



Høgskulen  
på Vestlandet

# BACHELOROPPGÅVE

Framstilling og optimalisering av syntesen  
for legemiddelmolekylet prazikvantel

Preparation and optimization of the synthesis  
of the drug praziquantel

**Eline Flo Hoem**

**Renate Grønås Hjemdal**

Bachelor i ingeniørfag, kjemi

Fakultet for ingeniør- og naturvitenskap/Institutt for sikkerheit,  
kjemi- og bioingeniørfag/Kjemiingeniør/Studieretning  
miljøteknologi

22.05.2023

Eg stadfestar at arbeidet er sjølvstendig utarbeida, og at referansar/kjeldetilvisingar til alle  
kjelder som er brukt i arbeidet er oppgitt, jf. Forskrift om studium og eksamen ved Høgskulen på Vestlandet, § 12-1.

## Forord

Det er med stor glede å presentere denne bacheloroppgåva som er gjennomført og skreve av Eline Flo Hoem og Renate Grønås Hjemdal hos institutt for sikkerheit, kjemi- og bioingeniørfag / Kjemiingeniør / retning miljøteknologi ved HVL i Bergen.

Framstilling og optimalisering av legemiddelet prazikvantel blei først introdusert av Jarle Sidney Diesen. Vi valte denne oppgåva på grunn av vår store interesse for organisk kjemi og legemiddelkjemi, samt grøn kjemi. Alle eksperimenta blei utført på laboratoria ved HVL, Bergen, Norge.

Vi vil først gi en stor takk til hovudrettleiar Jarle Sidney Diesen for hans engasjement og støtte gjennom heile skriveprosessen og det eksperimentelle arbeidet. Jarle sin kunnskap og ekspertise innan dette fagfeltet har vore heilt uvurderleg for å fullføre denne oppgåva.

Vidare vil vi også takke ekstern rettleiar Hans-René Bjørsvik for hans verdifulle hjelp med det eksperimentelle designet og for ressursane han gjorde tilgjengeleg for oss. Vi ynskjer også å takke Marit Kristin Leiren, Torun Synnøve Skøld og Kari Grete Nordli Børve for opplæring og rettleiing av instrumenta på laboratoriet.

Til slutt vil vi også takke venar og familie for deira støtte og oppmuntring.

Bergen 22.05.2023

*Eline Flo Hoem*  
Eline Flo Hoem

*Renate Grønås Hjemdal*  
Renate Grønås Hjemdal

## Samandrag

Prazikvantel, også kjent som Biltricide, er eit legemiddel som blir nytta til behandling av parasittiske ormeinfeksjonar hos både menneskjer og dyr. I seinare tid har det blitt publisert ei rekke studiar som viser at prazikvantel ikkje berre har antiparasitts verknad, men at den også kan nyttast i kreftbehandling og til behandling av psoriasis. Eit studium publisert av Wu *et al.* i 2012 viser at prazikvantel kunne forbetre antikrefteffektiviteten til paclitaxel (taxol) i ulike kreftcellelinjer, inkludert paclitaxel-resistente cellelinjer. Dette bachelorprosjektet er basert på prazikvantel-syntesen rapportert av Dömling *et al.* i 2010. Prazikvantel-syntesen er ei attraktiv to-trinns syntese der totalutbytte for dei to trinna ligg på over 74 %. Det første trinnet er ein Ugi-multikomponentreaksjon som gir det open kjeda diamid-intermediatet. I det andre trinnet blir diamid-intermediatet behandla med metansulfonsyre ved 70°C i 6 timar til å gi ei dobbel ringslutning av type Pictet-Spengler syklisering under danninga av prazikvantel, med utbytte på > 75 %. Målet var å framstille prazikvantel og optimalisere det siste trinnet ved bruk av eksperimentelt design. For å kunne syntetisere prazikvantel måtte isocyanidet framstillast. Dömling *et al.* rapportert framstillinga av isocyanidet i eit 61 % utbytte, og i dette prosjektet blei utbytte 54 %. Diamid-intermediatet fekk eit utbytte på 77 % samanlikna med Dömling *et al.* sitt utbytte på 98 %. Det blei utført fem forsøk i det eksperimentelle designet der temperatur ( $X_1$ ) og substratkonsentrasjon ( $X_2$ ) blei regulert. Høg verdi (+1) av  $X_1$  blei sett til 80°C, null verdi (0) til 70°C og låg verdi (-1) til 60°C. For  $X_2$  blei høg verdi (+1) 0,08 g/ml, null verdi (0) 0,29 g/ml og låg verdi (-1) 0,50 g/ml. Volumet av løysemiddelet metansulfonsyre var likt for alle eksperimenta (7 ml). Det blei også utført to ytterlegare forsøk med alkohol og keton som løysemiddel. Det blei tatt ut prøver på 0,2 ml etter 3, 4,5 og 6 timar for å sjå korleis reaksjonen utvikla seg. Deretter blei det gjennomført HPLC-analysar på alle prøvene der ein fann kor mykje av utgangstoffet som blei omdanna til prazikvantel ved dei ulike tidspunkta. Den høgaste conversion blei oppnådd ved høg temperatur og høg substratkonsentrasjon, og vart 66,3 %. Eksperimentet utført under Dömling *et al.* sine vilkår fekk ein mykje lågare conversion på 30,0 %.

*Nøkkelord: Prazikvantel, syntese, optimalisering, Ugi-reaksjon, Pictet-Spengler reaksjon*

## Abstract

Praziquantel, also known as Biltricide, is a medication used to treat parasitic worm infections in both humans and animals. In recent years, several studies have shown that praziquantel not only has antiparasitic effects, but can also be used in cancer treatment and for treating psoriasis. A study published by Wu *et al.* in 2012 showed that praziquantel could improve the anti-cancer effectiveness of paclitaxel (taxol) in various cancer cell lines, including paclitaxel-resistant cell lines. This bachelor's project is based on the praziquantel synthesis reported by Dömling *et al.* in 2010. The praziquantel synthesis is an attractive two-step synthesis with a total yield of over 74%. The first step is a Ugi multicomponent reaction that produces the open-chain diamide intermediate. In the second step, the diamide intermediate is treated with methanesulfonic acid at 70°C for 6 hours to give a double ring closure via a Pictet-Spengler cyclization to form praziquantel, with a yield of >75%. The goal was to synthesize praziquantel and optimize the final step using experimental design. To synthesize praziquantel, the isocyanide had to be prepared. Dömling *et al.* reported a 61% yield for the preparation of the isocyanide, while in this project, the yield was 54%. The diamide intermediate had a yield of 77% compared to the yield of 98% reported by Dömling *et al.* Five attempts were conducted in the experimental design where temperature ( $X_1$ ) and substrate concentration ( $X_2$ ) were regulated. The high value (+1) for  $X_1$  was set at 80°C, the zero value (0) at 70°C, and the low value (-1) at 60°C. For  $X_2$ , the high value (+1) was 0.08 g/ml, the zero value (0) was 0.29 g/mL, and the low value (-1) was 0.50 g/mL. The volume of the solvent methanesulfonic acid was the same for all experiments (7 mL). Two additional experiments were also performed using alcohol and ketone as solvents. Samples of 0.2 mL were taken after 3, 4.5, and 6 hours to observe how the reaction developed. HPLC analyses were then conducted on all samples to determine the amount of starting material that was converted to praziquantel at the different time points. The highest conversion was achieved at a high temperature and high substrate concentration, which was 66.3%. The experiment performed under Dömling *et al.*'s conditions had a much lower conversion of 30.0%.

*Keywords: Praziquantel, synthesis, optimization, Ugi-reaction, Pictet-Spengler reaction*

## Forkortingar

API - Active Pharmaceutical Ingredients

B1 - Batch 1

B2 - Batch 2

B3 - Batch 3

DCM - Diklormetan

DoE - Eksperimentelt design

FT-IR - Fourier transform infraraud spektroskopi

GC-MS - Gasskromatografi-massespektrometri

HVL - Høgskulen på Vestlandet

*J* - Koblingskonstant i NMR

KCN - Kaliumcyanid

MCR - Multikomponent reaksjonar

MSA - Metansulfonsyre

NaOH - Natriumhydroksid

NMR - Kjernemagnetisk spinnresonans spektroskopi

ODS - Oktadekylsilan

*p*-TsOH – *para*-toluensyre

PZQ - Prazikvantel

R1 - Reaksjon 1

R2 - Reaksjon 2

R3 - Reaksjon 3

$R_f$  - Retensjonsfaktor

RPM - Rotasjon per minutt

RT - Romtemperatur

S - Schistosoma

t - timar

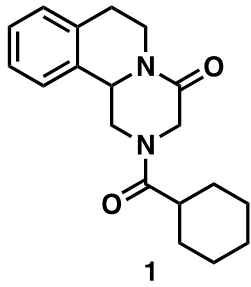
Min - minutt

TLC - Tynnsjiktiskromatografi

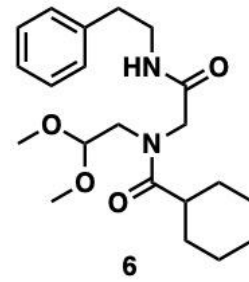
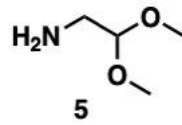
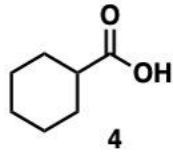
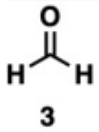
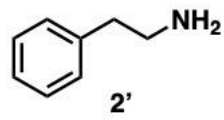
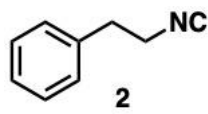
T1 - Start temperatur

T2 - Slutt temperatur

## Nummerering av molekyl



Prazikvantel



# Innholdsfortegnelse

Forord .....	II
Samandrag .....	III
Abstract .....	IV
Forkortingar .....	V
Nummerering av molekyl .....	VI
1 Introduksjon .....	1
1.1 Bakgrunn og tema .....	1
1.2 Problemstilling, hensikt, forskningsspørsmål og mål .....	5
2 Teori .....	8
2.1 Hofmann-karbylaminreaksjon .....	8
2.2 Firekomponent Ugi-reaksjon .....	9
2.3 Pictet-Spengler reaksjonen .....	10
2.4 Paclitaxel (taxol) .....	11
2.5 Synergieffekt mellom paclitaxel (taxol) og prazikvantel (PZQ) .....	12
2.6 Tidlegare syntesar av prazikvantel (PZQ) .....	12
2.6.1 Merck KG syntesen av prazikvantel (PZQ) .....	13
2.6.2 Shin Poong-syntesen av prazikvantel (PZQ) .....	14
2.7 Kromatografi .....	15
2.7.1 Tynnsjikt-kromatografi .....	15
2.7.2 Kolonnekromatografi .....	17
2.7.3 Væskrokromatografi .....	18
2.8 Spektroskopi .....	20
2.8.1 Kjernemagnetisk spinnresonans spektroskopi .....	20
2.8.2 Fourier-transform infraraud spektroskopi .....	21
2.9 Smeltepunktsbestemming .....	22
2.10 Eksperimentelt design og fleirvariabel modellering .....	22
3 Material og metode .....	25
3.1 Formlar og likningar .....	25
3.2 Instrumentering .....	26
3.3 Utstyr .....	27
3.4 Kjemikalier .....	28
3.5 Framgangsmåte .....	30
3.5.1 Syntese av (2-isocyanoetyl)benzen (2) ved hjelp av ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon .....	30
3.5.2 Syntese av <i>N</i> -(2,2-dimetoksy)- <i>N</i> -(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl)-sykloheksenkarboksamid (6) (Ugi-reaksjon) .....	32

3.5.3	Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, 1) (Pictet-Spengler reaksjon).....	33
4	Resultat og diskusjon .....	35
4.1	Syntese av (2-isocyanoetyl)benzen (2) ved hjelp av ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon .....	35
4.2	Syntesen av <i>N</i> -(2,2-dimetoksy)- <i>N</i> -(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl sykloheksenkarboksamid (6) (Ugi-reaksjon).....	39
4.3	Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, 1) (Pictet-Spengler reaksjon) .....	44
4.3.1	FT-IR og smeltepunktbestemming av prazikvantel (PZQ) .....	48
4.4	HPLC gradient førehandsundersøking .....	49
4.5	Eksperimentelt design.....	55
4.5.1	Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, 1) (Pictet-Spengler reaksjon).....	55
4.5.2	Lønsemd-analyse.....	63
5	Konklusjon .....	67
6	Framtidig arbeid .....	68
7	Referansar.....	69
8	Vedlegg .....	73
8.1	Utrekningar av utbytte og conversion .....	73
8.2	Gradientprogram versjon 1 .....	74
8.3	Gradientprogram versjon 2 .....	75
8.4	FT-IR spektrabase spekter av prazikvantel .....	76
8.5	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 1 .....	77
8.6	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 2 .....	79
8.7	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 3 .....	81
8.8	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 4 .....	83
8.9	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 5 .....	84
8.10	HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment Q1 og Q2. ....	86



# 1 Introduksjon

Introduksjonskapittelet gir ei oversikt over bakgrunn og tema for denne bacheloroppgåva, samt tidlegare arbeid, problemstilling og mål.

## 1.1 Bakgrunn og tema

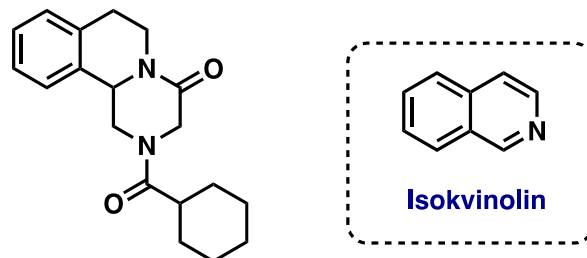
Framstillinga av legemiddel og grøn kjemi er to områder som stadig i større grad blir integrert for å utvikle meir berekraftige og miljøvennlege produksjonsprosessar. Tradisjonell legemiddelproduksjon har vore prega av høgt energiforbruk, avfall og store mengder utslepp av miljøskadelege stoff. Fokuset har vore på å lage dei mest revolusjonerande medisinane for å betre levestandarden over heile verda. I seinare tid har grøn kjemi gått frå å vere ein nysgjerrigheit på laboratoriet til å stadig bli meir brukt i farmasøytisk industri, og handlar om å designe kjemiske produkt og prosessar som redusera eller eliminera bruk eller produksjon av farlege stoff (1,2). Fleire selskap har allereie begynt å tilpasse seg ein berekraftig strategi ved å endre dei kjemiske produksjonsprosessane til grøn syntese av produkta, som involverar prinsippa for grøn kjemi vist i figur 1 (2). I dei 12 prinsippa inngår blant anna atomøkonomi, som handlar om å hindre avfall på atom- og molekylnivå. Eit anna viktig punkt, som også vil vere sentralt i dette prosjektet er å lage mindre farlege kjemiske syntesar. Dette kan inneberer å bruke sikrere løysemiddel og hjelpestoff (3).



**Figur 1.** Dei 12 prinsippa innan grøn kjemi, henta frå [ResearchGate.net/the-12-principles-of-green-chemistry](https://www.researchgate.net/publication/312222222).

Både berekraftig framstilling av legemiddel og legemiddelmangel er to store problem over heile verda i dag (4). Ei stor mengd av verdas legemiddel og API-ar (Active Pharmaceutical Ingredients) produserast i Asia, spesielt Kina og India (5). Etter Covid-19 og krigen i Ukraina kom det fram at det var alvorlege og omfattande forsyningsproblem av essensielle legemiddel og API-ar til USA og Europa. I oktober 2022 blei det publisert ein artikkel i NRK som fastslo at det var registrert 1258 legemiddel som ein ikkje får tak i Norge (6). Prognosane tyder på at Norge igjen går mot eit nytt toppår for medisinmangel. Framover vil det vere svært viktig å kunne produsere dei medisinane som manglar og flytte produksjonen tilbake til Europa og USA igjen.

Prazikvantel (PZQ, **1**), også kjent som Biltricide, er eit legemiddel som blir nytta til behandling av parasittiske ormeinfeksjonar hos både menneskjer og dyr. Hos menneskjer blir prazikvantel brukt til å behandle blant anna schistosomiasis, clonorchiasis, opisthorciasis, bendelorminfestasjonar og fleire andre parasittiske tilstandar (7). Prazikvantel blei først utvikla i 1972 av dei tyske legemiddelselskapa Bayer AG og E. Merck og kjemisk sett er forbindelsen ein isokvinolinanalog (8). Prazikvantel blei valt ut frå 400 forbindelsar, og blei funne til å vere det mest effektive middelet mot ei rekke parasittiske ormsjukdommar og står også oppført på WHO's 2021-liste over nødvendige legemiddel (9,10). Figur 2 viser den kjemiske strukturen til prazikvantel og strukturelementet isokvinolin.



**1: Prazikvantel (PZQ)**

**Figur 2.** Den kjemiske strukturen til prazikvantel (PZQ, **1**) og strukturelementet isokvinolin.

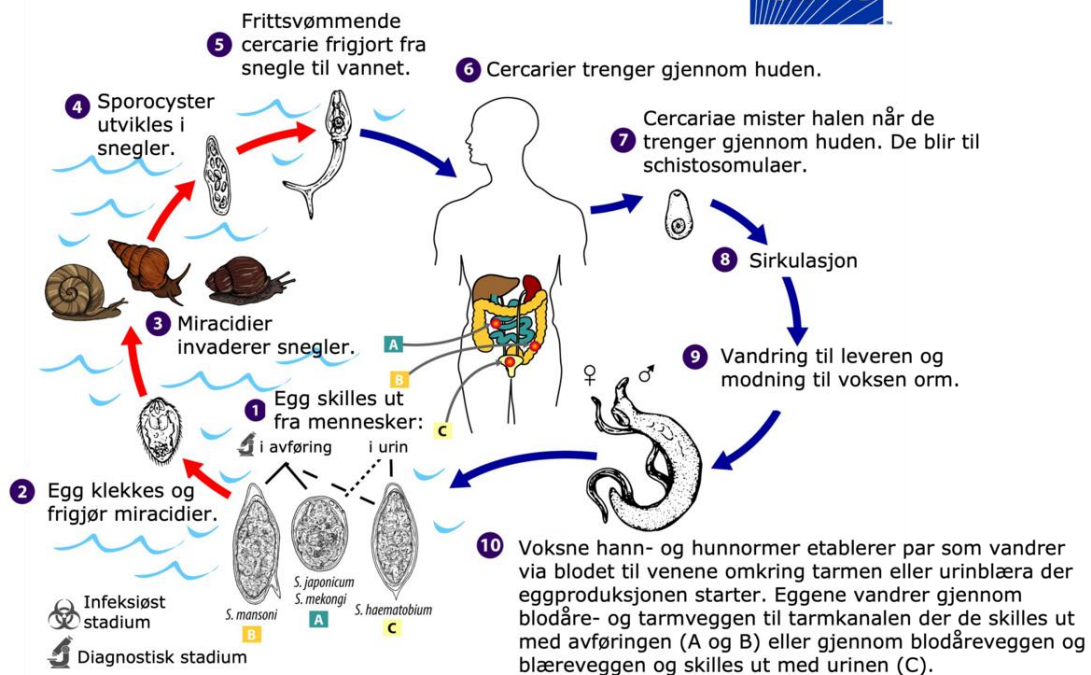
Menneskja i utviklingslanda er dei som blir hardest ramma av parasittiske sjukdommar, og prazikvantel er det viktigaste legemiddelet i behandlinga mot desse parasittiske tilstandane. Oppdaginga av prazikvantel representera blant anna den viktigaste utviklinga i behandlinga av schistosomiasis (10). Schistosomiasis, også kjent under namnet sneglefeber eller bilharzia, er eit markangrep som kjem av ikten *Schistosoma*. Dette er ein flatmark som penetrerar huda og akkumulerast i blodårene, tarmen og urinblæra. Når larvar av *Schistosoma* kjem inn i blodsirkulasjonen, kan det føre til alvorlege allergiske reaksjonar og gi symptom som feber,

hoste, utslett og muskelsmerter. Deponering av egg i dei indre organa kan forårsake kronisk sjukdom, inkludert kreftutvikling. Det finst tre typar av ikten, *S. mansoni* (*Schistosoma mansoni*) som angriper tarm og lever, *S. haematobium* som gir urinvegsplagar og *S. japonicum* som også angriper lever og tarm. Katayama-feber er vanlegvis forårsaka av den sist nemnte ikten, og gir eit akutt sjukdomsbilde og er ofte dødeleg (11). Schistosomiasis er mest utbreidd i Afrika, Asia og Sør-Amerika, og i 2017 trengte minst 220 millionar behandling av schistosomiasis i følgje verdens helseorganisasjon, der 90 % var i Afrika (11). Figur 3 viser alvorlege utslett og hevelsar som følgje av schistosomiasis og katayama-feber.



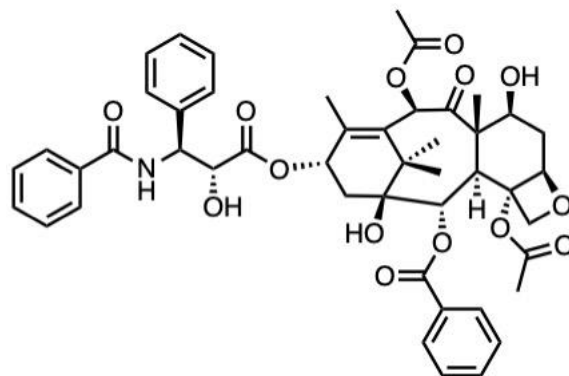
**Figur 3.** Schistosomiasis, henta frå Schistosomiasis (Bilharzia) - Katayama fever (pcds.org.uk).

Figur 4 viser dei ulike stadia i livssyklusen til parasitten. Egg frå parasitten som ligg i venene i urinblæreveggen og tarmveggen hos menneskje vil bli ført ut av kroppen gjennom avføring og urin. I vatnet vil egga klekke og utvikle seg til miracidium-larvar som vil infisere sniglar av arten *Biomphalaria* (for *S. mansoni* og *S. haematobium*) eller *Oncomelania* (for *S. japonicum*). Inne i snigelen utviklar larvane seg til sporocyster og deretter til cercaria-lavar som blir frigjort frå snigelen i vatnet. Cercarier vil trenge gjennom hunda på menneskje og bli til schistosomulaer og vandrar deretter vidare gjennom blodstraumen og når til slutt målorgana (12).



**Figur 4.** Livssyklusen til parasitten *Schistosoma*, henta frå [sml.snl.no/Schistosomiasis](http://sml.snl.no/Schistosomiasis).

I seinare tid har det blitt publisert ei rekke studiar som viser at prazikvantel ikkje berre har antiparasitts verknadar, men at den også kan nyttast i kreftbehandling og til behandling av psoriasis (13,14). Eit studium publisert av Wu *et al.* I 2012 viser at prazikvantel kunne forbetre antikrefteffektiviteten til paclitaxel (taxol) i ulike kreftcellelinjer, inkludert paclitaxel-resistente cellelinjer (13). Strukturformelen til paclitaxel er vist i figur 5.

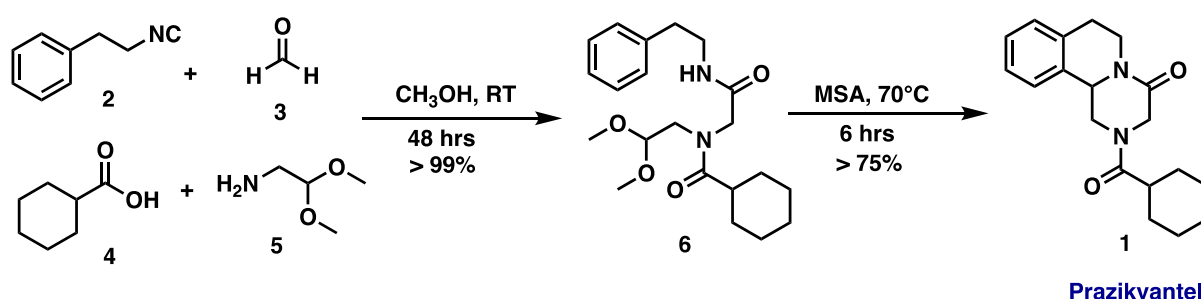


**Figur 5.** Strukturformelen til paclitaxel (taxol).

Paclitaxel, i lag med prazikvatel, hemmar synergistisk celleproliferasjon og forårsakar celledød i ulike kreftceller, slik som CRC DLD-1. Kombinasjonen av desse molekyla vil også kunne svekke den X-kopla inhibiteren av apoptose-proteinuttrykk (XIAP) som eit anti-apoptotisk protein, som kan fungere som ein effektiv hemmar av kaspaseaktivitet (13,14).

## 1.2 Problemstilling, hensikt, forskningsspørsmål og mål

Dette bachelorprosjektet er basert på prazikvantel-syntesen rapportert av Dömling *et al.* i 2010 (15). Prazikvantel-syntesen, som er vist i figur 6, er ei attraktiv to-trinns syntese der totalutbytte for dei to trinna ligg på over 74 %. Det første trinnet er ein Ugi-multikomponentreaksjon mellom eit isocyanid (2), formaldehyd (3), karboksylsyre (4) og eit amin (5) ved romtemperatur (RT) som gir det open kjeda diamid-intermediatet (6). I det andre trinnet blir (6) behandla med metansulfonsyre (MSA) ved 70°C i 6 timar til å gi ein dobbel ringslutning av type Pictet-Spengler syklisering under danninga av prazikvantel (1), med utbytte på > 75 %.

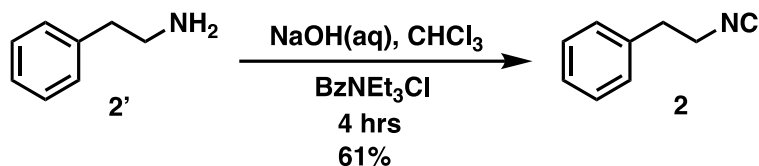


**Figur 6.** Prazikvantel-syntesen rapportert av Dömling *et al.* i 2010. Dette er ein to-trinns syntese der totalutbytte for begge trinna ligg over 74 %. Første trinn er ein Ugi-multikomponentreaksjon mellom isocyanid (2), formaldehyd (3), karboksylsyre (4) og eit amin (5), som dannar det open kjeda diamid-intermediatet (6). Deretter blir (6) behandla med metansulfonsyre (MSA) ved 70°C i trinn to. Dette gir ein dobbel ringslutning av Pictet-Spengler syklisering under danninga av Prazikvantel (1), som har eit utbytte på > 75 %.

Med dette har følgjande problemstilling blitt utarbeida:

Sidan prazikvantel ikkje berre har antiparasitts verknad, men kan også nyttast i kreftbehandling og mot psoriasis vil det ha stor betydning å kunne framstille prazikvantel på ein miljøvennleg og effektiv måte, og det finst fleire forhold for syntesen av stoffet som kan optimaliserast og gjerast grønar og meir lønsam for oppskalering. I dag ligg utsalsprisen for prazikvantel på ca. 7000 kr (NOK) per 250 g hos Merck (Sigma-Aldrich). På grunn av legemiddelmangel er det no viktigare enn nokon gong å kunne produsere legemiddel sjølv. Reaksjonstida på 48 timar i det første trinnet i Ugi-multikomponentreaksjonen, er noko som burde kunne reduserast, samt reaksjonstida (6t) i det andre trinnet. Fokuset i dette prosjektet vil ligge på det siste trinnet i syntesen av prazikvantel, der det også er ønskeleg å forbetre utbytte. I tillegg til dette må isocyanidet (2) framstillast, då det ikkje er til sals kommersielt

hos HVL sine leverandører. Dömling *et.al* rapporterte framstillinga av (2) i 61 % utbytte frå 2-fenyletan-1-amin (2') i ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon rapportert av Gokel *et.al* i 1976 og 1988 (15). Denne reaksjonen er vist i figur 7.



**Figur 7.** Syntese av isocyanidet (2) frå amidet (2') som skjer etter ein Hofmann-karbylaminreaksjon ved bruk av ein faseoverføringskatalysator. Dömling *et.al* fekk eit utbytte av (2) på 61 %.

## Hensikt

Hovudhensikta med dette prosjektet var å framstille prazikvantel på ein miljøvennleg og effektiv måte. Dette inneberer å optimalisere syntesen og gjere den grønare og meir lønsam for oppskalering. Her vil både batch- og flowsyntese vere aktuelt. I tillegg til å studere andre moglege syntesevegar for prazikvantel og evaluere desse opp mot kvarandre i eit grønt perspektiv.

## Forskingsspørsmål

1. Kva faktorar er avgjerande for å optimalisere syntesen for prazikvantel, hovudsakeleg i trinn to, med omsyn på pris og utbytte?
2. Kva er skilnaden mellom syntesevegen til Dömling *et al.* og den opphavelige syntesen til Merck og Bayer, samt den koreanske kommersielle syntesen, ved å samanlikne mengd syntesetrinn, atomøkonomi, problematiske reagensar og utbytte?

## Mål for prosjektet

1. Framstille isocyanidet (2) som skjer etter ein Hofmann karbylamin-reaksjon ved bruk av ein faseoverføringskatalysator.
2. Nytte eksperimentelt design (DoE) og fleirvariabel modellering for å optimalisere syntesen med omsyn på reaksjonstid, temperatur, løysemiddel og reaktantar.
3. Utforske andre moglege syntesemåtar for PZQ (1) og vurdere desse opp mot kvarandre i eit grønt perspektiv og i forhold til effektivitet.

## **Forskningsmetode og strategi**

Prosjektmåla vil bli oppnådd gjennom bruk av eksperimentelt design (DoE) og multivariabel modellering for å optimalisere syntesen av prazikvantel. I tillegg vil ulike analyseteknikkar, som kromatografi (tynnsjiktskromatografi (TLC), kolonnekromatografi og væskechromatografi (HPLC)) og spektroskopi (NMR og FT-IR) bli nytta for å identifisere og separere sambindingar i det eksperimentelle arbeidet. Instrumenta og metodane er vitskapelege og godt innarbeidde. Valet av desse metodane og instrumenta er basert på deira utbreidde bruk i liknande prosjekter, og tilgjengelegheita ved Høgskulen på Vestlandet.

