



**CHALMERS**  
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

---



## Vägen till en hållbar framtid

Enzymbaserade verktyg för biotransformation och förädling av förnyelsebara råvaror

Kandidatarbete vid avdelningen för Kemi och biokemi

Forsberg, John

Sandolf, Emilia

Svennungsson, Sofie

Svensson, Hanna

Sy, Tommy

Åkesson, Christian

Vägen till en hållbar framtid

Enzymbaserade verktyg för biotransformation och förädling av förnyelsebara råvaror

JOHN FORSBERG

EMILIA SANDOLF

SOFIE SVENNUNGSSON

HANNA SVENSSON

TOMMY SY

CHRISTIAN ÅKESSON

© JOHN FORSBERG, EMILIA SANDOLF, SOFIE SVENNUNGSSON, HANNA SVENSSON, TOMMY SY, CHRISTIAN ÅKESSON, 2018.

Handledare: Nina Kann, Kemi och kemiteknik, Kemi och biokemi

Petter Dunås, Kemi och kemiteknik, Kemi och biokemi

Examinator: Britt-Marie Steenari, Kemi och kemiteknik, Industriell materialåtervinning

Institutionen för kemi och kemiteknik

Avdelningen för kemi och biokemi

Chalmers Tekniska Högskola

412 96 Göteborg

Sweden

Telefon +46 31 772 1000

Omslagsbild: Träd, en förnyelsebar bioråvara, se avsnitt 4.1.3. Fotograf: Emilia Sandolf.

Göteborg, Sweden 2018

Vägen till en hållbar framtid

Enzymbaserade verktyg för biotransformation och förädling av förnyelsebara råvaror

JOHN FORSBERG, EMILIA SANDOLF, SOFIE SVENNUNGSSON, HANNA SVENSSON,  
TOMMY SY, CHRISTIAN ÅKESSON

Institutionen för kemi och kemiteknik

Chalmers tekniska högskola

## Sammanfattning

Syftet med detta kandidatarbete har varit att utveckla kirala molekyler från aromatenheter, som potentiellt kan erhållas från nedbrytet lignin. Metoderna som användes var biotransformation med *Ralstonia eutropha* B9, vilken uttrycker bensoat 1,2-dioxygenas, samt organisk syntes via hydrogen borrowing- och hydroamineringsreaktioner.

Målet är att de kirala molekylerna från biotransformation ska kunna användas vid tillverkning av högvärdeskemikalier. De aromatiska molekylerna förädlas successivt till allt mer avancerade kirala molekyler genom biotransformation och organisk syntes. Förhoppningen är att molekylerna, i kommande studier, ska kunna utvecklas ytterligare och användas för att ersätta de molekyler som i dagsläget erhålls från fossila råvaror.

Ett antal biotransformationer genomfördes, med bensoesyra derivat som substrat. Detta lyckades för ett substrat, natriumbensoat. Substitution på metapositionen testades också, men dessa substrat genomgick inte samma reaktion. Slutsatsen som dras är att denna organism kanske inte lämpar sig för biotransformation av nedbrutet lignin.

Hydrogen borrowing-reaktionen som genomfördes på derivat från biotransformationsprodukten gav inte den förväntade reaktionen utan gav en rearomatiserad produkt. Däremot gav testreaktionen med bensylalkohol ett lyckat resultat. Hydrogen borrowing-reaktionen kan dock eventuellt genomföras vid en lägre temperatur, vilket kan vara en lösning på problemet med att produkten rearomatiserades. I annat fall finns det många organiska reaktioner som kan utvärderas. Hydroamineringsreaktioner genomfördes också, med flera startmaterial. Dock genomgick inga av dessa reaktioner den förväntade reaktionen.

Slutsatsen är att det finns stor potential för att skapa kirala molekyler från nedbrutet lignin via biotransformation och organisk syntes. Dock är *R. eutropha* B9 kanske inte den mest lämpliga organismen för biotransformation av aromatenheter från nedbrutet lignin. Vidare kan det mycket väl vara av intresse att utveckla produkter från biotransformation till högvärdeskemikalier i form av exempelvis läkemedel och material.

The road to a sustainable future

Enzyme based tools for biotransformation and refining of renewable raw materials

JOHN FORSBERG, EMILIA SANDOLF, SOFIE SVENNUNGSSON, HANNA SVENSSON,  
TOMMY SY, CHRISTIAN ÅKESSON

The department of chemistry and chemical engineering

Chalmers University of Technology

## Abstract

The aim of this bachelor project has been to develop chiral molecules from aromatic units, which may be obtained from degraded lignin. The methods used were biotransformation with *Ralstonia eutropha* B9, expressing benzoate 1,2-dioxygenase, and organic synthesis through hydrogen borrowing and hydroamination reactions.

The goal of this process is to use these diversified products for high value chemical production. The aromatic molecules are progressively processed into increasingly sophisticated chiral molecules through biotransformation and organic synthesis. The hope is that the molecules, in future studies, will be further developed and used to replace the molecules currently obtained from fossil raw materials.

A number of biotransformations were performed with benzoic acid derivatives as substrates. These were carried out successfully on one substrate, sodium benzoate. Substitution at the meta position was also tested and were found to not undergo the same reaction. The conclusion from the biotransformations is that this particular organism may not be suitable for biotransformation of degraded lignin.

Hydrogen borrowing reactions on the derivatives of the biotransformation products did not yield the expected reaction, but one reaction did afford a rearomatised product. However the test reaction with benzyl alcohol did afford the desired product. The hydrogen borrowing reaction could still be achieved at lower temperatures, and this might be a solution for the rearomatisation of the product. Otherwise there are a whole range of other organic reactions that could be carried out. Hydroamination reactions were also carried out on a number of substrates. However, non of these reactions did provide the expected reaction.

To conclude, there is great potential in creating chiral molecules from degraded lignin, through biotransformation together with organic synthesis. However *R. eutropha* B9 may not be the most suitable organism for biotransformation of aromatic units from degraded lignin. Further on, it would certainly be interesting to develop the product from the biotransformtion to high value chemicals, as materials and pharmaceuticals.

The report is written in Swedish.



# Tack

Vi skulle vilja framföra ett stort tack, främst till våra handledare Nina Kann och Petter Dunås men också Andrew Paterson som varit till stor hjälp i vårt arbete. Vi vill också tacka Jerker Mårtensson samt Namratha Prabhu för deltagande i form av hjälp då olika frågor i ämnesområdet eller kring apparatur har uppkommit.

Förutom handledare och annan personal på avdelningen kemi och biokemi har bibliotekspersonal och personal från fackspråk varit till stor hjälp rörande rapportens stil och struktur och ett tack riktas därför även till dem.

# Innehållsförteckning

<b>1</b>	<b>Förkortningslista</b>	<b>vii</b>
<b>2</b>	<b>Ordlista</b>	<b>viii</b>
<b>3</b>	<b>Introduktion</b>	<b>1</b>
3.1	Bakgrund . . . . .	1
3.2	Syfte . . . . .	2
3.3	Metod . . . . .	2
3.4	Frågeställningar . . . . .	3
<b>4</b>	<b>Teori</b>	<b>4</b>
4.1	Ett hållbart samhälle . . . . .	4
4.1.1	Globala mål . . . . .	4
4.1.2	Fossila råvaror . . . . .	5
4.1.3	Bioråvaror . . . . .	5
4.1.4	Biobaserad ekonomi . . . . .	6
4.1.5	Grön kemi . . . . .	7
4.2	Biotransformation . . . . .	7
4.3	Kiralitet . . . . .	8
4.4	Organisk syntes . . . . .	9
4.4.1	Förestring . . . . .	9
4.4.2	Ketalbildning . . . . .	10
4.4.3	Hydrogen borrowing (HB) . . . . .	10
4.4.4	Hydroaminering (HA) . . . . .	11
<b>5</b>	<b>Metod</b>	<b>12</b>
5.1	Laborationer . . . . .	12
5.1.1	Biotransformation . . . . .	13
5.1.2	Organisk syntes . . . . .	15
<b>6</b>	<b>Resultat</b>	<b>18</b>
6.1	Biotransformation . . . . .	18
6.2	Förestring . . . . .	19
6.3	Ketalbildning . . . . .	19
6.4	Hydrogen borrowing (HB) . . . . .	20

6.5	Hydroaminering (HA)	21
<b>7</b>	<b>Diskussion</b>	<b>22</b>
7.1	Diskussion av metod och resultat	22
7.1.1	Biotransformation	22
7.1.2	Förestring	24
7.1.3	Ketalbildning	24
7.1.4	Hydrogen Borrowing (HB)	24
7.1.5	Hydroaminering (HA)	26
7.2	Analysmetoder	27
7.3	Samhälleliga och etiska aspekter	27
<b>8</b>	<b>Slutsats</b>	<b>29</b>
<b>A</b>	<b>Appendix A</b>	<b>I</b>
A.1	Stödande information	I
A.1.1	Biotransformation	I
A.1.2	Förestring	IV
A.1.3	Ketalbildning	VI
A.1.4	Hydrogen Borrowing (HB)	VI
A.1.5	Hydroaminering (HA)	VIII
<b>B</b>	<b>Appendix B</b>	<b>X</b>
B.1	Riskbedömningar	X
B.1.1	Biotransformation	X
B.1.2	Förestring	XIV
B.1.3	Ketalbildning	XIX
B.1.4	Hydrogen Borrowing (HB)	XXIII
B.1.5	Hydroaminering (HA)	XXVII
<b>C</b>	<b>Appendix C</b>	<b>XXXI</b>
C.1	Spektroskopiska data	XXXI
C.1.1	Biotransformation	XXXI
C.1.2	Förestring	XXXIII
C.1.3	Ketalbildning	XXXV
C.1.4	Hydrogen Borrowing (HB)	XXXVII

# 1

## Förkortningslista

- **BZDO** - Bensoat 1,2-dioxygenas
- **DCM** - Diklormetan
- **DMF** - Dimetylformamid
- **DMP** - Dimetoxipropan
- **Dppf** - 1,1'-bis(difenylfosfin)ferrocen
- **DSH** - Dinatriumsuccinatsexahydrat
- **EPA** - US Environmental Protection Agency
- **HA** - Hydroaminering
- **HB** - Hydrogen borrowing
- **HMB** - Hutner's Mineral Base
- **IPTG** - Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid
- **IR** - Infraröd
- **NMR** - Nuclear Magnetic Resonance (svenska: Kärnmagnetisk resonans)
- **NO<sub>x</sub>** - Kväveoxider
- **ppm** - parts per million
- **SO<sub>x</sub>** - Svaveloxider
- **TFA** - Trifluorättiksyra
- **THF** - Tetrahydrofuran
- **TLC** - Thin Layer Chromatography (svenska: Tunnskittskromatografi)

# 2

## Ordlista

- **Aromatenhet** - En cyklisk förening där varje atom har en dubbelbindning som är konjugerad med grannatomerna.
- **Aromatisering** - En kemisk reaktion varvid ett aromatiskt system bildas från ett ickearomatiskt system.
- **Atomekonomi** - Mått på andelen reaktantatomer som har införlivats i produkten.
- **Autoklivering** - Sterilisering av exempelvis kemikalier och apparatur genom uppvärmning under ökat tryck.
- **Biomassa** - Material av biologiskt ursprung.
- **Biotransformation** - Organisk reaktion katalyserad av enzymer.
- **Derivat** - Något som är bildat, eller 'deriverat', ur något annat.
- **Diol** - En kemisk grupp med två hydroxigrupper (-OH) i sig och kan jämföras med enkla alkoholer som har endast en hydroxigrupp.
- **Elektrofil** - En molekyl eller atom som dras till elektrontäta områden i en annan molekyl.
- **Enzym(er)** - Biologisk katalysator i form av protein som produceras av varje levande organism.
- ***E. coli*** - *Escherichia coli*, bakterie.
- **Flashkolonnkromatografi** - En typ av vätskekromatografi som används för att kunna separera olika organiska molekyler i ett prov. Ofta används en silikagel i kolonnen som stationär fas och lösningsmedel av olika polaritet används som mobilfas.
- **Funktionell grupp** - Avgränsad del av en molekyl som påverkar kemiska egenskaper.
- **Förestring** - En reaktion mellan syra och alkohol där en vattenmolekyl avspjälkas och en ester bildas.
- **HA** - Hydroaminering, vilket är en reaktion då en amin adderas till en alken.
- **HB** - Hydrogen borrowing, svensk översättning saknas men kan liknas vid "väteutlåning".
- **HMB** - Hutner's Mineral Base, medium för biotransformation.
- **Imin** - En förening som innehåller en dubbelbindning mellan ett kol och ett kväve,

med strukturen  $RN=CR_2$ .

- **Intermediärer** - Kemiskt tillstånd mellan substrat och produkt.
- **IPTG** - Isopropyl  $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranosid, laktosanalog som inte bryts ner av enzym som bryter ner laktos.
- **IR-spektrum** - Ett spektrum som erhålls då infrarött ljus (IR-ljus) används för att excitera elektroner i ett prov samt ta reda på vilka olika funktionella grupper som finns.
- **Karusell** - *Carousel 12 Plus Reaction Station* från Radleys.
- **Katalysator** - Ämne som påskyndar en kemisk reaktion.
- **Kiral molekyl** - Molekyl som ser ut som spegelbilden av en annan molekyl, men inte har någon symmetrilinje, se figur 3.2.
- **Lämnande grupp** - Atom eller molekyl som lämnar en större molekyl.
- **Masspektrometri** - En separationsmetod där jonernas förhållande mellan laddning och massa utnyttjas. Separationen sker i gasfas.
- **NMR** - Nuclear Magnetic Resonance (svenska: Kärnmagnetisk resonans), en metod för att ta reda på strukturen och kopplingen mellan atomer hos en molekyl.
- **Nukleofil** - En molekyl eller atom som dras till mindre elektrontäta områden i en annan molekyl.
- ***R. eutropha*** - *Ralstonia eutropha*, bakterie.
- **Selektivitet** - Utbytet av den önskade produkten i förhållande till mängden förbrukat substrat.
- **Skyddsgrupp** - En funktionell grupp som har modifierats för att bli stabilare.
- **Substrat** - Startmaterial för katalysator.
- **TLC** - Thin Layer Chromatography (svenska: Tunnskiktskromatografi) är en typ av vätskekromatografi där lösningsmedel med olika polaritet kan användas för att separera olika organiska molekyler i ett prov.
- **Turnover/Turnovertal** - Turnovertal är det maximala antalet kemiska konversioner av ett substrats molekyler per sekund som ett enstaka katalytiskt aktivt centrum utför för en given koncentrationmängd. Betecknas ofta som  $k_{cat}$ .
- **T7/lac-systemet** - Ett system som kan användas för aktivering av en specifik gen genom inducering med laktosanologen IPTG, vilket gör att enzymet av intresse produceras.
- **UV-ljus** - Ultraviolettt ljus.

# 3

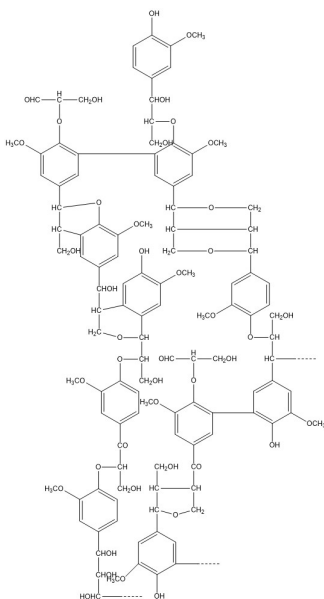
## Introduktion

### 3.1 Bakgrund

Dagens utbredda användning av fossila råvaror i kemisk industri bidrar i stor utsträckning till försämring av mark-, vatten- och luftmiljö i form av exempelvis smältande glaciärer, surare hav, ökande temperatur och sämre luftkvalitet. Detta sker främst genom utvinning av fossila råvaror och förbränning av fossilbaserade produkter, samt felaktig avfallshantering och oavsiktliga utsläpp till naturen.<sup>1,2</sup>

Jorden tillhandahåller även en begränsad mängd fossila råvaror, då de bildas under mycket lång tid, vid högt tryck och hög temperatur. Idag konsumeras dock en större mängd resurser än vad jorden förmår nyproducera. Det är därför troligt att de fossila råvarorna kommer bli mer svårtillgängliga och så småningom även ta slut.<sup>3</sup>

En lösning på detta problem, och ett steg på vägen till en bättre miljö, kan vara att ersätta de fossila råvarorna med förnyelsebara råvaror. De förnyelsebara råvarorna kan nybildas under överskådlig tid och det blir lättare att inte överanvända jordens resurser. Exempel på denna typ av råvara är bioråvaran ved, som innehåller cellulosa, hemicellulosa och lignin. Lignin, se figur 3.1, är idag en restprodukt från massaindustrin<sup>4,5</sup> och är därför extra intressant att försöka använda som råvara vid tillverkning av produkter då det redan finns tillgängligt.

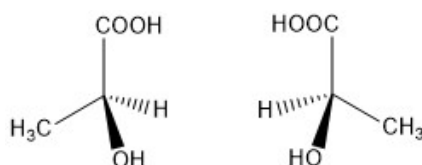


Figur 3.1: Del av lignins struktur, med aromatiska kolväten.

Eftersom lignin innehåller många strukturella element i form av aromatiska kolväten finns det många potentiella substrat som kan vidareutvecklas och bli värdefulla inom finkemin. Utveckling och förädling av aromatenheterna kan ske med biotransformation och organiska synteser, under förutsättning att ligninet kan brytas ned till önskade molekyler, för att erhålla kirala och mer komplexa molekyler. Flera forskningsprojekt visar på att det finns stora mängder lignin som kan utvinnas samt att det finns goda möjligheter att med lignin som råvara, skapa högvärdeskemikalier,<sup>6-8</sup> som bland annat kolfiber och läkemedel. I en demonstrationsanläggning har det exempelvis producerats 8000-10000 ton lignin årligen.<sup>8</sup> Forskning visar dock också på att lignin är en råvara som är svår att förädla vilket är problematiskt,<sup>7</sup> men också en intressant utmaning för forskningen.

## 3.2 Syfte

Det primära syftet med detta projekt är att skapa kirala molekyler utifrån aromatenheter som potentiellt kan erhållas från lignin. En kiral molekyl har ingen symmetrilinje och är därför inte identisk med sin spegelbild. Detta kan medföra skillnad i biologisk aktivitet, som kan vara av intresse vid exempelvis läkemedelstillverkning. I figur 3.2 visas ett exempel på en kiral molekyl.



Figur 3.2: De två enantiomererna av mjölksyra, en kiral molekyl.

Målet är att de kirala molekylerna ska kunna tjäna som byggblock i biobaserade produkter. Projektet är ett delsteg i en stor process där aromatenheter från lignin används som råvara för att erhålla enklare aromatiska molekyler, som successivt förädlas till allt mer avancerade kirala molekyler genom biotransformation och organisk syntes. Förhoppningen är att molekylerna, i kommande studier, ska kunna utvecklas ytterligare och användas för att ersätta de molekyler som i dagsläget erhålls från fossila råvaror.

## 3.3 Metod

I detta projekt har biotransformation och organisk syntes använts för att förädla olika startmaterial i form av aromatenheter. Vidare har också tunnskiktskromatografi (TLC), kärnmagnetisk resonans (NMR) samt IR-spektroskopi använts för analys av eventuella produkter, samt flashkolonnkromatografi för att rena produkten från kvarvarande startmaterial och biprodukter. Se kapitel 2 och 1 för beskrivning av analysmetoder samt förkortningar. Genomförda riskbedömningar återfinns i kapitel B. Bilder innehållande molekylstrukturer och reaktionsscheman har ritats i programmet ChemDraw och analys av NMR-spektrum har genomförts i programmet MestReNova.



## 3.4 Frågeställningar

Den huvudsakliga frågeställning som studien anser undersöka är om det finns potential för att skapa kirala, aromatiska molekyler genom biotransformation och organisk syntes med lignin som råvara. Om detta är möjligt, kan då dessa molekyler vara av intresse att vidareutveckla till material, läkemedel och andra högvärdeskemikalier?

# 4

## Teori

### 4.1 Ett hållbart samhälle

Människor i dagens samhälle har idag en ohållbar livsstil, mycket på grund av den utbredda användningen av fossila råvaror. För att försöka uppnå en mer hållbar livsstil har ett antal globala mål antagits av FN. Förhoppningen med målen är bland annat att erhålla en biobaserad ekonomi samt ett samhälle där människor lever hållbart och inte överanvänder jordens resurser.<sup>9</sup> I nuläget är det därför av intresse att byta ut de fossila råvarorna mot förnyelsebara råvaror. Biotransformation och organiska synteser används idag för att tillverka olika produkter, men det pågår mycket forskning för att ta fram nya metoder och syntesvägar så att fler och nya produkter kan tillverkas med förnyelsebara bioråvaror som startmaterial. Forskningen som pågår är därför av stor vikt för att kunna byta ut fossila råvaror i kemisk industri. Det norska företaget Borregaard har idag en produktion av ligninbaserade produkter som bland annat vanillin och bioetanol.<sup>10,11</sup> Det som har studerats i detta projekt är fortfarande på ett forskningsstadium.

#### 4.1.1 Globala mål

Den 25 september 2015 antogs 17 globala mål med 169 delmål på ett FN-toppmöte.<sup>9</sup> Målen omfattar exempelvis jämlikhet, utbildning, ekonomisk tillväxt, miljövård och minskad klimatpåverkan från människor. Bland annat ska vattenkvaliteten förbättras och alla människor ska ha tillgång till ren energi för ett överkomligt pris, samtidigt som energianvändningen ska bli mer effektiv. Städer ska bli mer hållbara med avseende på miljöpåverkan, resursanvändning och tillgänglighet.

Det finns även ett mål med fokus på hållbara produktions- och konsumtionsmönster. Inom detta mål finns det delmål som rör halvering av matsvinn, ansvarsfull användning av naturresurser, kemikalier och avfall samt vetenskapligt och tekniskt stöd till utvecklingsländer för att uppnå målet i fråga.<sup>12</sup>

Det finns många viktiga naturresurser som människan är beroende av. Idag konsumeras dock en större mängd resurser än vad jorden förmår nyproducera, vilket inte kan kallas ansvarsfull användning av naturresurser. Av denna enkla anledning måste samhället bli mer hållbart, och användningen av naturresurser måste ske mer ansvarsfullt än idag.<sup>12,13</sup>

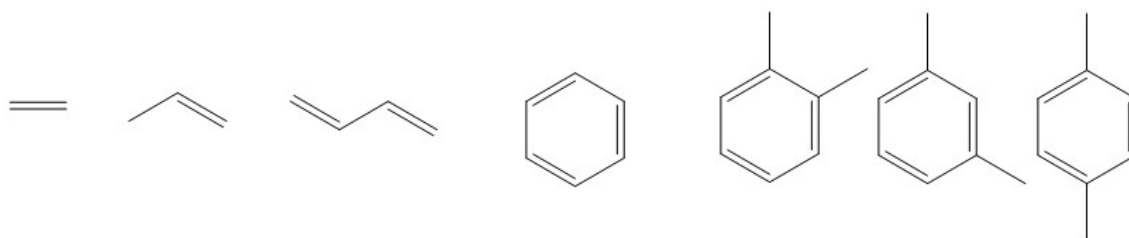
Ett byte av fossila råvaror till förnyelsebara råvaror skulle kunna bidra till en del av lösningen

att uppnå en del av de globala målen. Förnyelsebara råvaror kan exempelvis leda till ett mer hållbart produktions- och konsumtionsmönster om användningen anpassas till den takt råvarorna bildas.

