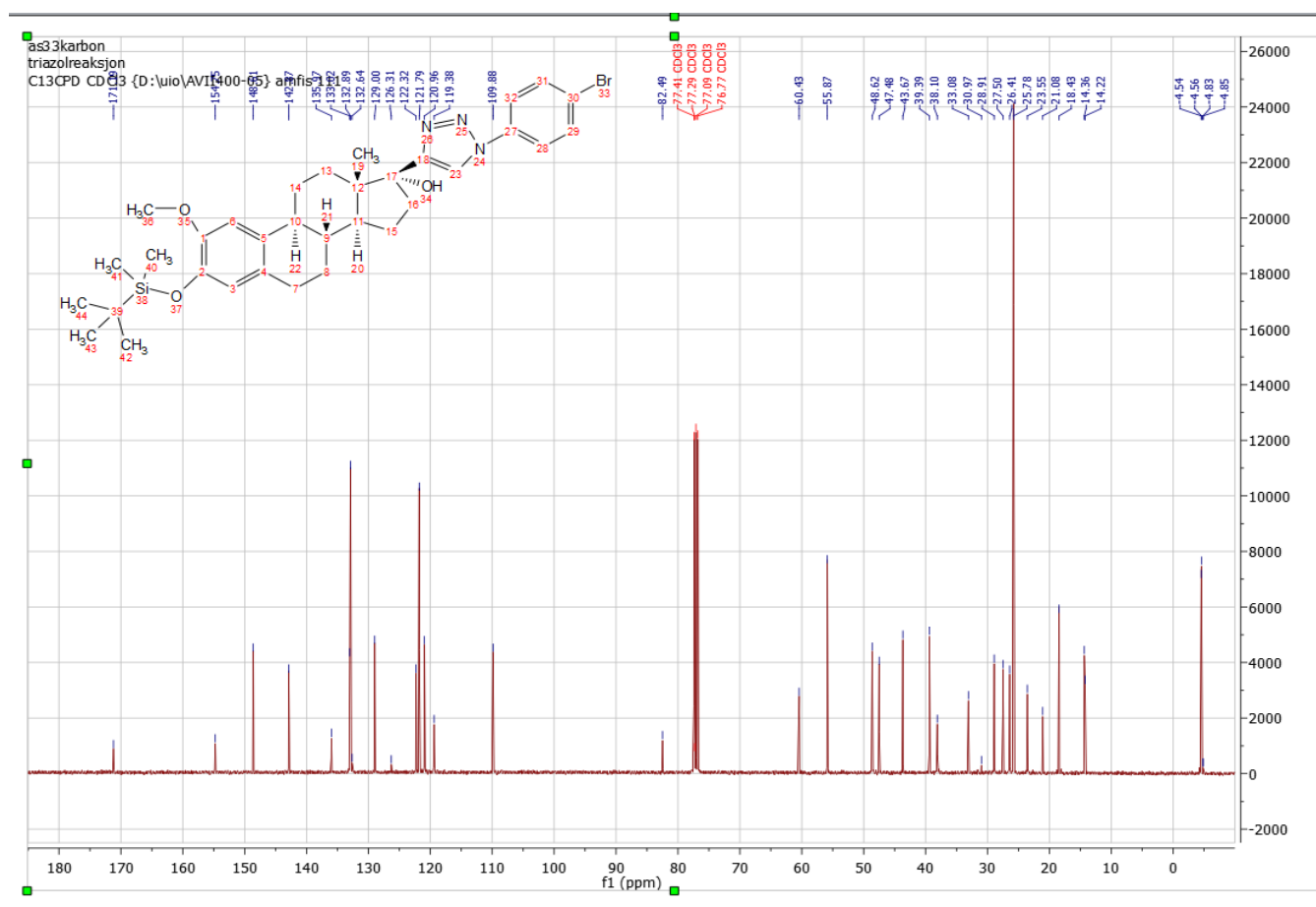
Utbytte : 41 %

¹H-NMR : (400 Mhz, CDCl₃) : δ 7.79 (s, 1H), 7.53-7.48 (m, 4H), 6.53 (s, 1H), 6.39 (s, 1H), 3.58 (s, 3H), 2.67-2.53 (m, 2H), 2.39-2.28 (m, 1H), 2.06-1.95 (m, 2H) 1.88-1.735 (m, 3H), 1.56-1.15 (m, 7H), 0.95 (s, 3H), 0.84 (s, 9H), 0.69-0.59 (m, 1H), 0.00 (s,6H).