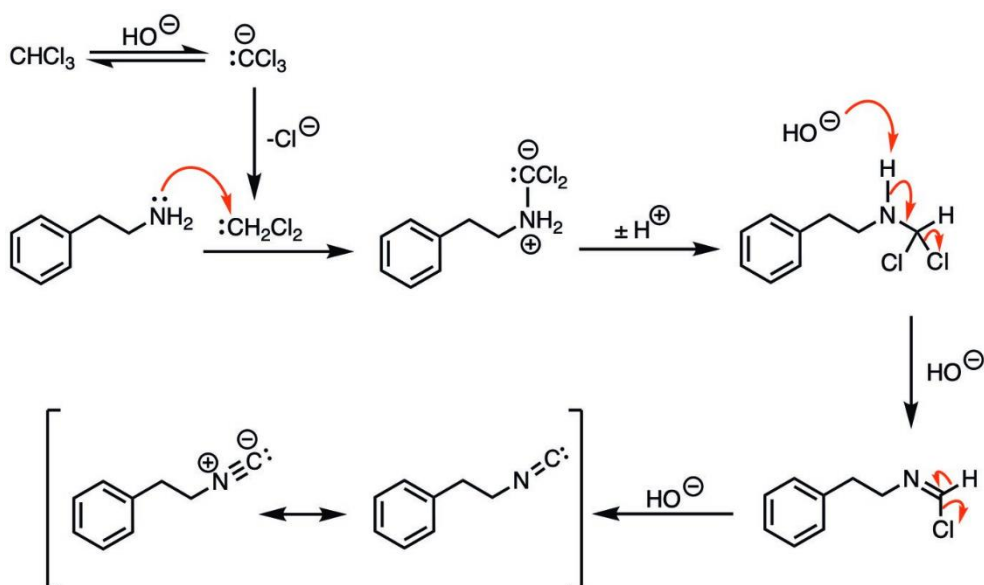
## 2 Teori

### 2.1 Hofmann-karbylaminreaksjon

Hofmann-karbylaminreaksjonen er ein kjemisk reaksjon som blir brukt til å omdanne primære amin til isocyanid. Reaksjonen blei oppkalla etter August Wilhelm von Hofmann, ein tysk kjemikar som først rapporterte den i 1851. Produktet, eit isocyanid har ei karakteristisk svært dårleg lukt. Det er verdt å merke seg at denne reaksjonen er selektiv for primære amin, og vil difor ikkje danne sekundære eller tertiære aminer som kan dannast i andre syntesevegar. Dette skyldast alkylgruppa si dårlege eigenskap til å lausrivast (16).

#### Reaksjonsmekanismen for Hofmann-karbylaminreaksjonen

Karbylamin reaksjonen, består av ein reaksjon som skjer mellom eit primært amin, kloroform og ein base. Mekanisemen begynner med at kloroformmolekylet gjennomgår ein dehydrohalogenering for å danne eit mellomprodukt av diklorokarben. Dette mellomproduktet er svært reaktivt og oppfører seg som ein elektrofil. Vidare vil dette elektrofile mellomproduktet angripe det elektronrike nitrogenatomet på aminet og danne isocyanidet (16). Reaksjonsmekanismen for Hofmann-karbylaminreaksjonen er vist i figur 8.



Figur 8. Reaksjonsmekanismen for Hofmann-karbylaminreaksjonen.



## 2.2 Firekomponent Ugi-reaksjon

Multikomponent reaksjonar (MCR) er ein syntetiske strategi for å generere eit mangfald av små molekyl. MCR gir store moglegheiter til å skape molekylært mangfald på eit reaksjonstrinn ved lita tid, syntetisk innsats og danning av biprodukt (17). Ugi-reaksjonen er ein multikomponent-reaksjon innafor organisk kjemi og blei først rapportert i 1959 av Karl Ugi. I reaksjonen inngår fire reaktantar, eit keton, eit amin, eit isocyanid og ei karboksylsyre, som reagera og typisk gjev eit diamid som produkt med vatn som biprodukt (18), som vist i figur 9.

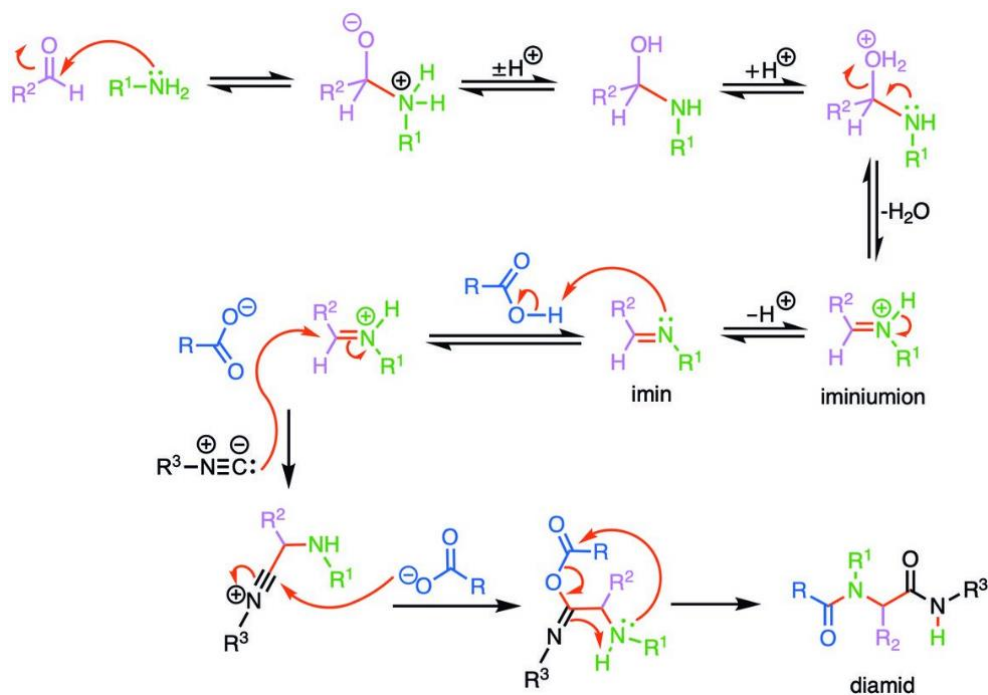
Ugi-reaksjonen som andre multikomponent-reaksjonar har store fordelar samanlikna med ein lineær reaksjon som gir liknande strukturforbindelsar. Fordelane med Ugi-reaksjonen er at den byggjer svært komplekse forbindelsar med god atomøkonomi, blir gjort under milde forhold og har berre vatn som biprodukt (18).



**Figur 9.** Ugi-reaksjonen. Reaksjonen består av fire komponentar, eit keton, amin, isocyanid og ei karboksylsyre, som danner diamidet.

### Reaksjonsmekanismen for Ugi-reaksjonen

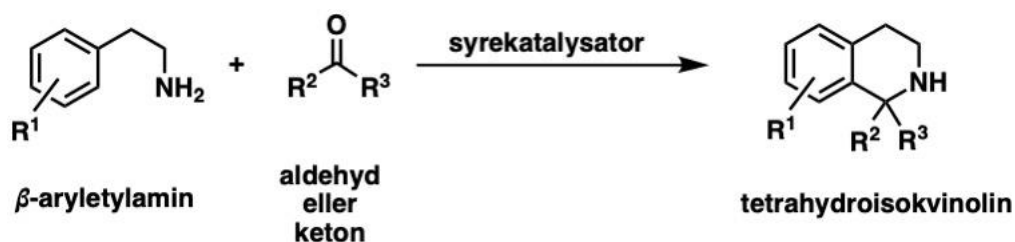
Mekanismen begynner med at aminet reagerer med ketonet og danner eit imin, med eliminering av vatn. Deretter skjer det ein protonutveksling med karboksylsyra og aminet for å skape ein nukleofil addisjon av isocyanidet med isocyanidets terminale karbonatom. Dette for å danne eit nitriliumion. I neste trinn skjer det ein ny nukleofil addisjon med nitriliumionet og karboksylsyreanionet. Til slutt skjer det ein Mumm-omleiring. Dette er ei blanding av ein organisk reaksjon og ein omorganiseringsreaksjon som overfører acylgruppa frå oksygenet til nitrogenet (19,20). Figur 10 viser reaksjonsmekanismen for Ugi-reaksjonen.



Figur 10. Reaksjonsmekanismen for Ugi-reaksjonen.

### 2.3 Pictet-Spengler reaksjonen

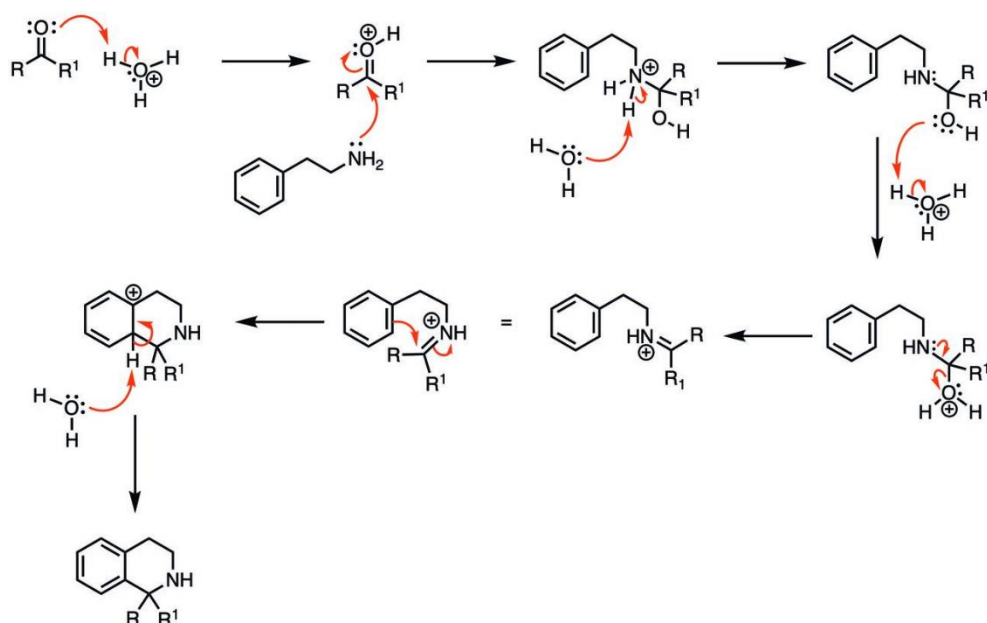
Pictet-Spengler reaksjonen, vist i figur 11, vart rapportert i 1911 av Pictet og Spengler, og er ein viktig reaksjon for syntese av alkaloidar og legemidlar (21,22). Alkaloidar er organiske sambindingar som ein finn naturlege i plantar (23). Reaksjonen rapportert i 1911 vart utført med  $\beta$ -aryletylaminar og ein karbonylforbindelse i konsentrert saltsyre, for å oppnå produktet 1,2,3,4-tetrahydroisokinolin (24). Den er ein av dei mest brukte metodane for å framstille 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -karboliner og tetrahydroisokvinoliner (22).



Figur 11. Pictet-Spengler reaksjonen. Reaksjonen består av tre komponentar beta-aryletylamin, aldehyd/keton og ein syrekatalysator som dannar tetrahydroisokvinolin.

## Reaksjonsmekanismen for Pictet-Spengler reaksjonen

Mekanismen byrjar med protonering av oksygenet på karbonylsyra før den vidare reagera med aminreagenset. Vidare skjer det ei protonoverføring som frigjer eit vassmolekyl og resultera i eit protonert mellomprodukt av iminium ion. Mellomproduktet gjennomgår så ein «6-endo-trig syklisering» reaksjon som fjernar aromat-eigenskapane til arylingen. Til slutt skjer det ein protonering som gjenopprettar den aromatiske ringsystemet og resultera i sluttproduktet (24,25). Reaksjonsmekanismen for Pictet-Spengler reaksjonen er vist i figur 12.



**Figur 12.** Reaksjonsmekanismen for Pictet-Spengler reaksjonen.

## 2.4 Paclitaxel (taxol)

Paclitaxel (taxol) er eit stoff som stabiliserer mikrotubuli (mikrotubuli er eit av tre element celledjellestett består av (26)), og vil kunstig stoppe cellyklusen i mitose-fasa og føre til apoptose. Taxol er eit av dei mest brukte legemidlane mot kreft og har vist til å ha sterk effekt mot bryst-, nakke-, hovud-, eggstokk- og lungekreft. Legemiddelet har derimot betydelege problem med alvorlege biverknadar og paclitaxel-resistens (13). Typiske biverknadar er alt frå hårtap, kvalme og muskel-verk, til anfall, alvorleg hovudverk og pusteproblem (27).

Det er eit aukande problem i taxol resistente kreftceller ved aukande bruk av legemiddelet. Dette er ei stor hindring for å kunne forbetre responsen og overlevelsen til kreftpasientane. Svulstane kan enten vere resistente mot stoffet eller bli resistente under bruken av

legemiddelet. Resistens mot taxol oppstår direkte i miktotubuli og fører til dømes til mutasjonar og post-translasjonell modifikasjon (28).

## **2.5 Synergieffekt mellom paclitaxel (taxol) og prazikvantel (PZQ)**

Det er rapportert at prazikvantel i lag med paclitaxel (taxol) kan forbetre den vekstinhiberende effekten taxol har i celler både in vitro og vivo, i tillegg til taxol resistente celler som CRC DLD-1. Synergien mellom prazikvantel og taxol inneberer også nedregulering av XIAP proteinet og mitosisk avbrot (13).

PZQ har ikkje noko påverknad på cellyklusen til ei kreftcelle, men den kan i stor grad forbetre taxol si evne til å kunstig stoppe cellyklusen i mitosefasa, for DLD-1- og H1299-celler. Taxol er ein mikrotubuli-stabiliserande middel som kan binde seg direkte til tubulin og stabiliserar mikrotubulien. Dette forstyrrar nedbrytinga av mikrotubuli og fører til mitotisk arrest (13).

Det er funne ut at synergien med PZQ og taxol kan sterkt redusere produksjonen av XIAP i DLD-1- og H1299-celler. XIAP er proteinet i cella som regulerer apoptose-proteina og kan ha ein hemmande effekt på apoptosen. XIAP er ofte overproduisert i tumor og visse typar kreftceller. Redusering av XIAP proteinet vil indusere apoptose i cellene, som vidare redusera utviklinga av tumor in vivo og aukar den terapeutiske følsamheita til kreftceller (13).

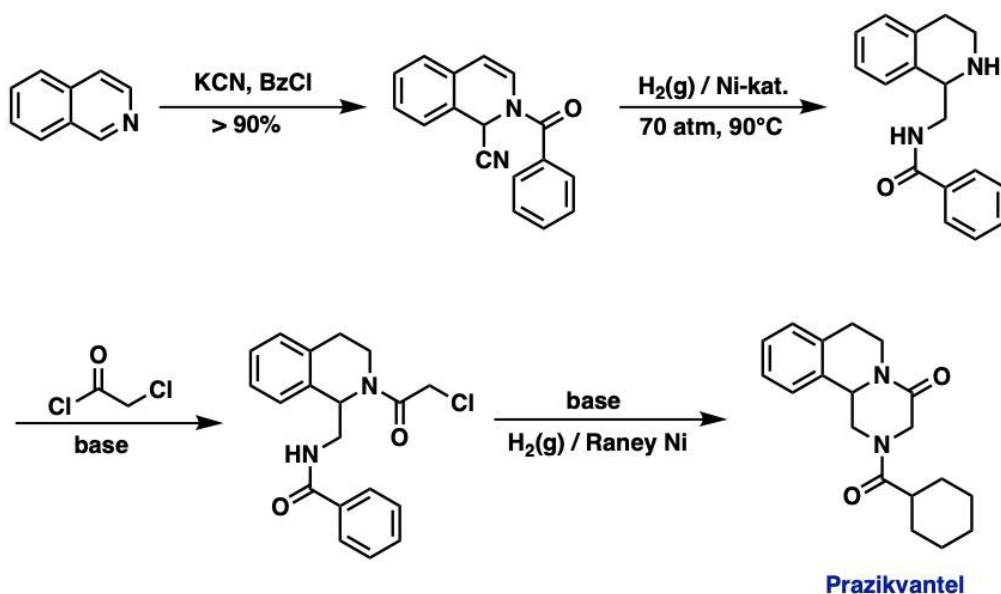
## **2.6 Tidlegare syntesar av prazikvantel (PZQ)**

Prazikvantel blei først syntetisert av E. Merck i 1977, og sidan den gong har det blitt produsert på ei rekkje forskjellige måtar av ulike produsentar over heile verda. På grunn av legemiddelet sin betydelege medisinske verdi og globale distribusjon, har det vert stor interesse for å utvikle metodar som kan optimalisere produksjonen av prazikvantel på ein økonomisk og berekraftig måte (10). Det vil også vere interessant å sjå på skilnaden mellom syntesevegn til Dömling *et al.* som blir følgt i dette prosjektet, opp mot den opphavlege syntesen til Merck og Bayer samt den koreanske kommersielle syntesen.

### 2.6.1 Merck KG syntesen av prazikvantel (PZQ)

Den første syntesen av prazikvantel blei i 1977 rapportert av J. Seubert, R. Pohlke og F. Loebich, og er resultatet av ein omfattande undersøking av det farmakologiske potensiale til substituerte isokvinoliner som er avleda av Reissert-forbindelsar (29). Reissert reaksjonen inneberer at kvinoliner blir omdanna til kvinalinsyre (30). Frå ei stor mengd av pyrazinoisokvinoliner blei PZQ selektert vidare for sin høge effektivitet og minimal toksisitet i eksperimentelle forsøk ved behandling av parasittiske sjukdommar. I rapporten seier dei blant anna at pyrazinoisokvinoliner kan bli syntetisert på fleire ulike metodar, blant anna frå det lett tilgjengelege stoffet *N*-(1,2,3,4-tetrahydroisokvinolyl-1-metyl)karboksamider. I det tredje trinnet blir dette stoffet alkylert med kloracetylklorid, etterfølgt av ringlukking ved hjelp av sterke basar (29).

Problemet med denne syntesen var at dei brukte overskot av kaliumcyanid (KCN), noko som førte til produksjon av store mengder cyanid-holdig avfall. Dette utgjorde ein betydeleg trussel for miljøet og for prosessarbeiderar ved fabrikkjen på grunn av spesielle behov for avfallshandtering, ettersom PZQ blir produsert på ein multi-tonn skala årleg (29). På grunn av store mengder biprodukt og avfall, vil denne syntesen ha ein lågare atomøkonomi. Det er heller ikkje rapportert noko utbytte. Syntesen av PZQ rapportert av Dömling *et al.* består av kun av tre trinn, og er gjennomført under svært milde forhold, der sekvensen er meget atomøkonomisk. Biprodukt i denne reaksjonen er kun metanol og vatn, og mange av startmateriala er rimelege og lett tilgjengelege. Det er likevel rom for ytterlegare reduksjon i produksjonskostnadane for å optimalisere denne prosessen. Merck KG syntesen av prazikvantel er vist i figur 13.

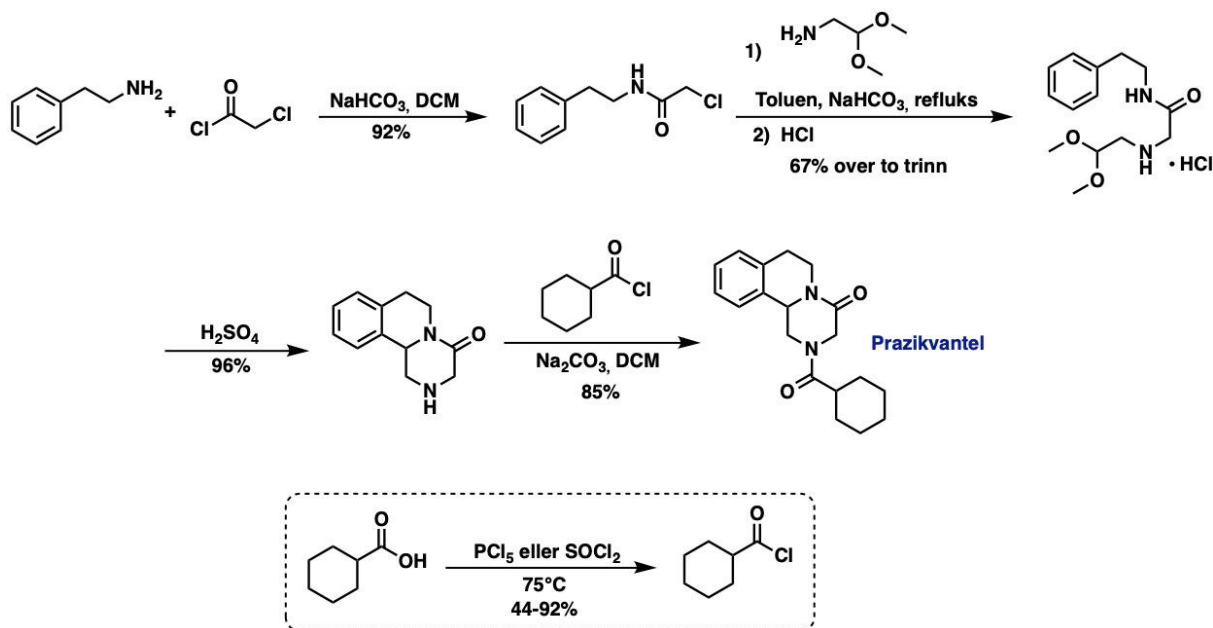


Figur 13. Merck KG syntesen av prazikvantel.

### 2.6.2 Shin Poong-syntesen av prazikvantel (PZQ)

På slutten av 1970-talet og byrjinga av 1980-talet anerkjente eit sørkoreansk selskap, Shin Poong Pharmaceutical Co, den strategiske betydninga av prazikvantel på det koreanske marknaden for behandling av dei to parasittiske sjukdommane schistosomiasis og cestodiasis. Med tilgang på 14 000 amerikanske dollar lykkast Shin Poong å skape ein alternativ og meir lønsam produksjonsprosess av PZQ. På byrjinga av 1900-talet hadde Shin Poong blitt verdens største produsent av PZQ på grunn av sin effektive forretningsstrategi, som innebar å sette prisen for PZ betydeleg lågare enn Bayers pris (10). Shin Poong brukte ein anna metode enn andre bedrifter til å produsere PZQ. Denne metoden generert eit stoff kalla for eit PZQ-amin som eit mellomprodukt i produksjonsprosessen. Dette mellomproduktet var omtrent like tilgjengeleg som andre mellomprodukt brukt av andre bedrifter (10).

Shin Poong syntesen er kjent for sitt høge utbytte på 85 %. Dette gir eit betre utbytte enn Dömling *et al.*, men syntesen har også dobbelt så mange trinn. Dette krev mykje kjemikalie, og det vil bli danna eit høgare mengd av biprodukt og avfall, som vil gjere atomøkonomien dårlegare. Fleire trinn vil også krevje meir energi. Toluen, svovelsyre ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) og saltsyre ( $\text{HCl}$ ) er også rekna som mindre miljøvennlege stoff. Den koreanske kommersielle syntesen av prazikvantel er vist i figur 14.



Figur 14. Shin Poong-syntesen av prazikvantel.

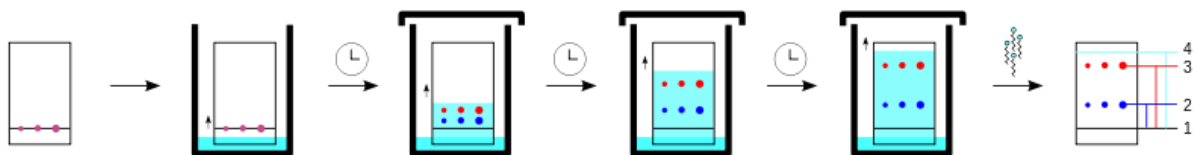
## 2.7 Kromatografi

Kromatografi er ein viktig metode for å separere, identifisere og måle ein eller fleire kjemiske komponentar i ei blanding (31). Hovudprinsippet for kromatografi er at stoffa fordelar seg mellom to fasar, ein mobil fase og ein stasjonær fase. Stoffa i prøva blir separert på grunn av ulikheiter i stoffa sine kjemiske og fysiske eigenskapar som for eksempel polaritet, ionisk ladning eller størrelse av molekyl (31). I denne oppgåve blei det brukt tynnsjikt-kromatografi (TLC), kolonnekromatografi, og væske-kromatografi (HPLC). Desse metodane basera seg på polariteten til forbindelsar for å få separert dei forskjellige komponentane.

### 2.7.1 Tynnsjikt-kromatografi

Tynnsjikt-kromatografi (Thin-Layer Chromatography, TLC) er ein kjemisk analysemetode som blir nytta til å identifisere og separere forskjellige komponentar frå kvarandre (32). Den stasjonære fasen består av eit tynt pulverlag som består av silikagel (ikkje krystallisk silika), som dekker ei tynn aluminiumsplate. Den mobile fasen er ei væske blanding bestående av ulike organiske løsemiddel som egna seg til å bevege dei ulike komponentane i ei prøve, eksempelvis heksan og etylacetat. Den mobile fasen kan også vere eit reint organisk løsemiddel (32). Dette kan vere ein effektiv måte for å oppnå ønska separasjonsforhold og optimal prøvefraksjonering i separasjonsprosessen.

Små flekkar av fortynna prøveløysning påførast TLC-plata ved hjelp av svært tynne kapillærrør. Deretter blir plata plassert i eit elueringskammer med mobil fase. Stoffa vil transporterast med den mobile fasen som trekker seg oppover TLC-plata. Dette vil skje som følgje av interaksjonen mellom komponentane og den stasjonære fasen, samt løysingsmiddelet si evne til å transportere prøver oppover grunna kapillærkreftene som oppstår mellom den stasjonære og den mobile fasen. Stoffa vil ha forskjellig hastigheit på grunn av ulik grad av interaksjon med det adsorberande materialet, som betyr at upolare molekyl vil bevege seg raskt gjennom den polare stasjonære fasen, medan polare molekyl vil henge etter i den stasjonære fasen. Før den mobile fasen når toppen av plata, blir plata fjerna frå elueringskammeret, og væskefronten blir markert. Stoffa vil etterlate prøveflekkar på plata som kan visualiserast ved hjelp av UV-lys eller ved hjelp av eit framkallingsmiddel som gir fargereaksjonar. Figur 15 viser utviklinga av ei TLC plate.



**Figur 15.** Utvikling av ei TLC-plate, henta frå Wikipedia.com.

Ved hjelp av fargeforskjellar kan dei separerte stoffa identifiserast. I nokon tilfelle vil stoffa sjå like ut, og då kan dei identifiserast ved å samanlikne vandringsavstanden mot ein standard. Dei kan også utsettast for ulike kjemiske stoff som vil reagere med komponentane og gi dei karakteristiske fargar (32). Eksempel på dette kan vere phosphomolybdensyre, vanilin, jod, og mange andre.

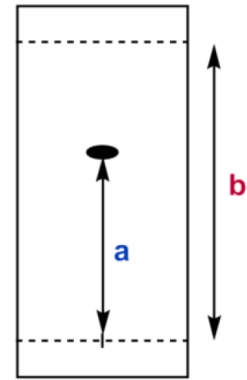
Kvar prøveflekk vil ha ein retensjonsfaktor ( $R_f$ ) (formel 1) som er lik avstanden mellom appliseringslinja og prøveflekk dividert med avstanden mellom appliseringslinja og væskefronten, som vist i figur 16.

$$R_f = \frac{\text{avstand mellom appliseringslinje og prøveflekk (a)}}{\text{avstand mellom appliseringslinje og væskefront (b)}} \quad (1)$$



Forbindelsen med størst  $R_f$ -verdi vil vere mindre polar fordi den ikkje held seg like lenge til den stasjonære fasen som den meir polare forbindelsen (33).

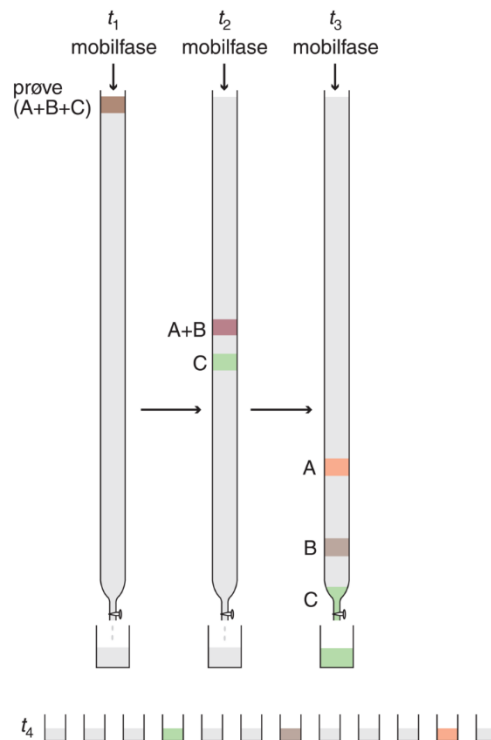
Tynnsjiktskromatografi er ein rask, billig og enkel teknikk som krev minimalt med utstyr og kan utførast på alle laboratorium.



**Figur 16.** Utrekning av  $R_f$ -verdi. Henta frå Peedia.com.

### 2.7.2 Kolonnekromatografi

Kolonnekromatografi er ein enkel og populær separasjons- og reinseteknikk som kan nyttast på både faste og flytande prøver. Mobilfasen består av ei løysning som beveger seg gjennom kolonna og påverkar separasjonen av dei ulike forbindelsane i blandinga, medan dei stasjonære fasen er ein fast fase som ikkje beveger seg og som forblir i kolonna. Ved kolonnekromatografi blir eit sylindrisk glasrøyr (kolonna) fylt med adsorbent (silikagel) og eit passende løysemiddel (mobil fase), og prøver som skal separerast blir innført på toppen av kolonna som gjer at den får bevege seg med løysingsmiddelet, som vist i figur 17. Sambindingane vil bli separert i forskjellige band på grunn av polaritetsforskjellar (34).



**Figur 17.** Skjematisk skisse av kolonnekromatografi, henta frå [snl.no/kolonnekromatografi](http://snl.no/kolonnekromatografi).

### 2.7.3 Væskekromatografi

Væskekromatografi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) er ein instrumentell kromatografimetode som blir brukt til å separere kjemiske komponentar i blanding av væske. Målet er å identifisere og/eller bestemme konsentrasjonen av stoff i ei blanding (31). Figur 18 viser HPLC-instrument nytta i dette prosjektet.



**Figur 18.** HPLC-instrumentet ved HVL som blei nytta i dette arbeidet. Instrumentet består av ei pumpe, ein trykkdempar, injektor, kolonne og ein detektor tilkople eit datasystem. Bilde er tatt av forfattarane av oppgåva.

Eit klassisk HPLC-instrument består av ei pumpe, ein trykkdempar, injektor, kolonne og ein detektor tilkople eit datasystem (31). Analysen består av ein mobil fase og ein stasjonær fase som er samansett av partiklar med liten storleik. Væska i kolonna er den mobile fasen, medan sjølve kolonna er den stasjonære fasen (35).

Det finst ulike typar kromatografimetodar, og væske-væske fordelingskromatografi er ein av dei. Denne metoden inneberer at stoff fordelar seg mellom ein stasjonær væskefase og ein mobil væskefase. Den stasjonære fasen (væske) er kovalent bunde til støttemateriale av til dømes C18-baserte (oktadekylsilyl) partiklar eller silikapartiklar, og er stabil i pH-området 2-8. Ein vanleg kovalent bunde stasjonær fase kan vere oktadekylsilan (ODS) (31).

Analysen blir gjort ved å injisere ei væskeprøve, vanlegvis bestående av to løysningar, inn i instrumentet ved hjelp av ei sprøyte. Før den injiserast vidare i kolonna, blir den blanda med den mobile fasen (35). Ved hjelp av høgt trykk frå pumpa blir den mobile fasen pressa gjennom ei kolonne som består av små partiklar (31). Det er her sjølve separasjonen går føre seg. Stoffa vil fordele seg mellom den mobile fasen og den stasjonære fasen som likevekter. Den stasjonære fasen vil halde stoffa igjen i ulik grad fordi stoffa har ulike eigenskapar, som molekylvekt og/eller polaritet. I den stasjonære fasen vil det vere mogleg å separere stoffa frå kvarandre, sidan kolonna er fylt med partiklar som avgjer hastigheita til desse. Separasjonen skjer etter kva slags type kolonne ein har. Det finst både pakka kolonner eller open kapillærkolonne. Separasjonen kan også forbestrast ved å endre samansetninga av den mobile fasen (35).

