

# SYNTESE AV OKSYGENERTE EPA-ANALOGER MED POTENSIELLE ANTIINFLAMMATORISKE EFFEKTER

SYNTHESIS OF OXYGENATED EPA-ANALOGS WITH POTENTIAL  
ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS.

KAROLINE GANGESTAD PRIMDAHL

UNIVERSITETET FOR MILJØ- OG BIOVITENSKAP  
INSTITUTT FOR KJEMI, BIOTEKNOLOGI OG MATVITENSKAP  
MASTEROPPGAVE 30 STP. 2013



## **Forord**

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved kjemiavdelingen på Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap ved Universitetet for Miljø- og Biovitenskap.

Jeg vil gjerne takke mine veiledere Yngve Stenstrøm og Trond Vidar Hansen, for god veiledning, muligheten til å jobbe med dette spennende prosjektet og deres smittende entusiasme for organisk kjemi.

Takk til studentene på gruppen for godt samvær og faglig diskusjon. Spesielt vil jeg takke Liudmilla Filippova og Harrison Gallantree-Smith for god tålmodighet og hjelp med det praktiske arbeidet.

Takk til Anne Gravdal for all hjelp og bestilling av varer.

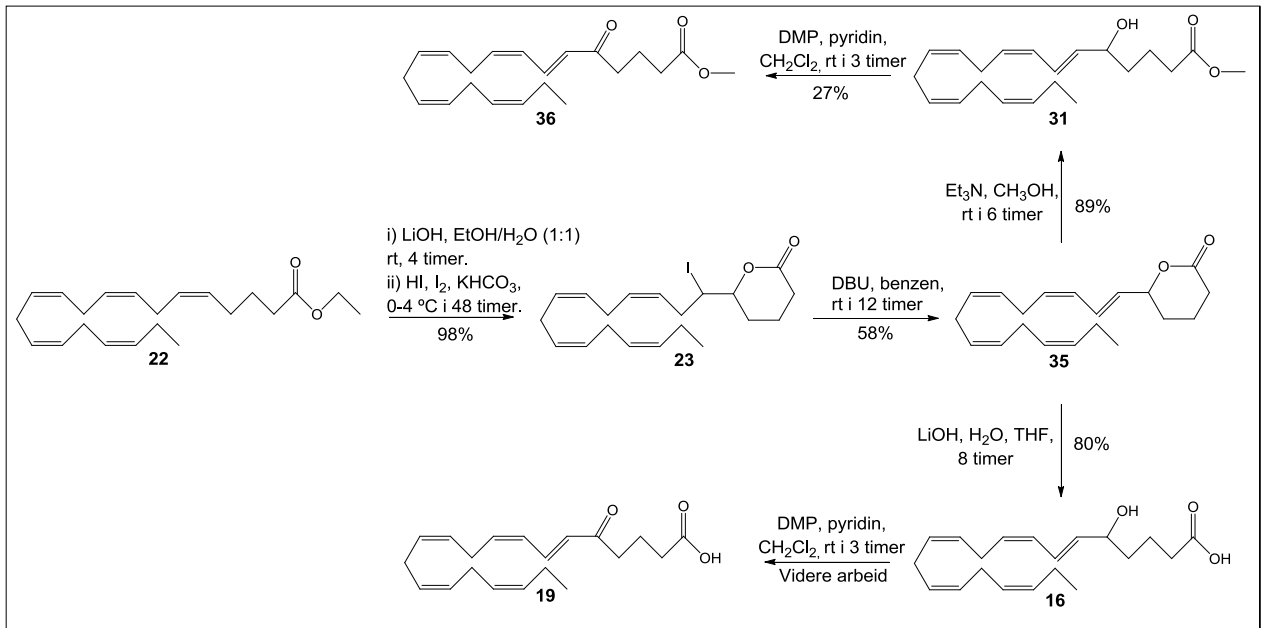
Takk til Pronova Biopharma AS for det uvurderlige utgangsmaterialet som ble benyttet til syntesene i denne oppgaven.

Til slutt vil jeg takke venner og familie for at dere alltid stiller opp for meg og støtten jeg har fått gjennom hele utdannelsen.

Ås, juni 2013.

Karoline Gangestad Primdahl

# Grafisk sammendrag



## Sammendrag

Synteser av de tre oksygenerte EPA-forbindelsene (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5-HEPE, **16**), (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**31**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-okso-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**36**) har blitt gjennomført.

Det ble ikke tid til å syntetisere enantiomerene av hverken **16** eller **31**.

Det ble utarbeidet en HPLC metode med en kirale kolonne som ga grunnlinjeseparasjon av enantiomerene av **31**.

Det ble i tillegg gjort forsøk på å analysere enantiomerene av **31** ved å derivatisere forbindelse **31** både med *R*- og med *S*-Mosher-syreklorid. Separasjon av de diastereomere forbindelsene **37** og **38** ved HPLC med en akiral kolonne ble forsøkt uten hell. Derivatiseringen av **31**, basert på NMR spektra av forbindelse **37** og **38**, viste seg å være vellykket.

De siste årene har flere studier av ulike oksygenerte PUFA metabolitter vist en rekke interessante biologiske aktiviteter. De biologiske egenskapene til forbindelsene **16**, **19** og **31** skal testes i et Ca<sup>2+</sup> immobiliserings assay.<sup>24</sup> Dette vil gi indikasjoner på disse forbindelsenes anti-inflammatoriske egenskaper *in vitro*.

## Abstract

Syntheses of three oxygenated EPA compounds (*6E,8Z,11Z,14Z,17Z*)-5-hydroxy-6,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (5-HEPE, **16**), (*6E,8Z,11Z,14Z,17Z*)-methyl-5-hydroxy-6,8,11,14,17-eicosapentaenoate (**31**) and (*6E,8Z,11Z,14Z,17Z*)-methyl-5-oxo-6,8,11,14,17-eicosapentaenoate has been successfully accomplished. There was not enough time to complete the synthesis of the last compound, 5-oxo-ETE (**19**), but since the other EPA metabolites were obtained, the probability is high that the synthesis of 5-oxo-ETE should be achieved, as well. The plan was also to prepare the enantiomers of both **16** and **31**, but the time was insufficient.

A HPLC method developed with a chiral column gave base line separation of the enantiomers of **31**.

In addition to this it was also made an attempt to analyze the enantiomers of **31** after reaction with both the *R*- and *S*-Mosher acid chloride. The diastereomers **37** and **38** was attempted separated by the use of an HPLC equipped with an achiral column. NMR spectra of both **37** and **38** indicated that the desired compounds were obtained. Unfortunately, no separation of these two diastereomers was achieved by HPLC within the timelines of this project.

During the last few years studies of different oxygenated PUFA metabolites has shown a number of interesting biological activities. The biological properties of compounds **16**, **31** and **36** will be tested in a  $\text{Ca}^{2+}$  immobilizing assay.<sup>24</sup> This will provide an indication of the compounds anti-inflammatory properties *in vitro*.

## Forkortelser

AA	(5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraensyre
ACP	Acyl bæreprotein ("Acyl Carrier Protein")
CBS	Corey-Bakshi-Shibaka katalysator
CoA	Coenzym A
COX	Cyklooksxygenase
d	Dublett
DBU	1,8-Diazabicykloundek-7-en
DHA	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-Dokosa-4,7,10,13,16,19-heksaensyre
DMP	Dess-Martin perjodinan
ee	Enantiomerisk overskudd
EPA	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Eikosa-5,8,11,14,17-pentaensyre
EPA-EE	(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-Etyl-eikosa-5,8,11,14,17-pentaenat
HPLC	Høytrykksvæskekromatografi
Hz	Hertz (frekvens)
IR	Infrarød
J	Koblingskonstant
LOX	Lipoksygenase
LTA <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	Leukotrien A <sub>4</sub>
LXA <sub>4</sub>	Lipoksin A <sub>4</sub>
LXB <sub>4</sub>	Lipoksin B <sub>4</sub>
m	Multipllett
Mar1	Maresin 1
NADPH	Nikotinamid adenine dinukleotid fosfat
NMR	Kjerne Magnetisk Resonans
NSAID	non-steroidal anti-inflammatorisk drug, eller ikke steroid baserte antiinflammatoriske medisiner
OXE	Oksoeikosanoid reseptor
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
Ph	Fenyl

PUFA	Flerumettet fettsyre ("Polyunsaturated Fatty Acid")
PD1	Protektin D1
R <sub>f</sub>	Retensjonsfaktor
R <sub>t</sub>	Romtemperatur
RvE1	Resolvin E1
RvE2	Resolvin E2
RvD1	Resolvin D1
RvD2	Resolvin D2
s	Singlett
t	Triplett
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tynnsjikt-kromatografi ("Thin Layer Chromatography")
δ	Kjemisk skift
4-HDHE	(5 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> ,16 <i>Z</i> ,19 <i>Z</i> )-Hydroksy-5,7,10,13,16,19-dokosaheksaensyre
4-Okso-DHE	(5 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> ,13 <i>Z</i> ,16 <i>Z</i> ,19 <i>Z</i> )-Okso-5,7,10,13,16,19-dokosaheksaensyre
5-HEDE	5-Hydroksyeikosanoid dehydrogenase
5-HEPE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> ,17 <i>Z</i> )-5-Hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaenoiksyre
5-HETE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> )-5-Hydroksy-6,8,11,14-eikosatetraenoiksyre
5-HPEPE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> ,17 <i>Z</i> )-5-Hydroperoksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre
5-HPETE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> )-5-Hydroperoksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre
5-Okso-EPE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> ,17 <i>Z</i> )-5-Okso-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre
5-Okso-ETE	(6 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> )-5-Okso-6,8,11,14-eikosatetraensyre

## **Generell bemerkning**

IUPAC-nomenklatur er i størst mulig grad brukt for navnsetting av forbindelser. Teksten er i "Times New Roman", skriftstørrelse 12 og linjeavstand 1,5. Strukturer og skjemaer er tegnet i ChemiBioDraw Ultra 12.0.3. Figurene i denne oppgaven er tegnet på enkel måte og representerer ikke molekylens romlige orientering.



## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Grafisk sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IV</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>V</b>
<b>Generelle bemerkninger</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Fettsyrer</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 <math>\omega</math>-3 og <math>\omega</math>-6 flerumettede fettsyrer</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Biosyntese av fettsyrer</b> .....	<b>2</b>
<b>1.4 Fettsyremetabolisme</b> .....	<b>5</b>
1.4.1 $\beta$ -oksidasjon.....	6
1.4.2 $\omega$ -oksidasjon.....	7
1.4.3 $\alpha$ -oksidasjon.....	8
<b>1.5 Autooksidasjon av PUFA'er</b> .....	<b>8</b>
<b>1.6 Helseeffekter av <math>\omega</math>-3 og <math>\omega</math>-6 polyumettede fettsyrer</b> .....	<b>9</b>
<b>1.7 Eikosanoider</b> .....	<b>9</b>
<b>1.8 Lipid metabolitter fra EPA, DHA og AA</b> .....	<b>9</b>
<b>1.9 Cyklooksygenase</b> .....	<b>11</b>
<b>1.10 Lipoksygenase og lipoksygenase metabolitter</b> .....	<b>11</b>
<b>1.11 Oksygenerte PUFA'er</b> .....	<b>12</b>
<b>1.12 Syntese av PUFA'er</b> .....	<b>13</b>
1.12.1 Syntese av PUFA'er med acetylenkjemii.....	13
1.12.2 Syntese av PUFA'er med Wittig reaksjonen.....	14
1.12.3 Dehydrohalogenering <i>via</i> eliminasjonsreaksjon.....	14
1.12.4 Bruk av EPA til syntese av PUFA'er.....	15
<b>1.13 Kjemisksyntese av oksygenerte PUFA metabolitter</b> .....	<b>16</b>
1.13.1 Syntese av oksygenerte AA metabolitter.....	16
<b>1.14 Syntesemetoder</b> .....	<b>17</b>
1.14.1 Oksidasjon med DMP.....	17
1.14.2 Stereoselektiv reduksjon av ketoner.....	18
1.14.2.1 Stereoselektiv reduksjon av ketoner med CBS katalysator.....	18
1.14.2.2 Noyoris Ru reduksjon.....	19
<b>1.15 High-performance liquid chromatography- HPLC</b> .....	<b>20</b>
<b>1.16 Mosher ester analyse av kirale forbindelser</b> .....	<b>20</b>
<b>1.17 Mål for oppgaven</b> .....	<b>21</b>

<b>2. Resultat og diskusjon</b> .....	<b>23</b>
2.1 Syntese av tetrahydro-6-((3Z, 6Z, 9Z, 12Z)-1-jodpenta-dekatetranyl)- pyran-2-on (23).....	23
2.2 Syntese av 6-((1E,3Z,6Z,9Z,12Z)-penta-deka-1,3,6,9,12-pentaen-1-yl)tetrahydro- 2H-pyran-2-on (35).....	24
2.3 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5- 5-HEPE, 16).....	25
2.4 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-hydroks-6,8,11,14,17- eikosapentaenoat (31).....	25
2.5 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-okso-6,8,11,14,17- eikosapentaenoat (36).....	26
2.6 Syntese av Mosher estere 37 og 38.....	27
<b>3. Oppsummering og veien videre</b> .....	<b>31</b>
<b>4. Konklusjon</b> .....	<b>31</b>
<b>5. Eksperimentelt</b> .....	<b>32</b>
5.1 Generelt.....	32
5.2 Syntese av tetrahydro-6-((3Z, 6Z, 9Z, 12Z)-1-jodpenta-dekatetranyl) pyran-2-on(23).....	33
5.3 Syntese av 6-((1E,3Z,6Z,9Z,12Z)-penta-deka-1,3,6,9,12-pentaen-1-yl)tetrahydro- 2H-pyran-2-on (35).....	37
5.4 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5- 5-HEPE, 16).....	43
5.5 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-hydroks-6,8,11,14,17- eikosapentaenoat (31).....	47
5.6 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-okso-6,8,11,14,17- eikosapentaenoat (36).....	54
5.7 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-(((S)-3,3,3-trifluor-2-metoksi-2- fenylpropanoyl)oksi)-6,8,11,14,17-eikosapenaenoat (37) og (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)- metyl-5-(((R)-3,3,3-trifluor-2-metoksi-2-fenylpropanoyl)oksi)-6,8,11,14,17- eikosapenaenoat (38).....	59
<b>6. Vedlegg</b> .....	<b>68</b>
<b>7. Referanser</b> .....	<b>70</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 Fettsyrer

Fettsyrer kjennetegnes ved at de består av en lang hydrokarbonkjede med en syregruppe i enden. Lengden på disse karbonkjedene kan variere fra 4-36 karbonatomer. Fettsyrer inneholder, med få unntak, nesten alltid et partall av karbonatomer og er uforgrenede. Dette kan forklares ved at byggesteinen i fettsyresyntesen er acetyl-coenzym A. Den alifatiske delen av fettsyren kan enten være umettet eller mettet. En mettet fettsyre inneholder ikke noen dobbeltbindinger, mens en umettet fettsyre vil inneholde én eller flere dobbeltbindinger, eller én eller flere trippelbindinger. Dobbeltbindingene forekommer med enten *E* (trans) eller *Z* (cis) konfigurasjon. De fleste naturlig forekommende umettede fettsyrene forekommer med *Z*-konfigurasjonen. Fettsyrer med flere enn en dobbeltbinding kalles flerumettede fettsyrer (polyumettede fettsyrer-PUFA'er). Disse dobbeltbindingene kan være ukonjugerte eller konjugerte. Ukonjugerte dobbeltbindinger er separert av en metylengruppe, mens de konjugerte dobbeltbindingene ikke er det.

## 1.2 $\omega$ -3 og $\omega$ -6 flerumettede fettsyrer

Fettsyrer hører inn under klassen lipider, som gjenkjennes ved at de er upolare, hydrofobiske og amfipatiske. Dette betyr i hovedsak at de er uløselige i polare løsningsmidler som for eksempel vann. Nylig er det kommet en annen definisjon av lipider basert på biosyntesen av lipider, ved at de dannes helt eller delvis fra karbanionbaserte kondensasjonsreaksjoner av tioestere, som for eksempel Claisen-kondensasjon av acetyl-CoA, og/eller fra karbokation baserte kondensasjoner av isopren-enheter.<sup>1</sup>

Lipider fungerer som energilager, isolasjon og signalmolekyler i levende organismer. De spiller også en viktig rolle i transport og opptak av de fettløslige vitaminene A, E, D og K.<sup>2</sup> Cellemembranen som omslutter cellens organeller og skiller celle fra omgivelsene består, hovedsakelig av lipider.<sup>2</sup>

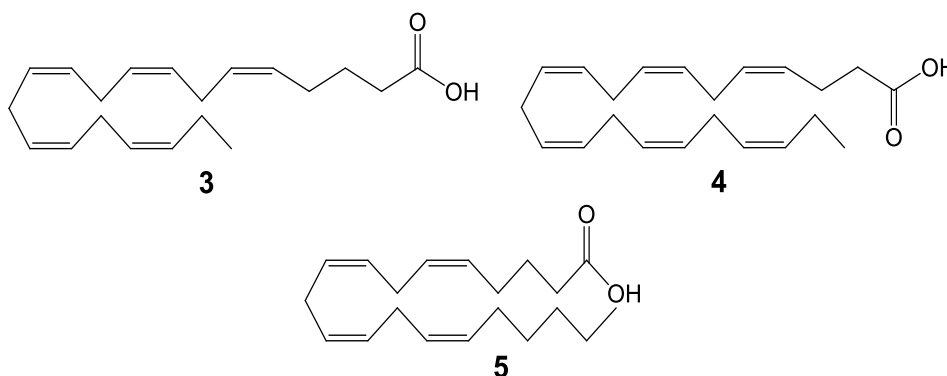
Polyumettede fettsyrer (PUFA'er) kan igjen deles inn i fire hovedgrupper,  $\omega$ -3,  $\omega$ -6,  $\omega$ -7 og  $\omega$ -9. Her klassifiseres fettsyrene i forhold til hvilken posisjon dobbeltbindingen nærmest metylenden,  $\omega$ -enden, har. Naturlig forekommende  $\omega$ -3 og  $\omega$ -6 PUFA'er har blitt mye studert innenfor medisinsk, kjemisk og biologisk forskning. Utgangspunktet for alle  $\omega$ -3 og  $\omega$ -6 fettsyrer er henholdsvis  $\alpha$ -linolensyre (en  $\omega$ -3 fettsyre, **1**) og linolsyre ( $\omega$ -6 fettsyre, **2**).<sup>1</sup> Disse fettsyrene regnes som essensielle fettsyrer og må inntas gjennom kosten da de ikke

biosyntetiseres i menneskekroppen.<sup>1</sup> Dette skyldes at mennesker ikke har enzymene  $\Delta^{12}$ - og  $\Delta^{15}$ - desaturase, som er nødvendig for biosyntesen av både linolsyre og linolensyre.<sup>1</sup>



**Figur 1.1.** Strukturen til  $\omega$ -3 fettsyren  $\alpha$ -linolensyre og  $\omega$ -6 fettsyren linolsyre.

To meget interessante fettsyrer innen  $\omega$ -3 gruppen er (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eikosa-5,8,11,14,17-pentaensyre (EPA, **3**) og (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-dokosa-4,7,10,13,16,19-heksoensyre (DHA, **4**). Disse fettsyrene finnes det mye av i fiskeolje og er mye omtalt i media på grunn av sine helsebringende effekter.<sup>3</sup>  $\omega$ -6 Fettsyren arachidonsyre (AA, **5**) spiller også en viktig biologisk rolle. Alle tre fettsyrene **3-5** omtales som essensielle, se Figur 1.2

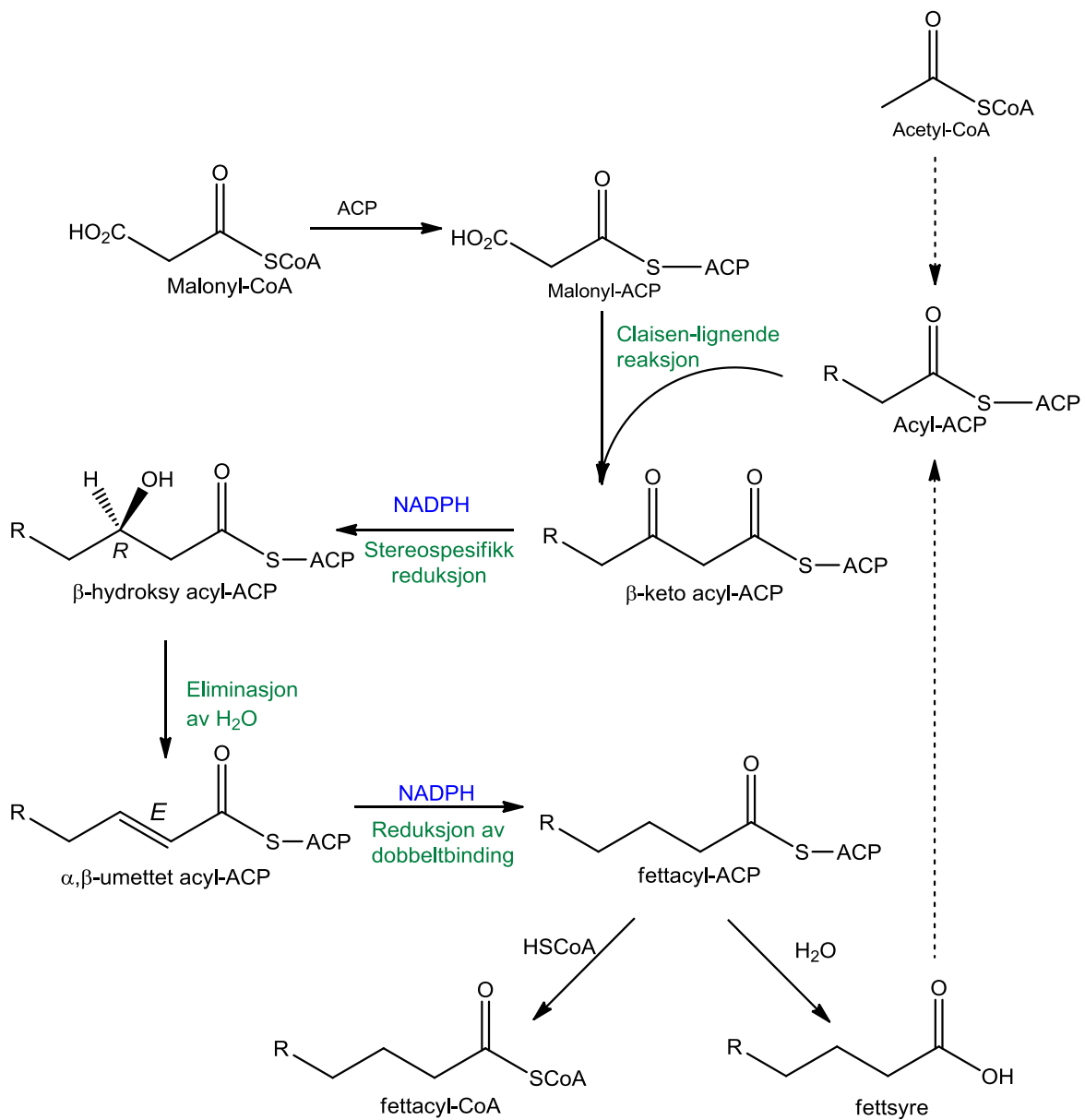


**Figur 1.2.** Kjemisk struktur av de essensielle  $\omega$ -3 fettsyrene EPA (**3**) og DHA (**4**), samt  $\omega$ -6 fettsyren AA (**5**).

### 1.3 Biosyntese av fettsyrer

Biosyntesen av mettede fettsyrer skjer *via* acetat-biosynteseveien fra acetyl-CoA enheter,<sup>1</sup> skjema 1.1. Malonyl-CoA og acetyl-CoA omdannes til tioestere med et "acyl carrier" protein (ACP) før de kondenseres til en  $\beta$ -keto acyl-ACP ved en Claisen-liknende reaksjon. Videre skjer en stereospesifikk reduksjon av karbonylgruppen på  $\beta$ -karbonet ved hjelp av NADPH til en hydroksylgruppe. Denne hydroksylgruppen undergår eliminasjon av vann, og det dannes en *E*-dobbeltbinding, som ved hjelp av NADPH reduseres til en enkeltbinding. Produktet av

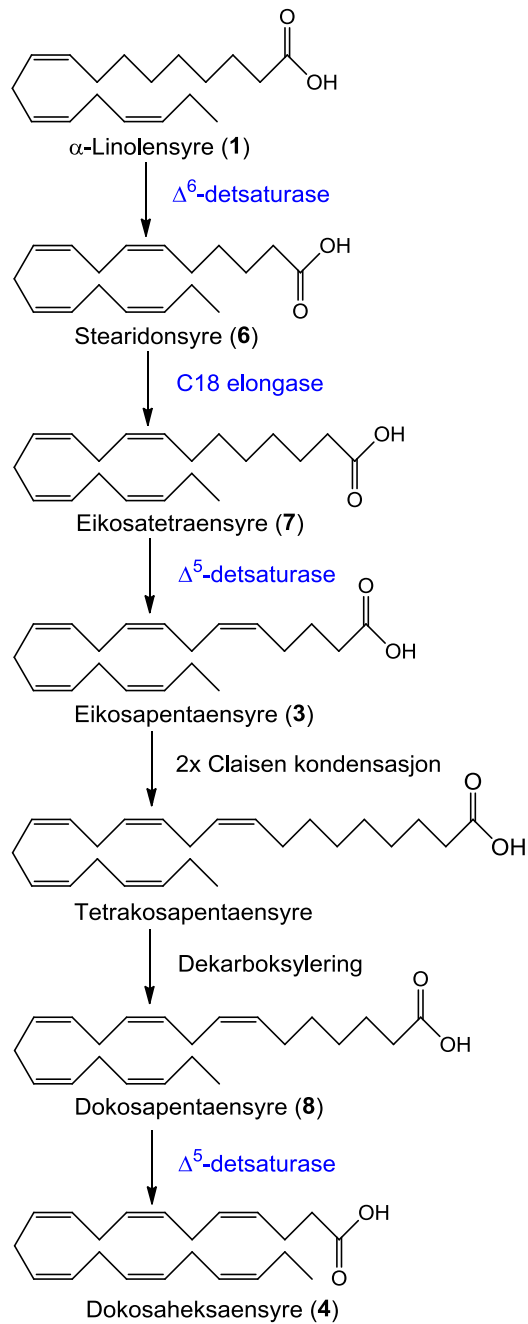
denne syntesen blir en mettet karbonkjede med acyl-ACP, som enten kan hydrolyseres til fettsyren eller omdannes til acyl-CoA, eventuelt kan den reagere med en acetyl-CoA for å danne lengre kjeder. For hver syklus vil karbonkjeden øke med to karbonatomer. Fettsyresyntase-enzymet katalyserer de fleste trinnene i denne biosyntesen.



**Skje ma 1.1.** Biosyntese av mettede fettsyrer.<sup>1</sup>

Hos hovedandelen av organismer starter syntesen av umettede fettsyrer ved innføring av en dobbeltbinding med Z-konfigurasjon mellom karbon ni og ti på den allerede biosyntetiserte mettede fettsyren. Denne dobbeltbindingen dannes ved en *syn*-eliminering av to vicinale *pro-R* hydrogenatomer.<sup>1</sup> Dannelsen av dobbeltbindinger i fettsyrer katalyseres av desaturase-enzymet.<sup>1</sup> Pattedyr har desaturase-enzymet som vil kunne innføre dobbeltbindinger fra C-9 og mot karboksylsyreenden, mens planter har desaturase-enzymet som innfører dobbeltbindinger mot metylgruppen.<sup>1</sup> Dette er grunnen til at  $\omega$ -3 og  $\omega$ -6 fettsyrer omtales som essensielle.

$\omega$ -3 og  $\omega$ -6 PUFA'er biosyntetiseres henholdsvis fra  $\alpha$ -linolensyre (1) og linolsyre (2). Biosyntesen av EPA (3) og DHA (4) fra linolensyre (1) er vist i Skjema 1.2.