¹³C-NMR(100 Mhz, CDCl₃) : δ 154.75, 148.61, 142.87, 135.97, 133.02, 132.89, 129.00, 122.32, 121.79, 120.96, 119.38, 109.88, 82.49, 55.87, 48.62, 47.48, 43.67, 39.39, 38.10, 33.08, 28.91, 27.50, 26.41, 25.78, 23.55, 18.43, 14.36, -4.54, -4.56.



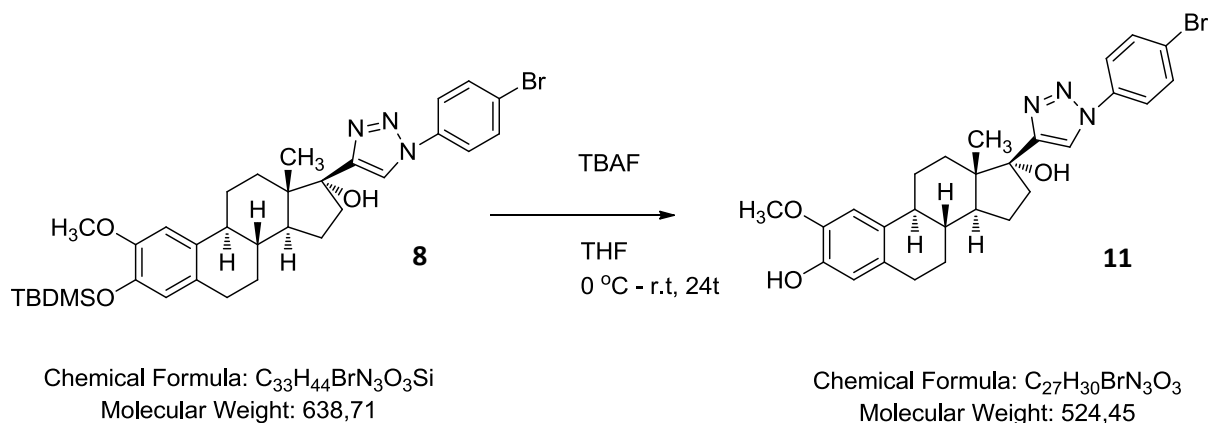
Spekter 9.19 : ^1H -NMR spekter av forbindelse **8**



Spekter 9.20 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 8

9.20.Syntese av 2-metoksi-17-β-(1-para-brom,1,2,3-triazol-4-yl)

Reaksjonslikning



Referanse : ⁽³⁸⁾

Fremgangsmåte :

	mmol	ekv.	masse(g)	molar masse (Mw)	volum(ml)	tetthet (g/ml)	k.p (°C)
Forbindelse 8	0,13	1,00	0,083	638,71			
1 M TBAF i THF	2,00	15,38		261,46	2,00	0,90	66
THF	-	-	-	72	5	0,89	66

Forbindelse **8** (0,083g, 0,13 mmol) ble tilsatt en 100 ml rundkolbe. Deretter ble rundkolben spylt med N_2 gass i ca 5 min. THF (5ml) ble tilsatt og rundkolben ble ristet inntil alt stoff var løst. Deretter ble TBAF (2 ml, 2 mmol) tilsatt. Varmerutvikling ble observert. Tilsatte forsiktig og løsningen ble satt på isbad. Løsningen ble satt til omrøring over natt inntil TLC viste at alt utgangsstoffet var omsatt.

Reaksjonen ble så opparbeidet. Satte reaksjonsblandingen på isbad igjen og det ble tilsatt mettet $NaHCO_3$ (20 ml) til rundkolben. Blandingen ble ekstrahert med EtOAc (3 x 20 ml) og deretter vasket med ionebyttet H_2O (20 ml). Til slutt ble produktet tørket med $MgSO_4$ og dampet inn under redusert trykk. Det ble utført flash kromatografi (heksan:EtOAc 50:50, $R_f = 0,3$). CAM dip. Siden 1H -NMR spekteret viste rester av EtOAc ble krystallene forsøkt vasket med CH_2Cl_2 og satt og satt under redusert trykk over natt. Da ble CH_2Cl_2 topp observert i spekteret.