Etter kvart som stoffa kjem ut av den stasjonære fasen blir dei lest av på ein detektor. Tida det tar frå den mobile fasen blir injisert i kolonna til den blir eluert kallast retensjonstida (36). Ved hjelp av retensjonstida, kan ein identifisere ulike stoff i prøva ved å samanlikne dei med retensjonstida til referansestoffa (35).

For å få eit mål på kor godt to toppar er separert frå kvarandre kan man sjå på oppløysninga,  $R_s$ . Oppløysninga kan uttrykkjast på forskjellige måtar. Formel 2 viser samanhengen mellom oppløysninga,  $R_s$ , og talet på teoretiske plater,  $N$  (31).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}(\alpha - 1)}{4} \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right) \quad (2)$$

Der  $k_2$  er ein retensjonsfaktor for det stoffet av dei to som har lengst retensjonstid. Oppløysninga aukar med aukande separasjon faktor, teoretiske plater, kolonnelengd og retensjonsfaktor. Separasjonsfaktoren ( $\alpha$ ) kan endrast ved å endre samansetnad av mobil fase eller stasjonær fase i HPLC. Talet på teoretiske plater ( $N$ ) er eit mål på effektiviteten til kolonna. Låg platehøgde gir fleire likevektsinnstillingar,  $N$ , i kolonna og dermed betre oppløysning,  $R_s$ .  $N$  kan endrast ved å endre hastigheita til mobil fase eller ved å endre stasjonær fase. Ei endring av kolonnelengda kan også bidra til betre tid til separasjon (31).

## Revers-fase kromatografi

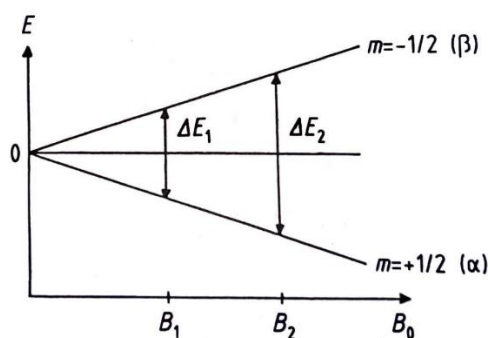
Revers-fase kromatografi er den vanligaste HPLC metoden, der den mobile fasen er polar og den stasjonære fasen er upolar. Dette betyr at den meir polare forbindelsen vil eluere ut først (31). I dette prosjektet blei HPLC-instrumentet nytta for å finne conversion og utbytte.

## 2.8 Spektroskopi

### 2.8.1 Kjernemagnetisk spinnresonans spektroskopi

Kjernemagnetisk resonans spektroskopi (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) er ein kraftig analyseteknikk som blir brukt til å strukturoppklare organiske molekyl (37). Den gir informasjon om tal på magnetisk unike atom i kjernen som blir undersøkt (38). Dette er mogleg fordi ein atomkjerne har eit eige spinnkvartal,  $I$ . Verdien av  $I$  må i teorien vere ulik null, da kjernar med  $I = 1$  ikkje har noko kjernemagnetisk moment, og kan difor ikkje bli tatt opp på NMR. Dei viktigaste nuklidene for å bestemme strukturen til organiske molekyl er proton ( $^1\text{H}$ ) og karbon-13 ( $^{13}\text{C}$ ), der  $I = 1/2$  for begge kjerneisotopane (37).

For alle atomkjernar med spinn eksisterer det  $(2I + 1)$  energinivå, som betyr at  $^1\text{H}$  og  $^{13}\text{C}$  har kunn to moglege energinivå, ( $2 \cdot \frac{1}{2} + 1 = 2$ ). Ved påføring av eit magnetisk felt,  $B_0$ , vil desse energinivåa splittast og bevege seg frå kvarandre (39). Eit energinivå vil minke,  $\alpha$ , og det andre,  $\beta$ , vil auke. Dette er illustrert i figur 19, der  $B_0$  er proporsjonal med  $\Delta E$  som er forskjellen i energi mellom dei to energinivåa. Når den magnetiske feltstyrken aukar vil energiforkjellen også bli større (39).



**Figur 19.** Dei to energinivåa for  $I = 1/2$  med eit magnetisk felt til stades. Illustrasjonen er henta frå *Basic one- and two-dimensional NMR spectrometry*, utgåve 5, Horst Friebolin.

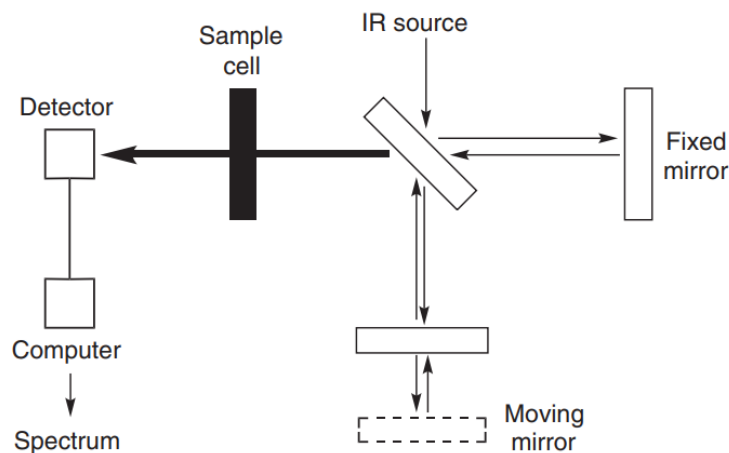
Når protona blir bestrålt med ein frekvens som tilsvara forskjellen i energinivå mellom dei to spinnstilstandane, kan overgangar mellom energinivåa induserast. Når kjernen fell tilbake til det første energinivået igjen avleverer den ei viss mengde energi, som er den energien som produsera eit NMR-signal. Dette blir kalla «relaxation» (39). Figur 20 viser NMR-instrumentet, med ein permanent magnet, som blei nytta i dette arbeidet.



**Figur 20.** NMR-instrument med permanent magnet som blei nytta i dette arbeidet. Bilde er henta frå [Magritek.com](http://Magritek.com).

### 2.8.2 Fourier-transform infraraud spektroskopi

Fourier-transform infraraud spektroskopi (FT-IR) er ein teknikk som blir brukt til å undersøkje molekylær struktur, samt samansetninga av organiske stoff og uorganiske stoff, og er ein spesielt god metode for å identifisere funksjonelle grupper og bindingstypar (37). Eit molekyl kan ha translasjons-, rotasjons- og vibrasjonsrørsler. Desse bevegelsane er energikvantifiserte og overgangen mellom energinivåa tilsvara energien til elektromagnetiske stråling i det infraraude området (IR-området). Eit molekyl er IR-aktivt, som vil sei at det adsorberer stråling med frekvensar i IR-området, dersom rotasjons- og vibrasjonsbevegelsen resulterer i ei endring i molekylets dipolmoment (31). Endring i lysbølgjene blir målt av ein detektor etter at dei har trengt igjennom eller blitt reflektert frå prøva, og blir deretter konvertert til eit spektrum ved hjelp av fourier-transformasjon. Ein kan også samanlikne spektrum opp mot ein database. Dette er ein verdifull teknikk innan fleire områder grunna sin høge følsamheit og evna til å analysere små mengder av prøvemateriale (37). Figur 21 viser ei skjematisk skisse av eit FT-IR spektrometer.



**Figur 21.** Skjematisk skisse av eit FT-IR spektrometer. Henta frå *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, utgåve 7, Ian Fleming.

## 2.9 Smeltepunktsbestemming

Smeltepunktsbestemming er ein metode for å identifisere kjemisk stoff, eller for å sjekke reinheita til eit kjent stoff. Ureinheita i eit stoff vil normalt føre til eit lågare smeltepunkt enn ved eit heilt reint stoff. Metoden utførast ved å langsamt varme opp ein liten prøve av det faste stoffet, for så å notere ned starttemperaturen ved produksjon av første dråpe, og slutttemperaturen når alt stoffet er gjort om til væske. Dette gir smeltepunktintervallet (40).

## 2.10 Eksperimentelt design og fleirvariabel modellering

Det er svært mange eksperiment som blir mislukka fordi dei i utgangspunktet ikkje er nøye nok gjennomtenkt og designa. Eksperimentelt design er ein metode for å planlegge og utføre vitenskaplege eksperiment på ein systematisk og strukturert måte (41). Målet er å optimalisere eksperimentelle parameter og minimere feilkjelder, slik at ein kan auke både presisjonen og pålitelegheita i resultatata. Ein ønskjer å unngå systematiske feil og minimere tilfeldig feil. Tilfeldig feil verkar inn på presisjonen til resultatet, medan systematiske feil gir avvik (bias) i resultatet frå den «sanne»-verdien. Sjølv om tilfeldige feil aldri kan bli eliminert, kan dei minimerast ved bruk av eksperimentelle teknikkar. Tilfeldig feil er ein av fleire faktorar som kan påverke eit eksperiment. Ein slik faktor kan definerast som noko som vil påverke resultatet til eksperimentet betydeleg, dette kan til dømes vere temperatur, pH, katalysator og konsentrasjon. Denne typen faktorar, som kan endrast av den som utfører eksperimentet, blir kalla for ein kontrollerbar faktor, der verdien til faktorane blir kalla for nivå (42). På same måte finst det ukontrollerte faktorar som ikkje kan styrast (41).

Før ein set i gong eit eksperiment er det viktig å avgjere kva faktorar, og interaksjonen mellom dei, som kan påverke responsen. Denne prosessen blir kalla for optimaliseringa (41). Begrepet eksperimentelt design (DoE) blir vanlegvis brukt til å beskrive stadia av:

1. Identifisere faktorane som kan påverke resultata av eksperimentet (optimalisering).
2. Designe eksperimentet slik at effekten av ukontrollerte faktorar blir minimert.
3. Bruke statistisk analyse til å separere og evaluere effekten av dei ulike faktorane som er involvert.

Fleirvariabel modellering er ein statistisk metode som blir nytta til å beskrive og undersøkje samanhengen mellom fleire variablar som kan påverke eit system eller ein prosess. Ein slik modell vil inkludere fleire uavhengige variablar som vil påverke dei avhengige variablane. Ved hjelp av fleirvariabel modellering kan ein teste hypotesar og sjå på korleis endringane av ein uavhengig variabel blir påverke den avhengige. Dette kan bidra til å føreseie korleis eit system eller ein prosess vil reagere under forskjellige forutsetningar, og dermed hjelpe med å optimalisere eksperiment slik at ein oppnår dei resultata ein ønskjer. For å beskytte seg mot bias kan ein nytte randomisering i eksperimenta. Denne teknikken inneberer å velgje rekkjefølgja av eksperimenta tilfeldig (41).

Eit passende faktorielt design kan oppdage og estimere interaksjonane mellom faktorane, medan eit ein-om-gongen design som inneberer å endre nivået til ein enkel faktor, og halde dei andre faktorane på konstante nivå, vil ikkje kunne gjere det. I tillegg til dette vil eit faktorielt design vere meir gunstig da det trengst færre forsøk enn eit ein-om-gongen design, for å oppnå same presisjon. Eit eksempel på eit faktorielt design kan vere  $2^3$ -faktorielt design, som gir 8 forsøk (tabell 1) (42). I denne typen design blir faktorane ofte studert på to nivå: lav (-1) og høg (+1). Dette blir gjort for å redusere mengda eksperiment. Av denne grunn blir eit faktorielt design også ofte kalla for «screening designs», men ulempa med denne metoden er at eksperimenta aukar raskt til fleire faktorar som blir tatt med (41).

Nullpunktforsøk er også ein vanleg teknikk innan eksperimentelt design, der variablane i forsøket blir heldt konstant. Formålet med denne teknikken er å kunne samanlikne resultata av det opphavlege eksperimentet med eksperimenta der variablane varierast. På denne måten kan man isolere effekten av enkeltvariablane og få ein betre forståing av kva som påverkar resultata i eksperimentet (41).

*Tabell 1. Eksempel på eit  $2^3$ -faktorielt design, med variablar/faktorar  $X_1$ ,  $X_2$  og  $X_3$ .*

<b>Eksperiment</b>	<b><math>X_1</math></b>	<b><math>X_2</math></b>	<b><math>X_3</math></b>	<b>Respons</b>
1	-	-	-	$Y_1$
2	+	-	-	$Y_2$
3	-	+	-	$Y_3$
4	+	+	-	$Y_4$
5	-	-	+	$Y_5$
6	+	-	+	$Y_6$
7	-	+	+	$Y_7$
8	+	+	+	$Y_8$



### 3 Material og metode

Dette kapitlet tar føre seg dei ulike eksperimentelle metodane som blei nytta i bachelorprosjektet for å svare på forskingsspørsmåla som blei gitt i introduksjonskapitlet. Hovudforsøka i prosjektet vil vere å framstille isocyanidet etter ein Hofmann-karbylaminreaksjon da dette molekylet ikkje er til sals hos HVL-sine leverandørar, og deretter framstille prazikvantel etter syntesen rapportert av Dömling *et al.* Denne syntesen skal deretter optimaliserast ved bruk av eksperimentelt design og fleirvariabel modellering. I det eksperimentelle arbeidet skal det også nyttast ulike analyseteknikkar, som kromatografi (TLC, kolonnekromatografi og HPLC) og spektroskopi (NMR og FT-IR) for å separere og identifisere sambindingar.

Dei ulike metodane blei valt for å oppnå spesifikke mål. TLC blei brukt som ein rask og enkel metode for å bestemme identiteten til prøvekomponentane, medan kolonnekromatografi blei brukt for å reinse og fraksjonere forbindelsane basert på forskjellige fysiske eigenskapar. HPLC blei valt for å spare tid, samt kunne arbeide med små mengder stoff og difor oppnå eit meir nøyaktig utbytte av prazikvantel. NMR blei brukt for å bekrefte identiteten til forbindelsane basert på spektrale data. Her blei det nytta  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR som er standardmetodar innan organisk kjemi. Andre teknikkar som FT-IR blei nytta for å støtte og supplere NMR-dataene. Valet av desse metodane blei basert på deira anvendelegheit, sensitivitet, hastigheit, nøyaktigheit og evna til å levere nødvendige data for prosjektet sine mål og krav.

#### 3.1 Formlar og likningar

Formel 3 viser formelen for prosentutbytte.

$$\% \text{ Utbytte} = \left( \frac{\text{Faktisk utbytte (g)}}{\text{Teoretisk utbytte (g)}} \right) \cdot 100 \% \quad (3)$$

Formel 4 viser formelen for prosentconversion.

$$\% \text{ Conversion} = \frac{m_{\text{utgangstoff}} - m_{\text{reagert}}}{m_{\text{utgangstoff}}} \cdot 100\% \quad (4)$$

## 3.2 Instrumentering

- NMR - spektrofotometer: Spinsolve 60 Carbo Benchtop NMR Spectrometer
  - Leverandør: Magritek
- NMR - spektrofotometer: BioSpin AVANCE NEON ( $^1\text{H}$  600 MHz,  $^{13}\text{C}$  151 MHz)
  - Leverandør: Bruker
- FTIR - spektrometer: Nicolet iS5 FT-IR utstyrt med utbyttbar transmisjonsenher (iD1) og utbyttbar ATR-einhet av typen iD5 ATR med diamantkrystall, og med programvarene Omnic og Omnic Spectra.
  - Leverandør: Thermo Fisher Scientific
- Analysevekt
  - Instrument: XSE204
  - Leverandør: Mettler Toledo AS
- Overskålsvekt
  - Instrument: XB 4200C
  - Leverandør: Precisa
- UV - kabinett
  - Model CM-10A – Fluorescence analysis cabinet
  - Langbølga UV-stråling: 365 nm
  - Kortbølga UV-stråling: 254 nm
  - Leverandør: Spectroline ([www.spectro-UV.com](http://www.spectro-UV.com))
- Rotavapor: R-215, Büchi
  - Vacuum Controller V-855
  - Heating Bath B-491
  - Vakuumpump V-700
  - Leverandør: BioNordika Bergman
- Smeltepunktsmålar, Büchi
  - Tag nr: 20132
  - Leverandør: BioNordika Bergman
- HPLC - instrument: Ultimate 3000 (Dionex)
  - Gradientpumpe
  - «autosampler» med injeksjonsnål og «loop» på 50  $\mu\text{l}$
  - Kolonneomn med kolonne som er ei C18 - upolar kolonne.

Kolonna er ei pakka kolonne med partikkelstørrelse på 0,040-0,055 mm (230-500 mesh). Den indre kolonne diameteren er 2,1 mm, medan kolonnenlengda er 50 mm.

- Detektor av typen Diode Array Detektor DAD (fotodioderekke ultrafiolett detektor).
- Leverandør: Thermo Fisher Scientific

### 3.3 Utstyr

Utstyr nytta til det eksperimentelle arbeidet:

- 500 ml og 25 ml einhalsa rundkolbe
- NMR-røyr
- Kapillærrøyr
- Pasteurpipette
- Glaspipette
- Automatpipette
- Trakter
- Varmluftspistol
- TLC plater
- Kolonne for kolumnekromatografi
- Begerglas
- Erlenmeyerkolbar
- Sinternut med sugokolbe
- Vakuumslange
- Vasslange
- Refluks-kondenser
- Skilletrakt med trykkutjamnar
- Dråpetrakt
- Vegeskip
- Termometer
- Matolje
- Vialar
- Kanyler

### 3.4 Kjemikalier

Tabell 2 viser kjemikalie brukt til kolonnekromatografi, TLC, HPLC og NMR.

**Tabell 2.** Kjemikalie brukt til TLC, Kolonnekromatografi, HPLC og NMR.

Namn	Kjemisk formel	Molekylvekt (g/mol)	Reinheit (%)	Leverandør	CAS
Heksan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	86,18	> 99	Honeywell /VWR	110-54-3
Etylacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	≤ 100	Merck	141-78-6
Aceton	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	58,08	100	VWR	67-64-1
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	≤ 100	Merck	67-56-1
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	119,38	> 99	VWR	67-66-3
Vanillin	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152,15	99	BVBA	121-33-5
Etanol	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46,07	> 99	Antibac	64-17-5
Svovelsyre	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98,09	96	BVBA	7664-93-9
Phospho- molybdnsyre	H <sub>3</sub> PMo <sub>12</sub> O <sub>40</sub>	1825,29 120,38	> 95	BVBA	51429-74-4
Deuterert kloroform	CDCl <sub>3</sub>		99,8	VWR	865-49-6

Tabell 3 viser kjemikalie brukt til syntesen av (2-isocyanoetyl)benzen (**2**) i følge den modifisere Ugi-karbylaminreaksjonen.

**Tabell 3.** Kjemikalie brukt til syntesen av (2-isocyanoetyl)benzen (**2**).

Namn	Kjemisk formel	Molekylvekt (g/mol)	Reinheit (%)	Leverandør	CAS
Natriumhydroksid	NaOH	39,99	99-100	Merck	1310-73-2
2-fenyletylamin	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N	121,18	≤ 100	Merck	64-04-0
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	119,37	≤ 100	Merck	67-66-3
Benzyltrietyl- ammonium-klorid	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> ClN	227,78	≤ 100	Merck	56-37-1
Diklormetan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93	> 99,5	BVBA	75-09-2
Saltsyre	HCl	36,46	34-37	VWR	7647-01-0
Natriumklorid	NaCl	58,44	100	Merck	7647-14-5
(Vassfri) Natriumsulfat	NaSO <sub>4</sub>	142,04	≤ 99	Merck	7757-82-6

Tabell 4 viser kjemikalie brukt til syntesen av *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl sykloheksenkarboksamid (6) (Ugi-reaksjonen).

**Tabell 4.** Kjemikalie brukt til syntesen av *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl sykloheksenkarboksamid (6).

Namn	Kjemisk formel	Molekylvekt (g/mol)	Reinheit (%)	Leverandør	CAS
Paraformaldehyd	CH <sub>2</sub> O		96	BVBA	30525-89-4
2,2-dimetoksyetylamin	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	105,14	99	Apollo Scientific	22483-09-6
Sykloheksylkarboksylsyre	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	128,17	≤ 99	Apollo Scientific	98-89-5
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	32,04	99	BVBA	67-56-1
Dietyleter (Vassfri)	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	74,12	≤ 100	Merck	60-29-1
Natriumsulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	≤ 99	Merck	7757-82-6
(2-isocyanoetyl)benzen	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N	131,17	-	-	59795-89-0

Tabell 5 viser kjemikalie brukt til syntesen av prazikvantel syntesen (Pictet-Spengler reaksjonen).

**Tabell 5.** Kjemikalie brukt til syntesen av prazikvantel.

Namn	Kjemisk formel	Molekylvekt (g/mol)	Reinheit (%)	Leverandør	CAS
Metansulfonsyre	CH <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	96,11	≤ 100	Merck	75-75-2
Natriumhydroksid	NaOH	39,99	> 99-100	Merck	1310-73-2
Dietyleter	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> O	74,12	≤ 100	Merck	60-29-7
Etylacetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88,11	≤ 100	Merck	141-78-6
<i>N</i> -(2,2-dimetoksy)- <i>N</i> -(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl-sykloheksenkarboksamid	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	376,49	-	-	90142-13-5
Prazikvantel	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	312,41	-	-	55268-74-1
Etylmetylketon	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O	72,11	> 99	VWR	78-93-3
Propan-2-ol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60,10	100	VWR	67-63-0
p-toluensulfonsyre	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> S	172,20	≤ 100	BVBA	104-15-4

### 3.5 Framgangsmåte

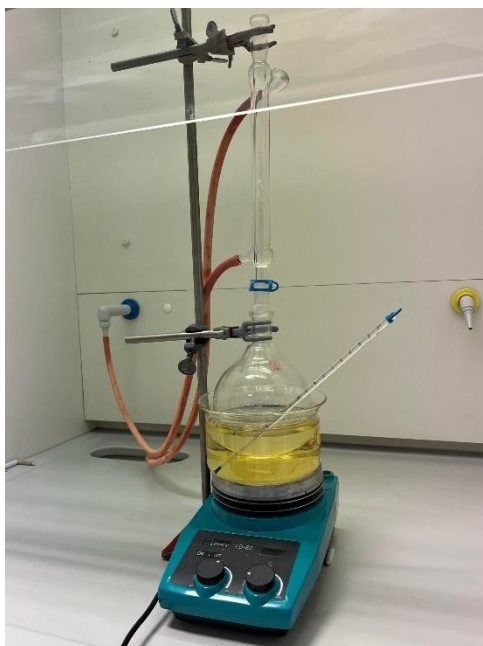
Analytisk tynnsjikt-kromatografi (TLC) blei gjort på SiO<sub>2</sub> plater av aluminium frå Macherey-Nagel. Visualiseringa av TLC-platene blei gjort ved bruk av UV-lys ved 254 nm, eller ved bruk av framkallingsmiddel. Det blei utført proton og karbon-13 NMR ved bruk av Spinsolve 60 Carbo Benchtop NMR Spektrometer frå Magritek og frå Bruker BioSpin AVANCE NEO. <sup>1</sup>H-NMR (blei kun tatt opp ved 600MHz) og <sup>13</sup>C-NMR blei tatt opp høvesvis 61 MHz og 15 MHz, og høvesvis 600 MHz og 151 MHz. Løysmiddel som blei brukt blir nemnt. Dei kjemiske skifta er rapportert som δ-verdiar oppgitt i parts per million (ppm).

Oppkonsentrering av stoff på rotavapor blei utført ved lågt trykk og med ein temperatur på over 60°C. Kolonnekromatografi blei utført ved bruk av ei kolonne med diameter = 6 cm og lengde = 30 cm pakka med 10 cm silikagel (pore størrelse 60 Å, 230-400 mesh partikkel-størrelse, 40-63 µm partikkel-størrelse).

#### 3.5.1 Syntese av (2-isocynoetyl)benzen (2) ved hjelp av ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon

Natriumhydroksid (NaOH) (60,12 g, 1,5 mol) blei porsjonsvis tilsett ein 500 ml einhalsa rundkolbe fylt med 60 ml vatn, utstyrt med magnetrøyrar og dråpetrakt . Deretter vart det laga ei blanding av 2-fenyletylamin (2') (23,44 g, 0,19 mol), kloroform (16,0 ml, 0,19 mol) og benzyltrietylammonium-klorid (0,40 g, 1,8 mmol) i 60 ml diklormetan. Denne blandinga vart tilsett dropevis til rundkolben ved bruk av ei dråpetrakt over eit tidsintervall på 10 min.

Vidare vart dråpetrakta bytta ut med ein reflux-kjøler, og blandinga blei sett på reflux i 4 timar, i eit oljebad med ein temperatur på over 60°C, vist i figur 22.



**Figur 22.** Oppsett for refluxkoking av (2-isocianoetyl)benzen (**2**). Bilde tatt av forfatterane av oppgåva.

Etterpå vart blandinga fortynna med is og vatn (50 ml) og overført til ei skilletrakt. Det vasshaldige laget vart ekstrahert ved bruk av diklormetan (2 x 50 ml). Det organiske laget vart deretter vaska med ei nedkjølt fortynna saltsyreløysing (1 N, 3 x 100 ml). Deretter blei det organiske laget tørka ved bruk av vassfritt natriumsulfat. Tørkemiddelet blei fjerna ved filtrering på sinternutch, og løysemiddelet blei fjerna ved bruk av rotavapor med vassbad på rundt 55°C. Filtratet blei så køyrt gjennom ein kolonnekromatografi med kolonnestørrelse på diameter = 6 cm og lengde = 30 cm. Oppsettet av kolonnekromatografi er vist i figur 23. For å utføre kolonnekromatografi blei ei kolonne med passende størrelse forberedt og fylt med et eigna adsorbentmateriale, i dette tilfellet 10 cm silikagel. Vidare vart kolonna pakka tett for å unngå kanalar og luftlommer. Dette blei gjort ved å helle silikagelen ut i ein 500 ml erlenmeyerkolbe og deretter fylle på med eluent til ein får ein gel-aktig konsistens. Blandinga vart så ført tilbake i kolonna. For å forberede prøva, vart den løyst opp i eit passende løysemiddel (DCM). Så vart prøva påført øvst på kolonna ved bruk av ei målepipette. 0,5 l av den mobile fasen (eluent), beståande av 30 % etylacetat og 70 % heksan ved bruk av same målepipette vaska med aceton, og vidare vart løysinga helt i ved bruk av ein glasstav for å unngå oppvirvel av silikagel. Etterpå vart det fylt på med ei løysning av 60 % etylacetat og 40 % heksan. Når kvar forbindelse nådde botnen av kolonna, vart den frigjort og samla i separate fraksjonar med volum på 75-100 ml. Dei innsamla fraksjonane vart analysert ved bruk av TLC. Fraksjonane som inneheldt produkt vart blanda og overført til kvar sin førehandsvege

rundkolbe og køyrt på rotavapor under lavt trykk i eit vassbad på 50 – 60°C for å fjerne løysemiddel. Produktet vart også sett på vasstrålevakuum og vakuumpumpe for å fjerne dei siste restane av løysemiddelet. Etter oppkonsentrering, blei (2-isocyanoetyl)benzen (**2**) gitt som ei gulaktig olje (11,99 g). Det konsentrerte produktet vart køyrt i <sup>13</sup>C-NMR for å sjekke om produktet var (**2**). Rundkolben blei deretter målt på nytt og utbytte blei berekna.



*Figur 23. Oppsett av kolonnekromatografi. Bilde tatt av forfattarane av oppgåva.*

### 3.5.2 Syntese av *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl)-sykloheksenkarboksamid (**6**) (Ugi-reaksjon)

Det vart laga ei blanding av paraformaldehyd (**3**) (2,69 g, 0,11 mol), 2,2- dimetoksyetylamin (**5**) (9,32 g, 0,11 mol) og sykloheksylkarboksylsyre (**4**) (11,38 g, 0,11 mol) i metanol (88 ml). (2-isocyanoetyl)benzen (**2**) (11,99 g) vart så dropevis tilsett blandinga ved 0°C under røring. Løysinga vart så sett under kontinuerleg omrøring ved romtemperatur i 48 timar. Etter dei 48 timane vart løysinga køyrt på rotavapor med lavt trykk i eit vassbad på over 60°C. Deretter vart den konsentrerte løysinga løyst opp i dietyleter (150 ml) og vaska med vatn (100 ml) og saltlake (100 ml). Restane vart så tørka ved bruk av vassfritt natriumsulfat og filtrert ved bruk av sinternutch før løysninga blei køyrt på rotavapor og krystallisert.

Grunna løysninga sin viskositet vart den ikkje krystallisert fullstendig og det vart difor utført kolonnekromatografi. Kolonna vart pakka med 10 cm silikagel. Først blei det brukt ein eluent



som bestod av 60 % etylacetat og 40 % heksan før polariteten blei økt til 80 % etylacetat og 20 % heksan. Grunna mangel på etylacetat, vart det nytta ein DCM mot slutten. Det vart samla 13 fraksjonar med volum mellom 75-100 ml. Vidare vart det utført TLC for å finne fraksjonane som inneheldt produkt. Fraksjonane som inneheldt produkt vart kombinert og overført til ein førehandsvege rundkolbe og køyrt på rotavapor under lavt trykk i eit vassbad på 60°C for å fjerne løysemiddelane. Produktet vart også sett på vasstrålevakuum og vakuumpumpe for å fjerne siste restane av løysemiddel. Rundkolben vart deretter vege på nytt og utbytte blei berekna. Etter oppkonsentrering, blei *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl-sykloheksenkarboksamid (**6**) gitt som ein lysare gulaktig olje (29,06 g). Det oppkonsentrerte produktet vart så køyrt i <sup>13</sup>C-NMR.

### 3.5.3 Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, **1**) (Pictet-Spengler reaksjon)

*N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl-sykloheksenkarboksamid (**6**) (11,57 g, 79,8 mmol) vart porsjonsvis tilsett metansulfonsyre (MSA) (59,36 g/104 ml, 1,6 mol) ved 0°C under røring. Deretter vart løysninga varma opp under omrøring til 70°C i 6 timar. Etter 6 timar vart reaksjonsblandinga helt i ei blanding av is og vatn og pH-en blei justert til pH 8 ved bruk av ca. 200 ml vasshaldig NaOH (20 %) og vidare ekstrahert ved bruk av dietyleter (4 x 400 ml). Det kombinerte organiske laget vart vaska med saltlake (100 ml) og restane vart så tørka ved bruk av vassfritt natriumsulfat og filtrert ved bruk av sinternutch før løysninga vart køyrt på rotavapor og krystallisert. Løysninga ville i første omgang ikkje krystallisere, og det blei difor køyrt kolonnekromatografi. Kolonna vart pakka med 10 cm silikagel. Først vart det brukt ein eluent som bestod av 50 % etylacetat og 50 % heksan før polariteten blei økt til 60 % etylacetat og 40 % heksan, deretter 80 % etylacetat og 20 % heksan. Mot slutten vart det brukt rein etylacetat. Det vart samla 22 fraksjonar med volum mellom 75-100 ml. Vidare vart det utført TLC for å finne fraksjonane som inneheldt produkt. Fraksjonane som inneheldt produkt vart blanda og overført til ein førehandsvege rundkolbe og køyrt på rotavapor under lavt trykk i eit vassbad på over 60°C for å fjerne løysemiddelane. Løysninga vart så sett på vasstrålevakuum og vakuumpumpe for å fjerne alt løysemiddel. Produktet krystalliserte seg ikkje godt og vart rekrystallisert ved hjelp av etylacetat/heksan (40:60) for å oppnå prazikvantel (**1**) som eit kvit-aktig fast stoff. Rekrystalliseringa vart utført ved å tilsette løysemiddelblandinga (etylacetat/heksan (40:60)) til ein 250 ml rundkolbe med innhald av prazikvantel-krystallar, opp til ca. halvparten av kolbens volum. Løysinga vart kondenskokt under omrøring ved hjelp av eit vassbad på over 80°C. Grunna dårleg løysingsevne, blei

rundkolben heldt i mikrobølgekar for å framskynde prosessen. Ferdig oppløyst blanding av (1) blei avkjølt til RT og deretter sett 1 time i frysaren. Løysinga vart filtrert ved bruk av sinternutch og dei nye krystallane blei lufttørkar i eit begerglas. Til slutt blei det oppkonsentrerte produktet køyrt i  $^1\text{H-NMR}$  og  $^{13}\text{C-NMR}$ .