### 4.1.2 Fossila råvaror

Fossila råvaror är ett samlingsnamn för råvaror som inte är förnyelsebara under överskådlig tid. De är organiska rester som bildats under mycket högt tryck, hög temperatur och lång tid. Några exempel på fossila råvaror är olja, naturgas och kol.<sup>3</sup>

Det finns många viktiga produkter som kan skapas utifrån fossila råvaror; allt från petrokemikalier, som plast och läkemedel kan tillverkas ifrån, till energialstrande produkter som bränsle och värmeolja. Enligt Keim finns det främst fem byggstenar från råolja och naturgas som är viktiga vid tillverkning av produkter utifrån petrokemikalier; etylen, propylen, C<sub>4</sub>-derivat, bensen och xylen, se figur 4.1.<sup>1</sup>



**Figur 4.1:** Från vänster till höger: etylen, propylen, butadien, bensen, samt orto-, meta- och para-xylen.

Forskning har visat att fossila råvaror påverkar både människa, djur och miljö negativt. Denna negativa påverkan sker vid såväl utvinning och användning som vid avfallshantering.<sup>1,2</sup> Då fossila råvaror bildas under en mycket lång tid, är tillgången till dem också begränsad. Av dessa anledningar är det av intresse att ersätta de fossila råvarorna med förnyelsebara alternativ och samtidigt även utveckla alternativa molekyler med mindre miljö- och hälsopåverkan.

### 4.1.3 Bioråvaror

Bioråvaror innefattar de råvaror som är förnyelsebara under överskådlig tid. Exempel på bioråvaror är ved, halm och matavfall. Dessa kan användas vid tillverkning av material som kolfiber och plast, kemikalier och bränslen i form av exempelvis biodiesel.<sup>14</sup>

Förbränning av bioprodukter är, liksom fossila råvaror, inte helt fritt från luftföroreningar som exempelvis NO<sub>x</sub> och SO<sub>x</sub>. Mängden luftföroreningar vid förbränning av bioråvaror är däremot mindre än vid förbränning av exempelvis kol, samtidigt som mängden bildade luftföroreningar kan kontrolleras genom styrning av förbränningsbetingelserna.<sup>15</sup>

Viktiga kriterier för användning av bioråvaror är att det ska vara billigt, ha minimal miljöpåverkan i tillverkningsprocessen och vara lättillgängligt. Tillgången till olika bioråvaror är det som främst begränsar användningen av dem i industriell skala. Alla länder har inte samma tillgång då det geografiska läget påverkar vad som växer på platsen.

Det skulle potentiellt kunna leda till överexploatering av mark och skog hos mindre ansvarstagande länder som inte miljökompenserar genom till exempel återplantering av träd.<sup>16</sup> Om önskade råvaror inte växer naturligt på en plats kan de ofta odlas, men kan då konkurrera med den vegetabiliska matproduktionen.

En viktig bioråvara inom svensk industri och som inte konkurrerar i någon större utsträckning med matproduktion är ved, som lignin, cellulosa och hemicellulosa kan utvinnas från. Dessa råvaror kan potentiellt användas som byggstenar inom svensk plast-, kemikalie- och läkemedelsindustri.<sup>17</sup> Omställningen från fossila till förnyelsebara, biobaserade råvaror kommer pågå långt in i framtiden och det talas idag om att samhället bör övergå till något som kallas biobaserad ekonomi.

#### 4.1.4 Biobaserad ekonomi

Biobaserad ekonomi, även kallad bioekonomi, har ingen exakt definition utan bygger mer på en förståelse om vad som eftersträvas.<sup>18</sup> Enligt Lewandowski *et al.* har biobaserad ekonomi ett bredare syfte än de traditionella vägarna:

*“För det första måste det leda till en innovativ och hållbar användning av jordens begränsade resurser. För det andra måste den ge riktlinjer för samhällsövergången till hållbar utveckling.”*<sup>18</sup>

Detta kan eventuellt uppnås genom tvärvetenskapliga samarbeten som innebär att hänsyn har tagits till flera olika perspektiv för att erhålla en helhetsbild.<sup>18</sup>

##### 4.1.4.1 Fördelar, nackdelar samt utmaningar

Det finns flera fördelar med en biobaserad ekonomi, där den största är att en cirkulär och hållbar ekonomi bidrar till ett förnyelsebart samhälle där produkter kan återvinnas och kretsloppet sluts.<sup>18</sup>

Mer konkreta fördelar är enligt Mussatto att det är stor sannolikhet att nya jobb och industrier skapas. Detta kan då skapa helt nya möjligheter när det kommer till entreprenörskap och tekniska innovationer.<sup>19</sup>

En av svårigheterna med bioekonomi är, enligt Lewandowski, att skapa medvetenhet och ge kunskap om hur till exempel olika produkter påverkar samhället.<sup>18</sup> En annan, mer övergripande svårighet är det som Sillanpää och Ncibi nämner i en artikel från 2017:

*“Den stora och övergripande utmaningen med bioekonomi är att säkerställa ekonomisk tillväxt genom användning av förnyelsebara resurser utan att skada miljön och svara till de globala problemen med energi och livsmedels säkerhet, klimatförändring, fattigdom, samt den ständigt växande bristen på tillgång till rent vatten och åkermark.”*<sup>20</sup>

Mussatto, i sin tur, anser att en stor utmaning med att övergå till biobaserad ekonomi är den teknologiska aspekten. Det innefattar att vidareutveckla, effektivisera, avancera och öka hållbarheten för processerna. Det som främst begränsar denna utveckling är förbehandlingen av biomassa. Exempel på en förbehandling är förädling av lignin genom att bryta ner det i aromatenheter.<sup>19</sup>

För att kunna skapa molekyler baserade på biomassa istället för exempelvis råolja behöver nya metoder utvecklas alternativt att redan existerande metoder modifieras. De biobaserade molekylerna bör ha samma funktion som de fossilbaserade alternativen för att enkelt kunna ersätta dem i reaktioner där fossilbaserade molekyler används idag. Detta byte gör att biobaserade molekyler kan användas vid tillverkning av produkter som därmed kan konkurrera med dagens fossilbaserade industri.

Som både Lewandowski, Mussatto samt Sillanpää och Ncibi berör,<sup>18-20</sup> kommer det krävas mycket hårt arbete och många engagerade människor för att lyckas övergå till en biobaserad ekonomi i hela världen.

#### 4.1.5 Grön kemi

Under 70-talet ansåg allmänheten att den kemiska industrin var förorenande och miljöförstörande. Synen på den kemiska industrin under den tiden präglades av skandaler och olyckor som framträdde i form av övergödning, skumbildning i floder och spår av persistenta kemikalier i naturen. Allt detta, tillsammans med en definition av hållbar utveckling i FN-kommissionen 1987, ledde till att EPA (US Environmental Protection Agency) under tidigt 90-tal definierade begreppet grön kemi.<sup>21</sup>

Grön kemi handlar om att konstruera produkter och processer som minimerar användning av farliga kemikalier. Dessutom handlar det om att förhindra uppkomst av farliga ämnen efter en reaktion. Begreppet grön kemi innefattar tolv principer som har som syfte att fungera som riktlinjer vid design av nya produkter och processer.<sup>22</sup>

Principerna behandlar bland annat optimerande av atomekonomi, förnyelsebara råvaror, undvikande av derivat, katalyserade reaktioner samt nedbrytbara produkter.<sup>22</sup> I denna studie är alla de tolv principerna av intresse och bör tas i beaktning vid fortsatt forskning av olika reaktioner.

## 4.2 Biotransformation

För att kemiska reaktioner ska ske på kortare tid än de skulle göra naturligt används ofta katalysatorer. Katalysatorer förbrukas inte under reaktionens gång, utan sänker aktiveringsenergin för reaktionen i fråga, genom att låta substrat binda till katalysatormolekylens aktiva säte. I ungefär 80-90% av alla kemiska processer används en katalysator. En typ av katalysatorer som används flitigt är enzymer, både i uppenad form och kontinuerligt producerade av levande celler.<sup>23</sup>

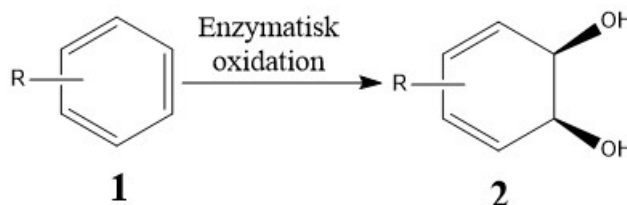
Enzymer är proteiner som katalyserar en reaktion från ett substrat till en produkt.<sup>24</sup> När en levande organism används för att genomföra en syntes i organisk kemi, via enzymer, kallas det för biotransformation. Begreppet biotransformation kan ibland likställas med det mer övergripande ordet metabolism. Dock brukar biotransformation syfta på metabolism av ämnen som inte tjänar som näringsämnen, exempelvis aromatiska kolväten eller läkemedel.<sup>25</sup>

Det finns många fördelar med att använda biotransformationer för att genomföra organiska reaktioner, då enzym kan fungera som katalysatorer. Till exempel har de flesta enzymer högst aktivitet vid relativt milda förhållanden då temperaturen ligger mellan 20-40°C och pH mellan 5-8. De milda reaktionsförhållandena gör också att enzymer som katalysatorer är mer miljövänliga än många metallkatalysatorer, samtidigt som de dessutom är biologiskt nedbryttningsbara.<sup>25</sup> Enzymer kan dock vara mycket känsliga för förändringar i temperatur och pH. Det är därför viktigt att kunna kontrollera dessa parametrar.

Den mest uppenbara fördelen med att använda enzymkatalysatorer är deras effektivitet, då reaktionshastigheten ofta är  $10^8$ - $10^{10}$  gånger högre än hastigheten för den okatalyserade reaktionen. Andra fördelar är också att enzymerna kan katalysera många olika reaktioner, och skadliga intermediärer kan undvikas då olika enzymer samverkar och flera reaktioner kan genomföras i följd.<sup>23</sup>

Det finns också vissa begränsningar när det kommer till enzymer som katalysatorer i organisk syntes. Till exempel kan vissa enzym vara mycket substratspecifika, och binder då enbart till enstaka substrat. Som tidigare nämnt är enzymer dessutom känsliga för temperatur- och pH-förändringar.

En av de reaktioner som kan göras via en biotransformation är dearomatisering genom enzymatisk oxidation, se figur 4.2. En koldubbelbindning bryts då och de båda kolen binder istället till var sin hydroxigrupp. Substans 2, som skapas från 1 i en sådan reaktion, har enligt Lewis och andra visat sig vara ett bra startmaterial för organisk syntes av till exempel läkemedel och naturprodukter.<sup>26</sup>



Figur 4.2: Enzymatisk oxidation

För att göra en biotransformation behövs levande organismer i en behållare med medium som innehåller kolkälla samt nödvändiga mineraler och vitaminer för att organismerna ska överleva. Ett av de viktigaste stegen i att göra en lyckad biotransformation är att sterilisera allting som kommer att komma i kontakt med organismerna. Detta är viktigt för att säkerställa att kulturen inte kontamineras och konkurreras ut av andra organismer.<sup>27</sup>

### 4.3 Kiralitet

När en molekyl inte har en symmetrilinje och därmed inte är identisk med sin spegelbild sägs den vara kiral. En kiral molekyl och dess spegelbild, se figur 3.2, bildar tillsammans två så kallade *enantiomerer*. Om symmetrilinje finns och spegelbilderna är identiska är komplexet istället *akiralt*.<sup>29</sup>

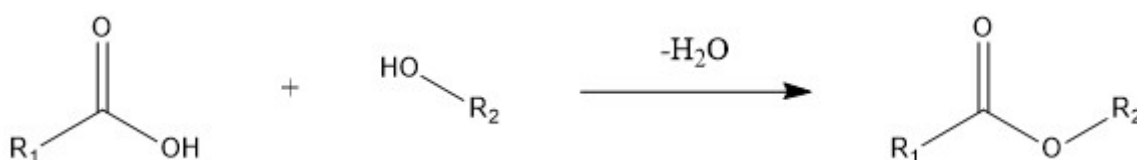
Kirala molekyler är ofta önskvärda eftersom de olika enantiomererna kan ha olika biologiska egenskaper, trots att de har samma fysikaliska egenskaper.<sup>30</sup> De kan också vara extra bra att använda som grund för tillverkning av biofarmaka inom läkemedelsindustrin, eftersom den ena enantiomeren kan ha en helt annan biologisk funktion än den andra.<sup>31</sup> Ena formen kan exempelvis vara överksam eller skadlig medan den andra har en mycket viktig medicinsk effekt.

## 4.4 Organisk syntes

Organisk syntes innebär att en transformation av en organisk molekyl sker. Det kan användas för att förädla en molekyl som erhållits från till exempel en biotransformation. Två intressanta reaktioner som kan användas vid organisk syntes är hydroaminering,<sup>32</sup> samt den som på engelska kallas hydrogen borrowing.<sup>35</sup> Ett svenskt namn på syntesen hydrogen borrowing finns inte, men namnet kan direktöversättas till väteutlåning. Reaktionen har dock i denna rapport definierats med namnet HB och reaktionen hydroaminering har definierats med namnet HA. Båda synteserna kräver metallkatalys, men olika typer av katalysatorer.

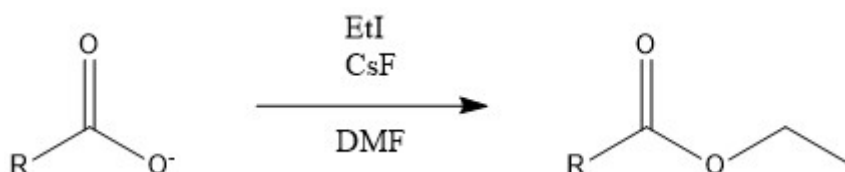
### 4.4.1 Förestring

Förestring är en reaktion som bilda en ester, vilket namnet på reaktionen antyder. Reaktionen förestring kan till exempel ske genom reaktion mellan syra och alkohol, där en vattenmolekyl avspjälkas.<sup>36</sup> Figur 4.3 visar en generell reaktion då en ester bildas.



Figur 4.3: Generell förestring av karboxylsyra och alkohol.

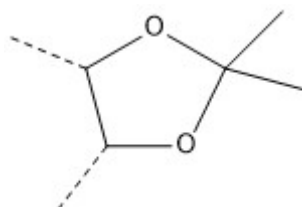
Förestring kan även ske enligt proceduren som beskrivs i en tidigare publicerad artikel av Khan, då både en karboxylsyra och en karboxylatjon går att förestra, se figur 4.4.<sup>37</sup> En ketal kan användas som skyddsgrupp både för en karbonylförening och för en diol.



Figur 4.4: Generell förestring av en karboxylatjon.

### 4.4.2 Ketalbildning

För att påverka selektiviteten hos en molekyl kan en skyddsgrupp introduceras. Det är en funktionell grupp, exempelvis ketal, vars uppgift är att hindra att en reaktion sker på platsen där den introduceras. Selektivitet relateras till den reaktiva delen av molekylstrukturen. En skyddsgrupp som kan vara av intresse inom organisk kemi yttrar sig i form av en acetonid, se figur 4.5.<sup>38</sup>



Figur 4.5: Skyddsgrupp i form av en acetonid.

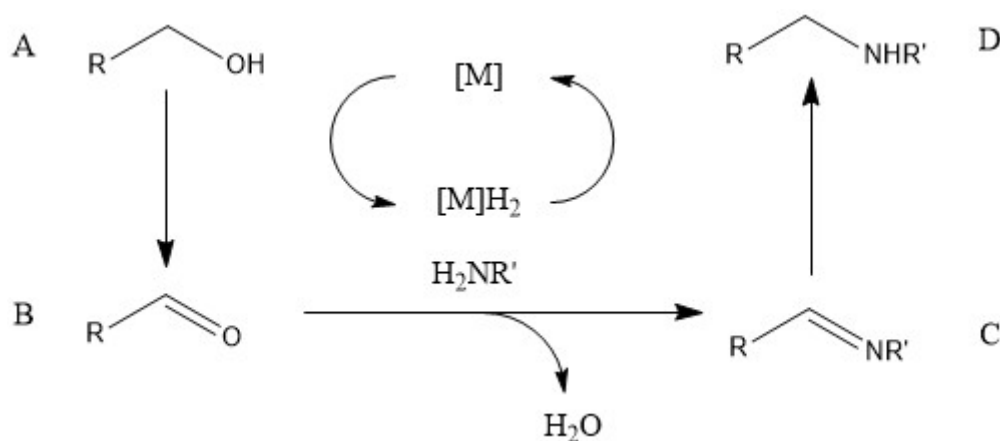
Denna typ av skyddsgrupp, där en ketalgrupp binds in, kan användas för dioler så väl som för karbonylföreningar.

### 4.4.3 Hydrogen borrowing (HB)

Hydrogen borrowing (HB) är en alkylering, katalyserad av övergångsmetaller. En hydroxigrupp samt en primär eller sekundär amingrupp kombineras till en sekundär eller tertiär amingrupp med enbart vatten som biprodukt. Denna reaktion kan räknas som grön kemi då den enda restprodukten som bildas är vatten, vilket gör denna reaktion relativt miljövänlig.

Vanligtvis görs alkylering av aminer med hjälp av alkylhalogenider. Då många alkylhalogenider kan vara giftiga och det finns stor risk för överalkylering är denna process inte optimal. Det är också svårt att göra en alkylering med alkohol som alkyleringsmedel utan katalysator då användning av alkohol som alkyleringsmedel är begränsad. Begränsningen beror på att alkoholer generellt sett är dåliga elektrofiler.<sup>39</sup> Av denna anledning är det önskvärt att genomföra reaktionen på ett mer effektivt och miljövänligt sätt, via exempelvis den så kallade HB-reaktionen, se figur 4.6.





Figur 4.6: Reaktionssteg i en Hydrogen Borrowing-reaktion.

Reaktionen börjar med att hydroxigruppen (A) omvandlas till en aldehydgrupp (B), eftersom aldehydgruppen är mer reaktiv än hydroxigruppen. Därefter reagerar aldehyden med aminen genom att en dubbelbindning bildas mellan kvävet och aldehyden. Samtidigt binder den kvarvarande syreatomen till två väten och bildar vatten som biprodukt. Aldehyden och aminen blir då en imin (C) som därefter reduceras av katalysatorn till en amin (D) genom att vätet som togs från hydroxigruppen i början återintroduceras,<sup>35,39</sup> därav namnet på reaktionen.

#### 4.4.4 Hydroaminering (HA)

Hydroaminering (HA), se figur 4.7, är en reaktion som sker genom att en amin adderas till en alken eller dien, med hjälp av till exempel en palladium- eller guld-katalysator.<sup>40</sup> Alkenen kan exempelvis vara eten, se figur 4.7. I hydroamineringen är det inte helt säkert vilket kol som aminogruppen placeras på, då flera alternativ är möjliga.



Figur 4.7: Generell hydroaminering med eten som alken.

Dessa relativt dyra metallkatalysatorer används främst för att alternativen är giftiga (kvicksilver) eller känsliga för luft och fukt (zirkonium, titan). Guld-katalysatorer har extremt högt turnoverantal i många reaktioner. Turnoverantal är den mol substrat som en mol katalysator kan konvertera innan den inaktiveras, framförallt för additionsreaktioner så som hydroaminering. Palladium har likartade egenskaper som guld i sin roll som katalysator för hydroaminering. Som katalysator har palladium nämligen ett högt turnoverantal. Dessutom tål både guld och palladium korrosiva förhållanden. Inom hydroaminering används palladium främst för att skapa intramolekylära bindningar mellan kolatomer medan guld i synnerhet används för att skapa intermolekylära bindningar. I hydroamineringsreaktioner förekommer guld och palladium ofta tillsammans med andra metaller för att få högre katalytisk verkan.<sup>40</sup>

# 5

## Metod

Projektet har främst baserats på laborativt arbete för att försöka erhålla olika kirala molekyler efter biotransformation och förädling genom organisk syntes. Biotransformation och organisk syntes skedde parallellt. Innan experiment genomfördes gjordes riskbedömningar för respektive reaktion, se kapitel B.

### 5.1 Laborationer

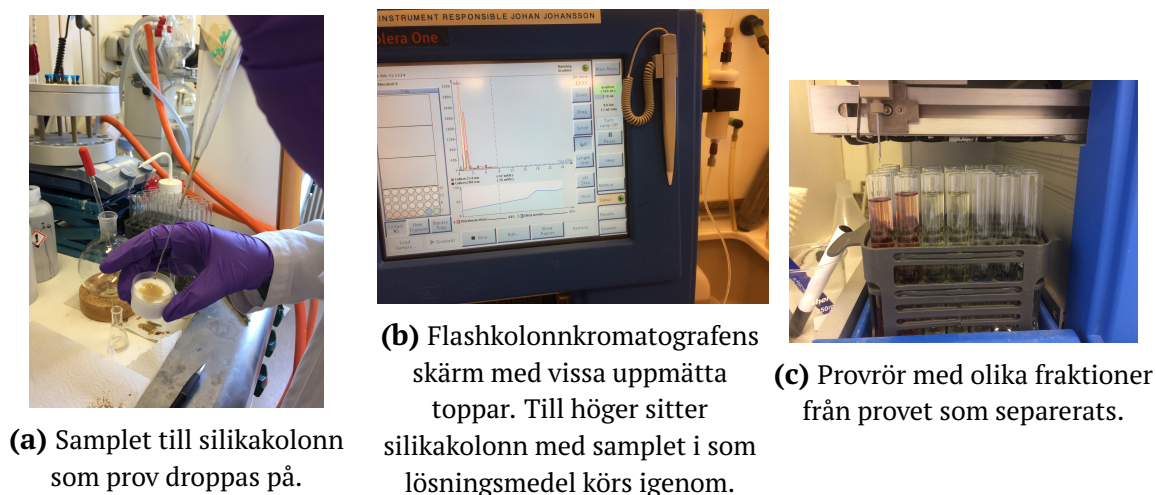
De två huvuddelarna av laborationerna som utfördes var biotransformation samt förädling, via organisk syntes, av de produkter som bildades under biotransformationen. Information om hur varje specifikt experiment har genomförts samt vilka mängder som användes återfinns i kapitel A.

Efter varje genomförd organisk reaktion analyserades resultatet, se kapitel A. Som en första analys, för att se om någon produkt bildats, utfördes tunnskikt-kromatografi (TLC). TLC är en typ av vätskekromatografi där provet med organiska föreningar droppas på en TLC-platta med kiselgel ( $\text{SiO}_2$ ), som utgör den stationära fasen. Den mobila fasen utgörs av ett lösningsmedel och när den vandrar längs den stationära fasen följer proverna med. Provdropparna separeras då med avseende på polaritet genom att de binder olika hårt till den stationära fasen (TLC-plattan). Efter separation av provet doppas TLC-plattan i kaliumpermanganat och torkas därefter. Ett exempel på ett resultat av ett TLC-prov visas i figur 5.1.



**Figur 5.1:** Ett exempel på hur ett TLC-prov kan se ut.

Därefter separerades den önskade produkten från biprodukter och resterande startmaterial med hjälp av flashkolonnkromatografi. Flashkolonnkromatografi användes om reaktion hade skett. Då överfördes provet till en samplet, se figur 5.2a. Samplet placerades i en silikakolonn, se figur 5.2b, och därefter får lösningsmedel flöda genom kolonnen för att separera provet i olika fraktioner, se figur 5.2c. Efter genomförd flashkolonnkromatografi utfördes TLC på de olika fraktionerna som erhöles, för att jämföra det med den första TLC-analys som gjorts. På så sätt kunde det avgöras i vilken eller vilka fraktioner den önskade produkten hamnat.



**Figur 5.2:** Olika delsteg som genomförs vid analys och separation av prov med flashkolonnkromatografi.

Produkterna som erhållits har även analyserats med kärnmagnetisk resonans (NMR), både med  $^1\text{H}$  och  $^{13}\text{C}$  NMR, samt IR-spektroskopi. NMR är en metod som kan användas för att ta reda på strukturen och kopplingen mellan atomer hos en molekyl. Med IR-spektroskopi bestämdes det även vilka funktionella grupper produkterna innehöll för att stärka de tidigare analyserna ytterligare.