Kommentar til forsøket :

Produktet viste seg å være svært vanskelig å få helt fritt for løsemiddel. Først viste ^1H spekteret EtOAc topp. Deretter ble CH_2Cl_2 topp observert etter neste rensing med CH_2Cl_2 . Dette kan skyldes at løsemiddelrestene er vanskelig å fjerne fra oljefasen. Det kommer tydelig frem i ^{13}C -spekteret som viser rester av EtOAc.

Data :

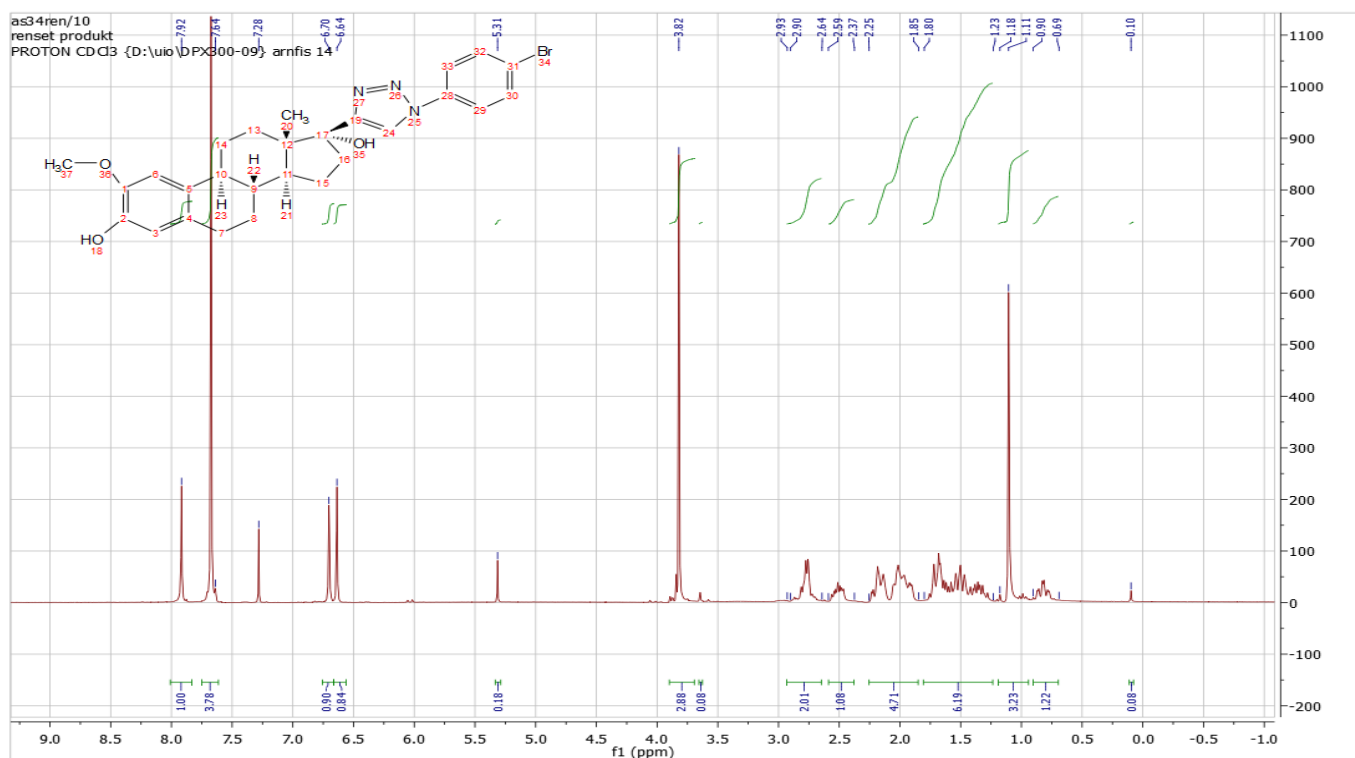
Produkt : Hvitt stoff med blanke krystaller

