



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Synthesis and EPR Studies of New Lipophilic Spin  
Traps, the Pregnenolone Steroidal Analogues of the Spin Trap  
BMPO

โดย ดร.วิชชา อิ่มอร่าม

มีนาคม 2559

สัญญาเลขที่ MRG5680075

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ Synthesis and EPR Studies of New Lipophilic Spin  
Traps, the Pregnenolone Steroidal Analogues of the Spin Trap  
BMPO

ผู้วิจัย ดร.วิชชา อิ่มอร่าม

สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย  
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

**Abstract (บทคัดย่อ)**

---

**Project Code : MRG5680075**

(รหัสโครงการ)

**Project Title : Synthesis and EPR Studies of New Lipophilic Spin Traps, the Pregnenolone Steroidal Analogues of the Spin Trap BMPO**

(ชื่อโครงการ)

**Investigator : ดร.วิชา อิ่มอร่าม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์**  
(ชื่อนักวิจัย)

**E-mail Address : fsciwci@ku.ac.th**

**Project Period :2 ปี**

(ระยะเวลาโครงการ)

เทคนิค EPR spin trapping เป็นเทคนิคที่มีความจำเพาะต่อการศึกษารังสีอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นทั้งในปฏิกิริยาในหลอดทดลองและในระบบชีววิทยา ที่ผ่านมามีการพัฒนาสังเคราะห์สารดักจับอนุมูลอิสระ หรือ spin trap ขึ้นมาหลายประเภทที่ทำให้ spin adduct ที่เกิดขึ้นมีครึ่งชีวิตที่ยาวขึ้นและมีสมบัติสามารถแทรกซึมเข้าไปในส่วนที่จำเพาะเจาะจงของเซลล์ได้เพื่อศึกษากระบวนการชีวเคมีเฉพาะอย่าง ซึ่งจะให้ข้อมูลที่มีความสำคัญเกี่ยวกับประเภทของสารอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์และอาจรวมถึงกลไกการทำลายเซลล์โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารอนุมูลอิสระนั้นๆ อีกด้วย หนึ่งในอันตรกิริยาที่สำคัญระหว่างสารอนุมูลอิสระกับเซลล์ก็คือ lipid peroxidation แต่เนื่องจากที่ผ่านมานั้นยังไม่มีงานวิจัยพัฒนา spin trap ที่เหมาะสมต่อการแทรกซึมเข้าไปในส่วน lipophilic ของเซลล์ได้ดีพอ ทำให้งานวิจัยทางด้าน EPR spin trapping กับ lipid peroxidation มีอยู่น้อย นอกจากนี้ความท้าทายในการพัฒนา spin trap อีกด้านหนึ่งก็คือการพัฒนาให้ spin adduct สามารถทนต่อการเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในระบบของเซลล์มีชีวิตได้ ในที่นี้ผู้วิจัยจะรายงานการสังเคราะห์ lipophilic nitron spin traps ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของสเตอรอยด์ pregnenolone และ BMPO โดยผู้วิจัยคาดว่า spin trap ที่สังเคราะห์ขึ้นจะให้ spin adduct ที่มีครึ่งชีวิตยาวพอสำหรับการศึกษาดูด้วยเทคนิค EPR แล้วให้ EPR spectrum ที่ไม่ซับซ้อนต่อการ

แปลผล นอกจากนี้ผู้วิจัยคิดว่า spin trap ชนิดใหม่นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการศึกษากระบวนการ lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในเซลล์ไขมันเช่น adipocytes ได้

**Keywords :** EPR spin trapping, BMPO, steroid, pregnenolone, free radical  
(คำหลัก)

EPR spin trapping is a method of choice to study reactive radical species generated in vitro and in vivo. Recently, several spin trapping agents have been created to not only prolong the life time of the spin adducts but also be able to localized in a specific cellular compartment. This cellular targeted spin trap could give valuable information regarding the types of the damaging radicals as well as their oxidative mechanism. Lipid peroxidation is one of the most common oxidative damages in the biological system. However, due to the lack of suitable spin trapping agents that can localize in the lipophilic cellular compartment, few EPR spin trapping experiments have been employed in this research field. Moreover, one of the greatest challenges to conduct a spin trapping experiment in in vivo is to have persistent spin adducts against physiological antioxidants. We are interested in designing new lipophilic nitron spin traps that can capture free radicals generated in lipophilic environment and can withstand reduction by antioxidants rendering EPR silence. Herein, we report the synthesis of new lipophilic nitron spin traps derived from a steroid unit pregnenolone and a nitron unit similar to BMPO. These spin trapping agents are expected to yield persistent spin adducts and give relatively simple EPR spectra. The new lipophilic spin traps can potentially be applied to study the mechanism of lipid peroxidation in fat cells such as adipocytes.

**Keywords :** EPR spin trapping, BMPO, steroid, pregnenolone, free radical

## Executive Summary

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์สารดักจับอนุมูลอิสระ (spin trap) ที่มีส่วนประกอบของสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีคุณสมบัติแทรกซึมเข้าไปในลิพิดได้ ทำให้เกิด radical adduct ที่มีความเสถียรสูงและให้ EPR spectrum ที่ไม่ซับซ้อน
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของหมู่ tertiary และ secondary alkoxy group ที่มีต่อเสถียรภาพของ spin adduct
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารดักจับอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ได้ในการวิเคราะห์ตรวจจับสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ cyclodextrin dimer ในการปกป้องสารดักจับอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยารีดักชัน และ ascorbate ion

### สรุปผลงานวิจัยตลอดระยะเวลาดำเนินการ

- วัตถุประสงค์ (ตามแผน)
  - สังเคราะห์ Spin trap จำนวน 2 ชนิด
  - ทดสอบสมบัติของ spin trap ที่ได้
  - ทดสอบสมบัติของ spin trap ในสถานะที่มี beta-cyclodextrin
- เป้าหมาย/ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)
  - สามารถสังเคราะห์ spin trap ที่ต้องการได้ในปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบสมบัติของ spin trap
  - ดำเนินการทดสอบการดักจับ free radical ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ
  - สามารถหา half-life ของ spin adduct ในสถานะที่มี antioxidant เช่น ascorbate เปรียบเทียบระหว่างสถานะที่มีและไม่มี beta-cyclodextrin dimers
- ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)
  - สามารถสังเคราะห์ lipophilic nitron spin trap ได้ 1 ชนิดจากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาข้างเคียงแต่ยังได้รับร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ต่ำซึ่งไม่เพียงพอในการนำไปใช้ทดสอบ EPR spin trapping ต่อ
  - ยังไม่ได้ดำเนินการ
  - ยังไม่ได้ดำเนินการ

## ผลการดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนหรือไม่อย่างไร

- ไม่เป็นไปตามแผน เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ lipophilic nitron spin trap ทั้ง 2 ชนิดตามแผนการทดลองได้ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ lipophilic nitron spin trap จากผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาข้างเคียงได้ แต่เนื่องจากการสังเคราะห์ได้รับปริมาณที่ต่ำ จึงยังไม่สามารถนำไปทดสอบสมบัติการเป็น spin trap ได้

## ปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

- มีปัญหาและอุปสรรคด้านปัจจัยการวิจัย
  - ใช้เวลารอสารเคมีที่สั่งนาน สารบางตัวไม่สามารถนำเข้าได้ ทำให้ต้องใช้วิธีการสังเคราะห์ที่มีจำนวนขั้นตอนมากกว่า ซึ่งบ่อยครั้งเป็นการลองผิดลองถูกทำให้ใช้เวลาวิจัยนาน
  - ขอเสนอให้ทางหน่วยงานที่เกี่ยวข้องช่วยหามาตรการที่จะอำนวยความสะดวกในการนำเข้าสารควบคุมได้อย่างรวดเร็วมากขึ้น

## งานที่จะทำต่อไป

- การมีอยู่ของพันธะคู่ในวง B ของสเตอรอยด์ที่เป็นสารตั้งต้นทำให้เกิดปัญหาในขั้นตอนการ oxidize เพื่อให้ได้ nitron ในขั้นตอนการสังเคราะห์ตอนท้ายทำให้เกิดปฏิกิริยาข้างเคียงที่ไม่ต้องการ ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสเตอรอยด์กลุ่มอื่นที่ไม่มีพันธะคู่ในวง B เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาดังกล่าวและจะดำเนินงานวิจัยตามแผนที่เหลือต่อไป

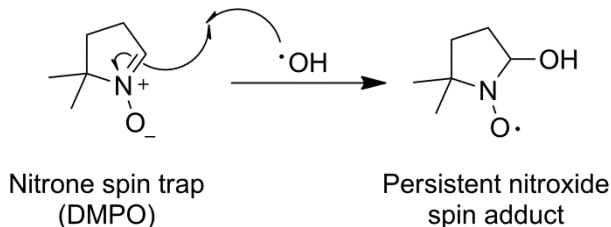
## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สารอนุมูลอิสระ หรือ free radical เป็นสารเคมีที่ประกอบด้วยอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ซึ่งมักจะมีครึ่งชีวิตที่สั้นมาก เนื่องจากสารอนุมูลอิสระมีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาสูง โดยมักจะมีสมบัติเป็นสารออกซิไดซ์เป็นส่วนใหญ่ สิ่งมีชีวิตมีสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นตลอดเวลา เพราะมันมีความสำคัญต่อกระบวนการทางชีวเคมีหลายกระบวนการในร่างกาย ร่างกายสามารถควบคุมการทำงานของสารอนุมูลอิสระให้ทำงานเป็นปกติได้โดยการรักษาสสมดุลระหว่างสภาวะออกซิไดซ์และสภาวะรีดิวซ์ แต่หากสิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่ร่างกายเสียสมดุลนี้ไป เช่น อยู่ภายใต้ความเครียด (oxidative stress) ทำให้มีสารอนุมูลอิสระอยู่ในระบบของร่างกายมากเกินไปก็อาจจะเป็นโทษต่อร่างกายได้

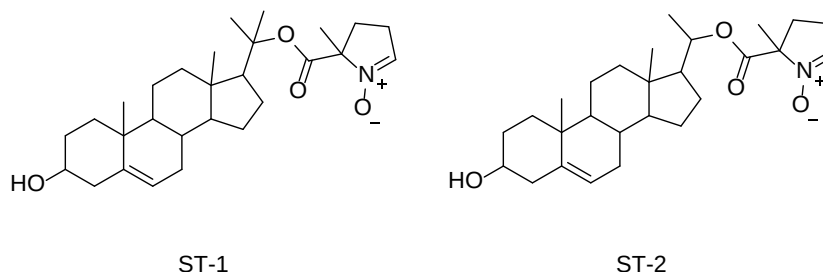
สารอนุมูลอิสระโดยเฉพาะพวกที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (reactive oxygen species, ROS) สามารถก่อความเสียหายต่อเซลล์ในร่างกายนำไปสู่การตายของเซลล์ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่โรคที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของร่างกายหลายโรค เช่นการเกิดพยาธิสภาพในภาวะเนื้อเยื่อขาดเลือด (ischemia), การบาดเจ็บของเนื้อเยื่อภายหลังจากการขาดเลือด (post-ischemic reperfusion damage), กระบวนการอักเสบของร่างกาย (inflammatory process), มะเร็ง, และโรคเกี่ยวกับความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disease) นอกจากนี้ ROS ยังสามารถเกิดขึ้นได้เป็นปริมาณมากเมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะที่มีความเครียด ซึ่งเป็นสาเหตุนำไปสู่การเกิดโรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง โรคหัวใจ และ โรคอ้วนลงพุง (metabolic syndrome) นักวิจัยบางกลุ่มสันนิษฐานว่า ROS อาจจะไปทำลายองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ เช่น DNA, โปรตีน, เอนไซม์ หรือ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน แต่กลไกของการเกิดปฏิกิริยาเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่งก็คือนักวิจัยไม่มีวิธีตรวจจับและวิเคราะห์ชนิดของสารอนุมูลอิสระที่เป็นต้นเหตุของโรคเหล่านี้ได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นการวิจัยพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ตรวจจับและวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระจึงเป็นกุญแจสำคัญในการค้นคว้าหาทางรักษาโรคที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระนี้