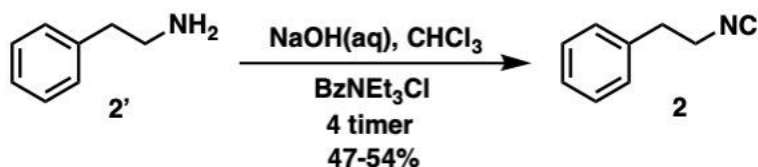
## 4 Resultat og diskusjon

I dette kapittelet blir det gjort rede for resultatene som blei oppnådd frå analysane og metodane beskrive i material- og metodekapittelet. Vidare vil resultatene også bli diskutert.

### 4.1 Syntese av (2-isocianoetyl)benzen (**2**) ved hjelp av ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon

I 2010 rapportert Dömling *et al.* framstillinga av (**2**) frå (**2'**) i ein modifisert Hofmann-karbylaminreaksjon rapportert av Gokel *et al.* i 1976 og 1988 (15). Denne syntesen involvera at eit primært amin blir omdanna til eit isocyanid. Ei blanding av (**2'**), kloroform, og benzyltrietylammmonium-klorid i DCM blei dråpevis tilsett ei blanding av NaOH og vatn. Blandinga blei varma opp til 60°C og røyrt for 4 timar. Produktet blei opparbeida med DCM og ei HCl-løysning, samt saltlake, før det blei tørka og køyrt gjennom ei kolonne for reinsing. Det blei gjennomført TLC og <sup>13</sup>C-NMR på samtlige batchar. I alle <sup>13</sup>C-NMR-spekterane av (**2**) blei det observert spor av løysemiddel. Det blei gjort fleire forsøk på å fjerne dette så godt som mogleg ved hjelp av ulike metodar, men grunna ein rotavapor med dårleg temperaturkontroll var det vanskeleg å få fjerna alt. Desse toppane vil vere kommentert under kvar batch. R<sub>f</sub>-verdien for (**2**) er ikkje oppgitt i artikkelen til Dömling *et al.*, og desse kunne dermed ikkje samanliknast, men R<sub>f</sub>-verdiane til batchane var svært like, og NMR-spekterane viste tydeleg at eksperimenta hadde gitt ønska produkt.

I litteraturen har det blitt rapportert eit utbytte på 61 %. Ved å følgje Dömling *et al.* sin framgangsmåte blei det oppnådd eit moderat utbytte på 47-54 %. Batch syntesen av (**2**) er vist i figur 24.



Figur 24. Syntesen av isocyanidet (**2**).

Kvart forsøk førte til ei auking i utbytte av (**2**), noko som kom av trening og meir erfaring, og viser til forbetring i utførselen av arbeidet. Ein ville også ha nådd eit betre utbytte ved bruk av

mekanisk røring, men det vart ikkje brukt her. Dette var ikkje eit kritisk trinn i oppgåva, og ein var difor trygg på å gå vidare med det eksperimentelle arbeidet. Prosentutbytte blei berekna ved bruk av formel 3, og blei funne for å vurdere det i forhold til det forventede utbytte og det dokumenterte utbytte i litteraturen. Utrekning av prosentutbytte ligg i vedlegg 1. Tabell 6 gir ei oppsummering av dei oppmålte verdiane til dei ulike stoffa som blei brukt til å lage (2), samt berekna utbytte for batch 1 reaksjon 1 (B1-R1), batch 2 reaksjon 1 (B2-R1) og batch 3 reaksjon 1 (B3-R1).

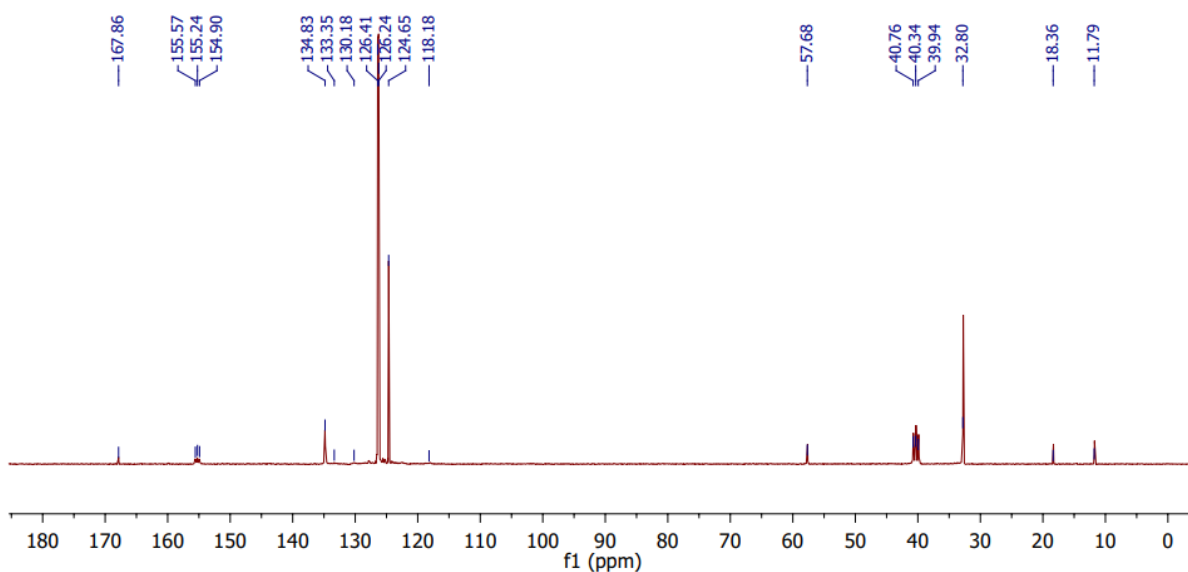
**Tabell 6.** Oppmålte verdier og berekna utbytte for Hofmann-karbylaminreaksjon (R1) for batch 1,2 og 3.

Namn på reaksjon	NaOH (g)	2-fenyletylamin (g)	Kloroform (ml)	Benzyltrietylammonium-klorid (g)	Utbytte (%)
B1-R1	60,12	24,44	16,0	0,40	47
B2-R1	60,13	23,42	16,0	0,40	52
B3-R1	60,05	23,43	16,0	0,41	54

### Batch 1-Reaksjon 1 (B1-R1)

I den første syntesen av forbindelse (2) blei det køyrt kolonnekromatografi som gav fraksjonar frå 0-12. Det vart funne produkt i fraksjonane 0-4, som kunne detekterast ved bruk av TLC der  $R_f = 0,83$  (heksan:etylacetat, 40:60). Etter fraksjon 4 viste produktet ikkje lengre på TLC-platene og det blei difor konkludert med at fraksjon 5 ikkje inneheldt produkt.  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) av produktet vart samanlikna med toppane funne i litteraturen (blant anna artikkelen til Dömling *et al.*). Ved å samanlikne det kunne ein sjå at ein hadde oppnådd det ynskja produktet. Det vart også observert spor av løysemiddelet etylacetat i spektera for både B1, B2 og B3 som fire toppar ved ca. 170, 60 og 10-20 ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR prøvene for forbindelse (2) blei køyrt utan  $\text{CDCl}_3$  som viser til ein liten ulikheit i signal i figur 25, 26, og 27 samanlikna med signala rapportert av Dömling *et al.* Utbytte blei berekna til 47 % som vist i tabell 6, som er eit nokså godt utbytte samanlikna med den Dömling *et al.* rapporterte utbytte på 61 %.

Figur 25 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter for (2-isocyanoetyl)benzen, batch 1 med spor av etylacetat.



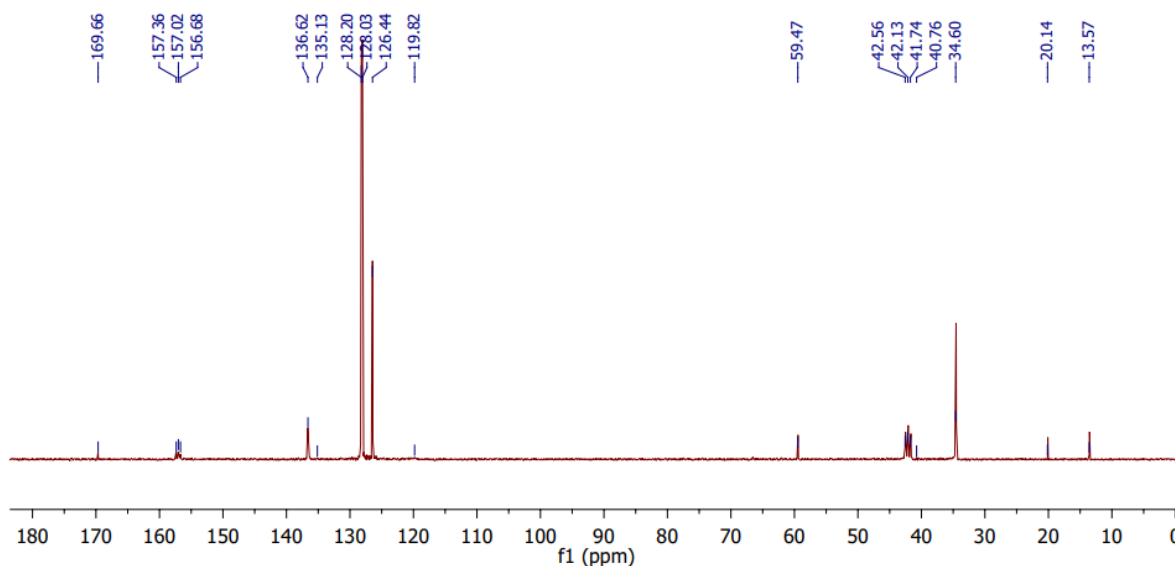
**Figur 25.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av isocyanidet (**2**), B1-R1.

$^{13}\text{C}$ -NMR av B1-R1 (150 MHz)  $\delta$ = 155,24, 134,83, 133,35, 130,18, 126,41, 126,24, 124,65, 118,18, 40,34, 32,80 ppm.

### Batch 2-Reaksjon 1 (B2-R1)

Det blei også køyrt kolonnekromatografi av batch 2 reaksjon 1 (B2-R1) av forbindelse (**2**), som gav fraksjonane 0-8, der det blei funne produkt i fraksjon 0-3. Dette kunne detekterast ved bruk av TLC med  $R_f$ = 0,85 (heksan:etylacetat, 40:60). Denne  $R_f$ -verdien gav omtrent same verdi som i B1-R1, som lover godt. Det vart ikkje funne noko produkt i dei resterande fraksjonane.  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz) av forbindelse (**2**) viste tydeleg produkt etter samanlikning av dei kjemiske skift verdiane med dei rapporterte verdiane til Dömling *et al.* Her blei det også observert spor av etylacetat i prøva. Utbytte vart berekna til 52 %, vist i tabell 6, som viser til eit forbetra utbytte.

Figur 26 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekteret for (2-isocyanoetyl)benzen (**2**) batch 2 med spor av etylacetat.



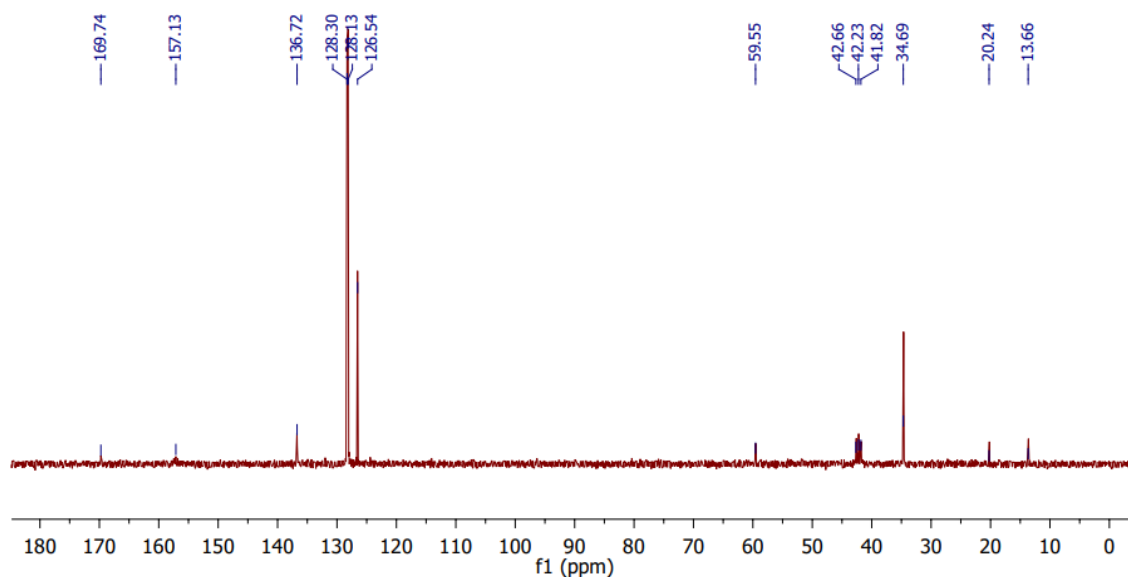
**Figur 26.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av isocyanidet (**2**), B2-R1.

$^{13}\text{C}$ -NMR av B2-R1 (15 MHz)  $\delta = 157,02, 136,62, 135,13, 128,20, 128,03, 126,44, 119,82, 42,13, 40,76, 34,60$  ppm.

### Batch 3-Reaksjon 1 (B3-R1)

Kolonnekromatografi av forbindelse (**2**) (B3-R1) gav fraksjonane 0-9, der det blei funne produkt i fraksjon 0-6. Dette kunne detekterast ved bruk av TLC med  $R_f = 0,97$  (heksan:etylacetat, 40:60).  $R_f$ -verdien i dette forsøket gav ein liten forskjell i forhold til B1-R1 og B2-R2. Dette kan kome av at stoffet på TLC-plata gav ein avlang flekk, eller eventuelle forureiningar i prøva. Etter fraksjon 4 viste produktet ganske svakt på TLC-platene, og det blei konkludert med at fraksjon 4-6 også skulle takast med for å få med alt produkt.  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz) av B3-R1 viste det ynskja stoffet. Her blei det også observert spor av løysemiddel. Utbytte vart berekna til 54 %, vist i tabell 6, og endte opp med å vere det beste oppnådde utbytte av (**2**) i dette prosjektet. For B3-R1 blir det berre observert ein topp ved 157 ppm, dette kan tyde på låg konsentrasjon av stoffet der instrumentet har oppdaga dei tre separate toppane som ein brei topp. Det kan også skyldast brei linjebredde som fører til overlapping av signal.

Figur 27 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter for (2-isocianoetyl)benzen, batch 3, med spor av etylacetat.

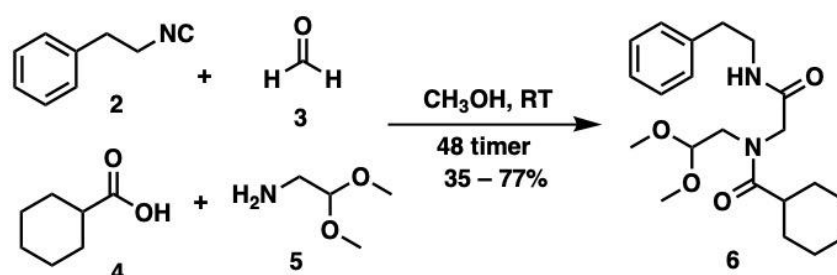


**Figur 27.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av isocyanidet (2), B3-R1, løyst i  $\text{CDCl}_3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) av B3-R1  $\delta = 157,13, 136,72, 128,30, 128,13, 126,54, 59,55, 42,23, 34,69$  ppm.

#### 4.2 Syntesen av *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl sykloheksenkarboksamid (6) (Ugi-reaksjon)

I 2010 rapportert Dömling *et al.* en kjemisk prosess for å oppnå forbindelse (6). Denne syntesen er vist i figur 28 og er ein Ugi-multikomponent reaksjon mellom eit isocyanid (2), formaldehyd (3), karboksylsyre (4) og aminet (5). Sambindinga (2) blei dråpevis tilsett ei blanding av desse komponentane saman med MeOH ved 0 °C, og blei deretter rørt for 48 timar før opparbeiding. I framtidig arbeid vil det vere interessant å redusere reaksjonstida på 48 timar, noko det ikkje blei tid til eller satt fokus på i dette arbeidet.



**Figur 28.** Syntesen av *N*-(2,2-dimetoksy)-*N*-(2-okso-2-(2-fenyletylamino)-etyl sykloheksenkarboksamid (6), Ugi-reaksjon.

Arbeidet med opparbeiding og reinsing av forbindelse (6) var både tidskrevjande og arbeidskrevjande. Denne blandinga blei løyst i dietyleter, før den blei vaska med vatn og saltlake. Då vatnet blei tilsett, danna det seg emulsjon. Ulike metodar blei nytta for å løyse problemet. I det to første forsøka var det mogleg å løyse opp emulsjonen, men i det siste forsøket var det vanskelegare. Til slutt måtte produktet ekstraherast, og det mistenka difor at noko produkt gjekk tapt i denne prosessen. Det blei deretter tatt TLC-prøver av forbindelsen og  $^{13}\text{C}$ -NMR. Begge metodane viste tendensar til ureinheiter i produktet, og det blei difor gjennomført kolonnekromatografi. I eksperimentprosedyren publisert av Dömling *et al.* var det ikkje gjennomført kolonnekromatografi for forbindelse (6). Det viste seg og vere ei utfordring å arbeide med (6) under kolonnekromatografi grunna forbindelsens høge viskositet. Som ei løysing på dette blei det nytta ein passende eluent beståande av heksan og etylacetat for å løyse opp forbindelsen. Denne reaksjonen blei gjennomført tre gongar gjennom prosjektperioden, og utbytte av (6) blei auka frå 35 til 77 % utbytte. Dette var midlertidig eit stykke unna utbytte som blei oppnådd av Dömling *et al.* som var på 98 %. Likevel blei det observert ein aukande tendens i utbytte for kvar batch som blei gjennomført, som kan indikere ei forbetring i utføringa av laboratoriarbeidet. Utbytta som blei oppnådd av (6) i dette prosjektet kan ha ein litt høgare verdi enn det faktiske utbytte grunna nærværet til etylacetat i produktet. Sjølv om det blei nytta ulike metodar for å fjerne løysemiddelet, var det framleis spor av etylacetat på NMR-spektra. Dette kjem truleg av at produkta som blei danna er tjukke oljer som kan hindre etylacetat frå å dampe av, samt dårleg temperaturkontroll på rotavapor-instrumentet som nemnt tidlegare. Det blei ikkje gjennomført ytterlegare forsøk av (6) for å forbetre utbytte. Resultata frå NMR-spektra indikerte nærvær av produktet, og det blei konkludert med at utbytte var tilstrekkeleg til å forsette prosessen.

Tabell 7 gir ei oppsummering av oppmålte verdiar til Ugi-reaksjonen for batch 1, 2 og 3.

Mengda til reaktantane blei nedskalert i høve til rapportert mengde av Dömling *et al.*

Prosentutbytte blei berekna frå den avgrensa reaktanten ved bruk av formel 3 og samanlikna med det forventa utbytte og det dokumenterte utbytte i litteraturen (Dömling *et al.*)

Berekningane av prosentutbytte er vist i vedlegg .For B1-R1 var prosentutbytte dårlegare enn forventa, dette grunna tap av produkt under opparbeiding.



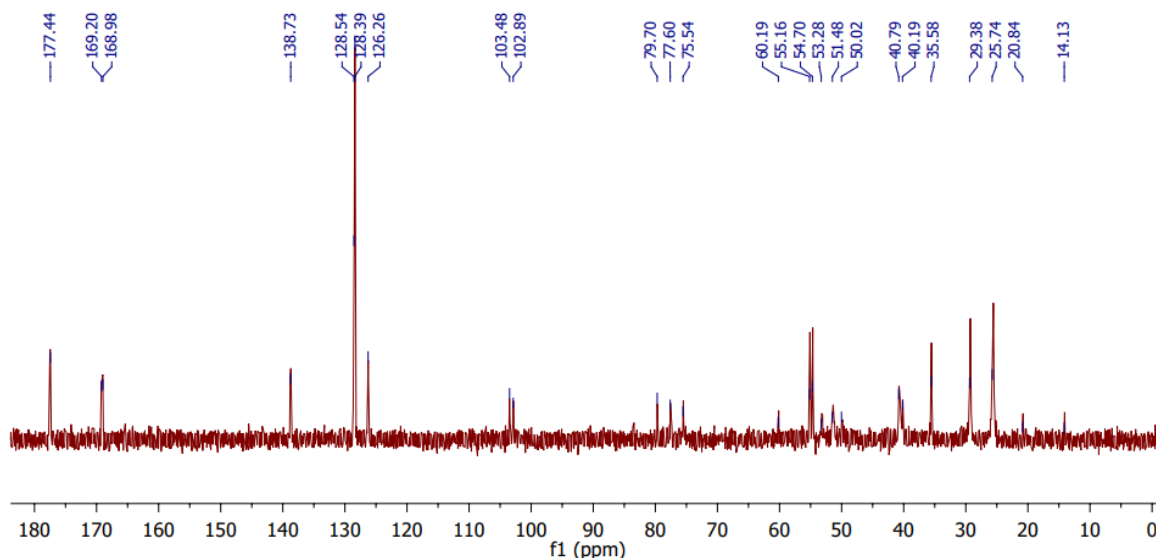
**Tabell 7.** Oppmålte verdier og berekna utbytte for Ugi-reaksjonen (R2) for batch 1, 2 og 3.

Namn på reaksjon	(2-isocynoetyl)-benzen (g)	Paraformaldehyd (g)	2,2-dimetoksyetylamin (g)	MeOH (ml)	Utbytte (%)
B1-R2	11,99	2,69	9,32	88	35
B2-R2	13,23	2,94	10,29	97	70
B3-R2	13,65	3,03	12,54	100	77

### Batch 1-Reaksjon 2 (B1-R2)

I batch 1 av forbindelse (6) vart produktet køyrt gjennom ein kolonnekromatografi for reinsing, og det blei funne produkt i fraksjonane 3-11. Dette vart detektert ved bruk av TLC. Fraksjon 11 var så svak at kolonna blei avslutta her, og høgst sannsynleg villa det ikkje vert produkt i fraksjon 12. Desse fraksjonane blei kombinert og køyrt på rotavapor, før det blei tatt TLC av produktet der retensjonsfaktoren vart rekna ut til å vere  $R_f = 0,29$  (heksan:etylacetat, 40:60). Retensjonsfaktoren i artikkelen av Dömling *et al.* vart oppgitt til å vere  $R_f = 0,33$ .  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) av fraksjon 3-11 viste tydeleg produktet av diamidet etter samanlikning med artikkelen. For B1 dukkar spor av løysemiddel, etylacetat, opp som fire toppar ved ca. 170, 60 og 10-20 ppm. Prosentutbytte til forbindelse (6) blei berekna til å vere 35 % vist i tabell 7. Sjølv om denne verdien er langt unna utbytte i artikkelen på 98 % vil det ikkje ha mykje å seie for det neste trinnet. Dette dårlege utbytte skyldast også søling av produkt under opparbeiding. Prosentutbytte økte vidare i B2-R1 og B3-R1.

Figur 29 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekteret av forbindelse (6), batch 1, med  $\text{CDCl}_3$  som løysemiddel. Spekteret inneheld spor av etylacetat.



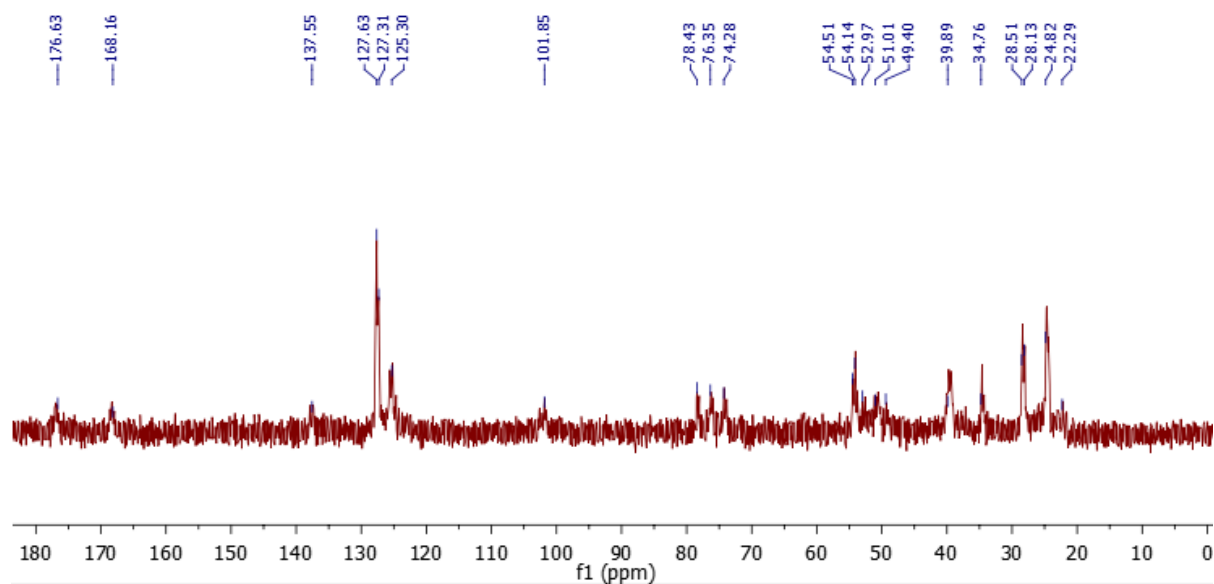
**Figur 29.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av forbindelse (6) B1-R2, løyst i  $\text{CDCl}_3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) av B1-R2  $\delta = 177,44, 168,98, 138,73, 128,54, 128,39, 126,26, 103,48, 102,89, 60,19, 55,16, 54,70, 53,28, 51,48, 50,02, 40,79, 40,19, 35,58, 29,38, 25,74$  ppm.

### Batch 2-Reaksjon 2 (B2-R2)

I batch 2 av forbindelse (6) blei det funne produkt i fraksjonane 2-11 etter kolonnekromatografi. Desse fraksjonane vart kombinert og køyrt på rotavapor, før det blei tatt TLC av produktet der retensjonsfaktoren blei berekna til å vere  $R_f = 0,40$  (heksan:etylacetat, 40:60).  $R_f$ -verdien avviker meir frå litteraturverdien på 0,33 for B2-R2, noko som kan kome av at det var vanskeleg å måle flekken av produkt da den var avlang.  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) av fraksjon hadde nokså like verdiar som B1-R2, men her observera ein ei mindre mengd signal, dette kan tyde på låg konsentrasjon av stoffet, og brei linjebredde. Ein kan også sjå at det er mykje støy til stades i spekteret (figur 30). Prosentutbytte til (6) blei berekna til å vere 70 % som vist i tabell 7, som er mykje betre enn utbytte i B1-R2.

Figur 30 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av forbindelse (6), batch 2, med  $\text{CDCl}_3$  som løysemiddel.



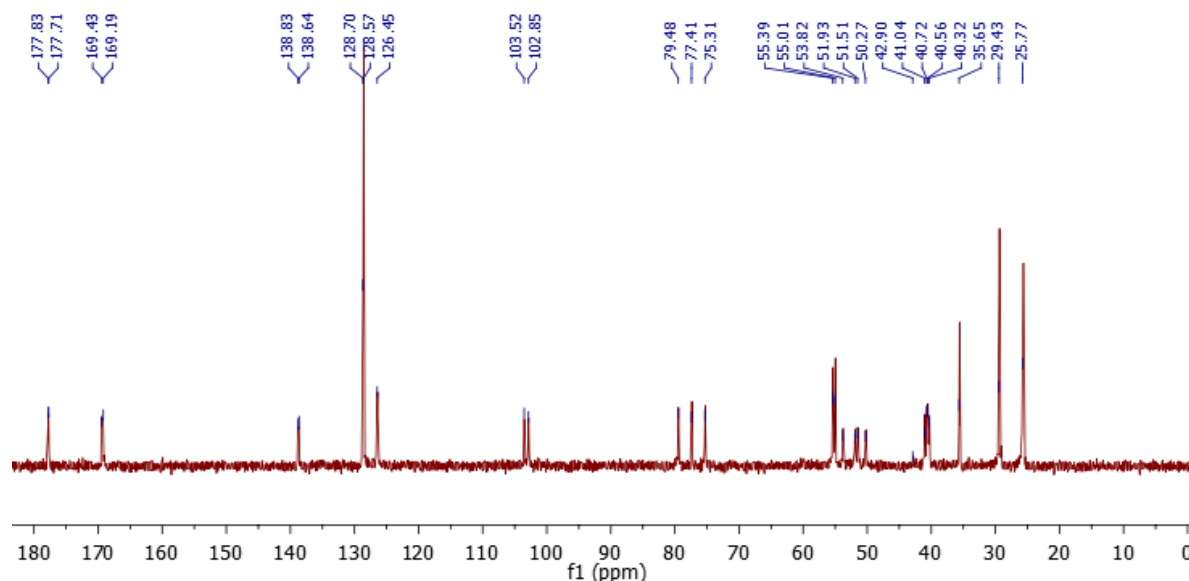
**Figur 30.**  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av forbindelse (6), B2-R2, løyst i  $\text{CDCl}_3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) av B2-R2  $\delta = 176,63, 168,16, 137,55, 127,63, 127,31, 125,30, 101,85, 54,51, 54,14, 52,97, 51,01, 49,40, 39,89, 34,76, 28,51, 28,13, 24,82, 22,29$  ppm.

### Batch 3-Reaksjon 2 (B3-R2)

I batch 3 av forbindelse (6) blei det funne produkt i fraksjonane 2-11 etter kolonnekromatografi. Desse fraksjonane blei kombinert og køyrt på rotavapor, før det blei tatt TLC av produktet der retensjonsfaktoren vart rekna ut til å vere  $R_f = 0,32$  (heksan:etylacetat, 40:60).  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) av fraksjon 2-11 hadde i første omgang dårleg grunnlinje og det blei difor tatt opp eit nytt spekter som stod over natta. Sjølv om det første spekteret ikkje vart like bra ser ein at toppane har svært like verdiar som B1-R2. Prosentutbytte til (6) blei berekna til å vere 77 % vist i tabell 7 **Tabell 7**, som er betre enn utbytte i B2-R2.

