

Sinteza trisaharida β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-D-Fucp

Tuković, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:205920>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Ivana Tuković

Sinteza trisaharida
 β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-D-Fucp

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom i neposrednim voditeljstvom doc. dr. sc. Đanija Škalamere.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekata: Sinteza i ispitivanje imunoadjuvantske aktivnosti konjugata desmuramil-dipeptida i saponina kvilaje (*Quillaja saponaria*) (Zaklada HAZU, voditelj: doc. dr. sc. Đani Škalamera) i Sinteza i strukturna analiza biološki aktivnih peptida, heterocikličkih spojeva i njihovih glikokonjugata (potpora Sveučilišta u Zagrebu, voditelj: izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković)

Zahvale

Zahvaljujem svome mentoru doc. dr. sc. Đaniju Škalameri na pruženoj prilici, vrhunskom mentorstvu, uloženom trudu, strpljenju i brojnim stručnim savjetima koji su mi uvelike olakšali izradu ovoga diplomskoga rada. Veliko hvala na ugodnoj i poticajnoj atmosferi u labosu, nesebičnoj pomoći i svom posvećenom vremenu. Također, hvala što me naučio strpljenju i upornosti jer u kemiji ne ide uvijek kako mi planiramo, ali uvijek postoji način.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama, a posebice Barbari, Ivi i Ivoni na podršci, savjetima, svim uspomenama i najljepšim godinama studiranja.

Veliko hvala Stjepanu na nesebičnoj pomoći, strpljenju i na svemu što smo zajedno prošli.

Naposljetku, najveće hvala mojim roditeljima, baki i sestrama, Zrinki i Petri, na razumijevanju, neizmjerne podršci, ljubavi i što su uvijek bili uz mene u lijepim i onim manje lijepim trenucima studiranja.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Ugljikohidrati	3
2.1.1. Podjela ugljikohidrata	3
2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije.....	6
2.1.3. Reakcije na anomernom centru.....	7
2.1.4. Reakcije hidroksilnih skupina	8
2.2. Sinteza O-glikozida	11
2.2.1. Stereokemija sinteze O-glikozida	12
2.2.2. Koenigs-Knorrova metoda glikozilacije	13
2.2.3. Trikloracetimidatna metoda.....	14
2.2.4. Izravna metoda.....	15
2.3. Metoda glikozilacije s alil-glikozidima kao glikozil-donorima	15
2.4. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-flourida i sililiranih akceptora	17
2.5. Saponini	19
2.6. QS-21	21
2.6.1. Struktura QS-21	21
2.6.2. Utjecaj strukture na aktivnost QS-21.....	22
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali i metode.....	25
3.2. Metoda glikozilacije I.....	26
3.2.1. Sinteza alil-D-ksilopiranozida (1).....	26
3.2.2. Sinteza alil-2,3,4-tri-O-pivaloil-D-ksilopiranozida (2).....	26
3.2.3. Sinteza prop-1-en-1-il-2,3,4-tri-O-pivaloil-D-ksilopiranozida (3).....	27
3.2.4. Sinteza alil- α -L-ramnopiranozida (4).....	27
3.2.5. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden- α -L-ramnopiranozida (5)	28
3.2.6. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden-4-[2,3,4-tri-O-pivaloil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (6)	28
3.3. Metoda glikozilacije II.....	29

3.3.1. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -D-ksilopiranozida (7).....	29
3.3.2. Sinteza 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-ksilopiranozil-bromida (8).....	29
3.3.3. Sinteza 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-ksilopiranozil-flourida (9)	30
3.3.4. Sinteza alil-2,3- O-izopropiliden-4-O-trimetilsilil- α -L-ramnopiranozida (10).....	31
3.3.5. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden-4-[2,3,4-tri-O-acetil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (11)	31
3.3.6. Sinteza alil-4-[β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (12) – uklanjanje izopropilidenske i acetilne zaštite	32
3.3.7. Sinteza alil-2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (13)	32
3.3.8. Sinteza 2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranoze (14).....	33
3.3.9. Sinteza 2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozil-flourida (15)	34
3.3.10. Sinteza alil- α -D-fukopiranozida (16).....	35
3.3.11. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden- α -D-fukopiranozida (17).....	35
3.3.12. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden-2-O-trimetilsilil- α -D-fukopiranozida (18)	36
3.3.13. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden-2-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]-2,3-di-O-benzil- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- α -D-fukopiranozida (19).....	36
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	39
4.1. Uvod	39
4.2. Retrosintetska analiza ciljnog spoja	39
4.3. Sinteza ciljnog spoja.....	41
4.4. Metoda glikozilacije s alil-glikozidima kao glikozil-donorima (metoda I).....	42
4.4.1. Sinteza ksiloznog prekursora	42
4.4.2. Sinteza ramnoznog prekursora	44
4.4.3. Sinteza disaharida (6) - reakcija glikozilacije (I)	45
4.5. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-flourida i sililiranih akceptora (metoda II)	46
4.5.1. Sinteza ksiloznog prekursora	46
4.5.2. Sinteza ramnoznog prekursora	48
4.5.3. Sinteza disaharida - reakcija glikozilacije (II).....	48
4.5.4. Sinteza fukoznog prekursora	51
4.5.5. Sinteza trisaharida - reakcija glikozilacije (metoda II)	52
4.5.6. Usporedba metode I i metode II.....	52
§ 5. ZAKLJUČAK	55
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	57
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	59

§ 8. DODATAK.....XV

§ 9. ŽIVOTOPIS XXVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Sinteza trisaharida

β -D-Xylp-(1→4)- α -L-Rhap-(1→2)-D-Fucp

Ivana Tuković

U sklopu ovog diplomskog rada biti će pripremljen linearni trisaharid Xyl(β 1-4)Rha(α 1-2)Fuc, važna domena imunostimulirajućeg saponina QS-21. Prirodni spoj QS-21, izoliran iz kore drveta *Quillaja saponaria*, jedan je od najjačih do sad poznatih adjuvanata, odnosno ključnih komponenti cjepiva koje poboljšavaju imunološki odgovor na primijenjeni antigen. Linearni trisaharid biti će sintetiziran iz odgovarajuće zaštićenih monosaharidnih prekursora. Usporedit će se dvije metodologije glikozilacije: i) upotrebom alila kao zaštitnih/aktivirajućih skupina, te ii) upotrebom glikozil-fluorida kao donora i sililiranih šećera kao akceptora. Očekivano je da će druga metoda zbog svoje robustnosti dati bolje rezultate. Prednost te metode je brz i jednostavan pristup, komercijalno dostupan katalizator, činjenica da nisu potrebni strogi uvjeti bez vlage i kisika, te da se reakcija provodi pri sobnoj temperaturi. Cilj ovog rada je što jednostavnijim sintetskim putem i u čim boljem iskorištenju doći do ciljnog linearnog trisaharida. Međuprodukti u sintezi, kao i konačni produkt biti će okarakterizirani spektroskopskim metodama (IR, NMR).

(59+XXVI stranica, 39 slika, 3 tablice, 25 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: adjuvanti, cjepiva, glikozilacija, sinteza oligosaharida, *Quillaja* saponini

Mentor i neposredni voditelj: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Đani Škalamera
 2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 14. 10. 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Sinteza trisaharida β -D-Xylp-(1→4)- α -L-Rhap-(1→2)-D-Fucp

Ivana Tuković

In this diploma thesis, the linear trisaccharide Xyl(β 1-4)Rha(α 1-2)Fuc, an important domain of the immunostimulatory saponin QS-21 was prepared. The natural compound QS-21, isolated from the bark of *Quillaja saponaria* tree, is one of the strongest known adjuvants. Adjuvants are the key components of the vaccine that improve the immune response to the applied antigen. The linear trisaccharide will be synthesized from protected monosaccharide precursors. Two glycosylation methods will be compared: i) using allyl as protecting / activating groups, and ii) using glycosyl fluoride as a donor and silyl ether as an acceptor. The second method is more robust and is expected to give better results. Advantages of this method are quick and easy approach, the commercially available catalyst, the fact that strict conditions without moisture and oxygen are not required, and that the reaction is carried out at room temperature. The aim of this work is to prepare the target linear trisaccharide in the simplest possible synthetic way and in the best possible yield. The intermediates in the synthesis, as well as the final product, will be characterized by spectroscopic methods (IR, NMR).

(59+XXVI pages, 39 figures, 3 tables, 25 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: adjuvants, glycosylation, oligosaccharide synthesis, *Quillaja* saponins, vaccines

Mentor: Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
 2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
- Substitute: Dr. Željka Car, Assistant Professor

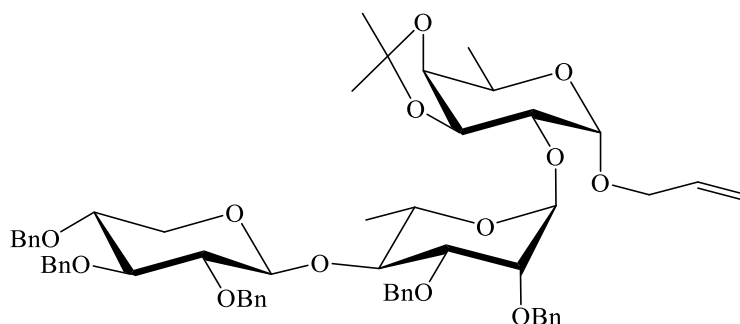
Date of exam: Oct 14, 2021

§ 1. UVOD

Adjuvanti su ključne imunostimulirajuće komponente cjepiva koje poboljšavaju i usmjeravaju imunološki odgovor na primijenjeni antigen.¹⁴ Unatoč sve važnijoj ulozi, mali je broj adjuvanata odobren za ljudsku uporabu.^{15,16} Saponinski adjuvanti tema su mnogih istraživanja i detaljno su proučeni sa svrhom uporabe u veterinarskim i humanim cjepivima. Prirodni spoj, saponin QS-21, izoliran iz kore drveta *Quillaja saponaria*, jedan je od najjačih do sad poznatih adjuvanata. Nakon više od tri desetljeća istraživanja u preko 100 kliničkih studija, odobren je za upotrebu u humanim cjepivima (Shingrix®). Međutim, QS-21 ima nekoliko ozbiljnih nedostataka, koji uvelike ograničavaju njegovu širu primjenu: kemijski je nestabilan, dostupan je u relativno maloj količini iz prirodnog materijala nakon vrlo zahtjevnog pročišćavanja te je toksičan pri većim dozama.¹⁷ Navedeno je potaknulo niz istraživanja korelacije strukture i aktivnosti u svrhu pronalaska strukturno pojednostavljenih i stabilnijih analoga QS-21. Prirodni QS-21 sastoji se od četiri glavne strukturne domene: razgranatog trisaharida, triterpenske jedinice, linearnog oligosaharida i acilnog lanca. Do sada su pripremljeni strukturni analozi s modifikacijama na svim navedenim domenama, a sveobuhvatan pregled tih istraživanja dan je u ref. 17. Pokazalo se da je linearna oligosaharidna domena QS-21, ([Xyl ili Api](β1-3)Xyl(β1-4)Rha(α1-2)Fuc, nužna za njegovu adjuvantsku aktivnost, što je potaklo istraživanja aktivnosti analoga sa skraćenim oligosaharidom (1-4 šećerne jedinice). Aktivnost trisaharidnog analoga usporediva je s aktivnošću QS-21, dok su disaharidni i monosaharidni analozi pokazali lošije rezultate u smislu toksičnosti, odnosno niske aktivnosti, što dovodi do zaključka da je za zadržavanje optimalne adjuvantske aktivnosti minimalna duljina oligosaharida od 3 šećerne jedinice.¹⁸ U nedavno objavljenim istraživanjima pokazano je da zamjena ksiloze i ramnoze nekim drugim šećerima, npr. komercijalno dostupnom celobiozom (Glc(β1-4)Glc) ili laktozom (Gal(β1-4)Glc), rezultira analogima čija je imunoadjuvantska aktivnost značajno smanjena.¹⁹

U sklopu ovog diplomskog rada biti će pripremljen linearni trisaharid Xyl(β1-4)Rha(α1-2)Fuc, u kojem je zadržan slijed koji je prisutan u prirodnom QS-21 (slika 1). Biti će sintetiziran iz odgovarajuće zaštićenih monosaharidnih prekursora: D-ksiloze, L-ramnoze i D-fukoze. Usporedit će se dvije metodologije glikozilacije: i) upotrebom alila kao zaštitnih/aktivirajućih skupina, te ii) upotrebom glikozil-fluorida kao donora i sililiranih šećera kao akceptora.