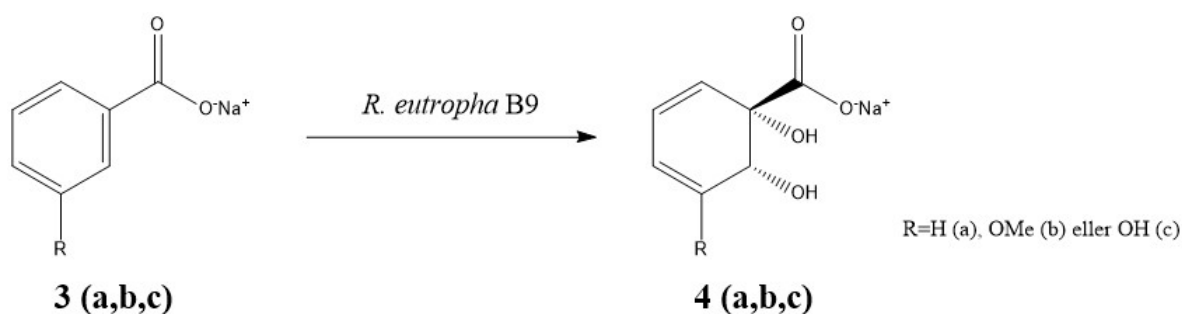
### 5.1.1 Biotransformation

Den organism som användes i dessa laborationer var *Ralstonia eutropha* av stammen B9. Innan inducering av enzymproduktion gjordes en förkultur för att öka bakteriekoncentrationen. Detta gjordes genom att skapa en ideal tillväxtmiljö för bakterierna. I fallet med *R. eutropha* odlades dessa i en E-kolv med steriliserat Hutner's Mineral Base-medium (HMB-medium) och dinatriumsuccinat hexahydrat (DSH) som kolkälla. Förkulturen inkuberades i cirka två dygn innan batchodling startades. Figur 5.3 visar hur uppställningen för batchodling såg ut.



**Figur 5.3:** Uppställning av den provisoriska bioreaktor som användes för biotransformation.

Efter två dygn tillsattes mer steriliserat HMB-medium, D-fruktos som kolkälla samt substrat i form av **3**, som också inducerade enzymproduktionen.<sup>41</sup> I laborationerna användes salt istället för syra då salt löser sig bättre i vatten.<sup>41</sup> En tid efter inducering tillfördes mer substrat och D-fruktos kontinuerligt via sprutpumpar. Den erhållna produkten var **4**, se figur 5.4.



**Figur 5.4:** Biotransformation med *R. eutropha*.

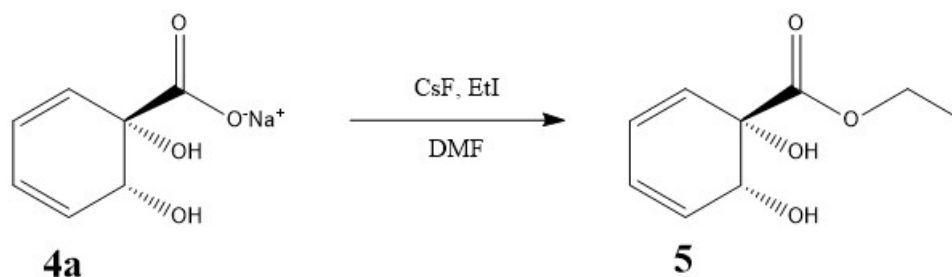
Innehållet i E-kolven centrifugerades sedan för att separera vätskan från cellerna. Centrifugering innebär att provet utsätts för en centrifugalkraft, genom rotation kring en axel. Denna kraft kan liknas vid ökad gravitation och bidrar till att separera faser i en lösning. De partiklar som har högre densitet än lösningsmedlet sedimenterar i botten på kärlet som centrifugeras. Vätskan som erhålls efter centrifugeringen kallas supernatant.

## 5.1.2 Organisk syntes

I följande avsnitt beskrivs de organiska synteserna som genomfördes, nämligen förestring, ketalbildning, hydrogen borrowing (HB) samt hydroaminering (HA).

### 5.1.2.1 Förestring

Efter att natriumbensoat biotransformerats förestrades **4a**, se figur 5.5. Förestringen utfördes enligt en tidigare publicerad artikel.<sup>37</sup>

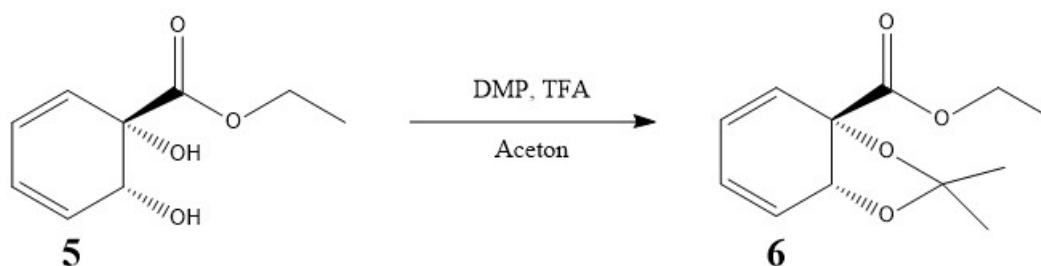


Figur 5.5: Förestring av **4a** från biotransformation.

För att förestra produkten reagerades den med etyljodid i närvaro av cesiumfluorid och dimetylformamid (DMF) som lösningsmedel. Denna reaktion skedde i rumstemperatur då etyljodid gör en alkylering av karboxylsyra under relativt milda förhållanden.<sup>42</sup>

### 5.1.2.2 Ketalbildning

En skyddsgrupp introducerades på **5** inför den andra hydroamineringen, se figur 5.6, med syfte att förhindra oönskade bireaktioner. Acetoniden bildades efter att hydroxigrupperna på **5** reagerade med dimetoxypropan (DMP), se figur 5.6.

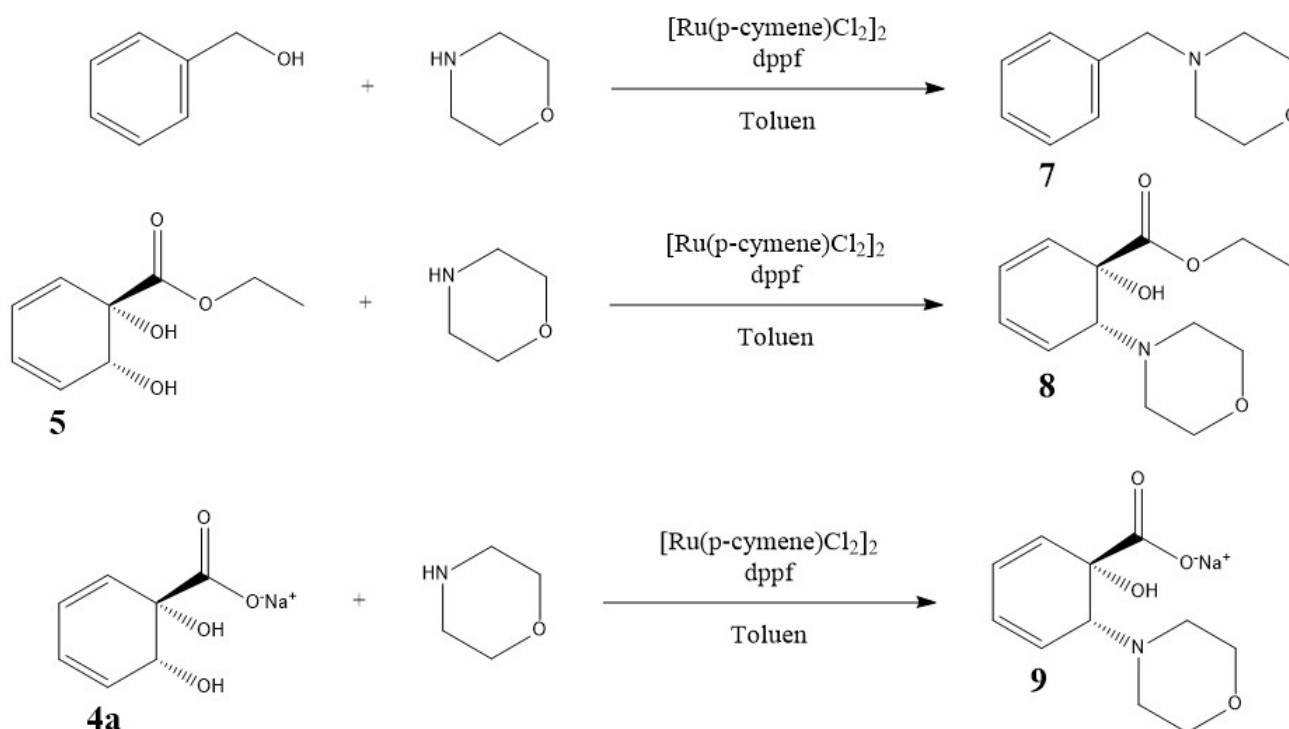


Figur 5.6: Ketalbildning av **5**.

För att skydda hydroxigrupperna på **5** användes DMP, kokatalysatorn trifluorättiksyra (TFA) samt aceton som fick reagera under två timmar i ett kärl nedsänkt i ett isbad. Isbad användes eftersom reaktionen bör ske vid 0°C.<sup>28</sup>

### 5.1.2.3 Hydrogen Borrowing (HB)

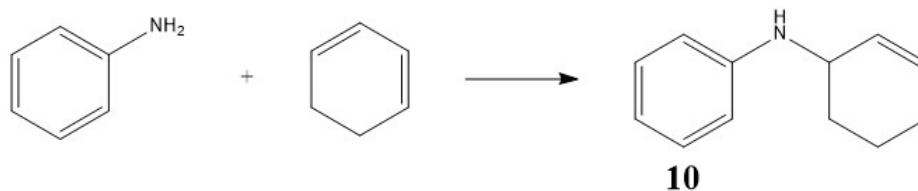
Hydrogen borrowing (HB) utfördes enligt en tidigare publicerad metod.<sup>39</sup> Tre olika substrat testades i tre separata reaktioner; bensylalkohol som använts i den tidigare publicerade artikeln samt **5** respektive **4a** från biotransformationen av **3a**. Dessa reagerades med aminen morfolin, se figur 5.7, i närvaro av en liten mängd  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  som katalysatorprekursor samt katalysatorliganden 1,1'-bis(difenylfosfin)ferrocen (dppf). De två sistnämnda bildar tillsammans katalysatorkomplexet som katalyserar reaktionen. Lösningemedlet som användes var toluen.<sup>39</sup> Reaktionen med **5** utfördes med olika reaktionsförhållanden. De reaktionsförhållanden som varierades var reaktionstid samt temperatur.



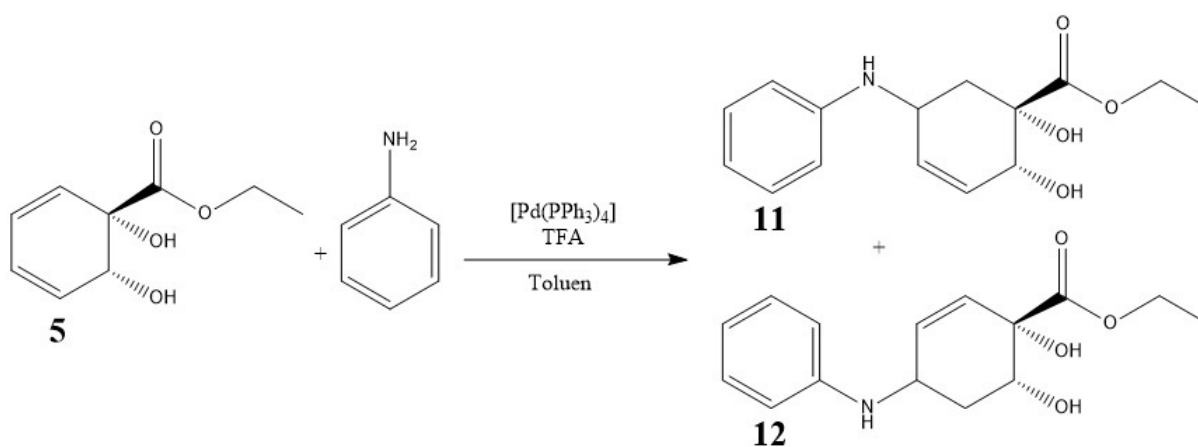
**Figur 5.7:** Önskat resultat av HB-reaktionerna. Överst i bilden visas testreaktionen av HB med bensylalkohol som startmaterial, i mitten visas HB-reaktionen med **5** och underst visas HB-reaktionen med **4a**.

### 5.1.2.4 Hydroaminering (HA)

Hydroamineringen utfördes utifrån en tidigare publicerad artikel av Löber *et al.*<sup>32</sup> Två reaktioner utfördes, den ena med 1,3-cyklohexadien som substrat, se figur 5.8, och den andra med **5**, se figur 5.9, som erhöles från biotransformationen.

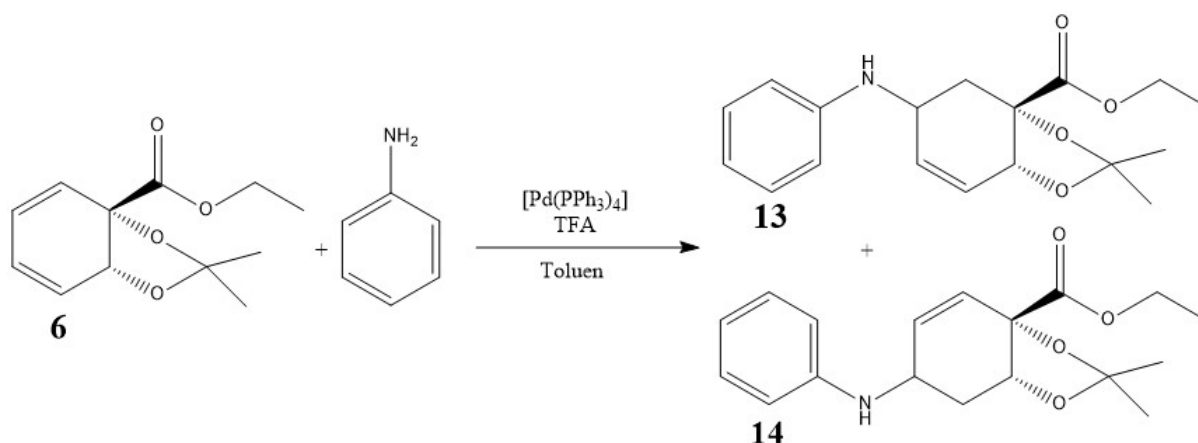


**Figur 5.8:** Reaktionschema för hydroaminering av 1,3-cyklohexadien med anilin.



**Figur 5.9:** Önskat resultat av hydroaminering utan ketalgrupp.

Reaktionen mellan **5** och anilin testades även med en ketalgrupp på. Reaktionen skedde alltså mellan **6** och anilin, se figur 5.10.



**Figur 5.10:** Önskat resultat av hydroaminering med ketalgrupp.

I övrigt genomfördes båda reaktionerna likadant. Substratet reagerade med aminen anilin i närvaro av 10 mol% TFA under 24 timmar, 25°C, med toluen som lösningsmedel samt palladiumkatalysatorn Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.

# 6

## Resultat

I följande avsnitt presenteras resultaten från de olika experimenten. Resultaten innefattar biotransformationen, förestringen, ketalbildningen, hydrogen borrowing (HB) och hydroamineringen (HA). Alla produkter analyserades med  $^1\text{H}$  och  $^{13}\text{C}$  NMR för att bestämma strukturen och sammansättningen av provernas innehåll, se NMR-data i kapitel A och C. Varje experiment har betecknats med bokstav B (biotransformation), F (förestring), K (ketalbildning), HB (hydrogen borrowing) och HA (hydroaminering) för respektive reaktion samt en siffra för vilket experiment det motsvarade.

### 6.1 Biotransformation

Alla förkulturer av *R. eutropha* B9 gav ett positivt resultat i form av celltillväxt, vilket kunde ses genom att vätskan i E-kolvarna gått från klar till grumlig under inkuberingen. I tabell 6.1 redovisas resultat för respektive biotransformation med olika substrat.

Analys av  $^1\text{H}$  NMR på supernatanten från biotransformation 1 med **3a** som substrat, se figur 5.1.1, visade ett svagt prov och indikerade att en diol skapats, vilket var det som önskades. Efter rening av produkt visade ett nytt  $^1\text{H}$  NMR att **4a** hade skapats. Det var enbart vätena på kolringen som gav toppar då vätena på hydroxigrupperna inte syns på grund av lösningsmedlet  $\text{D}_2\text{O}$ . En orenhet bestående av isopropanol<sup>33</sup> gick att urskilja vid cirka 1 ppm. Vid analys av **4a** jämfördes NMR-spektrumet med data från Fischer *et al.*<sup>34</sup> och dessa stämde väl överens, se avsnitt A.1.1. Detta visar att den första och andra biotransformationen, B1 och B2, resulterade i lyckade reaktioner, medan B3 och B4 inte gav någon produkt alls.

I den sista biotransformationen, B5, metaboliserades substratet helt. I den fortsatta organiska syntesen användes därför endast produkten från B1 som substrat. De två biotransformationerna med **3a** som substrat var lyckade. Från biotransformation 1 bildades 7.96 g av **4a**. Utbytet för B1 blev över 100%, troligtvis på grund av kvarvarande medium samt eventuella biprodukter. Utbytet för B2 beräknades aldrig eftersom endast inducering skulle uppnås, och ingen renframställning av produkt. Bindestrecken i de följande tabellerna betecknar att inget utbyte kunde beräknas då försöket inte gav någon önskad produkt.



**Tabell 6.1:** Använda substrat, resultat samt beräknade utbyten för de olika biotransformationerna.

Försök	Substrat	Resultat	Utbyte [%]
B1	<b>3a</b>	Önskad produkt	106
B2	<b>3a</b>	Lyckad inducering av enzymproduktion	Ej bestämt
B3	<b>3b</b>	Ingen reaktion	-
B4	<b>3b</b>	Ingen reaktion	-
B5	<b>3c</b>	Helt metaboliserad	-

## 6.2 Förestring

Efter extraktion av produkten, se figur 5.5, gjordes ett  $^1\text{H}$  NMR som visade att produkten behövde ytterligare rening och därmed utfördes flashkromatografi.  $^1\text{H}$  NMR efter flashkromatografen visade att **5** erhölet. Produkten som bildades i första biotransformationen gjordes därmed om från **4a** till **5** med lyckat resultat. För NMR-data se avsnitt A.1.2. Utbytet för denna reaktion var 40% och i tabell 6.2 redovisas reaktionsförhållanden samt resultat.

**Tabell 6.2:** Substrat, reaktionsförhållande samt beräknat utbyte för förestringen.

Försök	Substrat	Mängd substrat [mmol]	Temperatur [°C]	Tid [h]	Utbyte [%]
F1	<b>4a</b>	6.6	25	20	40

## 6.3 Ketalbildning

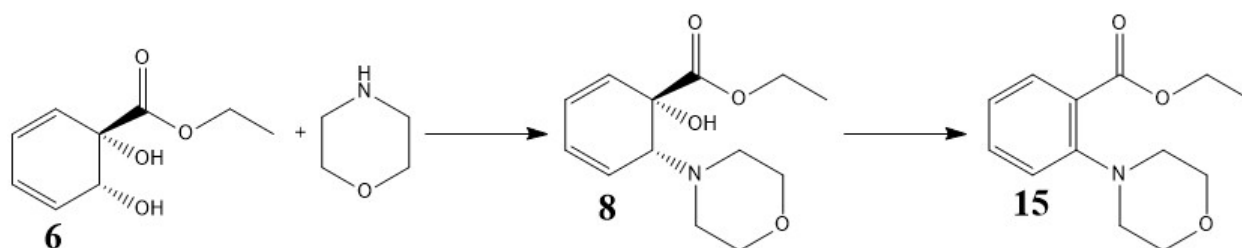
Ketalbildningen var även den lyckad och den eftersökta skyddsgruppen bildades som i figur 5.6. I tabell 6.3 följer reaktionsmängder och utbyte för bildning av molekyl **6**. För NMR-data, se A.1.3.

**Tabell 6.3:** Substrat, reaktionsförhållande samt beräknat utbyte för ketalbildningen.

Reaktion	Substrat	Mängd substrat [mmol]	Temperatur [°C]	Tid [h]	Utbyte [%]
K1	<b>5</b>	2	0	2	44

## 6.4 Hydrogen borrowing (HB)

HB-reaktionerna som genomfördes, se figur 5.7, samt resultaten av dessa återfinns i tabell 6.4. För NMR-data, se avsnitt A.1.4. Efter flashkromatografi av försök HB1a gjordes  $^1\text{H}$  NMR på fraktionerna 8-11 samt 17-23 som erhöles, för att bestämma vilken som innehöll den önskade produkten. Analysen av NMR visade att det var fraktionerna 8-11 som var intressanta och fraktionerna 17-23 innehöll oreagerad **5**. Den förväntade produkten, **8**, erhöles inte. Produkten som skapades var istället **15** och detta gick att urskilja i NMR då ett väte från aromatringen har försvunnit. HB1a, som reagerades under 24 timmar, gav därför enligt analys en rearomatiserad produkt utan hydroxigrupp, se figur 6.1.



**Figur 6.1:** Reaktionsschema med rearomatiserad produkt längst till höger.

HB1b, med **4a** som startmaterial, gav ingen produkt. HB2, som kördes i tolv timmar, gav okänd produkt vars struktur inte har kunnat fastställas. HB3 gav en eller fler okända produkter.

**Tabell 6.4:** Använda substrat, reaktionsförhållanden samt beräknade utbyten för de olika HB-reaktionerna.

Reaktion	Substrat	Mängd substrat [mmol]	Temperatur [°C]	Tid [h]	Utbyte [%]
HB - Test	Bensylalkohol	1	120	24	58
HB1a	<b>5</b>	0.5	120	24	Rearomatiserad
HB1b	<b>4a</b>	0.5	120	24	-
HB2	<b>5</b>	0.5	120	12	-
HB3	<b>5</b>	0.5	120	6	-
HB4	<b>5</b>	0.5	100	12	-

## 6.5 Hydroaminering (HA)

Resultaten av hydroamineringarna som genomfördes finns sammanställda i tabell 6.5. Inga av dessa reaktioner gav någon produkt.

**Tabell 6.5:** Använda substrat, reaktionsförhållanden samt beräknade utbyten för de olika hydroamineringarna.

Reaktion	Substrat	Mängd substrat [mmol]	Temperatur [°C]	Tid [h]	Utbyte [%]
HA1 - Test	1,3-cyklohexadien	0.5	25	24	-
HA2	5	0.5	25	24	-
HA3 - Test	1,3-cyklohexadien	2	25	24	-
HA4	5	1.54	25	24	-

# 7

## Diskussion

### 7.1 Diskussion av metod och resultat

Nedan följer resonemang kring resultat och metoder som använts vid biotransformationen och de organiska synteserna, samt vad som kan vara intressant för vidare forskning.

#### 7.1.1 Biotransformation

Första försöket att biotransformera **3a** utgick från en tidigare publicerad artikel.<sup>45</sup> Resultatet blev som förväntat då **4a** bildades och därför beslutades det att testa andra substrat utöver **3a**.

Utbytet för första biotransformationen beräknades till 106%, se tabell 6.1. En orsak till detta kan vara bristande upprening av produkten, vilket kan medföra att det finns medium och biprodukter kvar som påverkar beräkning av utbyte.

Två försök med olika metoder, se B3 och B4 i avsnitt A.1.1, genomfördes med **3b** som substrat och inget av dessa försök gav det förväntade resultatet i form av **4b**, då substratet fanns kvar i sin ursprungsform när försöken avslutades. Det första försöket med **3b** utfördes med celler som centrifugerats för att avlägsna **4a** som bildats från **3a**. En trolig anledning till att denna transformation inte fungerade är att enzymerna som katalyserar reaktionen kan ha hamnat i supernatanten med produkten som avlägsnades. För att verifiera om detta var problemet borde samma process upprepas med **3a** som substrat även efter centrifugering av cellerna. Detta för att undersöka om resultatet beror på avsaknad av enzym, och därmed en bristfällig metod, eller att reaktionen med **3b** helt enkelt inte kan katalyseras av bensoat 1,2-dioxygenas (BZDO).

Det andra försöket med **3b** som substrat utfördes genom inducering av enzymproduktion med **3a** och sedan tillsats av substratet utan att avlägsna produkten som bildats från **3a**. Som nämnt i avsnitt 4.2 kan en begränsning med enzymer vara substratspecificitet. Då inget av försöken med **3b** lyckades kan en orsak vara att enzymet är relativt specifikt för **3a** och därmed inte kan katalysera reaktionen med **3b**. Detta kan bero på att metoxigruppen tar för mycket plats så att molekylens blir för stor för enzymets aktiva säte. En annan orsak, som dock inte är lika trolig, kan vara att **3a** är mer gynnsamt som substrat än **3b** och därför är mer prioriterat för transformation.