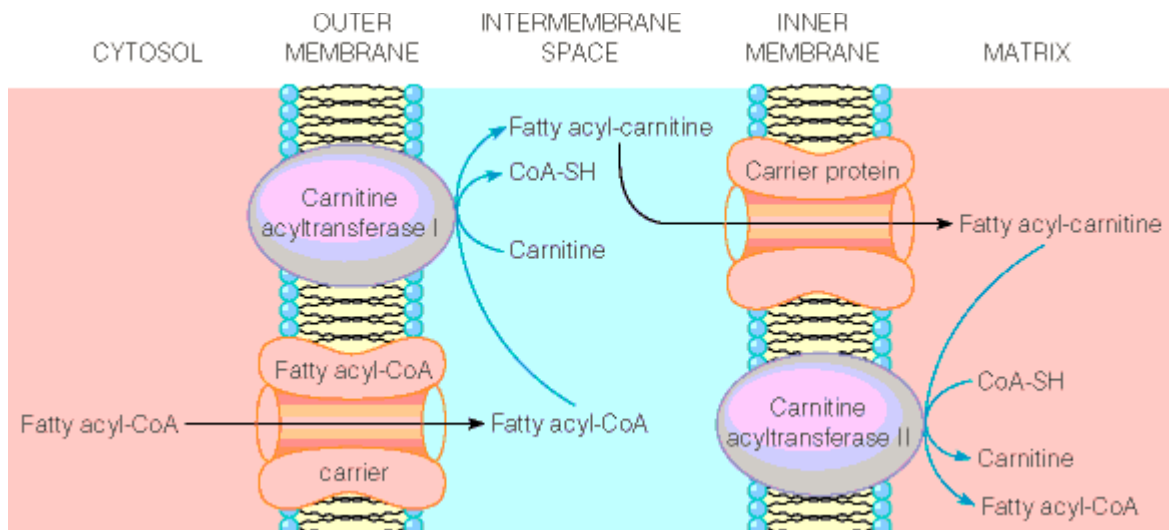
**Skjema 1.2.** Biosyntese av EPA (3) og DHA (4). Enzymene er merket i blått.<sup>4</sup>

### 1.4 Fettsyremetabolisme

Metabolisme av fettsyrer skjer ved en rekke katabolske prosesser. Det finnes flere ulike prosesser for nedbrytningen av fettsyrer, men den mest vanlige er  $\beta$ -oksidasjon.

### 1.4.1 $\beta$ -oksidasjon

$\beta$ -Oksidasjon er en enzymatisk nedbryting av fettsyrer som foregår på innsiden av mitokondrienes matriks. De frie fettsyrene aktiveres til fettsyre acyl-CoA før de transporteres inn i mitokondriens matriks som vist i figur 1.3.<sup>2</sup>

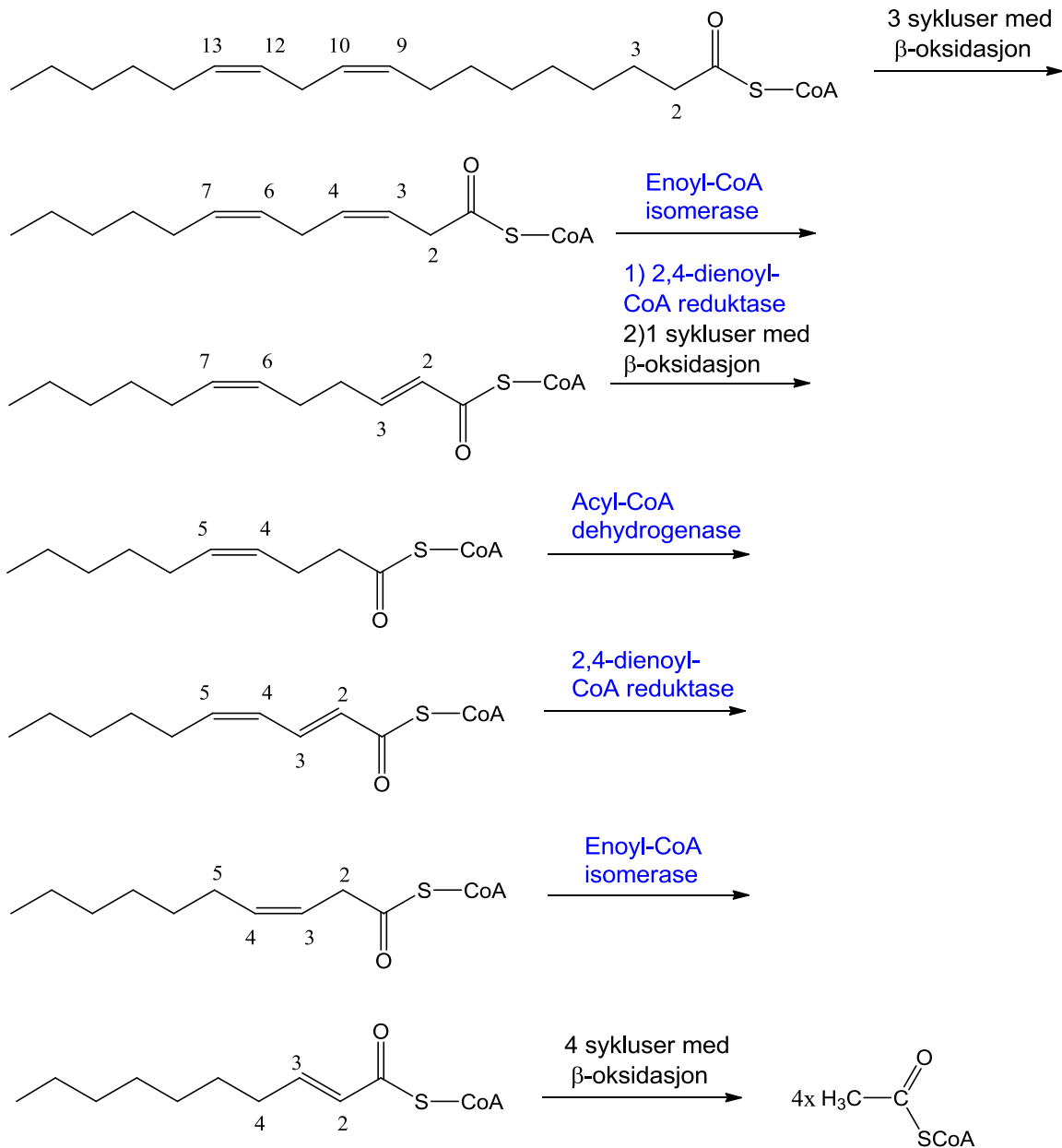


**Figur 1.3.** Illustrasjon av transporten av fettsyrer inn mitokondrie matriksen. Dette er kjent som karnitin-syklusen.<sup>2</sup>

Inne i matriksen foregår  $\beta$ -oksidasjonen, hvor det frigis to acetyl-CoA enheter per runde. Navnet  $\beta$ -oksidasjon kommer av at reaksjonen starter med oksidasjon av  $\beta$ -karbonet. Hvis  $\beta$ -karbonet er sterisk hindret, vil oksidasjonen skje ved  $\alpha$ -karbonet og denne prosessen kalles da naturlig nok  $\alpha$ -oksidasjon.<sup>5</sup>

PUFA'er kan også gjennomgå  $\beta$ -oksidasjon, men det krever et spesifikt enzymesystem som ikke er tilstede i oksidasjonen av mettede fettsyrer. Disse enzymene katalyserer Z-dobbelbindingen til E-dobbelbinding slik at den kommer i riktig posisjon, slik at  $\beta$ -oksidasjonen kan fortsette, som er illustrert i skjema 1.3.<sup>2</sup> Denne prosessen gjentas ved hver Z-dobbelbinding og når det ikke er flere av disse dobbelbindingene, vil  $\beta$ -oksidasjonen skje på vanlig vis.





**Skjema 1.3.** Oksidasjon av en polyumettet fettsyre (linolsyre), enzymene som deltar er merket i blått.<sup>2</sup>

### 1.4.2 $\omega$ -oksidasjon

Metabolisme av fettsyrer kan også foregå ved  $\omega$ -oksidasjon.<sup>6</sup> Ved denne prosessen blir  $\omega$ -karbonet omgjort til en karboksylsyre *via* enzymatiske reaksjoner. Det vil da være en karboksylsyregruppe i begge endene av molekylet som kan aktiveres med coenzym-A. Deretter kan molekylet transporteres inn i mitokondrien hvor det kan gjennomgå normal  $\beta$ -oksidasjon.

### 1.4.3 $\alpha$ -oksidasjon

Fettsyrer som er blokkert i syre-enden for eksempel ved at det sitter en metylgruppe festet til  $\beta$ -karbonatomet gjennomgår ikke  $\beta$ -oksidasjon på grunn av den steriske hindringen.<sup>7</sup> Siden  $\beta$ -karbonatomet er substituert, skjer oksidasjonen på  $\alpha$ -karbonatomet i stedet etterfulgt av avspalting av et karbon i form av formyl-CoA, som igjen brytes ned til format og karbondioksid. Prosessen er katalysert av enzymer. Deretter vil fettsyren bli oksidert videre av  $\beta$ -oksidasjon når fettsyren ikke inneholder den steriske hindringen lenger.

### 1.5 Autooksidasjon av PUFA'er

Autooksidasjon er en oksidasjon av organiske forbindelser som skjer ved tilgang på atmosfærisk oksygen. Flere av oksidasjonene som skjer i naturen som forråtnelse og harskning av fett, involverer autooksidasjoner. Denne formen for oksidasjon skjer *via* en rekke radikal-kjedereaksjoner som kan deles inn i tre trinn, initiering, kjedereaksjoner og terminering.<sup>26</sup> Trinnene er som følger:

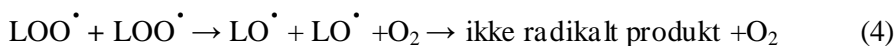
Initiering:



Kjedereaksjoner:



Terminering:



Lipidradikalet ( $\text{L}^\cdot$ ) er ofte avledet fra en umettet fettsyre ved reaksjon 1, initieringen. Dette radikalet reagerer hurtig med oksygen og det vil da bli dannet et peroksyldradikal ( $\text{LOO}^\cdot$ ) (reaksjon 2). Videre kan peroksyldradikalet plukke opp et allylisk hydrogen fra en PUFA (LH) slik at det dannes et hydroksyperoksid (LOOH) og et lipidradikal ( $\text{L}^\cdot$ ) (3). Termineringen av denne prosessen skjer i hovedsak som vist i reaksjon 4 og produktet vil ikke lengre være et radikal.

## 1.6 Helseeffekter av $\omega$ -3 og $\omega$ -6 polyumettede fettsyrer

Det er forsket mye på de biologiske rollene til  $\omega$ -3 og  $\omega$ -6 PUFA'ene og deres betydning innenfor helse og behandling av sykdommer.<sup>8,9</sup> Det har vist seg at spesielt  $\omega$ -3 PUFA'ene EPA (3) og DHA (4) har antiinflammatoriske effekter. De kan derfor virke forebyggende og brukes i behandling mot flere kroniske sykdommer som kardiovaskulære sykdommer,<sup>8</sup> diabetes,<sup>10</sup> kreft,<sup>11</sup> mental helse<sup>12</sup> og for utviklingen av syn og hjernefunksjon hos spedbarn.<sup>9</sup> Mennesker kan ikke biosyntetisere disse fettsyrene selv, så det er derfor viktig å ha et kosthold med regelmessig inntak av disse to  $\omega$ -3 PUFA'ene. Det er også kjent at  $\omega$ -6 fettsyren AA er involvert i biosyntese av antiinflammatoriske lipid-mediatorer.<sup>16</sup>

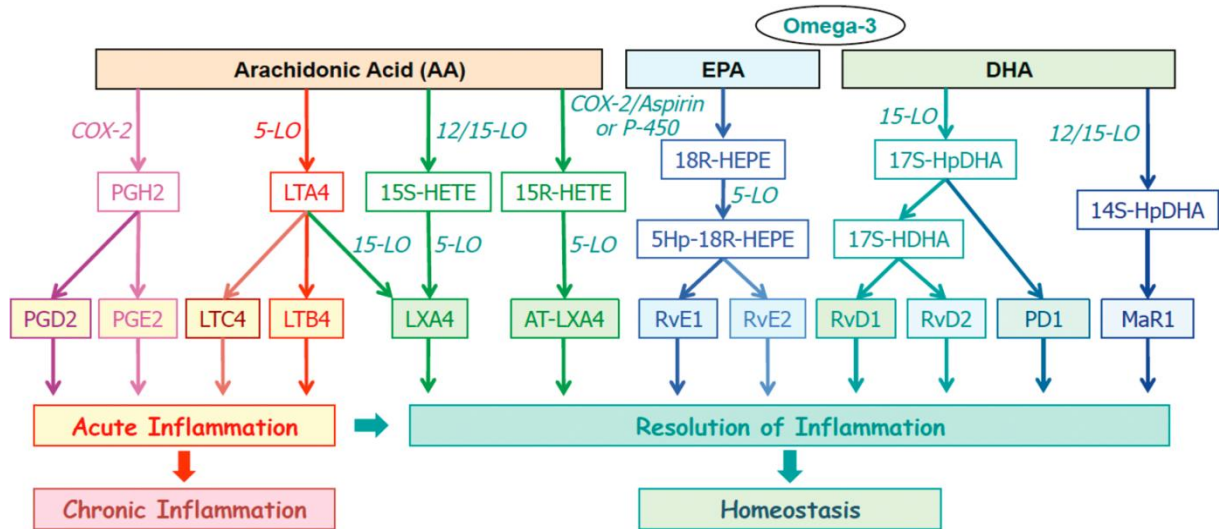
Det har vist seg at det er nødvendig med en balanse mellom  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 forholdet i kroppen. Et høyt nivå av  $\omega$ -6 fettsyrer i forhold til  $\omega$ -3 fettsyrer kan gi negative helseeffekter som kardiovaskulære sykdommer, diabetes, kreft, fedme, autoimmune sykdommer, leddgikt, astma og depresjon,<sup>13-15</sup> mens et omvendt forhold vil som tidligere nevnt kunne virke forebyggende mot disse sykdommene.

## 1.7 Eikosanoider

Eikosanoider er metabolitter som dannes gjennom enzymatisk oksidasjon av de to C20 fettsyrene, arachidonsyre og eikosapentaensyre. Flere av disse metabolittene deltar i prosesser i kroppen som skyldes inflammasjon. Prostaglandiner, prostasykliner, tromboksaner og leukotriener regnes tradisjonelt som de fire familiene innenfor eikosanoidene, men flere nye forbindelser blir stadig oppdaget og strukturoppklart.<sup>16</sup>

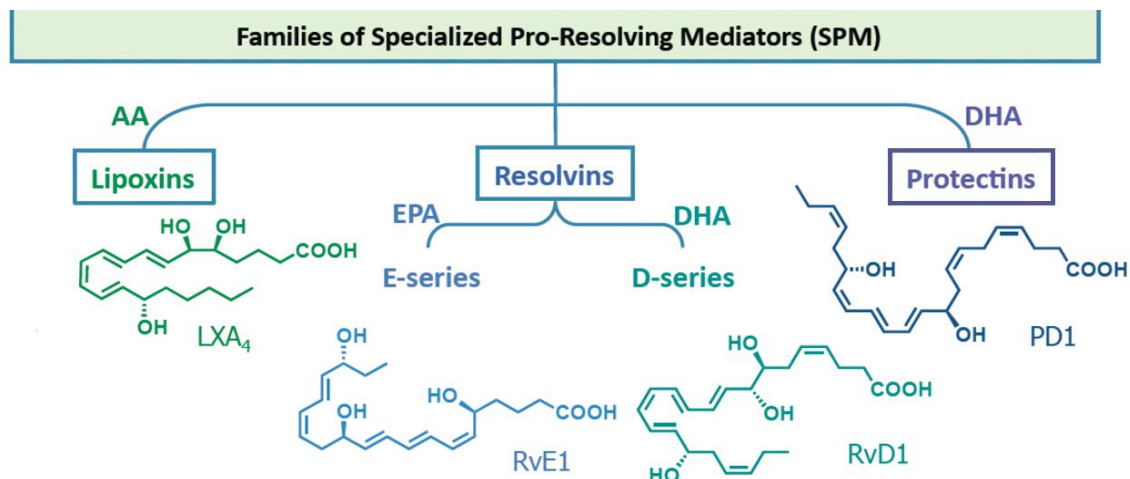
## 1.8 Lipidmetabolitter fra EPA, DHA og AA

$\omega$ -6 Fettsyren AA kan virke inflammatorisk og antiinflammatorisk. Via enzymene cyklooksygenase (COX) og lipoksygenase (LOX) kan det dannes prostaglandiner (for eksempel PGD<sub>2</sub> og PGE<sub>2</sub>), leukotriener (for eksempel LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub> og LTC<sub>4</sub>) og lipoksiner (LXA<sub>4</sub> og LXB<sub>4</sub>) fra AA, se figur 1.4.<sup>16</sup>



**Figur 1.4.** Biosyntetiske kaskader for dannelse av lipid metabolitter fra EPA, DHA og AA.<sup>16</sup>

Prostaglandinene og leukotrienene vil ha en proinflammatorisk effekt, mens lipoksinene vil ha en antiinflammatorisk effekt. Når det kommer til metabolittene som stammer fra  $\omega$ -3 fettsyrene EPA og DHA, er det vist at disse i hovedsak innehar antiinflammatoriske effekter. Serhan og medarbeidere<sup>16</sup> har identifisert en rekke EPA og DHA metabolitter, som for eksempel RvE1 og RvE2, som dannes fra EPA. D-klasse resolvinene, som for eksempel RvD1 og RvD2, protektin (PD1) og maresin (MaR1), som alle dannes fra DHA. De kjemiske strukturene til noen av disse antiinflammatoriske molekylene er vist i figur 1.5.



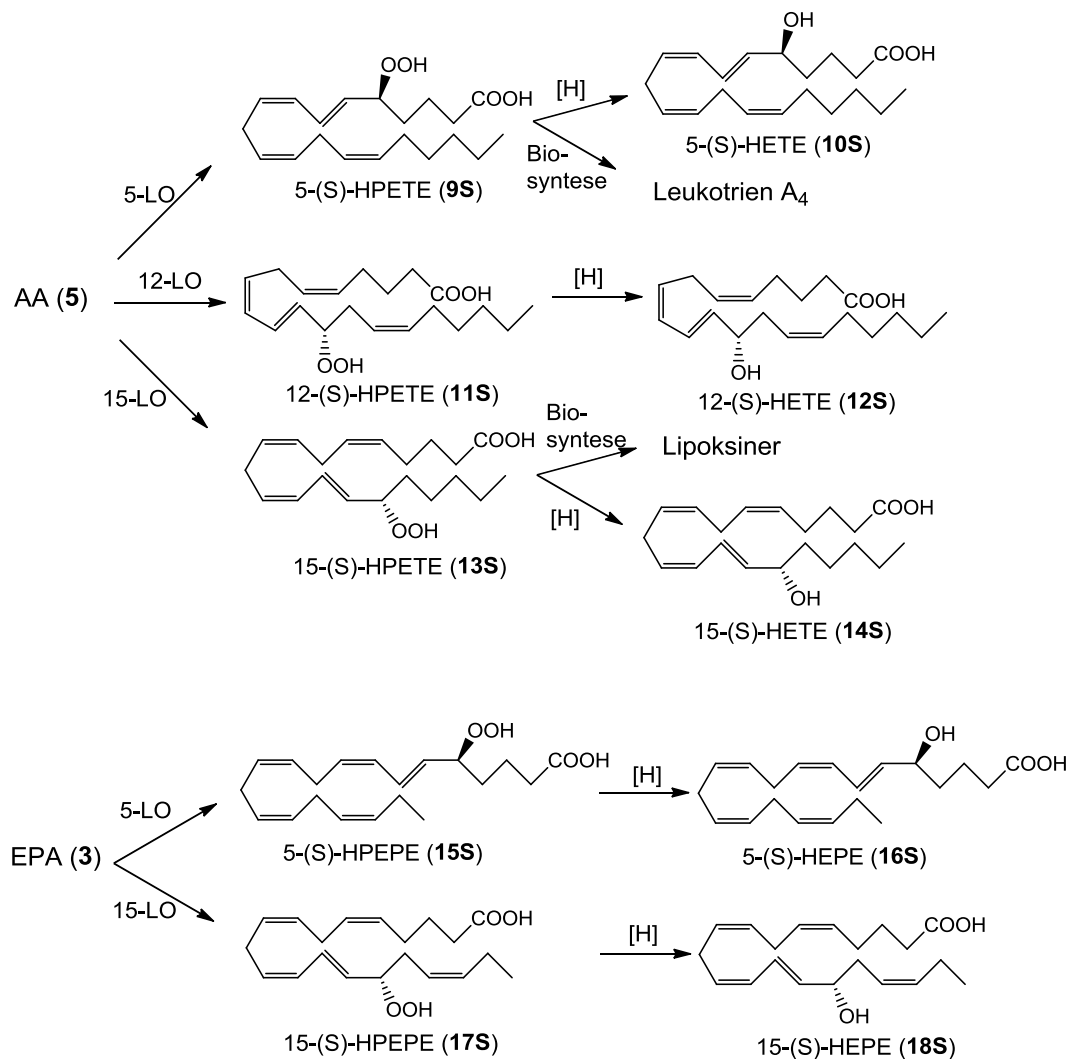
**Figur 1.5.** Kjemisk struktur til de ulike lipid metabolitter med antiinflammatorisk effekt.<sup>16</sup>

## 1.9 Cyklooksygenase

Cyklooksygenase (COX) er et enzym som deltar i dannelsen av blant annet prostaglandiner. COX 1 finnes i de fleste cellene hos pattedyr og syntetiseres kontinuerlig, mens COX 2 syntetiseres som en respons på inflammasjon.<sup>16</sup> Disse enzymene har identisk enzymatisk funksjon. Det finnes to aktive seter i COX enzymet. Det ene kalles cyklooksygenase, her sykliseres AA og en hydroperoksygruppe dannes på karbon 15 som gir prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). Det andre aktive setet kalles peroksidase, i dette setet reduseres hydroperoksygruppen til en hydroksylgruppe som gir prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).<sup>17-20</sup> Medisiner som aspirin og ibuprofen (nonsteroidal anti-inflammatory drugs- NSAIDs) kan inhibere COX og dermed lindre symptomer på betennelse og smerter.<sup>21</sup>

## 1.10 Lipoksygenase og lipoksygenase metabolitter

Lipoksygenaser tilhører enzymklassen som katalyserer stereospesifikk addisjon av molekylært oksygen til polyumettede fettsyrer. Hovedsakelig er lipoksygenase enzymene aktive i cellene som utgjør immunsystemet. 5-Lipoksygenase (5-LO) vil addere molekylært oksygen på karbonatom nummer fem, slik at det dannes en hydroperoksidgruppe ved denne,<sup>22</sup> skjema 1.4.<sup>23</sup> Fra AA vil det kunne dannes (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-5-(*S*) hydroperoksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (5-(*S*)-HPETE, **9S**) som er utgangspunktet for syntese av leukotriener og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-5-(*S*)-hydroksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (5-(*S*)-HETE, **10S**). 12- og 15-Lipoksygenase vil derimot kunne danne C-O bindinger på henholdsvis karbon 12 og 15. AA vil av disse enzymene omdannes til (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-12-(*S*)-hydroperoksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (12-(*S*)-HPETE, **11S**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-15-(*S*)-hydroperoksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (15-(*S*)-HPETE, **13S**). Disse produktene kan deretter reduseres til (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-12-(*S*)-hydroksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (12-(*S*)-HETE, **12S**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*)-15-(*S*)-hydroksy-6,8,11,14-eikosatetraensyre (15-(*S*)-HETE, **14S**). 15-(*S*)-HPETE kan gjennom videre biosyntese også omdannes til lipoksin A<sub>4</sub> og B<sub>4</sub>. Lipoksygenasene aksepterer også EPA som substrat, som vil kunne gi blant annet (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-5-(*S*)-hydroperoksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5-(*S*)-HPEPE, **15S**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-15-(*S*)-hydroperoksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (15-(*S*)-HPEPE, **17S**). 5-(*S*)-HPEPE og 15-(*S*)-HPEPE gir opphav til to interessante EPA metabolitter, som for eksempel (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-5-(*S*)-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5-(*S*)-HEPE, **16S**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-5-(*S*)-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (15-(*S*)-HEPE, **18S**). Dett er skjematisk vist i skjema 1.4.



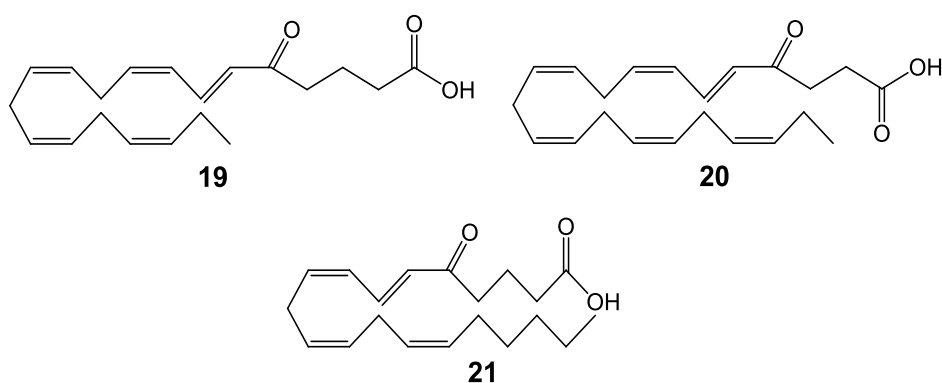
**Skjema 1.4.** Illustrasjon av dannelsen av de ulike LOX produktene fra EPA og AA.<sup>23</sup>

### 1.11 Oksygenerte PUFA'er

En oksygeneret AA metabolitt som også har vist antiinflammatorisk effekt er 5-okso-ETE ((6E,8Z,11Z,14Z)-5-okso-6,8,11,14-eikosatetraensyre, **21**).<sup>24</sup> Dette molekylet produseres i cellene som er koblet til immunforsvaret og er et produkt av oksidasjonen av 5-HETE (et 5-LO produkt, **10S**) via 5-hydroksyeikosanoid dehydrogenase (5-HEDE)<sup>24</sup>. 5-(S)-HEPE (**16**) er en metabolitt fra EPA og vil også aksepteres av 5-HEDE som substrat. Denne omdannes til 5-okso-EPE ((6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-5-okso-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre, **19**). Det er kjent at 5-okso-ETE vil abstrahere eosinofiler og neutrofiler.<sup>24</sup> Det er også påvist at 5-okso-EPE vil kunne fungere som en kjemoattraktant, men ikke i så sterk grad som 5-okso-ETE. En kjemoattraktant er kjemisk agent som induserer en organisme eller en celle (for eksempel leukocytter) å migrere mot det. Omsetningen av 5-okso-ETE skjer via en oksoeikosanoid reseptor (OXE reseptor).<sup>24</sup> Denne reseptoren hører til gruppe G<sub>i</sub> proteinkoblede reseptorer.

Det er trolig at 5-okso-EETE kan virke forebyggende mot astma og at det muligens kan benyttes som behandling for enkelte krefttyper.<sup>24</sup>

Det er tidligere gjort noen studier på hvorvidt enkelte EPA metabolitter kan virke forebyggende mot kardiovaskulære sykdommer<sup>25</sup> og diabetes,<sup>10</sup> men det kreves mer klinisk forskning for å kunne bekrefte påstandene. Det vil derfor være interessant å syntetisere racemisk og 5-(S)-HEPE (**16**), 5-okso-EPE (**19**) fra EPA og samt 4-HDHE og 4-okso-DHE (**20**) fra DHA. Disse kan benyttes i biologiske studier for å undersøke de mulige antiinflammatoriske effekter disse metabolittene kan inneha.



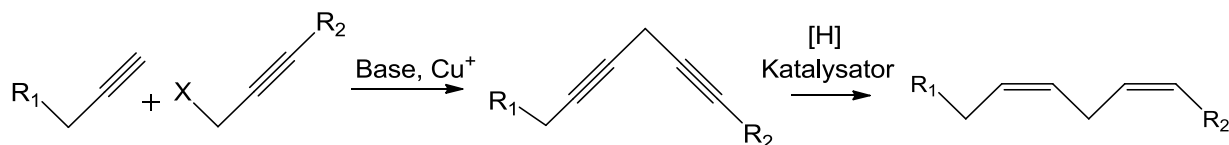
**Figur 1.7.** Strukturen til noen okso-metabolitter av EPA, DHA og AA.

## 1.12 Syntese av PUFA'er

Det er rapportert mange totalsynteser av PUFA'er. Under er noen syntese-strategier kort omtalt.