Očekivano je da će druga metoda zbog svoje robustnosti dati bolje rezultate. Prednost te metode je brz i jednostavan pristup, komercijalno dostupan katalizator ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$), činjenica da nisu potrebni strogi uvjeti bez vlage i kisika, te da se reakcija provodi pri sobnoj temperaturi.⁹ Cilj ovog rada je što jednostavnijim sintetskim putem i u čim boljem iskorištenju doći do ciljnog linearnog trisaharida. Međuprodukti u sintezi, kao i konačni produkt biti će okarakterizirani spektroskopskim metodama (IR, NMR). U daljnjim se istraživanjima (izvan okvira ovog rada) ovaj trisaharid može koristiti u svrhu pripreve analoga QS-21 u kojima će trisaharidni dio bitan za aktivnost biti sačuvan, dok se ostale strukturne podjedinice osnovne strukture QS-21 mogu varirati/modificirati te tako pratiti utjecaj promjene strukture na biološku aktivnost.



Slika 1. Struktura ciljne molekule

§ 2. LITERATURNI PREGLED

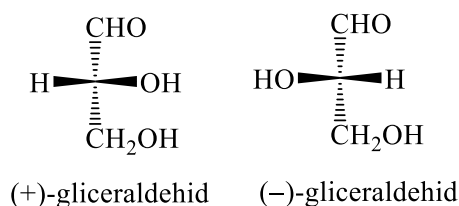
2.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su najraširenija skupina organskih spojeva u prirodi. Dobili su naziv na temelju molekulske formule većine šećera $C_n(H_2O)_m$, koja upućuje na to da je ugljik na neki način vezan s vodom. Od navedene molekulske formule dolazi naziv „hidrati ugljika“ ili „ugljikohidrati“.¹ Danas znamo da se ne radi o hidratima ugljika, već o polihidroksialdehidima, polihidroksiketonima ili spojevima koji se u njih lako hidratiziraju. Ovu vrstu spojeva sintetiziraju i metaboliziraju sve biljke i životinje, a služe im i kao skladište energije koja se po potrebi oslobađa u njihovim stanicama. U biljkama ugljikohidrati nastaju fotosintezom, tj. nizom složenih reakcija u kojima se s pomoću Sunčeve energije ugljikov dioksid i voda pretvaraju u glukozu i kisik.¹ Kod sisavaca ugljikohidrati imaju važnu biološku funkciju u procesu glikolize (glavnog metaboličkog puta razgranje glukoze) i u ciklusu limunske kiseline. Povezivanjem mnogo molekula glukoze nastaje škrob koji služi kao skladište energije ili celuloza koja je gradivni element biljaka. Celuloza je iznimno važna strukturna komponenta biljaka jer tvori stanične stijenke i učvršćuje njihovu strukturu.¹ Proces skladištenja energije u biljkama odnosi se na nastajanje škroba koji skladišti energiju te je lako oslobađa u stanicama. Za razliku od biljaka, kod životinja se energija skladišti povezivanjem glukoze u makromolekulu glikogen, više razgranati analog škroba. Ugljikohidrati su također uključeni u gotovo sve funkcije ljudskog metabolizma te služe za stvaranje i skladištenje energije u našim stanicama.

2.1.1. Podjela ugljikohidrata

Ugljikohidrate možemo podjeliti prema broju ugljikovih atoma, broju podjedinica, prisutnosti ketonske ili aldehidne skupine i prema konfiguraciji referentnog te anomernog ugljikovog atoma. Prema broju podjedinica ugljikohidrate možemo podjeliti na monosaharide, disaharide, oligosaharide i polisaharide. Monosaharidi ili jednostavni šećeri su ugljikohidrati koji ne mogu hidrolizirati u jednostavnije spojeve (npr. glukozu, fruktozu). Disaharidi su šećeri koji se mogu hidrolizirati u dvije molekule monosaharida. Najpoznatiji disaharid je saharoza odnosno kuhinjski šećer, koji hidrolizira u glukozu i fruktozu. Oligosaharidi su šećeri koji se sastoje od

tri do deset podjedinica, a produkti su djelomične hidrolize polisaharida (npr. stahioza, rafinoza). Molekule polisaharida mogu hidrolizirati u mnogo molekula monosaharida. Najpoznatiji polisaharidi su škrob i celuloza. Obje molekule su sastavljene od velikog broja molekula glukoze sa razlikom u njihovom povezivanju. U celulozi su molekule glukoze povezane β -glikozidnim vezama, dok se škrob sastoji od molekula glukoze povezanih α -glikozidnim vezama. Saharidi koji imaju aldehidnu skupinu nazivaju se aldoze (*ald-* označuje aldehidni dio, a *-oza* šećerni dio molekule), dok oni koji sadrže keto skupinu su ketoze (*ket-* za keton, a *-oza* za šećer). Klasifikacija na D- i L-šećere jedna je od najstarijih stereokemijskih notacija. Primijećeno je da odgradnja bilo kojeg prirodnog šećera uvijek daje desnozakrećući (+)-enantiomer gliceraldehida, a neki sintetički pripremljeni daju lijevozakrećući (-)-enantiomer. Stoga, određeno je da se stereokemijskim deskriptom D označuju šećeri koji se odgrađuju u (+)-gliceraldehid, a L oni koji se pretvaraju u (-)-gliceraldehid (slika 2).¹



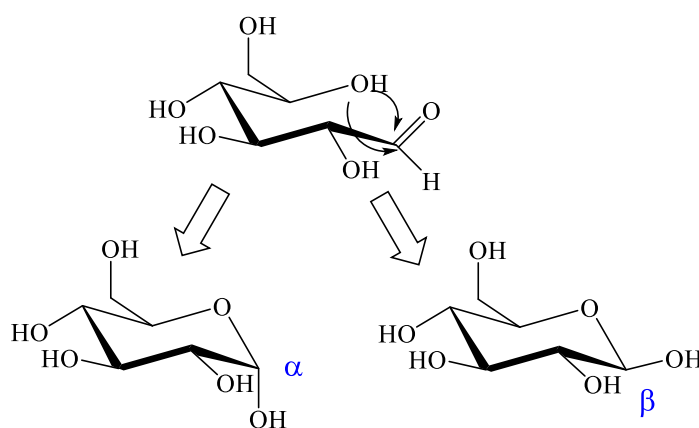
Slika 2. Fisherova projekcija (+)- i (-)-gliceraldehida

Produkt odgradnje određuje se na osnovi stereokemije zadnjeg asimetričnog ugljikovog atoma, tzv. referentnog C-atoma, koji je najudaljeniji karbonilnoj skupini. Odnosno, hidroksilna skupina (+)-gliceraldehida usmjerena je na Fisherovoj projekciji udesno pa će u svim šećerima D-niza hidroksilna skupina biti usmjerena na jednak način.¹ Suprotno, u šećerima L-niza hidroksilna skupina zadnjeg asimetričnog ugljikovog atoma usmjerena je ulijevo. Važno je napomenuti da D i L oznake ne daju podatak o smjeru zakretaja ravnine polarizirane svjetlosti. Neki D-šećeri mogu pokazivati (+), a drugi (-) optičko skretanje.¹

Prilikom ciklizacije monosaharidnog prstena, tj. prelaska karbonilne skupine u hemiacetalnu, moguć je nastanak dva različita diastereomera, koji se nazivaju anomeri te označavaju slovima α i β (slika 3). Anomerni C atom je onaj na kojem se nalazi aldehidna ili ketonska skupina u otvorenoj formi ugljikohidrata. Prilikom ciklizacije, ovisno o tome s koje strane se odvija nukleofilni napad na karbonilnu skupinu, hemiacetalna hidroksilna skupina u cikličkoj formuli biti će usmjerena prema gore ili dolje. Anomer u kojem je ta hidroksilna skupina usmjerena

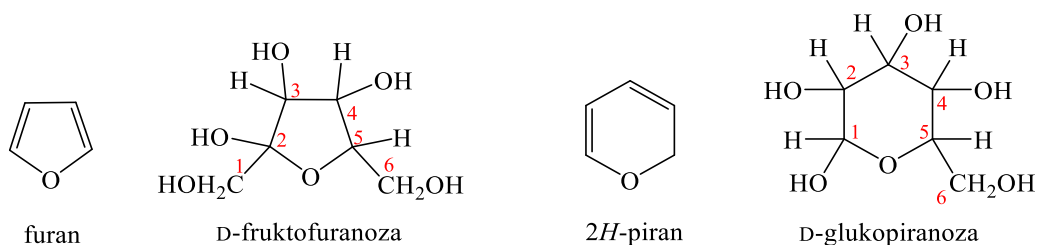
prema dolje (aksijalno) naziva se α -anomer pri čemu referentni i anomerni C-atomi imaju različitu konfiguraciju. Dok se anomer s hidroksilnom skupinom prema gore (ekvatorijalno) naziva

β -anomer pri čemu referentni i anomerni C-atomi imaju istu konfiguraciju. Navedeni anomeri su zapravo dijastereomeri, stereoizomeri koji nisu zrcalne slike. Zbog toga su njihova svojstva poput tališta i specifičnog zakretanja različita.



Slika 3. α - i β -anomeri D-glukoze

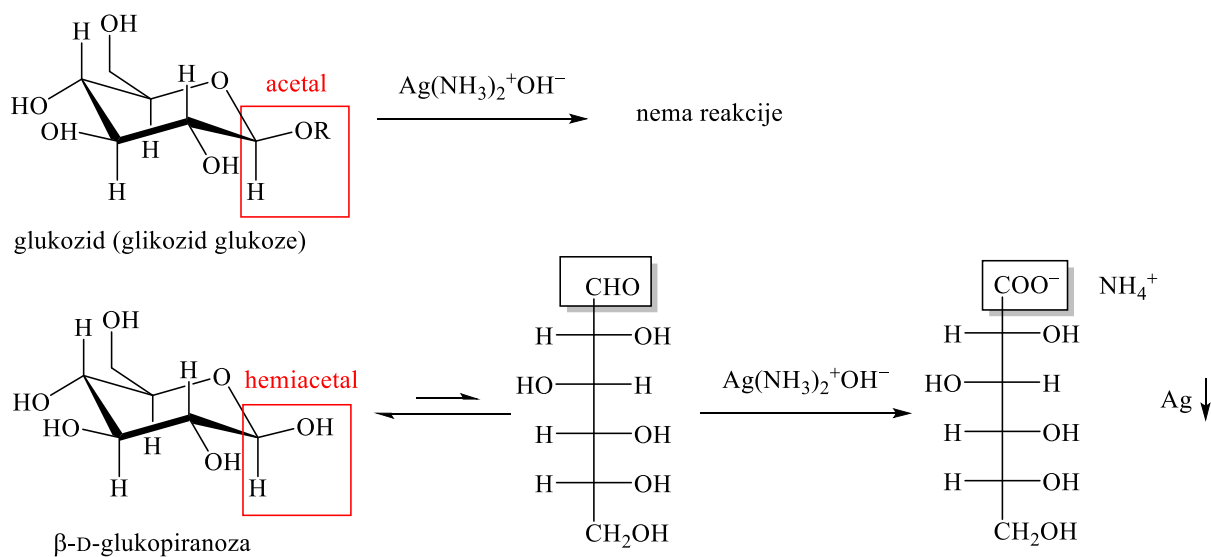
Monosaharidi osim u lančastoj formi mogu postojati i u već spomenutom obliku cikličkog hemiacetala. Ukoliko molekula sadrži aldehidnu i hidroksilnu skupinu, njihovom reakcijom nastaju ciklički hemiacetali. Ako pritom nastaju peteročlani ili šesteročlani prstenovi, ti su spojevi mnogo stabilniji od njihovih lančastih analoga. Prema veličini prstena monosaharide možemo podijeliti na piranoze i furanoze. Piranoze su šesteročlani ciklički hemiacetali čije je ime izvedeno iz šesteročlanog cikličkog etera pirana, a furanoze su peteročlani ciklički hemiacetali zbog odgovarajućeg cikličkog etera furana (slika 4).¹