Utbytte : 57 %

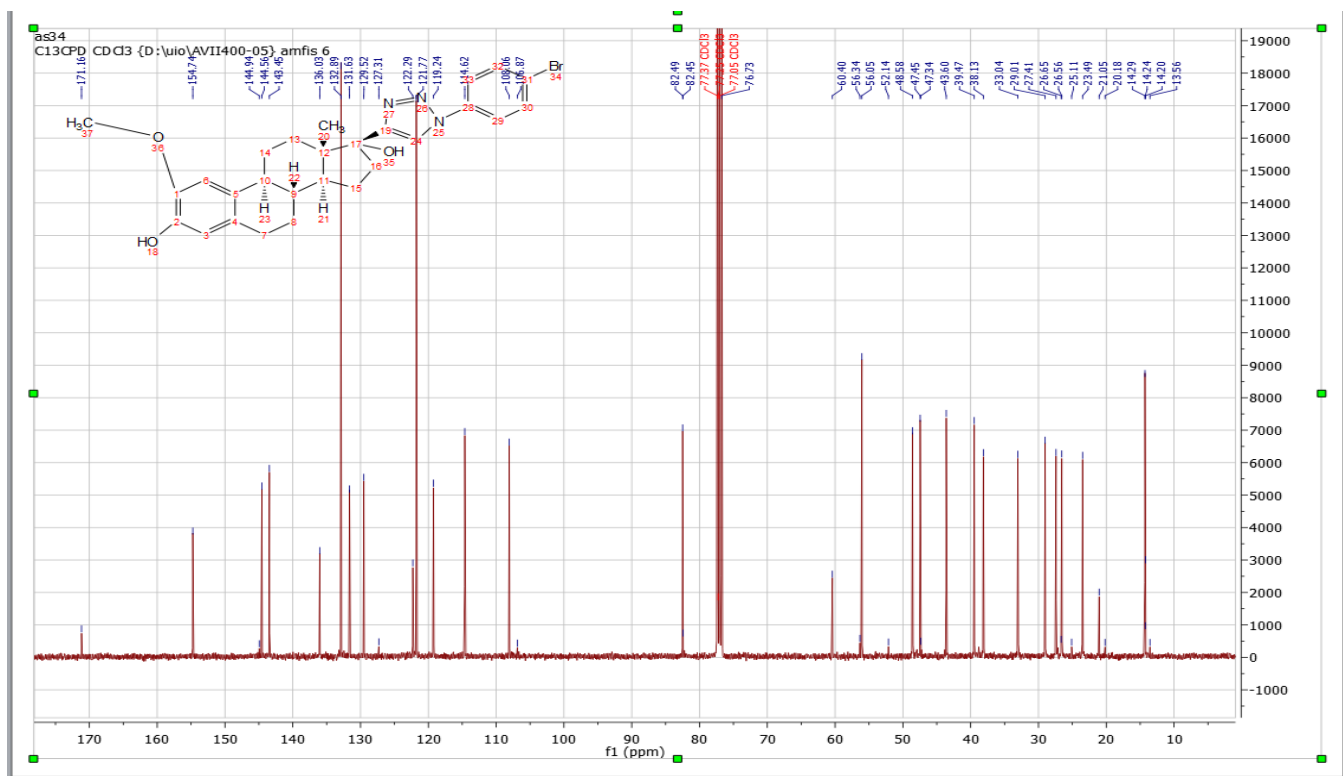
^1H -NMR (300 Mhz, CDCl_3): δ 7.92 (s,1H), 7.75-7.61 (m, 4H), 6.70 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.93-1.23 (m, 14H), 1.11 (s, 3H), 0.90-0.69 (m, 1H).

^{13}C -NMR(100 Mhz, CDCl_3):

δ 154.74, 144.56, 143.45, 136.03, 132.89, 131.63, 129.52, 122.29, 121.77, 119.24, 114.62, 108.06, 82.49, 56.05, 48.58, 47.45, 43.60, 39.47, 38.13, 30.04, 29.01, 27.41, 26.56, 23.49, 14.29.