### 1.12.1 Syntese av PUFA'er med acetylenkjemi

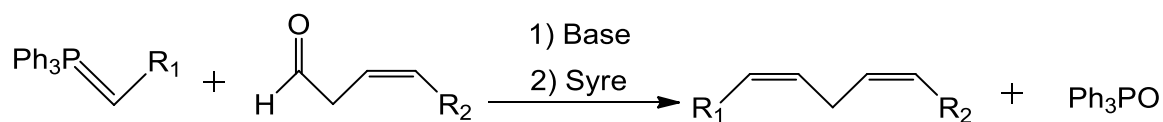
Ved denne syntese-strategien lages det ofte et ukonjugert polyynintermediat ved å reagere et propargylhalid med et terminalt alkyn. En *Z*-stereoselektiv semihydrogenering er en velkjent metode som gir *Z*-konfigurasjon ved hydrogenering av trippelbindinger. Det er utarbeidet mange metoder med ulike katalysatorer for *Z*-selektiv semihydrogenering av alkyn.<sup>27</sup> Ved ulike fremgangsmåter kan man oppnå ulike hydrokarbonkjeder med et bestemt antall ukonjugerte *Z*-bobbeltbindinger. Osbond og medarbeidere syntetiserte i 1959 AA *via* acetylenkjemi fra propargylalkohol.<sup>28</sup> DHA har også blitt syntetisert ved en lignende strategi.<sup>29</sup>



**Skjema 1.5.** Illustrasjon av acetylenkjemi og *Z*-steroselektiv semihydrogenering.

### 1.12.2 Syntese av PUFA'er med Wittig reaksjonen

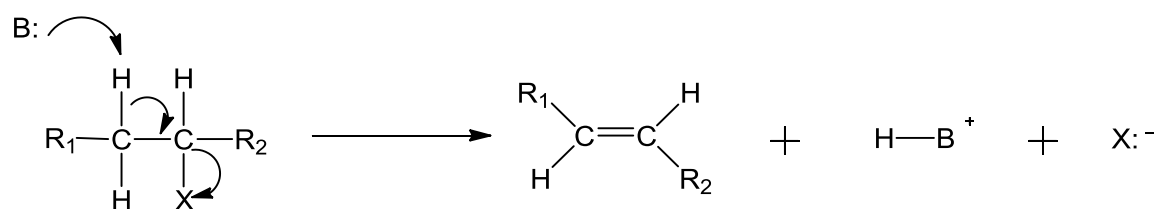
Wittig reaksjonen er en metode som ofte er brukt i synteser av PUFA'er. AA ble i 1988 syntetisert ved bruk av denne metoden av Viala og Santelli.<sup>30</sup> Ved en Wittig reaksjon reageres en karbonylforbindelse med et fosfoniumhalidsalt. Produktet som dannes fra denne reaksjonen kan ofte gi en blanding mellom *E*- og *Z*- isomerer, men det er til en viss grad mulig å manipulere reaksjonen mot en av disse isomerene ved passende reaksjonsbetingelsene eller valg av reagenser.<sup>31</sup>



**Skjema 1.6.** Reaksjonsskjema for Wittig-syntesen

### 1.12.3 Dehydrohalogenering via eliminasjonsreaksjon

Ved en eliminasjonsreaksjon fjernes elementer fra molekylet slik at det dannes en ny  $\pi$ -binding i molekylet. Katalysatorer i en slik reaksjon kan være en syre eller base. Eliminering av HX (X er et halogen) fra et molekyl kalles dehydrohalogenering og et eksempel på dette er vist i skjema 1.7. Denne metoden gir sjelden dobbeltbindinger med *Z*-konfigurasjon og brukes derfor nesten ikke i synteser av PUFA'er.

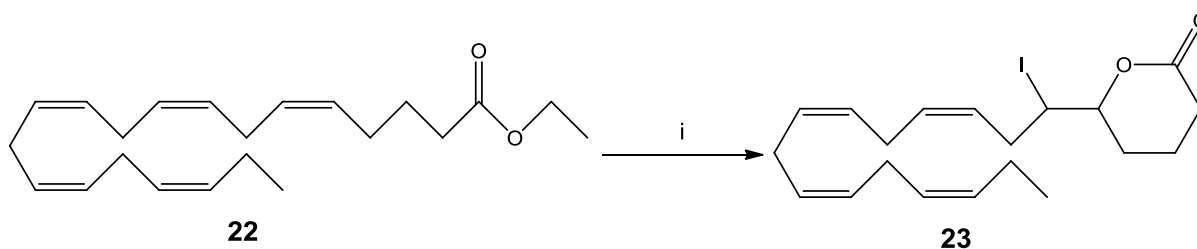


**Skjema 1.7.** Mekanismen for dehydrohalogenering ved eliminasjonsreaksjon.



#### 1.12.4 Bruk av EPA til syntese av PUFA'er

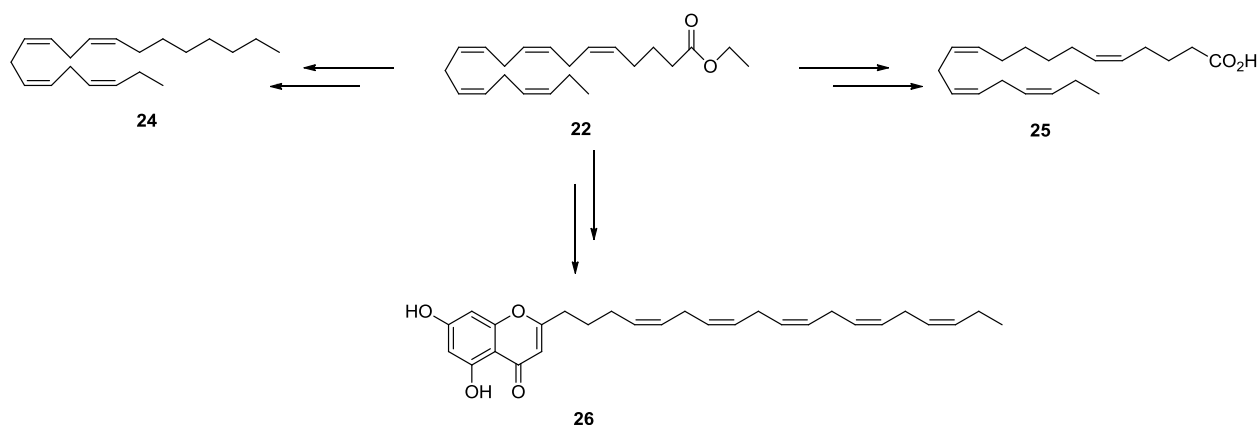
Pronova BioPharma AS er en norsk bedrift som utvinner etylesterene av EPA og DHA med høy renhetsgrad fra ubearbeidet fiskeolje. Jodlaktonisering av umettede fettsyrer er en godt kjent metode som benyttes for å manipulere fettsyrer ved å danne laktoner med typisk 4-6 atomer, men det er også mulig å lage molekyler med større ringstruktur.<sup>32</sup> Corey<sup>33</sup> har utarbeidet en metode for jodlaktonisering av PUFA'er. Senere har flere benyttet og videreutviklet denne metodikken. Under jodlaktoniseringen vil i hovedsak kun den dobbeltbindingen som er nærmest syregruppen i fettsyren reagere. Jodlaktonisering av EPA vil derfor gi et  $\delta$ -lakton, mens for DHA vil det bli dannet et  $\gamma$ -lakton.<sup>32</sup> Kinetisk sett er formasjonen av  $\gamma$ -lakton den mest gunstige, laktoniseringen av DHA vil derfor gå raskere enn for EPA.<sup>34</sup> Skjema 1.8 illustrerer en jodlaktonisering med etylesteren av EPA (EPA-EE, **22**) som utgangsmateriale.



i) a) LiOH, EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1), rt, 4 timer. b) HI, KHCO<sub>3</sub>, I<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, 0-4°C, 48 timer.

#### Skjema 1.8. Reaksjonslikning for jodlaktonisering av EPA-EE.<sup>32</sup>

Som nevnt er det flere som har utnyttet metoder hvor den kommersielt tilgjengelige fettsyren EPA eller dens etylester, er blitt benyttet som utgangsmateriale og deretter modifiseres. Langseter *et al.*<sup>34</sup> syntetiserte en komponent av kjønnsferomonet fra Emerald møll, molekyl **24**. Anwar og Hansen *et al.*<sup>35</sup> fremstilte det polyumettede kromonet **26** fra EPA etylester, mens Vik *et al.*<sup>36</sup> i syntesen av juniperonsyre (**25**) brukte EPA etylester. Dette er en metode som ofte forenkler syntesen av ulike fettsyrederivater i og med at stereokjemien i dobbeltbindingene i utgangsmaterialet bevarer.



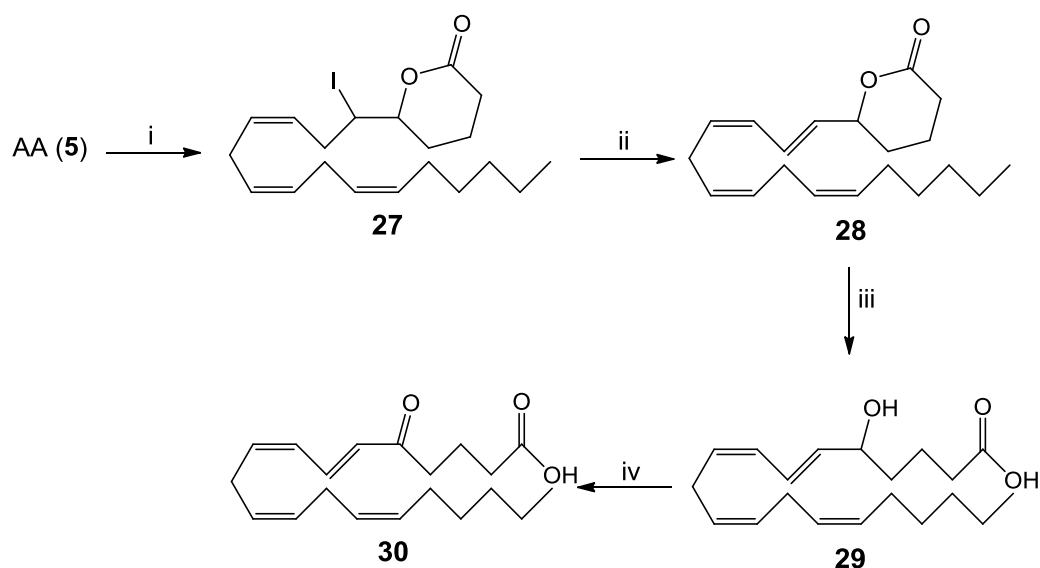
**Skjema 1.9.** Syntese av PUFA-naturprodukter med EPA-EE (22) som utgangsmateriale.<sup>34-36</sup>

### 1.13 Syntese av oksygenerte PUFA metabolitter

Som tidligere nevnt er det påvist at flere av de oksygenerte PUFA'ene spiller en viktig rolle innen biologien. For å kunne gjennomføre nødvendig biologisk testing er man avhengig av tilgang på store nok mengder av de aktuelle metabolittene i høyrenhetsgrad. Det er derfor nødvendig å utvikle effektive syntesemetoder for dette. Nedenfor er det blant annet nevnt en syntesemetode for AA metabolitten 5-okso-EETE.

#### 1.13.1 Syntese av oksygenerte AA metabolitter

Ulven *et al.*<sup>24</sup> har publisert en metode for å lage den oksygenerte AA metabolitten 5-okso-EETE. Første steg i metoden er jodlaktonisering av utgangsmaterialet AA (5), som gir jodlaktone 27. Videre behandles jodlaktone med DBU for å gi laktone 28, som transformeres til 5-HETE (29). Til slutt oksideres alkoholen i 5-HETE med Dess-Martin perjodinan (DMP) som gir 5-okso-EETE (30).



i) I<sub>2</sub>, kollidin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C i 14 timer. ii) DBU, benzen, 12 timer. iii) LiOH, H<sub>2</sub>O, THF, 8 timer. iv) DMP, pyridin, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3 timer.

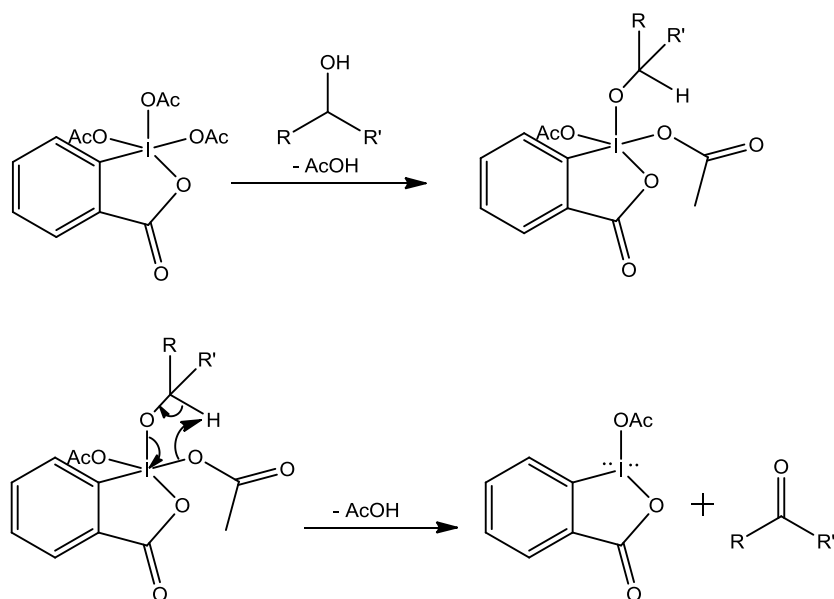
**Skjema 1.10.** Illustrasjon av syntesen av 5-okso-ETE fra arachidonsyre.<sup>24</sup>

## 1.14 Syntesemetoder i denne oppgaven

I syntesen av oksygenerte PUFA metabolitter er det noen ganger nødvendig med reduksjoner av f. eks. syrer eller estere og oksidasjoner av f. eks. alkoholer. En av utfordringene da er å finne metoder og reagenser som gjør dette uten å reagere med dobbeltbindingene eller metylen-gruppene mellom disse. Under er det nevnt noen eksempler på oksidasjons- og reduksjonsmetoder som er aktuelle for PUFA metabolitter som er del av denne oppgaven.

### 1.14.1 Oksidasjon med DMP

Dess og Martin<sup>37</sup> utviklet Dess-Marin perjodinan reagenset i 1983. Dette reagenset brukes til å oksidere primære alkoholer til aldehyder og sekundære alkoholer til ketoner, se skjema 1.11. Dette er en mild oksidasjonsmetode som har blitt mye benyttet spesielt etter at reagenset ble kommersielt tilgjengelig.



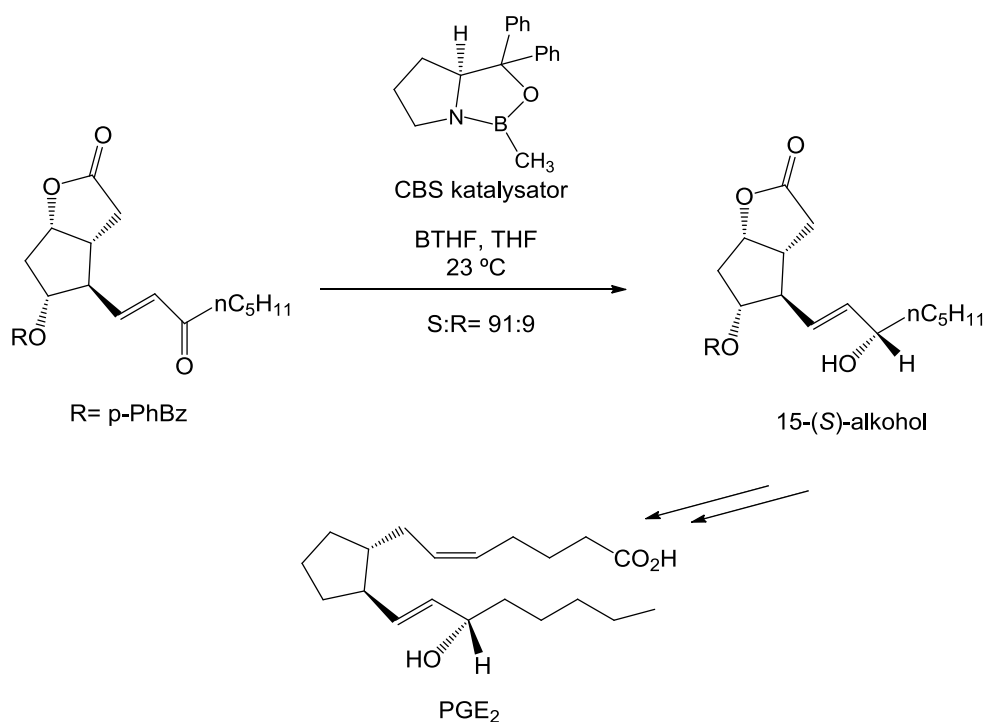
**Skjema 1.11.** Mekanismen for hovedtrinnet i oksidasjonen av en alkoholgruppe med DMP.

## 1.14.2 Stereoselektiv reduksjon av ketoner

Det finnes flere metoder for stereoselektiv reduksjon av ketoner. Under er to av de meste kjente reduksjonsmetoder omtalt.

### 1.14.2.1 Stereoselektiv reduksjon av ketoner med CBS katalysator.

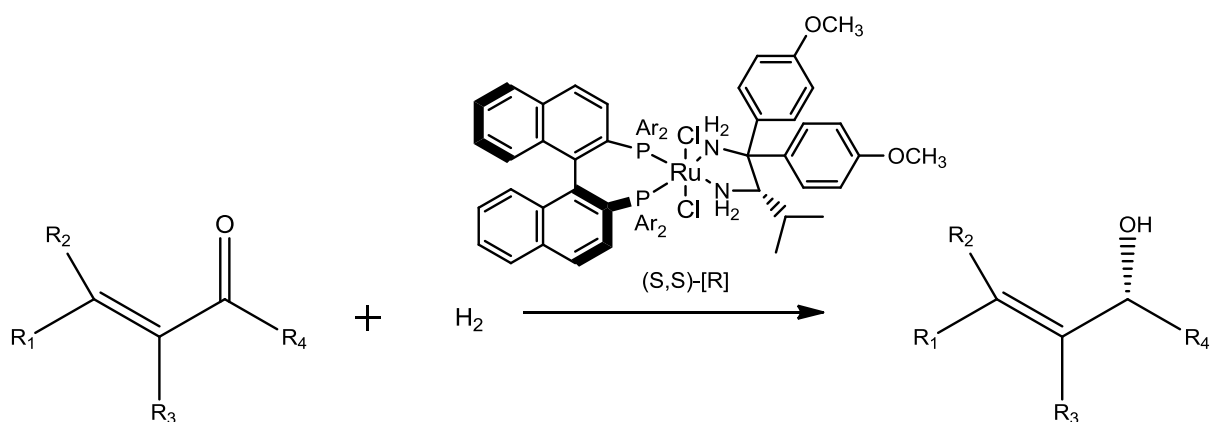
Dette er en metode som benyttes i enantioselektiv reduksjon av akirale ketoner til en kiral alkohol, med høyt enantiomerisk overskudd og i høye utbytter. Itsuno og medarbeidere<sup>38</sup> rapporterte i 1981 bruken av kirale alkoksyaaminboraner som katalysatorer for stereoselektive reduksjoner av ketoner, mens i dag brukes ofte den velkjente oksazaborolidin baserte CBS-katalysatoren, som ble utviklet av Corey og medarbeidere<sup>39</sup> i 1987. Det er en rekke eksempler på enantioselektiv CBS-reduksjoner, slik at dette er nå en veletablert metode som ofte benyttes i syntese av naturprodukter og enantiomert rene legemidler.<sup>40</sup>



**Skjema 1.12.** Bruk av CBS reduksjon i syntese av PUFA-metabolitten prostaglandin  $E_2$ .<sup>40</sup>

### 1.14.2.2 Noyoris Ru reduksjon

Dette er en enantioselektiv hydrogenering av ketoner. Denne metoden gir også et godt enantiomert overskudd og høye utbytter av alkoholproduktet. Til en slik reaksjon benyttes kirale ruthenium-katalysatorer.<sup>41</sup> Disse katalysatorene ble introdusert av Noyori, derav navnet Noyoris Ru-reduksjon. Denne metoden har vist seg å fungere godt for asymmetrisk hydrogenering av  $\alpha,\beta$ -umettede ketoner, noe som gjør den aktuell å benytte til reduksjon av ketongruppen i PUFA'er.

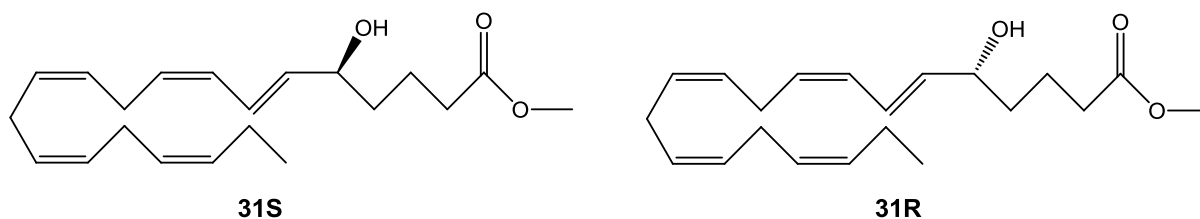


**Skjema 1.13.** Asymmetrisk hydrogenering av  $\alpha,\beta$ -umettede ketoner.<sup>41</sup>

## 1.15 High-performance liquid chromatography- HPLC

HPLC er en teknikk som benyttes for å separere en blanding av forbindelser, enten preparativt eller analytisk. Separasjonen foregår ved at en væske, den mobile fasen med en prøveblanding presses gjennom en kolonne ved hjelp av høyt trykk. Kolonnen inneholder et adsorpsjonsmiddel, den stasjonære fasen hvor de ulike komponentene i prøven vil kunne danne interaksjoner med sorbenten slik at forbindelsene i prøve kommer ut av kolonnen og detekteres ved ulike tidspunkt. Tiden forbindelsen bruker fra start til den kommer ut gjennom kolonnen kalles retensjonstid ( $R_t$ ). Den stasjonære fasen i kolonnen kan være polar eller ikke polar, den mobile fasen vil ha omvendt polaritet i forhold til den stasjonære fasen. Ved polar stasjonær fase kalles metoden normal fase kromatografi, mens ved ikke polar stasjonær fase kalles metoden omvendt fase kromatografi. Typisk stasjonær fase ved omvendt fase kromatografi er C18. Denne metoden passer godt til analyse av PUFA'er.

Det er også mulig å separere enantiomerer ved hjelp av HPLC. Ved separasjon av enantiomerer må den stasjonære fasen i kolonnen være kiral, det vil si at den stasjonære fasen består av den ene enantiomeren av en kiral forbindelse. De to enantiomere i prøven vil ha ulik affinitet til den stasjonære fase som derfor vil føre til at de får ulik retensjonstid. Metylesteren av 5-HEPE ((6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-hydroks-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat, **31**) som ble syntetisert i denne oppgaven er en forbindelse med to enantiomerer, (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5(*S*)-hydroksi-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (metyl-5(*S*)-HEPE, **31S**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5(*R*)-hydroksi-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (metyl-5(*R*)-HEPE, **31R**).

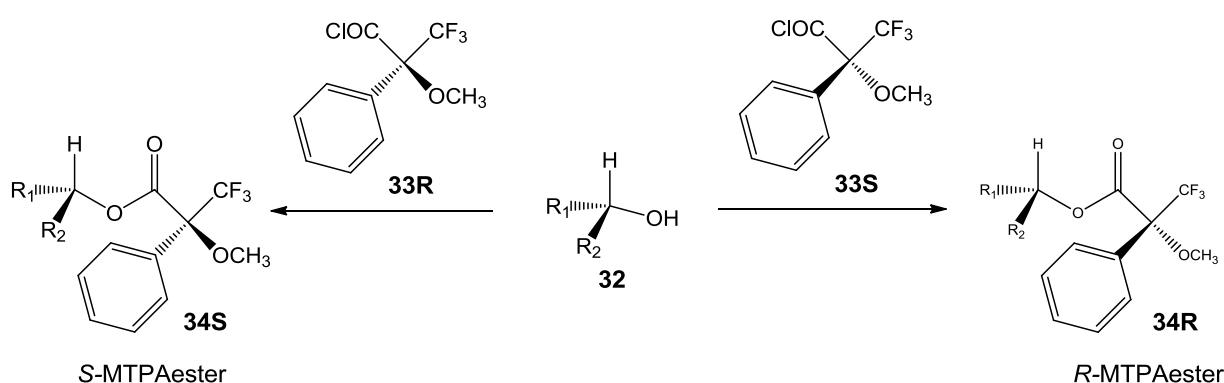


**Figur 1.8.** Strukturen av 5(*S*)-HEPE (**31S**) og 5(*R*)-HEPE (**31R**).

## 1.16 Mosher-ester analyse av kirale forbindelser

Det er spesielt viktig å finne den absolutte konfigurasjonen til forbindelser som har biologisk relevans og muligens kan brukes som f. eks. legemidler. De to enantiomere kan ha svært ulike virkning og i verste fall kan den ene enantiomeren ha fatale effekter. I 1973 rapporterte

Dale og Mosher<sup>42</sup> en NMR-basert metode hvor en enantiomerisk ren karboksylsyre ble bruk til å derivatisere en forbindelse med et ukjent stereogentsenter. I dag brukes som regel den kommersielt tilgjengelige  $\alpha$ -metoksy- $\alpha$ -trifluormetylfenylacetatsyren eller  $\alpha$ -metoksy- $\alpha$ -trifluormetylfenylacetylkloridet (MTPA-Cl, **33R** og **33S**). Kakisawa-gruppen<sup>43-45</sup> modifiserte denne metoden på slutten av 1980-tallet, og dette gjorde resultatene mere pålitelige. Metoden er i dag velkjent for å bestemme den absolutte konfigurasjonen av det stereogene senteret eller se på det relative forholdet mellom to enantiomerer. Metoden går ut på å lage et derivat av enten en sekundær alkohol (i denne oppgaven er det forbindelse **31**) eller et amin bundet til et sekundært karbonsenter. Ved å se på de kjemiske skiftforskjellene i <sup>1</sup>H NMR og integralene av hver av disse, vil man få et godt bilde på det relative forholdet mellom enantiomerene og dermed bestemme det enantiomeriske overskuddet (ee) ved denne metoden.<sup>46</sup>



**Skjema 1.14.** Illustrasjon av derivatisering av en karbinol (**32**) til *R*- og *S*-Mosher esterene (**34R** og **34S**).

### 1.17 Mål for oppgaven

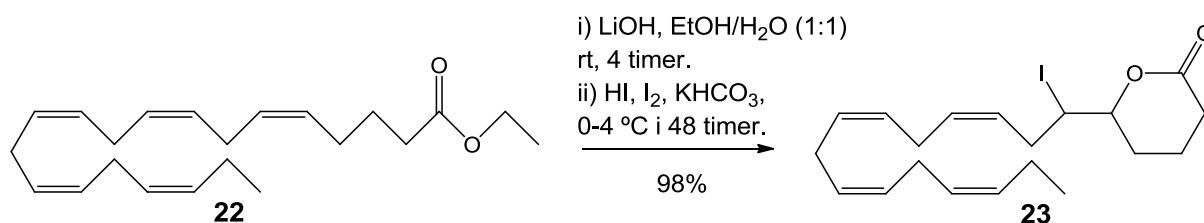
Målet for denne oppgaven var å utvikle syntese av de oksygenerte PUFA forbindelsene racemisk og 5-(*S*)-HEPE (**16**), 5-okso-EPE (**19**) og deres metylestere **31** og **36**, med EPA-EE som utgangsmateriale. Vi ønsker også å undersøke disse forbindelsenes antiinflammatoriske egenskaper *in vitro*. Et annet mål for oppgaven var å utarbeide en metode for analyse av de to enantiomerene av 5-HEPE (**16**) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**31**) ved bruk av HPLC.

Det siste målet for oppgaven var å utføre en stereoselektiv reduksjon av (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-okso-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**36**) og 5-okso-EPE (**19**) til et enantiomert rent produkt.



## 2. Resultat og diskusjon

### 2.1 Syntese av tetrahydro-6-((3Z, 6Z, 9Z, 12Z)-1-jodpenta-dekatetranyl)pyran-2-on (23)



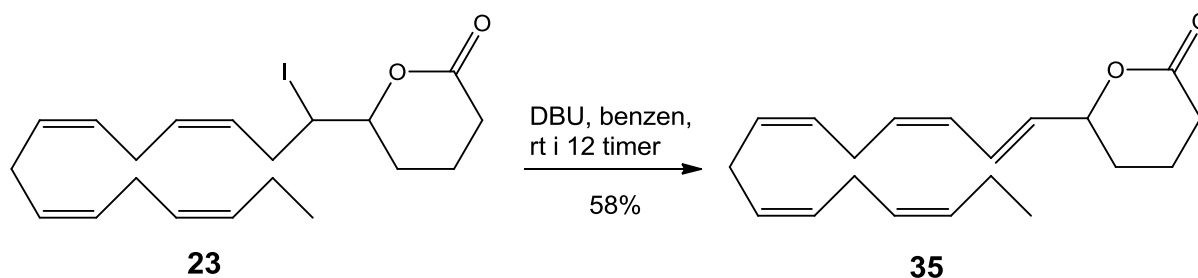
#### Reaksjonsskjema 2.1. Syntese av jodlakton **23**.<sup>32</sup>

Prosedyren som ble benyttet til syntese av jodlakton **23** er fra Langseter *et al.*<sup>32</sup>

Etylesteren av EPA (**22**) ble gitt i gave fra Pronova BioPharma AS og ble benyttet som startmaterialet i dette prosjektet. EPA-EE (**22**) ble omsatt til  $\delta$ -jodlakton **23** som vist i reaksjonsskjema 2.1. Denne reaksjonen var vellykket. Litteraturen oppgir et utbytte på 97 %, <sup>32</sup> noe som også ble oppnådd i mine forsøk. Karbonylgruppen i laktonet bekreftes både av absorpsjon ved 1738 cm<sup>-1</sup> i IR spekteret og ved signal på 170,4 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. I <sup>13</sup>C NMR spekteret kan man se et signal ved 81,0 ppm, dette er karakteristisk for karbonatomet som er bundet til oksygen og som samtidig også er nabo med karbonatomet som er bundet til jod. Karbonet som er bundet til jod vil komme ut med en skiftverdi på ca 30 ppm, men siden det er flere signaler rundt denne verdien er det vanskelig å si hvilket som tilhører akkurat dette protonet. Protonet som sitter på det karbonet som jod er bundet til observeres ved 3,95 ppm, mens protonet som sitter på karbonatomet bundet til oksygen bekreftes ved et kjemisk skift på 4,12 ppm i <sup>1</sup>H NMR.