Slika 4. Cikličke strukture monosaharida

2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije

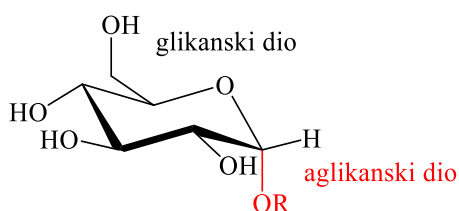
Kemija ugljikohidrata uključuje kemiju aldehida, ketona i alkohola jer su to funkcijske skupine prisutne u ovim polifunkcijskim spojevima.¹ Većina šećera postoji u obliku cikličkih poluacetalata, koji su u otopini u ravnoteži s lančastim aldehydima ili ketonima i zato podliježu karakterističnim reakcijama za svaku skupinu koju sadrže. Poput aldehida i ketona, aldoze i ketoze mogu se reducirati u odgovarajuće šećerne alkohole ili alditole, tj. alkohole koji se najčešće dobivaju redukcijom šećera i na svakom C-atomu imaju vezanu jednu -OH skupinu. Šećerni alkoholi upotrebljavaju se u industriji kao aditivi hrani i zamjena su za šećer (saharozu).¹ Osim redukcije, šećeri podliježu i reakcijama oksidacije i to s mnogim reagensima. Ove reakcije često služe za identifikaciju funkcijskih skupina šećera. Lako oksidiraju aldehydne skupine aldoza, a nekim reagensima može se selektivno oksidirati i terminalna skupina -CH₂OH. Tollensov reagens ([Ag(NH₃)₂]⁺OH⁻) jedan je od oksidirajućih reagensa i služi za dokazivanje aldehydne skupine uz nastajanje karboksilatnog iona i elementarnog srebra u obliku zrcala pa se stoga naziva test srebrnog zrcala. Šećeri koji reduciraju ovaj reagens nazivaju se reducirajući šećeri. Oni su najčešće u lančastom obliku gdje je aldehydna ili ketonska skupina slobodna. Hemiacetali se lako pretvaraju u lančasti oblik, no acetali su stabilni u neutralnim i bazičnim uvjetima. Ukoliko je karbonilna skupina vezana u cikličkom obliku acetalna, taj šećer neće reagirati s Tollensovim reagensom (shema 5).¹ Šećerni acetali koji ne reagiraju s Tollensovim reagensom su nereducirajući šećeri i nazivaju se glikozidi. Imena ove skupine spojeva završavaju na -ozid i predstavljaju stabilne acetale koji ne mogu spontano preći u lančaste oblike te postoje u definiranom anomernom obliku.¹



Shema 5. Reakcija glikozida glukoze s Tollensovim reagensom ¹

2.1.3. Reakcije na anomernom centru

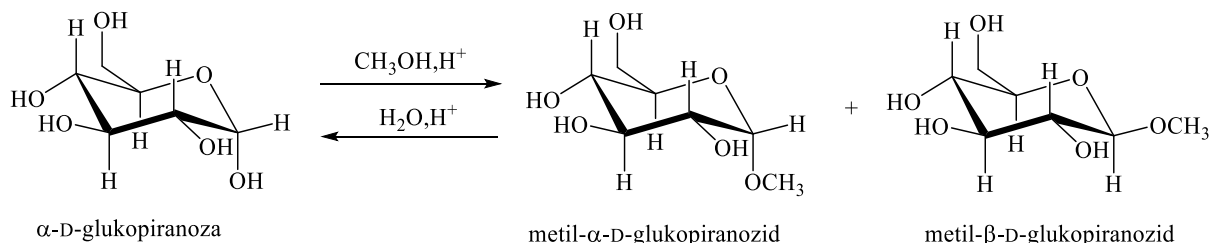
U glikozidima je prisutna glikozidna veza odnosno kovalentna veza između anomernog C-atoma i ostatka molekule. Ovisno o konfiguraciji anomernog centra postoje α i β -glikozidne veze. Ova veza dijeli molekulu na glikanski i aglikanski dio (slika 6). Postoje različiti tipovi glikozidne veze ovisno o heteroatomu vezanom na anomerni C atom, poput O-glikozida, S-glikozida, N-glikozida, C-glikozida i ostalih.



Slika 6. Struktura O-glikozida

Aldoze i ketoze, poput aldehida i ketona, prelaze u acetale (odnosno glikozide) u reakciji s alkoholom uz kiseli katalizator. Priprava O-glikozida odvija se u istim uvjetima kao Fischerova esterifikacija, tj. kiselinski kataliziranom reakcijom šećera s metanolom (alkoholom) pri čemu nastaju oba anomera metil-glikozida (shema 7). Reakcija se odvija samo na anomernom C-

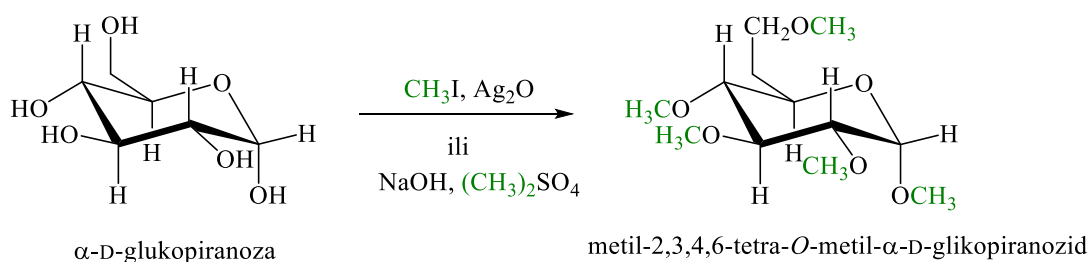
atomu jer je njegova reaktivnost drukčija od reaktivnosti ostalih C-atoma u molekuli; jedini sadrži dvije C-O veze.



Shema 7. Priprava O-glikozida u Fischerovim uvjetima¹

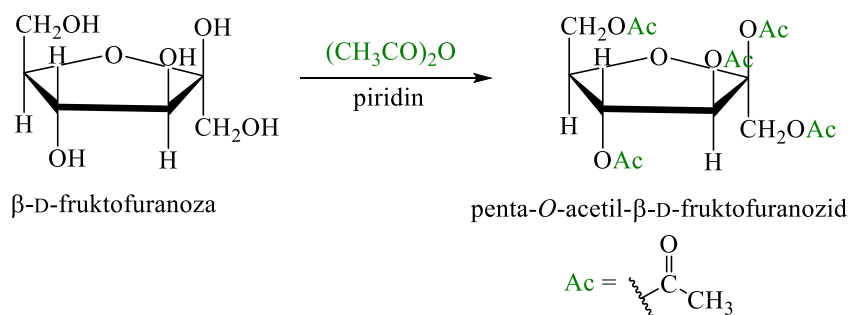
2.1.4. Reakcije hidroksilnih skupina

Zbog prisutnosti nekoliko hidroksilnih skupina šećeri su vrlo topljivi u vodi, a gotovo netopljivi u organskim otapalima. Reakcijama hidroksilnih skupina mogu nastati šećerni eteri i esteri koji se tada mogu pročistiti prekristalizacijom iz organskih otapala ili kromatografskim postupcima.¹ Primjer reakcije alkiliranja hidroksilne skupine je djelovanje metil-jodida i srebrova oksida na šećer pri čemu se sve njegove hidroksilne skupine pretvaraju u metilne etere. Metilni ugljik u molekuli CH_3I postaje elektrofilniji zbog polarizacije C-I veze koju potiče srebrov oksid. Nukleofilnim napadom hidroksilne skupine šećera i daljnjim deprotoniranjem nastaje eter (shema 8). Uz pažljivo kontrolirane uvjete može se sačuvati stereokemija anomernog ugljikovog atoma. Isti produkt možemo dobiti i Williamsonovom sintezom, uobičajenim postupkom dobivanja etera. Reagensi u ovoj reakciji su natrijev hidroksid i dimetil-sulfat, no zbog prisutstva jako bazičnog alkoksidnog iona jednostavni šećer izomerizira i raspada se. Stoga, kako bi nastao željeni metilirani ugljikohidrat potrebno ga je prethodno prevesti u glikozid koji je stabilan u bazičnim uvjetima.



Shema 8. Tvorba metilnih etera¹

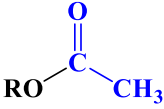
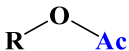
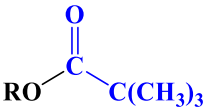
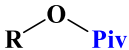
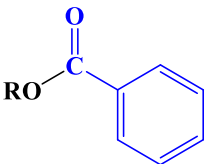
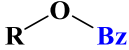
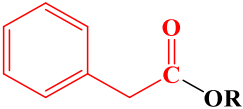
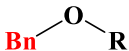
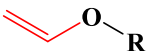
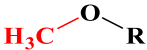
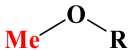
Aciliranjem hidroksilnih skupina dobivaju se šećerni esteri. Reakcijom acetanhidrida uz piridin (blago bazični uvjeti) hidroksilne skupine šećera pretvaraju se u acetatne estere (shema 9). Acetiliraju se sve hidroksilne skupine, a pri tome je očuvana stereokemija anomernog ugljikovog atoma jer ne dolazi do pucanja C-O veze.

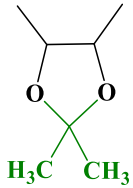
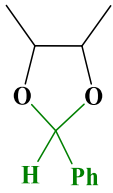


Shema 9. Tvorba acetatnih estera¹

Na ovome principu temelji se kemija zaštitnih skupina kod ugljikohidrata. Najčešće se koriste eterske, esterske i acetalne zaštitne skupine koje blokiraju reaktivnost hidroksilnih skupina. Na taj način postiže se selektivnost u reakcijama. Uvođenje i uklanjanje ovih skupina mora biti jednostavno, reakcije moraju imati visoki prinos te ne smiju interferirati s drugim reakcijskim centrima. Prednosti esterskih skupina su lakše uvođenje i uklanjanje, no eterske skupine su stabilnije i otpornije na širi spektar reakcijskih uvjeta. Neke od najčešćih zaštitnih skupina u kemiji ugljikohidrata, kao i one korištene u izradi ovog diplomskog rada prikazane su u Tablici 1.

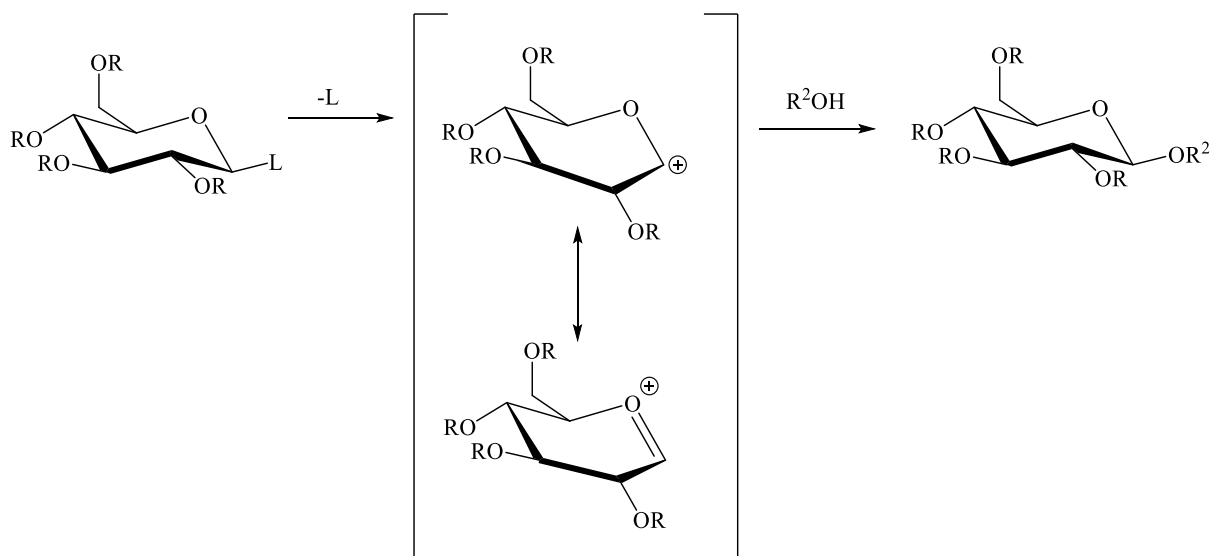
Tablica 1. Zaštitne skupine u kemiji ugljikohidrata

ESTERSKE ZAŠTITNE SKUPINE			
Zaštitna skupina	Oznaka	Uvođenje	Uklanjanje
 <p>ACETATNA ZAŠTITA</p>		Ac ₂ O ili AcCl/ piridin	NaOMe/ MeOH ili NH ₃ / MeOH
 <p>PIVALOILNA ZAŠTITA</p>		PivCl/ piridin	Baza MeLi ili reducirajuća sredstva (LiAlH ₄)
 <p>BENZOILNA ZAŠTITA</p>		BzCl ili Bz ₂ O/ piridin	NaOMe/ MeOH
ETERSKE ZAŠTITNE SKUPINE			
Zaštitna skupina	Oznaka	Uvođenje	Uklanjanje
 <p>BENZILNA ZAŠTITA</p>		BnCl ili BnBr/ NaH, KH	katalitička hidrogenoliza (Pd/C)
 <p>ALILNA ZAŠTITA</p>		Alil-bromid/NaH Alilni alkohol/AcCl	Izomerizacija, kisela hidroliza: Pd/C, Pd(Ph ₃) ₄ /H ⁺
 <p>METILNA ZAŠTITA</p>		CH ₃ I ili (CH ₃) ₂ SO ₄ / NaH, KH	BBr ₃ , AlBr ₃ , AlI ₃

ACETALNE ZAŠTITE			
Zaštitna skupina	Oznaka	Uvođenje	Uklanjanje
 <p>IZOPROPILIDENSKA ZAŠTITA</p>		Aceton, 2,2-dimetoksipropan/ kat. <i>p</i> -TsOH	Kisela hidroliza, H ⁺
 <p>BENZILIDENSKA ZAŠTITA</p>		Ph-CHO ili benzaldehyd dimetilacetal uz Lewisovu kiselinu	Kisela hidroliza, H ⁺

2.2. Sinteza O-glikozida

Osim karakterističnih reakcija pojedinih funkcijskih skupina ugljikohidrata, u organskoj sintezi od iznimne su važnosti metode sinteze glikozida i općenito sinteze oligosaharida iz odgovarajućih monosharidnih podjedinica. Glikozilacija je jedna od osnovnih i najvažnijih sintetskih metoda za pripremu prirodnih spojeva. Prvi korak u glikozilaciji je aktivacija glikozilnog donora pretvaranjem anomerne OH skupine u dobru izlaznu skupinu, nakon čega slijedi (stereoselektivno) vezanje glikozilnog akceptora (shema 10). Postoji više metoda kojima se provodi ova transformacija, a glavne i najčešće (Koenigs-Knorrova metoda, trikloracetimidatna i izravna metoda) opisane su u nastavku.