หนึ่งในเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์สารอนุมูลอิสระก็คือ Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้สารเคมีที่มีหมู่ฟังก์ชัน nitron เรียกว่า spin trap ทำหน้าที่ดักจับสารอนุมูลอิสระที่มีครึ่งชีวิตสั้นมาก ทำให้ได้สารอนุมูลอิสระทุติยภูมิที่เรียกว่า nitroxide spin adduct ซึ่งมีครึ่งชีวิตที่นานพอที่จะสามารถนำไปวิเคราะห์ได้ด้วย EPR spectrometer



การพัฒนา spin trap ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา ไม่เพียงแต่จะมีการสังเคราะห์ spin trap ใหม่ๆ เพื่อให้ได้ spin adduct ที่มีความเสถียรมากขึ้นเท่านั้น แต่ยังได้มีการพัฒนาสังเคราะห์ spin trap ให้มีคุณสมบัติสามารถแทรกซึมเข้าไปในส่วนที่จำเพาะเจาะจงของเซลล์ได้เพื่อศึกษากระบวนการชีวเคมีเฉพาะอย่าง ยกตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Lipid peroxidation) ซึ่งเป็นกระบวนการ

สำคัญอันหนึ่งที่น่าไปสู่การตายของเซลล์ การออกแบบ spin trap ให้สามารถแทรกซึมเข้าไปในชั้นของลิพิดเพื่อดักจับสารอนุมูลอิสระที่เป็นต้นเหตุของปฏิกิริยา lipid peroxidation จึงเป็นงานวิจัยที่ทำหายและมีความสำคัญ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะสังเคราะห์ spin trap ชนิดใหม่ (ST-1 และ ST-2, Figure 1) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ BMPO ที่มีองค์ประกอบของสเตอรอยด์ที่เตรียมจาก pregnenolone ซึ่งมีคุณสมบัติที่จะสามารถแทรกซึมเข้าไปในลิพิดได้



**Figure 1** แสดงโครงสร้างของ lipophilic nitron spin trap เป้าหมาย ST-1 และ ST-2

#### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์สารดักจับอนุมูลอิสระ (spin trap) ที่มีส่วนประกอบของสเตอรอยด์เป็นองค์ประกอบซึ่งมีคุณสมบัติแทรกซึมเข้าไปในลิพิดได้ ทำให้เกิด radical adduct ที่มีความเสถียรสูงและให้ EPR spectrum ที่ไม่ซับซ้อน
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของหมู่ tertiary และ secondary alkoxy group ที่มีต่อเสถียรภาพของ spin adduct
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารดักจับอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ได้ในการวิเคราะห์ตรวจจับสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ
4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของ cyclodextrin dimer ในการปกป้องสารดักจับอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยา reduction และ ascorbate ion

#### ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้จะแบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกจะเป็นการสังเคราะห์ spin trap ชนิดใหม่ที่เป็นอนุพันธ์ของสเตอรอยด์และ BMPO เมื่อได้ spin trap แล้วในขั้นต่อไปจะเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของ spin trap ในการดักจับสารอนุมูลอิสระชนิดต่างๆ ในตัวทำละลายอินทรีย์ซึ่งจะเป็นการจำลองสภาวะของปฏิกิริยาแทนการทำปฏิกิริยาในลิพิด

#### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ เช่น Journal of Organic Chemistry (impact factor: 4.002) ในหัวข้อ Synthesis and EPR Studies of New Pregnenolone Analogues of the Spin Trap BMPO



2. สามารถนำ spin trap ชนิดใหม่ที่เตรียมได้ไปต่อยอดศึกษากลไกของปฏิกิริยา lipid peroxidation ในสิ่งมีชีวิตได้
3. นิสิตหรือนักวิจัยที่ร่วมโครงการนี้จะได้รับความรู้และระเบียบวิธีวิจัยที่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์สารเคมีอินทรีย์และการใช้เทคนิค EPR spin trapping ซึ่งจะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญสำหรับการศึกษาในขั้นที่สูงขึ้น
4. เทคนิค electron paramagnetic resonance เป็นศาสตร์ที่ไม่แพร่หลายในประเทศไทย งานวิจัยนี้จะสร้างโอกาสให้กับนิสิตและนักวิจัยรุ่นใหม่ได้ศึกษาศาสตร์ด้านนี้ อันจะนำไปสู่การสร้างองค์ความรู้ใหม่และโอกาสที่จะสร้างเครือข่ายของงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ EPR ในประเทศไทยในอนาคต

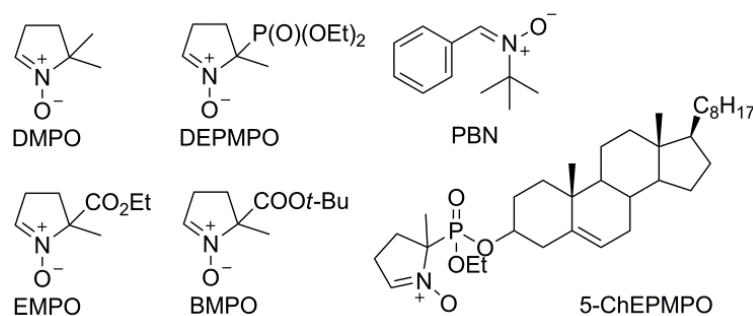


Figure 2 แสดง spin traps ชนิดต่างๆ

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เทคนิค EPR spin trapping เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสารอนุมูลอิสระ โดยความท้าทายของงานวิจัยทางด้านนี้ไม่เพียงแต่ต้องการสังเคราะห์ spin trap ที่ให้ spin adduct ที่มีความเสถียรเท่านั้น แต่ยังรวมถึงการออกแบบให้ได้ spin trap ชนิดใหม่ที่แสดง EPR spectrum เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสารอนุมูลอิสระที่ spin trap ดักจับได้แต่ละชนิด ยกตัวอย่างเช่น 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide หรือ DMPO (Figure 2) เป็น spin trap ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจจับ ROS แต่ DMPO มีข้อเสียที่สำคัญคือ DMPO-superoxide spin adduct ไม่เสถียร สามารถสลายตัวเปลี่ยนเป็น DMPO-hydroxyl spin adduct<sup>1</sup> ได้เอง ดังนั้น EPR spectrum ที่ได้จากปฏิกิริยาที่สร้าง superoxide radical จะเหมือนกับ EPR spectrum ที่ได้จากปฏิกิริยาที่ให้ hydroxyl radical ซึ่งอาจนำไปสู่การแปลผลที่ผิดพลาดได้ เพื่อแก้ไขปัญหานี้ของ DMPO ในจุดนี้ นักวิจัยจึงได้มีการพัฒนา spin traps ออกมาโดยมีโครงสร้างพื้นฐานที่เป็นวงเหมือนกับ DMPO เช่น 5-(dimethoxyphosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO)<sup>2</sup> และ 5-ethoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (EMPO)<sup>3</sup> โดย spin trap ทั้งสองชนิดนี้ถูกนำไปใช้ตรวจจับ superoxide radical ได้ดีโดยไม่แสดงปัญหาการสลายตัวให้ hydroxyl radical adducts แต่อย่างไรก็ตาม DEPMPO และ EMPO ที่มีขายอยู่ในท้องตลาดนั้นมีการปนเปื้อนของสาร nitroxide และไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเนื่องจากสามารถทำปฏิกิริยากับความชื้นได้ง่าย<sup>4</sup> ดังนั้นก่อนใช้ DEPMPO หรือ EMPO จึงต้องมีการทำสารให้

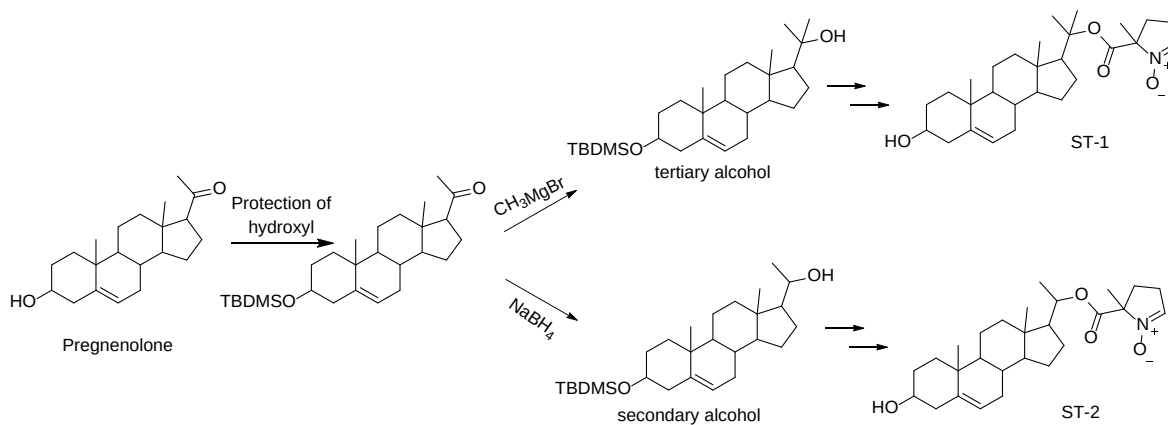
บริสุทธิ์เสียก่อนซึ่งส่งผลให้เสียเวลาและงบประมาณเพิ่มขึ้น เพื่อแก้ปัญหานี้ Zhao และคณะ จึงได้ทำการสังเคราะห์ 5-*tert*-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide หรือ BMPO<sup>4</sup> ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพการดักจับ superoxide radical anion และ thiyl radical ได้ดีกว่า DEPMPO และไม่มีปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของสาร nitroxide นอกจากนี้ EPR spectrum ที่ได้จาก BMPO ก็มีความสลับซับซ้อนน้อยกว่า DEPMPO เนื่องจาก DEPMPO มีอะตอม phosphorus เป็นองค์ประกอบซึ่งจะทำให้เกิดการแตกของสัญญาณ EPR signal (hyperfine splitting) เพิ่มขึ้นจึงทำให้ EPR spectrum ที่ได้มีความซับซ้อนและยากต่อการวิเคราะห์ผล

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาแนวโน้มของการพัฒนา spin trap จะเป็นการออกแบบให้ spin trap สามารถแทรกซึมเข้าไปในองค์ประกอบ (organelle) ต่างๆ ของเซลล์หรือบริเวณใดบริเวณหนึ่งของเซลล์ได้ ยกตัวอย่างเช่น ได้มีการสังเคราะห์ spin trap ที่เป็นอนุพันธ์ของ  $\alpha$ -phenyl-*N*-*tert*-butyl nitron (PBN)<sup>5-9</sup> ให้มีคุณสมบัติที่ละลายในไขมันได้ดีหรือมีความเป็น lipophilicity เพื่อที่จะสามารถเข้าไปจับสารอนุมูลอิสระในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีลึงพิดเป็นองค์ประกอบ โดยอนุพันธ์ของ PBN นี้บางตัวยังออกฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้ แต่ PBN มีข้อเสียคือเมื่อนำไปใช้ตรวจจับกับ สารอนุมูลอิสระของออกซิเจน เช่น hydroxyl หรือ superoxide เสถียรภาพของ spin adduct ที่เกิดขึ้นนั้นต่ำมาก<sup>10</sup> ตรงกันข้ามกับ spin trap พวก cyclic nitron เช่น DEPMPO ที่มีความเหมาะสมมากกว่าในการตรวจจับสารอนุมูลอิสระของออกซิเจน ดังนั้น Hardy และคณะ<sup>11</sup> จึงเสนอ lipophilic spin trap ชนิดใหม่นั้นคือ 5-(Cholesteryloxyethoxy-phosphoryl)-5-methylpyrroline *N*-oxide (5-ChEPMPO) (Figure 2) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ DEPMPO โดยมีคอเลสเตอรอลเป็นองค์ประกอบทำให้สามารถละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วได้ โดย Hardy และคณะรายงานว่า 5-ChEPMPO มีประสิทธิภาพในการทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ DEPMPO