Jodlakton **23** har tendens til å dekomponere hurtig ved tilgang på lys og luft, til en mørkebrun olje. Kolbene med jodlaktonet ble derfor dekket med aluminiumsfolie og fylt med nitrogen hurtig etter syntesen av **23** var ferdig. Alternativt ble jodlaktonet omsatt direkte videre i synteser. Det var ikke nødvendig med noe form for rensing av produktet da <sup>1</sup>H NMR-spekteret viste høy renhet med unntak av noe løsemiddelrester, men dette hadde ingen innvirkning for videre syntese.

## 2.2 Syntese av 6-((1E,3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeka-1,3,6,9,12-pentaen-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-on (35)

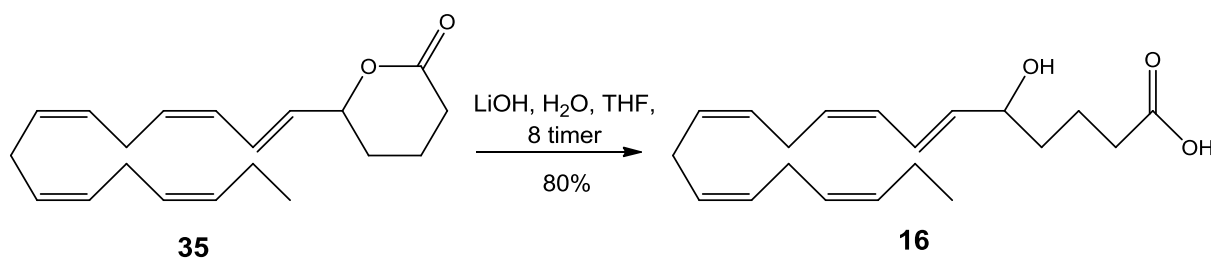


### Reaksjonsskjema 2.2. Syntese av lakton 35.<sup>24</sup>

Til syntesen av lakton **35** ble prosedyren publisert av Ulven *et al.*<sup>24</sup> benyttet.

Utgangsmaterialet i denne oppgaven var EPA-EE og ikke AA som ble benyttet i den opprinnelige prosedyren. Jodlaktonet **23** ble omdannet til lakton **35** via en eliminasjonsreaksjon. Denne reaksjonen viste seg også å være vellykket. I litteraturen var det oppgitt et utbytte på 93% med arachidonsyre som utgangsmateriale,<sup>24</sup> men det beste utbyttet som ble oppnådd var 58%. Fra <sup>13</sup>C NMR spekteret kan man se at det er to signaler mindre i alkanområdet og to signaler mer i alkenområdet sammenliknet med dette spekteret for jodlakton **23**. Dette tyder på at eliminasjonen av HI har skjedd, og en ny dobbeltbinding har blitt dannet. Dobbeltbindingen som er dannet har *E*-konfigurasjon i følge koblingskonstanten på 15,2 Hz. De kjemiske skiftverdiene for protonene i denne *E*-dobbeltbindingen, samt det kjemiske skiftet til naboprotonet som sitter på *Z*-dobbeltbindingen, kan observeres ved henholdsvis 5,62, 6,54 og 5,94 ppm i <sup>1</sup>H NMR. Ved 4,82 ppm i det samme spekteret ser man signalet for protonet som sitter på karbonatomet bundet til oksygen i laktonringen. Karbonet til dette protonet bekreftes også ved 80,2 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Karbonylgruppen bekreftes ved absorpsjon ved 1728 cm<sup>-1</sup> i IR spekteret og ved 171,1 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Siden utbyttet var noe lavt, ble det gjort noen forsøk på å forbedre utbyttet. Det første som ble gjort var å dekke kolben med aluminiumsfolie mens reaksjonen var i gang. Siden forbindelse **23** inneholder jod, som er lyssensitivt, kan dette muligens føre til uønskede reaksjoner, men tildekking av kolben med aluminiumsfolie ga ingen signifikant forbedring av utbyttet. Det ble forsøkt å bruke benzen som elueringsmiddel i stedet for etylacetat til opprensningen av **35**, da dette så lovende ut på TLC, men det ga fortsatt ingen forbedring av utbyttet. På grunn av begrenset tid og at dette er et mellomsteg i syntesen av mål molekylene ble det ikke gjort flere forsøk på å forbedre metoden.

### 2.3 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (5-HEPE, 16)

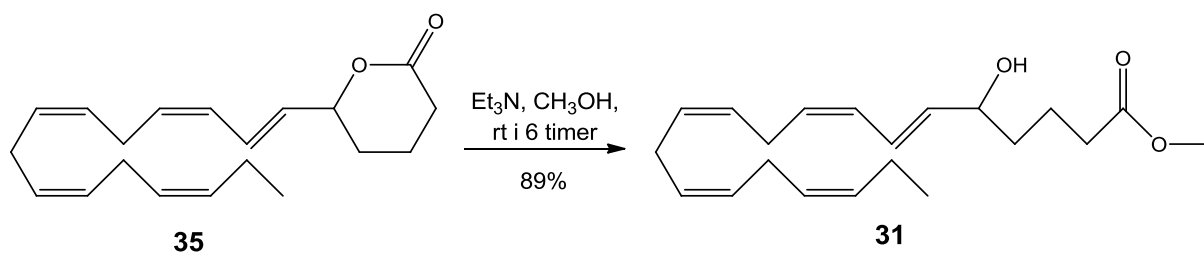


#### Reaksjonsskjema 2.3. Syntese av 5-HEPE (**16**).<sup>24</sup>

Prosedyren av Ulven *et al.*<sup>24</sup> ble brukt til syntesen av 5-HEPE (**16**), med EPA-EE som utgangsmateriale i stede for AA, som ble benyttet i prosedyren av Ulven *et al.* Alkoholen **16** ble syntetisert fra lakton **35** ved å hydrolysere laktonet i vandig, basisk miljø. Denne reaksjonen var vellykket. I litteraturen er det oppgitt er utbytte på 97%,<sup>24</sup> mens i mine forsøk ble utbyttet på 80%. Et signal ved 4,13 ppm stemmer godt karbonet bundet til karbinolhydrogen. I <sup>13</sup>C NMR spekteret kan man se et signal ved 72,4 ppm, dette er signalet er for karbonatomet hvor hydroksylgruppen sitter. karbonylgruppen bekreftes ved absorpsjon ved 1709 cm<sup>-1</sup> i IR spekteret og kjemisk skiftverdien 179,1 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Ingen absorpsjon i området 2500-3600 cm<sup>-1</sup> ble observert.

Metylesteren av 5-HEPE ble også syntetisert, denne reaksjonen ga et bedre utbytte og det ble derfor bestemt at studiene av begge metylestere **31** og **36** skulle ferdigstilles først, det ble derfor ikke nok tid til å gjøre flere forsøk på syntese av **16**. Da det ikke ble gjort noen flere forsøk på å syntetisere 5-HEPE (**16**), ble det derfor heller ikke gjort noe forsøk på å syntetisere 5-okso-EET (**19**), som var et annet av målmolekylene.

### 2.4 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**31**)



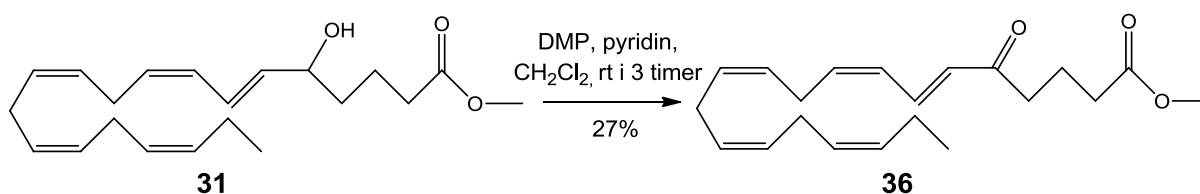
#### Reaksjonsskjema 2.4. Syntese av hydroksymetylesteren **31**.<sup>47</sup>

Til syntese av hydroksymetylester **31** ble prosedyren til Itoh *et al.*<sup>47</sup> benyttet. I denne prosedyren var DHA benyttet som utgangsmateriale, mens i denne oppgaven ble EPA-EE benyttet i stede.

Denne reaksjonen var vellykket. I litteraturen ble det oppnådd et utbytte på 61%,<sup>47</sup> mens i mine forsøk ble utbyttet 89%. I <sup>1</sup>H NMR spekteret er det et signal ved 4,12 ppm bundet til karbinolkarbonet. Dette karbonet kan man også se i <sup>13</sup>C NMR spekteret ved 72,3 ppm. Protonene i metylgruppen i metylesteren kan sees som en singlet ved 3,60 ppm i <sup>1</sup>H NMR spekteret og ved 51,6 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Ellers stemmer de resterende spektrale dataene godt overens med hva som var forventet for resten av molekylet.

Det ble gjort HPLC analyse av forbindelse **31** på en kirale kolonne i forsøk på separere enantiomerene **31R** og **31S**. Med gradient eluering viste det seg mulig å få grunnlinjeseparert disse enantiomerene. I kromatogrammet vises disse enantiomerene som to toppe en ved 39,3 min og en ved 42,0 min med et 1:1 forhold.

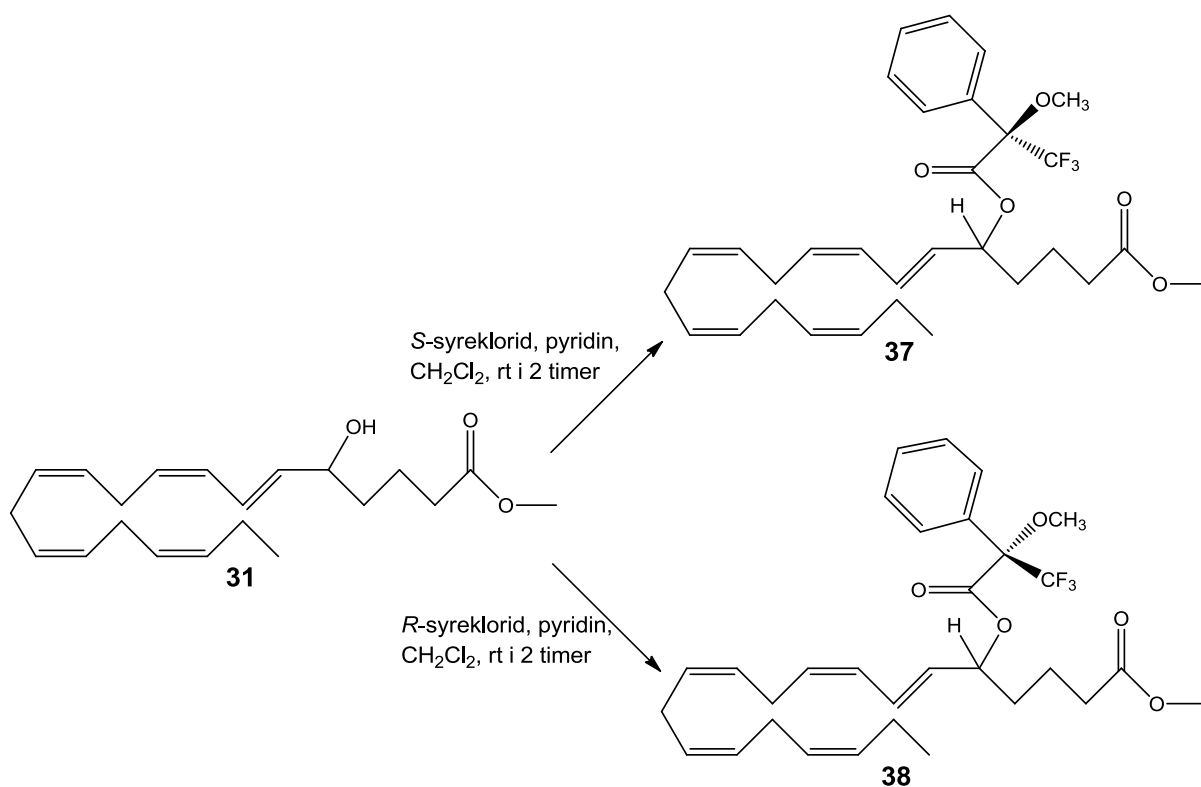
## 2.5 Syntese av (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-okso-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (**36**)



### Skje ma 2.5. Syntese av ketometylester **36**.<sup>24</sup>

Proseduren til Ulven *et al.*<sup>24</sup> ble benyttet i syntesen av ketometylester **36**. EPA-EE ble benyttet som utgangsmateriale i stede for AA som ble benyttet i den opprinnelige prosedyren. Denne reaksjonen var vellykket. I litteraturen er det oppgitt et utbytte på 82%,<sup>24</sup> men her ble det kun oppnådd 27%. Fra <sup>1</sup>H NMR spekteret observeres ikke lenger signalet for protonet på karbonatomet med hydroksylgruppen i forbindelse **31**, dette var også tilfelle i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Karbonylgruppen i ketonet bekrefte ved et kjemisk skift på 198,6 ppm i <sup>13</sup>C NMR spekteret. Ellers stemmer de spektrale dataene overens med hva som kan forventes.

## 2.6 Syntese av Mosher-esterene 37 og 38



**Skjema 2.6** Syntese av *R*-ester 37 og *S*-ester 38.

Både *R*-ester 37 og *S*-ester 38. ble syntetisert etter en prosedyre av Hoye *et al.*<sup>46</sup>

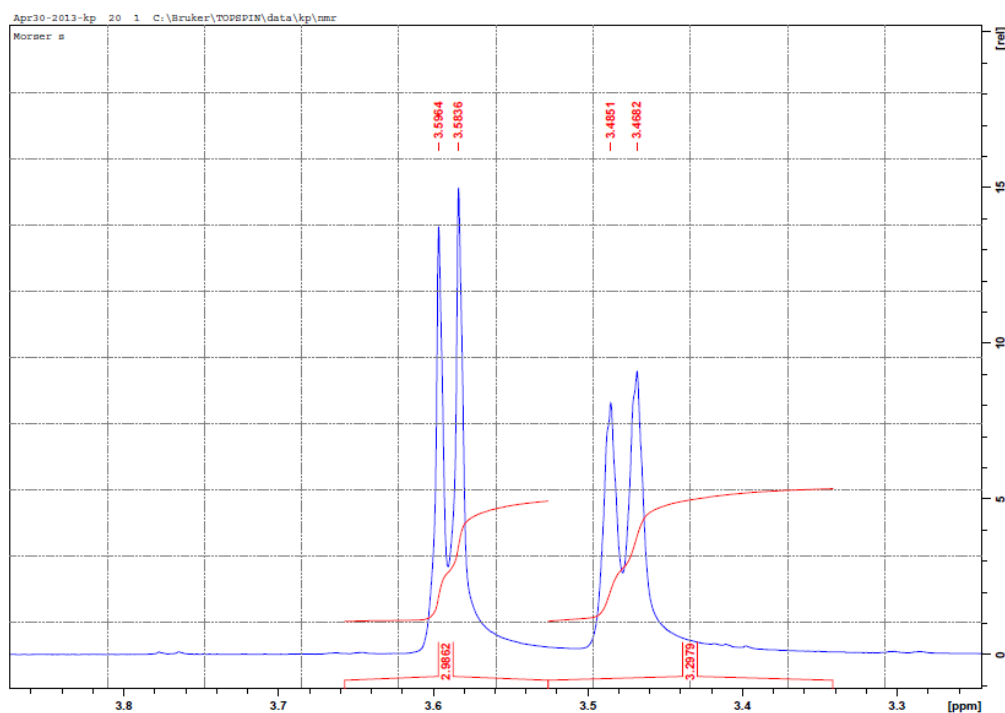
Begge reaksjonene var vellykkede. Det er ikke oppgitt noen utbytter i litteraturen da denne metoden kun benyttes til stereokjemisk analyse av kirale forbindelser. De spektrale dataene ble meget like for begge forbindelsene, det nevnes derfor bare de kjemiske skiftene for en av forbindelsene med mindre det er store forskjeller mellom dem.

I <sup>1</sup>H NMR spektrene for både forbindelse 37 og 38 sees flere diagnostiske signaler. Ved de kjemiske skiftverdiene 7,20 og 7,32 ppm observeres de fem protonene i benzenringen. I tillegg kan man se et signal ved 3,50 ppm som er de tre protonene i metoksygruppen.

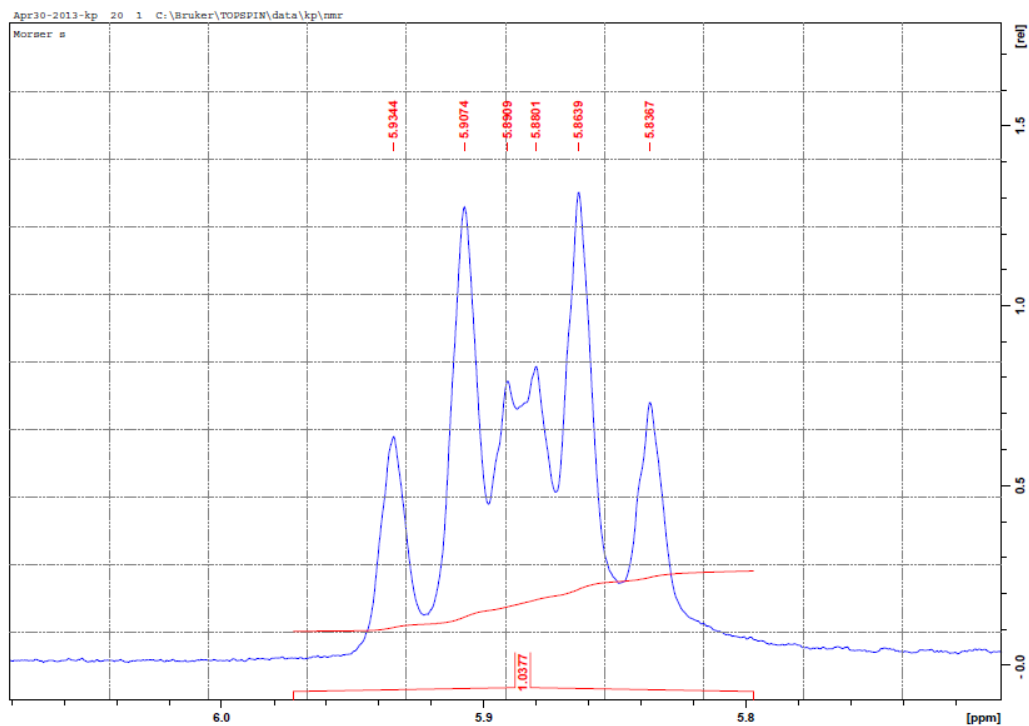
Karbonet i denne metylgruppen finnes også i <sup>13</sup>C NMR spekteret ved 55,5 ppm. Signalet for protonet som sitter bundet til alkosykarbonet, er ikke ved 4,12 ppm som i <sup>1</sup>H NMR spekteret til forbindelse 31. Det antas at signalet for dette protonet nå befinner seg i det brede signalet ved 5,21-5,50 ppm, som inneholder to ytterligere hydrogenatomer. Det andre hydrogenet som også er kommet med i dette signalet er det ene protonet i *E*-dobbeltbindingen. I <sup>13</sup>C NMR spekteret bekrefte begge karbonylgruppene i molekylet, signalet for karbonylkarbonet i

metylesteren observeres ved 173,4 ppm, mens signalet for karbonylgruppen i Mosher-esteren kommer ved 165,8 ppm.

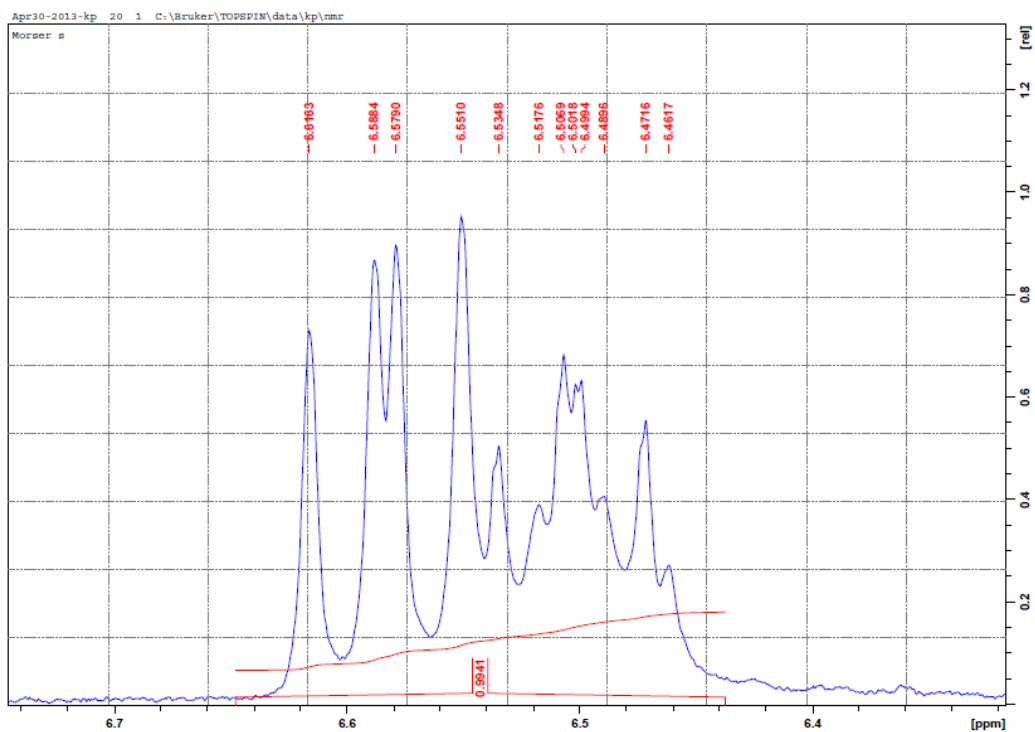
I begge tilfellene blir det dannet to diastereomere forbindelser, noe som forårsaker splitting i  $^1\text{H}$  NMR spektrene for signalene i nærheten av det stereogene karbonatomet som er blitt derivatisert med enten *R*-MTPA-Cl eller *S*-MTPA-Cl. Splittingen i signalene for protonene i metylgruppene i estere og eteren ved 3,59 og 3,48 ppm ses i Figur 2.1. Det er også mulig å se tegn til denne splittingen for det ene protonet i *E*-dobbeltbindingen og naboprotonet til denne dobbeltbindingen som selv sitter i *Z*-dobbeltbindingen ved de kjemiske skiftverdiene 6,45-6,63 og 5,89 ppm. Disse splittede signalene er ekspandert og vist i figur 2.1, 2.2, 2.3. I  $^{13}\text{C}$  NMR spekteret kan denne splittingen også observeres ved at det er flere signaler i spekteret enn hva en ville forvente for kun en av diastereomerene i løsningen. Det er for eksempel to signaler for hver av metylgruppene i esteren og eteren ved 51,6 og 55,5 ppm, og et signal ved 165,8 ppm for ester karbonet **31**.



**Figur 2.1.** Illustrasjon av splitting i signalene for protonene i metylgruppen i metylesteren og metoksygruppen i ester **37**.



**Figur 2.3.** Illustrasjon av splitting i signalene for protonet på Z-dobbelbindingen som er nærmest E-dobbelbindingen.



**Figur 2.3.** Illustrasjon av splitting i signalene for det ene protonet i E-dobbelbindingen.

Det ble også gjort HPLC analyse av Mosher-esterne **37** og **38** på en C18 kolonne i et forsøk på å separere diastereomerene, både før og etter opprensing. I kromatogrammet før rensing kom det ut to topper, én ved 11,2 min. og én 12,1 min. som hadde et tilnærmet 1:1 forhold, men siden det var så mange andre topper i kromatogrammet ble det bestemt at Mosher-esterne skulle renses og analyseres på nytt. Ved bruk av de samme betingelsene som før rensing, ble det nå ikke observert noen topper i dette området. Det viste seg tilslutt at denne metoden ikke var spesielt egnet for analyse av disse esterene, da det ikke var kommet ut noe etter 50 min. Side det var begrenset med tid ble det ikke gjort noen flere forsøk på å separere diastereomerene av esterene **37** og **38**.



### 3. Oppsummering og videre arbeid

Alle syntesene som ble prøvd, var vellykkede, da de ønskede forbindelsene ble fremstilt. De fleste reaksjonene ga tilfredsstillende utbytter. Det ble syntetisert tre av fire målmolekyler, men det ble for knapt med tid til å lage alle fire. Prosedyren fra Ulven og medarbeidere, som ble benyttet til syntese av 5-HEPE (**16**), viste seg å fungere bra. Med mer tid til rådighet ville det vært mulig også å gjennomføre syntesen av det siste målmolekylet, 5-okso-EPE (**19**). Det er aktuelt å sende de molekylene som ble syntetisert i denne oppgaven til biologisk testing som skal utføres i et  $\text{Ca}^{2+}$  immobiliserings assay, slik Ulven *et al.*<sup>24</sup> har gjort.

Grunnlinjeseparasjon av enantiomerene av hydroksymetyler **31** ved hjelp av HPLC med en kirale OD-H kolonne ble utarbeidet. Det gjenstår å finne ut hvilken av toppene som er *R*-hydroksymetyler **31R** og hvilken som er *S*-hydroksymetyler **31S**. Dette kan gjøres ved å bruke samme analysemetode på metylesteren av 5-(*S*)-HEPE (**16**). 5-(*S*)-HEPE (**16**) er kommersielt tilgjengelig. Sammenligning av retensjonstiden for denne med de to toppene fra kromatogrammet nevnt over vil gi identifisering av enantiomerene. Det er også ønskelig å utvikle en HPLC-metode med en kirale kolonne for separasjon av enantiomerene av **16**.

Det lot seg ikke gjøre å separere Mosher-esterne **37** og **38** ved hjelp av HPLC med de metodene som ble utprøvd innenfor tidsrammen for denne oppgaven.

Det ble ikke tid til å gjennomføre stereoselektiv reduksjon av 5-okso-EPE (**19**) og metylesteren **36** med CBS katalysator. Kjemien rundt denne formen for reduksjon er godt kjent og det burde derfor være mulig å gjennomføre dette i et videre arbeid.

### 4. Konklusjon

Målmolekyl **16**, **31** og **36** ble syntetisert i henholdsvis 80%, 89% og 27% utbytte, og disse skal sendes til biologisk testing. Det ble ikke nok tid til å syntetisere 5-okso-EPE (**19**).

Det ble utarbeidet en metode som gjorde det mulig å separere enantiomerene av forbindelse **31** ved hjelp av HPLC.

## 5. Eksperimentelt

### 5.1 Generelt

Alle synteser i denne oppgaven ble utført under N<sub>2</sub>-atmosfære.

Løsemidlene som ble benyttet var av teknisk kvalitet. I reaksjoner der tørre løsemidler var nødvendig, ble flasker forseglet med septum benyttet, og løsemiddelet ble tatt ut med sprøyte.

Tynnsjikt-kromatografi ble utført på plater av typen Merck TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>.

Til fremkalling ble løsning av konsentrert svovelsyre eller kaliumpermanganat benyttet.

Til opprensning ble Silica gel 60 (0,040-0,063 mm) fra Merck benyttet til kolonnekromatografi.

NMR spektere ble tatt opp på et Bruker Ascend 400-instrument. Spektrene er tatt opp ved 25 °C, 400 MHz for <sup>1</sup>H NMR og 100 MHz for <sup>13</sup>C NMR. Kloroform, CDCl<sub>3</sub>, ble brukt som løsemiddel for alle prøver.

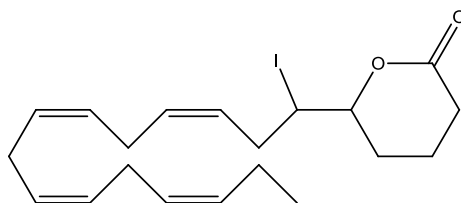
IR spektere ble tatt opp på et Perkin-Elmer FT-IR instrument (Spectrum Bx, 50/60 Hz).

HPLC instrumentet som ble benyttet i denne oppgaven var et Agilent Technologies 1200 Series med UV detektor stilt inn på 254 nm.

Kolonnene som ble benyttet til HPLC analysene var enten med C18 stasjonær fase (Eclipse XDB-C18, partikkelstørrelse 5 μm, 4.6 × 150 mm) eller en kiralt kolonne (Chiralpak OD-H, 250 mm, id. 4.6 mm x 150 mm)

UV spektere ble tatt opp på en Biochrom Libra S32PC.