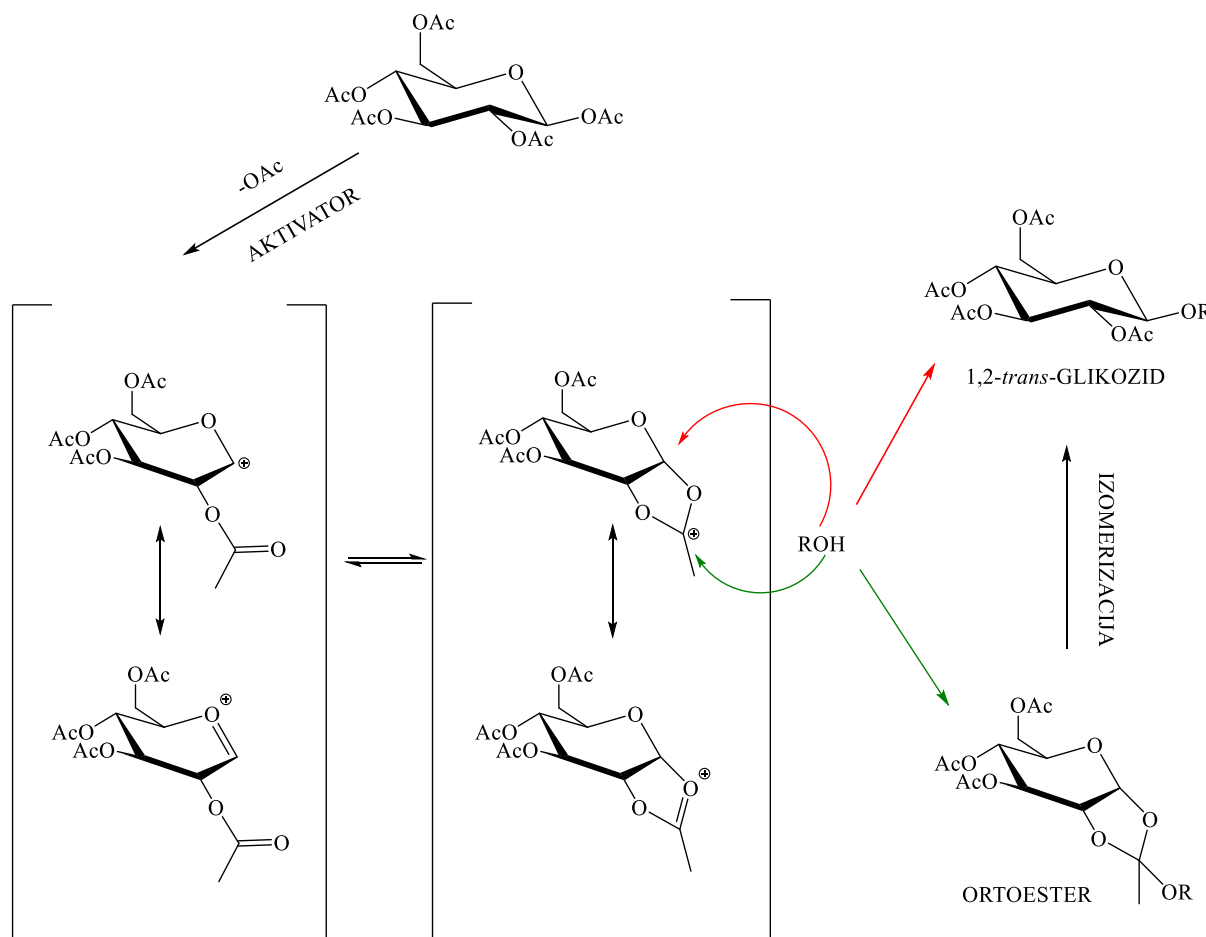


Shema 10. Pojednostavljeni mehanizam sinteze O-glikozida

2.2.1. Stereokemija sinteze O-glikozida

Među raznim glikozidnim vezama u prirodi, O-glikozidne veze su najveći izazov u sintezi. Postoje 4 osnovne vrste O-glikozidne veze koje se, ovisno o nomenklaturi, najčešće definiraju kao 1,2-*cis* α - i β - te 1,2-*trans* α - i β -glikozidi.² U reakcijama glikozilacije nakon aktivacije glikozil-donora i odlaska izlazne skupine dolazi do stvaranja glikozil-kationa, koji je stabiliziran zbog kisikovog atoma u susjedstvu pa kao drugu rezonancijsku strukturu možemo pisati i oksokarbenijev ion. Glikozil-akceptor, nukleofil, tada može napasti i formirati glikozidnu vezu s gornje ili donje strane ravnine prstena. Na stereokemijski ishod glikozilacije osim temperature, tlaka, koncentracije i strukture glikozid-donora/akceptora utječe i zaštitna skupina na C-2 atomu.⁴ Uz estersku skupinu na C-2 atomu dolazi do 1,2-*trans*-glikozilacije odnosno reakcije s preferiranim anomernim ishodom te nastaje 1,2-*trans*-glikozid kao glavni produkt. Skupina na C-2 atomu naziva se participirajuća skupina. Ona je susjedna skupina koja ima važnu ulogu u aktivaciji glikozil-donora aktiviranjem izlazne skupine. 1,2-*trans*-Glikozilaciju možemo postići korištenjem esterskih zaštitnih skupina s acilnom skupinom poput acetatnih, pivaloilnih ili benzoatnih skupina na C-2 atomu. Ukoliko je takva skupina prisutna na C-2 atomu, participacijom dolazi do nastajanja oksokarbenijevog iona koji prelazi u acetiloksonijev ion te konačno u 1,2-*trans*-glikozid. Nukleofilnim napadom alkohola na C-atom dioksalanskog prstena dolazi do nastajanja ortoestera koji izomerizacijom prelazi u željeni

produkt (shema 11).² U slučaju kada na C-2 atomu nema participirajuće skupine ili se nalazi eterska zaštitna skupina, produkt glikozilacije biti će smjesa anomera.

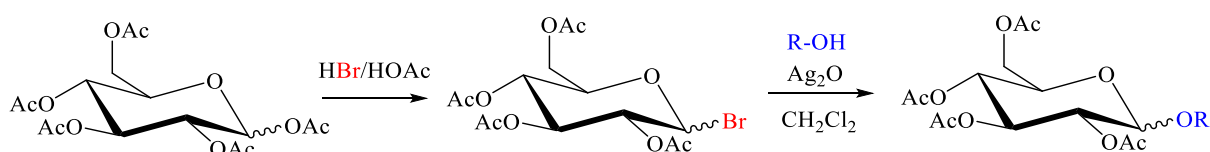


Shema 11. 1,2-*trans*-Glikozilacija²

2.2.2. Koenigs-Knorrova metoda glikozilacije

Koenigs-Knorrova metoda jedna je od najstarijih metoda glikozilacije i temelji se na reakciji halogeniranih šećera s alkoholom (glikozil-akceptorom) uz soli teških metala. Halogenirani šećeri pripremaju se uvođenjem halogenog elementa na mjesto anomerne -OH skupine. Ukoliko je izlazna skupina glikozidnog donora bromid, uvođenje se provodi na peracetiliranom šećernom derivatu uz HBr u octenoj kiselini. Glikozil-halogenidi mogu biti različite reaktivnosti i stabilnosti ovisno o prirodni halogenog elementa i vezanim zaštitnim skupinama. Kloridi su stabilniji od bromida, dok su jodidi obično vrlo nestabilni. Katalizatori su najčešće soli srebra (npr. Ag_2O , Ag_2CO_3 , AgOTf) ili žive, suspendirane/otopljene u aprotičnom otapalu,

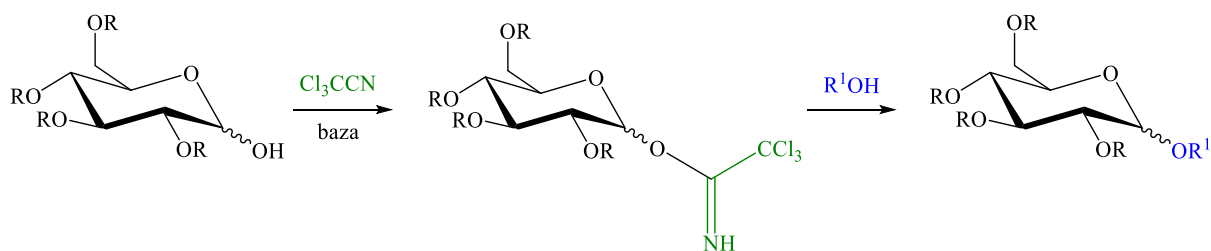
a zbog nestabilnosti glikozil-halogenida reakcije se provode na sobnoj temperaturi ili uz hlađenje (shema 12).³ Reakcija je stereospecifična ovisno o prisutnosti participirajuće skupine. Nastajanju β -anomera pridonosi sudjelovanje participirajuće skupine, dok nastajanju α -anomera pridonosi anomerni efekt u slučaju kada nema participirajuće zaštitne skupine. Nedostaci ove metode su žestoki uvjeti potrebni za pripremu glikozil-halogenida, koji su termički vrlo nestabilni i podložni hidrolizi ili eliminaciji. Uz navedeno, metalne soli su potrebne u ekvimolarnim količinama, a često su otrovne, neke i eksplozivne.³



Shema 12. Koenigs-Knorrova metoda glikozilacije

2.2.3. Trikloracetimidatna metoda

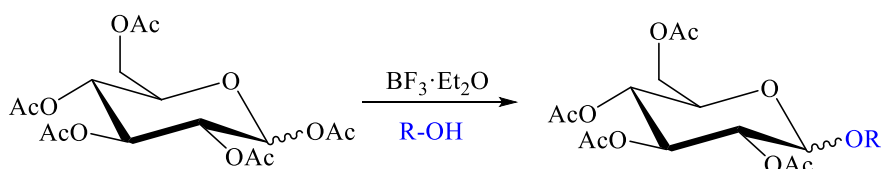
U trikloracetimidatnoj metodi kao glikozil-donori priređuju se *O*-glikozil-trikloracetimidati. Prednost ove metode je upravo veća stabilnost ove vrste spojeva od analognih glikozil-halida. Prvi korak u pripravi glikozil-donora je selektivno uklanjanje zaštite s anomernog C-atoma pri čemu slobodna -OH skupina šećera reagira s trikloroacetonitrilom (Cl_3CCN) u prisustvu baze (npr. K_2CO_3 , NaH). Nastali *O*-glikozil-trikloracetimidat se aktivira pomoću Lewisove kiseline, poput $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ili trimetilsilil-trifluorometansulfonata (TMSOTf), te zatim reagira s glikozilnim akceptorom (shema 13). Glikozil-trikloroacetimidi su relativno stabilni u bazičnim i neutralnim uvjetima, dok u prisutnosti Lewisove kiseline reagiraju s nukleofilima. Kod ove metode također je prisutan efekt participirajuće skupine koji usmjerava prema nastajanju 1,2-*trans*-glikozida. Ukoliko na C-2 atomu nema participirajuće skupine, iz β -trikloracetimidata nastaju α -glikozidi, a iz α -trikloracetimidata nastaju β -glikozidi.⁴