## วิธีทดลอง

สำหรับงานวิจัยนี้จะแบ่งลักษณะงานวิจัยออกเป็น 2 ส่วนหลัก คือ 1) การสังเคราะห์ Spin trap ST-1 และ ST-2 และ 2) การทดลอง EPR spin trapping

Scheme 1



## 1. การสังเคราะห์ Spin trap ST-1 และ ST-2

แนวทางการสังเคราะห์ spin trap ST-1 และ ST-2 ซึ่งมีองค์ประกอบของสเตอรอยด์อนุพันธ์ของ pregnenolone นั้นจะแบ่งการสังเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 จะเป็นการเตรียม tertiary และ secondary alcohol จาก pregnenolone หลังจากนั้นในขั้นที่ 2 จะนำ alcohols ที่ได้ไปทำการสังเคราะห์เติมหมู่ nitron เข้าไป (Scheme 1) โครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือทาง spectroscopy ต่างๆ เช่น NMR, IR, และ Mass spectrometry

## 2. การทดลอง EPR spin trapping

ในส่วนของการทดลอง EPR spin trapping ได้วางแผนการวิจัยไว้เป็น 2 ส่วน ดังนี้

2.1 การศึกษาสมบัติของ spin trap จะทำการเปรียบเทียบสมบัติของ spin trap ที่ได้กับ BMPO ภายใต้ตัวแปรควบคุมเดียวกันในการดักจับ free radical ที่เตรียมขึ้นจากปฏิกิริยาเคมีต่างๆ

2.2 การศึกษาสมบัติของ spin trap ในสภาวะที่มี beta-cyclodextrin dimers โดยใช้เทคนิค EPR จะทำการศึกษาค่า half-life ของ spin adduct เมื่อมีตัว reduce คือ ascorbate เปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีและไม่มี beta-cyclodextrin dimers

ในระหว่างที่เขียนรายงานฉบับนี้ผู้วิจัยสามารถสังเคราะห์ nitron spin trap ได้ แต่ปริมาณสารที่สังเคราะห์ได้ยังไม่เพียงพอต่อการทำการทดลอง EPR spin trapping จึงอยู่ในระหว่างทำการสังเคราะห์เพิ่มเติมให้เพียงพอต่อการทดลอง EPR spin trapping ดังนั้นในรายงานฉบับนี้ผู้วิจัยจะขอรายงานผลการทดลองเฉพาะส่วนที่ได้จากการสังเคราะห์ Spin trap ST-1 และ ST-2

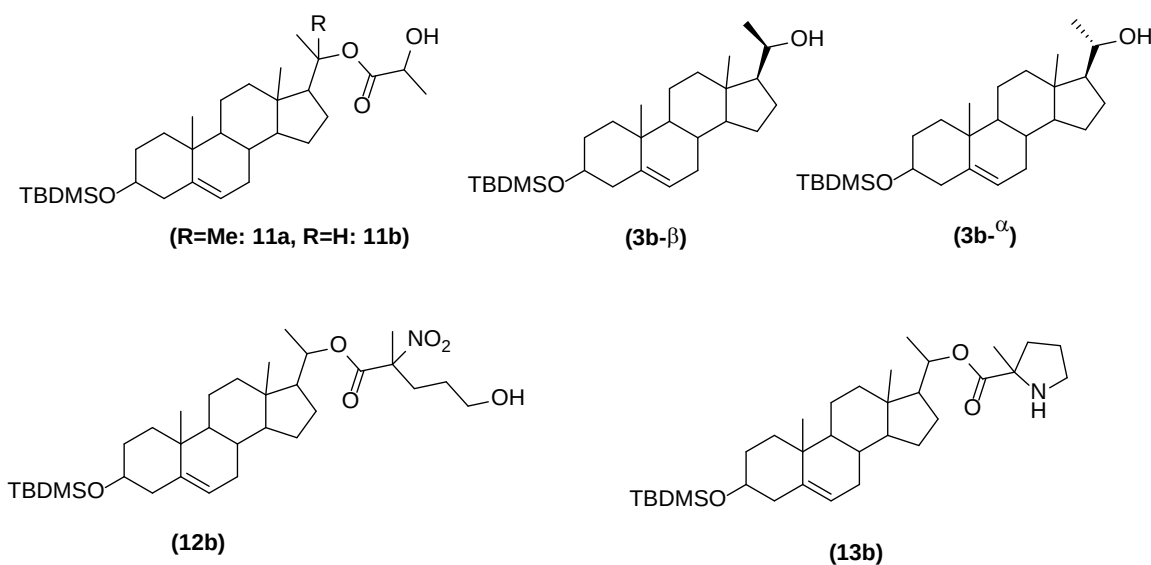
## ผลการทดลอง

การสังเคราะห์ Lipophilic nitron spin trap เป้าหมาย ST-1 และ ST-2 จะเริ่มจากการเตรียม alcohol intermediates 3 จากการทำปฏิกิริยา nucleophilic addition ของ hydroxyl protected pregnenolone 2 โดย tert-alcohol 3a สามารถเตรียมได้จาก Grignard reagent MeMgBr และ Sec-alcohol 3b เตรียมได้จากปฏิกิริยา reduction โดยใช้ NaBH<sub>4</sub> หลังจากนั้นผู้วิจัยจะใช้กลยุทธ์ในการสังเคราะห์ที่คล้ายคลึงกันเพื่อเติมหมู่ nitron ให้แก่ alcohol intermediates 3a และ 3b ดังแสดงใน Scheme 2 และ Scheme 3 ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดการสังเคราะห์ดังนี้

### 1. การสังเคราะห์ Lipophilic spin trap ST-1

วิธีการสังเคราะห์หมู่ nitron ให้กับ alcohol 3a (Scheme 2) จะเริ่มจากการทำปฏิกิริยา esterification ระหว่าง alcohol 3a กับ 2-bromopropionyl bromide ได้สารผลิตภัณฑ์  $\alpha$ -bromoester 4a ก่อนข้างต่ำ (58%) โดยอาจจะเกิดจาก steric hindrance ของหมู่ tert-butyl ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาได้ไม่ดี หลังจากนั้น bromide ของ 4a จะถูกแทนที่ด้วย nitro ได้  $\alpha$ -nitroester 5a จากการปฏิกิริยา substitution

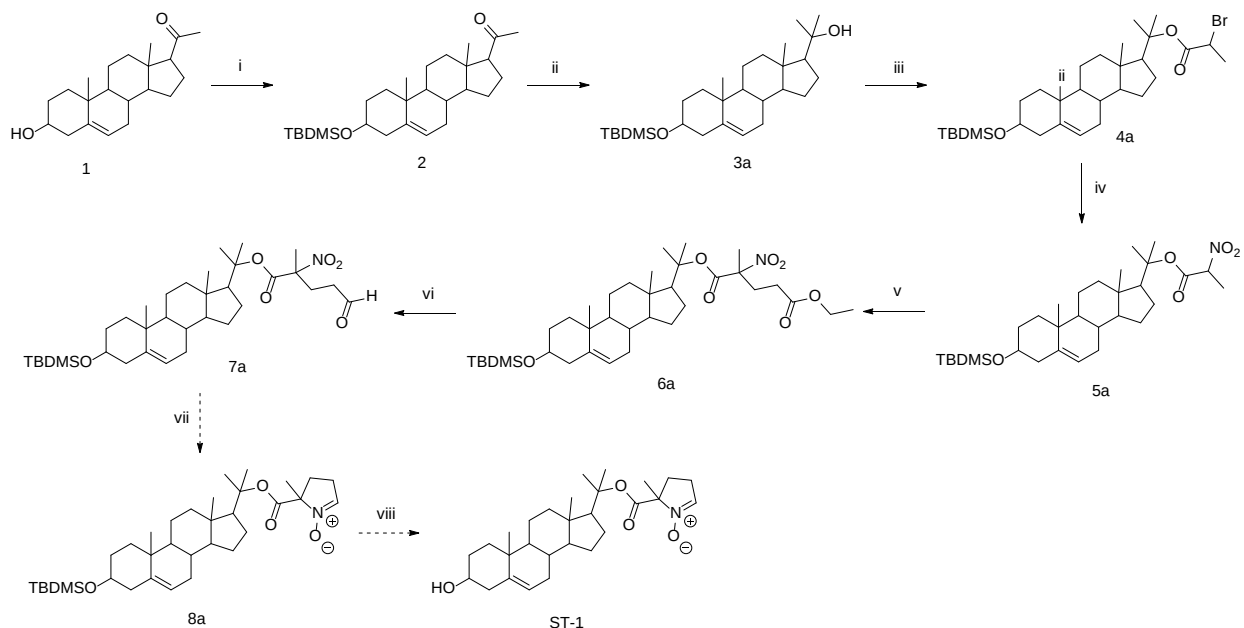
ระหว่าง **4a** และ  $\text{NaNO}_2$  โดยในปฏิกิริยานี้จะต้องเติม phloroglucinol dihydrate เพื่อลดการเกิด by product  $\alpha$ -oximinoester อย่างไรก็ตามร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนนี้ค่อนข้างต่ำ (53%) เนื่องจากพบว่ายังมี by product คือ  $\alpha$ -hydroxyester (**11a**, Figure 3) ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของ  $\alpha$ -oximinoester เกิดขึ้นอยู่ในปฏิกิริยา หลังจากนั้นโครงสร้างแกนที่จะไปเป็นหมู่ cyclic nitron ของ **ST-1** ถูกสร้างขึ้นโดยใช้ปฏิกิริยา Michael reaction เพื่อสร้าง C-C bond ระหว่าง  $\alpha$ -carbon ของ **5a** กับ ethyl acrylate ได้ adduct **6a** ร้อยละ 76 ในขั้นตอนถัดไปจะเป็นการ reduce หมู่ ethyl ester ให้เป็น aldehyde แต่เนื่องจากโครงสร้างของ **6a** นั้นมีหมู่ ester อยู่ 2 หมู่ แต่เนื่องจากหมู่ ester ทางด้านของ steroid เป็น *tert*-alkyl group ซึ่งมีความเกะกะมากกว่า ethyl ester ดังนั้นจึงน่าจะสมารถทำ selective reduction ได้ จากผลการทดลองพบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นไม่สมบูรณ์แต่เราสามารถ selectively reduce หมู่ ethyl ester ได้โดยการใช้อุณหภูมิต่ำคือ  $-78^\circ\text{C}$  ได้ aldehyde **7a**



**Figure 3** แสดงผลิตภัณฑ์รอง (By products) ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนต่างๆ ของการสังเคราะห์ **ST-1** และ **ST-2**

เนื่องจากขั้นตอนการสังเคราะห์ **ST-1** ในขั้นต้นๆ นั้นได้ร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างต่ำ ทำให้การสังเคราะห์ในขั้นตอนหลังมีสารตั้งต้นในปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการทำการสังเคราะห์ต่อ ผู้วิจัยจำเป็นต้องทำการสังเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อให้ได้สาร **7a** ในปริมาณที่มากพอต่อการสังเคราะห์ **ST-1** ต่อไป

**Scheme 2** Synthesis of ST-1.



*Reagents and conditions:* i) TBDMSiCl, imidazole, DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 15 min, 98%; ii)  $\text{CH}_3\text{MgBr}$ , THF,  $0^\circ\text{C}$  to rt, 3 h, 93%; iii) 2-bromopropionyl bromide, pyridine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$  to rt, 6 h, 58%; iv)  $\text{NaNO}_2$ , phloroglucinol dihydrate, DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 7 days, 53%; v)  $\text{NaOEt}$ , ethyl acrylate, EtOH,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 48 h, 76%; vi) DIBAL-H, THF,  $-78^\circ\text{C}$ , 8 h, 65% (bsrm).