Med anledning av den troliga substratspecificiteten gjordes även ett försök, B5, med ett

mindre substrat, **3c**. Inte heller denna reaktion gav det förväntade resultatet i form av **4c**. Däremot visade NMR, se avsnitt A.1.1.5, att allt substrat använts vilket indikerar att det metaboliserats helt. Detta resultat bekräftas även av Leischs masteruppsats.<sup>44</sup> Resultatet är väldigt intressant för vidare forskning, då detsamma inte skedde med den mindre molekyl **3a**.

För biotransformationen användes en luftad E-kolv, placerad i vattenbad, som provisorisk bioreaktor. Substrat och kolkälla tillsattes med hjälp av sprutpumpar, som inte alltid fungerade korrekt, då flödes hastigheten inte kunde regleras exakt. Ett problem med denna utrustning är att det finns begränsade möjligheter att kontrollera miljön för cellerna. Dålig syretillförsel, temperaturförändringar och pH-förändringar kan påverka cellerna negativt. Förändrat pH kan också påverka funktionaliteten hos enzymerna.

För att minimera risken att resultaten påverkas av de faktorer som nämnts ovan bör en riktig bioreaktor användas, där pH, temperatur och syretillförsel kan kontrolleras. Dessutom är det lättare att kontrollera tillförsel av substrat och kolkälla med en bioreaktor, då det ofta finns färdiga system för tillförsel. En bioreaktor skulle också minska risken för kontaminering då den kan hållas försluten efter sterilisering.

Som nämnt i avsnitt 4.2 är sterilisering en viktig del i processen för att de önskade organismerna inte ska konkurreras ut av oönskade organismer. Trots att utrustningen som använts i detta projekt steriliserats finns det risk för kontaminering då den inte är försluten och det inte finns några förslutna ingångar för tillförsel av medium. Kontaminering skulle alltså kunna innebära att de celler som växer i E-kolven inte är *R. eutropha* utan något annat, som troligtvis inte uttrycker det enzym som önskas.

I framtiden skulle det vara intressant att prova fler substrat tillsammans med *R. eutropha*, då de tre olika substraten i detta projekt uppvisat tre olika resultat. Det kan finnas många orsaker till att ett substrat inte kan katalyseras, där storleken bara är en aspekt. En litteraturstudie över enzymets aktivitet och funktion kan användas som utgångspunkt för att förutsäga vilka substrat som eventuellt kan katalyseras av BZDO som uttrycks av *R. eutropha* B9. Många substrat har redan testats och det kan vara av intresse att försöka återupprepa de försök som lyckats. Förslagsvis kan också aromatiska molekyler erhållna från lignin testas, då detta är intressant ur ett hållbarhetsperspektiv, som nämnt i avsnitt 4.1.3.

Olika organismer, till exempel rekombinant *E. coli*, är också av intresse att använda, då inducering av enzymproduktionen kan göras med IPTG via T7/lac-systemet. När enzymproduktionen induceras med **3a** bildas nämligen **4a** och detta kan eventuellt vara svårt att separera från en önskad produkt. Med inducering via T7/lac-systemet bildas förhoppningsvis ingen ytterligare produkt då promotorliganden, IPTG, inte metaboliserar, och antalet steg som behöver genomgå minskar, vilket är önskvärt.

Det skulle dessutom vara av intresse att gå vidare med produkten som erhöles från reaktionen benämnd som B1 i tabell 6.1 då denna reaktion gav lyckat resultat i form av en kiral molekyl. Optisk rotation skulle kunna mätas på produkten för att ta reda på vilken eller vilka enantiomerer produkten innehåller.

Tanken var att även *E. coli* skulle användas i detta projekt. Den stam som levererats var dock inte resistent mot ampicillin, vilket den önskade stammen, JM109, ska vara. Av denna anledning togs beslutet att inte göra några biotransformationsförsök med *E. coli*.

### 7.1.2 Förestring

Förestringen skedde som förväntat, enligt figur 5.5. Detta var viktigt för att kunna genomföra kommande organiska synteser i form av HB-reaktionen och hydroamineringen. Utbytet beräknades till 40%. Högre utbyte borde erhållas med ett annat lösningsmedel än dimetylformamid (DMF), då utbytet, enligt Brinchi, beror av styrkan på vätebindningarna i komplexbildningen mellan cesiumfluoriden och diolen.<sup>45</sup> Starkare vätebindningar bör ge högre utbyte. För att förestringen ska bli effektivare till nästa tillfälle, kan DMF som är ett organiskt lösningsmedel, ersättas med alternativ som kan gynna dessa vätebindningar. Ett tänkbart alternativ skulle exempelvis kunna vara tetrahydrofuran (THF).<sup>45</sup>

Även molförhållandet mellan cesiumfluoriden och diolen kan ha bidragit till det relativt låga utbytet, enligt Brinchi.<sup>45</sup> 9.95 mmol cesiumfluorid och 6.6 mmol av **4a**, som användes vid förestringen, innebär att molförhållandet mellan de två var på knappt 1.5. Tidigare erfarenhet från en artikel publicerad av Brinchi säger att ett molförhållande mindre än två ger betydligt lägre utbyte än normalt.<sup>45</sup> En ökad mängd cesiumfluorid och minskad mängd diol skulle göra förhållandet större och därmed eventuellt öka utbytet.

### 7.1.3 Ketalbildning

Ketalbildningen användes för att påverka vart aminen skulle placera sig på substratet som användes som startmaterial. Reaktionen lyckades och utbytet beräknades till 44%. För att bibehålla mängden substrat för kommande reaktioner är det önskvärt att öka utbytet.

Som tidigare nämnt i avsnitt 4.1.5 beskriver en av de tolv principerna att användande av derivat bör undvikas. I denna studie användes en acetonidgrupp som derivat, se figur 5.6, för att aminen inte skulle binda till ena hydroxigruppen. Det är önskvärt att undvika detta i framtiden och hitta andra sätt att påverka selektiviteten. Ett förslag för framtida forskning är således att försöka genomföra hydroamineringen utan att genomgå ketalbildningen. En möjlighet är kanske att se ifall hydroxigrupperna skulle kunna omvandlas till några andra, mindre reaktiva funktionella grupper så att aminen väljer att placera sig på annan plats än vid kolet med den sekundära alkoholen. Dock erhålls, som följd av detta, kanske inte den funktionalitet som fås då molekylerna innehåller hydroxigrupperna. Det hade varit en fördel att selektivt kunna bestämma vilket kol aminen ska placera sig på utan användning av derivat.

### 7.1.4 Hydrogen Borrowing (HB)

Som start vid HB-syntes av molekyler testades det att återupprepa en HB-reaktion från en tidigare publicerad artikel.<sup>39</sup> Denna HB-reaktion genomfördes som en testreaktion för att

kunna jämföra ifall samma resultat erhöles, samt för att kunna bekräfta att utrustningen i forskningslabbet där studien genomförs fungerar.

Testreaktionen genomfördes enligt avsnitt A.1.5.1 och gav ett lyckat resultat, med 58% i utbyte. Detta påvisar att utrustningen fungerar bra samt att metoden inte har några allvarliga brister.

Till följd av det lyckade resultatet från testreaktionen bestämdes det därför att testa reaktionen på egna substrat (**4a** och **5**) erhållna från den första biotransformationen. Detta visade sig dock inte fungera som förväntat utan **4a** reagerade inte alls och **8** rearomatiserades till **15**, se figur 6.1. Trots att produkt **15** erhöles var detta ändå ett intressant resultat vilket skulle vara av intresse att utveckla vid vidare forskning. En anledning till att **4a** inte reagerade med morfolin kan vara att katalysatorn är syrakänslig och därmed förstörts.

Den önskade molekyl i reaktionen med **5** är den som erhåles efter första reaktionssteget i figur 6.1, men oturligt nog inträffade en vidarereaktion efter detta steg.

En slutsats av detta är att reaktionen kanske pågick under för lång tid. Det bestämdes därför att minska reaktionstiden till sex respektive tolv timmar för att se om det kunde ge något annat resultat i form av **8**. Efter NMR-analys observerades det dock att en kortare reaktionstid inte gav ett mer lyckat resultat. Produkten hade vid tolv timmar återigen rearomatiserats och vid sex timmar hade reaktionen inte hunnit inträffa. Vid sex timmar erhöles istället ett prov med spår av okänt ämne som inte var relevant i arbetet. När reaktionstiden uppenbarligen inte var grundorsaken till det oönskade resultatet antogs det att reaktionen borde ha genomförts vid andra temperaturer.

De första HB-reaktionerna genomfördes vid en temperatur på 120°C. Ett annat förslag är därför att se ifall en minskning av reaktionstemperaturen kunde ge ett annorlunda resultat. Dessvärre hjälpte inte detta heller. En temperatursänkning på 20°C ledde tyvärr till att ingenting reagerade. Det antogs att lägre temperaturer under rådande omständigheter inte bör ge produkt överhuvudtaget, på grund av den höga energibarriären, som inte kunde sänkas av katalysatorn. Det var därmed inte av intresse att fortsätta med HB-reaktionerna vid lägre temperaturer, såvida katalysatorn inte byttes ut.

Det är av intresse att testa en iridiumkatalysator istället för den katalysator som användes i HB-reaktionerna. En katalysator av iridium skulle kunna medföra att lägre reaktionstemperaturer kan åstadkomma en HB-reaktion.<sup>46</sup> Iridium har också högre turnover, vilket potentiellt skulle kunna ge ett högre utbyte om det visar sig fungera. Om HB-reaktionerna skulle genomföras annorlunda vid ett annat tillfälle hade ruteniumkatalysatorn kunnat ersättas av en iridiumkatalysator.

För framtida forskning är det av intresse att försöka hitta fler faktorer som kan påverka att reaktionerna inte fungerar samt nya sätt att få de att fungera. Exempelvis skulle flera startmaterial, det vill säga olika aromatenheter erhållna från lignin, kunna testas. I denna studie har endast ett fåtal testats. Då reaktionen benämnd som testreaktion i tabell 6.4 gav ett lyckat resultat och de följande HB-reaktionerna som genomfördes inte gav det, påvisar detta att det är något med reaktionen som behöver ändras, inte utrustningen.

### 7.1.5 Hydroaminering (HA)

Tyvär gav ingen av de genomförda hydroamineringarna något lyckat resultat, varken de med startmaterialet 1,3-cyklohexadien, eller de som testades med **5** som startmaterial. Hydroamineringarna som i tabell 6.5 är benämnda som HA1 och HA2 genomfördes enligt samma metod som beskrivits i en tidigare publicerad artikel<sup>32</sup> men med ekvimolära mängder mellan anilin och startmaterial. Detta gav inget lyckat resultat och av denna anledning utfördes ytterligare två reaktionsförsök. HA3 och HA4 genomfördes med hög noggrannhet samt med samma förhållanden mellan reaktanterna som angivits i Löbers artikel.<sup>32</sup> Trots detta genomfördes även HA3 och HA4 utan lyckat resultat.

Det förväntade resultatet från hydroamineringen var att reaktionerna i figur 5.9 och 5.10 skulle ske. Extra höga förväntningar var det på HA3 och HA4 som genomfördes med extra hög noggrannhet för att försöka reproducera Löbers resultat.<sup>32</sup> En bidragande faktor som kan ha påverkat resultatet negativt är att palladiumkatalysatorn, Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, kan ha varit för gammal. Metallkatalysatorer är dock, som beskrivits under avsnitt 4.7, relativt dyra vilket gör att man gärna använder all tillgänglig katalysator innan ny köps in.

Då ingen av hydroamineringarna gav ett lyckat resultat är det svårt att avgöra om utrustningen som använts har påverkat resultatet, eller om det är metoden som är bristfällig. Dock används samma utrustning både för hydroamineringen och HB-reaktionerna. Detta kan tyda på att det inte är fel på utrustningen utan att det även för hydroamineringen är reaktionsförhållandena som behövas modifieras. Det skulle därför vara av intresse i framtiden att exempelvis testa andra aromatenheter från lignin som startmaterial. Det skulle kanske fungera att testa med aromatenheter som har andra funktionella grupper än hydroxigrupper.

Positivt med hydroamineringen är att reaktionen kan ske vid rumstemperatur, vilket medför att energi inte behöver tillföras. Något som skulle kunna forskas vidare på är om anilin hade kunnat bytas ut mot en annan amin då anilin utgör en ganska stor risk, se riskbedömning i avsnitt B.1.5. Det skulle även vara av intresse att testa en nyare katalysator eller andra palladiumkatalysatorer än Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, då denna katalysator kanske inte fungerade för denna reaktion. En annan faktor som kan ha påverkat att reaktionen inte gav något lyckat resultat är att kokatalysatorn i form av en syra, i detta fall TFA, kan förstöra metallkatalysatorn. För framtida forskning är det därför betydelsefullt att se om reaktionen kan genomföras utan syra. Enligt en tidigare studie av Löber *et al.* skulle detta kunna vara möjligt.<sup>32</sup> Alternativt kan det undersökas om möjligheten finns att använda andra syror som kanske inte förstör katalysatorer lika lätt. Ett alternativ är att testa syror med högre pK<sub>a</sub>, det vill säga svagare syror. Trifluorättiksyra är exempelvis lik ättiksyra, med skillnaden att ättiksyran har tre väteatomer bundna till metylgruppen och trifluorättiksyra har tre fluoratomer på samma plats. Ett förslag är därför att testa hydroamineringen med ättiksyra som är en svagare syra än trifluorättiksyra.



## 7.2 Analyismetoder

Vid laborationerna användes bland annat en rotationsindunstare för att avlägsna lösningsmedel. Mot slutet av projektet fungerade denna dock inte ordentligt då trycket inte sänktes, vilket är en förutsättning för att koka bort lösningsmedel vid låga temperaturer. Detta kan ha bidragit till att vissa prov som analyserats med NMR inte var rena och spektrum kan då tolkats felaktigt. NMR, och speciellt NMR på råprodukter, är dock en väldigt bra analysmetod för att ta reda på ifall reaktionen har skett och om det är relevant att rena upp den eventuella produkten.

Analysmetoden TLC var ett bra komplement till flashkolonnkromatografi för att ta reda på ifall någon reaktion har skett, samt för att se hur snabbt vissa komponenter eluerar i en specifik sammansättning av lösningsmedel. TLC som görs innan flashkolonnkromatografen kan användas för jämförelse med de TLC-tester som görs på de separerade fraktionerna efter flashkromatografi. Utifrån dessa analyser går det att dra slutsatser om vilken fraktion som sannolikt innehåller produkt.

En svårighet som nybörjare av TLC-analys samt flashkolonnkromatografi är dock att veta vilken blandning av polärt samt opolärt lösningsmedel som behöver användas. Rätt blandning behöver erhållas för att de olika komponenterna ska kunna separeras bra med avseende på polaritet. En bra metod skulle därför kunna vara att göra TLC med några olika sammansättningar av polärt och opolärt lösningsmedel för att hitta en bra balans.

För att mer säkert kunna bekräfta om den önskade molekylen erhållits eller inte användes även IR-spektroskopi. Detta utgör nämligen ett komplement till de andra analysmetoderna då IR-spektroskopi kan användas för att bestämma funktionella grupper som i vissa fall inte kan detekteras med NMR.

Något annat som hade kunnat användas för framtida laborativt arbete för att med ännu större säkerhet kunna säga att resultatet är tillförlitligt, är masspektrometri. Med masspektrometri kan molekylens summaformel och därmed molekylmassan erhållas, vilket kan styrka eller dementera andra analysmetoders resultat.

## 7.3 Samhälleliga och etiska aspekter

Det finns många positiva aspekter av en övergång från fossila råvaror till förnyelsebara råvaror, som till exempel lignin. Dock finns det också saker att ta hänsyn till i form samhälleliga och etiska aspekter. En samhällelig aspekt är den skogsavverkning som kan komma att ske för att få tag på lignin i tillräckligt stor utsträckning. Frågan är då ifall behovet av lignin kan tillgodoses utan att äventyra habitat, biodiversitet, människors boplatser och liknande. Då lignin idag utvinns ur svartlut, som är en restprodukt från massaindustrin<sup>4,5</sup>, är dock risken inte så stor att detta skulle ske. Däremot finns det en risk för överexploatering om lignin blir en mycket eftertraktad råvara som börjar användas kommersiellt i stor skala. Ökad avverkning av skog, för att tillgodose behovet av lignin, skulle kunna leda till flertalet negativa effekter. Minskad biodiversitet till följd

av förstörda habitat är något som bör tas i beaktning. De globala målen som nämns i avsnitt 4.1.1 behandlar både ett ansvarsfullt användande av naturresurser och värnandet om biodiversitet. Därför är det viktigt att väga för- och nackdelar mot varandra inför en eventuell kommersialisering av lignin som råvara.

Ökad skogsavverkning skulle också kunna resultera i mindre ytor av skog. Skogar är mycket viktiga för kolets kretslopp, då det kol som finns i form av koldioxid i atmosfären binds i biomassa via fotosyntesen, och det är viktigt att denna funktion upprätthålls. Minskade skogsytor skulle alltså kunna bidra till ökad mängd koldioxid i atmosfären och därmed även bidra till ytterligare ökning av växthuseffekten.

En fördel med att använda biomassa, i detta fall lignin, är dock att råvaran är förnyelsebar. En effekt kan dessutom bli att användningen av fossila råvaror minskar då förnyelsebara råvaror blir mer tillgängliga. Detta kan i sin tur leda till minskad mängd föroreningar i miljön om man, samtidigt som bytet till förnyelsebara råvaror, tar chansen att förbättra produkter utifrån ett miljöperspektiv.

De etiska aspekterna som rör människor bör också tas i beaktning om efterfrågan på lignin ökar. Det gäller då främst människors integritet. Ökad avverkning av skog skulle kunna inskränka på människors boplatser vid ökad exploatering av skogstäta områden. Dessutom kräver odling av skog mycket yta och sannolikheten att ytor som är beboeliga används för skogsbruk är relativt stor.

De diskuterade aspekterna är inte en direkt effekt av projektets slutgiltiga mål, men de skulle kunna bli framtida följd effekter. Det finns inte direkt några etiska problem med projektets metod då det inte påverkar någon levande varelse utöver bakterierna, som är så pass lågutvecklade att det inte ses som något problem. Metoden bidrar inte heller till någon omfattande överutnyttning av resurser i nuläget, men det bör nämnas att katalysatorer som används innehåller sällsynta metaller. Det skulle kunna bli en ökad efterfrågan på dessa metaller om denna process används i industrin i framtiden och därför är det önskvärt att använda mindre sällsynta metaller, som till exempel järn. Det lär också bli en ökad efterfrågan på skogsindustrin och skogsägare kommer troligtvis påverkas positivt rent ekonomiskt. Boende i områden där skog avverkas kan dock komma att påverkas negativt. Detta gäller även, som tidigare nämnt, djur i dessa områden.

# 8

## Slutsats

Projektet har visat att det finns potential för att skapa kirala molekyler från nedbrutet lignin, via biotransformation och organisk syntes. Dock är bakterien *R. eutropha* B9 kanske inte den lämpligaste organismen för biotransformation av aromatenheter från nedbrutet lignin. För att genomföra hydroamineringen med lyckat resultat hade reaktionen först och främst behövts testas med en nyinköpt metallkatalysator. För alla de genomförda synteserna hade det även varit intressant att testa med andra aromatenheter som startmaterial än de som testats i denna studie. Då en del av synteserna genomfördes med lyckat resultat skulle det vara av intresse att utveckla produkter från biotransformationen och de organiska synteserna till högvärdeskemikalier i form av exempelvis läkemedel och material.

# Källförteckning

- [1] Keim W. Petrochemicals: Raw material change from fossil to biomass? *Petroleum Chemistry*. 2010;50(4):298-304. doi: 10.1134/S0965544110040079
- [2] Readman JW. *The World's Waters : A Chemical Contaminant Perspective*. I: Harrison RM, editor. *Introduction to Pollution Science*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2006. s. 77–121.
- [3] Nationalencyklopedin, Norhammar U. Fossila bränslen [Internet]. [citerad 24 mars 2018]. Tillgänglig från: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/fossila-bränslen>
- [4] Södra Skogsägarna ekonomisk förening. Vår produktionsprocess [Internet]. [citerad 6 februari 2018]. Tillgänglig från: <https://www.sodra.com/sv/massa/vara-fabriker/var-produktionsprocess/>
- [5] Bergqvist S. Lignin är framtidens restråvara för produktion av biodrivmedel - Preem.se [Internet]. [citerad 6 februari 2018]. Tillgänglig från: <http://preem.se/om-preem/insikt-kunskap/gronare-drivmedel/lignin-ar-framtidens-ravara/>
- [6] Research Institutes of Sweden R. Kolfiber från lignin - Innventia [Internet]. [citerad 9 maj 2018]. Tillgänglig från: <http://www.innventia.com/sv/Det-har-kan-vi/Nya-material/Ligninprodukter/>
- [7] Framtidens Forskning – Från ide till produkt. Lignin – skogens nya guld | Framtidens Forskning [Internet]. 28 juni. 2017 [citerad 9 maj 2018]. Tillgänglig från: <http://framtidensforskning.se/foretagspresentation/lignin-skogens-nya-guld/>
- [8] Research Institutes of Sweden. LignoBoost – utvärderar kundernas möjligheter att dra nytta av lignin i skogsråvara | RISE Research Institutes of Sweden [Internet]. [citerad 9 maj 2018]. Tillgänglig från: <https://www.ri.se/erbjudanden/testbaddar-och-demonstratorer/lignoboost-utvarderar-kundernas-mojligheter-att-dra-nytta>
- [9] FN. Fördjupning - fakta om de globala målen. 2016 [citerad 27 mars 2018]; Tillgänglig från: <https://fn.se/wp-content/uploads/2016/09/Fördjupning-om-Globala-målen-lärarmaterial-till-Aktion-FN-för-en-bättre-värld.pdf>
- [10] Borregaard. Products & Solutions [Internet]. [citerad 9 maj 2018]; Tillgänglig från: <https://www.borregaard.com/Products-Solutions>

- [11] Borregaard LignoTech. Borregaard LignoTech [Internet]. [citerad 9 maj 2018]; Tillgänglig från: <https://www.lignotech.com/>
- [12] Global Goals. The 17 goals [Internet]. 2015 [citerad 27 mars 2018]. Tillgänglig från: <https://www.globalgoals.org/>
- [13] UNDP. Mål 12: Hållbar konsumtion och produktion - Globala målen [Internet]. 2017 [citerad 24 april 2018]. Tillgänglig från: [www.globalamalen.se/om-globala-malen/mal-12-hallbar-konsumtion-och-produktion/](http://www.globalamalen.se/om-globala-malen/mal-12-hallbar-konsumtion-och-produktion/)
- [14] Krutov S, Voznyakovskii P, Gordin , Savkin DI, Shugalei IV. Environmental problems of wood biomass processing. Waste processing lignin. Russian Journal of General Chemistry. 2015;85(13):2898-907. doi: 10.1134/S1070363215130058
- [15] Jenkins BM, Baxter LL, Miles TR. Combustion properties of biomass. Fuel Processing Technology. 1998;54(1):17-46. doi: 10.1016/S0378-3820(97)00059-3
- [16] Bilal Pirzadah T, Malik B, Kumar M, Ul Rehman R. Lignocellulosic Biomass: As Future Alternative for Bioethanol Production. I: Rehman Hakeem K, Jawaid M, Rashid U, editors. Biomass and Bioenergy: Applications. Cham: Springer International Publishing; 2014. s. 145–59.
- [17] Zhang X, Tu M, Paice MG. Routes to Potential Bioproducts from Lignocellulosic Biomass Lignin and Hemicelluloses. BioEnergy Research. 2011;4(4):246-57. doi: 10.1007/s12155-011-9147-1
- [18] Gaudet N, Lask J, Maier J, Tchouga B, Vargas-Carpintero R. Bioeconomy: Shaping the Transition to a Sustainable, Biobased Economy. Lewandowski I, editor. Cham: Springer International Publishing; 2018. s. 2, 13-15, 24-25. doi: 10.1007/978-3-319-68152-8
- [19] Mussatto SI. Challenges in Building a Sustainable Biobased Economy. Ind Crop Prod. 2017;106:1–2. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.07.007
- [20] Sillanpää M, Ncibi C. A sustainable bioeconomy: The green industrial revolution. A Sustainable Bioeconomy: The Green Industrial Revolution. Cham: Springer International Publishing; 2017. s. 1-343.
- [21] Lancaster M. Principles and Concepts of Green Chemistry. In: Green Chemistry: An introductory text. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2002 [citerad 4 maj 2018]. s. 1–20.
- [22] Richard P. Wool. New Polymers, Renewables as Raw Materials. In: Anastas PT, Zimmerman JB, editors. Innovations in Green Chemistry and Green Engineering: Selected Entries from the Encyclopedia of Sustainability Science and Technology. New York: Springer; 2013. s. 179.
- [23] Faber K. Biotransformations in Organic Chemistry. 7th ed. Cham: Springer International Publishing; 2018