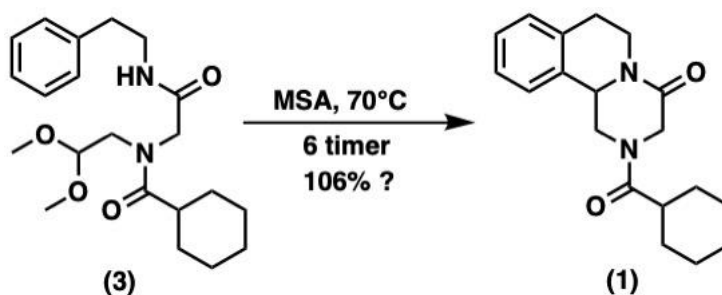
Figur 31 viser  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter for forbindelse (6), batch 3 med  $\text{CDCl}_3$  som løysemiddel.



Figur 31.  $^{13}\text{C}$ -NMR spekter av forbindelse (6), B3-R2, løyst i  $\text{CDCl}_3$ .

$^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) av B3-R2  $\delta = 177,83, 177,71, 169,43, 169,19, 138,83, 138,64, 128,70, 128,57, 126,45, 103,52, 102,85, 55,39, 55,01, 53,82, 51,93, 51,51, 50,27, 42,90, 41,04, 40,72, 40,56, 40,32, 35,65, 29,43, 25,77$  ppm.

#### 4.3 Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, 1) (Pictet-Spengler reaksjon)



Figur 32. Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, 1) (Pictet-Spengler reaksjon).

PZQ (1) blei produsert frå utgangstoffet (6) i MSA, vist i figur 32, og stod i 6 t ved ein temperatur på  $70^\circ\text{C}$ . pH-en blei justert ved bruk av NaOH. Det skulle svært lite base til før pH-en steig frå sur svært basisk. I eit av forsøka steig pH-en til 12, men sidan produktet ikkje skulle varmast vidare, var det liten risiko for at ein anna reaksjon skulle oppstå. Det ville

likevel vore mogleg å justere pH-en tilbake ved hjelp av ei syre viss det hadde vore nødvendig.

Etter opparbeiding med dietyleter og saltlake blei det utført TLC på PZQ (1) og forbindelse (6), for å sjå om det hadde blitt danna PZQ (1) frå (6). Under UV-lys såg dei to stoffa nesten identiske ut, men dei hadde forskjellig farge ved bruk av framkallingsmiddelet vanilin og phosphomolybdensyre. Dette indikerte at det var forskjellige funksjonelle grupper til stades. For å separere og reinse PZQ (1), blei det utført kolonnekromatografi med ein mobil fase som bestod av etylacetat og heksan. I byrjinga blei det brukt 50 % etylacetat, og ved slutten blei det brukt rein etylacetat for å sikre at produktet hadde blitt eluert ut av kolonna og for å minimere ureinheiter. Dersom produktet ikkje hadde blitt eluert ved bruk av rein etylacetat, kunne ein ha forsøkt å gjere mobilfasen meir polar ved å tilsette metanol. I dette tilfellet var det ikkje nødvendig, og TLC-platene viste at alt produkt var kome ut. Det blei utført både  $^1\text{H}$ -NMR og  $^{13}\text{C}$ -NMR av PZQ (1), men desse metodane viste ein del ureinheiter, inkludert etylacetat. Det blei difor nytta ulike metodar for å forsøke å fjerne løysemiddelet.

Utbytte av PZQ (1) før rekrystallisering blei berekna til å vere 106 %. Dette viser at det blei oppnådd eit høgare faktisk utbytte enn det som var forventa teoretisk. Årsaka til denne avvikelsen er ukjent, men det kan skuldast feil vekt av rundkolben eller nærværet av mykje løysemiddel. Det vil derfor vere vanskeleg

Produktet blei deretter rekrystallisert med ei blanding av 40 % etylacetat og 60 % heksan. I rapporten av Dömling *et al.* brukte dei eit forhold på 1:1 (etylacetat/hexsan). Årsaka til at mengda av etylacetat blei redusert var på grunn av risikoen for å miste produktet viss det blei tilsett for mykje. Men viss dette skulle blitt gjort igjen, ville det kanskje vore mogleg å bruke same forhold som Dömling *et al.*, fordi det måtte tilsetjast så mykje av blandinga på 40:60 for å løyse opp krystallane. Berre den første batchen av PZQ (1) blei rekrystallisert. Det blei bestemt at ein skulle bruke HPLC vidare for å berekne utbytte, både for å spare tid ved å unngå opparbeiding, samt forhindre større tap av produkt, som både kunne skje under kolonnekromatografi og rekrystallisering. Tabell 8 gir ei oppsummering av oppmålte verdiar for syntesen av PZQ (1).

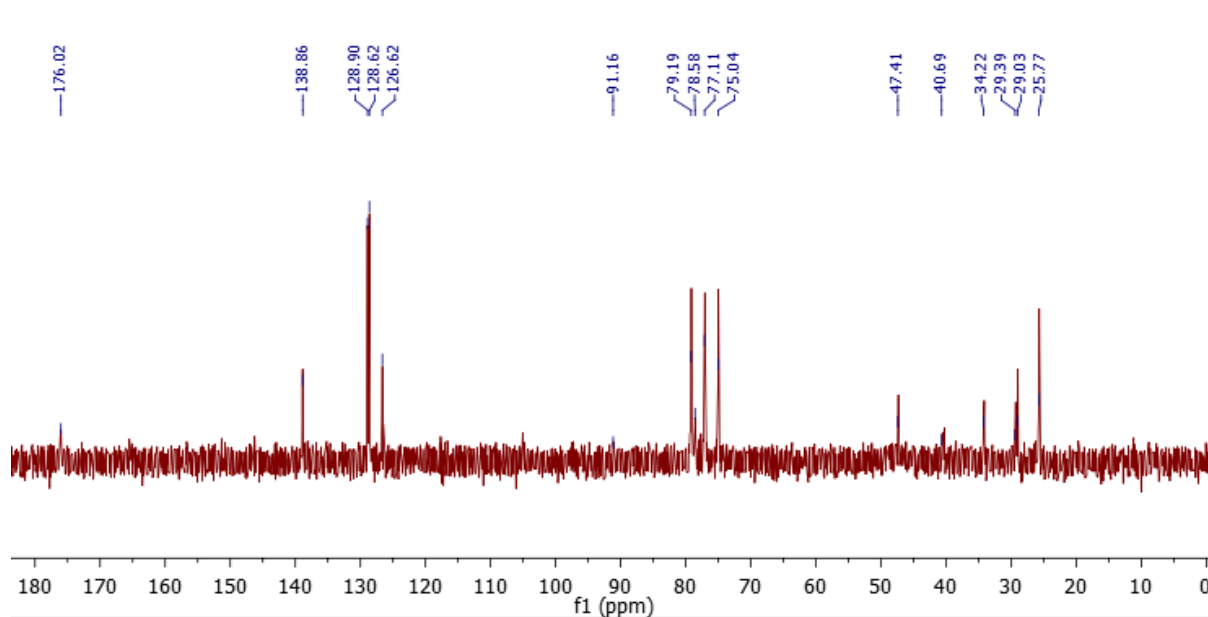
**Tabell 8.** Oppmålte verdier for Pictet-Spengler reaksjonen (R3), med utbytte før rekrystallisering.

Namn på reaksjon	Diamid (6) (g)	MSA (g)	Utbytte (%)
B1-R3	11,57	59,36	106

### Batch 1-Reaksjon 3 (B1-R3)

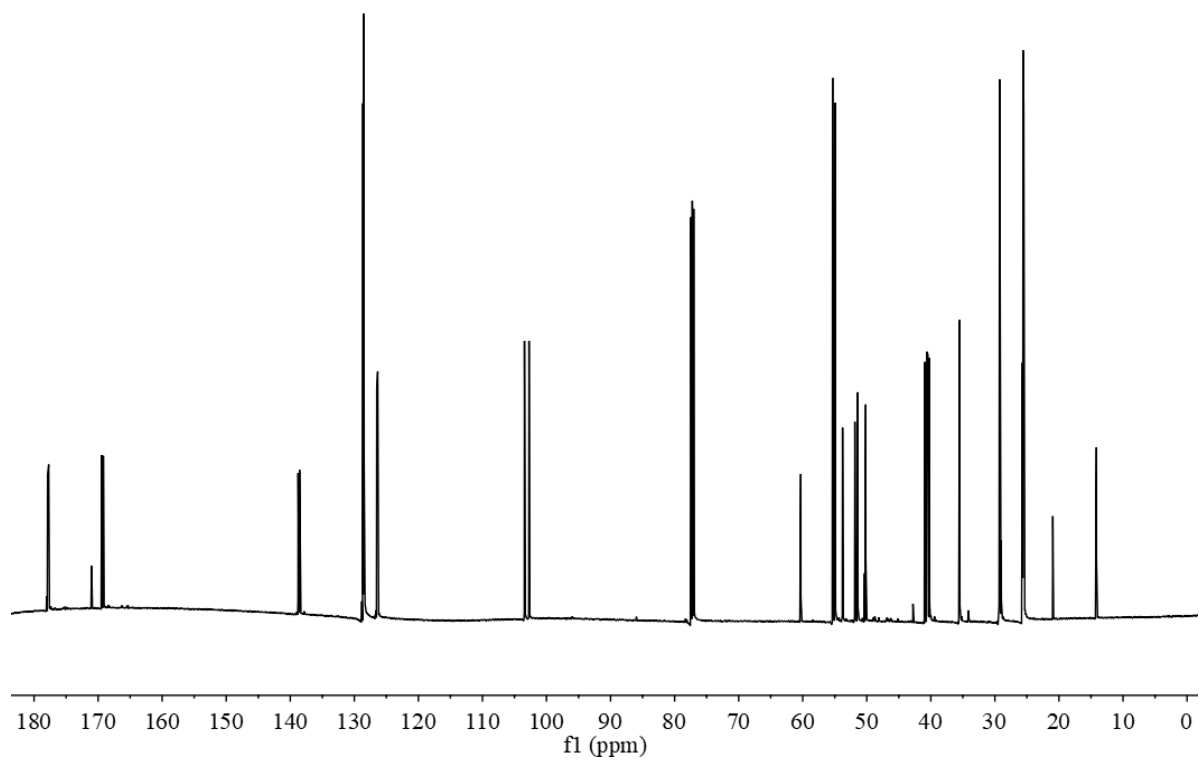
I batch 1 av PZQ (1) vart det køyrt kolonnekromatografi som gav faksjon 0-22. Det vart funne produkt i fraksjon 12-19, som kunne detekterast ved bruk av TLC med  $R_f = 0,23$

(heksan:etylacetat, 40:60).  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) av fraksjon 12-19, vist i figur 33, tydde på at PZQ (1) var til stades etter samanlikning med artikkelen til Dömling *et al.*, men NMR-instrumentet sleit med å ta opp alle toppane, og det blei difor også køyrt ein  $^{13}\text{C}$ -NMR og  $^1\text{H}$ -NMR (151 og 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ved Universitetet i Bergen for å få eit betre oppløyst spekter. Desse spektera er vist i figur 34 og figur 35.

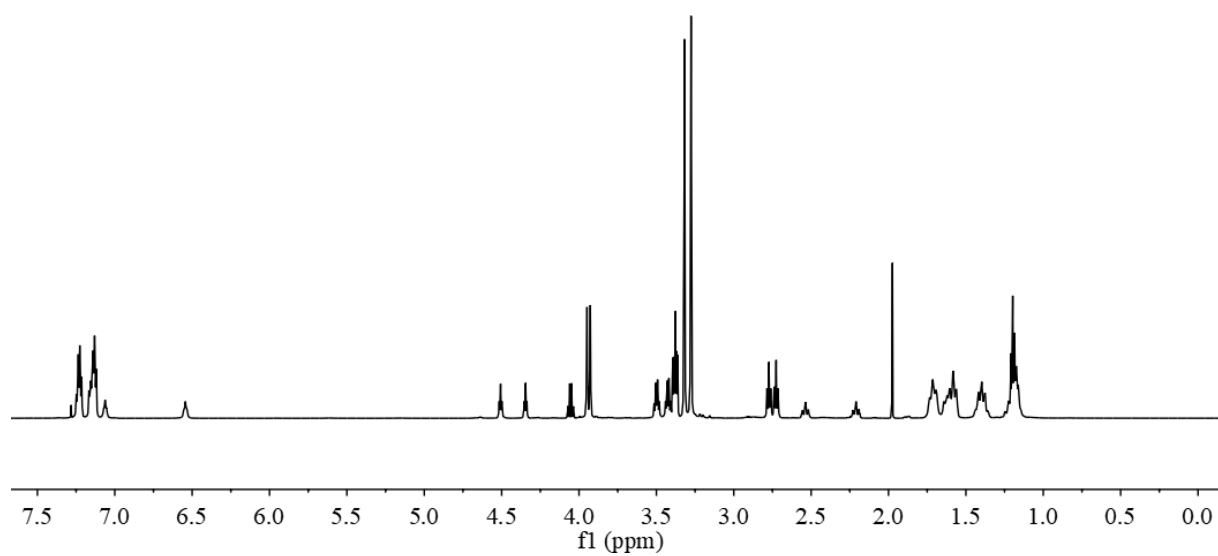


**Figur 33.**  $^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) spekter av PZQ (1), B1-R3

$^{13}\text{C}$ -NMR (15 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) av B1-R3  $\delta = 176,02, 138,86, 128,90, 128,62, 126,62, 91,16, 47,41, 40,69, 34,22, 29,39, 29,03, 25,77$  ppm



**Figur 34.**  $^{13}\text{C}$ -NMR (151 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) spekter av PZQ (1), B1-R3.



**Figur 35.**  $^1\text{H}$ -NMR (600 MHz, 298 K,  $\text{CDCl}_3$ ) spekter av PZQ (1), B1-R3.

### 4.3.1 FT-IR og smeltepunktbestemming av prazikvantel (PZQ)

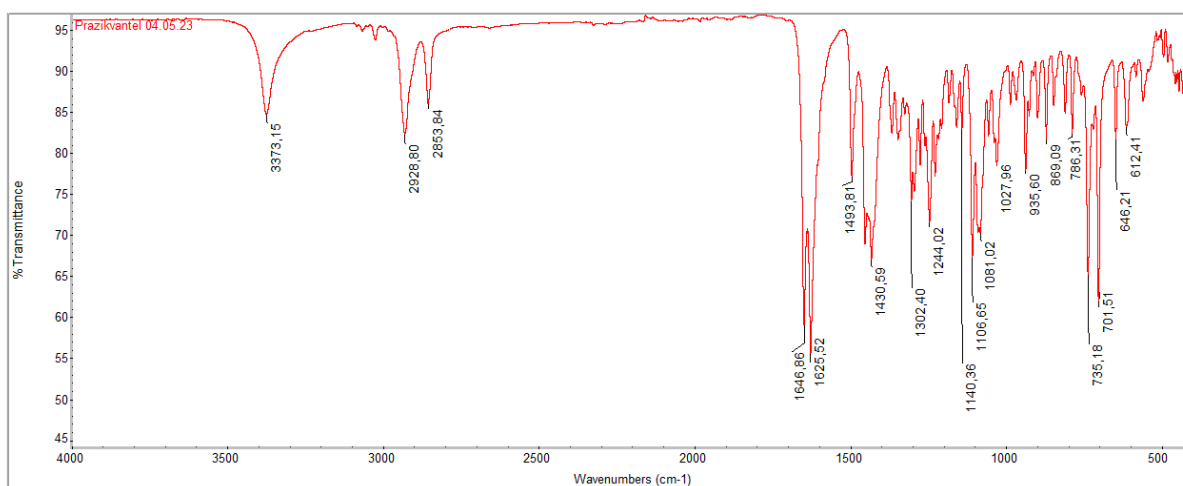
Til tross for at både  $^1\text{H-NMR}$ - og  $^{13}\text{C-NMR}$  spektra er bredt rapportert frå før, og det er tydeleg identifisert at sluttproduktet er PZQ (**1**), blei det utført ytterlegare analysemetodar. Smeltepunktbestemming blei først utført for å vurdere reinheita til produktet. Tabell 9 viser temperaturen notert for start- og slutt punkt ved 3 parallelle forsøk samt berekna gjennomsnitt.

**Tabell 9.** Smeltepunktbestemming av PZQ (**1**).

Parallell	T1 (°C)	T2 (°C)
1	132,5	134,2
2	132,4	134,0
3	132,4	134,3
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>132,4</b>	<b>134,2</b>

Smeltepunktintervallet for PZQ (**1**) blei målt til å vere 132-134°C. Dette området stemmer overeins med det smeltepunktet som tidlegare har blitt rapportert av Dömling *et al.* på 132-134 °C. Denne likeheita indikera at produktet har ei tilsvarende høg grad av reinheit, og at det ynskja produktet er oppnådd.

Det blei deretter tatt opp eit FT-IR spekter av PZQ (**1**), etter rekrystallisering, som vidare har blitt samanlikna med referansespekter for å støtte identifiseringa av produktet. Figur 36 viser FT-IR spekter av PZQ (**1**).



**Figur 36.** FT-IR spekter av PZQ (**1**).

Ved å samanlikne FT-IR spekteret av PZQ (**1**), med spekter frå ein spekter-database (spectrabase.com), vist i vedlegg 4, kan ein sjå at ein har oppnådd ynskja produkt. Toppen ved 3373  $\text{cm}^{-1}$  er ein O-H-strekk frå amidgruppene og kan ofte bli meir uttalt ved nærværet av



fuktighet. Bidragsformelen til amidet kan ha ein enolform i nærværet av vatn. Ein kan sjå ei antyding til ein topp ved denne absorpsjonen i spekteret frå databasen, men størrelsen på toppen er ikkje like stor som den som er observert her.

Både smeltepunktbestemminga og FT-IR spekteret bekreftar produktet si reinheit, og eit utbytte av PZQ (**1**) på 106 % er derfor uvanleg. Likevel, på grunn av produktets høge reinheit, kan det tyde på at det betydeleg mengde med produkt til stades. Det var også tydeleg visuelt at det danna seg ei vesentleg mengde med krystallisert produkt.

#### 4.4 HPLC gradient førehandsundersøking

Etter den første batchen av PZQ (**1**) blei det gjort ei vurdering om ein skulle fortsette opparbeidinga på same måte, inkludert kolonnekromatografi og rekrystallisering. Men ettersom det skulle nyttast eksperimentelt design der skalaen av utgangsstoff vil vere mindre, ville dette vore både vanskeleg å jobbe med, og kunne ført til større produkttap. Det blei difor bestemt at HPLC skulle brukast for å berekne eit utbytte både for å spare tid ved å unngå opparbeiding og forhindre tap av produkt. Sidan det blir brukt HPLC, vil ein ikkje kunne finne eit isolert utbytte på same måte som Dömling *et al.*, men heller finne ut kor mykje av forbindelse (**6**) som blir omdanna til PQZ (**1**), også kalla for conversion. Det blei utvikla eit gradientprogram inspirert for HPLC-analysen.

Det blei laga fortynna løysingar av analyttane i MeOH. Det blei også laga ei løysning med MSA fortynna med MeOH og ei rein MeOH løysning. Alle prøvene blei laga med ein konsentrasjon på 1 mg/ml. Tabell 10 gir informasjon om kva kolonnetype som blei brukt, samt injeksjonsvolum, temperatur og bølgjelengd. Flowen vart endra til 1000 µl/min som passa betre for ei C18 kolonne.

**Tabell 10.** Informasjon om kolonnetype, injeksjonsvolum, temperatur og bølgjelengd nytta i dette arbeidet.

Kolonnetype	C18 kolonne (Dionex Acclaim 120 Å, 2,1 x 50 mm, 3,0 µm, 0,2 ml/min, partikkel-størrelse 0,040-0,055 mm, 230-400 mesh)
Kolonnetemperatur (°C)	26
Injeksjonsvolum (µl)	10

Versjon 1 av gradientprogrammet er vist i tabell 11 (verdiane er henta frå vedlegg 2), der mobil fase var:

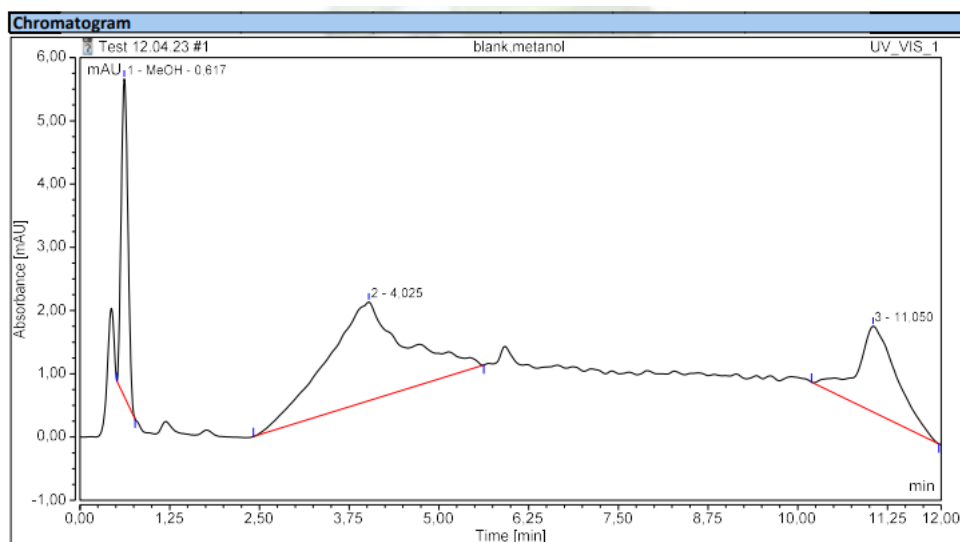
- A: vatn
- B: metanol

I staden for å bruke metanol, kunne ein ha valt å bruke acetonitril. Men på grunn av at metanol er meir polar og reknast som eit meir miljøvennleg val enn acetonitril, blei dette valt i staden for.

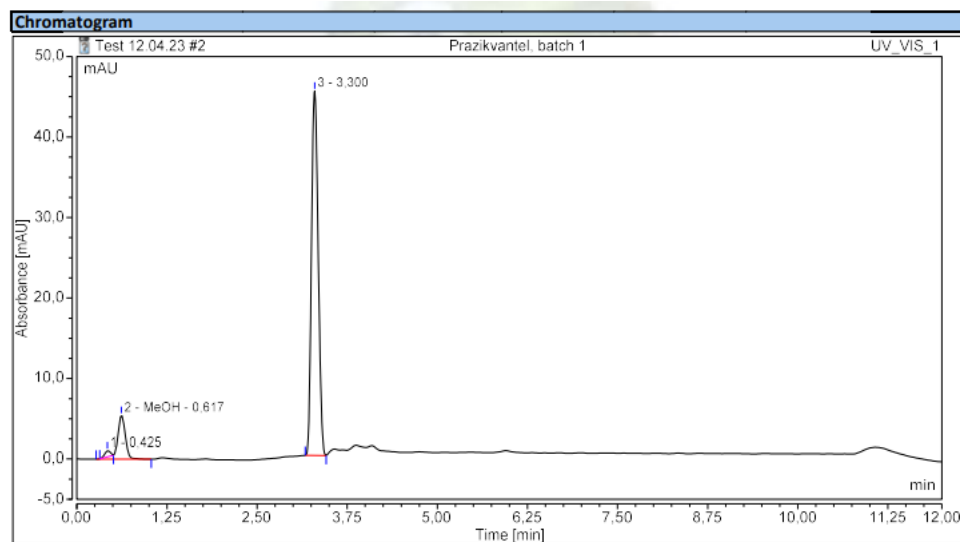
*Tabell 11. HPLC gradientprogram versjon 1 (12 minutts program).*

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0	50	50	1000
1,5	50	50	1000
3	20	80	1000
10	20	80	1000
11	50	50	1000

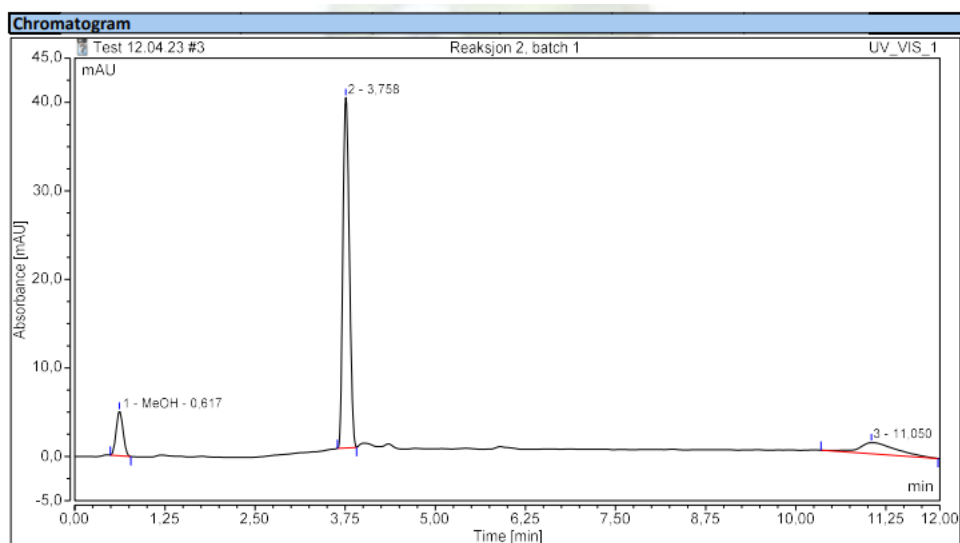
Det blei nytta reversfase kromatografi, der den stasjonære fasen er upolar/svakt polar, medan den mobile fasen er meir polar enn den stasjonære fasen. Dette er altså ein av grunnane til at forbindelse (6) hadde kortare retensjonstid enn PTZ (1). Det kan også kome av at PZQ (1), med den høgaste toppen, adsorbera betre ved bølgjelengda på 254 nm. Figur 37, 38 og 39 viser HPLC kromatogramma av PZQ (1) og forbindelse (6) køyrt med gradientprogram versjon 1, også vist i vedlegg 2, med MeOH som eluent (mobil fase).



Figur 37. HPLC kromatogram av MeOH, gradientprogram versjon 1.



Figur 38. HPLC kromatogram av PZQ (I), batch 1, gradientprogram versjon 1.



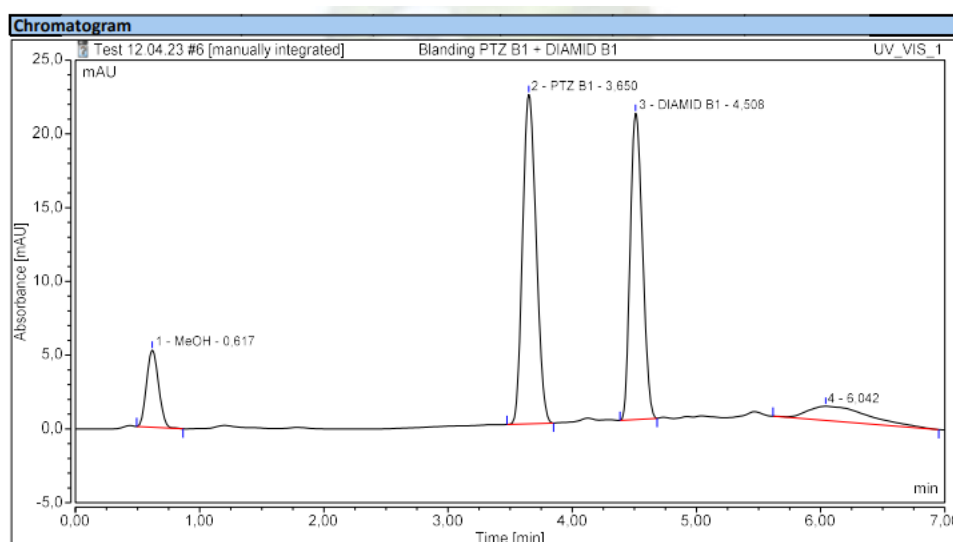
Figur 39. HPLC kromatografi av diamidet (6), batch 1, gradientprogram versjon 1.

Ved bruk av gradientprogram versjon 1 låg retensjonstida for PZQ (**1**) på 3,300 min og forbindelse (**6**) på 3,375 min. Det blei ikkje observert nokon relevante stoff etter desse tre minutta, som gjorde at gradientprogrammet kunne kortast ned til 7 minutt. Ved å korte ned på tida, blir det også nytta mindre løysemiddel som vil vere bra i eit grønt perspektiv. Dette blei då gradientprogram versjon 2. Ein kunna til fordel ha hatt ein høgare konsentrasjon av analyttane, og auka injeksjonsvolumet til 15 µl for å få ei enda finare baselinje. Tabell 12 viser HPLC gradientprogrammet for versjon 2, der verdiane er henta frå vedlegg 3.

**Tabell 12.** HPLC gradientprogram versjon 2 (7 minutt program).

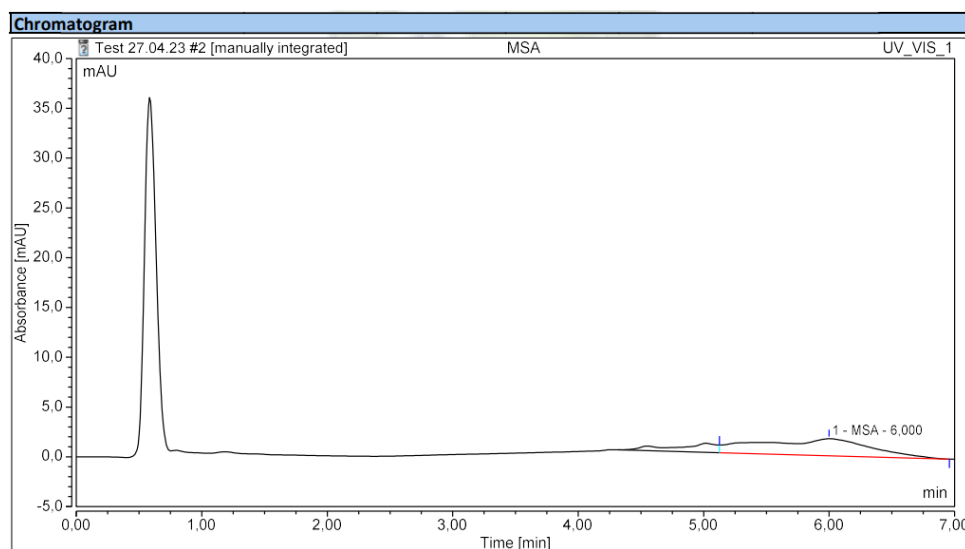
Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0	50	50	1000
1,5	50	50	1000
4,5	20	80	1000
5	20	80	1000
6	50	50	1000

Figur 40 viser HPLC kromatogrammet av ei blanding av PZQ (**1**) og forbindelse (**6**) køyrt med gradientprogram versjon 2, med MeOH som eluent (mobil fase). Her blei det testa ut å auke injeksjonsvolumet frå 10 til 15 µl. Her kom toppane ut med god separasjon, som tyder på at elueringsstyrken var god. Dersom ein hadde opplevd at toppane hadde kome for raskt ut, villa ein lågare elueringsstyrke vanlegvis auka differansen i retensjonstidene for stoffa.