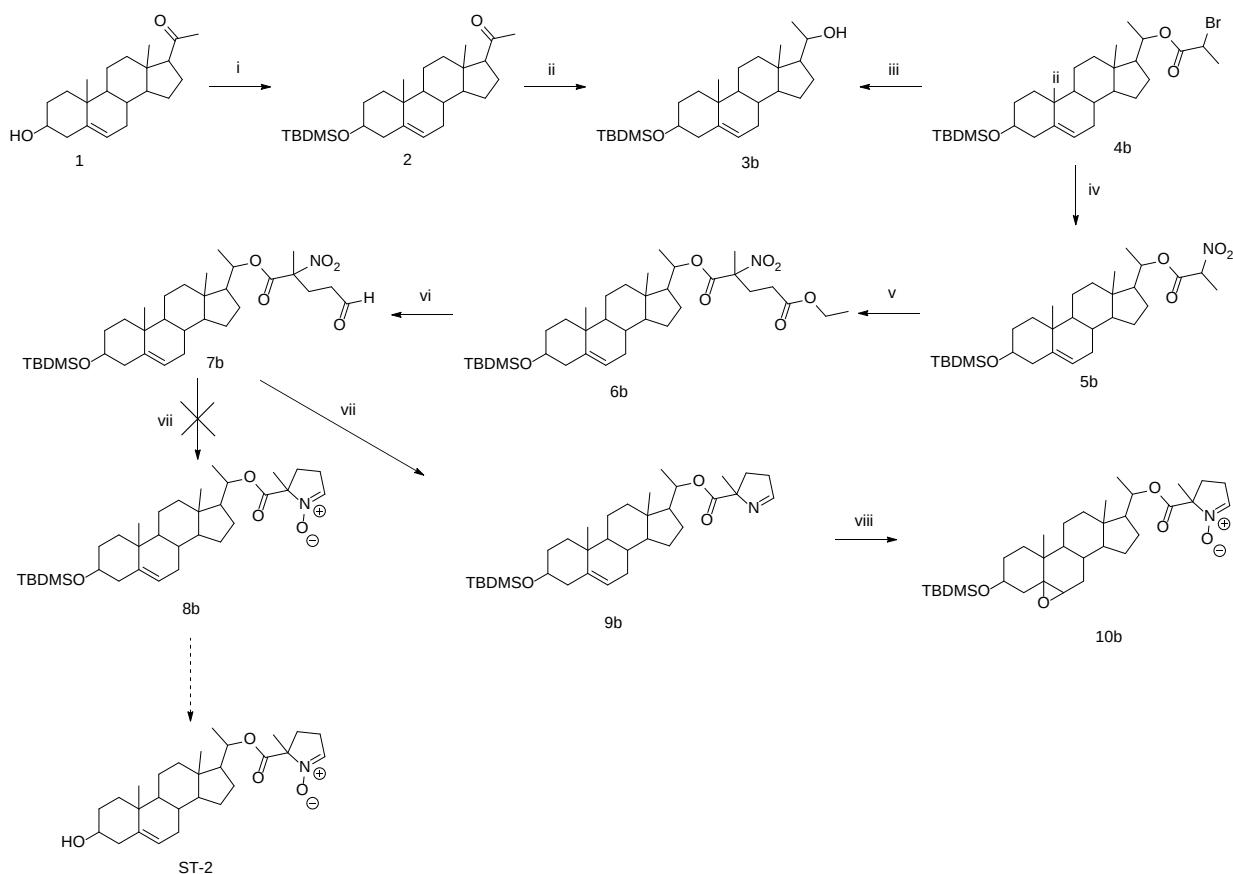
## 2. การสังเคราะห์ Lipophilic spin trap ST-2

สำหรับการสังเคราะห์ ST-2 นั้นใน 6 ขั้นตอนแรกจะใช้ปฏิกิริยาเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์ ST-1 เพียงแต่ alcohol 3b ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ ST-2 จะเป็นประเภท secondary alcohol ซึ่งเตรียมได้จากการ reduce pregnenolone silyl ether 2 ด้วย  $\text{NaBH}_4$  หลังจากทำการแยกสารให้บริสุทธิ์พบว่าจะเกิดผลิตภัณฑ์ alcohol ที่เป็นคู่ diastereomer คือ 3b- $\beta$  และ 3b- $\alpha$  (Figure 3) ซึ่งจากการวิเคราะห์ลักษณะของ transition state โดยใช้ Felkin-Ahn model คาดว่าสารผลิตภัณฑ์หลักน่าจะเป็น 3b- $\beta$

เป็นที่น่าสนใจว่าร้อยละผลิตภัณฑ์ที่ได้รับใน 6 ขั้นตอนแรกของแนวทางการสังเคราะห์ ST-2 นั้นจะสูงกว่าของ ST-1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโครงสร้างส่วนที่เป็น steroid ซึ่งเป็น secondary alcohol ในกรณีของ ST-2 นั้นมี steric hindrance น้อยกว่า tertiary alcohol ในกรณีของ ST-1 จึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีกว่า ส่งผลให้ผู้วิจัยมีสารตั้งต้นเพียงพอที่จะทำการสังเคราะห์ ST-2 ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นที่น่าสังเกตว่า by product ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนที่ iv (Scheme 3) สำหรับแนวทางการสังเคราะห์ ST-2 นั้นมีความคล้ายคลึงกับแนวทางการสังเคราะห์ ST-1 นั่นคือ พบว่านอกจากจะได้รับ  $\alpha$ -nitroester 5b เป็นผลิตภัณฑ์หลักแล้ว ยังเกิด  $\alpha$ -hydroxyester (11b, Figure 3) เป็นผลิตภัณฑ์รองเช่นเดียวกัน แต่สำหรับในขั้นตอนที่ vi ซึ่งเป็นการ reduce หมู่ ethyl ester ของสาร 6b พบว่าลักษณะของปฏิกิริยาจะมีความแตกต่างจาก ST-1 โดยพบว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (สารตั้งต้น

ถูกใช้จนหมด) แต่ว่าเกิดผลิตภัณฑ์ 2 ประเภทคือ aldehyde **7b** และ alcohol **12b** (Figure 3) ซึ่งเกิดจากการที่ aldehyde **7b** ถูก reduced ต่อเนื่องจนกลายเป็น alcohol

**Scheme 3** Synthesis of ST-2.



*Reagents and conditions:* i) TBDMSiCl, imidazole, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 15 min, 96%; ii) NaBH<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, 0°C to rt, 2 h, 87%; iii) 2-bromopropionyl bromide, pyridine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C to rt, 30 min, 96%; iv) NaNO<sub>2</sub>, phloroglucinol dihydrate, DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 48 h, 65%; v) NaOEt, ethyl acrylate, EtOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 50°C, 74%; vi) DIBAL-H, THF, -78°C, 7.5 h, 78%; vii) Zn dust, aq. NH<sub>4</sub>Cl, THF, rt, 4 h, 37%; viii) MeReO<sub>3</sub>, Urea hydrogen peroxide, MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, RT, 15 min, 67%.

ในขั้นตอนถัดไปหลังจากที่ได้รับ aldehyde **7b** แล้วจะทำการ reduce หมู่ nitro โดยใช้ Zn dust ให้กลายเป็น hydroxylamine ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า intermediate hydroxylamine นี้สามารถปฏิกิริยาเป็น cyclic nitron **8b** ได้ทันที แต่จากการทดลองพบว่าสารผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ cyclic imine **9b** และ pyrrolidine **13b** (Figure 3) ซึ่งคาดว่าสาร **9b** เกิดจากการที่หมู่ nitro เมื่อถูก reduce เป็น hydroxylamine แล้วเกิด reduction ต่อเนื่องจนกลายเป็น amine และเกิด cyclization กับหมู่ aldehyde ส่วน pyrrolidine **13b** อาจเกิดจาก reduction ของ imine **9b** ผู้วิจัยได้พยายามปรับเปลี่ยนสถานะของปฏิกิริยาเพื่อให้การ reduction หยุด

อยู่ที่ hydroxylamine แล้วหลายสถานะแต่ก็ไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องปรับเปลี่ยนวิธีการสังเคราะห์ โดยการนำ imine **9b** มาทำปฏิกิริยา oxidation โดยใช้  $\text{MeReO}_3$  และ Urea hydrogen peroxide ให้กลายเป็น nitron ซึ่งพบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยน imine ให้เป็น nitron ได้ แต่พบว่า olefin ที่ตำแหน่ง 5 ของวง B ของ steroid ถูก oxidized กลายเป็น epoxide ไปด้วย ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้ท้ายสุดของแนวทางการสังเคราะห์ **ST-2** จึงเป็นสาร nitron **10b**

แม้ว่าผู้วิจัยจะยังไม่สามารถสังเคราะห์ spin trap เป้าหมาย **ST-1** และ **ST-2** ได้ แต่ผู้วิจัยคาดว่า nitron **10b** สามารถที่จะนำไปทดสอบ EPR spin trapping ได้ แม้ว่า **10b** จะมีหมู่ epoxide อยู่ก็ตามแต่ก็น่าจะส่งผลกระทบต่อกรดักจับ free radical เนื่องจาก free radical จะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ nitron ได้ว่องไวกว่ามาก

### สรุปผลการทดลอง

เป้าหมายของโครงการวิจัยนี้คือการสังเคราะห์ lipophilic nitron spin trap ชนิดใหม่ **ST-1** และ **ST-2** ที่เป็นอนุพันธ์ของ pregnenolone และ BMPO เพื่อนำไปใช้ตรวจจับสารอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิค EPR spin trapping จากผลการทดลองที่ได้กล่าวข้างต้น การสังเคราะห์ **ST-1** ยังไม่สามารถดำเนินการได้แล้วเสร็จ เนื่องจากมีปริมาณสารตั้งต้นไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาต่อ สาเหตุมาจากปฏิกิริยาขั้นตอนแรกๆ ของแนวทางการสังเคราะห์ที่แสดงใน Scheme 2 เกิดขึ้นไม่ดึ้นก อันเป็นผลมาจากความเกะกะของสาร tertiary alcohol ตั้งต้น ทำให้ได้ร้อยละผลิตภัณฑ์ต่ำ ผู้วิจัยจึงต้องทำการสังเคราะห์เพิ่มเติม เมื่อได้ปริมาณสารที่เพียงพอแล้วจะดำเนินการตามแผนการสังเคราะห์ที่วางไว้ต่อไป

สำหรับการสังเคราะห์ **ST-2** ตามแนวทางการสังเคราะห์ใน Scheme 3 พบว่าร้อยละของผลิตภัณฑ์ที่ได้รับในแต่ละขั้นตอนสูงกว่า **ST-1** ทั้งนี้เนื่องมาจาก alcohol ตั้งต้นเป็น secondary alcohol ซึ่งมีความเกะกะน้อยกว่า ปฏิกิริยาเกิดได้ค่อนข้างดีจึงทำให้มีสารเพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าแนวทางการสังเคราะห์ที่วางแผนไว้ไม่สามารถสร้าง **ST-2** เป้าหมายได้ จึงต้องเปลี่ยนแนวทางการสังเคราะห์ใหม่ และพบว่าสามารถสังเคราะห์ lipophilic nitron ได้แล้วโดยมีโครงสร้างต่างจาก **ST-2** เล็กน้อยตรงส่วนของวง B ของ pregnenolone ที่มีหมู่ epoxide แทนที่จะเป็น olefin อย่างไรก็ตามผู้วิจัยคิดว่าหมู่ epoxide นี้ไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของหมู่ nitron ในการทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ เนื่องจาก nitron มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงกว่า epoxide ดังนั้นผู้วิจัยจะนำ lipophilic spin trap ที่ได้นี้ไปทำการทดลอง EPR spin trapping ในปฏิกิริยา *in vitro* เมื่อได้รับผลการทดลองนี้แล้วจึงจะทำการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์นานาชาติต่อไป

## ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

หลังจากที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ lipophilic spin trap ที่สังเคราะห์ได้ในการจับกับอนุมูลอิสระ *in vitro* แล้ว งานวิจัยที่ควรจะทำหลังจากนี้คือการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ หากทดสอบแล้วพบว่า spin trap ที่สังเคราะห์ได้ไม่เป็นอันตรายกับเซลล์ปกติ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำ lipophilic spin trap นี้ไปทดลอง EPR spin trapping กับเซลล์มีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการเกิด lipid peroxidation เช่น adipocytes โดยคาดหวังว่าจะสามารถเข้าใจกลไกการเกิด lipid peroxidation ได้มากขึ้นอันอาจนำไปสู่การค้นคว้าหาวิธีลด oxidative damage ที่เกิดขึ้นกับเซลล์จากการปฏิกิริยา lipid peroxidation ได้

## เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts *Mol. Pharmacol.* **1982**, *21* (2), 262-265.
2. Frejaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Lemoigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. 5-(Diethoxyphosphoryl)-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide - A New Efficient Phosphorylated Nitron for the In-Vitro and In-Vivo Spin-Trapping of Oxygen-Centered Radicals. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (2), 258-265.
3. Olive, G.; Mercier, A.; Le Moigne, F.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. 2-Ethoxycarbonyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole-1-oxide: evaluation of the spin trapping properties. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, *28* (3), 403-408.
4. Zhao, H. T.; Joseph, J.; Zhang, H.; Karoui, H.; Kalyanaraman, B. Synthesis and biochemical applications of a solid cyclic nitron spin trap: A relatively superior trap for detecting superoxide anions and glutathyl radicals. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *31* (5), 599-606.
5. Choteau, F.; Durand, G.; Ranchon-Cole, I.; Cercy, C.; Pucci, B. Cholesterol-based alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron derivatives as antioxidants against light-induced retinal degeneration. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7405-7409.
6. Durand, G.; Poeggeler, B.; Ortial, S.; Polidori, A.; Villamena, F. A.; Boker, J.; Hardeland, R.; Pappolla, M. A.; Pucci, B. Amphiphilic Amide Nitrones: A New Class of Protective Agents Acting as Modifiers of Mitochondrial Metabolism. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (13), 4849-4861.