- [24] Alexander S, Mathie A, Peters J. *British Journal of Pharmacology* Volume 164, Supplement 1, November 2011. 2011;164:279. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01649\_9.x
- [25] Ito S. Biotransformation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2014;96(3):281-3. doi: 10.1038/clpt.2014.133
- [26] Lewis SE. Applications of biocatalytic arene ipso,ortho cis-dihydroxylation in synthesis. *Chemical Communications*. 2014;5(22):2821-283. doi: 10.1039/c3cc49694e
- [27] Kawachi M, Noël M. *Sterilization and Sterile Technique. I: Andersen RA. Algal culturing techniques*. Boston, Mass: Elsevier/Academic Press; 2005. s. 65–83.
- [28] Lewis SE, You S-L. Asymmetric Dearomatization Under Enzymatic Conditions. In: *Asymmetric Dearomatization Reactions*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2016. s. 279–346.
- [29] Clayden J, Greeves N, Warren SG. *Organic chemistry*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 2012. 52-63, s. 302-311.
- [30] Hembury GA, Borovkov V V, Inoue Y. Chirality-Sensing Supramolecular Systems. *Chemical Reviews*. 2007;108(1):1–4. doi: 10.1021/cr050005k
- [31] Nationalencyklopedin. Enantiomeri [Internet]. [citerad 8 februari 2018]. Tillgänglig från:  
<https://www-ne-se.proxy.lib.chalmers.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/enantiomeri>
- [32] Löber O, Kawatsura M, Hartwig JF. Palladium-catalyzed hydroamination of 1,3-dienes: A colorimetric assay and enantioselective additions. *Journal of the American Chemical Society*. 2001;123(18):4366-7. doi: 10.1021/ja005881o
- [33] Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, Gottlieb HE, Nudelman A, Stoltz BM, et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics*. 2010;29(9):2176–2179. doi: 10.1021/om100106e
- [34] Fischer TCM, Hannes, Leisch G, Mihovilovic MD, Leisch HG, Mihovilovic MD. Intramolecular Diels–Alder cyclization of biodihydroxylated benzoic acid derivatives towards novel heterocyclic scaffolds. *Monatshefte für Chemie - Chem Mon*. 2010;141(6):699–707. doi: 10.1007/s00706-010-0291-7
- [35] Yang Q, Wang Q, Yu Z. Substitution of alcohols by N-nucleophiles via transition metal-catalyzed dehydrogenation. *Chemical Society Reviews*. 2015;44(8):235-2329. doi: 10.1039/C4CS00496E
- [36] Nationalencyklopedin. Förestring [Internet]. [citerad 27 april 2018]. Tillgänglig från:  
<https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/förestring>
- [37] Ali Khan M, Mahon MF, Lowe JP, Stewart AJW, Lewis SE. Valuable new cyclohexadiene building blocks from cationic  $\eta^5$ -iron-carbonyl complexes derived from a microbial

- arene oxidation product. *Chemistry - A European Journal*. 2012;18(42):13480–93. doi: 10.1002/chem.201202411
- [38] Rychnovsky SD, Rogers BN, Richardson TI. Configurational Assignment of Polyene Macrolide Antibiotics Using the [<sup>13</sup>C]Acetonide Analysis. *Accounts of Chemical Research*. 1998;31(1):9–17. doi: 10.1021/ar960223n
- [39] Hamid, M. Haniti S. A, Allen CL, Lamb GW, Maxwell AC, Maytum HC, Watson AJA, et al. Ruthenium-catalyzed N-alkylation of amines and sulfonamides using borrowing hydrogen methodology. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;131(5):1766–74. doi: 10.1021/ja807323a
- [40] Gooßen LJ, Huang L, Arndt M, Gooßen K, Heydt H. Late transition metal-catalyzed hydroamination and hydroamidation. *Chemical Reviews*. 2015;115(7):2596–697. doi: 10.1021/cr300389u
- [41] Wibbertmann A, Kielhorn J, Koennecker G, Mangelsdorf I, Melber C. Concise international chemical assessment document 26: Benzoic acid and sodium benzoate. *IPCS Concise International Chemical Assessment Documents*. 2000(26).
- [42] Sato T, Otera J, Nozaki H. CsF-promoted esterification of carboxylic acids. A practical alternative to the diazomethane method and direct conversion of organotin carboxylates. *Journal of Organic Chemistry*. 1992;57(7):2166–9.
- [43] Ghavre M, Froese J, Murphy B, Simionescu R, Hudlicky T. A Formal Approach to Xylosmin and Flacourtosides E and F: Chemoenzymatic Total Synthesis of the Hydroxylated Cyclohexenone Carboxylic Acid Moiety of Xylosmin. *Organic Letters*. 2017;19(5):1156–9.
- [44] Leisch H. Intramolecular Diels-Alder Cyclizations of Biodihydroxylated Aryl Carboxylic Acids. Master [thesis]. Vienna: Vienna University of Technology;2004.
- [45] Brinchi L, Germani R, Savelli G. Efficient esterification of carboxylic acids with alkyl halides catalyzed by fluoride ions in ionic liquids. *Tetrahedron Letters*. 2003;44(35):6583–5. doi: 10.1016/S0040-4039(03)01693-9
- [46] Michlik S, Kempe R. New iridium catalysts for the efficient alkylation of anilines by alcohols under mild conditions. *Chemistry - A European Journal*. 2010;16(44):13193–8. doi: 10.1002/chem.201001871

# A

## Appendix A

### A.1 Stödande information

I följande appendix återges det hur varje experiment har genomförts samt vilka mängder av de olika kemikalierna som har använts. I varje avsnitt för respektive experiment presenteras även det erhållna resultatet i form av utbyte och NMR-data.  $^1\text{H}$ - och  $^{13}\text{C}$ -NMR-data erhöles via instrumentet Varian MR 400 MHz, där antingen  $\text{CDCl}_3$  eller  $\text{D}_2\text{O}$  har använts som lösningsmedel. All NMR-data har klassificerats med toppar och värden på dessa toppar. De olika topparna kan vara s (singlett), d (dublett), t (triplett), q (kvartett), p (pentett), dd (dubbla dubletter), ddd (dublett av dubbla dubletter) samt m (multiplett). Topparna ger utslag vid ett visst skift där skiftet anges i enheten ppm. IR-data har klassificerats med ms (mycket stark), s (stark) och m (medium). Bokstaven J betecknar kopplingskonstanten.

#### A.1.1 Biotransformation

Vid autoklaveringen tillsattes Hutner's mineral base (HMB) i en E-kolv med lock. Därefter vägdes dinatriumsuccinatohexahydrat (DSH) upp och tillsattes till E-kolven varpå E-kolven skakades för att lösa upp DSH. En bomullstuss sattes i flaskhalsen och locket lämnades halvt påskruvat, varefter E-kolven autoklaverades i  $125^\circ\text{C}$  och 6 bar. Innehållet i autoklaven togs sedan ut efter att det kylts ned till cirka  $60^\circ\text{C}$  eller lägre, och innehållet anses sterilt och redo för användning. En variant av en autoklav presenteras i figur A.1.



Figur A.1: Autoklav.



I tabell A.1 visas de mängder av HMB och DSH som användes vid autoklaveringen.

**Tabell A.1:** Mängder med HMB och DSH som användes i biotransformationerna 1 till 5

Substans	BS1	BS2	BS3	BS4	BS5
HMB [ml]	200	200	50	200	200
DSH [g]	0.8272	0.4229	0.206	0.815	0.826

När autoklaveringen hade genomförts, hämtades bakterier (*R. eutropha*) från frysen som höll en temperatur på  $-80^{\circ}\text{C}$ . Det är viktigt att vara försiktig för att undvika kontaminering av det som har autoklaverats. På grund av detta användes handskar samt etanol som smörjdes på handskarna vid fortsatt arbete med det som hade autoklaverats.

Med en autoklaverad sticka tillsattes en liten mängd bakterier till den autoklaverade E-kolven med HMB, DSH samt destillerat vatten. Därefter sattes bomullen i flaskhalsen igen och lådan med bakterier togs tillbaka till frysen. Kulturen inkuberades sedan i  $30^{\circ}\text{C}$  och 200 rpm under 48 timmar.

Efter 48 timmar tillsattes HMB och D-fruktos (10% viktsvolym), båda autoklaverade. E-kolven placerades i ett vattenbad med temperaturen  $30^{\circ}\text{C}$  och luftades via en luftpump. Bomullen lämnades kvar i flaskhalsen och E-kolvens öppning täcktes med aluminiumfolie.

Efter 20 timmar tillsattes D-fruktos och enzymproduktionen inducerades med **3a**. Sju timmar senare kopplades två sprutor, innehållande **3a** i ena och D-fruktos i den andra, till varsin sprutpump, se figur A.2. Pumparna ställdes in på att tillföra sprutinnehållet under 72 timmar. Injektionssprutornas nålar stoppades ner i E-kolven och pumparna startades.



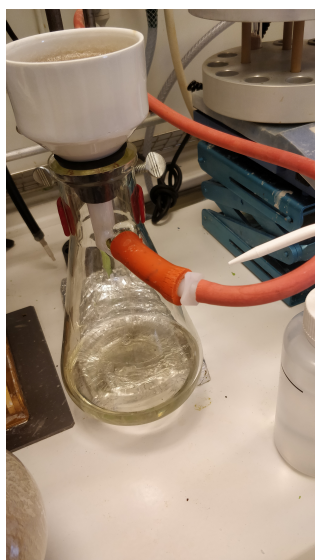
**Figur A.2:** Uppställning med injektionssprutor.

Då allt i injektionssprutorna hade adderats till E-kolven, det vill säga efter 72 timmar, plockades sprutorna, folien, bomullen, slangen och "luftaren" bort. Innehållet i E-kolven centrifugerades sedan i Sigma 4-16KS under 45 minuter,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5000 rpm. Efter centrifugeringen fördes supernatanten över till en rundkolv. Rundkollen med supernatanten rotationsindunstades, se figur A.3, i cirka tre timmar för att avlägsna vattnet.



Figur A.3: Rotationsindunstare med vatten som kylmedium.

Ett grovt NMR-prov av supernatanten förbereddes och analyserades, se kapitel C. Till rundkolven som innehöll fasta kristaller efter rotationsindunstningen tillsattes avjoniserat vatten och kolven skakades därefter med hjälp av en sonikator. Därefter mättes isopropanol upp och tillsattes till rundkolven varpå rundkolven placerades i kylskåpet i 60 minuter. Provet filtrerades med Büchnertratt och vakuumtorkades över natten, se figur A.4, för att erhålla det färdiga pulvret.



(a) Filtrering av prov med Büchnertratt.



(b) Vakuumtorkning av prov.

Figur A.4: Utrustning som användes för filtrering och torkning av det färdiga pulvret.

#### A.1.1.1 B1

500 ml HMB och 10 ml D-fruktos användes i första tillsatsen. Efter 20 timmar tillsattes 10 ml D-fruktos och 4 ml **3a**. 30 ml D-fruktos och 24 ml **3a** adderades till sprutorna som kopplades till pumparna. Till rotationsindunstningen användes 50 ml avjoniserat vatten och 450 ml isopropanol. Produktens färg var lätt gul och konsistensen var pulvrig. Utbytet var 106% på grund av ofullständig rening från medium och eventuella biprodukter.

**Natrium (1*S*,6*R*)-1,6-dihydroxicyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (4a), (Tabell 6.1, Reaktion B1).**  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  6.15 – 6.10 (m, 1H), 6.00 – 5.94 (m, 1H), 5.80 – 5.74 (m, 2H), 4.88 – 4.85 (m, 1H) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  180.63, 130.89, 127.05, 126.08, 123.14, 75.00, 71.35 ppm. **FTIR-ATR** ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3304 (m), 1600 (ms) (CO), 1417 (s), 1374 (s).

#### A.1.1.2 B2

500 ml HMB och 10 ml D-fruktos användes i första tillsatsen. Efter 20 timmar tillsattes 10 ml D-fruktos och 4 ml **3a**. Efter centrifugering hälldes supernatanten ut och cellerna frystorkades. Efter resuspendering av icke frystorkade celler som inte gav upphov till önskad biotransformation, användes de frystorkade cellerna aldrig.

#### A.1.1.3 B3

Levande celler som redan inducerats med **3a**, enligt BS2, resuspenderades i de två autoklaverade E-kolvarna. 10 ml D-fruktos tillsattes till respektive E-kolv och sedan 250 ml HMB. Sprutorna fylldes med 10 ml D-fruktos och 8 ml **3b** respektive 10 ml D-fruktos och 8 ml **3a** och tillfördes under 48 timmar. Inget utbyte beräknades då den önskade reaktionen inte skedde.

#### A.1.1.4 B4

500 ml HMB, 10 ml D-fruktos och 4 ml **3a** tillsattes vid samma tillfälle. Efter ett dygn fylldes sprutorna, kopplade till pump, med 10 ml D-fruktos och 10 ml **3b**. Detta tillfördes till E-kolven under ett dygn. Inget utbyte beräknades då den önskade reaktionen inte skedde.

#### A.1.1.5 B5

200 ml HMB, 10 ml D-fruktos och 4 ml **3a** tillsattes först. Ett dygn senare tillsattes **3c**. Inget utbyte beräknades då allt substrat metaboliserades.

### A.1.2 Förestring

Från biotransformationen erhöles en diol som behövde omvandlas till en ester för vidare förädling. 3.6 g **4a** samt 3.0 g cesiumfluorid vägdes upp och tillsattes till en rundkolv. Därefter tillsattes 2.4 ml etyljodid och 60 ml av lösningsmedlet dimetylformamid (DMF). Reaktionen pågick under cirka 72 timmar i rumstemperatur.

Efter 72 timmar rotationsindunstades innehållet i rundkolven med hjälp av en rotationsindunstare där etylenglykol användes som kylmedium. Efter indunstningen erhöles en brun, organisk trögflytande vätska.

Produkten extraherades med natriumvätekarbonat och diklormetan (DCM). Den organiska fasen, DCM, överfördes till en E-kolv och sparades. Då DCM används hamnar den organiska fasen plus den önskade produkten, i botten av separertratten. Samtidigt som den nedre fasen tappades ut i E-kolven togs ett litet prov ut från strålen, som användes till ett TLC-prov. TLC-pappret med provet hölls under UV-ljus för att se hur koncentrerat provet var. På detta sätt kunde det avgöras när produkten hade tvättats färdigt. Att pricken inte syntes påvisade att det endast var DCM kvar i den organiska fasen och tvätten kunde därmed anses klar. I separertratten bildades även koldioxid vilket medförde att det var viktigt att öppna ventilen på separertratten ibland.

När tvättningen var klar tillsattes cirka 15 stycken små skedar natriumsulfat, vattenfri, till E-kolven innehållande den organiska fasen med den önskade produkten i som erhållits efter tvätten. Natriumsulfat tillsattes för att binda vattnet som fanns kvar i E-kolvens innehåll. Vätskan i E-kolven filtrerades genom bomull ner i en 1000 ml rundkolv för att få bort natriumsulfaten. Ett TLC-prov genomfördes på vätskan som erhöles efter filtreringen. Innehållet i rundkolven rotationsindunstades därefter tills dess att lösningsmedlet hade försvunnit.

Från rundkolven pipetterades oljan som erhöles efter rotationsindunstningen till en förvägd vial. Rundkolven sköljdes tre gånger med en liten mängd DCM vilket också överfördes till vialen. Vialen kväveblåstes över natten för att kvarvarande lösningsmedel skulle avdunsta, och utbytet kunde därefter beräknas.

Av den olja som erhöles efter kväveblåsningen preparerades och analyserades ett NMR-prov och från NMR-provet togs ett TLC-prov. Oljan renades sedan genom flashkolonnkromatografi, se figur 5.2, och behöll sin rödbruna färg.

Innehållet i de provrör som innehöll produkt hälldes över till en rundkolv och provrören sköljdes ur med lite DCM som även detta överfördes till rundkolven. Ett TLC-prov togs på vätskan och därefter genomfördes en rotationsindunstning. Efter rotationsindunstningen pipetterades den erhållna genomskinliga vätskan över till en förvägd vial. Rundkolven sköljdes tre gånger med en väldigt liten mängd DCM vilket också överfördes till vialen varpå vialen kväveblåstes i några timmar. Utbytet beräknades efter att allt lösningsmedel hade avdunstat och ett NMR-prov preparerades och analyserades. Produkten i form av olja vägde 1.47 g och utbytet beräknades till 40%.

**Etyl (1S,6R)-1,6-dihydroxicyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (5), (Tabell 6.2, Reaktion F1).**  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.15 (ddp, 1H,  $J= 9.52, 5.28, 0.54$  Hz), 5.99 – 5.93 (m, 1H), 5.85 – 5.80 (m, 1H), 5.77 – 5.73 (m, 1H), 4.85 (d, 1H,  $J= 10.1$  Hz), 4.33 (synbar qt, 2H), 3.60 (s, 1H), 2.62 (d, 1H,  $J= 10.4$  Hz), 1.34 (td, 3H,  $J= 7.14, 0.48$  Hz) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  175.21, 132.03, 126.72, 124.75, 122.67, 73.66, 70.90, 63.01, 14.13 ppm. FTIR-ATR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 3404 (m), 1724 (ms) (CO), 1241 (ms), 1083 (ms), 1028 (ms).

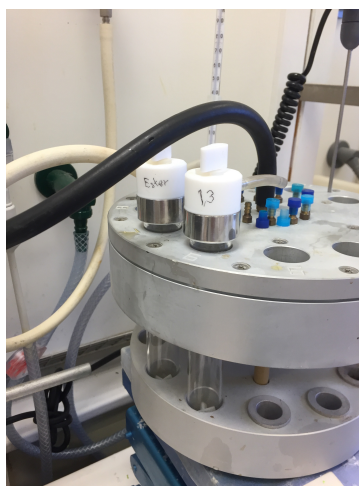
### A.1.3 Ketalbildning

En spruta på 1 ml med tillhörande kanyl vägdes på en våg. Vågen nollställdes med sprutan på vågen innan 5 sögs upp i sprutan. Vågen nollställdes ytterligare en gång efter att sprutan och dess innehåll vägdes upp. Substratet, **5**, som vägdes upp var på 378 mg, eller cirka 2.05 mmol. Denna mängd substrat injicerades sedan i reaktionskärlet. Substansmängden bestämdes genom att jämföra viktskillnaden före och efter injicering. 2 ml aceton, 0.15 ml TFA och 0.4 ml DMP injicerades sedan i reaktionskärlet. TFA tillsattes långsamt i smådroppar. Reaktionskärlet fick därefter ligga i ett isbad samtidigt som innehållet vakuumtorkades i två timmar. TLC genomfördes 45 minuter efter reaktionsstarten. NMR gjordes sedan på kärlnnehållet när två timmar hade passerat. Utbytet beräknades till 44 %.

**Etyl (3a*S*,7a*R*)-2,2-dimetylbenzo[d][1,3]dioxol-3a(7aH)-karboxylat, (6), (Tabell 6.3, Reaktion K1).**  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.15 - 6.07 (m, 2H), 6.03 - 5.97 (m, 1H), 5.86 - 5.78 (m, 1H,  $J=5.7, 3.3, 1.6$  Hz), 4.98 (dd, 1H,  $J=4.2, 0.4$  Hz), 4.25 (q, 2H,  $J=7.1$  Hz), 1.44 (s, 3H), 1.42 (s, 3H) 1.29 (t, 3H,  $J=7.1$  Hz) ppm.  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172.21, 124.65, 124.61, 124.32, 124.20, 107.10, 79.59, 72.99, 62.33, 26.97, 25.29, 14.17 ppm. FTIR-ATR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 1732 (ms) (CO), 1375 (s), 1247 (ms), 1214 (ms), 1048 (ms).

### A.1.4 Hydrogen Borrowing (HB)

Ett speciellt kärl placerades i en kondensorn på en värmeplatta, kallad karusell (en Carousel 12 Plus Reaction Station från Radleys), se figur A.5.



**Figur A.5:** De speciella reaktionskärlen samt kondensorn, kallad karusell, som kärnen placerades i.

Dppf och katalysatorn  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  vägdes upp och tillsattes via en tratt till ett kärl innehållande en magnetloppa. Därefter uppmättes toluen genom att tillföra argon till flaskan med toluen, för att hålla toluenen torr, samt genom att använda en spruta med kanyl för att ta upp toluen. 1 ml toluen tillsattes i kärlet. När alla lösningsmedel var tillsatta sattes kärlet alternerande under vakuum och argon med hjälp av ventiler och slutligen under argon. Därefter tillsattes startmaterialet och morfolin till kärlet varpå cirka 100 mg molekylsiktat, på engelska kallat molecular sieves, vägdes upp och tillsattes till

kärlet. Kärlet förslöts med en gummipropp och argonet stängdes av. Omrörningen och temperaturen startades på värmeplattan och termometern i kondensorn ställdes in till den temperatur reaktionen skulle ske vid.

Efter den valda reaktionstiden gjordes en TLC-analys för att se om reaktionen skett. I de fall starmaterialet reagerat överfördes provet till en samplet, se figur 5.2a, som därefter placerades i en silikakolonn. Silikakolonnen placerades i flashkolonnkromatografen, se figur 5.2b, och lösningsmedel kördes genom kolonnen för att separera provet i olika fraktioner, se figur 5.2c. TLC-prov togs på de erhållna fraktionerna för att se i vilka fraktioner en möjlig produkt kunde finnas i. Fraktionerna innehållande produkt överfördes till en rundkolv och rotationsindunstades, se figur A.3. Efter rotationsindunstning överfördes provet till en förvägd vial som kväveblåstes tills lösningsmedlet hade försvunnit. Provet kunde därefter vägas och ett utbyte kunde beräknas. På provet kördes även  $^1\text{H}$  och  $^{13}\text{C}$  NMR.

#### A.1.4.1 Test

104  $\mu\text{l}$  av bensylalkohol, 86  $\mu\text{l}$  morfolin, 7.7 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 13.9 mg dppf användes. Reaktionen kördes vid en temperatur av  $120^\circ\text{C}$  under cirka 24 timmar. Produkten vägde 103 mg och utbytet beräknades till 58%.

**4-Bensylmorfolin, (7), (Tabell 6.4, Reaktion HB -Test).** Färglös olja, 58%.  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.33 (s, 1H), 7.32 - 7.31 (m, 4H), 3.73 - 3.69 (m, 4H), 3.5 (m, 2H), 2.51 - 2.39 (m, 4H) ppm;  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  138, 129, 128, 127, 67.0, 63.5, 53.6 ppm.

#### A.1.4.2 HB1a

83.5 mg av **5**, 43  $\mu\text{l}$  morfolin, 3.8 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 6.9 mg dppf användes. 50 mg molekylsiktar adderades. Reaktionen kördes vid  $120^\circ\text{C}$  under cirka 24 timmar. Produkten vägde 9 mg och utbytet beräknades till 8%.