Spekter 9.21 : ^1H -NMR spekter av forbindelse **11**



Spekter 9.22 : ^{13}C -NMR spekter av forbindelse 11

10.Litteraturliste

1. Lakhani NJ, Sarkar MA, Venitz J, Figg WD:**2-Methoxyestradiol, a Promising Anticancer Agent.** *Pharmacotherapy* 2003, **23**(2):165-172.
2. Sutherland TE, Anderson RL, Hughes RA, Altmann E, Schuliga M, Ziogas J, Stewart AG :**2-Methoxyestradiol – a unique blend of activities generating a new class of anti-tumour/anti-inflammatory agents.** *Drug Discov. Today* 2007, **12**(13–14):577-584.
3. Agoston GE, Shah JH, LaVallee TM, Zhan X, Pribluda VS, Treston AM: **Synthesis and structure–activity relationships of 16-modified analogs of 2-methoxyestradiol.** *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**(24):7524-7537.
4. David J:**Cancer Care - Prevention, Treatment and Palliation.** Great Birtain: Chapman & Hall; 1995:s. 1-10
5. Cutter MA, Sigstedt J, Venne V: **Cell Biology and Cancer.** Colorado: BSCS and Videodiscovery; 1999:s. 5-10, tilgjengelig fra :
http://science.education.nih.gov/supplements/nih1/Cancer/guide/pdfs/nih_cancer.pdf , sist aksessert ,13.oktober 2012
6. Mooberry SL: **Mechanism of action of 2-methoxyestradiol: new developments.** *Drug Resist. Update* 2003, **6**(6):355-361.
7. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher A: **Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32–like Proteases.** *JEM.* 1997, **185**(4):601-608.
8. Surget S, Chiron D, Gomez-Bourgie P, Deschamps G , Ménoret E,Bataille R, Moreau P, Le Gouill S, Amiot M, Pellat- Deceunck C.: **Cell Death via DR5, but not DR4, Is Regulated by p53 in Myeloma Cells.** *Cancer Res.* 2012, **72**(17):4562-4573.
9. Vaskivuo T: **Regulation of apoptosis in the female reproductive system**
Hentet fra : <http://herkules oulu.fi/isbn9514266676/html/i267425.html#i267436> sist aksessert 13.oktober 2012
10. LaVallee TM, Zhan XH, Johnson MS, Herbstritt CJ, Swartz G, Williams MS, Hemsbrough WA Green SJ, Pribluda VS: **2-Methoxyestradiol Up-Regulates Death Receptor 5 and Induces Apoptosis through Activation of the Extrinsic Pathway.** *Cancer Res.*2003, **63**(2):468-475.
11. Kamath K, Okouneva T, Larson G, Panda D, Wilson L, Jordan MA:**2-Methoxyestradiol suppresses microtubule dynamics and arrests mitosis without depolymerizing microtubules.** *Mol Cancer Ther* 2006, **5**(9):2225-2233.
12. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Essetial cell Biology.**2nd Edition.New York: Garland Science; 2004:s. 580-582.
13. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A,Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Essential Cell Biology.**2nd Edition.New York: Garland Science, 2004:s. 641-644.
14. D'Amato RJ, Lin CM, Flynn E, Folkman J, Hamel E.: **2-Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site.***PNAS* 1994, **91**(9):3964-3968.
15. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A,Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Essential Cell Biology.**2nd Edition. New York: Garland Science, 2004:s. 613.
16. Gui Y, Zheng X-L:**2-Methoxyestradiol Induces Cell Cycle Arrest and Mitotic Cell Apoptosis in Human Vascular Smooth Muscle Cells.** *Hypertension.* 2006, **47**(2):271-280.
17. Baguley BC, Kerr DJ:**Anticancer Drug Development.**California:Academic Press, 2002: 123-125
18. Sato Y: **Molecular mechanism of angiogenesis Transcription factors and their therapeutic relevance.** *Pharmacol & Ther.* 2000, **87**(1): 51-60