## 5.2 Syntese av tetrahydro-6-((3Z, 6Z, 9Z, 12Z)-1-jodpentadecateryl)pyran-2-on (23)



**C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>IO<sub>2</sub>**

**M<sub>w</sub> = 428,35**

**Utbytte = 98 %**

Etylester av EPA (**22**, 2,5 g, 7,5 mmol) ble tilsatt LiOH×H<sub>2</sub>O (1,6 g, 37,5 mmol) og EtOH/H<sub>2</sub>O (1:1, 15 ml). Denne blandingen stod under røring i 4 timer ved romtemperatur. Underveis ble reaksjonsblandingen kontrollert ved TLC i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Deretter ble 22,5 ml vann tilsatt. Rundkolben ble dekket med aluminiumsfolie og kjølt ned til 0 °C før HI (5 ml) ble overført til reaksjonsblandingen. pH ble justert til ca 7 med en mettet løsning av KHCO<sub>3</sub> (2,5-5 ml) og en løsning av I<sub>2</sub> (5,7 g, 22,5 mmol) i THF (17,5 ml) ble tilsatt. Videre stod denne reaksjonsblandingen under røring i 48 timer i 0-4 °C.

Reaksjonen ble stoppet med Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (25 ml). Produktet ble ekstrahert med heksan (3×50 ml) og den organiske fasen ble vasket med en mettet løsning NaCl. Tilsutt ble løsningsmiddelet dampet inn på rotavaporen. Produktet var en klar gul olje. Denne forbindelsen er kjent.<sup>50</sup>

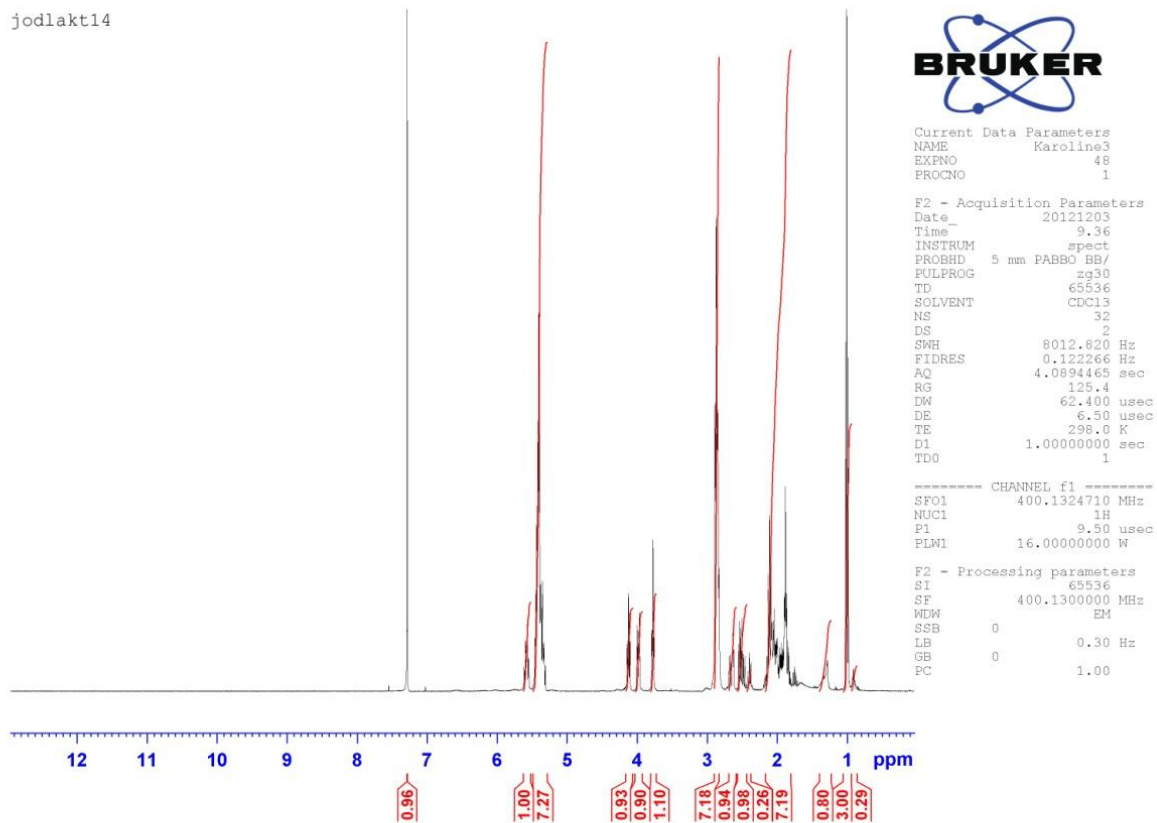
Data:<sup>50</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,91 (t, J=7,5 Hz, 3H), 1,54-2,10 (m, 7H), 2,57 (m, 1H), 2,72 (m, 1H), 2,98 (m, 7H), 3,95 (dt, J=10,7, 2,9 Hz, 1H), 4,12 (td, J= 7,5, 2,6 Hz, 1H), 5,25-5,45 (m, 7H), 5,55 (m, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,31 (CH<sub>3</sub>), 18,33 (CH<sub>2</sub>), 20,59 (CH<sub>2</sub>), 25,59 (CH<sub>2</sub>), 25,70 (CH<sub>2</sub>), 25,93 (CH<sub>2</sub>), 27,96 (CH<sub>2</sub>), 29,59 (CH), 34,36, 36,82, 80,95 (CH), 127,02 (CH), 127,07 (CH), 127,42 (CH), 127,77 (CH), 128,70 (CH), 128,80 (CH), 131,45 (CH), 132,09 (CH), 170,41 (CO)

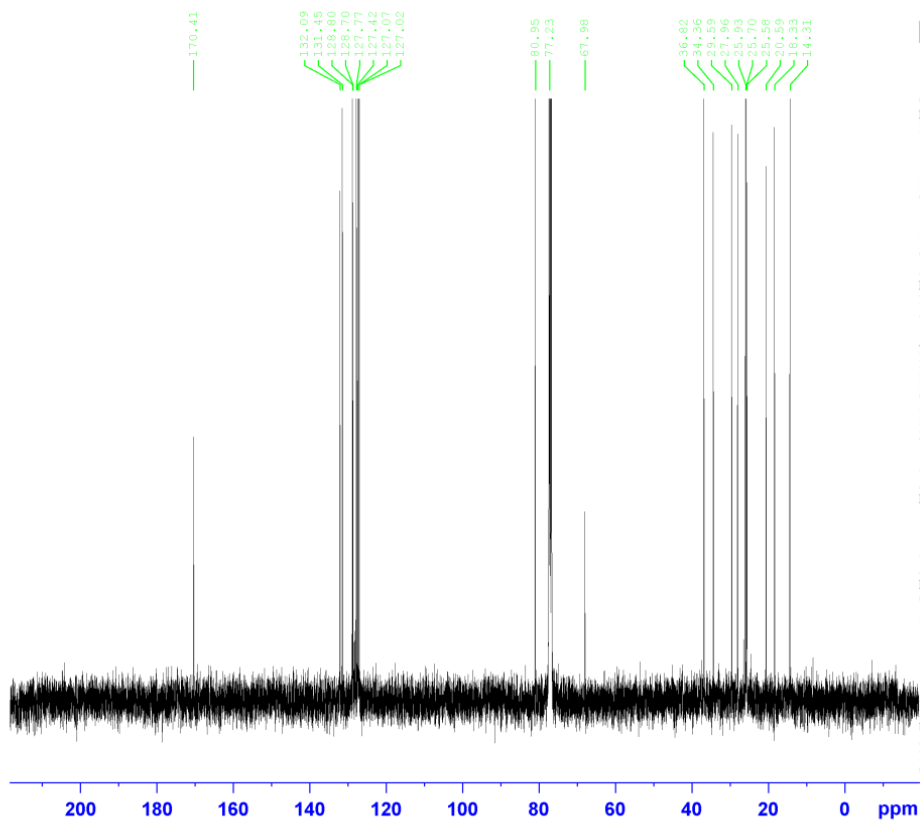
**IR (film):** 3013 (s), 2963 (s), 1738 (s)  $\text{cm}^{-1}$

Litt løsemiddel (heksan og THF) observeres i  $^1\text{H}$  NMR spekteret, THF signalet kan også ses i  $^{13}\text{C}$  NMR spekteret. I alle  $^1\text{H}$  NMR spektrene observeres det en uidentifisert forurensning ved 1,18 ppm.



**Spekter 5.1.**  $^1\text{H}$  NMR spekter av jodlaktone 23.

jodlaktcarb



Current Data Parameters  
NAME Karoline3  
EXPNO 54  
PROCNO 1

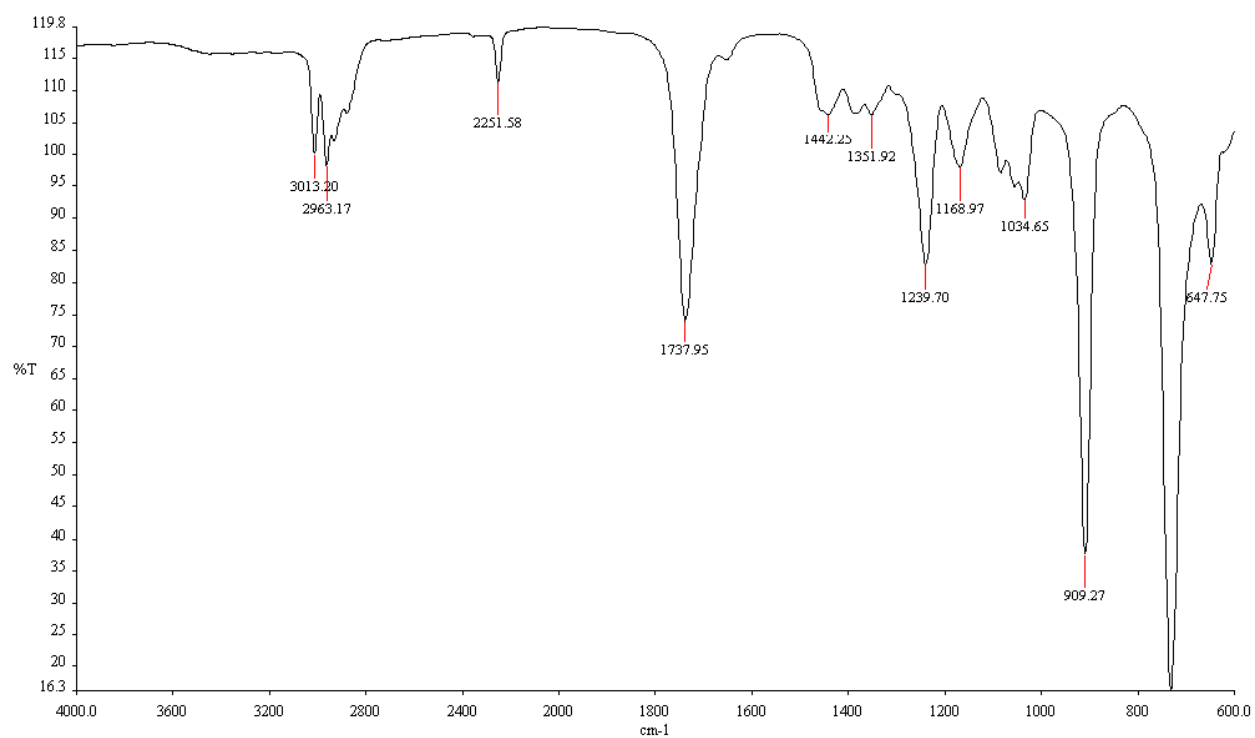
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20121204  
Time 14.25  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT CDC13  
NS 2000  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3631488 sec  
RG 200.28  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.0000000 sec  
D11 0.0300000 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 100.6228293 MHz  
NUC1 13C  
P1 7.50 usec  
PLW1 107.0000000 W

===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 400.1316005 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 80.00 usec  
PLW2 16.0000000 W  
PLW12 0.2430000 W  
PLW13 0.1444000 W

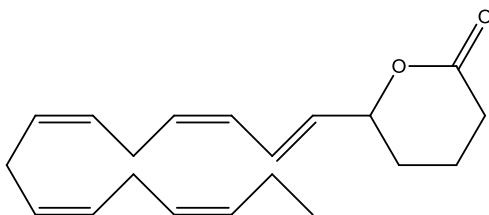
F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.6127690 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Spekter 5.2.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av jodlakton 23.



**Spekter 5.3.** IR spekter av jodlaktone 23.

### 5.3 Syntese av 6-((1E,3Z,6Z,9Z,12Z)-pentadeka-1,3,6,9,12-pentaen-1-yl)tetrahydro-2H-pyran-2-on (35)



**C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>**

**M<sub>w</sub>**= 300,21

**Utbytte**= 58%

Til en løsning av jodlakton **23** (2,7 g, 9,0 mmol) ble det tilsatt tørr benzen (37,5 ml) og DBU (1,1 g, 7,3 mmol). Denne reaksjonen stod under omrøring i 12 timer ved romtemperatur. Deretter ble løsningen sentrifugert i 5 min. Den klare løsningen ble overført til en ren rundkolbe, mens bunnfallet ble rørt med benzen (50 ml) og sentrifugert på nytt. De klare benzen løsningene ble slått sammen og oppkonsentrert. Det er også mulig å benytte vakuumfiltrering i stede for sentrifugering.

Til opprensning av produktet ble flashkromatografi benyttet. En eluentgradient fra 0-15 % etylacetat i heksan ble benyttet. Fraksjonene ble kontrollert med TLC. R<sub>f</sub>-verdi for lakton **35** var 0,60 med en 1:1 løsning av etylacetat i heksan. Denne reaksjonen ble gjennomført flere ganger og det beste utbyttet av **35** ble 58 %. Forbindelsen er kjent.<sup>51-53</sup>

HPLC-analyser av forbindelse **16**, **31** og **36** ble utført med isokratisk løsningsmiddeleluent med følgende betingelser:

Injiseringvolum: 5 µl

Løsningsmiddelforhold: MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20)

Flow: 1 ml/min

Temperatur: 30 °C

Kolonne: C18

Data:<sup>51-53</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,91 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,55-1,68 (m, 1H), 1,74-2,05 (m, 5H), 2,30-2,59 (m, 2H), 2,75 (m, 4H), 2,90 (t, J=7,0 Hz, 2H), 4,82 (m, 1H), 5,20-5,46 (m, 7H), 5,62 (dd, J= 15,2, 6.2 Hz, 1H), 5,94 (t, J=10,9 Hz, 1H), 6,54 (dd, J=15,2, 11,0 Hz, 1H)

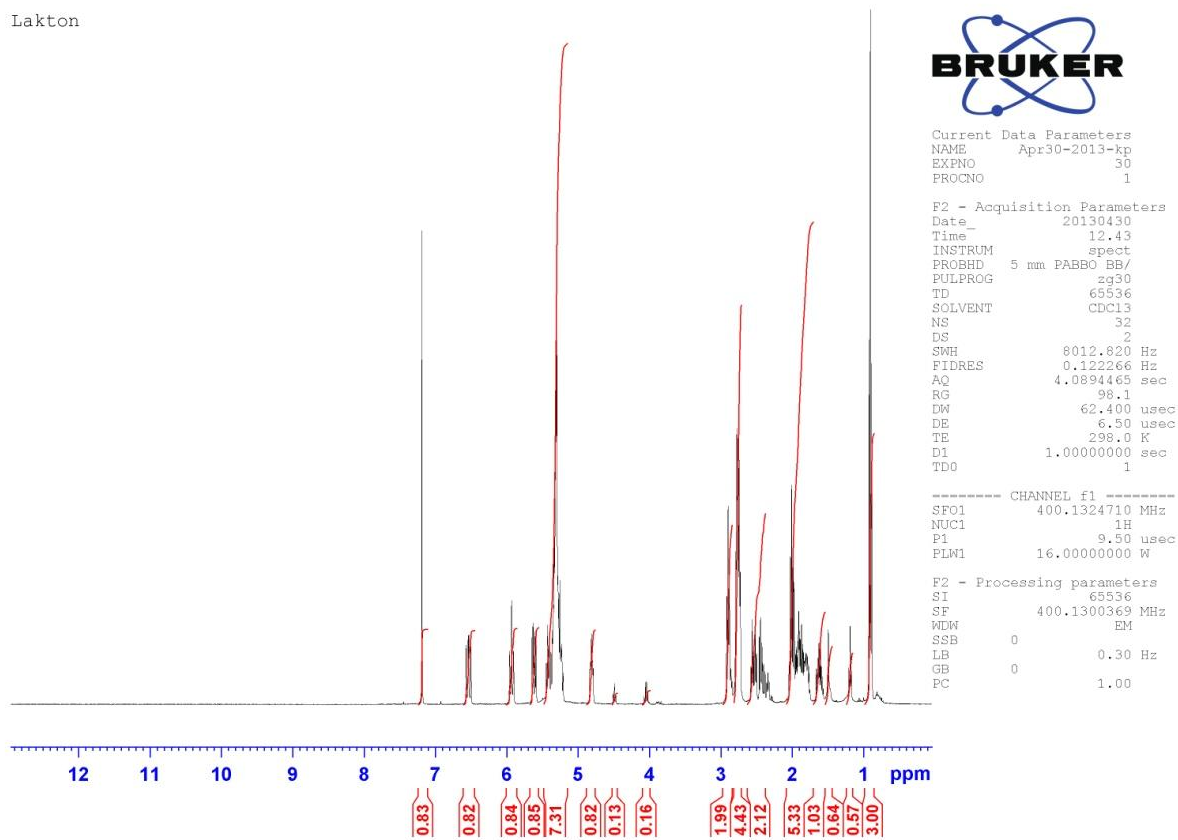
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,28 (CH<sub>3</sub>), 18,29 (CH<sub>2</sub>), 20,55 (CH<sub>2</sub>), 25,54 (CH<sub>2</sub>), 25,64 (CH<sub>2</sub>), 26,13 (CH<sub>2</sub>), 28,37 (CH<sub>2</sub>), 29,53 (CH<sub>2</sub>), 80,23 (CH), 126,96 (CH), 127,28 (CH), 127,41 (CH), 127,69 (CH), 128,31 (CH), 128,67 (CH), 128,87 (CH), 130,67 (CH), 131,92 (CH), 132,05 (CH), 171,13 (CO)

**IR (film):** 3014 (s), 2964 (s), 1728 (s) cm<sup>-1</sup>

Det kan ses noe løsemiddel (etylacetat) i <sup>1</sup>H NMR spekteret.

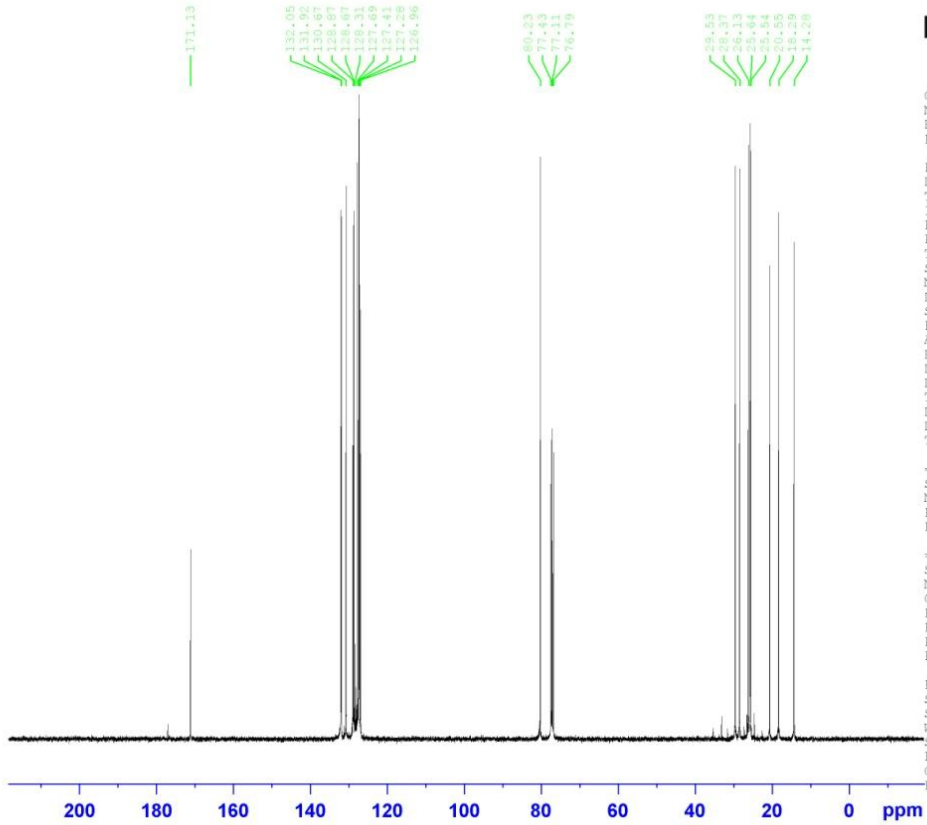


Lakton



Spekter 5.4. <sup>1</sup>H NMR spekter av lakton 35.

Fjernet I C



Current Data Parameters  
NAME Master  
EXPNO 8  
PROCNO 1

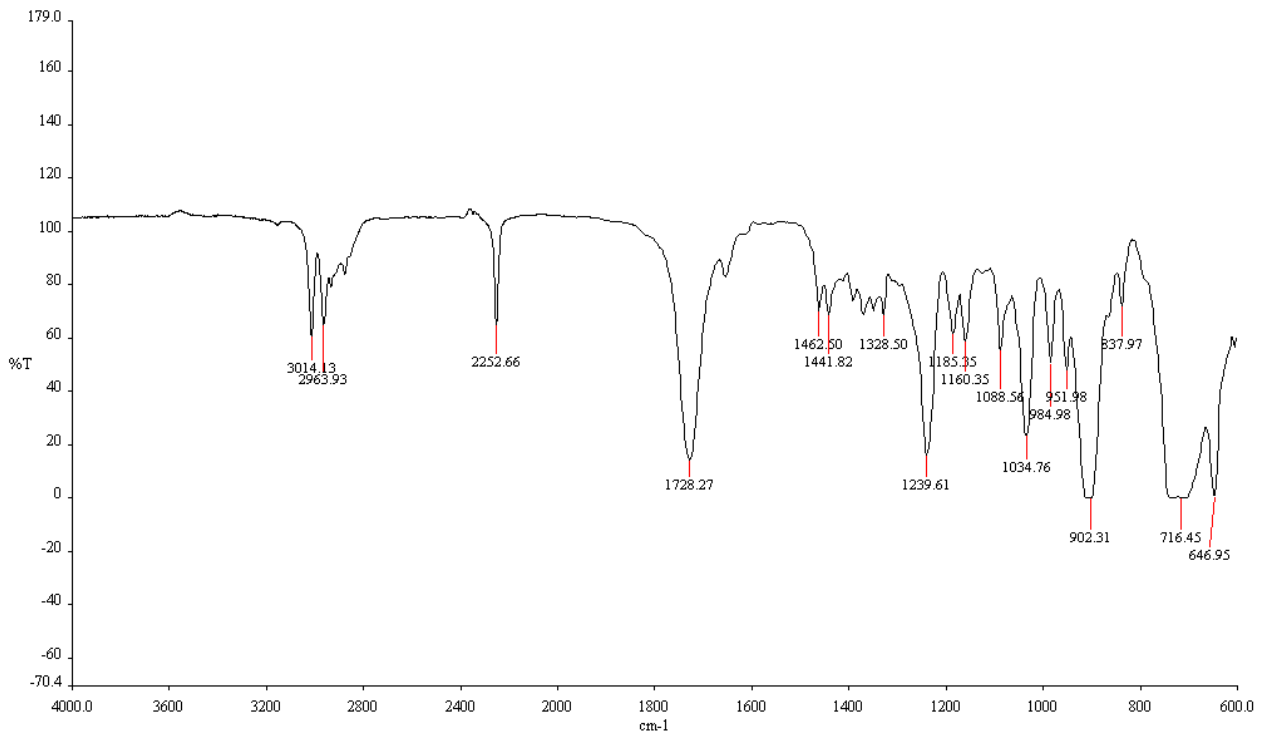
F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20130128  
Time 11.19  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 1024  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3611488 sec  
RG 200.28  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.0000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----  
SFO1 100.6228293 MHz  
NUC1 13C  
P1 7.50 usec  
PLW1 107.0000000 W

===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 400.1316005 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG2 waltz16  
PCPD2 80.00 usec  
PLW2 16.0000000 W  
PLW12 0.2430000 W  
PLW13 0.1444000 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.6127690 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

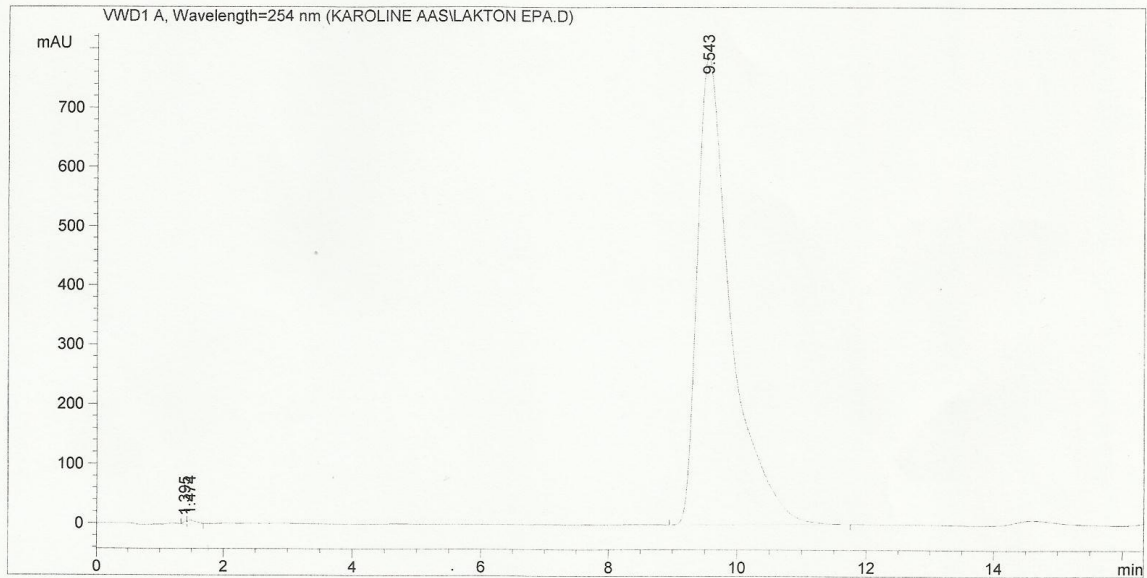
Spekter 5.5.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av lakton 35.