**Etyl 2-morfolinobensoat, (15), (Tabell 6.4, Reaktion HB1a).**  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.59 (dd, 1H,  $J=2.52, 1.48$  Hz), 7.55 (ddd, 1H,  $J=7.60, 1.48, 1.00$  Hz), 7.33 (synbar ddd, 1H), 7.09 (ddd, 1H,  $J=8.28, 2.68, 0.96$  Hz), 4.37 (q, 2H,  $J=7.12$  Hz), 3.90 - 3.85 (m, 4H), 3.23 - 3.18 (m, 4H), 1.39 (t, 3H,  $J=7.14$  Hz) ppm;  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  166.84, 151.21, 131.35, 129.08, 120.95, 119.89, 116.36, 66.80, 60.96, 49.12, 14.34 ppm. FTIR-ATR ( $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ ): 1712 (s) (CO), 1261 (ms), 1113 (s).

#### A.1.4.3 HB1b

52  $\mu\text{l}$  av **4a**, 43  $\mu\text{l}$  morfolin, 3.8 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 6.9 mg dppf användes. 50 mg molekylsiktar adderades. Reaktionen kördes vid  $120^\circ\text{C}$  under cirka 24 timmar.

**Natrium (1S,6R)-1-hydroxi-6-morfolinocyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (9), (Tabell 6.4, Reaktion HB1b).** Gulaktig olja, 0%.

#### A.1.4.4 HB2

76.4 mg av **5**, 43  $\mu\text{l}$  morfolin, 3.8 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 6.9 mg dppf användes. Reaktionen kördes vid 120°C under tolv timmar.

**Etyl (1S,6R)-1-hydroxi-6-morfolinocyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (8), (Tabell 6.4, Reaktion HB2).** Gulaktig olja, 0%.

#### A.1.4.5 HB3

96.3 mg av **5**, 43  $\mu\text{l}$  morfolin, 3.8 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 6.9 mg dppf användes. Reaktionen kördes vid 120°C under sex timmar.

**Etyl (1S,6R)-1-hydroxi-6-morfolinocyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (8), (Tabell 6.4, Reaktion HB3).** Gulaktig olja, 0%.

#### A.1.4.6 HB4

81.0 mg av **5**, 43  $\mu\text{l}$  morfolin, 3.9 mg  $[\text{Ru}(p\text{-cymene})\text{Cl}_2]_2$  och 6.8 mg dppf användes. Reaktionen kördes vid 100°C under tolv timmar.

**Etyl (1S,6R)-1-hydroxi-6-morfolinocyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat, (8), (Tabell 6.4, Reaktion HB4).** Gulaktig olja, 0%.

### A.1.5 Hydroaminering (HA)

Till två olika reaktionskärl som placerats i karusellen, en Carousel 12 Plus Reaction Station från Radleys, se figur A.5, tillsattes 0.005 mmol av palladiumkatalysatorn  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  och 0.1 ml av lösningsmedlet toluen med hjälp av en tratt. Till kärlen tillsattes därefter respektive substrat, ett i vardera kärl. Därefter tillsattes 45.6  $\mu\text{l}$  anilin och 3.9  $\mu\text{l}$  trifluorättiksyra (TFA) med spruta och kanyl. Reaktionen skedde i rumstemperatur och under omrörning i 24 timmar. Efter att reaktionen var färdig kväveblåstes proverna och en  $^1\text{H}$  NMR-analys gjordes.

#### A.1.5.1 HA1 - Test

57 mg av 1,3-cyklohexadien användes. Reaktionen kördes vid 25°C under cirka 24 timmar. Ingen önskad produkt bildades enligt  $^1\text{H}$  NMR.

**N-(cyclohex-2-en-1-yl)anilin, (10), (Tabell 6.5, Reaktion HA1).** Färglös olja, 0%.

#### A.1.5.2 HA2

100  $\mu\text{l}$  av **5** användes. Reaktionen kördes vid 25°C under cirka 24 timmar. Ingen önskad produkt bildades enligt  $^1\text{H}$  NMR.

**Etyl (1*S*,2*R*)-1,2-dihydroxi-5-(fenylamin)cyclohex-3-en-1-karboxylat och Etyl (1*S*,6*R*)-1,6-dihydroxi-4-(fenylamin)cyclohex-2-en-1-karboxylat (11 och 12), (Tabell 6.5, Reaktion HA2).** Gulaktig olja, 0%.

#### A.1.5.3 HA3 - Test

191  $\mu$ l av 1,3-cyklohexadien användes. Reaktionen kördes vid 25°C under cirka 24 timmar. Ingen önskad produkt bildades enligt  $^1\text{H}$  NMR.

**N-(cyclohex-2-en-1-yl)anilin, (10), (Tabell 6.5, Reaktion HA3).** Färglös olja, 0%.

#### A.1.5.4 HA4

347  $\mu$ g av 6 (med skyddsgrupp) användes. Reaktionen kördes vid 25°C under cirka 24 timmar. Ingen önskad produkt bildades enligt  $^1\text{H}$  NMR.

**Etyl (3*aS*,7*aR*)-2,2-dimetyl-5-(fenylamin)-5,7*a*-dihydrobenzo[d][1,3]dioxol-3*a*(4*H*)-karboxylat och**

**Etyl (3*aS*,7*aR*)-2,2-dimetyl-6-(fenylamin)-7,7*a*-dihydrobenzo[d][1,3]dioxol-3*a*(6*H*)-karboxylat (13 och 14), (Tabell 6.5, Reaktion HA4).** Gulaktig olja, 0%.



# B

## Appendix B

I följande kapitel redovisas en genomförd riskbedömning för vardera reaktionstyp, men riskbedömning genomfördes för alla experiment.

### **B.1 Riskbedömningar**

Riskbedömningarna gjordes innan experimenten påbörjades för att ge en överblick över riskfyllda moment. Som beskrivits i varje riskbedömning behövde skyddutrustning i form av skyddsrock, skyddsglasögon och skyddshandskar användas vid varje experiment. Varje experiment genomfördes även i dragskåp i ett laboratorium.

#### **B.1.1 Biotransformation**

# Riskbedömning

## Kandidatarbete KBTX10-18-09, B1

Utförd **2018-04-10** Av **Student kemi** på **Student kemi kurs**.  
Andrad senast **2018-05-12** Av **Student kemi**

### Slutlig bedömning av hela metoden

#### 2. Viss risk

Liten mängd bensoesyra som arbetas med inne i dragskåp under en kort period. Endast tillsättning vid ett tillfälle.

#### Ange vilka lokaler bedömningen avser





Forskningslab. 9071



#### Metodbeskrivning/Aktivitet

Autoklavering av kemikalier som behövs. Arbete med bakterier (klass 1) som i en bioreaktor får odlas i HMB, destillerat vatten samt "disodium succinate hexahydrate" (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O). Vätskan med celler centrifugeras och därefter ska rullindunstning av supernatrant ske. Analys av supernatranten ska ske genom NMR-analysering. Därefter ska Büchner-filtrering användas för att erhålla produkten som ett pulver.

#### Produktlista

Notera att riskkategorisering enbart ska ses som vägledning

Hög risk					
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Aceton</b> <b>Nivågränsvärden</b> 250 (ppm), 600 (mg/m <sup>3</sup> ) EUH066 , H225 , H319 , H336 P210 , P305 + P351 + P338 , P370 + P378 , P403 + P235 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			För tvättning av utrustning.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>2-Propanol</b> <b>Nivågränsvärden</b> 150 (ppm), 350 (mg/m <sup>3</sup> ) <b>CLP-information</b> H225 , H319 , H336 P210 , P240 , P243 , P261 , P280 , P305 + P351 + P338 , P403 + P233 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>Natriumhydroxid</b> H290 , H314 P280 , P301 + P330 + P331 , P304 + P340 + P310 , P305 + P351 + P338 <b>Listor</b> Hygieniskt gränsvärde finns		Fast			
<b>Koldioxid (volym)</b> <b>Nivågränsvärden</b> 5000 (ppm), 9000 (mg/m <sup>3</sup> ) H280 P410 + P403 <b>Listor</b> Hygieniskt gränsvärde finns Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport		Gas			Avges från fruktosen.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					

Måttlig risk					
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Natriumbensoat</b> <b>CLP-information</b> H319 P305 + P351 + P338		Lösning	28 ml		
<b>Etanol 70% (Solveco)</b> H226 P210 , P243 , P261 , P280 , P403 + P233 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			För tvättning av utrustning.
<b>Sodium succinate dibasic hexahydrate</b>					

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
Hexametylbensen		Vätska	600 ml		
Destillerat vatten		Vätska	150 ml		
D-(-)-Fruktos	10 % w/v	Vätska	50 ml		
Natriumhypoklorit lösning 3% (Histolab)		Vätska			Blekmiddel för att döda cellerna.
Deuteriumoxid (volym)		Vätska			Lösningsmedel till NMR-prov. Endast en liten mängd användes.

**Faroangivelser**

EUH066	Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor.
H225	Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H226	Brandfarlig vätska och ånga.
H280	Innehåller gas under tryck. Kan explodera vid uppvärmning.
H290	Kan vara korrosivt för metaller.
H314	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.
H315	Irriterar huden.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H335	Kan orsaka irritation i luftvägarna.
H336	Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.

**Skyddsangivelser**

P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P240	Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P243	Vidta åtgärder mot statisk elektricitet.
P261	Undvik att andas in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P301+P330+P331	VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning.
P304+P340+P310	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P370+P378	Vid brand: Släck med ... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P403+P233	Förvaras på väl ventilerad plats. Behållaren ska vara väl tillsluten.
P403+P235	Förvaras på väl ventilerad plats. Förvaras svalt.
P410+P403	Skyddas från solljus. Förvaras på väl ventilerad plats.

**Kemikaliernas inneboende risk**

b: Hög risk;

Liten mängd bensoesyra som används och jobbar dessutom i dragskåp så borde inte bli någon mycket hög risk med avseende på den kemikalien.

**Exponeringsnivå**

Låg;

**Skyddsventilation**

Skyddsnivå 2 - dragskåp e.d.;

**Biologiskt material**

Agens klass 1;

Har använts bakterien R. eutropha.

**Eventuellt samverkande effekter och möjliga reaktioner**

**Krav på lokal och utrustning i lokal**

---

Ventilation;

**Specifisering av förvaring**

---

Ventilerat skåp; Kylskåp; Frys;

**Får ej förvaras tillsammans med.**

---

Baser; Salpetersyra; Oxiderande ämnen; Annat;

(Kanske fylla i syror, organiska ämnen och ketoner (natriumhydroxid)?)  
Undvik värme, gnistor och heta ytor.

**Krav på skyltning**

---

Försök pågå under natten; Kemikalier; Nödutrustning;

**Personlig skyddsutrustning**

---

Skyddsglasögon/visir; Skyddshandskar; Skyddsrock;

**Beskriv teknisk utrustning**

---

Se laborationshandledningar i bilaga ... (?)

**Yttre miljö**

---

Ej relevant;

**Avfallshantering**

---

Kemiskt avfall; Biologiskt avfall;

**Första hjälpen samt beredskap inför olycka, brand och spill**

---

Förstahjälpentavla; Nöddusch; Ögondusch; Brandsläckare vatten; Brandsläckare skum; Brandsläckare kolsyra; Brandfilt;

**Arbetsmoment och omständigheter som är riskfyllda**

---

Överföring mellan kärl; Centrifugering; Uppvägning;

**Slutlig bedömning av hela metoden**

---

2. Viss risk;

Liten mängd bensoesyra som arbetas med inne i dragskåp under en kort period. Endast tillsättning vid ett tillfälle.

**Deltagande personer i riskbedömningen**

---

Hanna Svensson, Sofie Svennungsson, Emilia Sandolf, Christian Åkesson, John Forsberg, Tommy Sy.

**Signatur Ansvarig chef**

---

Nina Kann

**Datum**

---

## B.1.2 Förestning

# Riskbedömning

## Kandidatarbete KBTX10-18-09, F1

Utförd **2018-04-17** Av **Student kemi** på **Student kemi kurs**.  
Andrad senast **2018-05-12** Av **Student kemi**

### Slutlig bedömning av hela metoden

#### 2. Viss risk

### Ange vilka lokaler bedömningen avser

Forskningslab. 9071

### Metodbeskrivning/Aktivitet

Förestring genom reaktion mellan C7H7O2Na, se bilaga, samt jodetan, cesiumfluorid, dimetylformamid i 20 h vid rumstemperatur.

### Produktlista

Notera att riskkategorisering enbart ska ses som vägledning

#### Mycket hög risk

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Jodetan (volym)</b> H302, H315, H317, H319, H334, H335 P261, P280, P284, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P342 + P311		Vätska	2,41 ml		
<b>Cesiumfluorid</b> <b>Nivågränsvärden</b> (ppm), 2 (mg/m3) EUH032, H301, H311, H315, H318, H331, H361d P261, P280, P301, P302 + P352 + P312, P304 + P340 + P311, P305 + P351 + P338 + P310, P310, P330, P331 <b>Listor</b> Hygieniskt gränsvärde finns		Fast	3,0407 g		
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>N,N-Dimetylformamid</b> <b>Nivågränsvärden</b> 10 (ppm), 30 (mg/m3) <b>CLP-information</b> H226, H312, H319, H332, H360D P201, P210, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P308 + P313 <b>Listor</b> Anmärkning H, AFS 2015:7 Begränsningsdatabasen Chemsec SIN CMR-ämnen Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Kandidatlistan (SVHC) PRIO-Databasen		Vätska	60 ml		
<input type="checkbox"/> Ja, en utredning om möjlighet att ersätta produkten har genomförts i enlighet med 39 § AFS 2011:19, se kommentar/bilaga.					
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>Kloroform</b> H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372 P261, P280, P281, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Begränsningsdatabasen Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Vattendirektivet, bilaga X		Vätska			Lösningsmedel till NMR-prov.
<b>Petroleumbensin kokpunktsintervall 40-60°C</b> H225, H304, H315, H336, H411 P210, P240, P273, P301 + P330 + P331, P302 + P352, P403 + P235 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Begränsningsdatabasen Chemsec SIN Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska	12 ml		Lösningsmedel vid TLC.
<b>Kaliumpermanganat</b> <b>Nivågränsvärden</b> (ppm), 0.2 (mg/m3) H272, H302, H314, H400, H410 P221, P273, P280, P301 + P330 + P331, P305 + P351 + P338, P308 + P310 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Hygieniskt gränsvärde finns					För TLC-prov.

- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga.
- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.

**Hög risk**

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Argon, komprimerade</b> CLP-information H280 P410 + P403		Gas			
<b>Kväve, komprimerad (volym)</b> H280 P410 + P403		Gas			Kvävgas för kvävebläsning.
<b>Etylacetat</b> Nivågränsvärden 150 (ppm), 500 (mg/m3) EUH066, H225, H319, H336 P210, P240, P305 + P351 + P338, P403 + P235 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska	12 ml		Lösningsmedel vid TLC.

- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga.
- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.

<b>Aceton</b> Nivågränsvärden 250 (ppm), 600 (mg/m3) EUH066, H225, H319, H336 P210, P305 + P351 + P338, P370 + P378, P403 + P235 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			För tvättning av utrustning.
--	--	--------	--	--	------------------------------

- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga.
- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.

<b>Diklormetan</b> Nivågränsvärden 35 (ppm), 120 (mg/m3) H315, H319, H335, H336, H351, H371 P201, P280, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338, P308 + P311 <b>Listor</b> Anmärkning H, AFS 2015:7 Begränsningsdatabasen Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport Vattendirektivet, bilaga X		Vätska	400 ml		
--	--	--------	--------	--	--

- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga.
- Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.

**Låg risk**

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Natriumvätekarbonat</b>		Vätska	50 ml		
<b>Natriumsulfat</b>		Fast	5 st stora kedar		För att binda och få bort vattnet i lösningen.

**Egna produkter**

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>C7H7O2Na</b>	0	Fast	3,5697 g		Startmaterial erhållen från biotransformation

**Faroangivelser**

EUH032	Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
EUH066	Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor.
H225	Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H226	Brandfarlig vätska och ånga.
H272	Kan intensifiera brand. Oxiderande.
H280	Innehåller gas under tryck. Kan explodera vid uppvärmning.
H301	Giftigt vid förtäring.
H302	Skadligt vid förtäring.
H304	Kan vara dödligt vid förtäring om det kommer ner i luftvägarna.
H311	Giftigt vid hudkontakt.
H312	Skadligt vid hudkontakt.
H314	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.

H315	Irriterar huden.
H317	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
H318	Orsakar allvarliga ögonskador.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H331	Giftigt vid inandning.
H332	Skadligt vid inandning.
H334	Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning.
H335	Kan orsaka irritation i luftvägarna.
H336	Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.
H351	Misstänks kunna orsaka cancer .
H360D	Kan skada det ofödda barnet.
H361d	Misstänks kunna skada det ofödda barnet.
H371	Kan orsaka organskador .
H372	Orsakar organskador genom lång eller upprepad exponering .
H400	Mycket giftigt för vattenlevande organismer.
H410	Mycket giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
H411	Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.

**Skyddsangivelser**

P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden. OBS! Skyddsangivelsen existerar inte längre. (Tidigare text: Undvik att blanda med brännbara ämnen ...)
P221	OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.)
P240	Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P261	Undvik att andas in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P273	Undvik utsläpp till miljön
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P281	OBS! Skyddsangivelsen existerar inte längre. (Tidigare text: Använd föreskriven personlig skyddsutrustning.)
P284	[Vid otillräcklig ventilation] använd andningskydd. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P301	VID FÖRTÄRING:
P301+P330+P331	VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten/... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P302+P352+P312	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten. Vid obehag, kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P304+P340	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.
P304+P340+P311	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P305+P351+P338+P310	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.
P308+P310	Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P308+P311	Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare/... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P308+P313	Vid exponering eller misstanke om exponering: Sök läkarhjälp.
P310	Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare/...
P330	Skölj munnen.
P331	Framkalla INTE kräkning.
P342+P311	Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare/...
P370+P378	Vid brand: Släck med ... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P403+P235	Förvaras på väl ventilerad plats. Förvaras svalt.
P410+P403	Skyddas från solljus. Förvaras på väl ventilerad plats.

**Kemikaliernas inneboende risk**

a: Mkt hög risk;

**Exponeringsnivå**

Låg;

**Skyddsventilation**

Skyddsnivå 2 - dragskåp e.d.;

**Biologiskt material**

Ej relevant;

**Eventuellt samverkande effekter och möjliga reaktioner****Krav på lokal och utrustning i lokal**

Ventilation;

Riskbedömning : Kandidatarbete KBTX10-18-09, F1



**Specificering av förvaring**

---

Ventilerat skåp; Kylskåp;

**Krav på skyltning**

---

Gasflaskor; Försök pågår under natten; Kemikalier; Nödutrustning;

**Personlig skyddsutrustning**

---

Skyddsglasögon/visir; Skyddshandskar; Skyddsrock;

**Beskriv teknisk utrustning**

---

Rullindunstare, NMR-analys, se handledning (?)

**Yttre miljö**

---

Utsläpp till luft;

**Avfallshantering**

---

Kemiskt avfall;

**Första hjälpen samt beredskap inför olycka, brand och spill**

---

Förstahjälpentavla; Nöddusch; Ögondusch; Brandsläckare vatten; Brandsläckare skum; Brandsläckare kolsyra; Brandfilt;

**Arbetsmoment och omständigheter som är riskfyllda**

---

Ventilationsavbrott;

**Slutlig bedömning av hela metoden**

---

2. Viss risk;

**Deltagande personer i riskbedömningen**

---

Hanna Svensson, Sofie Svennungsson, Emilia Sandolf, Christian Åkesson, John Forsberg, Tommy Sy.

**Signatur Ansvarig chef**

---

Nina Kann

**Datum**

---

### **B.1.3 Ketalbildung**

# Riskbedömning

## Kandidatarbete KBTX10-18-09, K1

Utförd **2018-04-17** Av **Student kemi** på **Student kemi kurs**.  
Andrad senast **2018-05-12** Av **Student kemi**

### Slutlig bedömning av hela metoden

#### 1. Acceptabel risk

Små mängder av riskabla kemikalier gör hela experimentet mindre farligt.

### Ange vilka lokaler bedömningen avser

Forskningslab. 9071

### Metodbeskrivning/Aktivitet

En skyddsgrupp skall "byggas på" estern innan HB och hydroamineringen. Ester, DMP, TFA och aceton skall användas i en reaktion som ska pågå i 2 h i ett isbad. TLC kan användas efter en timme för att se om reaktionen har fortskridit.

### Produktlista

Notera att riskkategorisering enbart ska ses som vägledning

Mycket hög risk					
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Kaliumpermanganat lösning &gt;25%</b> <b>CLP-information</b> H272 , H302 , H400 , H410 P210 , P273 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			Används vid TLC.
<b>Hexan</b> <b>Nivågränsvärden</b> 25 (ppm), 90 (mg/m3) H225 , H304 , H315 , H336 , H361f , H373 , H411 P210 , P240 , P273 , P301 + P330 + P331 , P302 + P352 , P314 , P403 + P233 <b>Listor</b> Chemsec SIN Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			Lösningsmedel vid TLC.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
Hög risk					
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Trifluorättiksyra (volym)</b> H314 , H332 , H412 P260 , P301 + P330 + P331 , P303 + P361 + P353 , P305 + P351 + P338 , P405 , P501		Vätska	0,15 ml		
<b>Etylacetat</b> <b>Nivågränsvärden</b> 150 (ppm), 500 (mg/m3) EUH066 , H225 , H319 , H336 P210 , P240 , P305 + P351 + P338 , P403 + P235 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska			Lösningsmedel vid TLC.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>Aceton</b> <b>Nivågränsvärden</b> 250 (ppm), 600 (mg/m3) EUH066 , H225 , H319 , H336 P210 , P305 + P351 + P338 , P370 + P378 , P403 + P235 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska	2 ml		För tvättning av utrustning.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>2,2-Dimetoxypropan</b> H225 , H319 P210 , P305 + P351 + P338		Vätska	0,4 ml		

### Faroangivelser

EUH066 Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor.  
 H225 Mycket brandfarlig vätska och ånga.

H272	Kan intensifiera brand. Oxiderande.
H302	Skadligt vid förtäring.
H304	Kan vara dödligt vid förtäring om det kommer ner i luftvägarna.
H314	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.
H315	Irriterar huden.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H332	Skadligt vid inandning.
H336	Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.
H361F	Misstänks kunna skada fertiliteten.
H373	Kan orsaka organskador genom lång eller upprepad exponering .
H400	Mycket giftigt för vattenlevande organismer.
H410	Mycket giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
H411	Giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
H412	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

**Skyddsangivelser**

P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P240	Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P273	Undvik utsläpp till miljön
P301+P330+P331	VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten/... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P303+P361+P353	VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten [eller duscha].
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P314	Sök läkarhjälp vid obehag.
P370+P378	Vid brand: Släck med ... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P403+P233	Förvaras på väl ventilerad plats. Behållaren ska vara väl tillsluten.
P403+P235	Förvaras på väl ventilerad plats. Förvaras svalt.
P405	Förvaras inlåst.
P501	Innehållet/behållaren lämnas till ... i enlighet med lokala/regionala/nationella/internationella bestämmelser (ska anges)

**Kemikaliernas inneboende risk**

b: Hög risk;

**Exponeringsnivå**

Låg;

**Skyddsventilation**

Skyddsnivå 2 - dragskåp e.d.;

**Biologiskt material**

Ej relevant;

**Eventuellt samverkande effekter och möjliga reaktioner****Krav på lokal och utrustning i lokal**

Ventilation;

**Specificering av förvaring**

Ventilerat skåp;

**Krav på skyltning**

Gasflaskor; Kemikalier; Nödutrustning;

**Personlig skyddsutrustning**

Skyddsglasögon/visir; Skyddshandskar; Skyddsrock;

**Beskriv teknisk utrustning**

Se handledning (?)

**Yttre miljö**

Utsläpp till luft;

**Avfallshantering**

Kemiskt avfall;

**Första hjälpen samt beredskap inför olycka, brand och spill**

---

Förstahjälpentavla; Nöddusch; Ögondusch; Brandsläckare vatten; Brandsläckare skum; Brandsläckare kolsyra; Brandfilt;

**Arbetsmoment och omständigheter som är riskfyllda**

---

TFA måste tillsättas långsamt i små droppar annars kan reaktionen misslyckas.