19. Agoston GE, Shah JH, Suwandi L, Hanson AD, Zhan X, LaVallee TM, Pribluda V, Treston AM : **Synthesis, antiproliferative, and pharmacokinetic properties of 3- and 17-double-modified analogs of 2-methoxyestradiol.***Bioorg. Med. Chem.Lett.* 2009, **19**(21):6241-6244.
20. Verdier-Pinard P, Wang Z, Mohanakrishnan AK, Cushman M, Hamel E: **A Steroid Derivative with Paclitaxel-Like Effects on Tubulin Polymerization.** *Mol. Pharmacol.* 2000, **57**(3):568-575.
21. Miller TA, Bulman AL, Thompson CD, Garst ME, Macdonald TL:**Synthesis and Structure–Activity Profiles of A-Homoestrans, the Estratropones.** *J. Med. Chem.* 1997, **40**(23):3836-3841.
22. Cushman M, He H-M, Katzenellenbogen JA, Lin CM, Hamel E: **Synthesis, Antitubulin and Antimitotic Activity, and Cytotoxicity of Analogs of 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Mammalian Metabolite of Estradiol That Inhibits Tubulin Polymerization by Binding to the Colchicine Binding Site.** *J. Med. Chem.*1995, **38**(12):2041-2049
23. Cushman M, He H-M, Katzenellenbogen JA, Varma RK, Hamel E, Lin CM, Ram S,Sachdeva YP : **Synthesis of Analogs of 2-Methoxyestradiol with Enhanced Inhibitory Effects on Tubulin Polymerization and Cancer Cell Growth.** *J. Med. Chem.* 1997, **40**(15):2323-2334.
24. Suwandi LS, Agoston GE, Shah JH, Hanson AD, Zhan XH, LaVallee TM, Treston AM:**Synthesis and antitumor activities of 3-modified 2-methoxyestradiol analogs.** *Bioorg. Med. Chem.Lett.* 2009, **19**(22):6459-6462
25. Rao PN, Cessac JW, Tinley TL, Mooberry SL:**Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs.** *Steroids.* 2002,**67**(13–14):1079-1089.
26. Rao PN, Cessac JW, Boyd JW, Hanson AD, Shah J: **Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs—Part II.** *Steroids.* 2008,**73**(2):158-170
27. Edsall AB, Mohanakrishnan AK, Yang D, Fanwick PE, Hamel E, Hanson AD, Agoston GE, Cushman M: **Effects of Altering the Electronics of 2-Methoxyestradiol on Cell Proliferation, on Cytotoxicity in Human Cancer Cell Cultures, and on Tubulin Polymerization,** *J. Med. Chem.* 2004, **47**(21):5126-5139.
28. Meijer RH: **The winding road from Oppenauer to sustainable catalytic oxidations of alcohols.**Technische Universiteit Eindhoven; 2002.
29. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic Chemistry.**9th Edition. Hoboken, NJ.: Wiley; 2008:s. 280-283
30. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic Chemistry.**9th Edition Hoboken, NJ.: Wiley; 2008:s. 526-536
31. Tao C-Z, Cui X, Li J, Liu A-X, Liu L, Guo Q-X: **Copper-catalyzed synthesis of aryl azides and 1-aryl-1,2,3-triazoles from boronic acids,** *Tetrahedron Lett.*..2007, **48**(20):3525-3529
32. Moses JE, Moorhouse AD: **The growing application of click chemistry.** *Chem. Soc. Rev.* 2007, **36**(8):1249-1262
33. Himo F, Lovell T, Hilgraf R, Rostovtsev VV, Noodleman L, Sharpless KB, Fokin VV: **Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates.** *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**(1):210-216.
34. Hein CD, Liu X-M, Wang D: **Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences.** *Pharm. Res.* 2008, **25**(10):2216-2230.
35. Greene TW, Wuts PGM: **Protective groups in organic synthesis.**Third Edition Hoboken, NJ.:Wiley; 1999:s. 23-33
36. Greene TW, Wuts PGM: **Protective groups in organic synthesis.**Third Edition Hoboken, NJ.:Wiley; 1999:s. 127-139.
37. Kocienski P: **Protecting Groups.**Third Edition.Stuttgart.:George Thime Verlag; 2005:s. 7-8.
38. Corey EJ, Venkateswarlu A : **Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives.** *J. Am. Chem. Soc.* 1972, **94**(17):6190-6191.
39. Solomons TWG, Fryhle CB: **Organic Chemistry.**9th Edition. Hoboken, NJ.: Wiley; 2008:s. 364-462

40. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A: **NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities.** *J. Org. Chem.* 1997, **62**(21): 7512-7515
41. Meyer SD, Schreiber SL: **Acceleration of the Dess-Martin Oxidation by Water..** *J. Org. Chem.* 1994, **59**(24):7549-7552.
42. Williams DH, Fleming I : **Spectroscopic methods in Organic Chemistry.**5th Edition.Great Britain: The Bath Press; 1995: s. 63-170
43. Cone EJ, Buchwald WF, Darwin WD: **Analytical controls in drug metabolic studies. II. Artifact formation during chloroform extraction of drugs and metabolites with amine substituents. Drug Metabolism and Disposition.** *Drug Metab Dispos.* 1982, **10**(6):561-567
44. Schneider W, Diller W: **Phosgene.***Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.*7th edition.Volume 26, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000: s. 623-632
45. Sigma Aldrich - 2-methoxyestradiol hentet fra :
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m6383?lang=en®ion=NO>
sist aksessert 9.oktober 2012
46. Hou Y, Meyers CY, Akomeah M: **A Short, Economical Synthesis of 2-Methoxyestradiol, an Anticancer Agent in Clinical.** *J. Org. Chem.* 2009, **74**(16):6362-6364.