**Spekter 5.6.** IR spekter av lakton 35.

Data File D:\DATA\KAROLINE AAS\LAKTON EPA.D  
Sample Name: Lakton EPA

```
=====
Acq. Operator   : Karoline aas
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : Vial 1
Injection Date  : 4/29/2013 10:49:50 AM
                                           Inj Volume : 5 µl
Acq. Method     : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed    : 4/29/2013 10:48:49 AM by Karoline aas
Analysis Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed    : 4/29/2013 11:06:42 AM by Karoline aas
Sample Info     :
=====
```



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

```
Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.395	VV	0.0511	24.81607	7.08191	0.0868
2	1.474	VV	0.1225	75.07286	8.00563	0.2626
3	9.543	VB	0.5337	2.84836e4	785.48938	99.6505

Totals :                    2.85835e4    800.57692

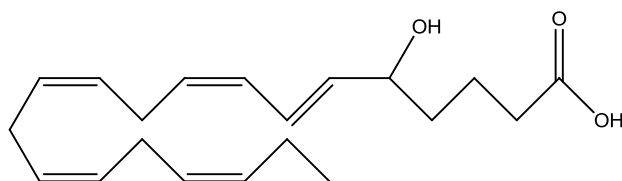
=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*

Instrument 1 4/29/2013 11:07:21 AM Karoline aas

Page 1 of 1

**Kromatogram 5.1.** HPLC kromatogram av lakton 35.

#### 5.4 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-5-hydroksey-6,8,11,14,17-eikosapentaensyre (16)



**C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>**

**M<sub>w</sub>=318,22**

**Utbytte= 80%**

Til en løsning av lakton **35** (318 mg, 1,0 mmol) i THF (6,6 ml) ble det tilsatt en blanding av LiOH×H<sub>2</sub>O (67 mg, 1,6 mmol) og vann (3,2 ml). Reaksjonsblandingen stod 8 timer under omrøring ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt vann (12 ml). Reaksjonsblandingen ble kjølt ned til 0 °C og surgjort med 1,0 M HCl til pH 5. Produktet ble ekstrahert med dietyleter (3×24 ml), vasket med saltlake og tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. løsningsmidlene ble dampet inn på rotavaporen. Forbindelse **16** er kjent fra før.<sup>51</sup>

Data:<sup>51</sup>

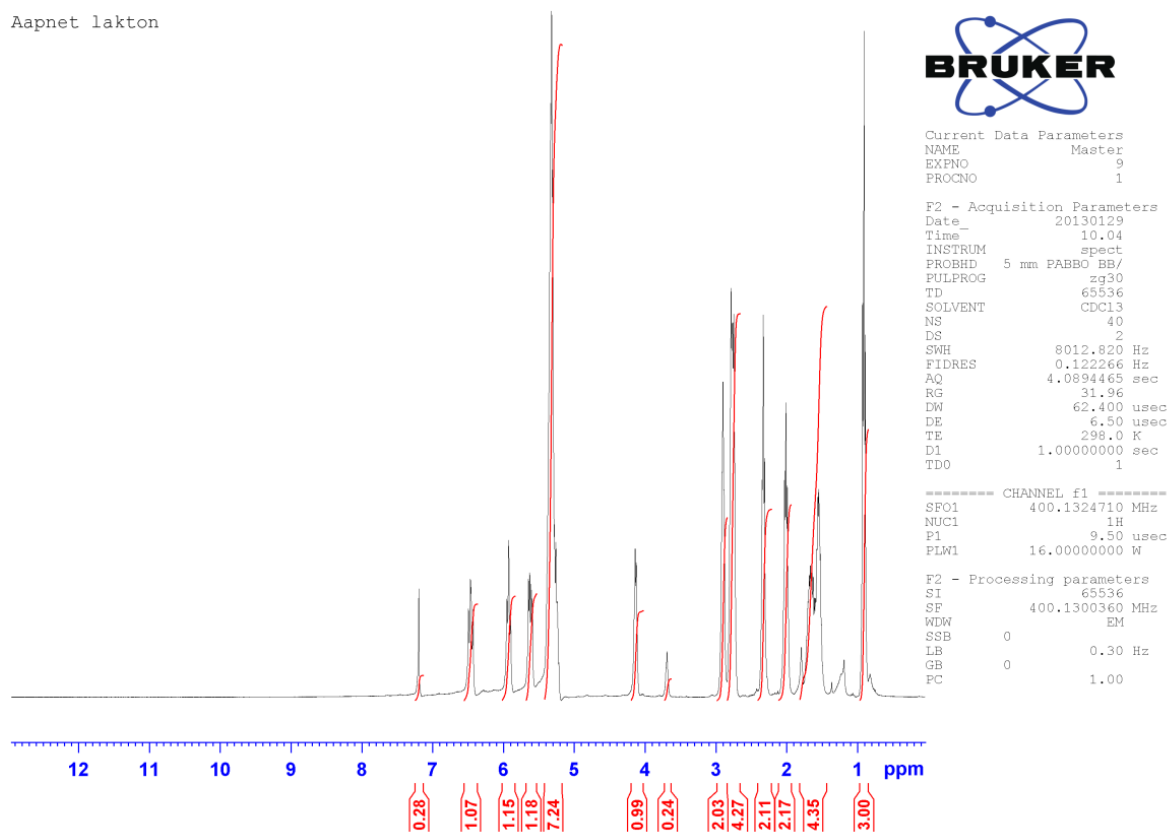
**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,91 (t, J=7,5 Hz, 3H), 1,46-1,75 (m, 4H), 2,01 (t, J=6,9 Hz, 2H), 2,33 (t, J= 6,9 Hz, 2H), 2,70-2,85 (m, 4H), 2,90 (t, J= 5,54 Hz, 2H), 4,13 (m, 1H), 5,20-5,40 (m, 7H), 5,60 (dd, J= 15,1, 6,7 Hz, 1H), 5,92 (t, J= 10,6 Hz, 1H), 6,45 (dd, J= 15,0, 11,2 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,28 (CH<sub>3</sub>), 20,57 (CH<sub>2</sub>), 20,58 (CH<sub>2</sub>), 25,56 (CH<sub>2</sub>), 25,65 (CH<sub>2</sub>), 26,10 (CH<sub>2</sub>), 33,70 (CH<sub>2</sub>), 36,36 (CH<sub>2</sub>), 72,40 (CH), 125,84 (CH), 126,99 (CH), 127,51 (CH), 127,77 (CH), 127,87 (CH), 128,66 (CH), 128,70 (CH), 130,66 (CH), 132,12 (CH), 135,76 (CH), 179,09 (CO)

**IR (film):** 3014 (s), 2965 (s), 1709 (s) cm<sup>-1</sup>

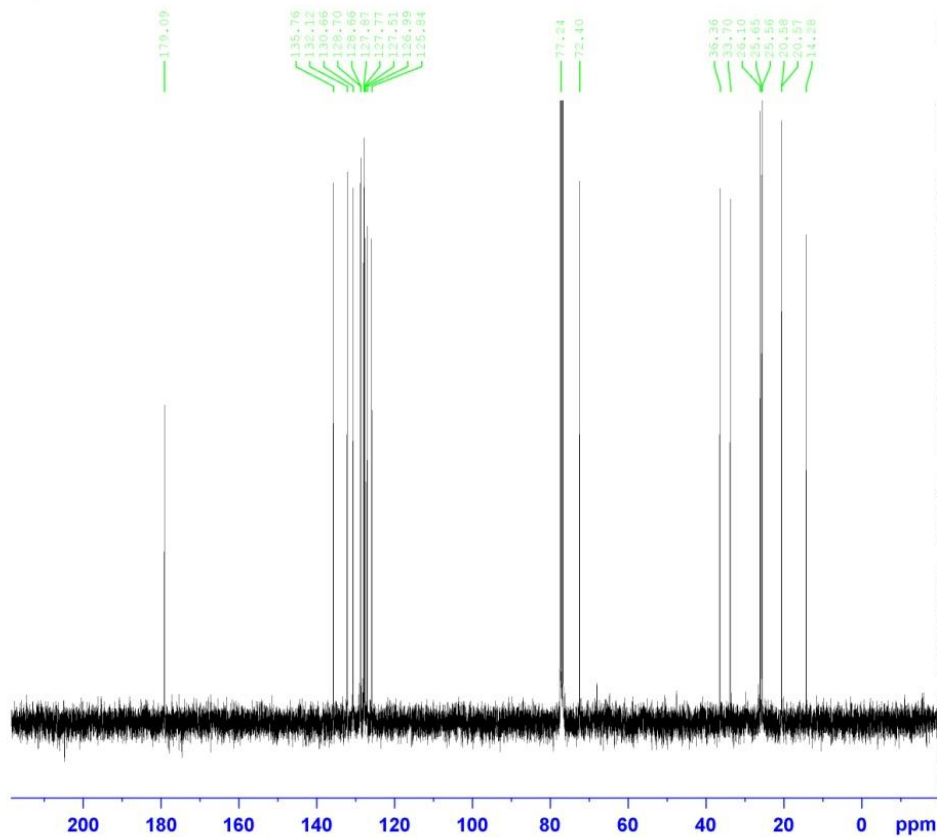
Det kan ses noe løsemiddel (heksan) i <sup>1</sup>H NMR spekteret.

Aapnet lakton



**Spekter 5.7.** <sup>1</sup>H NMR spekter av 5-HEPE (16)

Aapnet C



```
Current Data Parameters
NAME          Master
EXPNO         11
PROCNO        1

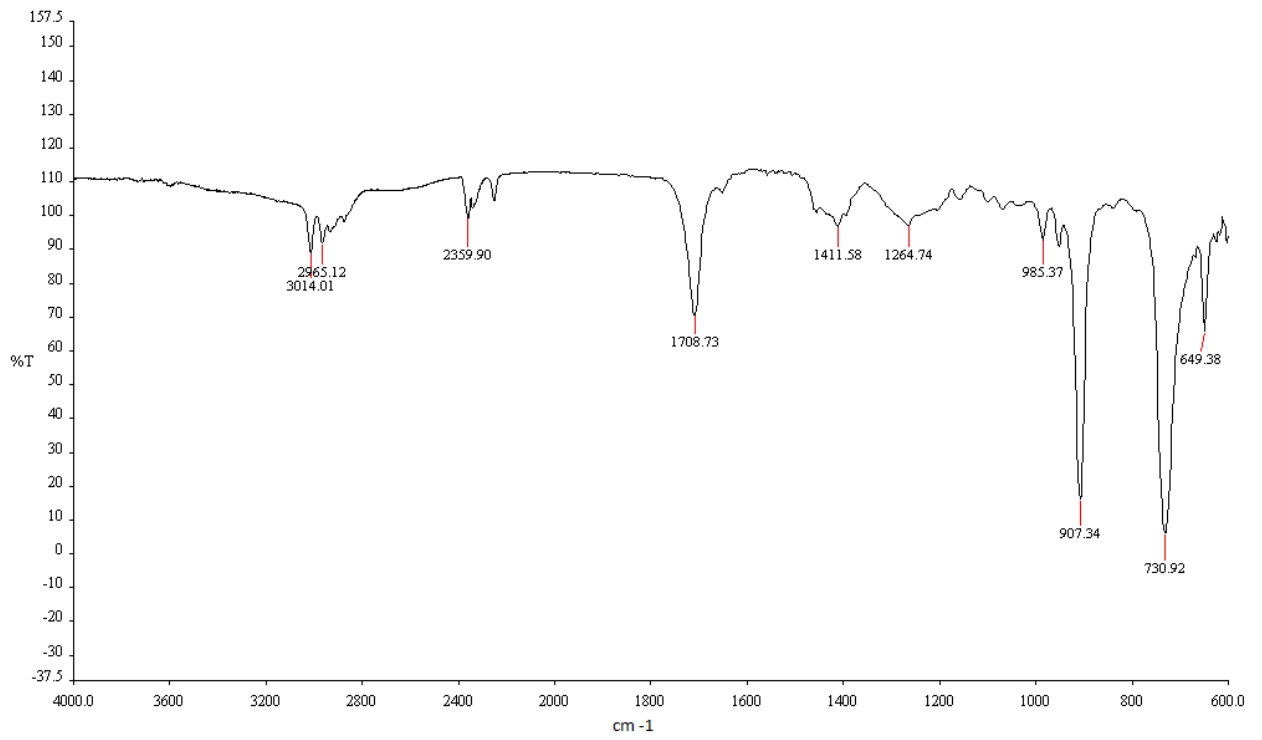
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20130129
Time_         12.45
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm PABBO BB/
PULPROG       zgpg30
TD            65536
SOLVENT       CDCl3
NS            128
DS            4
SWH           24038.461 Hz
FIDRES        0.366798 Hz
AQ            1.3631488 sec
RG            200.28
DW            20.800 usec
DE            6.50 usec
TE            298.0 K
D1            2.00000000 sec
D11           0.03000000 sec
TD0           1

----- CHANNEL f1 -----
SF01          100.6228293 MHz
NUC1           13C
P1             7.50 usec
PLW1          107.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02          400.1316005 MHz
NUC2           1H
CPDPRG[2]     waltz16
PCPD2         80.00 usec
PLW2          16.00000000 W
PLW12         0.24300000 W
PLW13         0.14440000 W

F2 - Processing parameters
SI            32768
SF            100.6127690 MHz
WDW           EM
SSB           0
LB            1.00 Hz
GB            0
PC            1.40
```

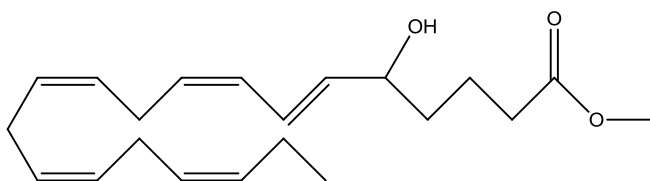
Spekter 5.8.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av 5-HEPE (16).



**Spekter 5.9.** IR spekter av 5-HEPE (16).



## 5.5 Syntese av (6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-metyl-5-hydroksy-6,8,11,14,17-eikosapentaenoat (31)



$C_{21}H_{32}O_3$

Mw= 332,24

Utbytte= 89%

Det ble tilsatt  $Et_3N$  (1,1 ml, 7,6 mmol) og  $CH_3OH$  (48,6 ml) til en løsning av **35** (827  $\mu$ l, 2,5 mmol). Reaksjonsblandingen stod under omrøring i 6 timer ved romtemperatur.

Produktløsningen ble oppkonsentrert på rotavaporen og deretter rensed ved flash kromatografi.

Som eluent ble en løsning på 7,5% og 10% etylacetat i benzen benyttet.  $R_f$ -verdi for **31** var 0,46 i en 25% løsning av etylacetat i benzen. Oppnådd produkt var en klar olje. Denne forbindelsen er kjent fra før.<sup>52-53</sup>

Analysen av enantiomere **31R** og **31S** ble utført med et gradient program oppgitt i Tabell 1.

**Tabell 1.** Prosentandel isopropanol som ble benyttet som gradient eluent.

Tid (min)	Isopropanol (%)
0,0	0,0
7,5	0,5
15,0	1,0
20,0	1,5
25,0	2,0
35,0	2,5
50,0	5,0
80,0	7,0

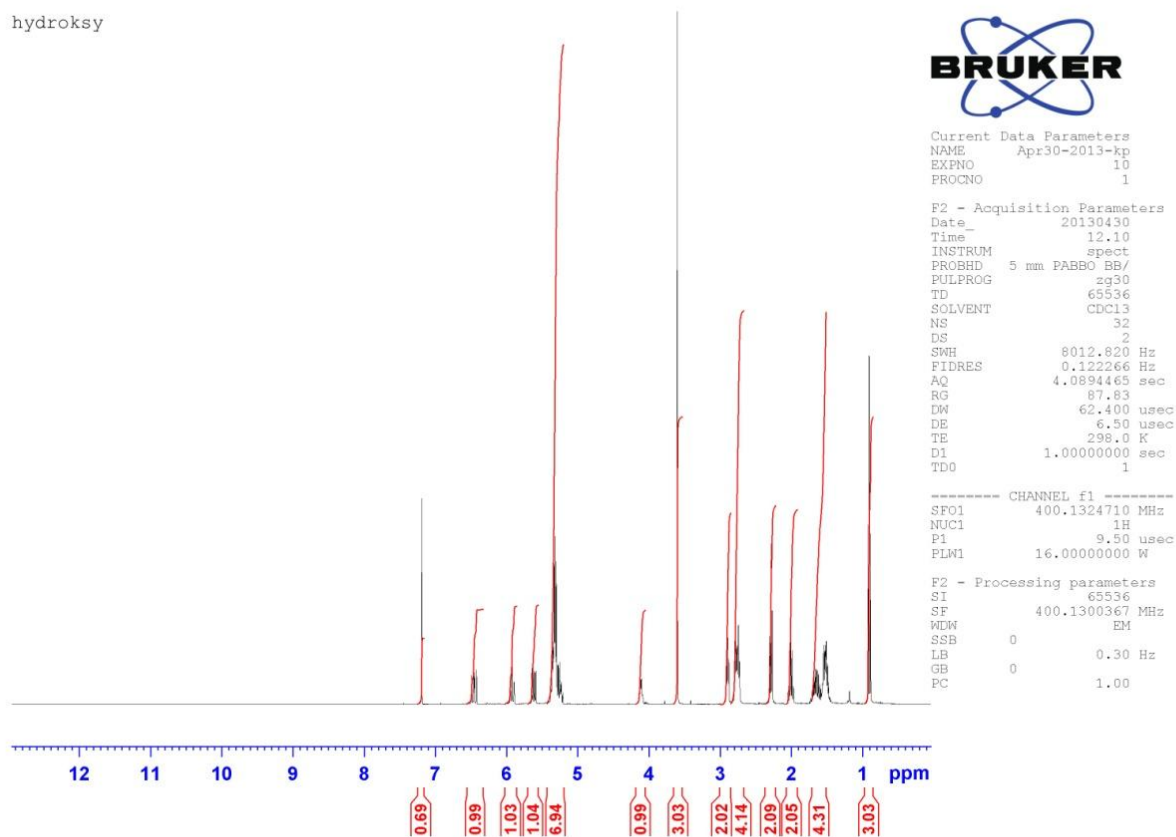
Data:<sup>52-53</sup>

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0,91 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,44-1,73 (m, 4H), 2,00 (m, 2H), 2,29 (t, J= 7,3 Hz, 2H), 2,75 (dt, J= 8,6, 5,7 Hz, 4H), 2,90 (t, J= 6,7 Hz, 2H), 3,60 (s, 3H), 4,12 (k, J= 6,2 Hz, 1H), 5,20-5,40 (m, 7H), 5,62 (dd, J= 15,2, 6,8 Hz, 1H), 5,92 (t, J=11,0 Hz, 1H), 6,25 (dd, J= 15,2, 11,1 Hz, 1H)

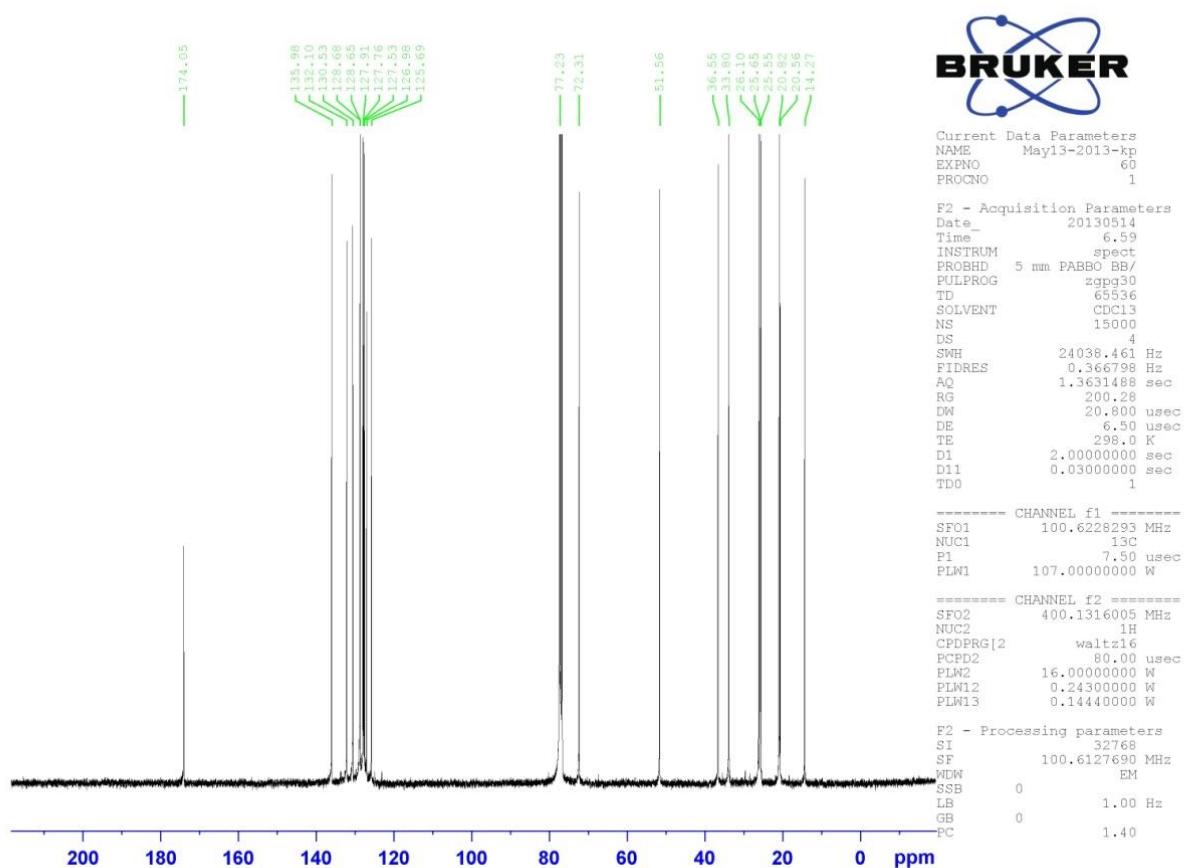
**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 14,27 (CH<sub>3</sub>), 20,56 (CH<sub>2</sub>), 20,82 (CH<sub>2</sub>), 25,55 (CH<sub>2</sub>), 25,65 (CH<sub>2</sub>), 26,10 (CH<sub>2</sub>), 33,80 (CH<sub>2</sub>), 36,55 (CH<sub>2</sub>), 51,56 (CH<sub>3</sub>), 72,31(CH), 125,69 (CH), 126,98 (CH), 127,53 (CH), 127,76 (CH), 127,91 (CH), 128,65 (CH), 128,68 (CH), 130,53 (CH), 132,10 (CH), 135,98 (CH), 174,05 (CO)

**IR (film):** 3012 (s), 2959 (s), 2924 (s), 1737 (s) cm<sup>-1</sup>

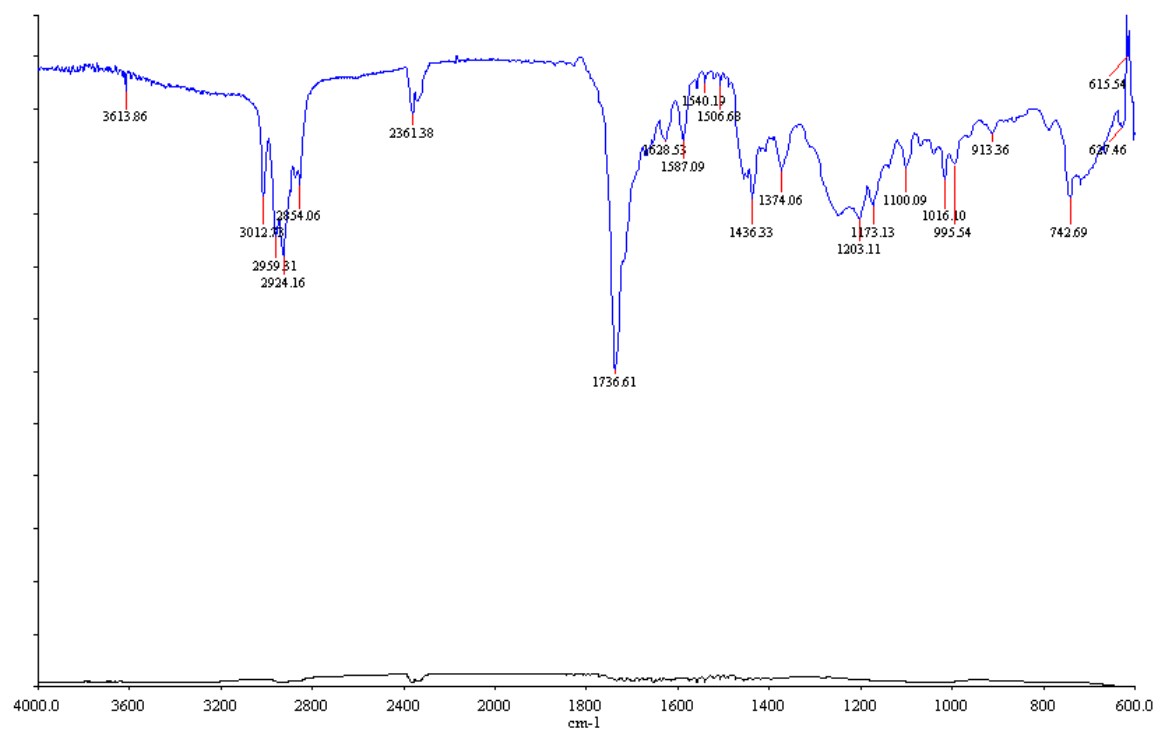
hydroksy



Spekter 5.10.  $^1\text{H}$  NMR spekter av hydroksymetylester 31.



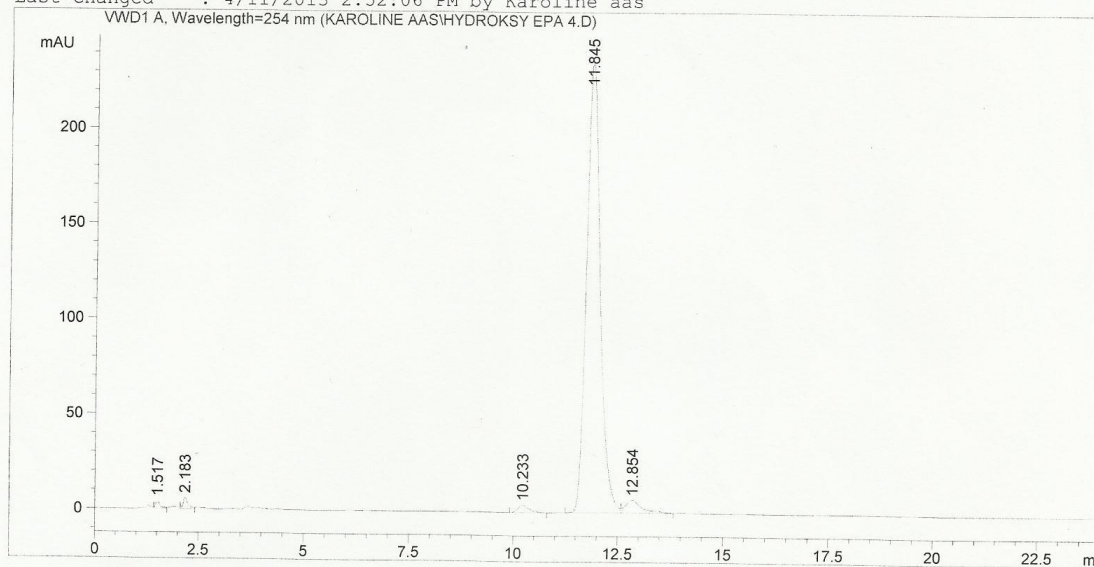
Spekter 5.11.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av hydroksymetylester **31**.



**Spekter 5.12.** IR spekter av hydroksymetylester **31**.

Data File D:\DATA\KAROLINE AAS\HYDROKSY EPA 4.D  
 Sample Name: Hydroksy EPA 4

=====  
 Acq. Operator : Karoline aas  
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1  
 Injection Date : 4/11/2013 2:27:40 PM Inj Volume : 5 µl  
 Acq. Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m  
 Last changed : 4/11/2013 2:26:19 PM by Karoline aas  
 Analysis Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m  
 Last changed : 4/11/2013 2:52:06 PM by Karoline aas



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

Sorted By : Signal  
 Multiplier : 1.0000  
 Dilution : 1.0000  
 Sample Amount : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)  
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.517	VV	0.1050	29.67996	4.23796	0.5220
2	2.183	VV	0.1167	47.10566	5.88181	0.8285
3	10.233	BB	0.2764	72.14597	3.88475	1.2689
4	11.845	BV	0.3455	5358.77295	236.80376	94.2462
5	12.854	VB	0.3964	178.22568	6.57431	3.1345

Totals : 5685.93021 257.38259

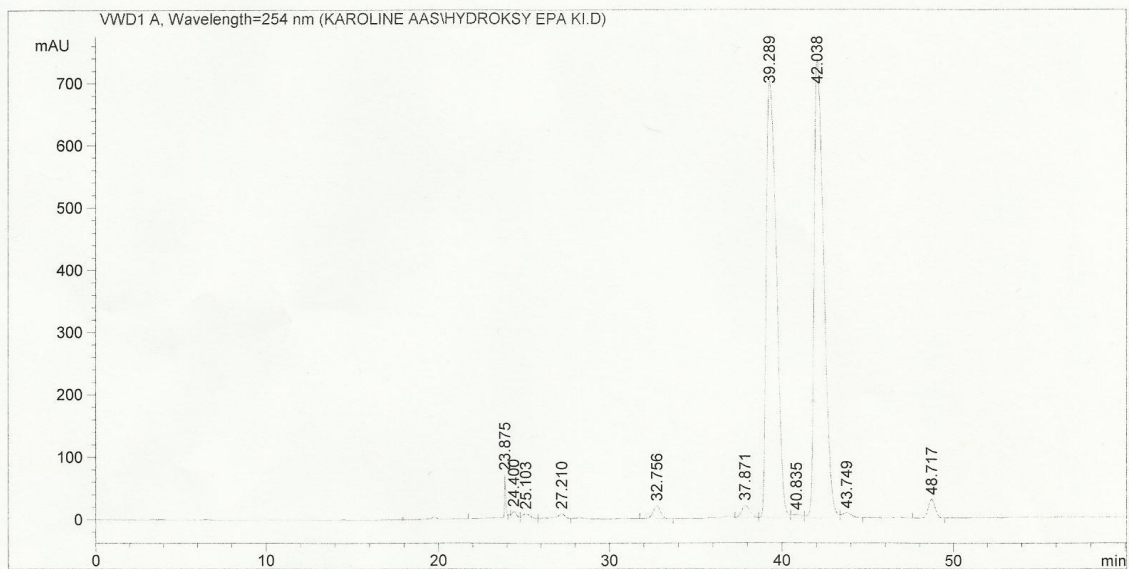
=====  
 \*\*\* End of Report \*\*\*

**Kromatogram 5.2. HPLC kromatogram av hydroksymetylester 31.**

Data File D:\DATA\KAROLINE AAS\HYDROKSY EPA KI.D  
 Sample Name: Hydroksy EPA ki