**Slutlig bedömning av hela metoden**

---

1. Acceptabel risk;

Små mängder av riskabla kemikalier gör hela experimentet mindre farligt.

**Deltagande personer i riskbedömningen**

---

Hanna Svensson, Sofie Svennungsson, Emilia Sandolf, Christian Åkesson, John Forsberg, Tommy Sy.

**Signatur Ansvarig chef**

---

**Datum**

---

Nina Kann

## **B.1.4 Hydrogen Borrowing (HB)**

# Riskbedömning

## Kandidatarbete KBTX10-18-09, HB - Test

Utförd **2018-04-10** Av **Student kemi** på **Student kemi kurs**.  
Andrad senast **2018-05-12** Av **Student kemi**

### Slutlig bedömning av hela metoden

#### 1. Acceptabel risk

### Ange vilka lokaler bedömningen avser

Forskningslab. 9071

### Metodbeskrivning/Aktivitet

En testreaktion skall påbörjas 14/2-18 där benzylalkohol skall reagera med morfolin med hjälp av en katalysator ( $[\text{RuCl}_2(\text{P-Cymene})]_2$ ) i 24 timmar. Reaktionen genomförs med en temperatur på 120 grader. Lösningsmedel som ska användas är DPPF (2,5 mol %) och toluen. Den erhållna produkten heter N-Benzylmorfolin.

### Produktlista

Notera att riskkategorisering enbart ska ses som vägledning

#### Mycket hög risk

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Toluen</b> Nivågränsvärden 50 (ppm), 200 (mg/m <sup>3</sup> ) H225, H304, H315, H336, H361d, H373 P210, P240, P301 + P330 + P331, P302 + P352, P314, P403 + P233 <b>Listor</b> Anmärkning B, AFS 2015:7 Anmärkning H, AFS 2015:7 Begränsningsdatabasen Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport		Vätska	Överskottsmängd		Lösningsmedel
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					
<b>Kloroform-d (volym)</b> Nivågränsvärden 2 (ppm), 10 (mg/m <sup>3</sup> ) <b>CLP-information</b> H302, H315, H319, H331, H351, H361d, H372 P260, P280, P301 + P312 + P330, P304 + P340 + P311, P305 + P351 + P338, P403 + P233 <b>Listor</b> Hygieniskt gränsvärde finns					Lösningsmedel till NMR-prov.
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.					

#### Hög risk

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Argon, komprimerade</b> <b>CLP-information</b> H280 P410 + P403		Gas			Tog bort luft under reaktionen
<b>Morfolin (massa)</b> <b>CLP-information</b> H226, H302, H312, H314, H332 P210, P280, P301 + P330 + P331, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P309 + P310 <b>Listor</b> Anmärkning H, AFS 2015:7 Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska	1 mmol		

#### Måttlig risk

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>Bensylalkohol (mass)</b> <b>CLP-information</b> H302, H319, H332 P261, P301 + P312 + P330, P304 + P340 + P312, P305 + P351 + P338 <b>Listor</b> Flyktiga organiska föreningar (VOC)		Vätska	1 mmol		

#### Låg risk

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>1,1'-Bis(difenylfosfino)ferrocen</b>	2,5 mol %	Lösning	0,025 mmol		Lösningsmedel

**Faroangivelser**

H225	Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H226	Brandfarlig vätska och ånga.
H280	Innehåller gas under tryck. Kan explodera vid uppvärmning.
H302	Skadligt vid förtäring.
H304	Kan vara dödligt vid förtäring om det kommer ner i luftvägarna.
H312	Skadligt vid hudkontakt.
H314	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.
H315	Irriterar huden.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H331	Giftigt vid inandning.
H332	Skadligt vid inandning.
H336	Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.
H351	Misstänks kunna orsaka cancer .
H361d	Misstänks kunna skada det ofödda barnet.
H372	Orsakar organskador genom lång eller upprepad exponering .
H373	Kan orsaka organskador genom lång eller upprepad exponering .

**Skyddsangivelser**

P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P240	Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P261	Undvik att andas in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P301+P312+P330	VID FÖRTÄRING: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt. Skölj munnen.
P301+P330+P331	VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten/... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P304+P340+P311	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P304+P340+P312	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas. Vid obehag, kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN eller läkare.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P309+P310	OBS! Skyddsangivelsen existerar inte längre. (Tidigare text: Vid exponering eller obehag: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare.)
P314	Sök läkarhjälp vid obehag.
P403+P233	Förvaras på väl ventilerad plats. Behållaren ska vara väl tillsluten.
P410+P403	Skyddas från solljus. Förvaras på väl ventilerad plats.

**Kemikaliernas inneboende risk**

b: Hög risk;

Relativt små mängder av högrisk ämnen användes.

**Exponeringsnivå**

Låg;

Alla kemikalier hanteras i dragskåpen. Labbrock, skyddsglasögon och skyddshandskar används vid varje tillfälle.

**Skyddsventilation**

Skyddsnivå 2 - dragskåp e.d.;

**Biologiskt material**

Ej relevant;

**Eventuellt samverkande effekter och möjliga reaktioner****Krav på lokal och utrustning i lokal**

Ventilation;

**Specificering av förvaring**

Ventilerat skåp; Kylskåp;

**Får ej förvaras tillsammans med.**

Oxiderande ämnen; Lättantändligt material;



Toluen och morfolin är brandfarliga, gnistor ska undvikas

**Krav på skyltning**

Gasflaskor; Försök pågår under natten; Kemikalier; Nödutrustning;

**Personlig skyddsutrustning**

Skyddsglasögon/visir; Skyddshandskar; Skyddsrock;

**Beskriv teknisk utrustning**

Se handledning

**Yttre miljö**

Utsläpp till luft; Ej relevant;

**Avfallshantering**

Kemiskt avfall;

**Första hjälpen samt beredskap inför olycka, brand och spill**

Förstahjälpentavla; Nöddusch; Ögondusch; Brandsläckare vatten; Brandsläckare skum; Brandsläckare kolsyra; Brandfilt;

**Arbetsmoment och omständigheter som är riskfyllda**

Ventilationsavbrott;

Användningen av slangen som tillför argon kan öka trycket i kärlet om utsugningen av argon inte fungerar som tänkt.

**Slutlig bedömning av hela metoden**

1. Acceptabel risk;

**Deltagande personer i riskbedömningen**

Hanna Svensson, Sofie Svennungsson, Emilia Sandolf, Christian Åkesson, John Forsberg, Tommy Sy.

**Signatur Ansvarig chef****Datum**

Nina Kann

## **B.1.5 Hydroaminering (HA)**

# Riskbedömning

## Kandidatarbete KBTX10-18-09, HA3 - Test

Utförd **2018-04-10** Av **Student kemi** på **Student kemi kurs**.  
Andrad senast **2018-05-12** Av **Student kemi**

### Slutlig bedömning av hela metoden

#### 2. Viss risk

### Ange vilka lokaler bedömningen avser

Forskningslab. 9071

### Metodbeskrivning/Aktivitet

Genomförande av en hydroaminering genom reaktion mellan anilin och 1,3-cyklohexadien med toluen som lösningsmedel samt Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> som katalysator. Reaktionen sker under omrörning i 24 h i rumstemperatur.

### Produktlista

Notera att riskkategorisering enbart ska ses som vägledning

Mycket hög risk						
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar	
<b>Anilin (volym)</b> Nivågränsvärden 1 (ppm), 4 (mg/m <sup>3</sup> ) <b>CLP-information</b> H301, H311, H317, H318, H331, H341, H351, H372, H400, H410 P201, P261, P273, P280, P301 + P310 + P330 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Chemsec SIN Anmärkning H, AFS 2015:7 Hygieniskt gränsvärde finns		Vätska	46 µl			
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.						
<b>Toluen</b> Nivågränsvärden 50 (ppm), 200 (mg/m <sup>3</sup> ) H225, H304, H315, H336, H361d, H373 P210, P240, P301 + P330 + P331, P302 + P352, P314, P403 + P233 <b>Listor</b> Anmärkning B, AFS 2015:7 Anmärkning H, AFS 2015:7 Begränsningsdatabasen Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport		Vätska	0,1 ml		Lösningsmedel	
<input type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning har genomförts, se kommentar/bilaga. <input checked="" type="radio"/> Ja, halten luftföroreningar i inandningsluften av ämnet vid beskriven hantering är godtagbar utifrån gränsvärdet i AFS 2015:7. Mätning bedöms inte vara nödvändig.						
<b>Kloroform</b> H302, H315, H319, H331, H336, H351, H361d, H372 P261, P280, P281, P302 + P352, P304 + P340, P305 + P351 + P338 <b>Listor</b> PRIO-Databasen Begränsningsdatabasen Naturvårdsverkets föreskrifter om miljörapport Flyktiga organiska föreningar (VOC) Hygieniskt gränsvärde finns Vattendirektivet, bilaga X		Vätska			Lösningsmedel till NMR-prov.	
Hög risk						
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar	
<b>Argon, komprimerade</b> <b>CLP-information</b> H280 P410 + P403		Gas				
<b>Trifluorättiksyra (volym)</b> H314, H332, H412 P260, P301 + P330 + P331, P303 + P361 + P353, P305 + P351 + P338, P405, P501		Vätska	4 µl			
<b>1,3-Cyklohexadien</b> <b>CLP-information</b> H225 P210		Vätska	191 µl			
Låg risk						
Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar	

<b>Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)</b>		Fast	11,56 mg		
---	--	------	----------	--	--

### Egna produkter

Produktnamn	Konc.	Form	Mängd	Fara	Kommentar
<b>C12H15N</b>		Vätska			Produkt, ej med i registret, se ... för molekyl, endast summaformel är anvisad här.

### Faroangivelser

H225	Mycket brandfarlig vätska och ånga.
H280	Innehåller gas under tryck. Kan explodera vid uppvärmning.
H301	Giftigt vid förtäring.
H302	Skadligt vid förtäring.
H304	Kan vara dödligt vid förtäring om det kommer ner i luftvägarna.
H311	Giftigt vid hudkontakt.
H314	Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon.
H315	Irriterar huden.
H317	Kan orsaka allergisk hudreaktion.
H318	Orsakar allvarliga ögonskador.
H319	Orsakar allvarlig ögonirritation.
H331	Giftigt vid inandning.
H332	Skadligt vid inandning.
H336	Kan göra att man blir dåsig eller omtöcknad.
H341	Misstänks kunna orsaka genetiska defekter .
H351	Misstänks kunna orsaka cancer .
H361d	Misstänks kunna skada det ofödda barnet.
H372	Orsakar organskador genom lång eller upprepad exponering .
H373	Kan orsaka organskador genom lång eller upprepad exponering .
H400	Mycket giftigt för vattenlevande organismer.
H410	Mycket giftigt för vattenlevande organismer med långtidseffekter.
H412	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

### Skyddsangivelser

P201	Inhämta särskilda instruktioner före användning.
P210	Får inte utsättas för värme, heta ytor, gnistor, öppna lågor och andra antändningskällor. Rökning förbjuden.
P240	Jorda och potentialförbind behållare och mottagarutrustning.
P260	Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P261	Undvik att andas in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P273	Undvik utsläpp till miljön
P280	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P281	OBS! Skyddsangivelsen existerar inte längre. (Tidigare text: Använd föreskriven personlig skyddsutrustning.)
P301+P310+P330	VID FÖRTÄRING: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Skölj munnen.
P301+P330+P331	VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning.
P302+P352	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket vatten/... OBSERVERA! Skyddsangivelsen kräver specificering av leverantör/tillverkare, för exakt formulering se säkerhetsdatabladet.
P303+P361+P353	VID HUDKONTAKT (även håret): Ta omedelbart av alla nedstänkta kläder. Skölj huden med vatten [eller duscha].
P304+P340	VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas.
P305+P351+P338	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P314	Sök läkarhjälp vid obehag.
P403+P233	Förvaras på väl ventilerad plats. Behållaren ska vara väl tillsluten.
P405	Förvaras inlåst.
P410+P403	Skyddas från solljus. Förvaras på väl ventilerad plats.
P501	Innehållet/behållaren lämnas till ... i enlighet med lokala/regionala/nationella/internationella bestämmelser (ska anges)

### Kemikaliernas inneboende risk

b: Hög risk;

Små mängder av de mest riskfyllda kemikalierna, till exempel anilin.

### Exponeringsnivå

Låg;

### Skyddsventilation

Skyddsnivå 2 - dragskåp e.d.;

### Biologiskt material

Ej relevant;

**Eventuellt samverkande effekter och möjliga reaktioner**

---

**Krav på lokal och utrustning i lokal**

---

Ventilation;

**Specifisering av förvaring**

---

Ventilerat skåp;

**Får ej förvaras tillsammans med.**

---

Syror; Organiska ämnen; Salpetersyra; Oxiderande ämnen; Annat;

Värme, gnistor, heta ytor.

**Krav på skyltning**

---

Gasflaskor; Försök pågår under natten; Kemikalier; Nödutrustning;

**Personlig skyddsutrustning**

---

Skyddsglasögon/visir; Skyddshandskar; Skyddsrock;

**Beskriv teknisk utrustning**

---

Se laborationshandledningar i bilaga ... (?)

**Yttre miljö**

---

Utsläpp till luft;

Bildades någon typ av gas efter att allt hade blandats i kärlet.

**Avfallshantering**

---

Kemiskt avfall;

**Första hjälpen samt beredskap inför olycka, brand och spill**

---

Förstahjälpentavla; Nöddusch; Ögondusch; Brandsläckare vatten; Brandsläckare skum; Brandsläckare kolsyra; Brandfilt;

**Arbetsmoment och omständigheter som är riskfyllda**

---

Blandning; Ventilationsavbrott;

**Slutlig bedömning av hela metoden**

---

2. Viss risk;

**Deltagande personer i riskbedömningen**

---

Hanna Svensson, Sofie Svennungsson, Emilia Sandolf, Christian Åkesson, John Forsberg, Tommy Sy.

**Signatur Ansvarig chef**

---

Nina Kann

**Datum**

---

# C

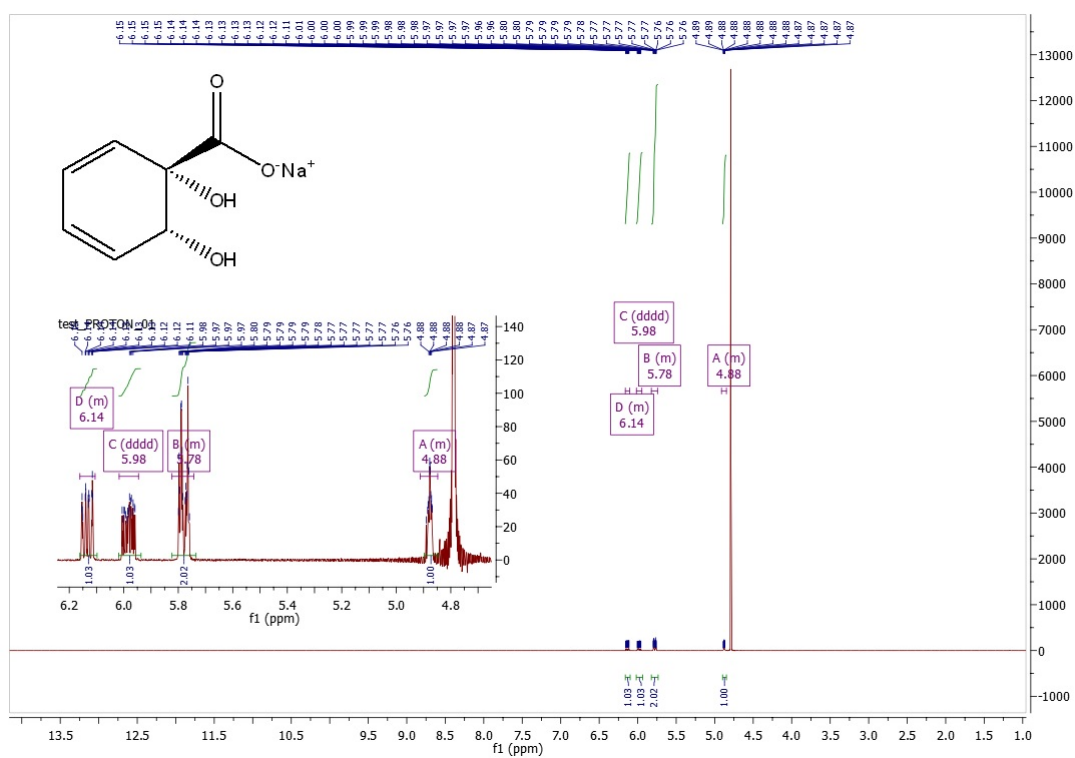
## Appendix C

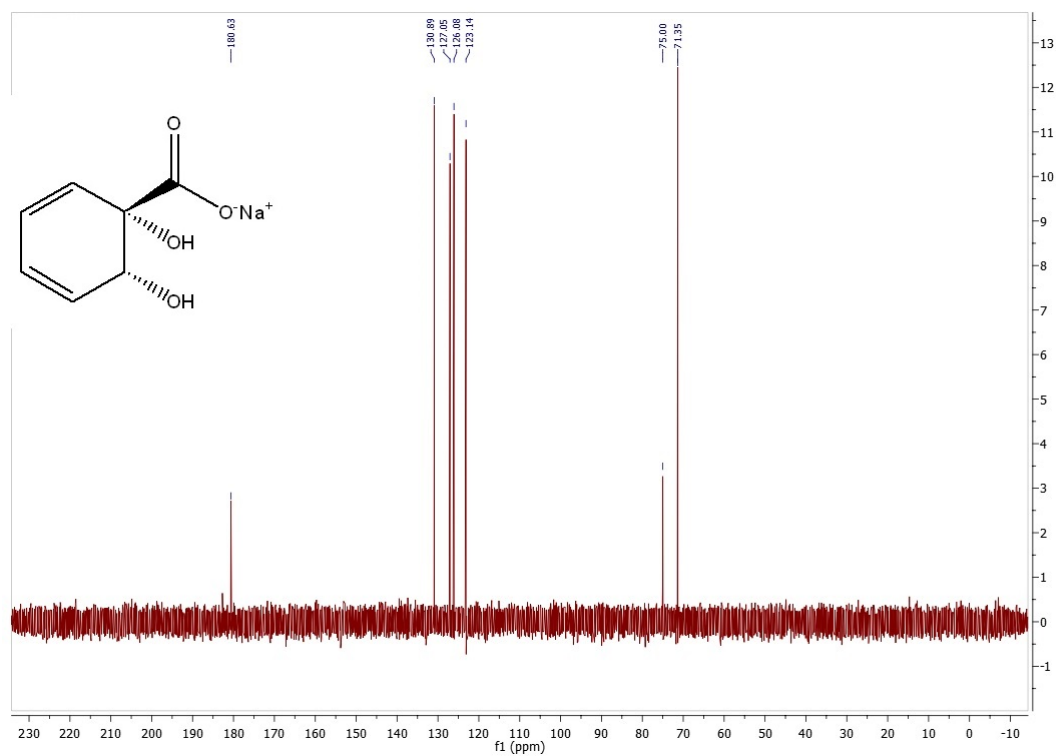
### C.1 Spektroskopiska data

#### C.1.1 Biotransformation

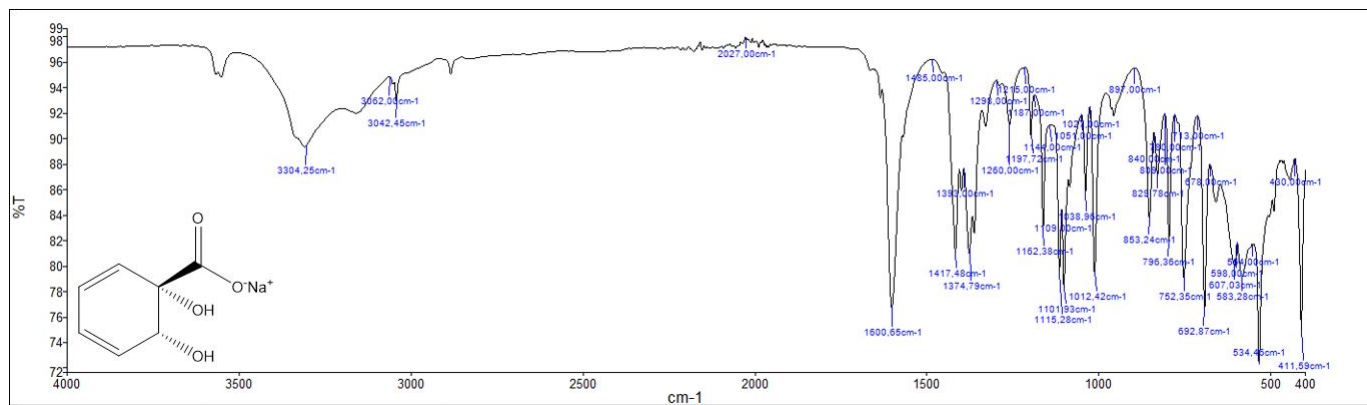
##### C.1.1.1 Natrium (1*S*,6*R*)-1,6-dihydroxicyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat (4a)