**Figur 40.** HPLC kromatogram av prøve bestående av PZQ (**1**) og diamidet (**6**), gradientprogram versjon 2.

Det vart også køyrt HPLC av MSA aleine for å finne retensjonstida til dei eventuelle restane i dei eksperimentelle prøvene. Retensjonstida til MSA låg på rundt 6,000 min. Figur 41 viser HPLC kromatogrammet av MSA køyrt med gradientprogram versjon 2, med MeOH som eluent (mobil fase).



**Figur 41.** HPLC kromatogram av MSA, gradientprogram versjon 2.

Tabell 13 viser retensjonstidene for dei ulike stoffa som var av interesse å identifisere i dei eksperimentelle prøvene. Retensjonstidene er henta frå figur 40, og vil varierte med nokon sekund mellom kvar prøve. Dette skyldast små ulikeheitar i førebuing av prøvar, som gir små ulikheiter i konsentrasjon og reinheit. Små variasjon i instrumentet, døme trykk, temperatur og injeksjonsvolum kan også påverke retensjonstida, men det er mindre sannsynleg.

Variasjonar i retensjonstida er heilt vanleg og var forventa.

**Tabell 13.** HPLC retensjonstid for MeOH, diamid (6), PZQ (1) og MSA, ved bruk av gradientprogram versjon 2.

Stoff	Retensjonstid (min)
MeOH	0,617
Diamid (6)	4,508
PTZ (1)	3,650
MSA	6,042

Ved å køyre dei isolerte stoffa aleine på HPLC kunne ein optimalisere gradientprogrammet, samt sikre god separasjon på ynskja produkt i ukjent blanding. Dette gav sikre resultat og god nøyaktigheit til vidare utrekning og bruk. Det vil også gi ein indikasjon på kva retensjonstid stoffa har som vil gjere det enklare å identifisere stoffa i kromatogramma. For å sikre betre og meir påliteleg resultat vart det bestemt å auke konsentrasjonen på HPLC prøvene i det eksperimentelle designet til 5 mg/ml.

## 4.5 Eksperimentelt design

### 4.5.1 Syntese av 2-(sykloheksankarbonyl)-2,3,6,7,11b-heksahydro-pyrazino[2,1-a]isoquinolin-4-on (prazikvantel, **1**) (Pictet-Spengler reaksjon)

Det eksperimentelle designet gjekk ut på å optimalisere det siste trinnet i syntesen av PZQ (**1**). Det eksperimentelle designet blei tentativt bestemt til å bestå av to faktorar:  $X_1$  (temperatur) og  $X_2$  (konsentrasjon av forbindelse (**6**)). Reaksjonstida blei eliminert som ein faktor for å forenkle det eksperimentell designet, sidan endringa av temperatur allereie påverkar reaksjonstida. Det blei difor foreslått å ha volum/fortynning som ein eigen faktor, men dette ville ikkje hatt mykje effekt på grunn av intramolekylære reaksjonar. Temperaturane blei sett til å vere 60-80°C, som er under 100°C grensa. Det blei også diskutert om den sterke organiske syra MSA skulle erstattast med isopropanol og etylmetylketon kombinert med ei lita mengd syre. Dette blei seinare gjennomført som to separate eksperiment på sida av det eksperimentelle designet (Q1 og Q2). Alle eksperimenta gjekk i 6 timar, der det undervegs blei tatt ut 0,2 ml prøve ved 3, 4,5 og 6 timar. Det var snakk om å tilsette nokre dropar med NaOH for å oppretthalde ein pH-verdi som er nødvendig for å bevare integriteten til prøvene under oppbevaring i frysen, men sidan prøvene skulle brukast relativt raskt, var dette ikkje nødvendig likevel. Prøvene vart så køyrt på HPLC, for å finne kor mykje produkt som blei omdanna ved dei ulike tidene. Ved å gjere dette kunne ein finne ut når dei ulike eksperimenta nådde sitt maksimale utbytte.

**Tabell 14** Tabell 14 viser arealet i mAU\*min til toppane for PZQ (**1**) og forbindelse (**6**) for eksperiment 1-5, etter 3, 4,5 og 6 timar. Toppane vart funne ved å køyre HPLC gradientprogram versjon 2 (vedlegg 3), med MeOH som eluent (mobil fase). Verdiane er henta frå vedlegg 5-9.

**Tabell 14.** Areal (mAU\*min) henta frå HPLC for eksperiment 1-5 ved reaksjonstid 3, 4,5 og 6t.

Areal (mAU*min)	3t		4,5t		6t	
	PZQ	(6)	PZQ	(6)	PZQ	(6)
1	0,092	1,024	0,109	0,986	0,132	0,990
2	0,442	0,599	0,438	0,356	0,387	0,198
3	0,304	4,909	0,431	4,803	0,540	4,465
4	1,460	2,601	2,337	1,996	2,701	1,370
5	0,483	2,858	0,701	2,591	0,952	3,175

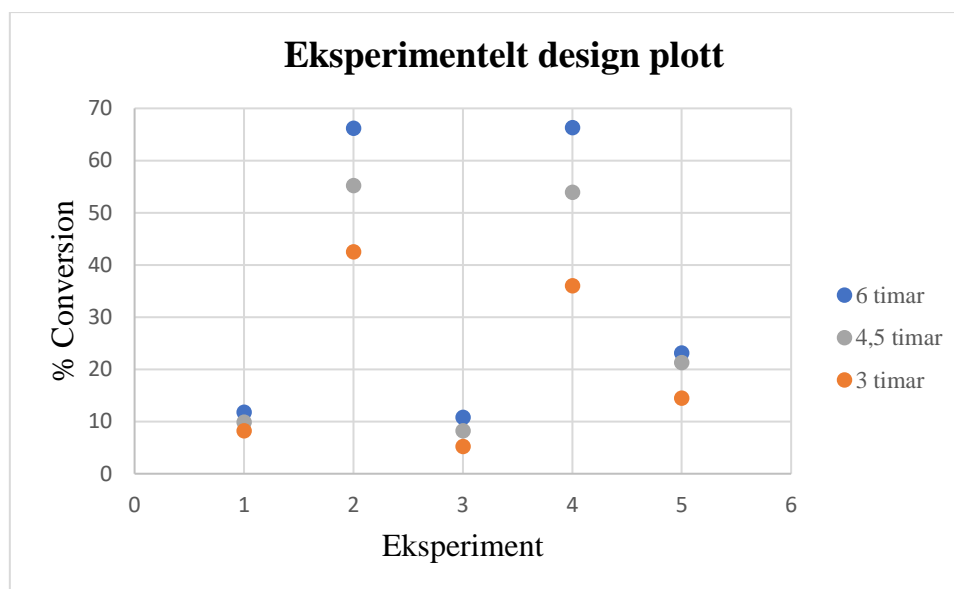
Tabell 15 iser det eksperimentelle designet som blei sett opp.  $X_1$  høg verdi (+1) vart sett til 80°C, null verdi (0) til 70°C og låg verdi (-1) til 60°C. For konsentrasjon av (6) blei høg verdi (+1) 0,08 g/ml, null verdi (0) 0,29 g/ml og låg verdi (-1) 0,50 g/ml. Volumet av MSA var 7,0 ml for alle eksperimenta. Respons i form av conversion blei notert etter tida prøvene vart tatt. Conversion blei berekna frå areala av toppane til PZQ (1) og diamidet (6) ved bruk av formel 4. Berekinga er vist i vedlegg 1. Alle eksperimenta blei utført med same type glasutstyr, i tilfeldig rekkefølge og med omrøring på 690 RPM. Ved å utføre det eksperimentelle arbeidet i tilfeldig rekkefølge vil ein redusere risikoen for at utbytte forbetrast ved forbetring av utførsle, instrument eller andre faktorar som påverkar resultata på ein systematisk måte (bias). Nøyaktigheita vart også forsterka ved bruk av likt type utstyr og omrøringshastigheit.

**Tabell 15.** Eksperimentelt design for reaksjon 3 med faktorane  $X_1$  (°C) og  $X_2$  (g/ml), og berekna respons etter 3, 4,5 og 6t.

Eksperiment	T (°C)	C (6) (g/ml)	Tilfeldig rekkefølge	Respons/Conversion ( $Y_{timar}$ ) (%)		
	$X_1$	$X_2$		$Y_3$	$Y_{4,5}$	$Y_6$
1	60	0,08	1	8,2	9,9	11,8
2	80	0,08	2	42,5	55,2	66,2
3	60	0,5	5	5,2	8,2	10,8
4	80	0,5	3	36,0	53,9	66,3
5	70	0,29	4	14,5	21,3	23,1



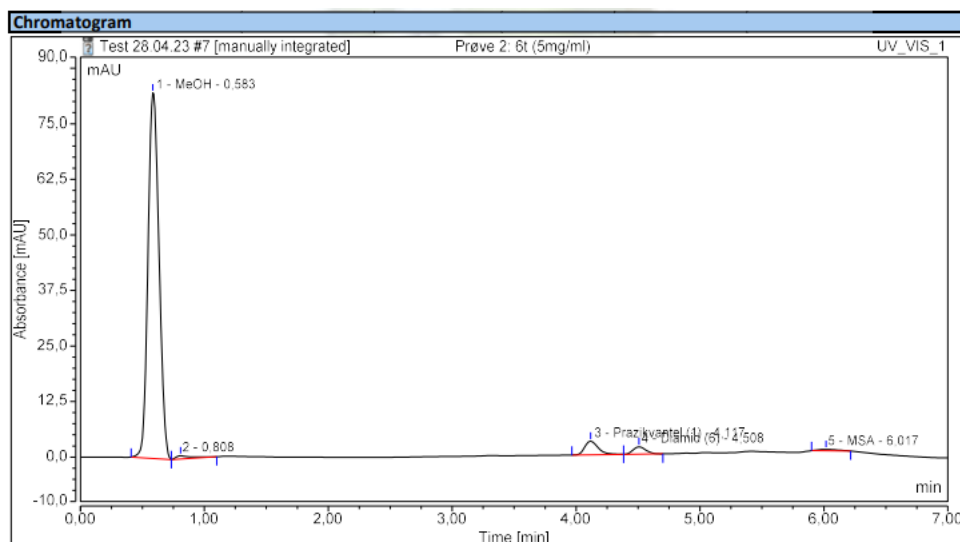
Responser fra eksperimentene i det eksperimentelle designet ble brukt til å lage et plott som viser oppførsel til den uavhengige variabelen (x-aksen) i forhold til de ulike verdiene av de uavhengige variablene (y-aksen), vist i figur 42. Dette plottet kan være nyttig for å identifisere eventuelle trender eller mønstre i dataene.



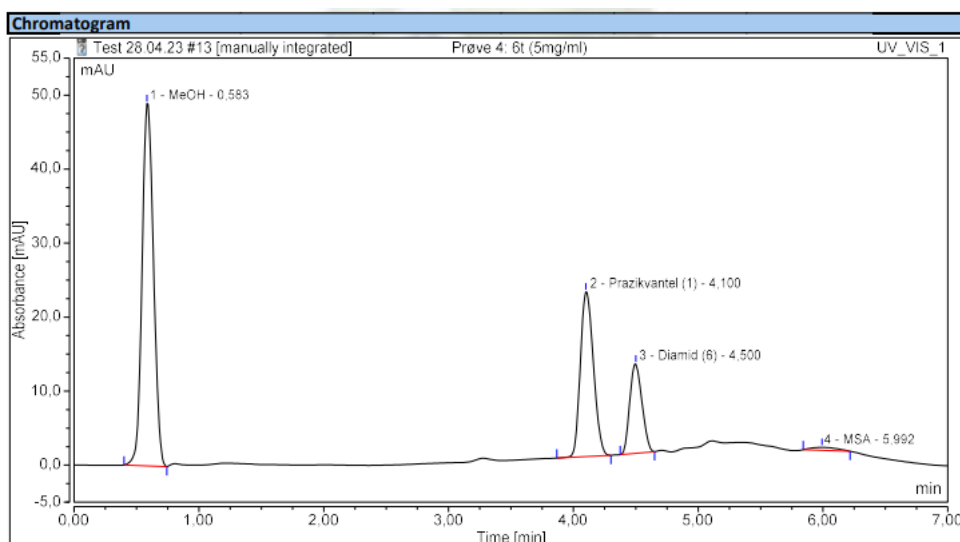
**Figur 42.** Plottet viser prosentconversion for eksperiment 1-5 etter 3, 4,5 og 6 timer.

### Eksperiment 2 og 4

Frå HPLC responser vist i tabell 15 kan ein sjå at eksperiment 2 og 4, for 6 timer oppnådde den høgaste conversion samanlikna med dei andre prøvene. Fellesfaktoren for desse to eksperimenta er at reaksjonen vart utført ved den høgaste temperaturen på 80°C. Det som skil dei frå kvarandre er konsentrasjonen av (6). Eksperiment 2 hadde ein låg konsentrasjon av (6) på 0,08 g/ml, medan eksperiment 4 hadde ein høg konsentrasjon på 0,5 g/ml. Alle eksperimenta vart utført med lik mengde MSA på 7,0 ml. Dette betyr at eksperiment 2 inneheldt høgast konsentrasjon løysemiddel per konsentrasjon utgangstoff (6). Figur 43 viser HPLC kromatogram av eksperiment 2 (prøve 2, 6t), og figur 44 viser HPLC kromatogram av eksperiment 4 (prøve 4, 6t).



**Figur 43.** HPLC kromatogram av prøve 2, 6t.



**Figur 44.** HPLC kromatogram av prøve 4, 6t.

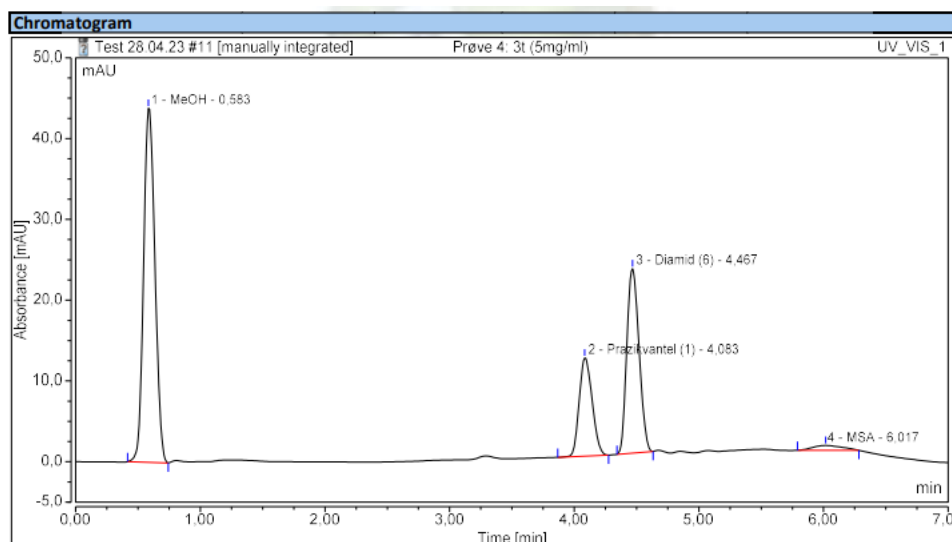
Figur 44, HPLC kromatogram for prøve 4, 6 timar, viser betydeleg høgare og meir definerte toppar, samt betre separasjon enn for eksperiment 2. Den dårlege separasjonen i eksperiment 2 kan skyldast mangel på reaktant til stades, som fører til mindre produkt danning. Sidan eksperiment 4 inneheldt høgare konsentrasjon av (6) vil desse kromatogramma vere meir nøyaktige.

Ved å vidare samanlikne eksperiment 2 og 4, vil ein sjå at eksperiment 2 får høgare conversion etter kortast tid. Eksperiment 2 fekk conversion på 42,2 % etter 3 t og 55,2 % etter 4,5 t (tabell 15), og eksperiment 4 fekk conversion på 36,0 % etter 3 t og 53,9 % etter 4,5 t (tabell 15). Ein kan difor konkludere med at løysemiddelet (MSA) har ein påverknad på

reaksjonshastigheita, men sidan forskjellen i prosent ikkje er betydeleg vil det vere meir lønsamt både økonomisk og i eit grønt perspektiv å utføre eksperiment 4. Det er viktig å merke seg at både produksjonsanlegget og operatørane står ovanfor farar knytt til lagring, handtering og avfallsbehandling av store mengder MSA. Ved reduksjon av løsemiddel vil derfor kostnadane bli lågare, og ein vil redusere utslepp av kjemikalie, som vidare redusera miljø og helse-risiko.

Kromatogrammet for eksperiment 1 og 2 (vedlegg 5 og 6) hadde små toppar og litt dårlegare separasjon grunna låg startkonsentrasjon av diamidet (**6**) på 0,08 g/ml. Dette betyr at prosentconversion for eksperiment 3 og 4 (vedlegg 7 og 8) vil gi meir nøyaktig respons ved temperatur 60°C og 80°C.

Under prøveopparbeidinga av eksperiment 4 vart det observert ein mykje sterkare gul-oransje farge på prøva samanlikna med dei andre prøvene, og spesielt for prøva tatt etter 3 timar. Denne sterke fargen kan indikere at produktet blei danna tidleg i reaksjonen eller at det er forureiningar til stades. Forureiningar kan gi sterk farge ved låge konsentrasjonar. Likevel ser det ikkje ut til å vere noko forureiningar eller ukjente stoff i HPLC kromatogrammet til prøve 4 (3 timar). Figur 45 viser HPLC kromatogram for eksperiment 4 (prøve 4, 3 timar).

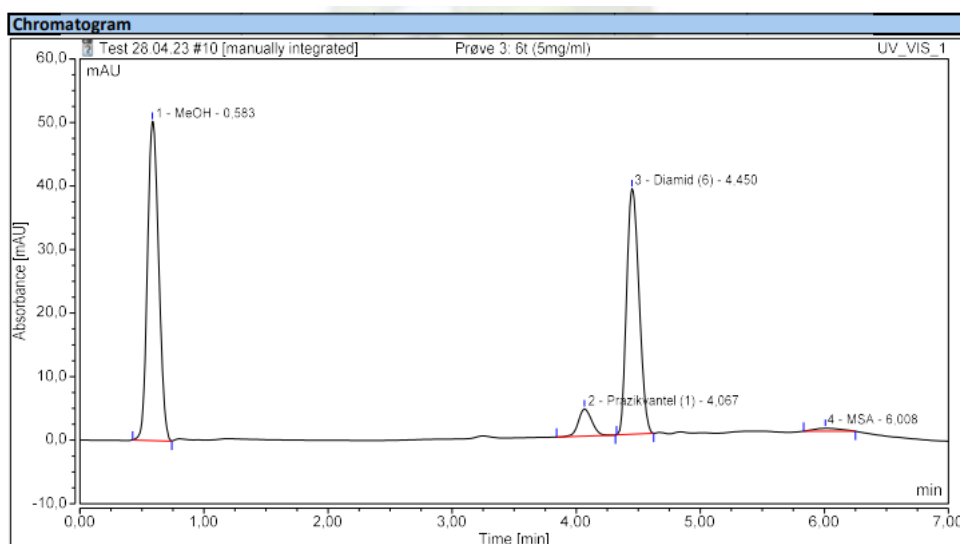


Figur 45. HPLC kromatogram av prøve 4, 3t.

### Eksperiment 1 og 3

I eksperiment 3 blei den lågaste conversion detektert. Eksperimentet hadde låg temperatur, høg konsentrasjon (6) og lågt konsentrasjon av MSA per konsentrasjon utgangstoff.

Conversion aukar frå 5,2 % ved 3 t til 10,8 % ved 6 t (tabell 15). Årsaka til den dårlege konverteringa skyldast den låge temperaturen. Dette kan ein også sjå i eksperiment 1 (vedlegg 5) med conversion på 11,8 % (tabell 15). Temperaturen for eksperiment 3 hadde ein negativ innverknad på reaksjonshastigheita, til tross for at ein her har høgare mengde med reaktant (6). Ein anna mogleg årsak til den låge konverteringa, er det låge volumet av løysemiddel. Dette vil også påverke reaksjonshastigheita negativt. Figur 46 iser HPLC kromatogram for eksperiment 3 (prøve 3, 6 timar). Kromatogrammet har god grunnlinjeseparasjon og store toppar som visar til god separasjon. Dette skyldast den høge konsentrasjonen av reaktanten (6).



Figur 46. HPLC kromatogram av prøve 3, 6t.

### Eksperiment 5

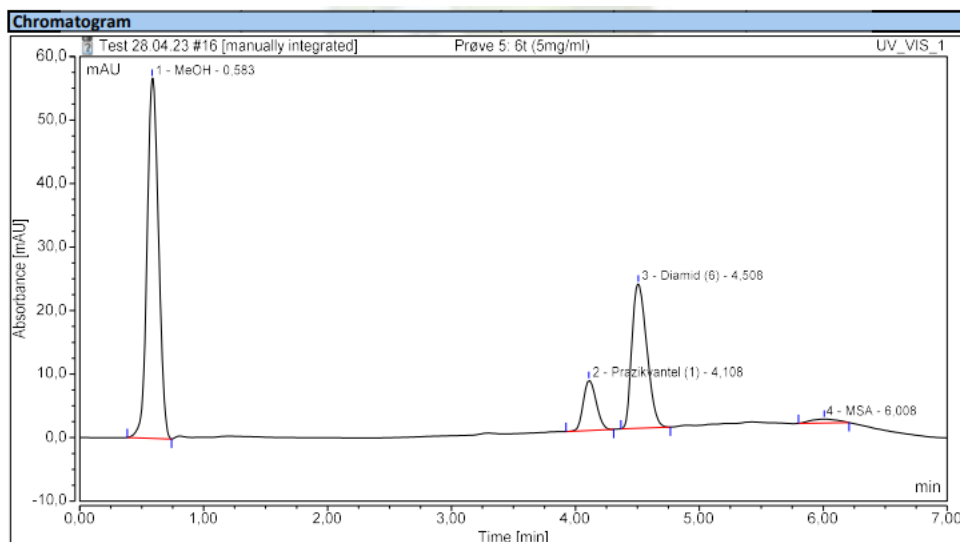
Eksperiment 5 er nullpunktforsøket (70°C, 0,29 g/ml) i dette eksperimentelle designet, som vil sei at eksperimentet er køyrt under dei same vilkåra som Dömling *et al.* Overraskande nok viser dette forsøket ein låg conversion på 23,1 % (tabell 15). Dette var ein mykje dårlegare conversion enn forventa, samanlikna med eksperiment 1-4. Det blei også observert ei svært lita endring mellom time 4,5 og 6. Det vart observert at ingen andre av reaksjonane stoppa etter 4,5t.

Etter at den observerte konversjonen i nullpunktsforsøket såg lågare ut enn forventa, blei det bestemt å berekne ny conversion basert på HPLC kromatogrammet frå same prøver (eksperiment 1-5, 6t) som blei tatt dagen før. Prøvene som vart tatt dagen etterpå hadde konsentrasjonar på 2 mg/ml og vart utført ved bruk av gradientprogram versjon 2. Conversion var lik for eksperimenta 1-4, med ein feilmargen på  $\pm 1$  %, medan nullpunktsforsøket hadde ein forskjell på 10 %. For dette HPLC kromatogrammet (figur 46) vart conversion berekna til å vere 30,0 %. Dette kan indikere ein feil i ei av prøvene.

Kromatogrammet for prøve 5 (6t) var det siste av de 15 eksperimentelle prøvene som blei analysert på HPLC-instrumentet. Eventuelle feil i instrumentet kunne difor ikkje observerast på seinare kromatogram. Feil i kromatogram kan vise til forureining, overbelastning av kolonna eller feil i programmet. Det er vanskeleg å kommentere på kva av kromatogram (figur 47 og figur 48) som er feil utan å undersøke dette vidare, men sidan prøva med høgast konsentrasjon (5 mg/ml) gav dårlegast utbytte vil dette tyde på at dette kromatogrammet er feil. Høg konsentrasjon på prøver i HPLC analyser vil ikkje alltid gi meir nøyaktig resultat, da dette kan påverke belastninga på kolonna. Basert på resultata som er presentert, kan det konkluderast med at HPLC-instrumentet ga ei meir nøyaktig måling her grunna prøvene sin låge konsentrasjon på 2 mg/ml. Analyse av ein mindre mengd med prøver resulterte også i mindre belastning på kolonna, noko som bidrog til ei auka nøyaktigheit i målingane. Vidare blir det derfor brukt conversion på 30,0 % for prøve 5 (6t).

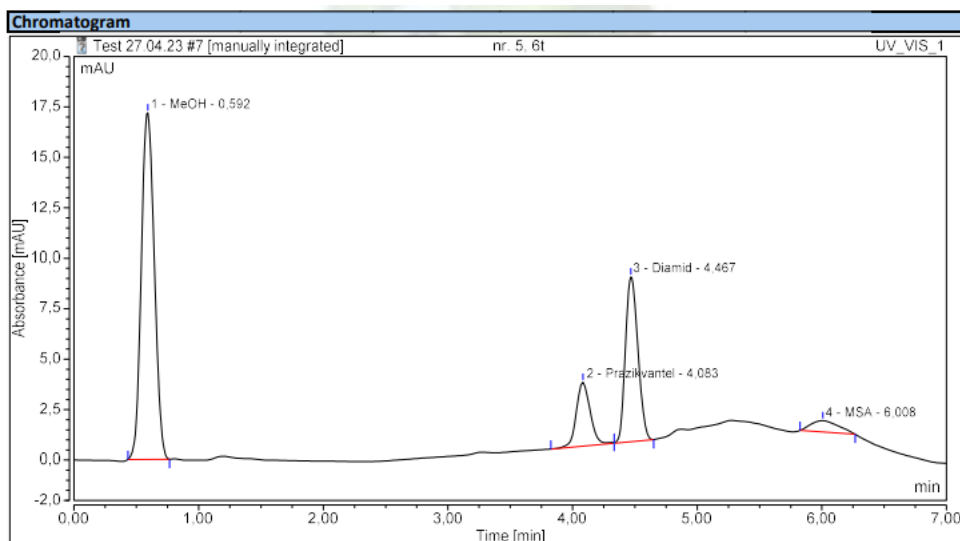
I eksperiment 4 vart det observert ein conversion på 36,0 % etter 3 timar (tabell 15), medan nullpunktsreaksjonen (figur 48) hadde ein conversion på 30,0 % etter 6 timar, som stemmer med teorien om at auking i reaksjonstemperatur med 10°C vil doble reaksjonshastigheta.

Figur 47 viser HPLC kromatogram for eksperiment 5 (prøve 5, 6 timar) med conversion på 23,1 % og konsentrasjon på 5 mg/ml.



**Figur 47.** HPLC kromatogram av prøve 5, 6t, den 28.04.2023

Figur 48 viser HPLC kromatogram for eksperiment 5 (prøve 5, 6 timar) med conversion på 30,0 % og konsentrasjon på 2 mg/ml. Integrasjonsresultata er vedlagt i vedlegg 9.



**Figur 48.** HPLC kromatogram av prøve 5, 6t, den 27.04.2023.

### Samanlikning av prosentutbytte og conversion

Som nemnt tidlegare fekk Dömling *et al.* eit utbytte på 65 % etter rekrystallisering (76 % før rekrystallisering). Ved å gjennomføre det eksperimentelle designet og køyre prøvene i HPLC, vart den høgaste verdien av conversion på 66,3 % (prøve 4, 6t). Prosentutbytte og conversion kan her samanliknast grunna reaksjonens gode selektivitet, samt ut frå HPLC og NMR kunne ein sjå at det ikkje blei danna noko biprodukt i signifikante mengder, og ein har berre eit utgangstoff (6). Utbytte og conversion er to metodar for å måle reaksjonens effektivitet på, og

høge verdiar av begge type målingane vil indikere til at ein reaksjon er effektiv. Verdiane i denne reaksjonen er direkte korrelert og kan difor samanliknast. 66,3 % conversion viser til kor mykje av (6) som blei omdanna til andre stoff, i dette tilfellet PZQ (1). Dömling *et al.* sitt utbytte på 65 % viser til mengda av PZQ (1) som blei oppnådd i reaksjonen, i forhold til kor mykje som reint teoretisk kunna blitt danna. Verdiane her er nokså like og ein har oppnådd eit likt utbytte ved ulike reaksjonsvilkår.

For å kunne gjere ein grundigare samanlikning av dei oppnådde verdiane i dette prosjektet samanlikna med Dömling *et al.* sine verdiar, blei det køyrt eit nullpunktforsøk (70°, 0,29 g/ml), som nemnt tidlegare. Resultata frå dette forsøket viste ein conversion på 30,0 % (prøve 5, 6t), som er betydeleg lågare enn den høgaste oppnådde verdien i det eksperimentelle designet. I R3-B1 vart prosentutbytte for PZQ (1) på 106 %. Dette peikar på at det ikkje er den eksperimentelle utførsla som har påverka konverteringa negativt, men truleg nedskaleringa av R3. Reaksjonar med små volum gjer at små endringar i eksperimentet har større innverknad på reaksjonen. Ein villa difor fått eit høgare isolert utbytte ved å utføre Dömling *et al.* si prosedyre køyrt ved dei nye vilkåra funne i det eksperimentelle arbeidet. Dette er noko som kan vere interessant å teste i framtidig arbeid. Samanlikninga her vil sjølvsagt ikkje vere heilt riktig, da ein må ta i betraktning at forsøket ikkje er utført av same personar, og at utbytte av (6) i dette prosjektet vart mykje lågare enn utbytte til Dömling *et al.* Likevel er grunnlaget for ei ekte optimalisering lagt for dette syntesetrinnet og vil vere eit viktig bidrag til den systematiske forbetringa av trinnet i framtida.

#### **4.5.2 Lønsemd-analyse**

Hensikta med dette prosjektet innebar å optimalisere siste reaksjonstrinn i syntesen av PZQ (1) rapportert av Dömling *et al.* med omsyn på miljø og lønsamheit for oppskalering. Det eksperimentelle designet viser til at høg temperatur vil gi det beste resultatet av prosentconversion. Det viser også til at konsentrasjon løysemiddel per konsentrasjon utgangsstoff (6) ikkje hadde stor innverknad på omdanninga og ein vil difor oppnå betre lønsemd ved bruk av lågt volum løysemiddel når ein utføre R3. Ein ser difor her at bruken av løysemiddel er den viktigaste optimaliseringa av syntesen. Konsekvensar ved bruk av store mengder løysemiddel er både negativt økonomisk og miljømessig. Høge mengder MSA gir risiko for både produksjonsanlegget og operatørar ved lagring, handtering og avfallshandtering.

Kostnaden for 500 ml MSA frå leverandøren Merck Life Science ligg på 1519,16 kr. Ein kan dermed finne kostnaden for R3 rapportert av Dömling *et al.* ved omsyn på løysemiddel (MSA). 104 ml MSA vil koste 315,99 NOK per batch. Sidan løysemiddelet ikkje hadde stor påverknad for conversion, kan ein sjå på eksperiment 4 og berekne kostnaden for løysemiddelet som blei brukt der. For eksperiment 4 oppskalert etter R3 rapportert av Dömling *et al.* vil løysemiddel MSA koste 182,30 NOK per batch. Dette gir ein forskjell på 133,69 NOK som kan utgjere store summer ved oppskalering på industrielt nivå. Differansen i kostnad mellom eksperiment 4 frå DoE og Dömling *et al.* er gitt i tabell 16.