```

=====
Acq. Operator   : Karoline aas
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 5/2/2013 10:03:48 AM
Location       : Vial 1
Inj Volume     : 5 µl
Acq. Method    : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed   : 5/2/2013 10:02:48 AM by Karoline aas
Analysis Method: D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed   : 5/2/2013 11:09:18 AM by Karoline aas
Sample Info    :
  
```



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

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU	Area *s	Height [mAU]	Area %
1	23.875	BV	0.1025	535.19806		71.03289	0.8792
2	24.400	VV	0.3163	264.10406		12.14709	0.4338
3	25.103	VV	0.5083	285.93454		8.57683	0.4697
4	27.210	VV	0.5904	390.01575		8.89124	0.6407
5	32.756	VB	0.4571	620.24451		20.80193	1.0189
6	37.871	VV	0.5199	701.01642		20.56802	1.1516
7	39.289	VV	0.6673	2.81745e4		700.49719	46.2818
8	40.835	VV	0.5970	202.49382		5.08543	0.3326
9	42.038	VV	0.6250	2.85831e4		735.78204	46.9531
10	43.749	VB	0.5874	296.04996		7.59318	0.4863

Instrument 1 5/2/2013 11:10:52 AM Karoline aas

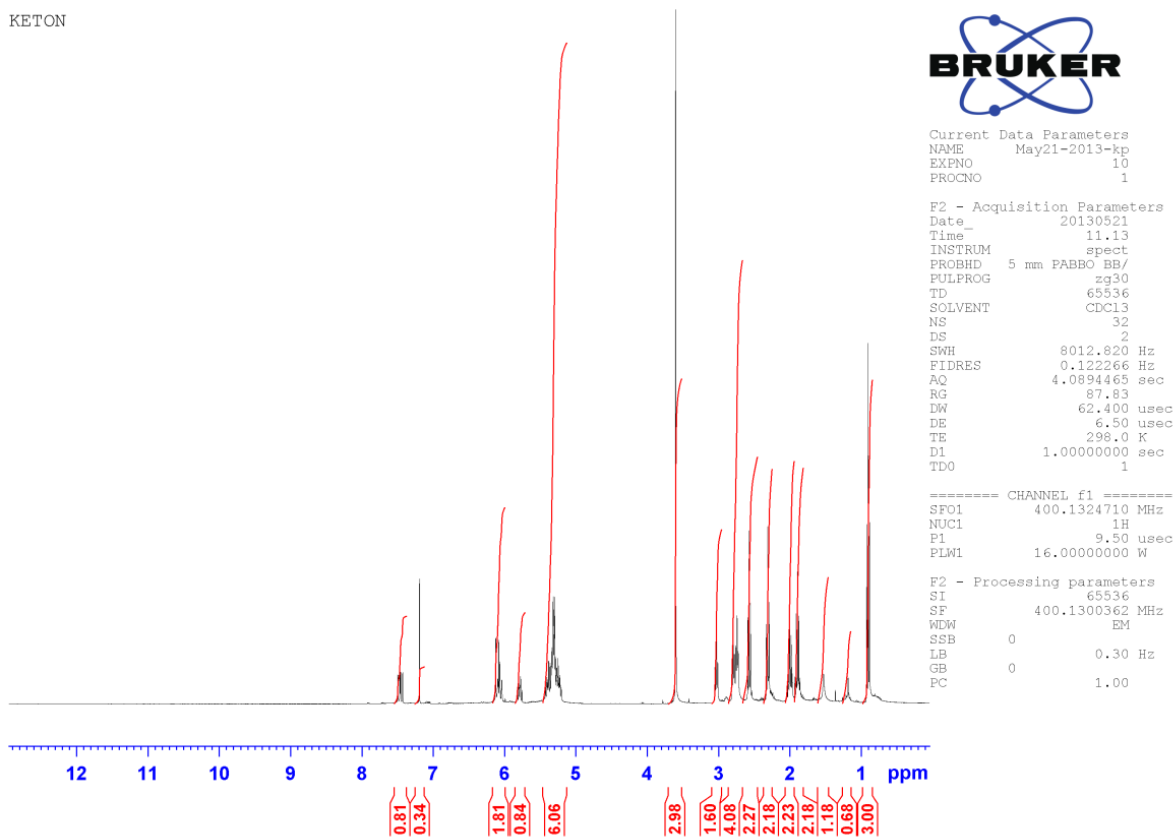
Page 1 of 2

**Kromatogram 5.3.** HPLC kromatogram av racemisk hydroksymetyler 31.



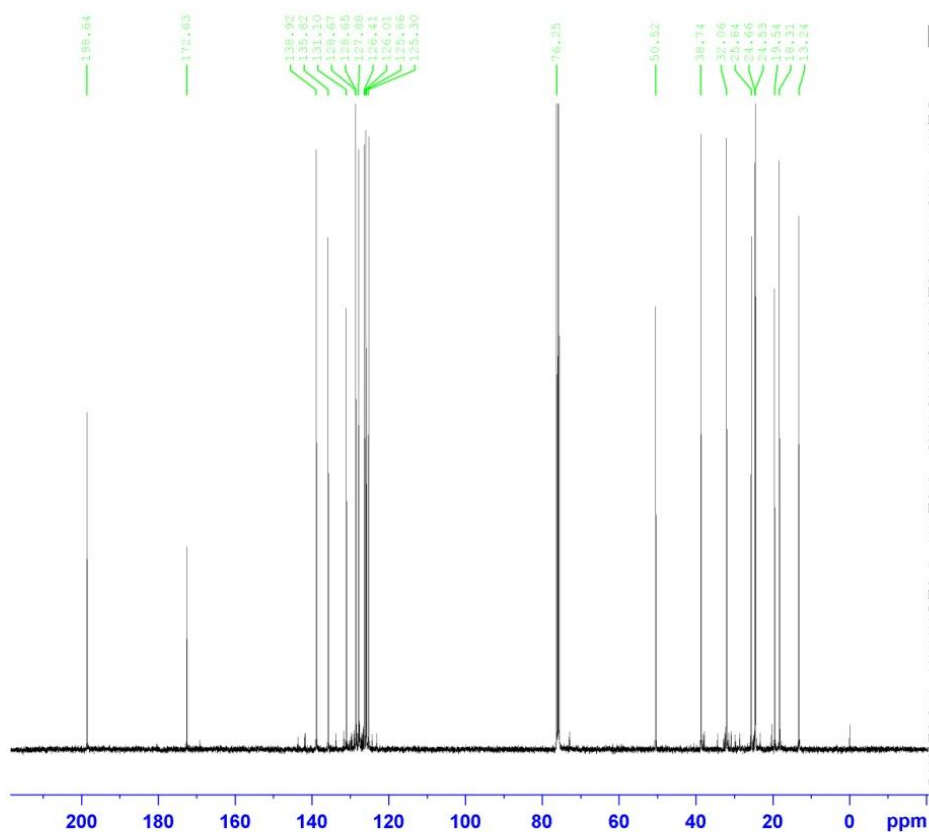


KETON



Spekter 5.13.  $^1\text{H}$  NMR spekter av ketometylester 36.

Keton karb



```
Current Data Parameters
NAME      Apr02-2013-kp
EXPNO     20
PROCNO    1

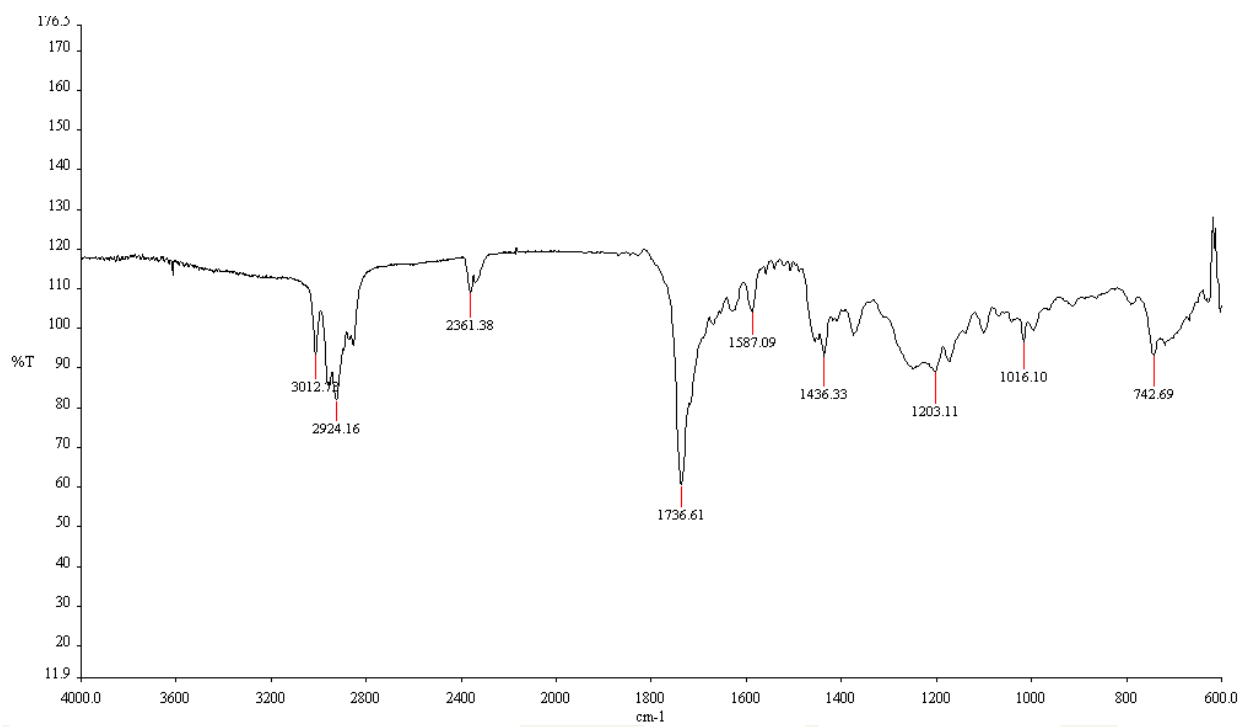
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130402
Time      10.49
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         1024
DS         4
SWH        24038.461 Hz
FIDRES     0.366798 Hz
AQ         1.3631488 sec
RG         200.28
DW         20.800 usec
DE         6.50 usec
TE         298.0 K
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
SF01      100.6228293 MHz
NUC1       13C
P1         7.50 usec
PLW1       107.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02      400.1316005 MHz
NUC2       1H
CPDPRG[2] waltz16
PCPD2     80.00 usec
PLW2      16.00000000 W
PLW12     0.24300000 W
PLW13     0.14440000 W

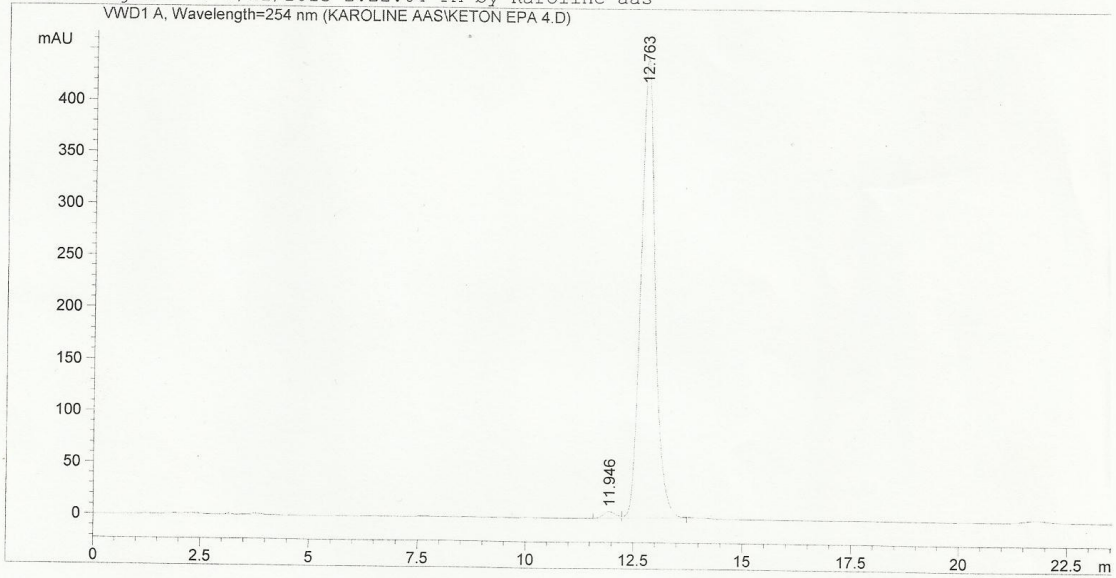
F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         100.6128707 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

Spekter 5.14.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av ketometyler 36.



**Spekter 5.15.** IR spekter av ketometyler 36.

=====  
Acq. Operator : Karoline aas  
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1  
Injection Date : 4/11/2013 1:58:02 PM Inj Volume : 5 µl  
Acq. Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m  
Last changed : 4/11/2013 1:56:34 PM by Karoline aas  
Analysis Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m  
Last changed : 4/11/2013 2:22:04 PM by Karoline aas  
=====



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

Sorted By : Signal  
Multiplier : 1.0000  
Dilution : 1.0000  
Sample Amount : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)  
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

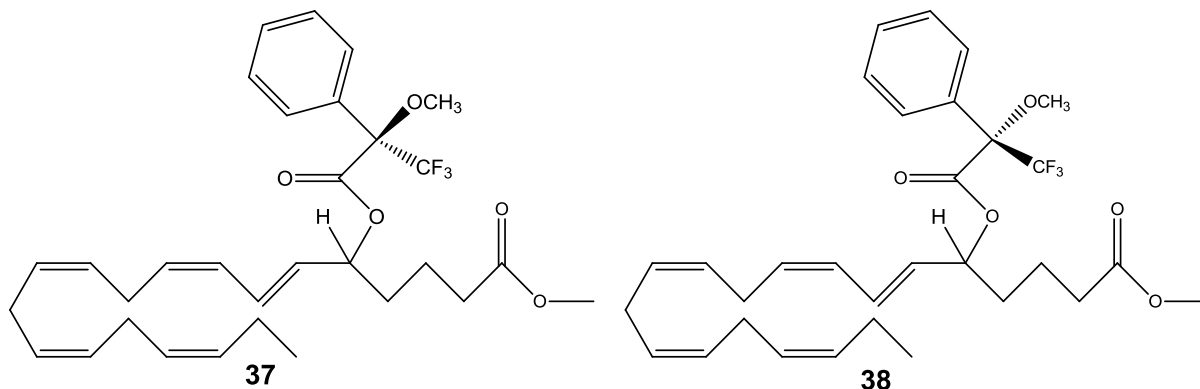
Signal 1: VWD1 A, Wavelength=254 nm

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU*s	Height [mAU]	Area %
1	11.946	BV	0.2972	124.97697	6.45661	1.2237
2	12.763	VB	0.3428	1.00883e4	443.01489	98.7763

Totals : 1.02133e4 449.47150

=====  
\*\*\* End of Report \*\*\*  
=====

**5.7 Syntese av (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-(((*S*)-3,3,3-trifluor-2-metoksi-2-fenylpropanoyl)oksi)-6,8,11,14,17-eikosapenaenoat (37) og (6*E*,8*Z*,11*Z*,14*Z*,17*Z*)-metyl-5-(((*R*)-3,3,3-trifluor-2-metoksi-2-fenylpropanoyl)oksi)-6,8,11,14,17-eikosapenaenoat (38)**



**C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>F<sub>3</sub>O<sub>5</sub>**

**M<sub>w</sub>**= 548,63

Alkohol **31** (69,3 mg, 0,13 mmol), tørr pyridin (111 µl, 1,4 mmol) og tørr CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ble blandet i en rundkolbe og deretter ble *S*-syrekloridet (159 µl, mmol) tilsatt. Reaksjonsblandingen stod under røring i to timer ved romtemperatur. Deretter ble det tilsatt vann (7 ml) og produktet ble ekstrahert ut med dietyleter (21×3). Den organiske fasen ble tørket (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) og løsningsmidlene ble fjernet under vakuum på rotavapor.

Til opprensing av produktet ble flash kromatografi benyttet. Som eluent ble en løsning av etylacetat i heksan (1:40) benyttet. R<sub>f</sub>-verdiene var tilnærmet like, 0,44 i en 1:1 løsning av etylacetat i heksan for både forbindelse **37** og **38**.

Den samme prosedyren ble brukt til å syntetisere **38**, med unntak av at *R*-syrekloridet ble benyttet i stede for *S*-syrekloridet. Dette er nye forbindelser.

Data:

Forbindelse **37**:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,90 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,45-1,77 (m, 4H), 2,00 (k, J= 7,4 Hz, 2H), 2,20 (t, J=7,3 Hz, 1H), 2,26 (t, J=7,0 Hz, 1H), 2,76 (m, 4H), 2,86 (m, 2H), 3,48 (s

<sup>m</sup>/splitting, 3H), 3,59 (s <sup>m</sup>/splitting, 3H), 5,20-5,60 (m, 9H), 5,89 (t <sup>m</sup>/splitting, J= 10,9 Hz, 1H), 6,46-6,65 (6,46-6,54, m/ 6,54-6,65, dd= 14,9, 11,2 Hz, 1H), 7,32 (m, 3H), 7,44 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,27(CH<sub>3</sub>), 20,28 (CH<sub>2</sub>), 20,52 (CH<sub>2</sub>), 20,56 (CH<sub>2</sub>), 25,54 (CH<sub>2</sub>), 25,63 (CH<sub>2</sub>), 26,13 (CH<sub>2</sub>), 26,16 (CH<sub>2</sub>), 33,40 (CH<sub>2</sub>), 33,46 (CH<sub>2</sub>), 33,59 (CH<sub>2</sub>), 33,71 (CH<sub>2</sub>), 51,57 (CH<sub>3</sub>), 51,61 (CH<sub>3</sub>'), 55,47 (CH<sub>3</sub>), 55,54 (CH<sub>3</sub>'), 126,98 (CH), 127,17 (CH), 127,25 (CH), 127,32 (CH), 127,40 (CH), 127,65 (CH), 127,69 (CH), 128,35 (CH), 128,37 (CH), 128,75 (CH), 128,93 (CH), 128,99 (CH), 129,19 (CH), 129,25 (CH), 129,31 (CH), 129,56 (CH), 132,09 (CH), 132,25 (CH), 132,43 (CH), 132,51 (CH), 165,82(CO), 165,89(CO'), 173,43 (CO)

**IR (film):** 3015(s), 2956 (s), 1739 (s) cm<sup>-1</sup>

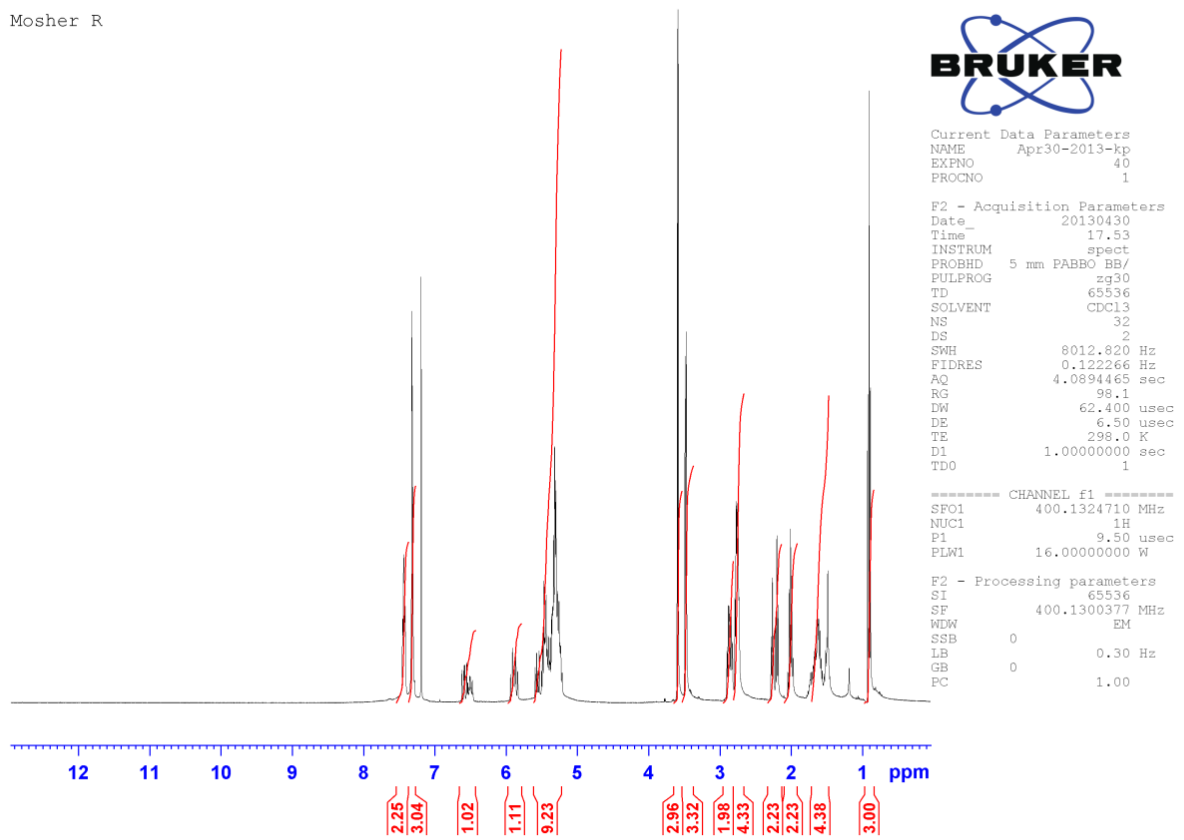
Forbindelse **38**:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 0,90 (t, J= 7,5 Hz, 3H), 1,43-1,75 (m, 4H), 2,00 (k, J= 7,4 Hz, 2H), 2,20 (t, J=7,3 Hz, 1H), 2,26 (t, J=7,0 Hz, 1H), 2,76 (m, 4H), 2,86 (m, 2H), 3,48 (s <sup>m</sup>/splitting, 3H), 3,59 (s <sup>m</sup>/splitting, 3H), 5,21-5,55 (m, 9H), 5,87 (t <sup>m</sup>/splitting, J= 10,8 Hz, 1H), 6,46-6,65 (6,46-6,54, m/ 6,54-6,65, dd= 14,9, 11,2 Hz, 1H), 7,32 (m, 3H), 7,43 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 14,28(CH<sub>3</sub>), 20,28 (CH<sub>2</sub>), 20,52 (CH<sub>2</sub>), 20,56 (CH<sub>2</sub>), 25,54 (CH<sub>2</sub>), 25,63 (CH<sub>2</sub>), 26,13 (CH<sub>2</sub>), 26,16 (CH<sub>2</sub>), 33,40 (CH<sub>2</sub>), 33,46 (CH<sub>2</sub>), 33,59 (CH<sub>2</sub>), 33,71 (CH<sub>2</sub>), 51,57 (CH<sub>3</sub>), 51,61 (CH<sub>3</sub>'), 55,46 (CH<sub>3</sub>), 55,53 (CH<sub>3</sub>'), 126,97 (CH), 127,17 (CH), 127,25 (CH), 127,32 (CH), 127,39 (CH), 127,65 (CH), 127,69 (CH), 128,35 (CH), 128,37 (CH), 128,75 (CH), 128,93 (CH), 128,99 (CH), 129,19 (CH), 129,24 (CH), 129,31 (CH), 129,56 (CH), 132,09 (CH), 132,25 (CH), 132,43 (CH), 132,51 (CH), 165,81(CO), 165,89(CO'), 173,43 (CO)

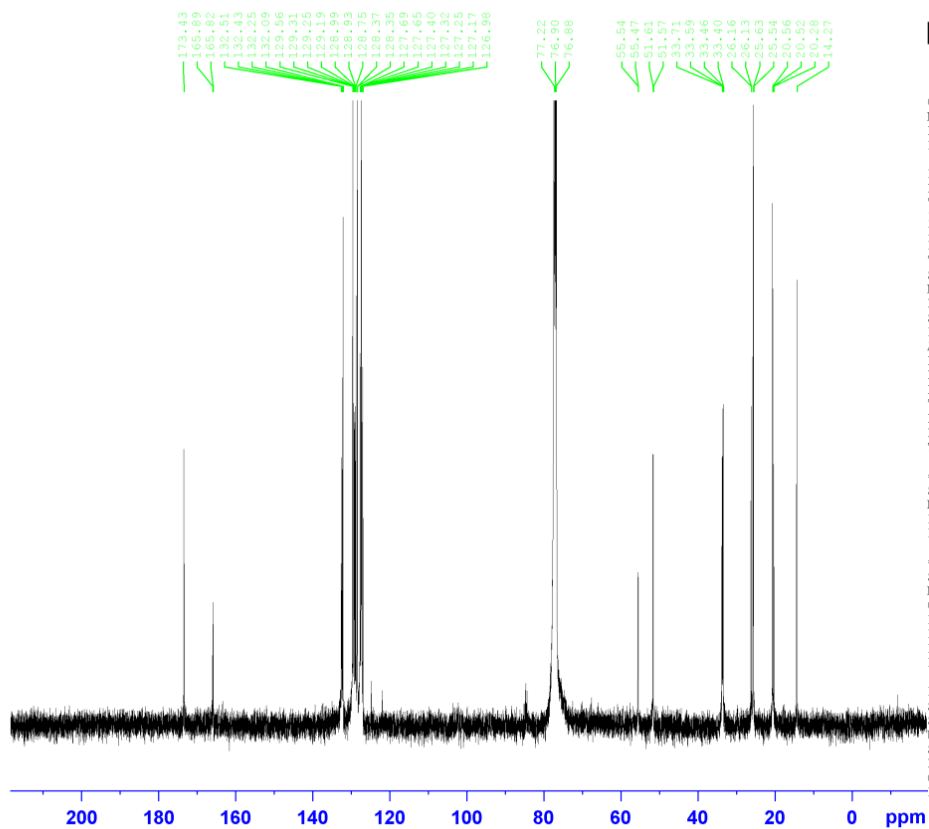
**IR (film):** 3014 (s), 2963 (s), 1738 (s) cm<sup>-1</sup>

Mosher R



Spekter 5.16.  $^1\text{H}$  NMR spekter av forbindelse 37.

Mosher R



Current Data Parameters  
NAME Apr30-2013-kp  
EXPNO 41  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20130501  
Time 9.50  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 16756  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3631488 sec  
RG 200.28  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.00000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
TD0 1

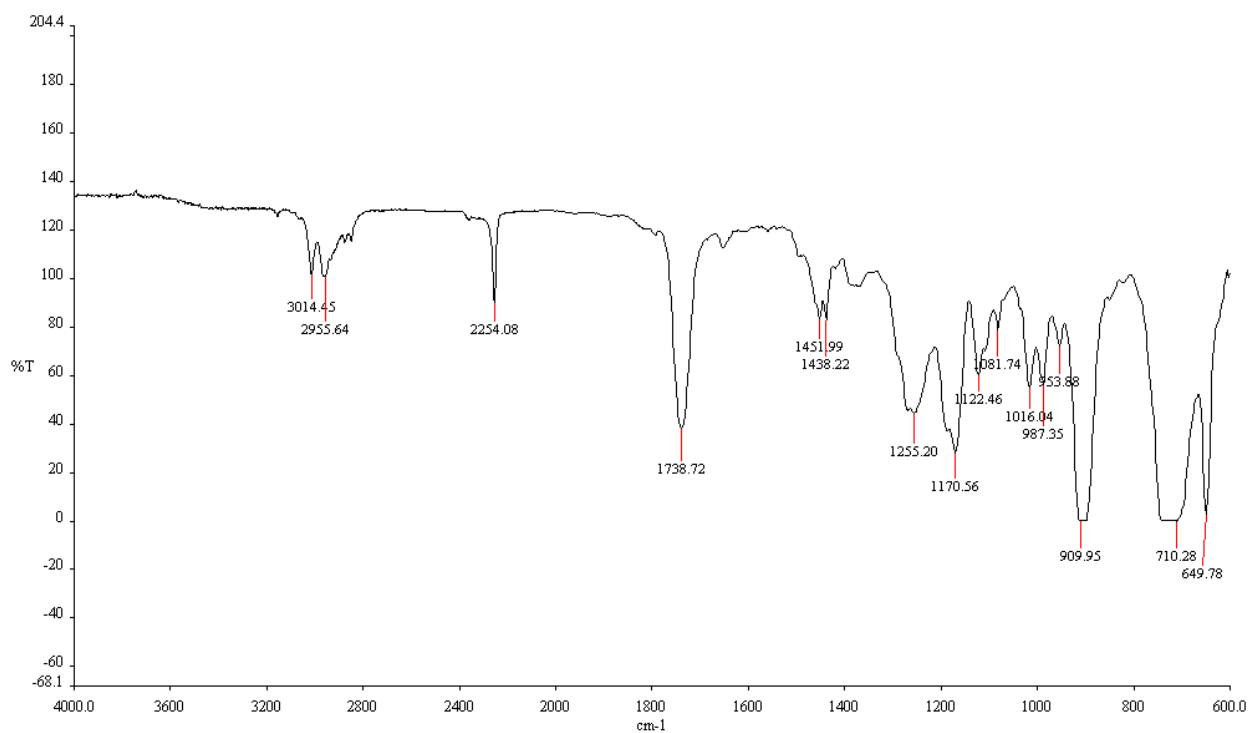
===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 100.6228293 MHz  
NUC1 13C  
P1 7.50 usec  
PLW1 107.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 400.1316005 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 80.00 usec  
PLW2 16.00000000 W  
PLW12 0.24300000 W  
PLW13 0.14440000 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.6127690 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Spekter 5.17.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av forbindelse 37.