Shema 13. Trikloracetimidatna metoda priprave O-glikozida

2.2.4. Izravna metoda

Izravna metoda glikozilacije jedna je od najjednostavnijih metoda priprave glikozida, a posebno je pogodna za male glikozilne akceptore. Koristi se za pripravu jednostavnih glikozida iz peracetiliranih šećera kao glikozil-donora koji su najčešće aktivirani s borovim trifluoridom dietil-eteratom ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) kao Lewisovom kiselinom (shema 14). Nakon izlaska acetilne skupine na anomernom C-atomu, koja je u ovome slučaju izlazna skupina, nastaje oksokarbenijev kation. Sudjelovanjem participirajuće acetilne skupine na C-2 atomu, oksokarbenijev kation prelazi u acetiloksonijev ion, što daljnjom reakcijom pridonosi nastajanju 1,2-*trans*-glikozida.⁵



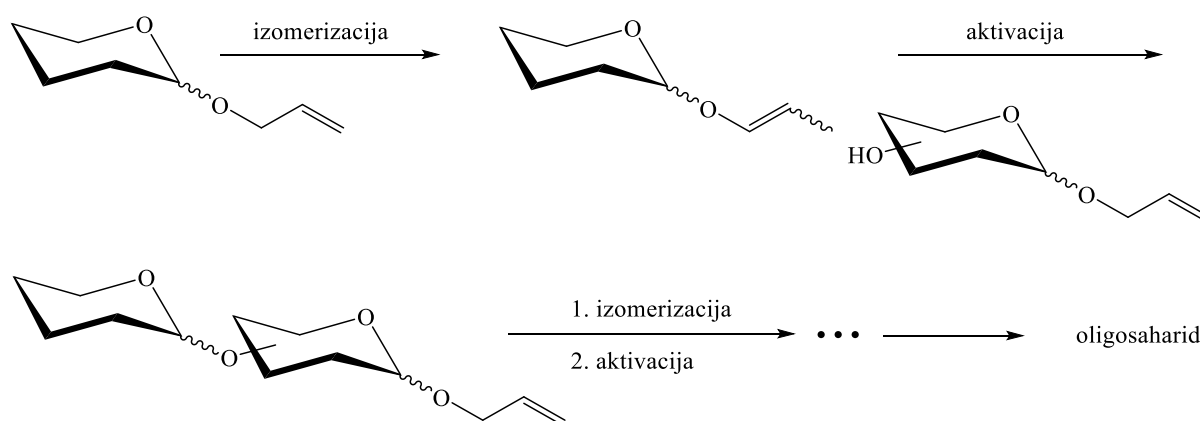
Shema 14. Izravna metoda glikozilacije

Nakon tri osnovne metode, u nastavku će biti detaljnije opisane još dvije metode glikozilacije na čijoj upotrebi i usporedbi se temelji ovaj diplomski rad i priprema ciljne molekule.

2.3. Metoda glikozilacije s alil-glikozidima kao glikozil-donorima

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća brojna su istraživanja posvećena razvoju novih metoda glikozilacije, no unatoč napretku, učinkovit način sinteze složenih ugljikohidrata i dalje predstavlja izazov.⁶ Kako bi se metode glikozilacije što više pojednostavile, poželjno je da skupina uvedena kao zaštita na anomernom -OH, ujedno bude i izlazna skupina u reakciji. Na

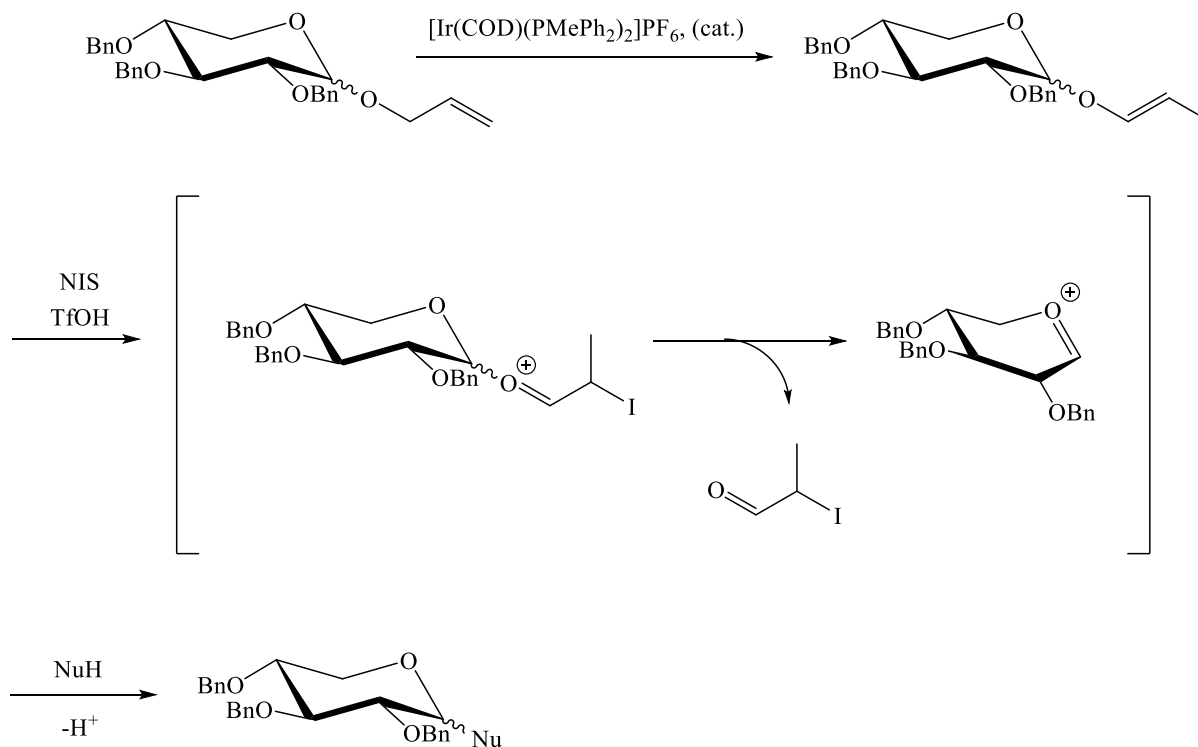
taj se način izbjegava dodatan korak u sintezi i dodatno pročišćavanje, a samim time se povećava učinkovitost metode. Takve skupine je teško naći zbog činjenice da dobre izlazne skupine najčešće nisu dovoljno stabilne da budu zaštita na anomernoj -OH skupini.⁶ Naslovna metoda glikozilacije koristi alil-glikozide kao glikozil-donore pri čemu je alilna skupina dobra zaštitna skupina, koja se vrlo jednostavno pretvori i u dobru izlazeću skupinu. Nakon pripreme alil-glikozida potrebno ga je izomerizirati u reaktivniji, prop-1-enil-glikozid, koji u reakcijskim uvjetima putem generiranja oksokarbenijevog iona reagira s glikozil-akceptorom i daje novi saharid. Produkt ove reakcije može biti glikozil-donor u sljedećoj reakciji glikozilacije s novim alil-glikozidim akceptorom i tako se proces može ponavljati sve dok se ne sintetizira željeni oligosaharid (shema 15).



Shema 15. Princip glikozilacije s alil-glikozidima⁵

Alilna skupina je eterska zaštitna skupina i najčešće se uvodi s alil-bromidom uz NaH, no može se uvesti i korištenjem alilnog alkohola uz acetil-klorid (Fischerovi uvjeti). Reakcijom alilnog alkohola s acetil-kloridom generira se HCl koji čini reakcijsku smjesu kiselom. U ovim uvjetima anomerna -OH skupina se protonira i izlazi kao voda, dok alilni alkohol, koji je dodan u suvišku, nukleofilno napada anomerni C atom. Alilna skupina sama po sebi nije dobra izlazna skupina i zato ju treba prevesti u nestabilni enol-eter koji lako hidrolizira. Izomerizacija alil-glikozida u reaktivni prop-1-enil-glikozid odvija se u reakciji kataliziranoj prijelaznim metalima / njihovim kompleksima, npr. Pd/C, Pd(Ph₃)₄, [Ir(COD)(PMePh₂)₂]PF₆, [RhCl(PPh₃)₃]. Reakcija prop-1-enil-glikozida i glikozil-akceptora provodi se u strogo bezvodnim uvjetima, najčešće u suhom acetonitrilu uz katalitičku količinu TfOH (trifluorometansulfonska kiselina) i ekvimolarnu količinu NIS (*N*-jodosukcinimid) kao

aktivatore koji omogućavaju nastajanje oksokarbenijevog iona. On daljnjom reakcijom vodi nastanku željenog produkta glikozilacije (shema 16).

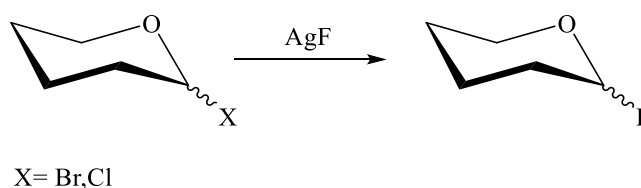


Shema 16. Mehanizam glikozilacije s alil-glikozidima⁶

2.4. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-flourida i sililiranih akceptora

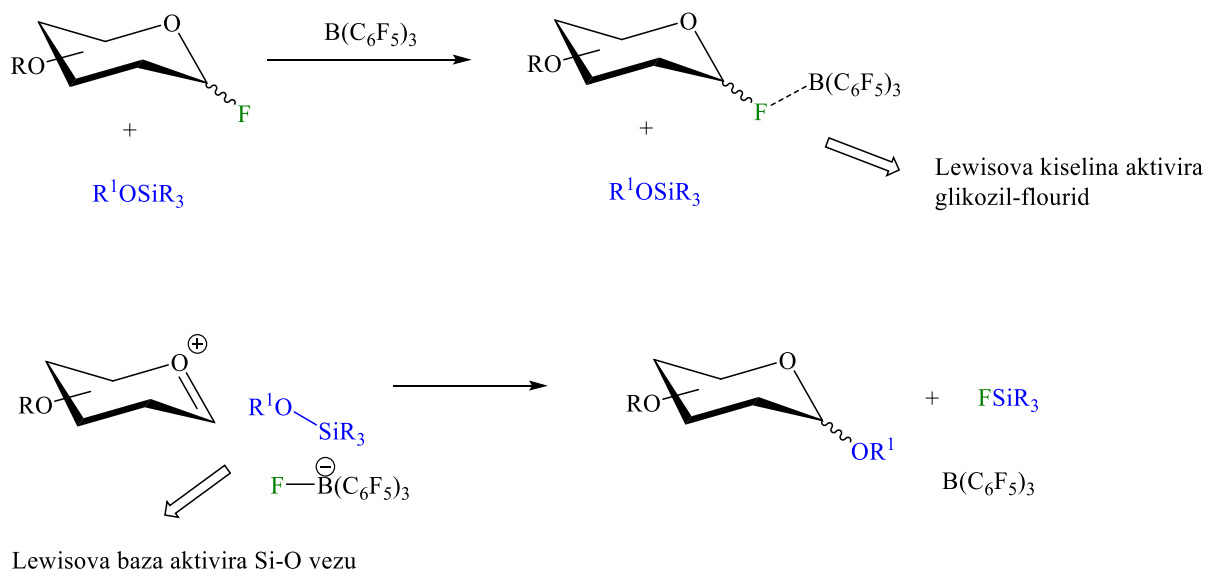
Odabir prikladnog glikozil-donora od iznimne je važnosti u reakcijama glikozilacije i planiranju sintetskog puta. Poželjna značajka dobrog glikozil-donora je stabilnost veze između anomernog C atoma i izlazne skupine jer uporaba nestabilnih glikozil-donora uzrokuje mala iskorištenja u reakcijama i teško rukovanje reagensom. Također je poželjno da Lewisova kiselina, koja se koristi u reakciji kao katalizator, bude dovoljno slaba kako ostale funkcionalne skupine osjetljive na kisele uvjete ne bi reagirale.⁷ Posljednjih godina glikozil-flouridi jedni su od najčešće korištenih glikozil-donora koji ispunjavaju navedene uvjete. Zbog velike energije veze C-F, glikozil-flouridi su iznimno stabilni za razliku od ostalih glikozil-halogenida, poput bromida i jodida. Osim jednostavnijeg rukovanja, stabilnost ovih spojeva olakšava i njihovo pročišćavanje.⁸ Metoda glikozilacije s glikozil-flouridima kao glikozil-donorima i silil-eterima

kao glikozil-akceptorima nadilazi mnoge trenutne prepreke u sintezi glikozida. Ova brza i jednostavna metoda glikozilacije odvija se na sobnoj temperaturi pri čemu nisu potrebni strogi uvjeti bez vlage i zraka. Glikozil-flouridi mogu se pripremiti na mnogo načina, a neki od najčešće korištenih su priprava iz acetiliranih šećera uz HF u piridinu, iz hemiacetala uz DAST (dietilaminosumporov triflourid) reagens te iz glikozil-halogenida korištenjem metalnih flourida.⁹ U sklopu ovog diplomskog rada korištene su dvije od tri navedene metode pripreve glikozil-flourida. Najčešće korišteni reagens za prevođenje glikozil-halogenida u glikozil-flourid je srebrov flourid, AgF. Reakcija se odvija S_N2 mehanizmom, pri čemu dolazi do zamjene klora ili broma odgovarajućeg glikozil-halogenida s fluorom reagensa (shema 17). Izlazak klora ili broma olakšan je zbog koordinacije Ag⁺ (isti princip opisan je u §2.1.4.). Ravnoteža se pomiče prema nastanku produkta i zbog nastanka vrlo stabilnog taloga, netopljivog AgCl ili AgBr.