###### C.1.1.1.1 $^1\text{H}$ NMR



C.1.1.1.2  $^{13}\text{C}$  NMR

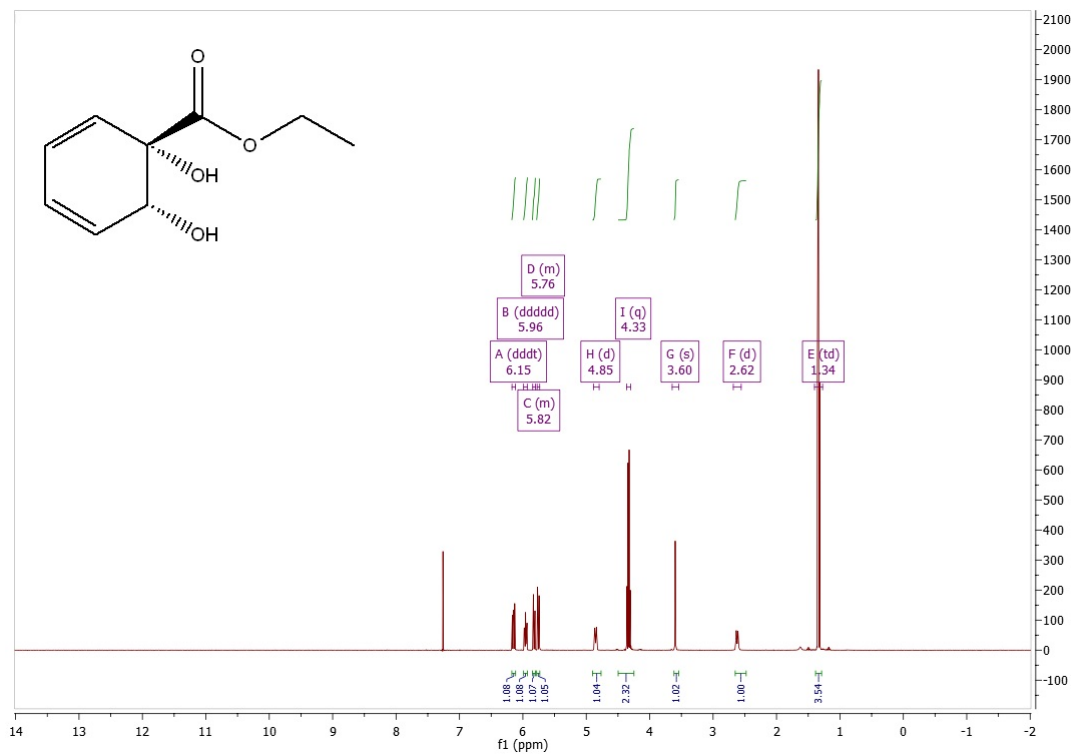
## C.1.1.1.3 IR



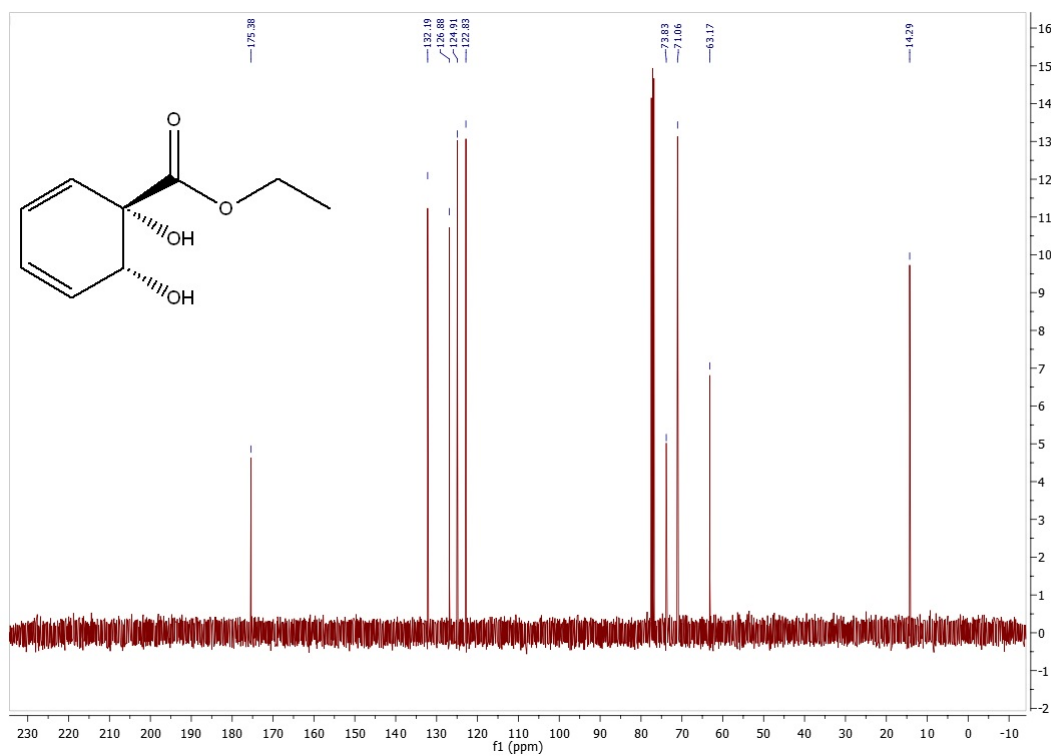
## C.1.2 Förestring

### C.1.2.1 Etyl (1*S*,6*R*)-1,6-dihydroxycyklohexa-2,4-dien-1-karboxylat (5)

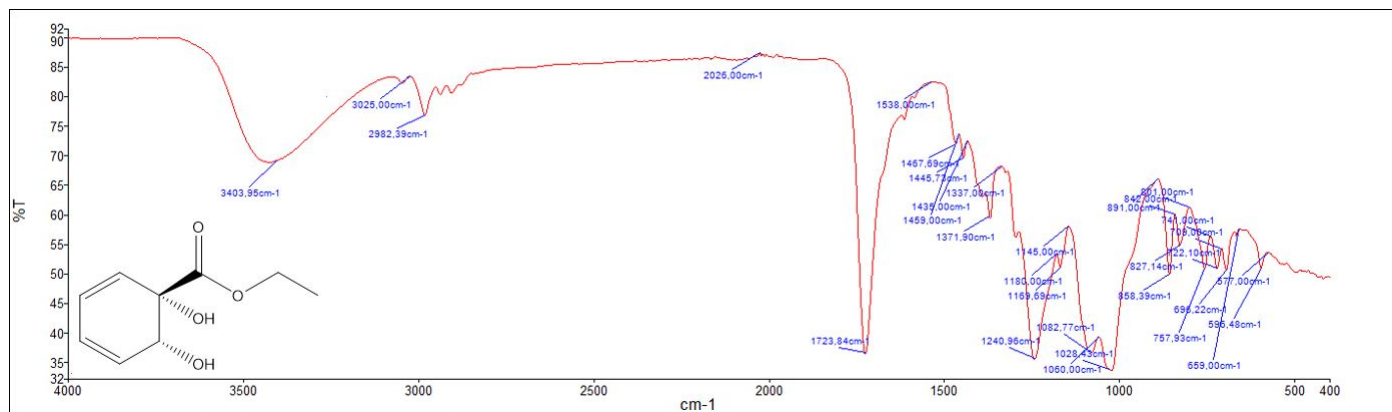
#### C.1.2.1.1 $^1\text{H}$ NMR





$^{13}\text{C}$  NMR

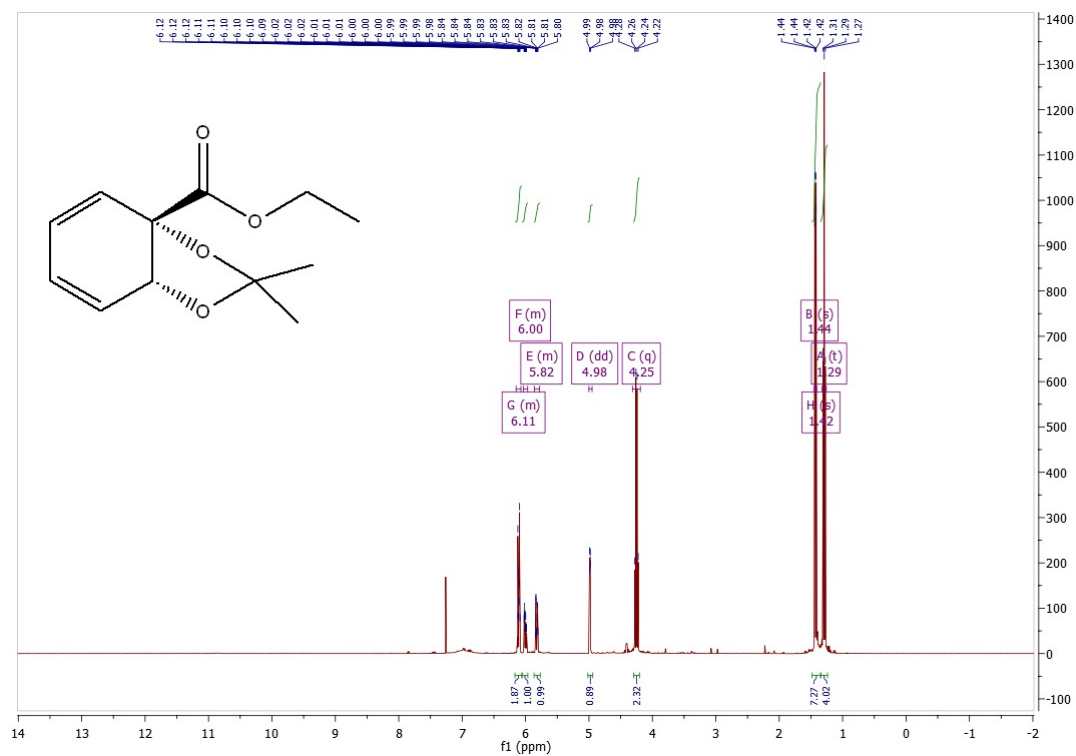
## C.1.2.1.2 IR

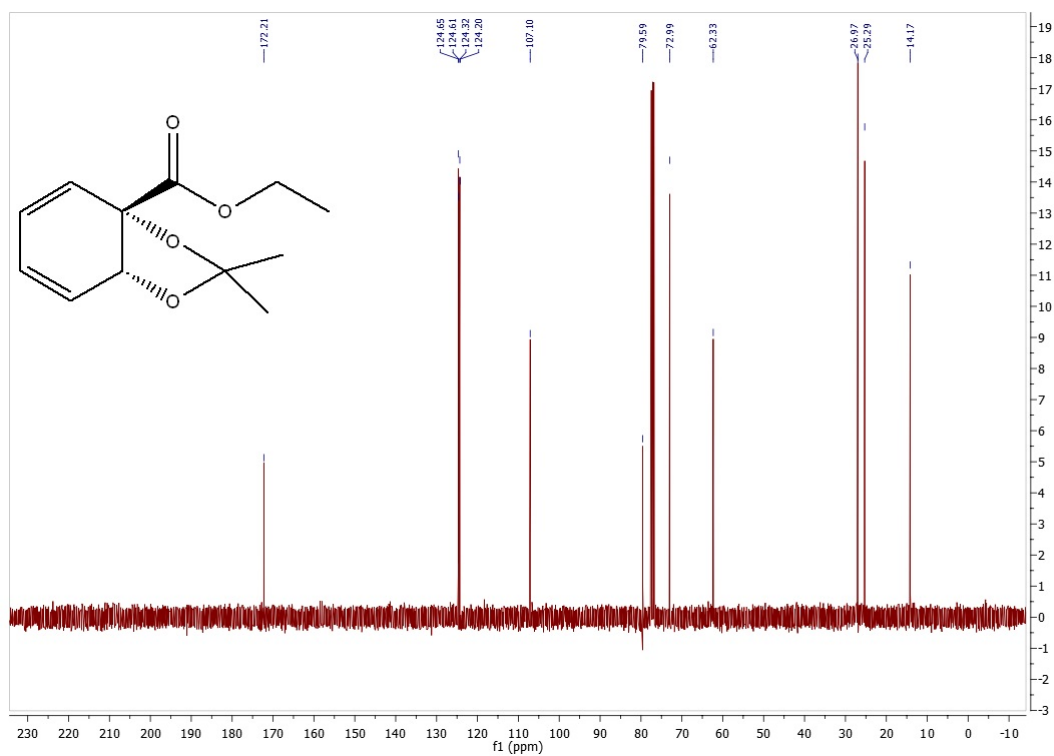


## C.1.3 Ketalbildung

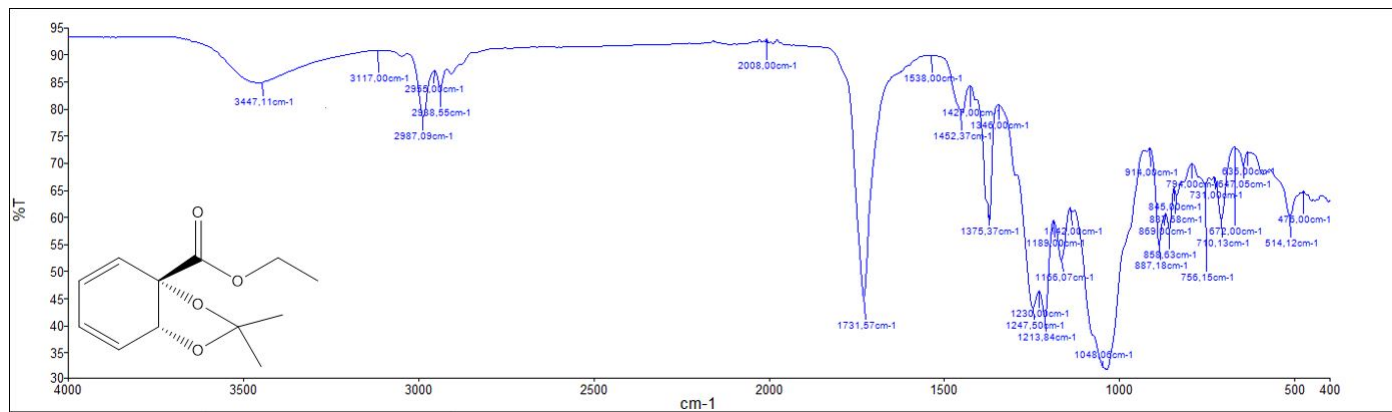
### C.1.3.1 Ethyl (3*aS*,7*aR*)-2,2-dimethylbenzo[d][1,3]dioxol-3*a*(7*aH*)-karboxylat (6)

#### C.1.3.1.1 $^1\text{H}$ NMR



C.1.3.1.2  $^{13}\text{C}$  NMR

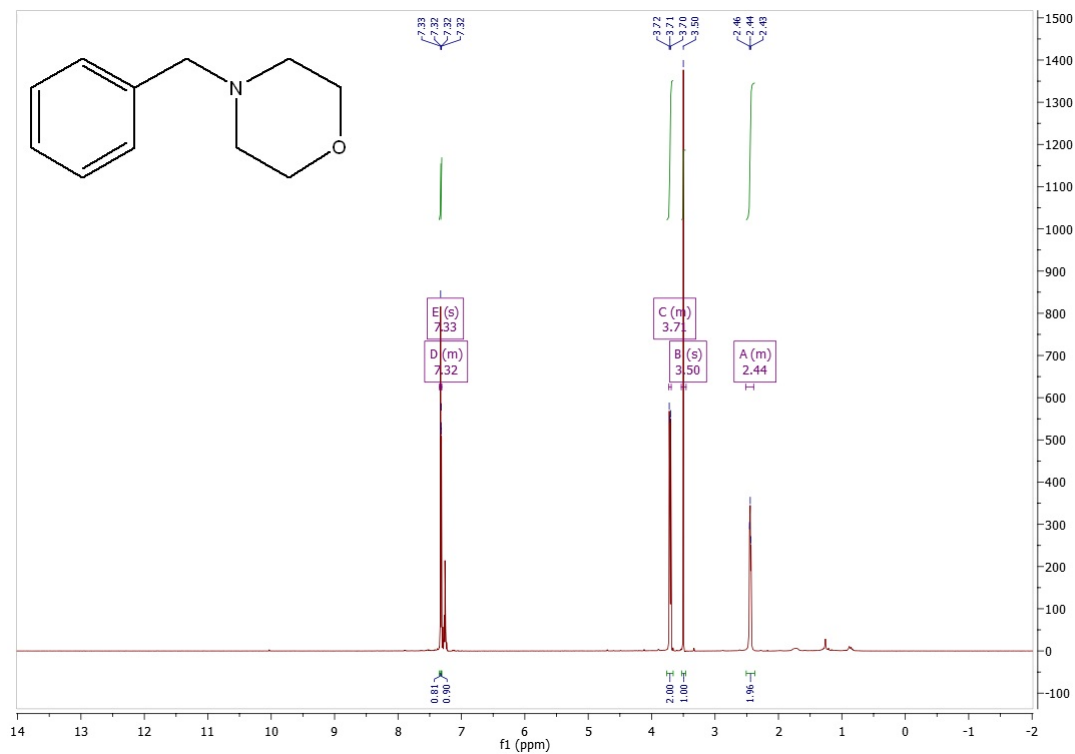
## C.1.3.1.3 IR



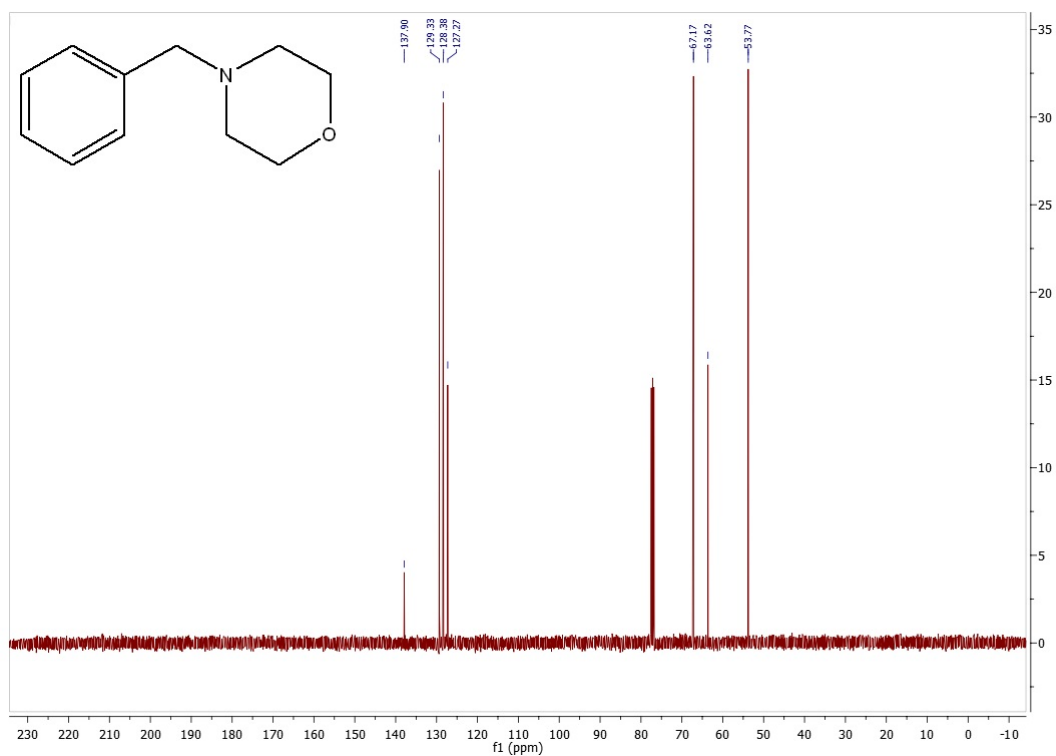
## C.1.4 Hydrogen Borrowing (HB)

### C.1.4.1 4-Benzylmorpholin (7)

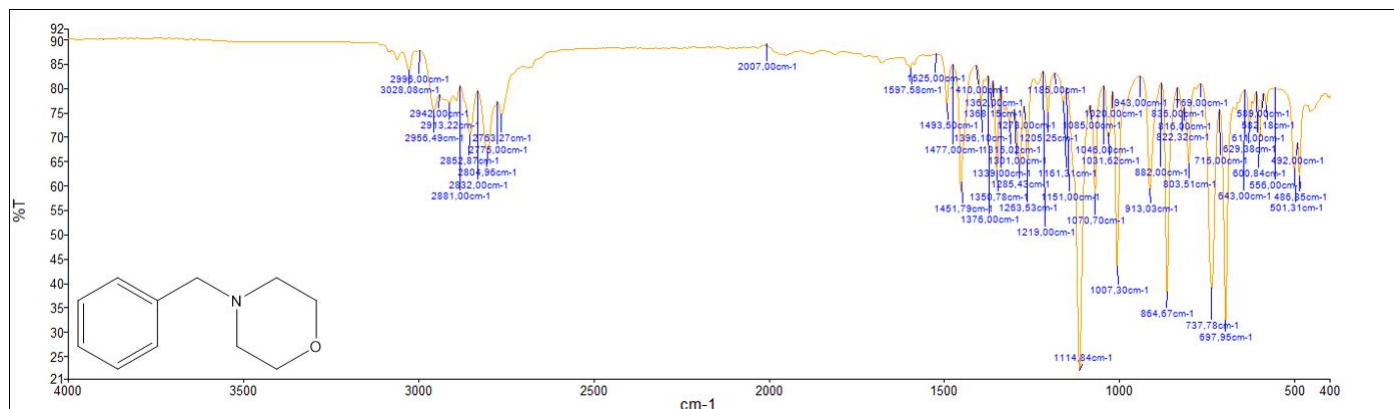
#### C.1.4.1.1 $^1\text{H}$ NMR



#### C.1.4.1.2 $^{13}\text{C}$ NMR

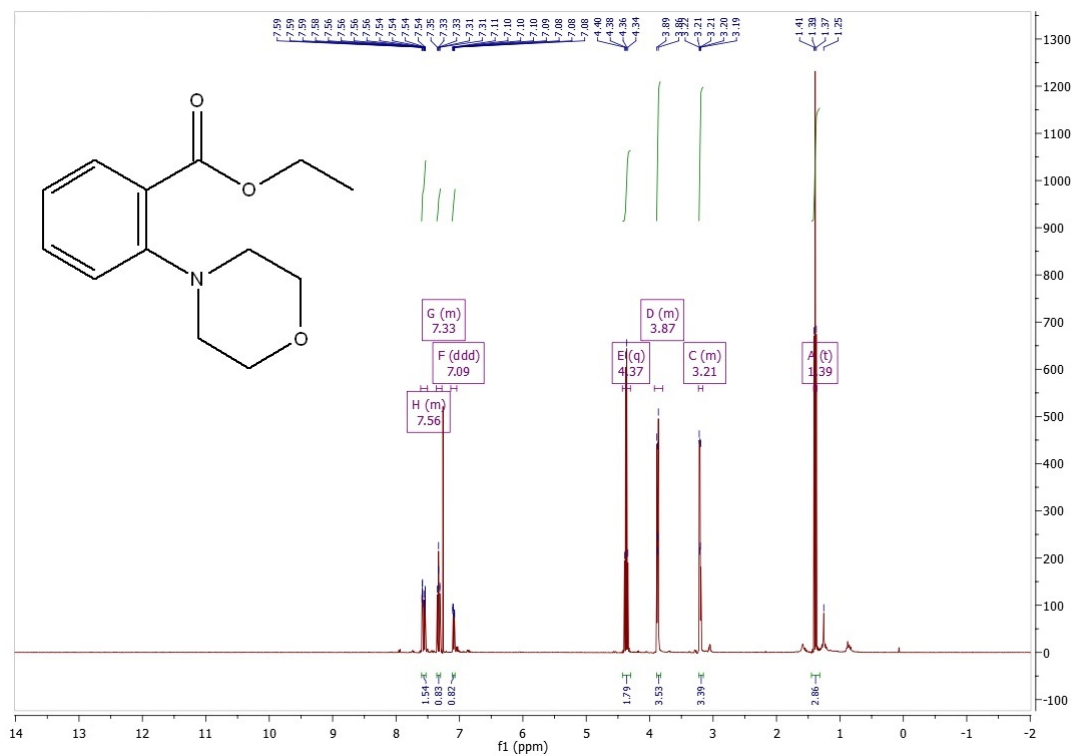


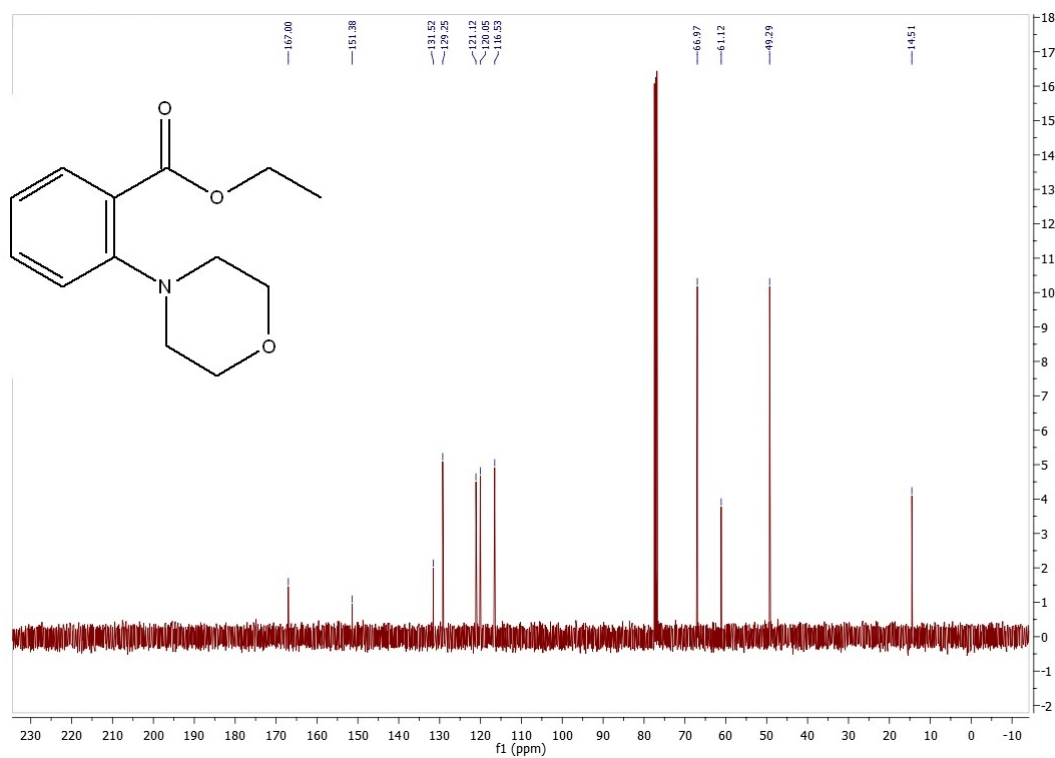
C.1.4.1.3 IR



C.1.4.2 Ethyl 2-morfolinbensoat (15)

C.1.4.2.1 <sup>1</sup>H NMR



C.1.4.2.2  $^{13}\text{C}$  NMR

## C.1.4.2.3 IR