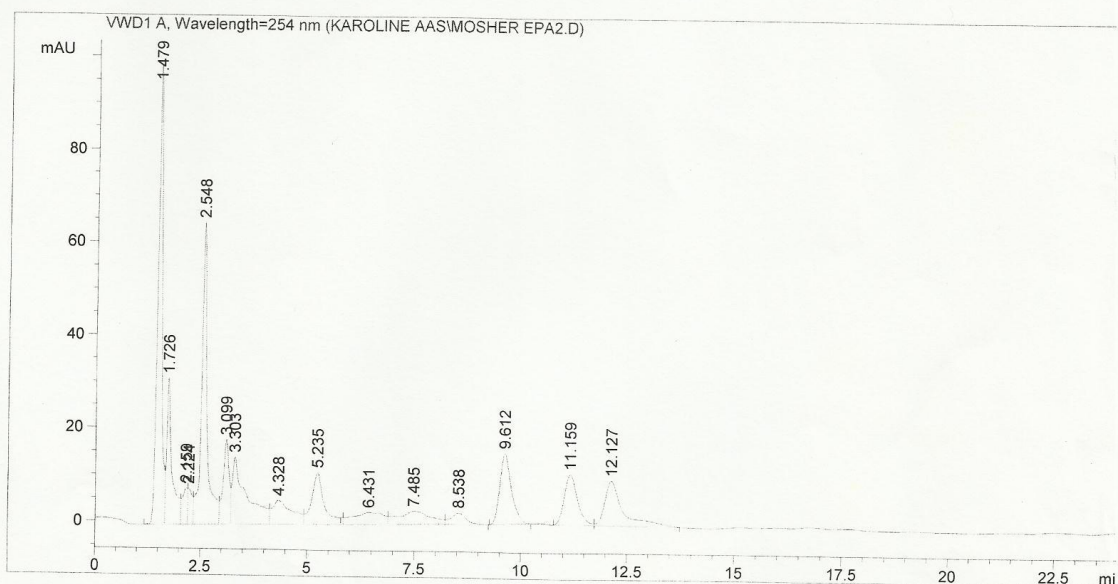


**Spekter 5.18.** IR spekter av forbindelse 37.

Data File D:\DATA\KAROLINE AAS\MOSHER EPA2.D  
 Sample Name: Morsher EPA2

```

=====
Acq. Operator   : Karoline aas
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date  : 4/15/2013 10:52:04 AM
Location       : Vial 1
Inj Volume     : 5 µl
Acq. Method    : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed   : 4/15/2013 10:50:48 AM by Karoline aas
Analysis Method : D:\METHODS\Jorn\C18 isokratisk.m
Last changed   : 4/15/2013 11:16:42 AM by Karoline aas
Sample Info    :
=====
  
```



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

```

Sorted By      : Signal
Multiplier     : 1.0000
Dilution       : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```

Signal 1: WVD1 A, Wavelength=254 nm

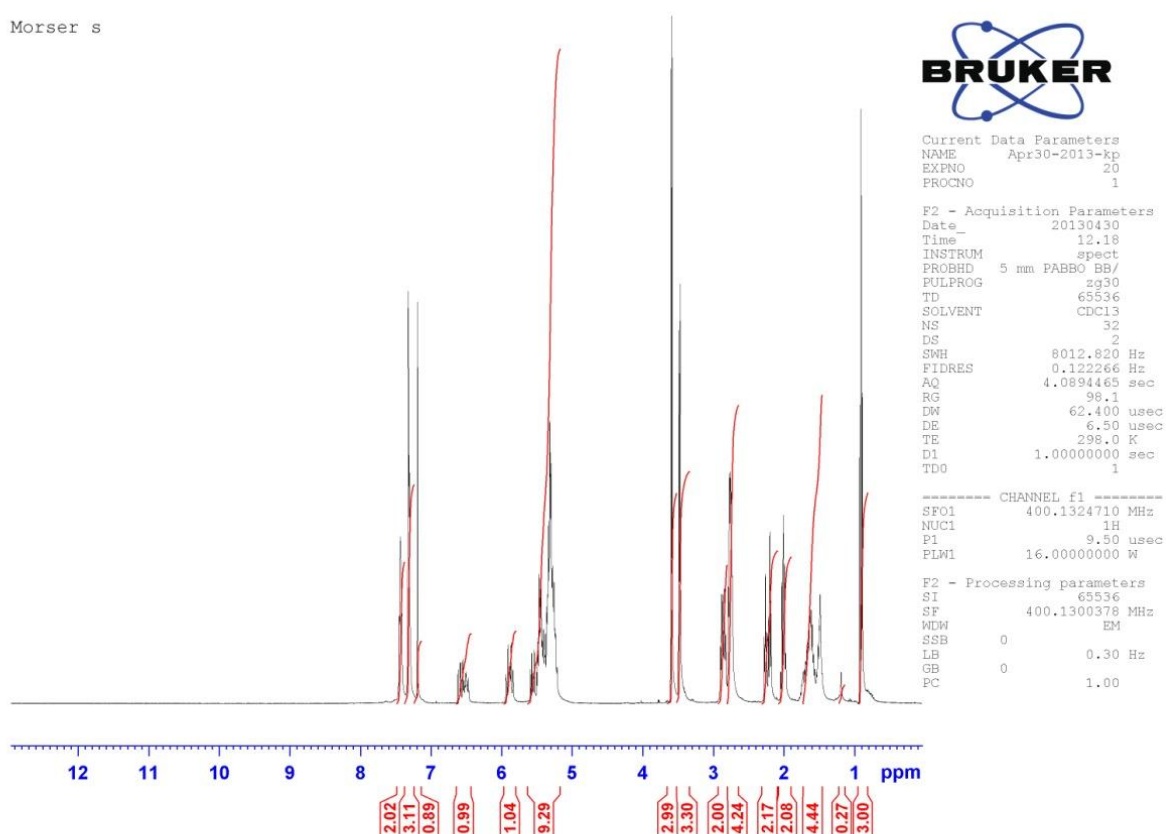
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area mAU *s	Height [mAU]	Area %
1	1.479	BV	0.1128	735.05707	99.01577	19.3398
2	1.726	VV	0.1202	279.44162	31.28074	7.3523
3	2.159	VV	0.1125	64.98129	7.85338	1.7097
4	2.224	VV	0.1033	56.25201	7.64389	1.4800
5	2.548	VV	0.1316	609.83795	64.84210	16.0452
6	3.099	VV	0.1409	177.35245	18.03275	4.6663
7	3.303	VB	0.3018	342.37592	14.34430	9.0081
8	4.328	BV	0.4407	164.85240	5.08676	4.3374
9	5.235	VB	0.2809	224.39302	11.10396	5.9039
10	6.431	BV	0.6282	127.80393	2.58300	3.3626

Instrument 1 4/15/2013 11:17:30 AM Karoline aas

Page 1 of 2

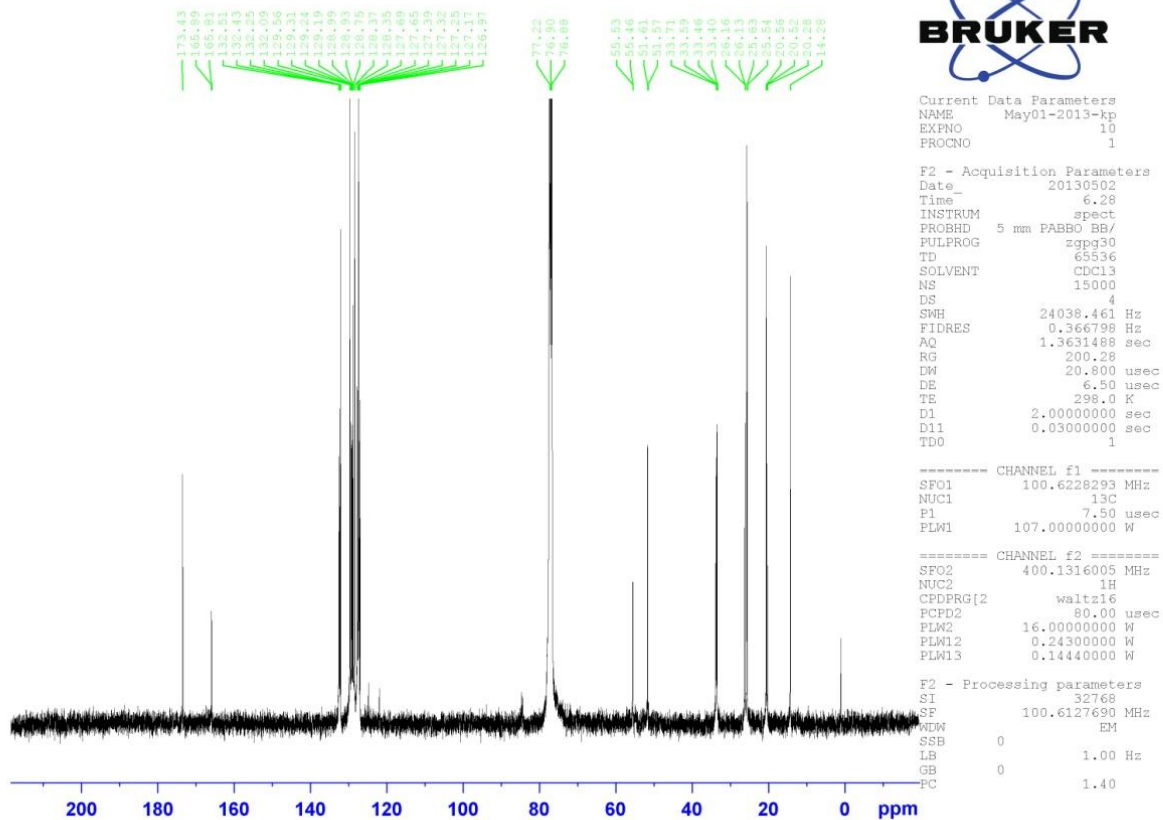
**Kromatogram 5.5.** HPLC kromatogram av Mosher-ester 37 før rensing.

Morser s

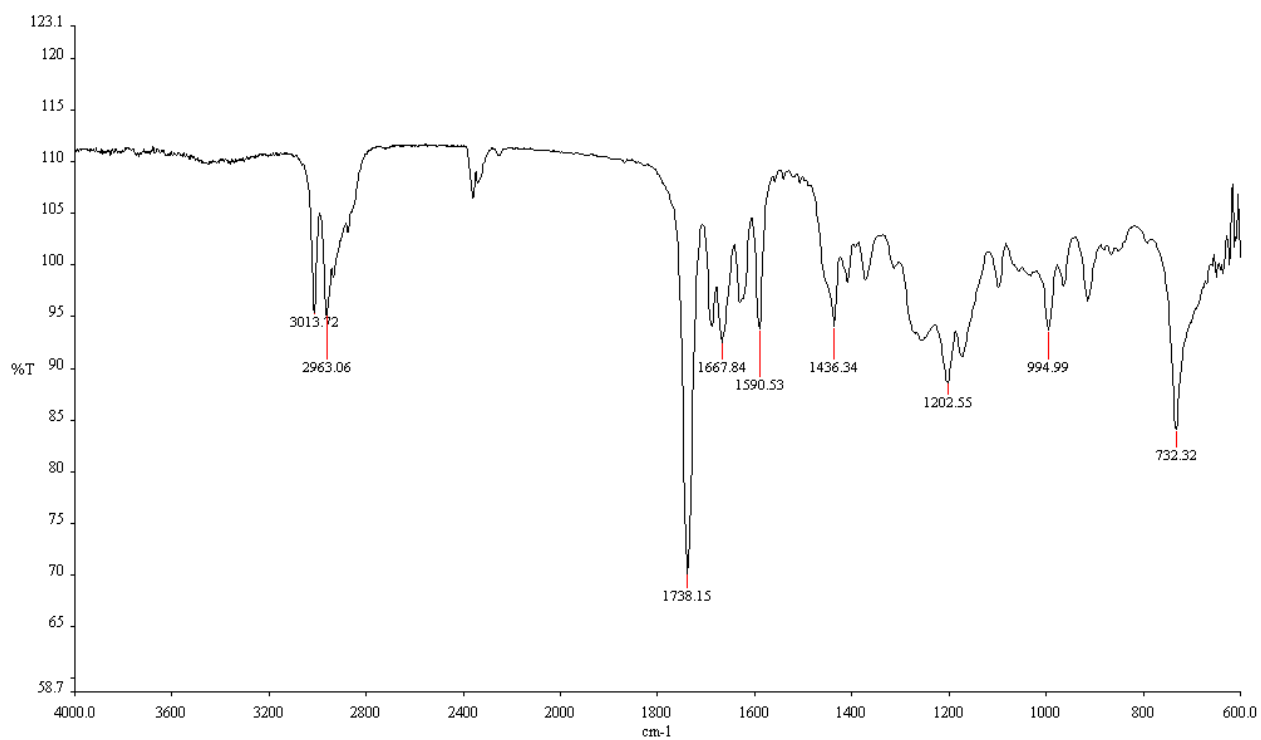


Spekter 5.19.  $^1\text{H}$  NMR spekter av forbindelse 38.

Mosher S

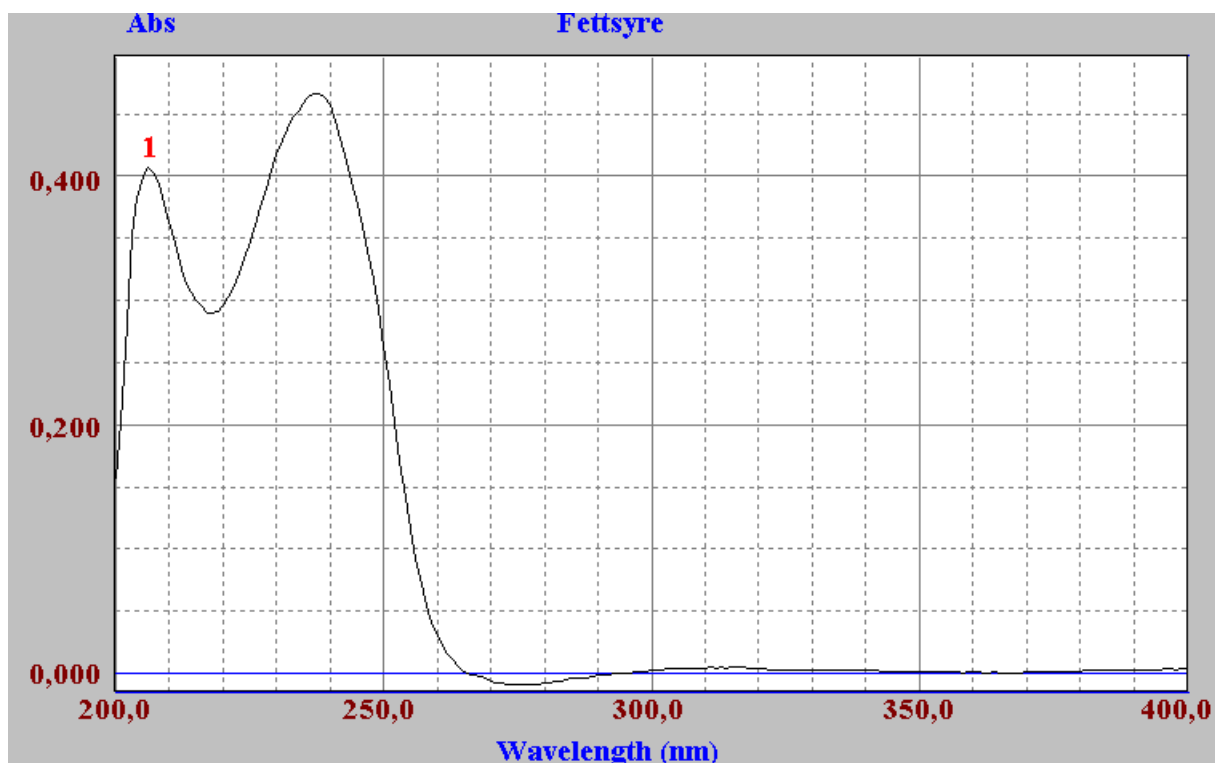


Spekter 5.20.  $^{13}\text{C}$  NMR spekter av forbindelse 38.

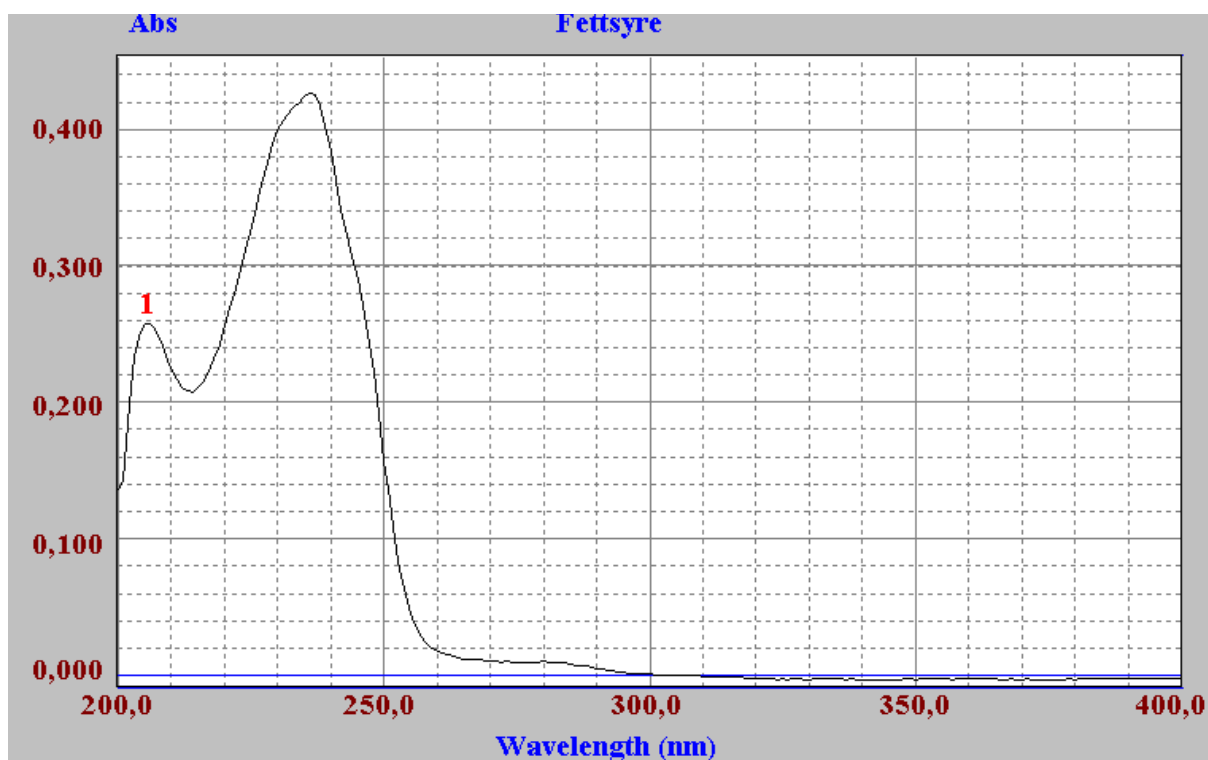


**Spekter 5.21.** IR spekter av forbindelse 38.

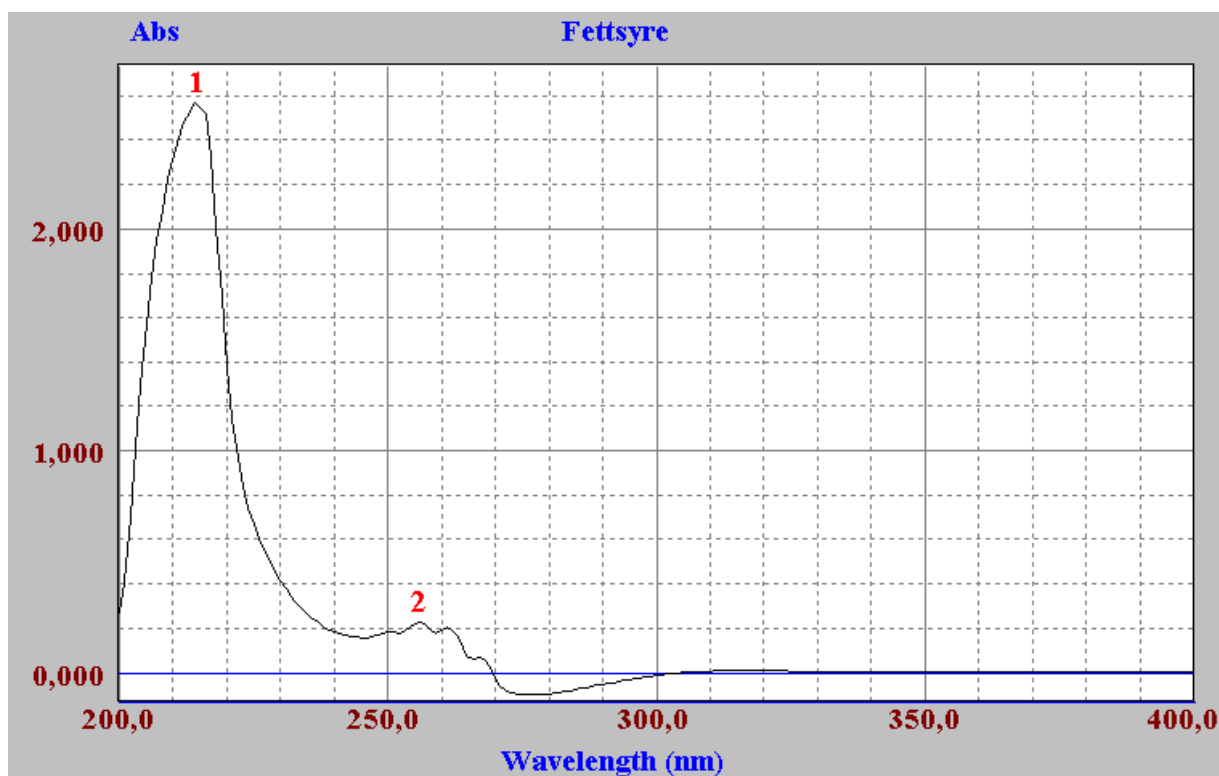
## 6.Vedlegg



Spekter 7.1. UV spekter av metylhydroksy 31,  $\lambda_{max}=236$  nm.



Spekter 7.2. UV spekter av Mosherester 37,  $\lambda_{max}=237$  nm.



**Spekter 7.3.** UV spekter av Mosher reagens,  $\lambda_{max}=214$  og  $262$  nm.

$$\epsilon_{31} = 30582$$

$$\epsilon_{37} = 27267$$

$$\epsilon_{\text{Mosher reagens}} = 1) 6500, 2) 201$$

## 7. Referanser

1. Dewick, P. M. "Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach", 3<sup>rd</sup> Edition; John Willey and sons: New York; 2009, Chapter 3 The Acetate Pathway: Fatty Acids and Polyketides, s 39-135.
2. Mathews, C. K.; van Holde, K. E.; Ahern, K. G.; *Biochemistry*. 3.ed.; Addison Wesley Longman: San Francisco, 2000; s 627-664.
3. (a) NRK Guide til omega-3.; <http://www.nrk.no/helseEforbrukEogElivsstil/1.8082029> (accessed 17.04.2013); (b) Aftenposten Omega-3 hjelper ikke hjertet likevel.; <http://www.aftenposten.no/helse/OmegaE3EhjelperEikkeEhertetElikeveIE6992706.html> (accessed 17.04.2013).
4. Zhou, D.; Ghebremeskel, K.; Crawford, M.A.; Reifen, R. *Lipids* 2006, 41, s. 213-219.
5. Huang, S.; Van Veldhoven, P. P.; Vanhoutte, F.; Parmentier, G.; Eyssen, H. J.; Mannaerts, G. P., *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 296, (1), s. 214-232.
6. Nelson, D. L.; Cox, M. M., *Lehninger principles of biochemistry*. 2. utg. W.H Freeman and company. **2005**, ISBN 0-7167-4339-6, s. 631-652.
7. Casteels, M.; Foulon, V.; Mannaerts, G. P.; Van Veldhoven, P. P. *Eur. J. Biochem.*, 2003, 270, s. 1619-1627.
8. Simopoulos, A. P., *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 70 (3), s. 560-569.
9. de Deckere, E. A. M.; Korver, O.; Verschuren, P. M.; Katan, M. B., *Eur. J. Clin. Nutr.* **1998**, 52, s. 749-753.
10. Ryouta, K.; Kazuya, T.; Shuichi, H.; Itaru, K, Shigeki, T.; *Biochem and Biophys. Res. Comm.*, 416 **2011**, s. 58-63
11. Horrocks, L. A.; Yeo, Y. K., *Pharmacol. Res.* **1999**, 40, (3), s. 211-225
12. Riediger, N. D.; Othman, R. A.; Suh, M.; Moghadasian, M. H., *J. Am. Diet. Assoc.* **2009**, 109, (4), s. 668-679.
13. Sublette, M. E.; Hibbeln, J. R.; Galfalvy, H.; Oqendo, M. A.; Mann, J. *J. Am. J. Psychiatry.* **2006**, 163, s. 1100-1102.
14. Simopoulos, A. P. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, s. 365-79.
15. Simopoulos, A. P. *Exp. Biol. Med.* **2008**, 233, s. 674-688.
16. Serhan, N. C.; Petasis, N. A.; *Chem. Rev.* **2012**, s A-V
17. Yokoyama, C.; Tanabe, T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1989**, 165, s. 888-849.
18. Funk, C.D.; Funk, L. B.; Kemmedy, M. E.; Pong, A.S.; Fitzgerald, G. A. *FASEB J.* 1991, 5, s. 2304-2312.
19. Hla, T.; Neilson, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89, s. 7384-7388.
20. Xie, W.; Robertson, D.L.; Simmons, D.L. *Drug Develop. Res.* **1992**, 25, s. 249-265
21. Kurumbail, R.G., et al., "Structural Grunnlag For Selektiv Hemming av Cyklooksygenase-2 av Anti-inflammatorisk agenter". *Nature*, **1996**, 384, s. 644-648.
22. Kennedy, B. P.; Diehl, R.E.; Boie, Y.; Adam, M.; Dixon, R. A. *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, s. 8511-8516.
23. Smith, W. L.; Murphy, R. C. "Biochemistry of Lipids. Lipoproteins and Membranes", (fjerde utg.) kapittel 13 "The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxyoksygease pathways", 2002, s. 341-371.
24. Tyagi, R.; Shimpukade, B.; Blättermann, S.; Kostenis, E.; Ulven, T. *Med. Chem. Commun.*, **2012**, 3, s. 195-198.
25. Nielsen, M.S.; Gammelmark, A.; Madsen, T.; Obel, T.; Aardestrup, I.; Schmidt, B. E. "Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids". **2012**, 87, s. 43-48
26. Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; Millis, K. A. "Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids". *Lipids*. **1995**, 30 s. 277-290.
27. Oger, C.; Balas, L.; Durand, T.; Galano, J-M. *Chem. Rev.* **2013**, 113, s. 1313-1350.



28. Osbond, J. M.; Wickens, J. C. *Chem. Ind. (London)*, **1959**, 1288.
29. Osbond, J. M.; Philpott, M. P. G.; Wickens, J. C. *J. Chem. Soc.* **1961**, s. 2779-2787.
30. Viala, J.; Santelli, M. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, s. 6121-6123
31. Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chem. Ber.* **1954**, *87*, s. 1318-1330.
32. Langseter, A. M.; Stenstrøm, Y.; Skattebøl, L.; *Submitted*.
33. Corey, J. E.; Wright, W. S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, s. 5980-5981.
34. Langseter, A. M. "The use of omega-3 polyunsaturated fatty acids in total syntheses of natural products (with methylene interrupted Z-double bonds)". UMB, Ås, **2013**
35. Mohamed, A. M. Y. "Synthesis and Biological Evaluation of Polyunsaturated Natural Products and Derivatives" Blindern, Oslo, **2013**.
36. Vik, A.; Hansen, T. V.; Holmeide, A. K.; Skattebøl, L. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, s. 2852-2854.
37. Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155.
38. Hirao, A.; Itsuno, S.; Nakahama, S.; Yamazaki, N. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, s. 315-317;
39. Corey, J. E.; Bakshi, K. R.; Shibata, S.; Chen, C-P.; Singh, K. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, s. 7925-7926.
40. Corey, J. E.; Helal, J. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, s. 1986-2012.
41. Noyori, R.; Ohkuma, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, s. 40-73.
42. Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, s. 512-519.
43. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Ishitsuka, M. O.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, s. 3147-3150.
44. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, s. 1296-1298.
45. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, s. 4092-4096.
46. Hoyer, R. T.; Jeffrey, S. C.; Shao, F. *Nature Protocols.* **2007**, *10*, s. 2451-2458.
47. Itoh, T.; Murota, I.; Yoshikai, K.; Yamada, S.; Yamamoto, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, s. 98-108.
50. Flock, S.; Lundquist, M.; Skattebøl, L. *Acta Chemica Scandinavica.* **1999**, *53*, s. 436-445.
51. Itoh, T.; Yoshimoto, N.; Yamamoto, K. *Fra Heterocycles.* **2010**, *80(1)*, s. 689-695.
52. Kuklev, V. D.; Smith, L. W. *Fra Chemistry and Physics of Lipids.* **2004**, *130(2)*, s. 145-158.
53. Holmeide, K, A.; Skattebøl, L.; Sydnæs, M. *Fra J. of the Chem. Soc. Perkin Transactions I.* **2001**, *16*, s. 1942-1946.