**Tabell 16.** Differanse i kostnad mellom eksperiment 4 frå DoE og framgangsmåten til Dömling *et al.*

Løysemiddel	Volum (ml)	Kostnad per batch (NOK)
MSA (frå Merck)	500	1519,16
MSA (Dömling <i>et al.</i> )	104	315,99
MSA (eksperiment 4)	104	182,30
<b>Differanse i kostand</b>		<b>133,69</b>

Sjølv om høg temperatur gir best omdanning av diamidet (**6**) til PZQ (**1**), vil dette føre til ei auke i energiforbruk samanlikna med nullpunktsforsøket. Konsekvensane er då ei auke i straumforbruk som fører til ein mindre økonomisk lønsam reaksjon. Reaksjonar som går ved høge temperaturar er sårbare for uønska reaksjonar, nedbryting eller omdanning av reaktantar samt biprodukt. Ein kan sjå her at reaktantane som blei brukt i R3 har betydeleg høge kokepunkt, og at ei auke på 10°C dermed ikkje ha noko påverknad på omdanning eller nedbryting. Økonomisk sett er ei auke i straumforbruket negativt, og spesielt på industrielt nivå. Vidare kan det diskuteras om energiforbruk vege opp mot mengde produkt produsert, har noko betydning for sal av PZQ (**1**).

Resultata frå dette prosjekter viser alt i alt at det eksperimentelle designet var vellykka i å optimalisere reaksjonen og oppnå ein høg conversion. Med ytterlegare optimalisering og justering kan ein auke konverteringa enda meir og oppnå eit høgare utbytte av det ynskja produktet.



## Eksperiment Q1 og Q2

Det vart også bestemt å køyre to eksperiment med andre typar løysemiddel. MSA blei bytta ut med ei anna organisk sterk syre, *p*-toluensulfonsyre (*p*-TsOH). Det blei tilsett 10 % av denne som ein katalysator. Blandinga blei køyrt i to forskjellige løysemiddel: alkohol som er eit protisk løysemiddel og eit keton som er eit polart aprotisk løysemiddel. Dette er løysemiddel som er resirkulerbart, lette å fjerne og vil gjere opparbeidinga av PZQ (**1**) både enklare og billigare. I tillegg vil det ikkje ver nødvendig å bruke like mykje NaOH som tidlegare, som igjen vil gjere reaksjonen betre i eit grønt perspektiv. Det blei ikkje gjennomført opparbeiding av Q1 og Q2, men dette vil kunne vere interessant for framtidig arbeid. Reaksjonen blei køyrt under same vilkår som Dömling *et al.* på 6 timar ved 70°C. Tabell 17 viser ei oversikt over løysemiddel, katalysator og vilkår som vart brukt for eksperiment Q1 og Q2.

**Tabell 17.** Reaksjon 3 ved bruk av propan-2-ol og etylmetylketon som løysemiddel.

<b>Eksperiment</b>	<b>Løysemiddel</b>	<b>Katalysator</b> (10 %)	<b>Vilkår</b>
Q1	Propan-2-ol	<i>p</i> -TsOH	70°C, 6t
Q2	Etylmetylketon	<i>p</i> -TsOH	70°C, 6t

HPLC kromatograma for eksperiment Q1 og Q2 vist i vedlegg 10, fekk dårleg separasjon samt relativt komplisert produktblanding. Toppene for PZQ (**1**) og (**6**) var også overlappende for begge kromatograma. Dette gjorde at det ikkje var mogeleg å bestemme utbytte og conversion. Årsaka er at gradientprogrammet som vart brukt var laga for reaksjon 3 i metanol med MSA som løysemiddel, og var ikkje testa for løysemiddelet propan-2-ol eller etylmetylketon på førehand. MSA har også ein høgare polaritet på grunn av at dette er ei syre. Etylmetylketonet er det minst polare løysemiddelet og kjem difor raskast ut gjennom kolonna med ei retensjonstid på 0,850 min, vist på kromatogrammet figur 66 vedlegg 10.

På grunn av at tida på oppgåva ikkje strakk til vart dette eksperimentelle arbeidet bortprioritert, men for vidare eksperimentelt arbeid med Q1 og Q2 ville det vore interessant å identifisere dei ukjente stoffa i kromatograma (vedlegg 11), og utvikle eit nytt gradientprogram som gir betre separasjon. Det hadde også vært lurt å identifisert stoffa ved bruk av gasskromatografi-massespektrometri (GCMS), og brukt ein intern standard i HPLC prøvene for å kunne rekne ut utbytte. Godt utbytte ved bruk av løysemiddelet propan-2-ol og etylmetylketon er svært gunstig å oppnå da dette er løysemiddel som er svært billige og kan

brukast om att. Slik unngår ein store mengder kjemisk avfall som må handterast og ein vil gjer produksjon av PZQ (1) billigare og meir tilgjengeleg for folk.

## 5 Konklusjon

I dette bachelorprosjektet blei syntesen av prazikvantel (**1**) framstilt på ein miljøvennleg og effektiv måte, samt optimalisert ved bruk a eksperimentelt design. Dette er av stor betydning på grunn av prazikvantel sin antiparasittiske verknad, samt prazikvantel si effekt i kreftbehandling og til behandling av psoriasis.

Isocyanidet (**2**) blei framstilt etter ein Hofmann karbylamin-reaksjon, der det høgaste oppnådde utbytte blei 54 %. Dette avviker frå Dömling *et al.* sitt utbytte på 61 %.

Det open kjeda diamid-intermediatet (**6**) blei framstilt etter ein Ugi-multikomponent reaksjon, og det høgaste utbytte blei 77 %, som avviker frå Dömling *et al.* sitt utbytte på 98 %.

Dette gav ein dobbel ringslutning av Pictet-Spengler synklisering av danninga av prazikvantel (**1**), som fekk eit utbytte på 106 %. Dette viser til at det faktiske utbytte vart høgare enn det teoretiske utbytte. Grunnen til dette er ukjent, men det kan vere løysemiddel til stades eller feil måling av rundkolbe (Dömling *et al.*: 75 % før rekrystallisering, 65 % etter rekrystallisering). NMR-analysane av isocyanidet (**2**), diamidet (**6**) og prazikvantel (**1**) bekreftar danning av dei ynskja produkta. Smeltepunktintervallet for praziquantel (**1**) blei målt til å vere 132-134°C, som er i samsvar med dei rapporterte verdiane i litteraturen. Vidare bekreftar FT-IR spekteret at stoffet som vart identifisert er prazikvantel (**1**). Dette indikera at produktet har ein tilsvarende høg grad av reinhet og at det ynskja produktet blei oppnådd.

Det blei nytta eksperimentelt design til å optimalisere det siste trinnet i syntesen av prazikvantel (**1**), der det blei funne ut at reaksjonane ved høg temperatur (80°C) gav høgast conversion. Eksperiment 4 (prøve 4, 6 timar) gav den høgaste conversion på 66,3 % ved den høgaste temperaturen (80°C) og den høgaste konsentrasjonen av utgangsstoffet (**6**) (0,5 mg/ml). Eksperiment 2 (prøve 2, 6 timar) utført ved 80° C og den lågaste konsentrasjonen (0,08 mg/ml) fekk omtrent same conversion på 66,2 %. Eksperiment 4 er det grønstaste og mest optimale eksperimentet. Alle eksperimenta hadde høgast utbytte etter 6 timar.

Lønsamheita til syntesen av prazikvantel (**1**) blei forbetra ved å redusere bruken av løysemiddelet metansulfonsyre til 2 ml/mg av utgangsstoffet (**6**), noko som resulterte i ei innsparing på 133,69 kr samanlikna med kostanden for løysemiddelet brukt av Dömling *et al.*

Syntesen av prazikvantel (**1**) blei samanlikna med tidlegare syntesar og funne til å vere ein meir miljøvennleg syntese med omsyn på atomøkonomi og reaksjonstrinn.

## 6 Framtidig arbeid

I framtidig arbeid burde reaksjonstida på 48 timar i det første trinnet i Ugi-multikomponentreaksjonen rapportert av Dömling *et al.* reduserast. Det kan også vere interessant å undersøkje vidare bruk av metyletylketon og propan-2-ol som løysemiddel i det siste trinnet. Det har også blitt rapportert ein enantioselektiv Ugi-reaksjon i litteraturen (19). Det kan vere interessant å undersøkje moglegheitene for å syntetisere kun det legemiddelaktive enantiomeren av prazikvantel, som vil sei den (-)-dreiarande enantiomeren. Fordelen til (-)-prazikvantel er den høge effektiviteten og den låge toksisiteten samanlikna med rac-prazikvantel. Dette skyldast at prazikvantel sin terapeutiske effekt er knytta til (-)-isomeren. Det har blitt rapportert fleire syntesar for prazikvantel i seinare tid, men det har enda ikkje blitt rapportert ein optisk rein (-)-prazikvantel per no (43). Det har blitt rapportert fleire syntesar for prazikvantel i seinare tid, men det har enda ikkje blitt rapportert ein optisk rein (-)-prazikvantel per no (43).

Zang *et al.* har rapportert en enantioselektiv organokatalytisk firekomponent Ugi-reaksjon. Når eit stereogent senter oppstår i multikomponente reaksjonar (MCR) blir det danna racemiske forbindelsar som må gjennomgå kiral separasjon. Det har blitt rapportert i ei rekke studiar om enantioselektivitet for mange organiske reaksjonar, men løysninga på desse problema innan MCR er meir utfordrande. Her spelar kompleksiteten i reaksjonsmekanismen ei avgjerande rolle (19). Ugi-reaksjonen kan i prinsippet utførast med kontroll over enantioselektiviteten i nærvær av ein kiral mediator, moglegvis ein katalysator. Aktiveringa som er ansvarleg for enantioselektiviteten må skje på iminet (den første intermedietet som oppstår frå kondenseringa av aldehydet med aminet) før danninga av det nye stereogene senteret. Zang *et al.* sikra den katalytiske effekten ved å velje ein Brønsted-syre med høgare surhetsgrad enn karboksylsyre-reagenset. Ved å finjustere og utvikle ein ny familie av komplekse kirale fosforsyrer, klarte dei å takle utfordringa med å optimalisere katalysatoren sin struktur for å oppnå effektiv kontroll over enantioselektiviteten (19). Det kan vere interessant å sjå om ein enantioselektiv Ugi-reaksjon etter Zang *et al.* si prosedyre kan syntetisere kun den legemiddelaktive enantiomeren av prazikvantel.

## 7 Referansar

1. EPA United States Environmental Protection Agency. *Basics of Green Chemistry* [Internett]. EPA.gov; **2013** [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry>
2. Mishra M., Sharma M., Dubey R., Kumari P., Ranjan V., Pandey J. *Green synthesis interventions of pharmaceutical industries for sustainable development*. **2021**; 1-7.
3. Feilberg P. *12 prinsipper for en bærekraftig kjemi* [Internett]. Gemini.no; **2022** [sitert 1. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://gemini.no/2022/03/12-prinsipper-for-en-baerekraftig-kjemi/>
4. Statens Legemiddelverk. *Legemiddelmangel - årsaker og tiltak* [Internett]. Legemiddelverket.no; **2023** [sitert 10. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://legemiddelverket.no/legemiddelmangel/legemiddelmangel-arsaker-og-tiltak>
5. Helsedirektoratet. *2.1. Den forenklete forsyningskjeden* [Internett]. Helsedirektoratet.no; **2019** [sitert 7. februar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/nasjonale-legemiddelberedskap/forsyningskjeden-for-legemidler/den-forenklete-forsyningskjeden>
6. Mannsåker H. *Går mot rekordår for medisinmangel:- Urovekkande* [Internett]. NRK.no; **2022** [sitert 16. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.nrk.no/rogaland/gar-mot-rekordar-for-medisinmangel-1.16131155>
7. Wikipedia. *Praziquantel* [Internett]. Wikipedia.com; **2023** [sitert 14. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Praziquantel&oldid=1132105798>
8. Andrews P., Thomas H., Pohlke R., Seubert J. *Praziquantel*. **1983**; 3(2): 147–200.
9. World Health Organization. *WHO model list of essential medicines - 22nd list, 2021* [Internett]. Who.int; **2021** [sitert 16. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>
10. Reich M.R., Govindaraj R. *Dilemmas in drug development for tropical diseases Experiences with praziquantel*. **1998**; 44(1): 1-18.
11. Folkehelseinstituttet. *Schistosomiasis - veileder for helsepersonell* [Internett]. Fhi.no; **2019** [sitert 16. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/schistosomiasis---veileder-for-hels/>

12. Pettersen F.O.D. *schistosomiasis* [Internett]. Snl.no; **2022** [sitert 29. mars 2023].  
Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/schistosomiasis>
13. Wu Z.H., Lu M., Hu L.Y., Li X. *Praziquantel Synergistically Enhances Paclitaxel Efficacy to Inhibit Cancer Cell Growth*. **2012**; 7(12): e51721.
14. Hao L., Mao Y., Park J., Bae E.J., Park B.H. *Repurposing the anthelmintic praziquantel to treat psoriasis*. **2021**; 178(23): 4726–40.
15. Cao H., Liu H., Dömling A. *Efficient Multicomponent Reaction Synthesis of the Schistosomiasis Drug Praziquantel*. **2010**; 16(41): 12296–8.
16. Testbook Learn. *Carbylamine Reaction: Know Importance, Mechanism & Applications* [Internett]. Testbook.com; **2022** [sitert 27. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://testbook.com/learn/chemistry-carbylamine-reaction/>
17. Ingold M., Colella L., Dapuelto R., López G., Porcal W. *Ugi Four-component Reaction (U-4CR) Under Green Conditions Designed for Undergraduate Organic Chemistry Laboratories*. **2017**; 5: 153–7.
18. Riva R. *Enantioselective four-component Ugi reactions*. **2018**; 361(6407): 1072–3.
19. Li J.J. *Name Reactions, A collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications: Ugi reaction*. 6.utg. Springer Nature Switzerland AG; **2021**. s. 547–51.
20. Wikipedia. *Ugi reaction* [Internett]. Wikipedia.com; **2022** [sitert 26. januar 2023].  
Tilgjengelig på:  
[https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Ugi\\_reaction&oldid=1085234134](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Ugi_reaction&oldid=1085234134)
21. Pradhan P.K., Nandi D., Pradhan S.D., Jaisankar P., Giri V.S. *An Unusual Diastereoselective Pictet–Spengler Reaction: Synthesis of Novel Tetrahydro- $\beta$ -Carboline Glycosides*. **2012**; 24(1): 85-89
22. Wangensteen H. *alkaloider – medisin* [Internett]. Snl.no; **2023** [sitert 24. april 2023].  
Tilgjengelig på: [https://snl.no/alkaloider\\_-\\_medisin](https://snl.no/alkaloider_-_medisin)
23. Li J.J. *Name Reactions, A collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications: Pictet–Spengler Tetrahydroisoquinoline Synthesis*. 6.utg. Springer Nature Switzerland AG; **2021**. s. 443–5.
24. Name-reaction. *Pictet–Spengler reaction Also known as: Pictet–Spengler tetrahydroisoquinoline synthesis* [Internett]. Name-reaction.com; [sitert 26. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.name-reaction.com/pictet-spengler-reaction>
25. Pictet A., Spengler T. *Über die Bildung von Isochinolin-derivaten durch Einwirkung von Methylal auf Phenyl-äthylamin, Phenyl-alanin und Tyrosin*. **1911**; 44(3): 2030–6.

26. Five M.B., Fossum S. *mikrotubuli* [Internett]. Snl.no; **2022** [siteret 24. januar 2023].  
Tilgjengelig på: <http://sml.snl.no/mikrotubuli>
27. Drugs. *Paclitaxel Uses, Side Effects & Warnings* [Internett]. Drugs.com; **2022** [siteret 27. januar 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.drugs.com/mtm/paclitaxel.html>
28. Orr G.A., Verdier-Pinard P., McDaid H., Horwitz S.B. *Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules*. **2003**; 22(47): 7280–95.
29. Seubert J., Pohlke R., Loebich F. *Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes*. **1977**; 1036–7.
30. Reissert A. *Ueber die Einführung der Benzoyl-gruppe in tertiäre cyclische Basen*. **1905**; 38(2): 1603-14\_.
31. Harris D.C., Lucy C.A. *Quantitative chemical analysis: High-Performance Liquid Chromatography*. 10. utg. New York, NY: Macmillan International Higher Education; **2020**. s. 703-39
32. NTNU Wiki. *Tynnsjiktskromatografi* [Internett]. Ntnu.no; **2018** [siteret 24. januar 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Tynnsjiktskromatografi>
33. Chemistry LibreTexts. *Thin Layer Chromatography* [Internett]. Chem.libretexts.org; **2013** [siteret 25. januar 2023]. Tilgjengelig på:  
[https://chem.libretexts.org/Ancillary\\_Materials/Demos\\_Techniques\\_and\\_Experiments/General\\_Lab\\_Techniques/Thin\\_Layer\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Demos_Techniques_and_Experiments/General_Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography)
34. ScienceDirect Topics. *Column Chromatography - an overview* [Internett].  
Sciencedirect.com; **1984** [siteret 25. januar 2023]. Tilgjengelig på:  
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/column-chromatography>
35. NTNU Wiki. *HPLC* [Internett]. Ntnu.no; **2018** [siteret 8. november 2021]. Tilgjengelig på: <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/HPLC>
36. NTNU Wiki. *Retensjonstid* [Internett]. Ntnu.no; **2018** [siteret 8. november 2021].  
Tilgjengelig på: <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Retensjonstid>
37. Fleming I. *Spectroscopic methods in organic chemistry: Nuclear Magnetic Resonance Spectra*. 7. utg. Springer; **2019**. s. 123-34.
38. Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Vyvyan J.R. *Introduction to Spectroscopy*. 5. utg. Cengage Learning; **2015**. s. 215-76

39. Mohrig J.R., Alberg D.G., Hofmeister G.E., Schatz P.F., Noring Hammond C.  
*Laboratory Techniques in Organic Chemistry*. 4. utg. W. H. Freeman and Company;  
**2014**. 350–435 s.
40. Egeland E.S. *smeltepunktsbestemmelse* [Internett]. Snl.no; **2023** [sitert 10. mai 2023].  
Tilgjengelig på: <https://snl.no/smeltepunktsbestemmelse>
41. James N.M., Miller J.C., Miller R.D. *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 7. utg. Harlow: Pearson Education; **2018**. s. 186-218
42. Otto M. *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. 3. utg. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; **2017**. s. 1-396.
43. Ma C., Zhang Q.F., Tan Y.B., Wang L. *Total Synthesis of (-)-Praziquantel: An Anthelmintic Drug*. **2004**; 186-187



## 8 Vedlegg

### 8.1 Utrekningar av utbytte og conversion

Prosentutbytte blei funne ved bruk av formel 3. For batch 1 reaksjon 1 (B1-R1) vart teoretisk utbytte på 25,37 g og det observerte utbytte funne til å vere 11,99 g, som gav eit prosentutbytte på 47 %.

$$\% \text{ Utbytte} = \frac{11,99 \text{ g}}{25,37 \text{ g}} \cdot 100 \% = 47,26 \% \sim 47 \%$$

B1-R2 vart 2,2-dimetoksyetylamin blei identifisert som den avgrensande reaktanten i B1-R1 med ei stoffmengd på 0,08864 mol, og blei vidare brukt for å finne teoretisk utbytte på 33,37 g. Det observerte utbytte vart funne til å vere 11,57 g. Prosentutbytte blei deretter funne ved hjelp av formel 3.

$$n_{(2,2\text{-dimetoksyetylamin})} = \frac{9,32 \text{ g}}{105,14 \text{ g/mol}} = 0,08864 \text{ mol}$$

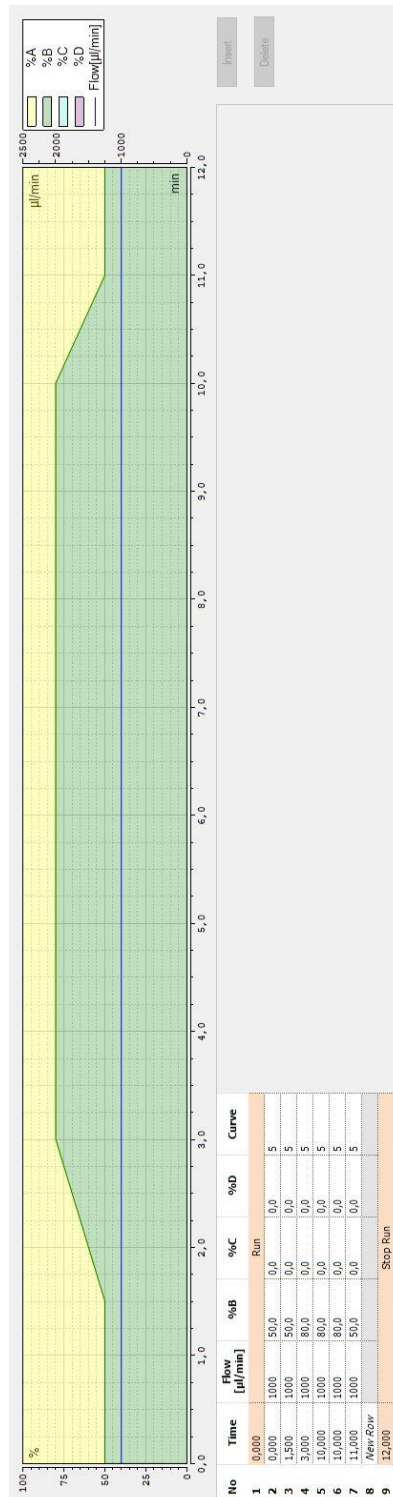
$$m_{\text{diamid (6)}} = 0,08864 \text{ mol} \cdot 376,49 \text{ g/mol} = 33,37 \text{ g}$$

$$\% \text{ Utbytte} = \frac{11,57 \text{ g}}{33,37 \text{ g}} \cdot 100 \% = 34,67 \% \sim 35 \%$$

Prosentconversion blei funne ved bruk av formel 4. Arealet av PZQ (1) på 0,092 mAU\*min blei delt på summen av areala til PZQ (1) og forbindelse (6). Dette ga ein prosentconversion på 8,2 % for eksepriment 1 (3t) i det eksperimentelle designet.

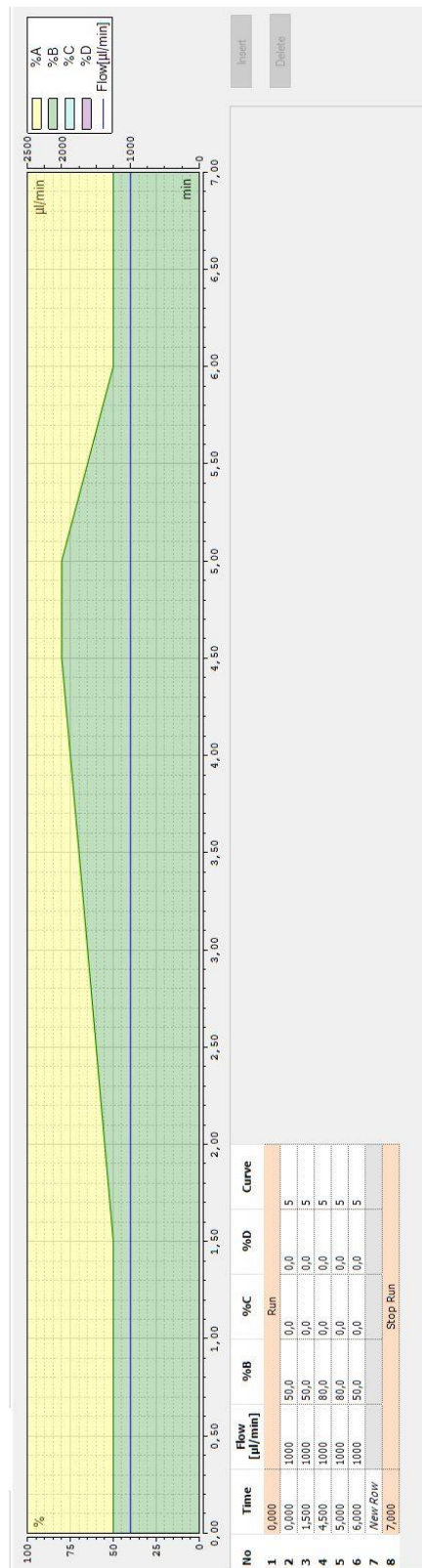
$$\% \text{ Conversion} = \frac{0,092 \text{ mAU} \cdot \text{min}}{(1,024 + 0,092) \text{ mAU} \cdot \text{min}} \cdot 100 \% = 8,2 \%$$

## 8.2 Gradientprogram versjon 1



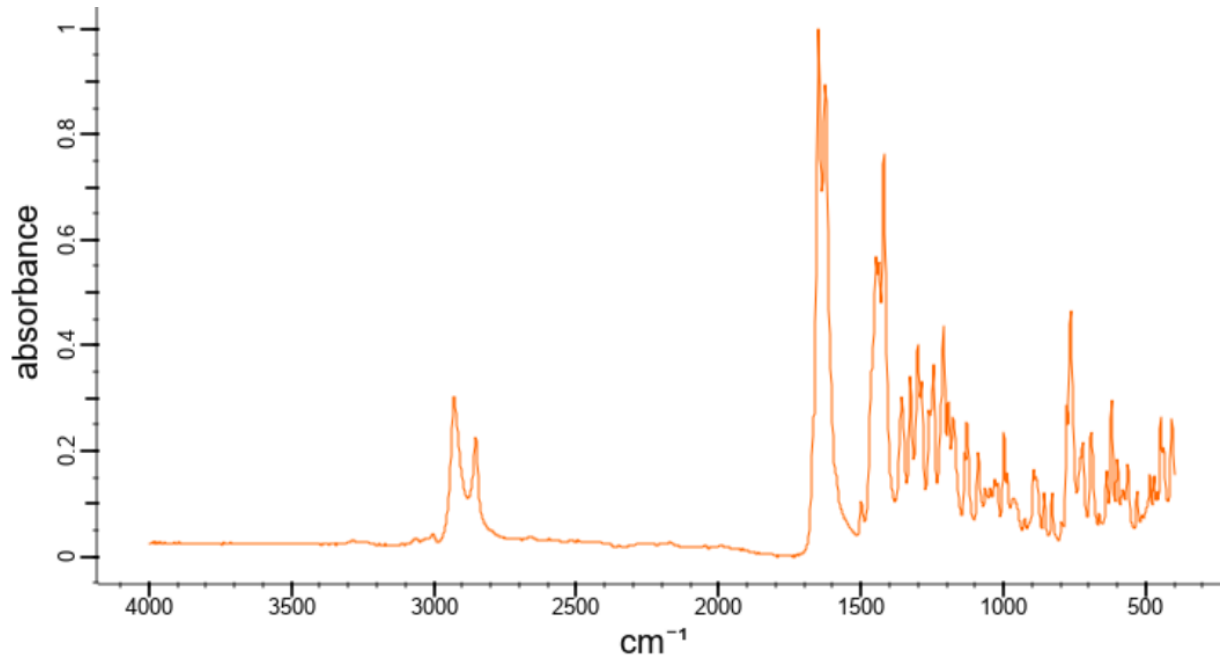
Figur 49. Gradientprogram versjon 1, 12 minutt.

### 8.3 Gradientprogram versjon 2



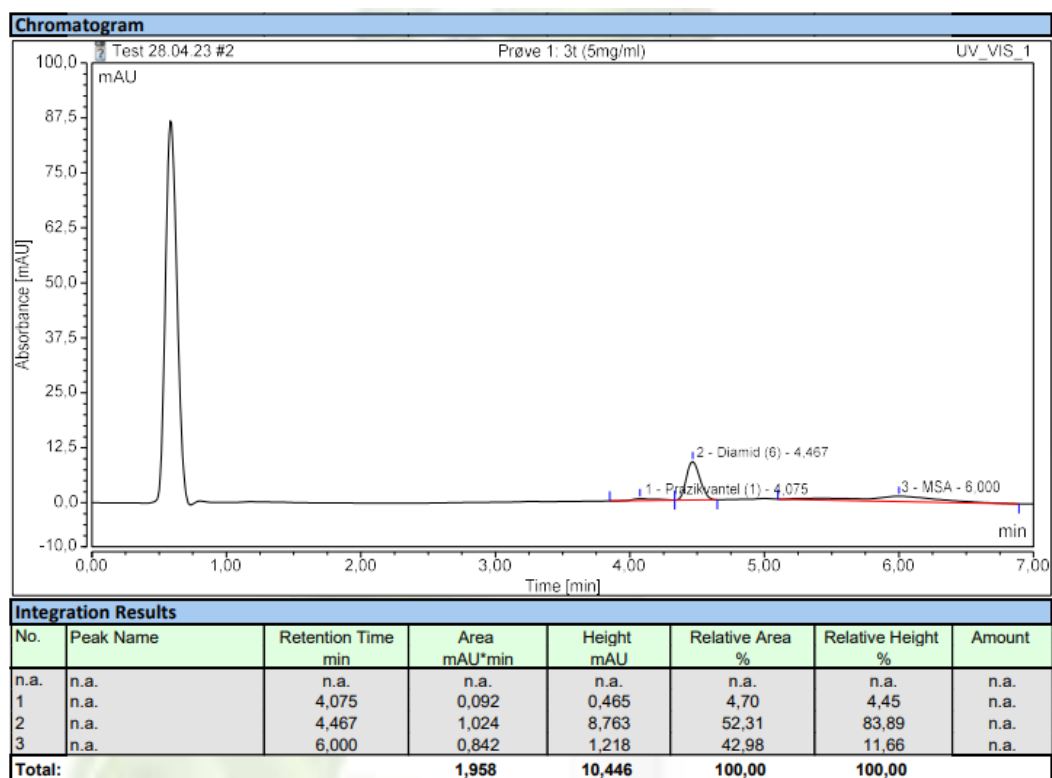
Figur 50. Gradientprogram versjon 2, 7 minutt.