7. Han, Y. B.; Liu, Y. P.; Rockenbauer, A.; Zweier, J. L.; Durand, G.; Villamena, F. A. Lipophilic beta-Cyclodextrin Cyclic-Nitrone Conjugate: Synthesis and Spin Trapping Studies. *J. Org. Chem.* **2009**, 74 (15), 5369-5380.
8. Hay, A.; Burkitt, M. J.; Jones, C. M.; Hartley, R. C. Development of a new EPR spin trap, DOD-8C (N-[4-dodecyloxy-2-(7'-carboxyhept-1'-yloxy) benzylidene]-N-tert-butylamine N-oxide), for the trapping of lipid radicals at a predetermined depth within biological membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, 435 (2), 336-346.
9. Morandat, S.; Durand, G.; Polidori, A.; Desigaux, L.; Bortolato, M.; Roux, B.; Pucci, B. PBN derived amphiphilic spin-traps. I/synthesis and study of their miscibility with polyunsaturated phospholipids. *Langmuir* **2003**, 19 (23), 9699-9705.
10. Stolze, K.; Udilova, N.; Rosenau, T.; Hofinger, A.; Nohl, H. Spin trapping of superoxide, alkyl- and lipid-derived radicals with derivatives of the spin trap EPPN. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66 (9), 1717-1726.
11. Hardy, M.; Ouari, O.; Charles, L.; Finet, J. P.; Iacazio, G.; Monnier, V.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. Synthesis and spin-trapping behavior of 5-ChEPMPO, a cholesteryl ester analogue of the spin trap DEPMPO. *J. Org. Chem.* **2005**, 70 (25), 10426-10433.

## วิธีการสังเคราะห์

### Pregnenolone silyl ether (2)

Tert-butyl(chloro)dimethylsilane (1.8730 g, 0.0124 mol) was added to a solution of pregnenolone (2.5422 g, 0.0080 mol), imidazole (1.6754 g, 0.0246 mol) and dimethylaminopyridine (0.5040 g, 0.0041 mol) in dichloromethane (25 mL) at room temperature. After the reaction mixture was stirred for 15 min, was extracted with saturated  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution, washed with water, dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and removed solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography under 10% ethyl acetate: hexane system. Pregnenolone silyl ether (3.3234 g, 96%) was observed as white solid.

**FTIR**,  $\nu_{\text{max}}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2927 (C-H), 1700 (C=O), 1243 (Si-C), 1076 (Si-O), 1052 (C-O).

**$^1\text{H-NMR}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.31 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, C-6), 3.47 (m, 1H, C-3), 2.52 (t,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, C-17), 2.11 (s, 3H, C-21), 0.99 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.62 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H,  $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$ ).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ: 209.55, 141.50, 120.83, 72.50, 63.69, 56.93, 50.03, 43.99, 42.73, 38.84, 37.35, 36.56, 32.01, 31.83, 31.77, 31.52, 25.90 (3C), 24.46, 22.78, 21.04, 19.39, 18.22, 13.18, -4.62 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) m/z: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O<sub>2</sub>SiNa 453.3159; Found 453.3157.

### **3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-ol (3a)**

Methyl magnesium bromide (2.50 mL, 0.0075 mol) was added dropwise to the solution of pregnenolone silyl ether (1.0759 g, 0.0025 mol) in dry THF (16.00 mL) at 0°C and further stirred at room temperature for 3 hour. The reaction was quenched by slow addition of saturated NH<sub>4</sub>Cl solution and extracted with dichloromethane. The combined organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography under 5-10% ethyl acetate: hexane system. 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-ol (1.0363 g, 93%) was observed as a white solid. The partial crude product was crystallized by ethyl acetate and afforded needle crystals.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.31 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, C-6), 3.48 (m, 1H, C-3), 1.31 (s, 3H, C-21), 1.19 (s, 3H, C-22), 1.00 (s, 3H, C-19), 0.89 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.84 (s, 3H, C-18), 0.06 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz): δ 141.58, 121.03, 73.52, 72.61, 60.17, 56.85, 50.10, 42.79, 42.73, 40.09, 37.36, 36.57, 32.05, 31.80, 31.34, 30.96, 30.05, 25.92 (3C), 23.82, 23.09, 20.88, 19.41, 18.25, 13.44, -4.60 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) m/z: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>SiNa 469.3472; Found 469.3471.

### **3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-bromopropanoate) (4a)**

2-Bromopropionyl bromide (0.76 mL, 7.26 mmol) was slowly added to a solution of 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-ol (1.6210 g, 3.63 mmol) and pyridine (0.58 mL, 7.20 mmol) in dichloromethane (40 mL) at 0°C and further stirred at room temperature for 6 h. The reaction mixture was quenched by addition of water and extracted with dichloromethane. The combined organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed the solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography under 5-10% ethyl acetate: hexane system. 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-bromopropanoate) (1.3366 g, 63%) was observed as white solid.

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, C-6), 4.25 (q, *J* = 6.9 Hz, 1H, α-proton), 3.48 (m, 1H, C-3), 1.77 (dd, *J* = 3.7, 6.9 Hz, 3H, CHBrCH<sub>3</sub>), 1.62 (s, 3H, C-21), 1.52 (d, *J* = 2.5 Hz, 3H, C-22), 1.00 (s, 3H, C-19), 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.88 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si)

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 169.05, 141.58, 120.98, 86.94, 72.58, 60.63, 60.42, 56.71, 50.04, 42.80, 42.39, 42.18, 40.02, 37.34, 36.56, 32.03, 31.76, 31.34, 25.92 (3C), 25.32, 23.70, 23.00, 21.63, 20.83, 19.38, 18.24, 13.84, -4.60 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>31</sub>H<sub>53</sub>O<sub>3</sub>BrSiNa 603.2840; Found 603.2852.

### Substitution of 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-bromopropanoate) (4a)

3β-Silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-bromopropanoate) (6.01 g, 0.01 mol) was added to a solution of sodium nitrile (1.48 g, 0.02 mol) and pholroglucinol dihydrate (1.71 g, 0.01 mol) in dimethylformamide (35 mL) and tetrahydrofuran (20 mL) at room temperature, and further stirred for 13 hour. The brown solution was quenched by addition of cold water, then extracted with ethyl acetate and washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution. The combined organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed the solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography under 10-20% ethyl acetate: hexane system to give 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-nitropropanoate) (**5a**) (2.98 g, 53%) was observed as white solid and 3β-silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-hydroxypropanoate) (**11a**) (1.83 g, 34%) as colorless oil.

### 3β-Silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-nitropropanoate) (5a)

**FTIR**, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>: 2935 (C-H), 1745 (C=O), 1562 (N-O), 1251 (Si-O), 1215 (N-O), 1095 (C-O).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 5.33 (m, 1H, C-6), 5.11 (qd, *J* = 2.1, 7.1 Hz, 1H, α-proton), 3.49 (m, 1H, C-3), 1.76 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.65 (s, 3H, C-21), 1.56 (d, *J* = 2.0 Hz, 3H, C-22), 1.01 (s, 3H, C-19), 0.90 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.77 (d, *J* = 3.2 Hz, 3H, C-18), 0.07 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.8, 141.6, 120.9, 89.4, 84.1, 72.6, 60.4, 56.6, 50.0, 42.8, 42.7, 39.9, 37.3, 36.5, 32.0, 31.7, 31.3, 26.1, 25.9 (3C), 25.5, 23.6, 23.0, 20.8, 19.3, 18.2, 15.6, 13.2, -4.6 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>31</sub>H<sub>53</sub>NO<sub>5</sub>SiNa 570.3585; Found 570.3604.

### 3 $\beta$ -Silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-hydroxypropanoate) (11a)

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3486 (O-H), 2939 (C-H), 1731 (C=O), 1369 (C(O)-O), 1252 (Si-O), 1085 (C-O).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.30 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, C-6), 4.11 (m, 1H,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ), 3.47 (m, 1H, C-3), 2.96 (bs, 1H,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ), 1.61 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 3H,  $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ), 1.54 (s, 3H, C-21), 1.37 (d,  $J$  = 6.7 Hz, 3H, C-22), 0.99 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.80 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, C-18), 0.04 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  175.0, 141.7, 121.1, 87.3, 72.7, 67.2, 60.4, 56.8, 50.2, 42.9, 40.1, 37.5, 36.7, 32.0, 31.5, 26.5, 26.2, 26.0 (3C), 24.8, 23.8, 23.5, 23.2, 21.0, 20.6, 19.5, 18.4, 14.0, -4.5 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{O}_4\text{SiNa}$  541.3683; Found 541.3651.

### 3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate) (6a)

3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-nitropropanoate) (0.6783, 1.24 mmol) was dissolved in absolute ethanol (15.00 mL) and dichloromethane (5.00 mL) before added to a sodium ethoxide solution which prepared by metallic sodium (0.003 g, 0.13 mmol) and absolute ethanol (0.60 mL) and followed by addition of ethyl acrylate (1.30 mL, 12.2 mmol). After the solution was heated at 50°C for 72 h, it was cooled to room temperature, washed with water, and extracted with dichloromethane. The combined organic phase was dried over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and removed solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography under 5-10% ethyl acetate: hexane system. Tert-butyl-5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate (0.5422 g, 71%) was observed as colorless oil.

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.30 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, C-6), 4.14 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 3.47 (m, 1H, C-3), 2.47 (m, 4H,  $\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$ ), 1.73 (d,  $J$  = 3.5 Hz, 3H,  $\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{NO}_2)\text{CH}_3$ ), 1.63 (s, 3H, C-21), 1.54 (s, 3H, C-22), 1.26 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 0.98 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.72 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ ).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171.88, 165.86, 141.71, 121.10, 92.41, 89.35, 72.73, 61.00, 56.82, 50.13, 42.91, 42.76, 40.07, 37.47, 36.69, 32.17, 31.86, 31.62, 31.47, 31.42, 29.13, 26.37, 26.08(3C), 25.28, 23.76, 23.04, 21.39, 20.93, 19.50, 18.41, 14.30, 13.30, -4.45(2C).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{NO}_7\text{SiNa}$  670.4110; Found 670.4125.

### 3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate) (7a)

Diisobutylaluminium hydride (1.20 mL, 1.20 mmol) was slowly added over the period of 5 min to a solution of 3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate) (0.4926 g, 0.80 mmol) in dry THF (6.00 mL) at -78°C with dry ice/acetone and further stirred for 8 h. The mixture solution was quenched by addition of water and warmed to room temperature. The resulting solution was filtered and washed with diethyl ether. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by flash column chromatography under 10% ethyl acetate: hexane system. 3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate) (0.1705 g, 65%) was observed as a white solid, and 3 $\beta$ -silyloxy-20-methylpregn-5-en-20-(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate) (0.2257 g), starting material, was recovered as colorless oil.