Shema 17. Reakcija flouriranja glikozil-halogenida

Priprava glikozil-flourida iz hemiacetalnih šećera provodi se uz DAST koji je poznat kao najbolji reagens za flouriranje slobodne anomerne -OH skupine uz veliko iskorištenje. Sililni eteri često se koriste kao eterska zaštita hidroksilnih skupina. Prednosti ovih zaštitnih skupina i razlog široke primjene su jednostavna priprava, lako uklanjanje te velik broj dostupnih sililnih skupina s različitim alkilnim supstituentima poput trimetilsililnih etera (TMS), trietilsililnih etera (TES), *tert*-butildimetilsililnih etera (TBS) i ostalih. U ovoj metodi glikozilacije sililni eteri predstavljaju glikozil-akceptore. Priređuju se reakcijom šećera sa slobodnom -OH skupinom i reagensima poput heksametildisilazana za uvođenje najjednostavnije TMS zaštite. Reakcija glikozil-donora i akceptora katalizirana je Lewisovom kiselinom, BF₃·Et₂O ili B(C₆F₅)₃. Lewisova kiselina ima ulogu aktivatora glikozil-donora pri čemu prenosi flouridni ion i dostavlja ga kao Lewisova baza glikozil-akceptoru.⁹ Glavna pokretačka sila ove reakcije je veliki afinitet silicija prema flouru zbog čega u reakciji uz željeni produkt nastaje i nusprodukt FSiR₃. Mehanizam reakcije prikazan je na shemi 18.

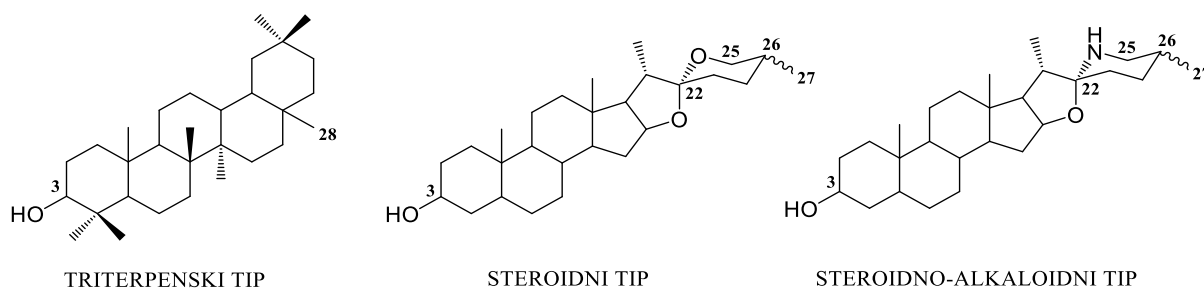


Shema 18. Mehanizam glikozilacije s glikozil-flouridima uz Lewisovu kiselinu kao katalizator⁹

2.5. Saponini

Saponini su važni sekundarni biljni metaboliti koji se mogu pronaći u sastavu mnogih biljaka.¹⁰ Ovi spojevi poput sapuna stvaraju pjenu u vodenoj otopini, po čemu su i dobili ime (*lat. sapo, saponis*-sapun). Saponine često susrećemo u svakodnevnom životu kao glavni sastojak mnogih namirnica u prehrani poput krumpira, slanutka, graha, leće, šećerne repe, soje i mnogih drugih.¹¹ Uobičajeni izvori saponina u prirodi su biljke, a otkriveno je da ih mogu sintetizirati i morski organizmi poput morskog krastavca i morske zvijezde.¹² Zbog svog specifičnog svojstva pjenušanja i emulzifikacije kroz povijest su mnoge biljke, koje u svom sastavu sadrže saponine, korištene kao sapuni. Saponini imaju površinski aktivna svojstva odnosno svojstva nalik deterdžentu zbog topljivosti saharidnog djela u vodi, dok je saponin topljiv u mastima. Po svojoj građi saponini su glikozidi velike molekulske mase koji se tradicionalno dijele na triterpenske i steroidne saponine. Sastoje se od jedne ili više šećernih jedinica vezanih za aglikon steroidne ili triterpenske strukture. Saharidni dio sadrži najviše 11 monosaharidnih podjedinica, a može biti linearan ili razgranat. Monosaharidne jedinice najčešće su D-glukoza,

D-galaktoza, D-galakturonska kiselina, D-glukuronska kiselina, L-ramnoza, L-arabinoza i D-fukoza. Većina do sada izoliranih saponina ima dvije do pet monosaharidnih podjedinica. Aglikonski, odnosno ne-saharidni dio molekule saponina naziva se genin ili sapogenin.¹² Prema vrsti sapogenina, saponine dijelimo na tri osnovne vrste: triterpenske glikozide, steroidne glikozide i steroidno-alkaloidne glikozide (slika 19).



Slika 19. Tri osnovne vrste sapogenina

Sapogenini su obično hidroksilirani na C-3 položaju, a neke metilne skupine su često oksidirane do hidroksimetilnih, aldehidnih ili karboksilnih funkcijskih skupina.¹² Svim saponinima zajedničko je vezanje jednog ili više šećernog lanca na aglikonski dio molekule. Na aglikon je najčešće vezan jedan šećerni lanac (engl. *monodesmosidic*), no mogu biti vezana i dva (engl. *bidesmosidic*) tako da je prvi vezan preko eterske veze na C-3 atom, a drugi esterskom vezom na C-28 atom (triterpenski saponini) ili C-26 atom (steroidni saponini, furostanol). Saponini s tri šećerna lanca su vrlo rijetki te se poput bisdezmozida lako prevode u monodezmozide hidrolizom esterske veze između šećernog lanca i aglikona.¹² Steroidni saponini imaju slična biološka svojstva kao i triterpenoidni saponini ali su manje prisutni u prirodi.¹⁰ Steroidni sapogenin čini karakteristična steroidna jezgra s četiri prstena te heterocikli furan i piran. Šećerni lanac na položaju C-3 obično sadrži manje monosaharidnih jedinica nego u triterpenskim analogima. Za razliku od steroidnog, triterpenski sapogenin sastoji se od pentacikličkih struktura i ukupno 30 ugljikovih atoma.¹² Strukturne karakteristike ove vrste su nezasićenost na C-12/13 atomima te funkcionalizacija metilne skupine na C-28, C-23 ili C-30. Pentaciklički triterpeni mogu se podijeliti u tri glavne vrste, ovisno o tome sadrže li β -amirin, α -amirin ili lupeol, a najzastupljeniji su saponinini s β -amirinom. Posljednjih nekoliko desetljeća saponini su glavna tema mnogih istraživanja zbog svojih bioloških i farmakoloških svojstava, a zbog velike potražnje istražuju se najučinkovitije metode njihove ekstrakcije i kemijske sinteze.

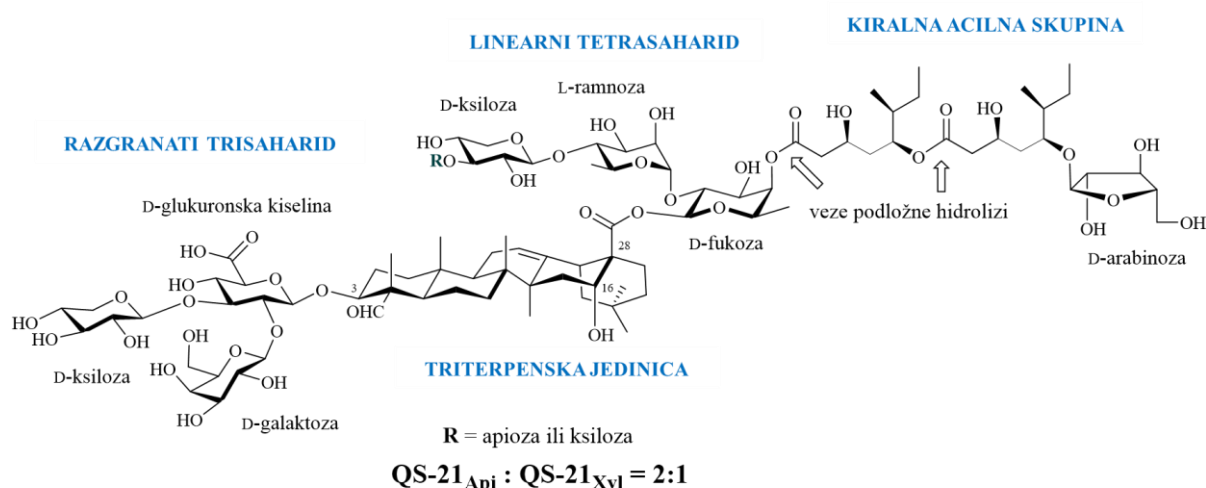
2.6. QS-21

Tradicionalna cjepiva temelje se na oslabljenim i inaktiviranim virusima ili bakterijama. Zbog svojeg sastava ova cjepiva su prilično reaktivna i odgovorna za aktivaciju, a često i preaktivaciju imunološkog sustava. Tradicionalni pristup razvoja cjepiva je učinkovit, no ne može se primijeniti u borbi protiv teških infektivnih bolesti, karcinoma te kroničnih upalnih i autoimunih bolesti. Potreba za učinkovitijim cjepivima potaknuta je pojavom novih patogenih mikroorganizama i neodgovarajućom zaštitom koju pružaju neka od postojećih cjepiva, osobito u određenim dobnim skupinama ili kod osoba s oslabljenim imunološkim sustavom. Veliki uspjeh na tom području postignut je razvojem cjepiva na temelju dobro karakteriziranih, visoko pročišćenih i sigurnijih antigena, poput rekombinantnih proteina i peptida. Prednost ovih cjepiva je smanjenje nuspojava, međutim prisutni antigeni nedovoljno aktiviraju imunološki odgovor, pri čemu se javlja slaba imunogenost te općenito slab i kratkotrajan imunitet. Za jačanje imunogenosti ključno je da cjepiva imaju adjuvante koji pojačavaju imunološke odgovore koji su izazvani slabo imunogenim antigenima.¹³ Adjuvanti su ključne imunostimulirajuće komponente cjepiva koje poboljšavaju i usmjeravaju imunološki odgovor na primijenjeni antigen.¹⁴ Adjuvanti mogu povećati sposobnost cjepiva da izazove snažne i trajne imunološke odgovore, smanjiti dozu antigena te prilagoditi prirodu imunološkog odgovora. Unatoč sve važnijoj ulozi, mali je broj adjuvanata odobren za ljudsku uporabu.^{15,16} Saponinski adjuvanti tema su mnogih istraživanja i detaljno su proučeni sa svrhom uporabe u veterinarskim i humanim cjepivima. Prirodni spoj, saponin QS-21, izoliran iz kore vazdazelenog drveta *Quillaja saponaria*, jedan je od najjačih do sad poznatih adjuvanata. Nakon više od tri desetljeća istraživanja u preko 100 kliničkih studija, odobren je za upotrebu u humanim cjepivima (Shingrix®).¹³

2.6.1. Struktura QS-21

Prirodni QS-21 sastoji se od četiri glavne strukturne domene: razgranatog trisaharida, triterpenske jedinice, linearnog oligosaharida i acilnog lanca (slika 20). Ovaj spoj je smjesa dva izomerna bisdezmozidna saponina sa sličnom adjuvantskom aktivnošću. QS-21 ima triterpensku aglikonsku jezgru na koju je vezan razgranati trisaharid koji se povezuje s OH skupinom na C3 atomu preko β -glikozidne eterske veze i linearni oligosaharid koji se povezuje sa C28 atomom karboksilne skupine putem β -glikozidne esterske veze. Reducirajući kraj C28

oligosaharida je β -D-fukozilna jedinica s acilnim lancem vezanim na 4-O položaj. Dva strukturna izomera QS-21 razlikuju se samo po nereducirajućem kraju C28 tetrasaharida, odnosno QS-21_{Api} ima završnu β -D-apiozilnu jedinicu, dok QS-21_{Xyl} ima β -D-ksilozilnu jedinicu.¹³ Spoj QS-21 je amfipatska molekula zbog svoje hidrofobne triterpenske jezge i acilnog lanca te hidrofilnih saharidnih lanaca. Navedeno svojstvo QS-21 dovodi do stvaranja micela u vodenim otopinama.