## 8.4 FT-IR spektrabase spekter av prazikvantel

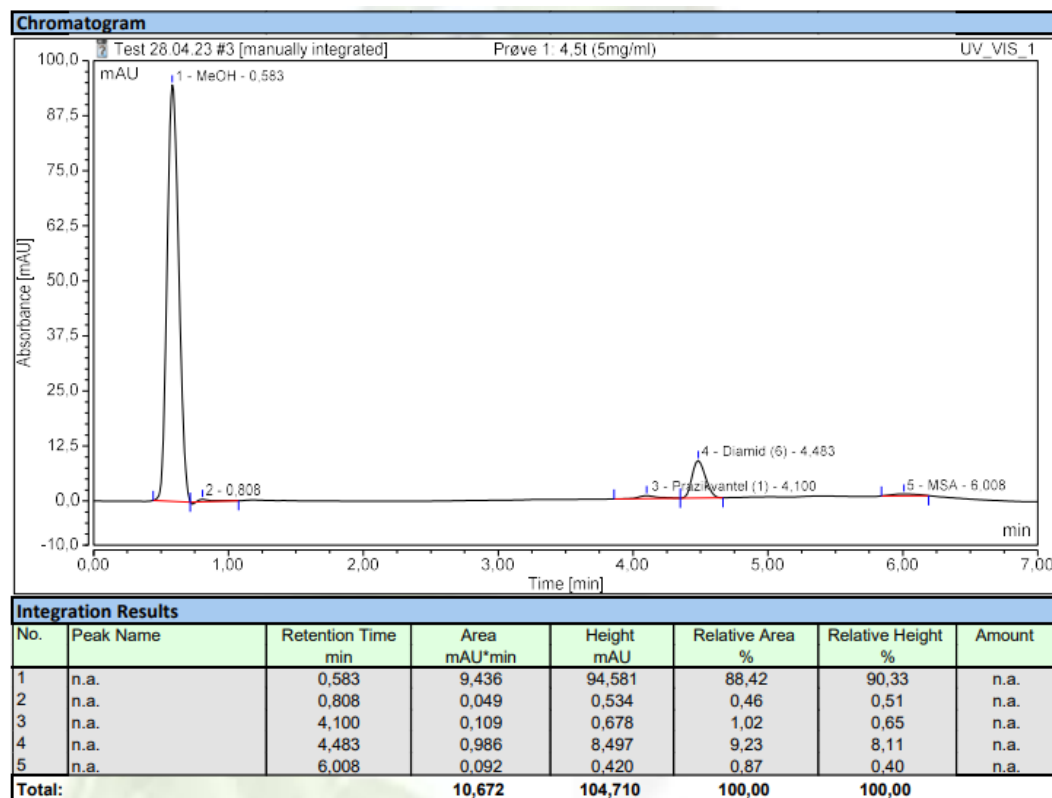


*Figur 51. FT-IR spekter av PZQ (1), henta frå specrabase.com*

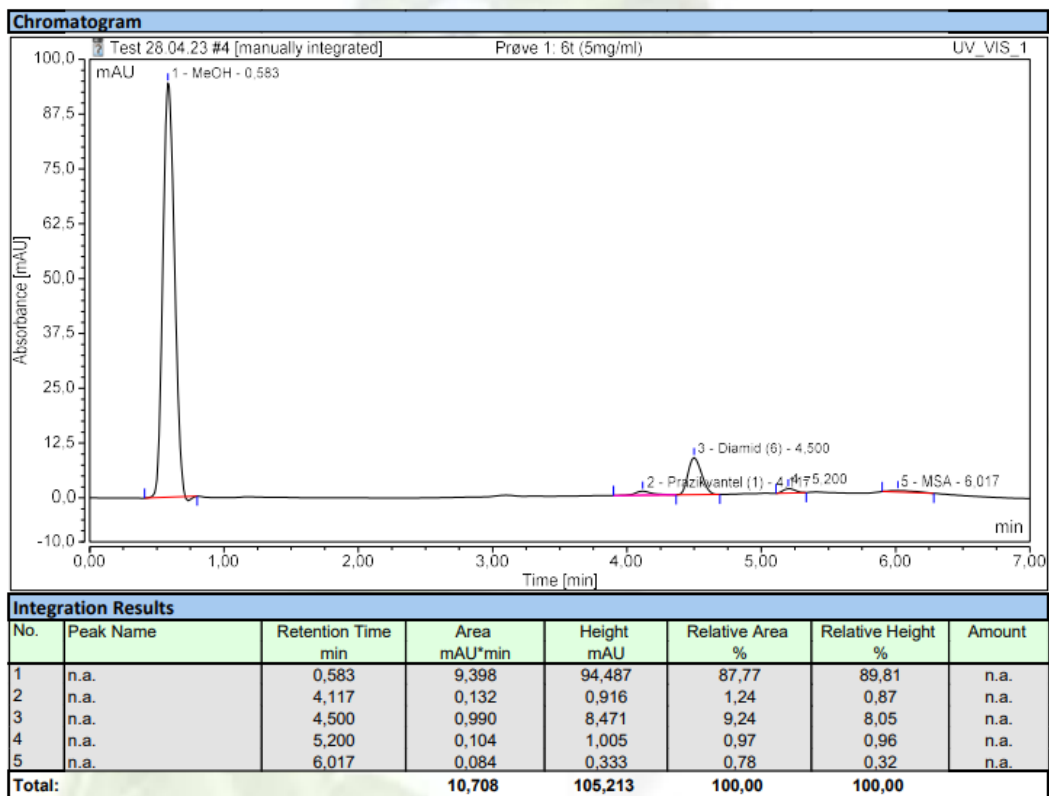
## 8.5 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 1



Figur 52. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 1, 3 timar.

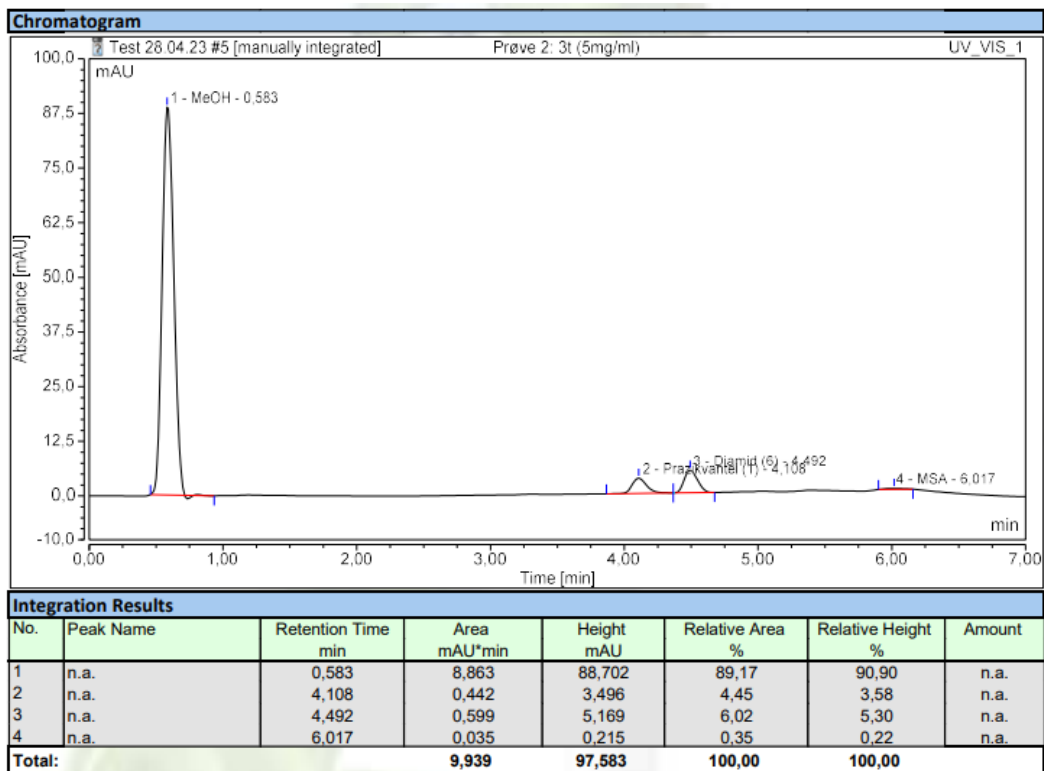


Figur 53. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 1, 4,5 timar..

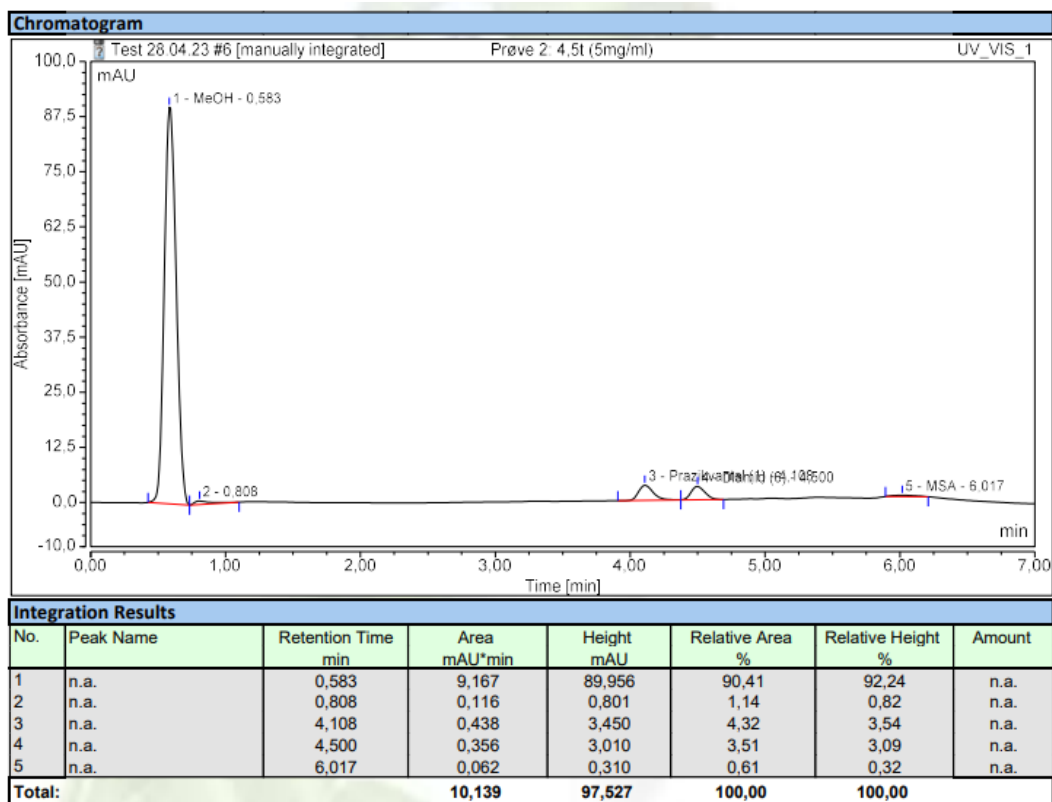


Figur 54. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 1, 6 timer.

## 8.6 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 2



Figur 55. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 2, 3 timar.



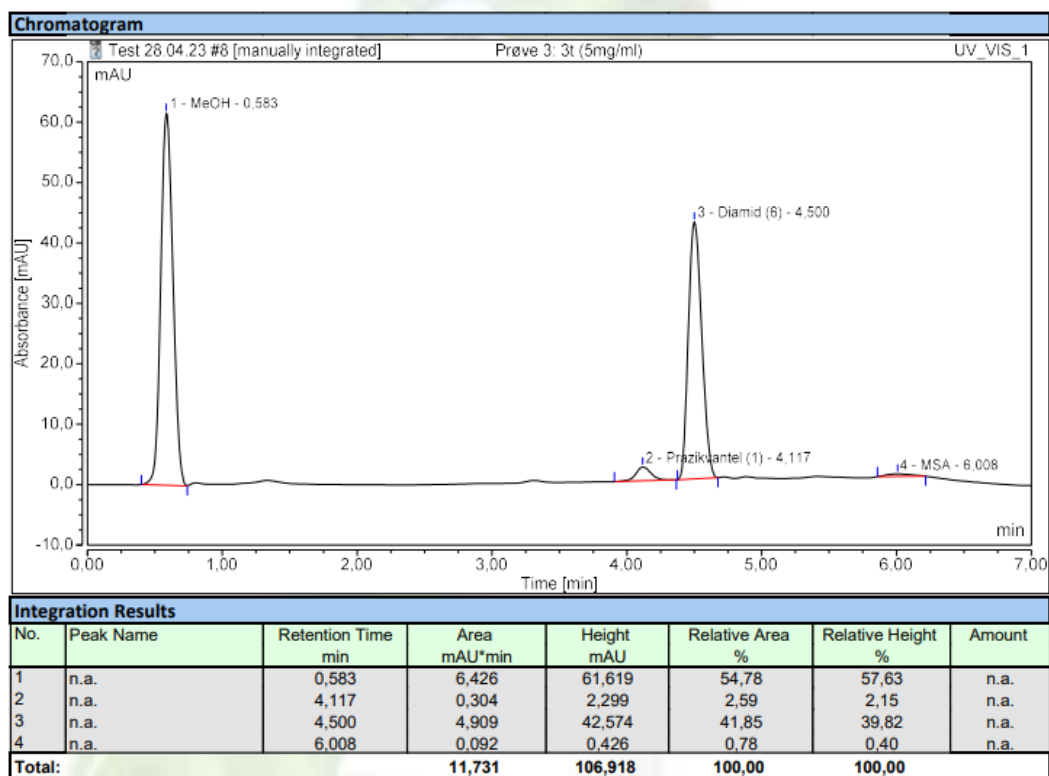
Figur 56. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøver 2, 4,5 timar.

Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,583	8,455	82,285	91,85	93,46	n.a.
2	n.a.	0,808	0,106	0,736	1,16	0,84	n.a.
3	n.a.	4,117	0,387	3,064	4,21	3,48	n.a.
4	n.a.	4,508	0,198	1,656	2,15	1,88	n.a.
5	n.a.	6,017	0,058	0,299	0,63	0,34	n.a.
<b>Total:</b>			<b>9,205</b>	<b>88,039</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

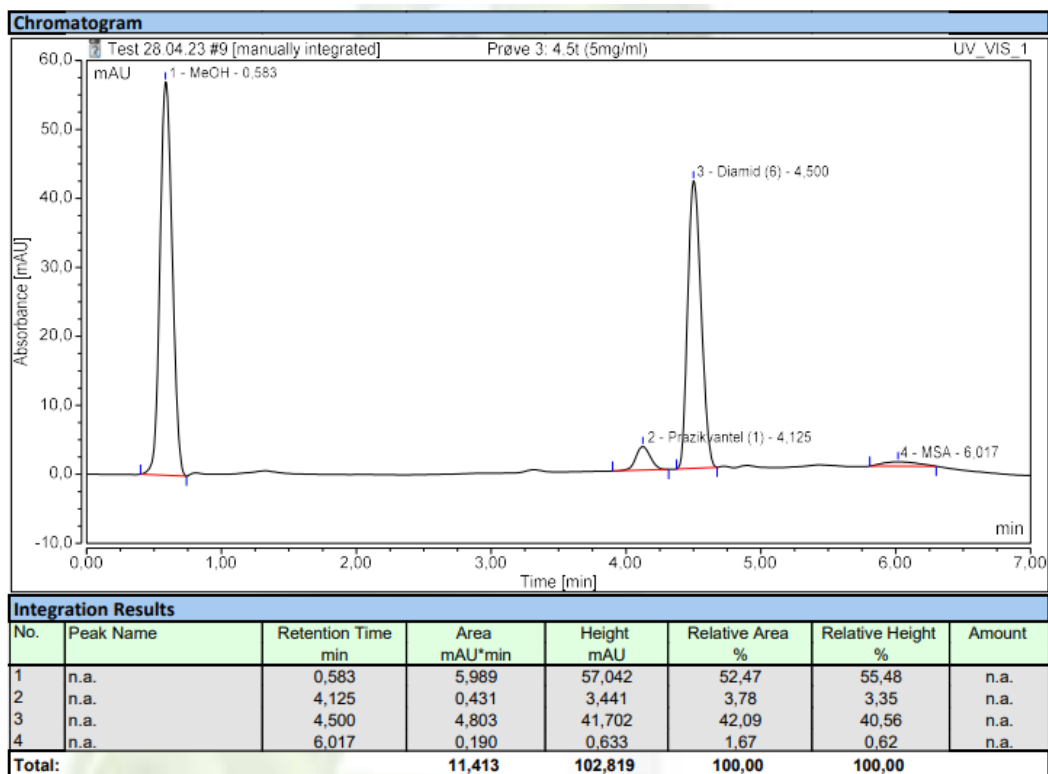
*Figur 57. HPLC integrasjonsresultat av prøve 2, 6 timer.*



## 8.7 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 3



Figur 58. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 3, 3 timar.



Figur 59. HPLC kromatogram og integrasjons resultat av prøve 3, 4,5 timar.

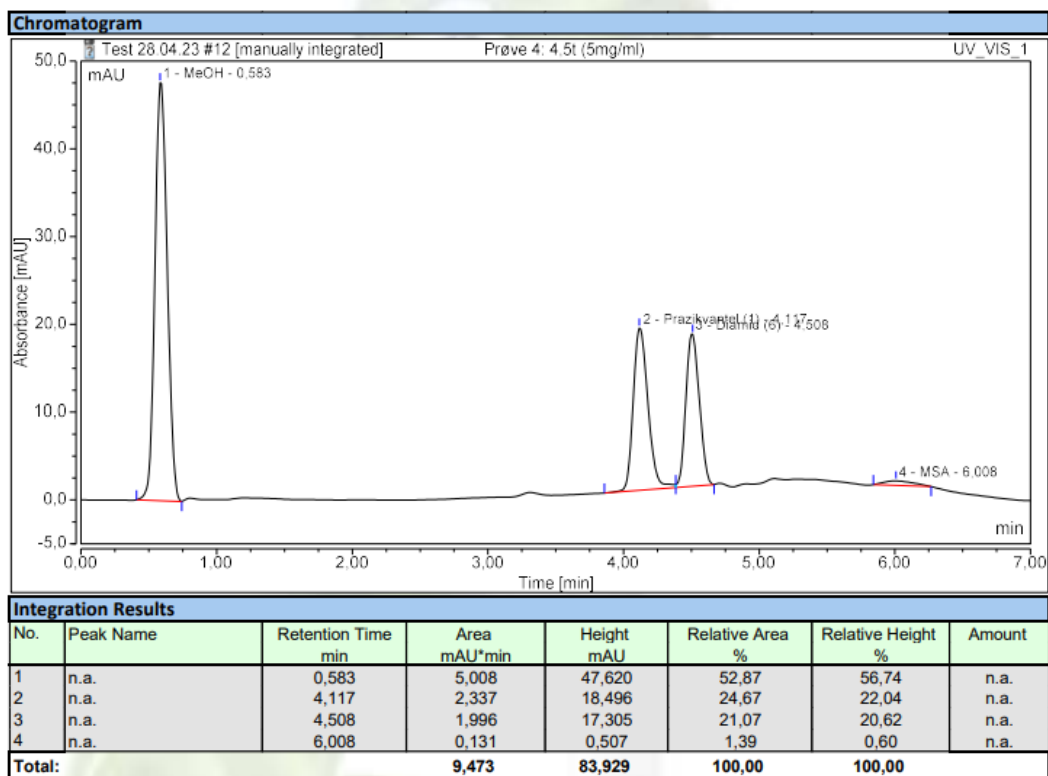
Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,583	5,255	50,242	50,64	53,65	n.a.
2	n.a.	4,067	0,540	4,301	5,20	4,59	n.a.
3	n.a.	4,450	4,465	38,645	43,02	41,26	n.a.
4	n.a.	6,008	0,118	0,466	1,14	0,50	n.a.
<b>Total:</b>			<b>10,377</b>	<b>93,654</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

*Figur 60. HPLC integrasjonsresultat av prøve 3, 6 timar.*

## 8.8 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 4

Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,583	4,616	43,826	52,21	55,21	n.a.
2	n.a.	4,083	1,460	12,138	16,52	15,29	n.a.
3	n.a.	4,467	2,601	22,819	29,42	28,75	n.a.
4	n.a.	6,017	0,164	0,600	1,86	0,76	n.a.
<b>Total:</b>			<b>8,842</b>	<b>79,384</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

Figur 61. HPLC integrasjonsresultat av prøve 4, 3 timar.

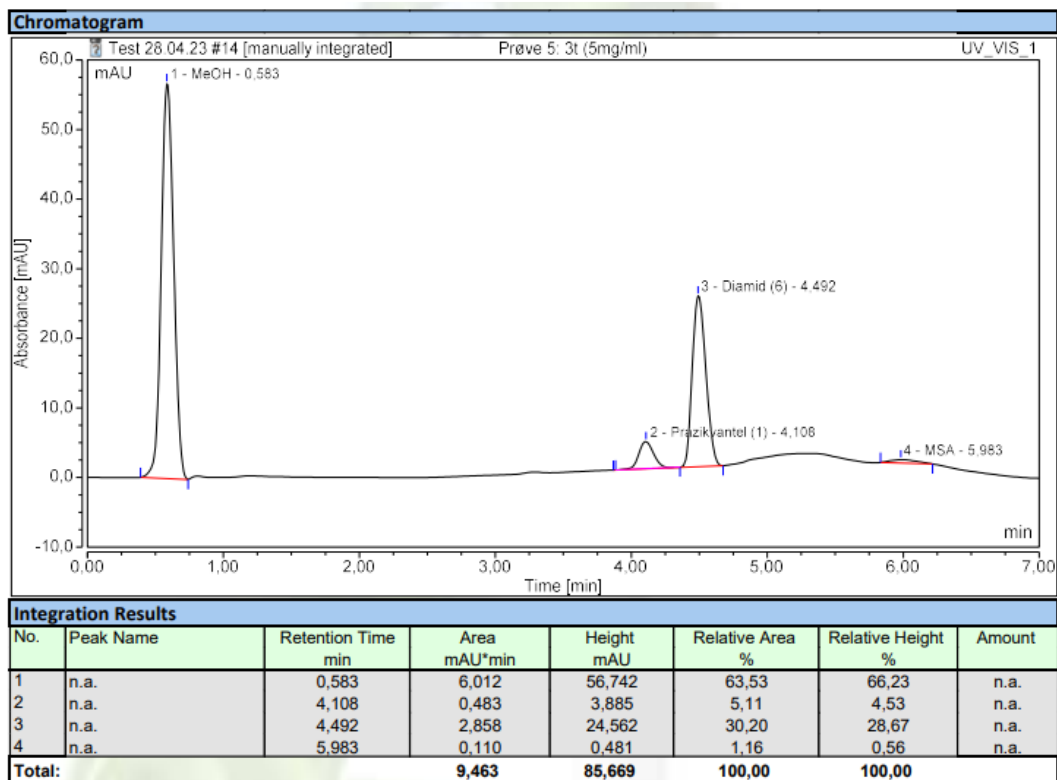


Figur 62. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 4, 4,5 timar.

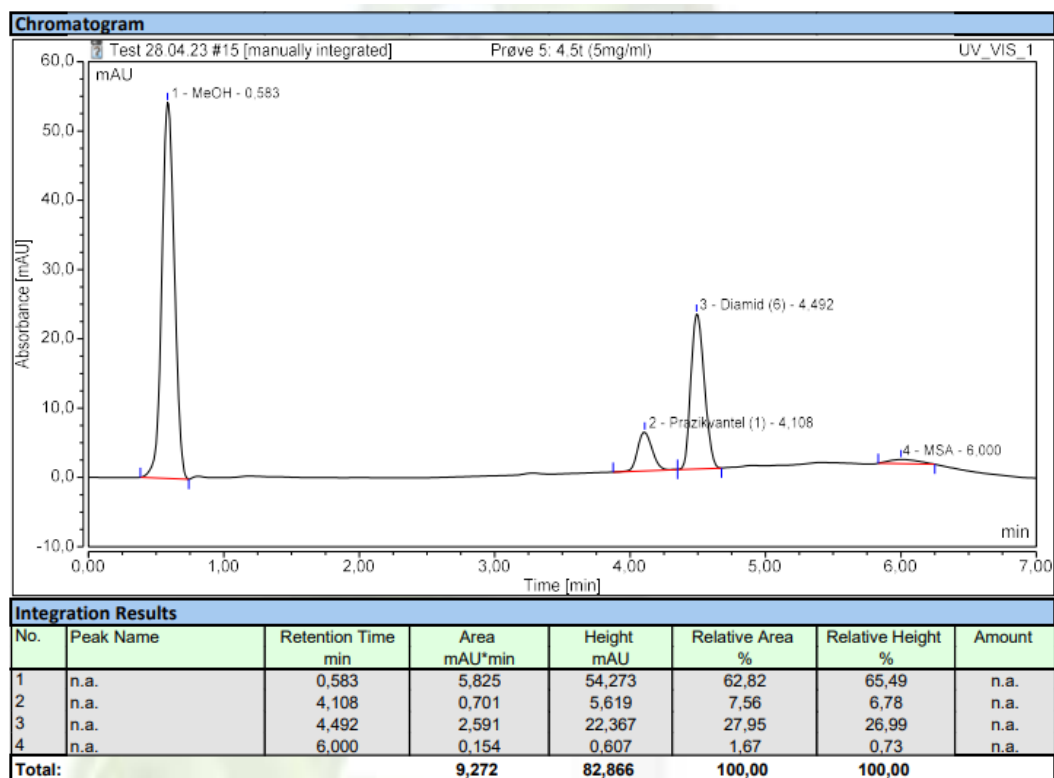
Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,583	5,189	48,944	55,46	58,50	n.a.
2	n.a.	4,100	2,701	22,269	28,87	26,61	n.a.
3	n.a.	4,500	1,370	12,059	14,64	14,41	n.a.
4	n.a.	5,992	0,097	0,400	1,04	0,48	n.a.
<b>Total:</b>			<b>9,357</b>	<b>83,672</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

Figur 63. HPLC integrasjonsresultat av prøve 4, 6 timar.

## 8.9 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment 5



Figur 64. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 5, 3 timar.



Figur 65. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve 5, 4,5 timar.

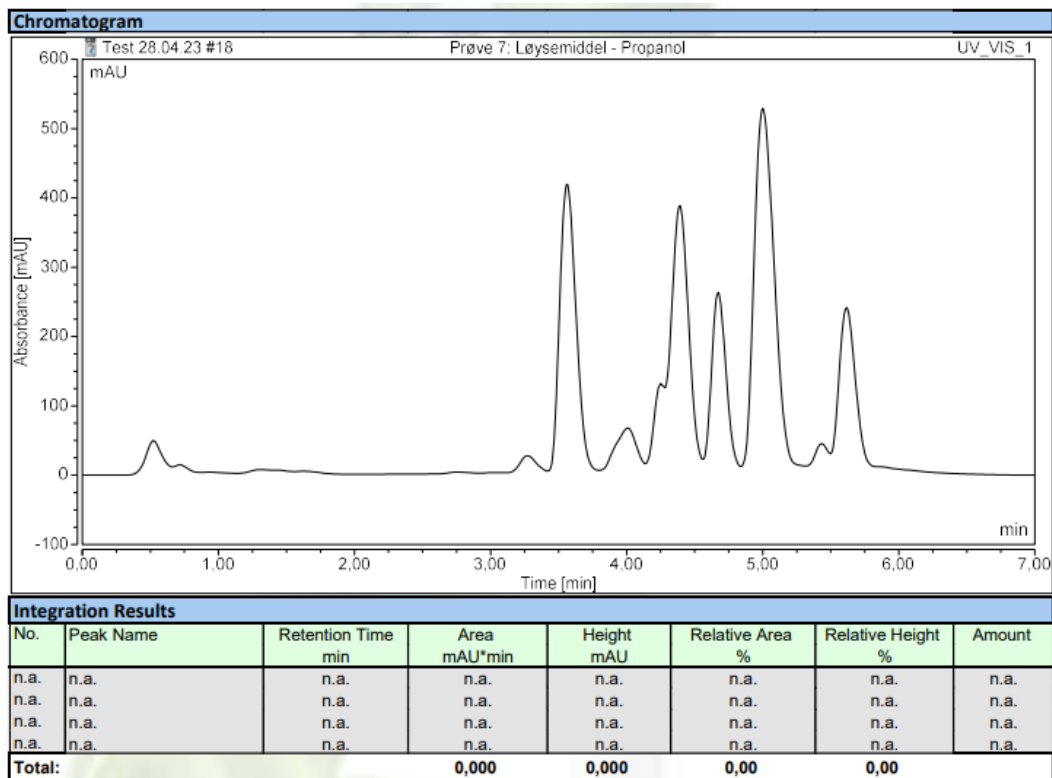
Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,583	6,056	56,711	58,60	64,51	n.a.
2	n.a.	4,108	0,952	7,876	9,21	8,96	n.a.
3	n.a.	4,508	3,175	22,716	30,72	25,84	n.a.
4	n.a.	6,008	0,151	0,601	1,46	0,68	n.a.
<b>Total:</b>			<b>10,335</b>	<b>87,904</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

*Figur 66. Integrasjonsresultat av prøve 5, 6 timar, den 28.04.2023.*

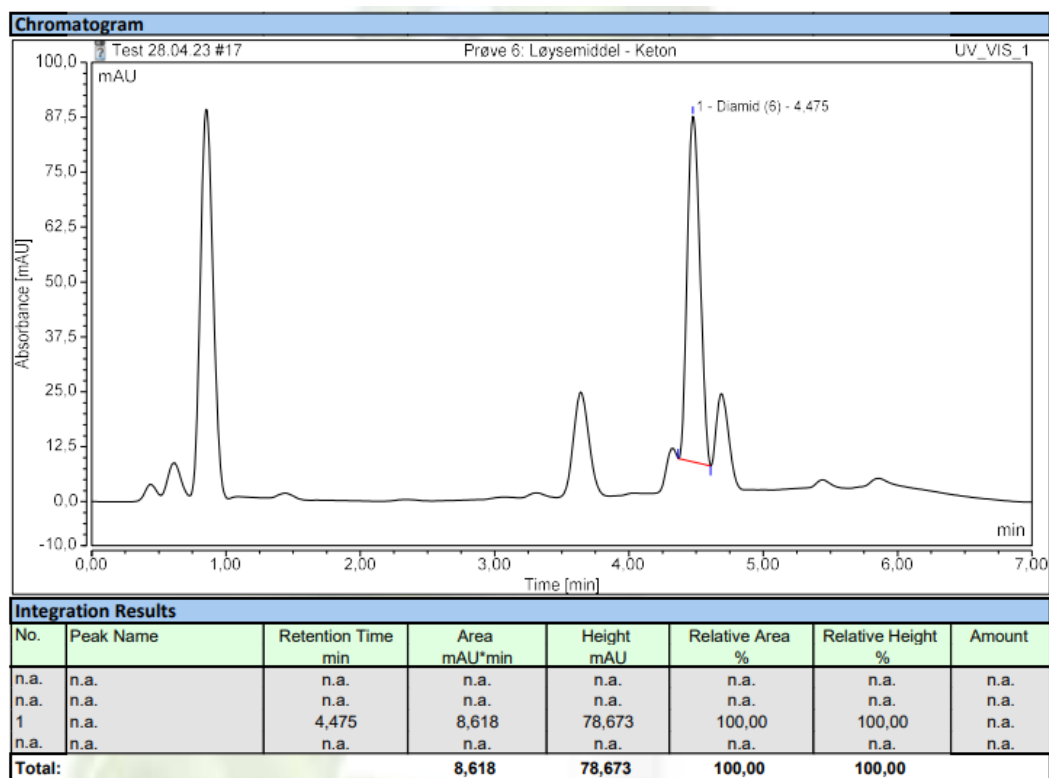
Integration Results							
No.	Peak Name	Retention Time min	Area mAU*min	Height mAU	Relative Area %	Relative Height %	Amount
1	n.a.	0,592	2,077	17,179	58,01	59,09	n.a.
2	n.a.	4,083	0,408	3,163	11,38	10,88	n.a.
3	n.a.	4,467	0,950	8,170	26,54	28,10	n.a.
4	n.a.	6,008	0,145	0,562	4,06	1,93	n.a.
<b>Total:</b>			<b>3,580</b>	<b>29,074</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	

*Figur 67. Integrasjonsresultat av prøve 5, 6 timar, den 27.04.2023.*

## 8.10 HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av eksperiment Q1 og Q2.



Figur 68. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve Q1, med proan-2-ol som løsemiddel.



Figur 69. HPLC kromatogram og integrasjonsresultat av prøve Q2, med etylmetylketon som løsemiddel.