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  9.78 (s, 1H, C(O)H), 5.30 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, C-6), 3.47 (m, 1H, C-3), 2.50 (m, 4H, C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>C(O)H), 1.73 (d,  $J$  = 3.3 Hz, 3H, C(O)C(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.63 (s, 3H, C-21), 1.54 (s, 3H, C-22), 0.98 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.72 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  199.22, 165.87, 141.72, 121.07, 92.32, 89.53, 72.73, 60.90, 56.82, 50.15, 42.92, 42.80, 40.08, 38.64, 37.48, 36.69, 32.18, 31.86, 31.44, 28.76, 26.36, 26.07(3C), 25.29, 23.76, 23.08, 21.71, 20.94, 19.50, 18.40, 13.34, -4.45(2C).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$ : [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>34</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>6</sub>SiNa 626.3847; Found 626.3852.

### Reduction of pregnenolone silyl ether (3b)

Sodium borohydride (4.55 g, 0.12 mol) was added to the solution pregnenolone silyl ether (12.51 g, 0.03 mol), dichloromethane (159 mL) and methanol (159 mL) at 0°C and further stirred at room temperature for 2 hour. The reaction was quenched by addition of saturated NH<sub>4</sub>Cl solution and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 5-10% ethyl acetate: hexane system as eluent. 3 $\beta$ -silyloxypregn-5-en-20 $\beta$ -ol (**3b- $\beta$** ) (10.09g, 80%) was observed as a white solid; m.p. 151-152°C and 3 $\beta$ -silyloxypregn-5-en-20 $\alpha$ -ol (**3b- $\alpha$** ) (1.58g, 13%) was obtained as a white solid; m.p. 162-164°C.

### 3 $\beta$ -silyloxypregn-5-en-20 $\beta$ -ol (3b- $\beta$ )

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>: 3416 (O-H), 2934 (C-H), 1253 (Si-O), 1092 (C-O), 838 (Si-C).

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.30 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, C-6), 3.73 (dq, *J* = 12.1, 6.1 Hz, 1H, C-20), 3.52 – 3.42 (m, 1H, C-3), 1.13 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, C-21), 1.00 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.76 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz), δ: 141.8, 121.1, 72.8, 70.7, 58.6, 56.4, 50.3, 43.0, 42.4, 40.1, 37.5, 36.8, 32.2, 32.1, 31.9, 26.0 (3C), 25.8, 24.7, 23.8, 21.1, 19.6, 18.4, 12.5, -4.4 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>SiNa 455.3316; Found 455.3329.

### **3β-silyloxy pregn-5-en-20α-ol (3b-α)**

**FTIR**, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>: 3337 (O-H), 2934 (C-H), 1252 (Si-O), 1099 (C-O), 836 (Si-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz), δ: 5.31 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, C-6), 3.70 (dq, *J* = 12.4, 6.2 Hz, 1H, C-20), 3.52 – 3.43 (m, 1H, C-3), 1.22 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, C-21), 0.99 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.67 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 101 MHz), δ: 141.7, 121.2, 72.7, 70.5, 58.6, 56.7, 50.3, 42.9, 41.8, 39.0, 37.5, 36.7, 32.2, 32.0, 31.7, 26.1 (3C), 25.8, 24.3, 23.6, 20.9, 19.6, 18.4, 12.6, -4.4 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>SiNa 455.3316; Found 455.3297.

### **3β-silyloxy pregn-5-en-20-(2-bromopropanoate) (4b)**

2-Bromopropionyl bromide (4.85 mL, 0.05 mol) was slowly added to a solution of 3β-silyloxy pregn-5-en-20β-ol (10.01 g, 0.02 mmol) and pyridine (3.75 mL, 0.05 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) at 0°C and further stirred at room temperature for 30 min. The reaction mixture was washed with water and saturated NH<sub>4</sub>Cl solution, subsequently. The combined organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed the solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 3-5% ethyl acetate: hexane system as eluent. 3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-bromopropanoate) (12.82 g, 98%) was observed as white solid; m.p. 140-141°C.

**FTIR**, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>: 2939 (C-H), 1733 (C=O), 1235 (Si-O), 1091 (C-O), 838 (Si-C), 673 (C-Br).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.31 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, C-6), 4.88 (dd, *J* = 6.1, 10.2 Hz, 1H, C-20), 4.32 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, α-proton), 3.48 (m, 1H, C-3), 1.82 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.19 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, C-21), 0.99 (s, 3H, C-19), 0.89 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.67 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ: 169.58, 141.65, 120.87, 75.22, 72.57, 56.19, 54.79, 50.19, 42.78, 42.24, 40.74, 39.08, 37.36, 36.59, 32.05, 31.91, 31.74, 25.92 (3C), 25.58, 24.36, 21.73, 20.81, 19.60, 19.42, 18.23, 12.29, -4.60 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) m/z: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>O<sub>2</sub>SiBrNa 589.2683; Found 589.2687.

### **Substitution of 3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-bromopropanoate)**

3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-bromopropanoate) (11.22 g, 0.02 mol) was added to a solution of sodium nitrile (2.84 g, 0.04 mol) and phloroglucinol dihydrate (3.27 g, 0.02 mol) in DMF (88 mL) and THF (66 mL) at room temperature, and further stirred for 14 hour. The brown solution was quenched by addition of cold water, then extracted with ethyl acetate. The combined organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed the solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 3-20% ethyl acetate: hexane system as eluent to give 3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-nitropropanoate) (6.63 g, 63%) was observed as white solid; m.p. 132-134°C and 3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-hydroxypropanoate) (3.62 g, 36%) as white solid; m.p. 145-146°C.

### **3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-nitropropanoate) (5b)**

**FTIR**, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>: 2938 (C-H), 1743 (C=O), 1565 (N-O), 1254 (Si-O), 1211 (N-O), 1086 (C-O), 838 (Si-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.29 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, C-6), 5.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, α-proton), 4.96 (m, 1H, C-20), 3.46 (m, 1H, C-3), 1.77 (dd, *J* = 2.1, 7.1 Hz, 3H, CH(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.20 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, C-21), 0.98 (d, *J* = 1.9 Hz, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.65 (d, *J* = 3.2 Hz, 3H, C-18), 0.04 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz), δ: 164.4, 141.6, 120.8, 83.4, 76.4, 72.5, 56.1, 54.5, 50.1, 42.8, 42.1, 38.9, 37.3, 36.5, 32.0, 31.9, 31.7, 25.9 (3C), 25.4, 24.2, 20.9, 19.5, 19.4, 18.2, 15.6, 12.3, -4.6 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) m/z: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>5</sub>SiNa 556.3429; Found 556.3451.

### **3β-silyloxy pregn-5-en-20β-(2-hydroxypropanoate) (11b)**

**FTIR**, ν<sub>max</sub>, cm<sup>-1</sup>: 3460 (O-H), 2934 (C-H), 1728 (C=O), 1253 (Si-O), 1083 (C-O), 838 (Si-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 5.29 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, C-6), 4.94 (m, 1H, C-20), 4.19 (qd, *J* = 1.9, 6.9 Hz, 1H, α-proton), 3.46 (m, 1H, C-3), 1.39 (dd, *J* = 6.9, 12.6 Hz, 3H,

CH(OH)CH<sub>3</sub>), 1.17 (dd,  $J$  = 3.2, 6.1 Hz, 3H, C-21), 0.97 (s, 3H, C-19), 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.64 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H, C-18), 0.04 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 175.0, 141.6, 120.8, 74.8, 72.5, 67.0, 66.7, 56.1, 54.8, 50.1, 42.8, 42.2, 39.1, 37.3, 36.5, 32.0, 31.8, 31.7, 25.9 (3C), 24.3, 20.8, 20.3, 19.8, 19.4, 18.2, 12.4, -4.6 (2C).

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>30</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>SiNa 527.3527; Found 527.3529.

### **3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate) (6b)**

3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(2-nitropropanoate) (7.07, 0.01 mol) was dissolved in absolute ethanol (25 mL) and dichloromethane (30 mL) before added to a sodium ethoxide solution which prepared by metallic sodium (32 mg, 1.39 mmol) and absolute ethanol (5.75 mL) and followed by addition of ethyl acrylate (5.70 mL, 0.02 mol). After the solution was heated at 50°C for 24 h, it was cooled to room temperature, quenched with saturated NH<sub>4</sub>Cl solution, and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The combined organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and removed solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 5-10% ethyl acetate: hexane system as eluent. 3 $\beta$ -Silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate) (6.96 g, 83%) was observed as a white solid; m.p. 127-129°C.

FTIR,  $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>: 2939 (C-H), 1741 (C=O), 1558 (N-O), 1258 (Si-O), 1190 (N-O), 1080 (C-O), 838 (Si-C).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  5.28 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, C-6), 4.93 (m, 1H, C-20), 4.13 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.45 (m, 1H, C-3), 2.47 (m, 4H, CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)), 1.75 (d,  $J$  = 4.5 Hz, 3H, C(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.17 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, C-21), 0.97 (s, 3H, C-19), 0.86 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.63 (s, 3H, C-18), 0.03 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz),  $\delta$ : 171.6, 166.4, 141.6, 120.8, 91.8, 72.5, 60.9, 56.1, 54.5, 50.1, 42.8, 42.0, 38.7, 37.3, 36.6, 32.0, 31.8, 31.7, 31.5, 31.3, 28.9, 25.9 (3C), 25.6, 24.3, 21.3, 20.8, 19.4, 19.3, 18.2, 14.1, 12.3, -4.6 (2C).

HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ : [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>35</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>7</sub>SiNa 656.3953; Found 656.3978.

### **Reduction of 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedioate)**

Diisobutylaluminium hydride (18 mL, 0.02 mmol) was slowly added to a solution of compound (**82**) (6.66 g, 0.01 mol) in dry THF (80 mL) at -78°C with dry ice/acetone and further



stirred for 7.5 h. The mixture solution was quenched by addition of water and warmed to room temperature. The resulting solution was filtered and washed with diethyl ether. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by flash column chromatography with 5-10% ethyl acetate: hexane system as eluent. 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate) (**7b**) (5.22 g, 84%) was observed as a white solid; 119-121°C, and 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(5-hydroxyl-methyl-2-nitropentanoate) (**12b**) (0.50 g, 8%) was detected as white solid.

**3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate) (7b)**

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 2940 (C-H), 2725 (C(O)-H), 1738 (C=O), 1556 (N-O), 1256 (Si-O), 1197 (N-O), 1083 (C-O), 840 (Si-C).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.77 (s, 1H, C(O)H), 5.29 (s, 1H, C-6), 4.98 – 4.90 (m, 1H, C-20), 3.47 (dt,  $J$  = 15.9, 5.3 Hz, 1H, C-3), 2.62–2.42 (m, 4H,  $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C(O)H}$ ), 1.76 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 3H, C(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.19 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H, C-21), 0.98 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.65 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  199.1, 166.5, 141.9, 120.9, 91.9, 76.9, 72.7, 56.3, 54.7, 50.3, 42.9, 42.2, 38.9, 38.6, 37.5, 36.7, 32.2, 32.0, 31.9, 28.8, 26.1 (3C), 25.8, 24.4, 21.8, 21.0, 19.6, 19.4, 18.4, 12.5, -4.4 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$ : [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>3</sub>SiNa 564.3843; Found 564.3857.

**3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(5-hydroxyl-methyl-2-nitropentanoate) (12b)**

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ : 3336 (O-H), 2939 (C-H), 1738 (C=O), 1554 (N-O), 1252 (Si-O), 1195 (N-O), 1096 (C-O), 838 (Si-C).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.30 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H, C-6), 4.93 (m, 1H, C-20), 3.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 3.47 (m, 1H, C-3), 2.41 – 2.12 (m, 4H CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 1.78 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 3H C(NO<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>), 1.19 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H, C-21), 0.99 (s, 3H, C-19), 0.88 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.65 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**HRMS** (ESI-TOF)  $m/z$ : [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>57</sub>NO<sub>6</sub>SiNa 614.3847; Found 614.3859.