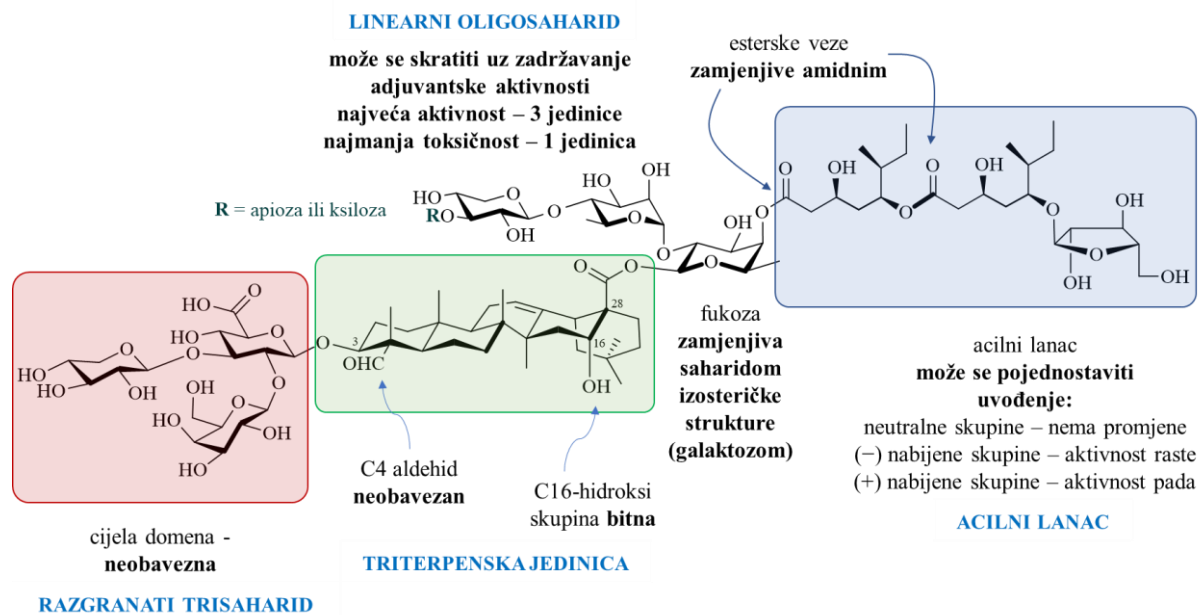


Slika 20. Strukturne domene QS-21¹⁷

2.6.2. Utjecaj strukture na aktivnost QS-21

QS-21 ima nekoliko ozbiljnih nedostataka, koji uvelike ograničavaju njegovu širu primjenu: kemijski je nestabilan, dostupan je u relativno maloj količini iz prirodnog materijala nakon vrlo zahtjevnog pročišćavanja te je toksičan pri većim dozama.¹⁷ Navedeno je potaknulo niz istraživanja korelacije strukture i aktivnosti koja obuhvaćaju sve četiri domene, u svrhu pronalaska strukturno pojednostavljenih i stabilnijih analoga QS-21. Nakon više od desetljeća istraživanja Gin i suradnici uspješno su proveli totalnu sintezu spoja QS-21 i razvili pristup za sintezu derivata koji nadilaze prepreke prirodnog spoja.¹⁷ Jedan od glavnih nedostataka QS-21 je kemijska nestabilnost, a razlog je hidroliza esterske veze iz domene acilnog lanca pri čemu nastaju nusprodukti bez adjuvantske aktivnosti. Istraživanja su pokazala da, iako je nužan za aktivnost, acilni lanac se može pojednostaviti, a hidrolitički nestabilne esterske veze mogu se zamijeniti amidnom vezom uz očuvano ili poboljšano adjuvantsko djelovanje.¹⁷ Ispitan je i utjecaj naboja acilnog lanca pri čemu je pozitivno nabijeni lanac rezultirao smanjenjem

adjuvantske aktivnosti, a negativno nabijeni lanac zadržavanjem aktivnosti. Središnja glikozidna veza također je iznimno važna za adjuvantsku aktivnost. Ispitan je utjecaj duljine glikozidne veze, njena stereokemija i fleksibilnost.¹⁷ Dokazano je da produljenjem veze te promjenom stereokemije na anomernom centru dolazi do gubitka adjuvantske aktivnosti QS-21, a često i povećanja toksičnosti. Ovi rezultati ukazuju na važnu ulogu konformacije saponina. Analози QS-21 s eterskom glikozidnom vezom unatoč većoj fleksibilnosti veze također pokazuju smanjenu adjuvantnu aktivnost. Daljnjim istraživanjem ustanovljeno je da cijela domena razgranatog trisaharida nije nužna za adjuvantsku aktivnost, a njenim uklanjanjem dolazi do povećanja aktivnosti i smanjenja toksičnosti.¹⁷ Osim navedenih prednosti, ovo otkriće je uvelike pojednostavilo strukturu molekule, njenu sintezu i istraživanje triterpenske domene. Proučavanjem triterpenske jezgre ustanovljeno je da uklanjanjem, odnosno zamjenom aldehidne skupine na C4 atomu adjuvantska aktivnost ostaje ista. Istraživanjem je također dokazana i važnost C16 hidoksilne skupine iste domene čijim izostankom dolazi do znatnog smanjenja adjuvantske aktivnosti.¹⁷ Pokazalo se da je linearna oligosaharidna domena QS-21, (Xyl ili Api(β 1-3)Xyl(β 1-4)Rha(α 1-2)Fuc, nužna za njegovu adjuvantsku aktivnost, što je potaklo istraživanja aktivnosti analoga sa skraćenim oligosaharidom (1-4 šećerne jedinice). Aktivnost trisaharidnog analoga usporediva je s aktivnošću QS-21, dok su disaharidni i monosaharidni analози pokazali lošije rezultate u smislu toksičnosti, odnosno niske aktivnosti, što dovodi do zaključka da je za zadržavanje optimalne adjuvantske aktivnosti minimalna duljina oligosaharida tri šećerne jedinice.¹⁸ Ciljna molekula ovog diplomskog rada je upravo linearni oligosaharid koji se sastoji se od tri šećera: D-ksiloze, L-ramnoze i D-fukoze. Šećerne jedinice međusobno su povezane glikozidnim vezama. Šećeri ksiloza i ramnoza povezani su β -glikozidnom vezom koja povezuje C1 atom ksiloze sa C4 atomom ramnoze, dok su ramnoza i fukoza povezane α -glikozidnom vezom koja povezuje C1 atom ramnoze sa C2 atomom fukoze. U nedavno objavljenim istraživanjima pokazano je da zamjena ksiloze i ramnoze nekim drugim šećerima, npr. komercijalno dostupnom celobiozom (Glc(β 1-4)Glc) ili laktozom (Gal(β 1-4)Glc), rezultira analozima čija je imunoadjuvantska aktivnost značajno smanjena.¹⁹ Navedena istraživanja dovela su do iznimno važnih zaključaka o korelaciji stukture i biološke aktivnosti QS-21, a najvažniji od njih su sažeti na slici 21.

Slika 21. Utjecaj strukturnih modifikacija QS-21 na imunoadjuvantsku aktivnost.¹⁷

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Svi reagensi i otapala korišteni u sintezi komercijalno su dostupni i analitičke su čistoće: D-ksiloza (*Sigma*), L-ramnoza (*Calbiochem*), D-fukoza (*Calbiochem*), alilni alkohol (ALIOH, *Sigma-Aldrich*), acetil-klorid (*Merck*), piridin (py, *Kemika*), trimetilacetil klorid (PivCl, *Merck*), etil-acetat (EtOAc, *Fluka*), klorovodična kiselina (HCl, *Kemika*), natrijev klorid (NaCl, *Kemika*), bezvodni natrijev sulfat (Na₂SO₄, *Merck*), petroleter (PE, *Fluka*), metanol (MeOH, *Fluka*), dietil-eter (*Fluka*), 10% paladij na ugljiku (Pd-C, *Fluka*), octena kiselina (HOAc, *Kemika*), 2,2-dimetoksiopropan (2,2-DMP, *Merck*), *p*-toluensulfonska kiselina (*p*-TsOH·H₂O, *Merck*), toluen (*Kemika*), acetonitril (*J.T.Baker*), *N*-jodsukcinimid (NIS, *Acros*), trifluormetansulfonska kiselina (TfOH, *Sigma-Aldrich*), trietilamin (TEA, *Fluka*), acetanhidrid (Ac₂O, *Kemika*), sumporna kiselina (H₂SO₄, *Fluka*), natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO₃, *Gram mol*), HBr u octenoj kiselini (HBr/HOAc, *Merck*), srebrov fluorid (AgF, *Aldrich*), diklormetan (DCM, *Lach-Ner*), jod (I₂, *Gram mol*), heksametildisilazan (*Merck*), natrijev tiosulfat (*Sigma-Aldrich*), benzen (*Sigma-Aldrich*), paladijev(II) klorid (PdCl₂, *Kemika*), borov trifluorid dietil-eterat (BF₃·OEt₂, *Sigma-Aldrich*), 25% natrijev metoksid u metanolu (*Sigma-Aldrich*), *N,N*-dimetilformamid (DMF, *Sigma-Aldrich*), benzil-bromid (BnBr, *Merck*), natrijev acetat (NaOAc, *Merck*), tetrahidrofuran (THF, *Sigma-Aldrich*), dietilaminosumporov trifluorid (DAST, *Sigma-Aldrich*). Korištena suha otapala pripremljena su standardnim literaturnim metodama.²⁰ Alilni alkohol i acetonitril dodatno su pročišćeni destilacijom.

Tijek provedenih reakcija, sastav frakcija i čistoća sintetiziranih spojeva praćeni su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela na staklu (Macherey-Nagel, Sil G-25). Sustavi otapala za razvijanje TLC-pločica navedeni su uz pojedini propis. Spojevi su detektirani Hanesianovim reagensom uz zagrijavanje. Sirovi produkti su pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela (0,063-0,200 mm, *Merck*) kao stacionarnoj fazi te sustavom otapala (mobilnom fazom) navedenim uz pojedini propis.

Sintetizirani spojevi okarakterizirani su infracrvenom spektroskopijom (IR) te spektroskopijom nuklearne magnetske rezonancije (NMR). Korišten je instrument Perkin Elmer FT-IR C89391, a valni brojevi ($\tilde{\nu}$) su izraženi u recipročnim centimetrima (cm⁻¹). ¹H i ¹³C (DEPT-Q) NMR

spektri snimljeni su na Bruker Avance III HD spektrometru pri 400 MHz (^1H) odnosno 100 MHz (^{13}C), u deuteriranim otapalima navedenim u tekstu. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS) prema kojem su izraženi kemijski pomaci (δ) u ppm, a konstante sprege (J) izražene su u Hercima (Hz). Multiplicitet signala naveden je kao: s-singlet, d-dublet, t-triplet, q-kvartet, m-multiplet, dd-dublet dubleta, qd-kvartet dubleta, AB-AB kvartet.

Optička zakretanja spojeva mjerena su na polarimetru Schmidt + Haensch Polartronic NH8 pri sobnoj temperaturi.

3.2. Metoda glikozilacije I

3.2.1. Sinteza alil-D-ksilopiranozida (1)

U okruglu tikvicu dodan je alil-alkohol (22,5 mL, 0,33 mol). Tikvica je smještena u ledenu kupelj te je dokapan acetil-klorid (4,8 mL, 66,6 mmol) uz miješanje na magnetskoj mješalici. Miješanje je nastavljeno pri sobnoj temperaturi 1 h. Nakon jednog sata, u reakcijsku smjesu dodana je D-ksiloza (5 g, 33,3 mmol) u malim obrocima. Reakcija je ostavljena na mješalici u atmosferi argona preko noći (16 h). Reakcija je praćena TLC-om (etil-acetat / metanol, 3:2). Po završetku reakcije, otapalo je upareno uz vakuum (postavke: 40 °C, 7 mbar). Dobiven je produkt **1** koji je bez pročišćavanja korišten u sljedećoj reakciji.