**Reduction of 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate)**

An aqueous solution of ammonium chloride (11 mL, 2.87 g in 16 ml of water) was added to a solution of compound (**7b**) (5.11 g, 8.66 mmol) in THF (27 mL). Zinc dust (2.84 g, 0.04 mol) was added in a portion and further stirred at room temperature for 4 h. The sample was filtered through celite and the residue was washed with methanol. The combined organic phase was

removed the solvent under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 20-50% ethyl acetate: hexane system as eluent. 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole) (**9b**) (1.70 g, 36%) was observed as white solid and 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methylpyrrolidine) (**13b**) (1.41 g, 31%) was detected as pale yellow solid.

**3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole) (**9b**)**

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>: 2941 (C-H), 1728 (C=O), 1626 (C=N), 1258 (Si-O), 1094 (C-O), 834 (Si-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.62 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, N=CH), 5.29 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, C-6), 4.87 (m, 1H, C-20), 3.46 (m, 1H, C-3), 2.65 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 2.29 – 2.11 (m, 3H), 1.46 (s, 3H, 5-CH<sub>3</sub>-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole), 1.14 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, C-21), 0.97 (s, 3H, C-19), 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.63 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 2H), 0.04 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.1, 167.7, 167.2, 141.7, 121.1, 79.9, 73.8, 72.7, 56.3, 54.9, 50.3, 42.9, 42.2, 39.1, 37.5, 37.3, 36.7, 32.3, 32.0, 26.0 (3C), 25.7, 25.2, 24.8, 24.4, 21.0, 19.8, 19.5, 18.4, 12.5, 1.1, -4.5.

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+23]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>55</sub>NO<sub>3</sub>SiNa 564.3843; Found 564.3846.

**3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methylpyrrolidine) (**13b**)**

**FTIR**,  $\nu_{\max}$ , cm<sup>-1</sup>: 3352 (N-H), 2941 (C-H), 1723 (C=O), 1259 (Si-O), 1092 (C-O), 835 (Si-C).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  5.29 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, C-6), 4.87 (m, 1H, C-20), 3.99 (bs, 1H, NH), 3.46 (m, 1H, C-3), 3.01 (m, 2H, NHCH<sub>2</sub>), 2.20 (m, 4H, C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 1.39 (d, *J* = 9.5 Hz, 3H, 5-CH<sub>3</sub>-pyrrolidine), 1.13 (dd, *J* = 6.0, 1.8 Hz, 3H, C-21), 0.97 (s, 3H, C-9), 0.87 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CSi), 0.64 (s, 3H, C-18), 0.05 (s, 1H), 0.04 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Si).

**<sup>13</sup>C-NMR** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  176.5, 141.4, 121.0, 74.3, 72.7, 66.1, 60.5, 56.3, 54.9, 50.3, 46.2, 42.9, 42.2, 39.3, 37.5, 36.8, 32.0, 26.0 (3C), 25.8, 25.4, 25.1, 24.4, 21.1, 19.9, 19.5, 18.4, 14.3, 12.6, 1.1, -4.5 (2C).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+1]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>NO<sub>3</sub>Si 544.4180; Found 544.4162.

**5,6-epoxy-3 $\beta$ -silyloxy pregn-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methyl-1-pyrrolidine *N*-oxide) (**10b**)**

Urea hydrogen peroxide (0.08 g, 0.86 mmol) in methanol (1.50 mL) solution was added to a solution of 3 $\beta$ -silyloxy pregn-5-en-20 $\beta$ -(oxycarbonyl-5-methyl-3,4-dihydro-2*H*-pyrrole) (0.15 g,

0.27 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL), subsequently the addition of methyltrioxorhenium(VII) (2.9 mg, 11.6 μmol). The solution was stirred at room temperature for 15 min and removed the solvent under reduced pressure. The reaction mixture was added with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and the insoluble urea was filtered off to afford the crude product which was purified by flash column chromatography. 5,6-epoxy-3β-silyloxy pregn-20β-(oxycarbonyl-5-methyl-1-pyrrolidine *N*-oxide) (0.10 g, 67%) was observed as pale yellow solid.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.03 – 6.94 (m, 1H), 4.96 – 4.76 (m, 2H), 3.86 – 3.79 (m, 1H), 3.66 – 3.55 (m, 1H), 3.00 (s, 1H), 2.84 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H), 1.65 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.84 (s, 18H), 0.57 (dd, *J* = 12.1, 2.9 Hz, 6H), 0.01 (m, 13H).

**HRMS** (ESI-TOF) *m/z*: [M+1]<sup>+</sup> calcd for C<sub>33</sub>H<sub>58</sub>NO<sub>3</sub>Si 544.4180; Found 544.4162.

**Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.**

- ยังไม่สามารถตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติได้
- การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
  - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
    - ไม่มี
  - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
    - ไม่มี
  - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
    - ไม่มี
  - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
    - ผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโทจำนวน 1 คน
- อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
  - Aonsri, C., Kongkathip, B., and Imaram, W. 2016. "A new synthetic route to 5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline n-oxide" PACCON 2016 Proceedings, Bangkok, Thailand:1546-1551.

## ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์เสนอในที่ประชุมวิชาการ PACCON 2016 Proceedings เรื่อง “A new synthetic route to 5-tert-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline n-oxide”

## A new synthetic route to 5-*tert*-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide

Chaiyawat Aonsri,<sup>1</sup> Boonsong Kongkathip,<sup>1,2</sup> Witcha Imaram\*,<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Center of Excellence for Innovation in Chemistry,  
Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

<sup>2</sup>Special Research Unit for Advanced Magnetic Resonance, Department of Chemistry,  
Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

\*e-mail: witcha.i@ku.ac.th

### Abstract:

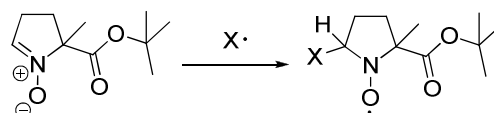
EPR spin trapping is a versatile technique used to detect short-lived reactive radical species in both chemical and biological systems. In general, a spin trapping agent, usually a nitron compound, is added to the system being studied to capture radicals produced in the reaction and yield persistent nitroxide radical adducts, allowing enough time to be detected by EPR. Recently, 5-*tert*-butoxycarbonyl 5-methyl-1-pyrroline N-oxide (BMPO 8), a solid cyclic nitron spin trap, was synthesized and exhibited several advantages over other spin traps. For example, it can be easily purified by crystallization to remove nitroxide impurities and more important, BMPO-superoxide radical adduct is quite stable that it does not decompose to BMPO-hydroxyl radical adducts that could potentially lead to false interpretation of its EPR spectrum. However, the usage of BMPO in free radical research is quite limited due to its high cost. Thus, a more facile cost effective synthetic route to BMPO was described in this report. The new synthetic method is based upon the availability of starting materials in Thailand and is to improve the product yield. The key steps of the new approach include a Michael reaction of  $\alpha$ -nitroester 4 and ethyl acrylate 5 to dialkyl ester 6 and a subsequent selective reduction of 6 using DIBAL-H to its corresponding aldehyde 7. The production of BMPO was achieved in 5 steps from *tert*-butyl alcohol 1 and 2-bromopropionyl bromide 2. With % yield of each step given in the reaction scheme, the % overall yield would be 22, which is higher and with a shorter synthetic route than the previously reported BMPO synthesis.

### 1. Introduction

EPR spin trapping is the method of choice to detect transient radical species. One of the most commonly used spin trap in both chemical and biological system is the nitron compound. In general, a nitron spin trap is introduced into a reaction to react with the short-lived free radical generated in the system being studied, resulting in the more stable nitroxide spin adduct (shown in Scheme 1), allowing enough time to be detected by EPR.<sup>1</sup>

Several nitron spin trapping agents are commercially available with various chemical and biological properties. 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) is one of the most used starting spin trap in

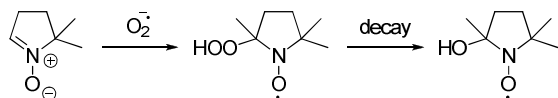
many experiments due to its low cost to begin with and its robust function to capture reactive oxygen species, such as hydroxyl radical (HO $\cdot$ ) or superoxide anion radical (O $_2^{\cdot-}$ ).



**Scheme 1.** The formation of spin adduct from BMPO spin trap where X is hydroxyl radical or superoxide radical anion.

However, the DMPO–O $_2^{\cdot-}$  adduct can suffer spontaneous degradation to its corresponding DMPO–OH adduct leading to ambiguous interpretation of its EPR

spectrum.<sup>2</sup> To solve this problem, new nitron spin traps, such as BMPO, have been developed to distinguish between the trapping of HO· and O<sub>2</sub><sup>-</sup>.



**Scheme 2.** The decomposition of DMPO superoxide radical adduct to the corresponding DMPO hydroxyl radical adduct.

5-*tert*-Butoxycarbonyl- 5- methyl-1-pyrroline *N*-oxide (BMPO) is a commercial solid cyclic nitron spin trap. BMPO displays many advantages over DMPO. For example, BMPO is a solid less-hygroscopic compound, which can be easily purified by recrystallization to remove nitroxide impurities. Moreover, BMPO–O<sub>2</sub><sup>-</sup> adduct is very stable that it does not decay to BMPO–OH adduct. In addition, the EPR spectra obtained from BMPO–radical adduct give simpler and higher signal-to-noise ratio than phosphorus containing spin trap, i.e., DEPMPO<sup>3</sup>. However, the usage of BMPO in free radical research is quite limited due to its high cost.

With financial constraints, the in-house preparation of BMPO is needed provided that the synthesis can be achieved within a reasonable time. Recently, the first BMPO synthetic route was reported by Zhao and co-workers<sup>4</sup>. It required 6 steps to achieve BMPO with 7% overall yield. The key step in this synthesis would be the carbon-carbon bond formation by using Michael addition between a nitro ester enolate and acrolein. Unfortunately, acrolein cannot be imported into Thailand because of some legal restrictions. This led us to develop a new BMPO synthetic procedure based on the availability of chemicals that can be purchased in the kingdom. Here, we report the new synthetic route to synthesize BMPO, which was achieved with less number of

reaction steps and higher yield than previous work.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 General procedure

Solvents and chemical reagents were purchased from commercial sources including benzophenone, DIBAL-H and phloroglucinol from Acros; sodium nitrite and pyridine from Ajax Finechem; dichloromethane, methanol and tetrahydrofuran from Burdick & Jackson; dimethylformamide, ethanol and *tert*-butanol from Carlo Erba; and 2-bromopropionyl bromide, 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane, ethyl acrylate and zinc dust from Sigma Aldrich. Dry tetrahydrofuran (THF) was newly distilled under N<sub>2</sub> atmosphere with metallic sodium and benzophenone as an indicator. Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) and carbon nuclear magnetic resonance spectra were recorded on a VARIAN<sup>UNITY</sup> INOVA 400 spectrometer as chemical shifts (δ) value in unit of part per million (ppm) relative to CDCl<sub>3</sub> (δ 7.26 for <sup>1</sup>H NMR and 77.23 for <sup>13</sup>C NMR) as internal reference. The following abbreviations were used for multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet and m = multiplet. Coupling constant (*J*) were reported in hertz (Hz). High-resolution mass spectra were obtained on Bruker, micrOTOF QIII spectrometry in electrospray ionization mode (ESI).

### 2.2 Synthesis of *tert*-butoxyl-2-bromopropionate (3)

2-Bromopropionyl bromide (20 mL, 0.19 mol) was slowly added to a solution of *tert*-butanol (15 mL, 0.15 mol) and pyridine (16 mL, 0.19 mol) in dichloromethane (85 mL) at 0°C. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h and then washed with water, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and sat. NaHCO<sub>3</sub> solution. The combined organic phase was dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under the vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 5-10% ethyl acetate:

hexane system as eluent to obtain *tert*-butoxyl-2-bromo-propaonate (28.20 g, 86%) as yellow liquid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.26 (q,  $J$  = 8.0, 12.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{CHBr}$ ), 1.76 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CHBr}$ ), 1.47 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$ : 169.3, 82.2, 42.0, 27.7 (3C), 21.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{O}_2\text{BrNa}$  230.9991; Found 230.9988.

### 2.3 Synthesis of *tert*-butoxyl-2-nitro-propaonate (4)

*tert*-Butoxyl-2-bromopropaonate (15.04 g, 0.07 mol) was added to a solution of sodium nitrile (9.98 g, 0.14 mol) and phloroglucinol dihydrate (11.75 g, 0.07 mol) in DMF (120 mL) at room temperature and further stirred for 2 h. The reaction solution was quenched by addition of cold water and extracted with ethyl acetate, sat.  $\text{NaHCO}_3$  solution and brine, respectively. The combined organic phase was concentrated under vacuum and purified by flash column chromatography with 10% ethyl acetate: hexane system as eluent to give *tert*-butoxy-2-nitropropanoate (11.21 g, 89%) as light yellow liquid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  5.08 (q,  $J$  = 8.0, 12.0 Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{CHNO}_2$ ), 1.72 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{CHNO}_2$ ), 1.47 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$ : 164.0, 84.4, 83.9, 27.6 (3C), 15.6. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_2\text{Na}$  198.0737; Found 198.0737.

### 2.4 Synthesis of *tert*-butyl-5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedionate (10)

*tert*-Butoxy-2-nitropropanoate (9.28 g, 0.05 mol) was slowly added to the ethoxide solution, which was prepared by metallic sodium (0.13 g, 5.6 mmol) and absolute ethanol (24 mL), and followed by addition of ethyl acrylate (11 mL, 0.10 mol). The reaction mixture was heated to  $50^\circ\text{C}$  and further stirred for 8 h and then it was quenched by addition of sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. The mixture was extracted with dichloromethane. The combined organic phase was dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The crude

product was purified under flash column chromatography with 10-20% ethyl acetate: hexane system as eluent to obtain *tert*-butyl-5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedionate (11.96 g, 82%) as yellow liquid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  4.14 (q,  $J$  = 4.0 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ), 2.45 (m, 4H,  $\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$ ), 1.73 (s, 3H,  $\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)(\text{NO}_2)$ ), 1.47 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ), 1.25 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 3H,  $\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$ : 171.7, 165.7, 92.2, 84.2, 60.8, 31.3, 28.9, 27.5 (3C), 21.4, 14.0. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{Na}$  298.1261; Found 298.1266.

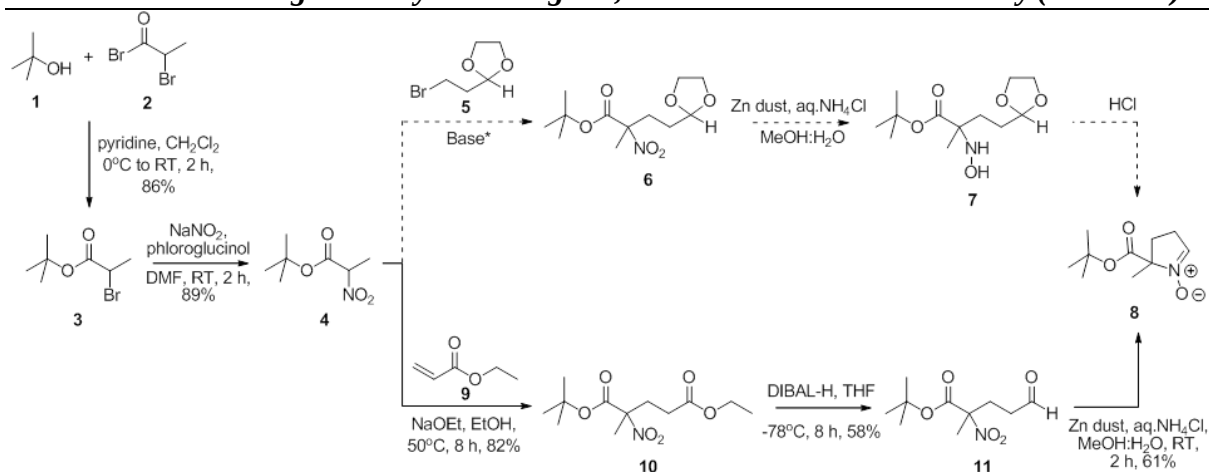
### 2.5 Synthesis of *tert*-butyl-2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate (11)

Diisobutylaluminium hydride (61 mL, 0.07 mol) was slowly added to a solution of *tert*-butyl-5-ethyl-2-methyl-2-nitropentanedionate (10.02 g, 0.04 mol) in THF (275 mL) at  $-78^\circ\text{C}$  and further stirred at this temperature for 6 h. The reaction was quenched by addition of water and filtrated through celite and washed with diethyl ether. The combined organic phase was dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The crude product was purified under flash column chromatography with 10-20% ethyl acetate: hexane system as eluent to give *tert*-butyl-2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate (4.88 g, 58%) as yellow liquid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  9.77 (t,  $J$  = 4.0 Hz, 1H,  $\text{C}(\text{O})\text{H}$ ), 2.51 (m, 4H,  $\text{C}(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})$ ), 1.73 (s, 3H,  $\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)(\text{NO}_2)$ ), 1.47 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{C}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$ : 199.2, 165.8, 92.1, 84.5, 38.5, 28.6, 27.7 (3C), 21.8. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+23]^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}_5\text{Na}$  254.0999; Found 254.0995.

### 2.6 Synthesis of BMPO (8)

An aqueous solution of ammonium chloride (0.80 mL, 1.4 g in 6 mL of water) was added to a solution of *tert*-butyl-2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate (0.51 g, 2.20 mmol) in a water (6 mL) and MeOH (4 mL). Zinc dust (1.00 g, 15.38 mmol) was added and further stirred at room





**Scheme 3.** The synthesis of BMPO spin trap (see Table 1).

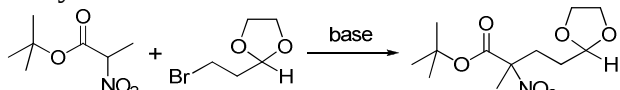
temperature for 2 h. The sample was filtered and the residue washed with methanol. The solvents in the combined organic phase were removed under vacuum. The crude product was purified by flash column chromatography with 10–20% ethanol: hexane system as eluent. *tert*-Butoxycarbonyl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (0.12 g, 61%) was observed as light yellow liquid, and *tert*-butyl-2-methyl-2-nitro-5-oxopentanoate (0.29 g), which is the starting material, was recovered as yellow liquid.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  7.10 (s, 1H,  $\text{NCHCH}_2$ ), 2.67 (dddd,  $J = 11.9, 9.2, 8.6, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHN}$ ), 2.49 (ddd,  $J = 12.4, 7.7, 3.2$  Hz, 1H,  $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHN}$ ), 2.10 (ddd,  $J = 9.3, 6.7, 1.7$  Hz, 1H,  $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CHN}$ ), 1.61 (s, 3H,  $\text{NCCCH}_3$ ), 1.44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz),  $\delta$ : 168.6, 137.4, 82.9, 79.5, 32.3, 27.6 (3C), 26.1, 20.7. HRMS (ESI-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+1]^+$  calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_3$  200.1281; Found 200.1275.

### 3. Results & Discussion

The synthesis of BMPO spin trap was displayed in scheme 3 where two synthetic approaches were summarized, with the successful pathway indicated by solid reaction arrows and the unsuccessful route shown by dashed arrows. In both approaches, the synthesis began with the preparation of  $\alpha$ -nitroester, *tert*-butoxyl-2-nitropropanoate 4 via  $\alpha$ -bromoester 3.

These reactions proceeded smoothly, in which the products were obtained in high yields. To construct the five-membered ring moiety of BMPO, a carbon-carbon bond forming reaction is needed to extend the carbon side chain at  $\alpha$ -position of compound 4. For the first approach, we adopted the alkylation reaction in which the nitro ester enolate would be formed from its corresponding  $\alpha$ -nitroester 4 under basic condition<sup>5–8</sup> and would react with 2-(2-bromoethyl)-1,3-dioxolane 5. An advantage of this approach is to eliminate the protection step for the aldehyde moiety in acrolein from reduction in the subsequent step as reported by Zhao<sup>4</sup>. Unfortunately, after several attempts to perform such alkylation reaction by using various bases and reaction conditions (Table 1), no desired product 6 was observed.

Thus, the second carbon-carbon bond forming reaction that is the Michael reaction was investigated. In this approach, we adapted the synthetic strategies from the works reported by Zhao<sup>4</sup> and Olive<sup>9</sup>. Instead of using acrolein as reported recently, ethyl acrylate 9 was treated with *tert*-butoxyl-2-nitropropanoate 4 under basic condition. To our delight, the Michael reaction proceeded as expected to generate diester compound 10.

**Table 1.** Conditions of alkylation reaction.


| Entry | Base               | Solvent  | Additive          | Temp.           | Time | Product            |
|-------|--------------------|----------|-------------------|-----------------|------|--------------------|
| 1     | NaOEt <sup>a</sup> | EtOH     | -                 | RT to 50°C      | 6 h  | No desired product |
| 2     | NaH <sup>b</sup>   | DMF      | -                 | -15°C to reflux | 6 h  | No desired product |
| 3     | NaH <sup>c</sup>   | DMF      | -                 | -15°C to reflux | 6 h  | No desired product |
| 4     | LDA <sup>a</sup>   | THF      | -                 | -78°C           | 3 h  | No desired product |
| 5     | LDA <sup>a</sup>   | THF      | HMPA <sup>d</sup> | -78°C           | 3 h  | No desired product |
| 6     | DBU                | THF      | -                 | RT              | 8 h  | No desired product |
| 7     | TBOH <sup>e</sup>  | DCM/DMSO | -                 | RT              | 10 h | No desired product |
| 8     | TBOH <sup>e</sup>  | DMSO     | -                 | RT              | 10 h | No desired product |

<sup>a</sup> generate *in situ*, <sup>b</sup> 60% NaH in mineral oil was directly used without wash with THF, <sup>c</sup> 60% NaH in mineral oil was washed with THF before used, <sup>d</sup> distilled, <sup>e</sup> 40% TBOH in water

Then, the selective reduction of ethyl ester with DIBAL-H was operated under control temperature at -78 °C, giving the aldehyde 11. The observed selectivity may be resulted from the steric hindrance exerted by *tert*-butyl group of another ester moiety that hindered its interaction with DIBAL-H. However, we also observed the production of a minor product, i.e., the alcohol 7% derived from reduction of aldehyde 11. This may contribute to the observed low yield in this step. Finally, the aldehyde 11 was treated with Zn dust and aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution to convert the nitro group to the hydroxylamine intermediate, which simultaneously underwent cyclization to achieve the targeted BMPO spin trap.

#### 4. Conclusion

We have demonstrated the new synthetic route to synthesize the robust spin trap BMPO that could be accomplished in 5 steps, which is shorter than the previous reported synthesis. The new method is not only feasible to conduct in Thailand but also suitable for the in-house preparation that could lower the research cost, considering the current high price tag of the commercial BMPO.

#### Acknowledgements

This work was financially supported by Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) and the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education. Mr. Chaiyawat Aonsri is grateful for his financial support from Science Achievement Scholarship of Thailand (SAST) from the Commission on Higher Education.

#### References

- Hawkins, C. L.; Davies, M. J. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2014**, 1840, 708–721.
- Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J. *Mol. Pharmacol.* **1982**, 21, 262–265.
- Frejaville, C.; Karoui, H.; Tuccio, B.; Le Moigne, F.; Culcasi, M.; Pietri, S.; Lauricella, R.; Tordo, P. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 258–265.
- Zhao, H.; Joseph, J.; Zhang, H.; Karoui, H.; Kalyanaraman, B. *Free Radical Biol. Med.* **2001**, 31, 599.
- Cambeiro, F.; López, S.; Varela, J. A.; Saá, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 723–727.

6. Giorgi, G.; Maiti, S.; Lopez-Alvarado, P.; Menendez, J. C. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 2722–2730.
7. Harel, T.; Rozen, S. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 6500–6503.
8. Varala, R.; Enugala, R.; Nuvula, S.; Adapa, S. R. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 877–880.
9. Olive, G.; Mercier, A.; Le Moigne, F.; Rockenbauer, A.; Tordo, P. *Free Radical Biol. Med.* **2000**, 28, 403–408.