$R_f = 0,72$ (etil-acetat / metanol, 3:2)

3.2.2. Sinteza alil-2,3,4-tri-O-pivaloil-D-ksilopiranozida (2)

Spoj **1** otopljen je u suhom piridinu (23,1 mL, 286 mmol) u atmosferi argona. Otopina je miješana na magnetskoj mješalici te je dokapan trimetilacetil-klorid (22 mL, 178,8 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj mješalici u atmosferi argona pri sobnoj temperaturi preko noći (16 h). Reakcija je praćena TLC-om (petroleter /etil-acetat, 15:1). Zbog prisutnosti veće količine neizreagiranog reaktanta, dodano je još trimetilacetil-klorida (4,5 mL, 36,6 mmol) te je reakcijska smjesa grijana na 60 °C kroz 45 min. Nakon završetka reakcije, u reakcijsku smjesu je dodan etil-acetat (125 mL) i smjesa je prebačena u lijevak za ekstrakciju. Smjesa je prana s vodom (250 mL), 1 M klorovodičnom kiselinom (2×200 mL), zatim 3 M otopinom natrijeva hidroksida (2×100 mL) i na kraju zasićenom otopinom natrijeva klorida (2×100 mL). Nakon sušenja na bezvodnom natrijevom sulfatu, organski ekstrakt je profiltriran, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen

kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 15:1. Dobiveno je 11,51 g (78 %) produkta **2** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,4$ (petroleter / etil-acetat 15:1)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ/ppm : 5,78-5,86 (m, 1H, CH-All), 5,32-5,28 (m, 1H), 5,27-5,23 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-All}$), 5,20-5,17 (m, 1H, $\text{CH}_2\text{-All}$), 5,02-4,94 (m, 2H), 4,50 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz), 4,33-4,27 (m, 1H), 4,02-4,12 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-All}$), 3,28-3,34 (m, 1H), 1,16-1,13 (3×s, 27H, 3×OPiv)

3.2.3. Sinteza prop-1-en-1-il-2,3,4-tri-O-pivaloil-D-ksilopiranozida (**3**)

Spoj **2** (250 mg, 0,56 mmol) otopljen je u metanolu (12,5 mL). U otopinu je potom postepeno dodan 10% Pd-C (62 mg, 0,58 mmol) i 5 kapi octene kiseline. Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj mješalici uz refluks (100 °C) kroz 1 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 9:1. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana kroz sloj celita, koji je potom ispran metanolom (4×30 mL). Otapalo je zatim upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 9:1. Dobiveno je 114,4 mg (46 %) produkta **3** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,64$ (β -anomer), 0,54 (α -anomer) (petroleter / etil-acetat, 9:1)

3.2.4. Sinteza alil- α -L-ramnopiranozida (**4**)

U okruglu tikvicu dodan je alil-alkohol (24 mL, 0,35 mol). Tikvica je smještena u ledenu kupelj te je postupno dodan acetil-klorid (4 mL, 56,1 mmol) uz miješanje na magnetskoj mješalici. Miješanje je nastavljeno pri sobnoj temperaturi 1 h. Nakon jednog sata, u reakcijsku smjesu je dodana L-ramnoza (5 g, 30,5 mmol) u malim obrocima. Reakcija je ostavljena na mješalici pod atmosferom argona preko noći (16 h). Reakcija je praćena TLC-om (etil-acetat / metanol 1:1). Po završetku reakcije, otapalo je upareno uz vakuum (postavke: 40 °C, 7 mbar). Dobiven je sirovi produkt **4** u obliku bijele krutine koji je bez pročišćavnja korišten u sljedećem sintetskom koraku.

$R_f = 0,45$ (etil-acetat / metanol 1:1)

3.2.5. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden- α -L-ramnopiranozida (**5**)

U okruglu tikvicu dodani su sirovi produkt **4**, 2,2-DMP (90 mL, 0,73 mol) i *p*-TsOH·H₂O (524 mg, 2,75 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći (16 h) na magnetskoj mješalici u atmosferi argona pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 4:1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je neutralizirana dodatkom krutog Na₂CO₃ (292 mg, 2,75 mmol), profiltrirana i uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 5:1. Dobiveno je 4,54 g (61 %) produkta **5** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,29$ (petroleter / etil-acetat, 5:1)

IR ν/cm^{-1} : 3466 (OH), 2986 (=C-H, alkeni), 2936 (C-H, alkani), 1243 (C-O, eteri)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm : 5,93-5,86 (m, 1H, CH-All), 5,31 (qd, 1H, CH₂-All, $J = 17,2$ Hz, 1,15 Hz), 5,22 (dd, 1H, CH₂-All, $J = 10,4$ Hz, 1,28 Hz), 5,00 (s, 1H, H-1), 4,20-4,16 (m, 2H, CH₂-All), 4,09-4,12 (m, 1H, H-4), 4,03-3,98 (m, 1H, H-5), 3,73-3,66 (m, 1H, H-3), 3,44-3,39 (m, 1H, H-2), 2,31 (d, 1H, OH, $J = 4,6$ Hz), 1,53 (s, 3H, CH₃), 1,35 (s, 3H, CH₃), 1,3 (d, 3H, CH₃)

3.2.6. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden-4-[2,3,4-tri-O-pivaloil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (**6**)

Dvogrla tikvica je vakuumirana i sušena plamenom, nakon čega je ohlađena pod argonom. Spojevi **3** (114,4 mg, 0,26 mmol) i **5** (87,4 mg, 0,36 mmol) prebačeni su u dvogrlu tikvicu i azeotropirani sa suhim toluenom (6 mL) uz vakuum kako bi se iz njih uklonili tragovi vlage. Potom je u smjesu dodan suhi acetonitril (14 mL), NIS (62,8 mg, 0,28 mmol) i TfOH (12 μ L, 0,14 mmol) pod atmosferom argona. Reakcija je miješana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi 5 min, nakon čega je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 7:1) pokazana potpuna konverzija reaktanata. Reakcija je zaustavljena dodatkom 2 kapi TEA i uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 7:1. Dobiveno je 22,2 mg (10 %) produkta **6** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,59$ (petroleter / etil-acetat, 7:1), $[\alpha]_D^{26} = -7,08^\circ$ (c 1,61, CHCl₃)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm : 5,93-5,85 (m, 1H, CH-All), 5,38-5,33 (m, 1H), 5,32-5,27 (m, 1H, CH₂-All), 5,23-5,20 (m, 1H, CH₂-All), 5,03-4,92 (m, 6H), 4,13-4,19 (m, 6H), 3,63-3,56 (m,

1H), 3,36-3,25 (m, 1H), 1,54 (s, 3H, CH₃), 1,35 (s, 3H, CH₃), 1,25 (d, 3H, CH₃), 1,19-1,14 (3×s, 27H, 3×OPiv)

3.3. Metoda glikozilacije II

3.3.1. Sinteza 1,2,3,4-tetra-O-acetil- α -D-ksilopiranozida (7)

U okruglu tikvicu dodana je D-ksiloza (5 g, 33 mmol) i acetanhidrid (27 mL, 286 mmol). U smjesu je zatim kapalicom dodano 1-2 kapi konc. H₂SO₄. Zbog nastanka guste suspenzije, tikvica je ručno miješana kružnim pokretima. Ukoliko se sadržaj tikvice zagrijao do vrenja odmah je tikvica uronjena u ledenu kupelj. Nakon 10-15 min, reakcijska smjesa je prebačena na magnetsku miješalicu te je uz miješanje grijana na uljnoj kupelji (100 °C) kroz 1,5 h. Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat 2:1). Po završetku, reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. U smjesu je dodan etil-acetat (30 mL), koji je zatim ispran s vodom (2×20 mL) i zasićenom otopinom NaHCO₃ (20 mL). Organski ekstrakt osušen je na bezvodnom Na₂SO₄, profiltriran i uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 2:1. Dobiveno je 10,1 g (98,5%) produkta **7** u obliku žute uljaste tekućine.

$R_f = 0,48$ (petroleter / etil-acetat 2:1)

IR ν/cm^{-1} : 2961 (C-H), 1742 (C=O, esteri), 1206 (O-C=O, esteri)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm : 6,26 (d, 1H, H-1, $J = 3,6$ Hz), 5,47 (t, 1H, H-3, $J = 9,8$ Hz), 5,06-4,99 (m, 2H, H-2, H-4), 3,94 (dd, 1H, H-6, $J = 11,2$ Hz, 5,91 Hz), 3,71 (t, 1H, H-5, $J = 10,9$ Hz), 2,18-2,03 (4×s, 12H, 4×OAc)

3.3.2. Sinteza 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-ksilopiranozil-bromida (8)

U tikvicu je dodan spoj **7** (2,3 g, 7,2 mmol), octena kiselina (0,5 mL, 8,7 mmol) i acetanhidrid (0,5 mL, 5,3 mmol). Smjesa je miješana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon 10-15 min, tikvica je stavljena u ledenu kupelj i postupno je dodan HBr u octenoj kiselini (4 mL, 73,7 mmol). Tikvica je zatvorena klor-kalcijevom cjevčicom i reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi 2,5 h. Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat 2:1). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje u koji su prethodno dodani etil-acetat (20 mL) i voda (30 mL). Organski ekstrakt

ispran je sa zasićenom otopinom NaHCO₃ (2×20 mL), zasićenom otopinom NaCl (20 mL), osušen je na bezvodnom Na₂SO₄ te uparen na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Produkt je pročišćen kromatografijom na kratkom stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 2:1. Dobiveno je 185 mg (75 %) produkta **8** u obliku žute krutine.

$R_f = 0,72$ (petroleter / etil-acetat, 2:1)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm: 6,58 (d, 1H, H-1, $J = 4,0$ Hz), 5,57 (t, 1H, H-3, $J = 9,8$ Hz), 5,07-5,00 (m, 1H, H-4), 4,78 (dd, 1H, H-2, $J = 9,9$ Hz, 4,0 Hz), 4,05 (dd, 1H, H-6, $J = 11,4$ Hz, 6,0 Hz), 3,88 (t, 1H, H-5, $J = 11,4$ Hz), 2,10-2,06 (3×s, 9H, 3×OAc)

¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm: 169,9, 168,8 (3×C=O, 3×OAc), 87,6 (C1, CH), 70,9 (C3, CH), 69,5 (C2, CH), 68,1 (C4, CH), 62,5 (C5, CH₂), 20,7 (3×CH₃, 3×OAc)

3.3.3. Sinteza 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-ksilopiranozil-flourida (**9**)

Bromid **8** (518 mg, 1,53 mmol) otopljen je u suhom acetonitrilu (7,6 mL). U otopinu je zatim dodan srebrov flourid (503 mg, 3,96 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici u atmosferi argona, zaštićena od svjetla, pri sobnoj temperaturi kroz 2h. Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat 2:1). Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana kroz sinter lijevak, a krutina je isprana DCM-om (60 mL). Otapalo je upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak, pri čemu je dobiven sirovi produkt u obliku tamno smeđe uljaste tekućine. Produkt je pročišćen kromatografijom na duljem stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter/etil-acetat, 2:1. Dobiveno je 250 mg (59 %) produkta **9** u obliku bijele krutine.

$R_f = 0,43$ (petroleter / etil-acetat, 2:1)

IR ν/cm^{-1} : 2962 (C-H), 1743 (C=O, esteri), 1213 (O-C=O, esteri), 940 (C-F)

¹H NMR (CDCl₃) δ/ppm: 5,47 (dd, 1H, H-1, $J = 50,1$ Hz, 2,7 Hz), 5,07 (t, 1H, H-3, $J = 4,5$ Hz), 4,97-4,94 (m, 1H, H-4), 4,89-4,86 (m, 1H, H-2), 4,30 (dd, 1H, H-6, $J = 12,9$ Hz, 2,9 Hz), 3,79 (dd, 1H, H-5, $J = 12,9$ Hz, 4,3 Hz), 2,13-2,11 (3×s, 9H, 3×OAc)

¹³C NMR (CDCl₃) δ/ppm: 169,9, 169,4, 169,3 (3×C=O, 3×OAc), 106,4 (C1, CH), 104,2 (C3, CH), 67,1 (C2, CH), 66,8 (C4, CH), 60,7 (C5, CH₂), 21,0, 20,84, 20,79 (3×CH₃, 3×OAc)

3.3.4. Sinteza alil-2,3- O-izopropiliden-4-O-trimetilsilil- α -L-ramnopiranozida (**10**)

Spoj **5** (2,05 g, 8,39 mmol) otopljen je u suhom DCM-u (39 mL). U otopinu je zatim dodan jod (53 mg, 0,21 mmol) i heksametildisilazan (336 μ L, 1,62 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici u atmosferi argona, zaštićena aluminijskom folijom od svjetla, preko noći (16 h) pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Idući dan u reakcijsku smjesu dodano je još heksametildisilazana (700 μ L, 3,34 mmol) u manjim obrocima. Reakcija je prekinuta polaganim dodatkom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (66 mg, 0,42 mmol). Reakcijska smjesa je profiltrirna kroz vatu i uparena. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela (56,6 g) koji je deaktiviran s 0,3% TEA zbog nestabilnosti spoja na silikagelu, koji je inače blago kiseo. Sustav otapala bio je petroleter / eter, 30:1.

Dobiveno je 2,23 g (84 %) produkta **10** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,56$ (petroleter / eter, 9:1)

IR ν/cm^{-1} : 2987 (=C-H, alkeni), 2906 (C-H, alkani), 1243 (C-O, eteri)

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 5,92-5,85 (m, 1H, CH-All), 5,30 (qd, 1H, CH-All, $J = 17,2$ Hz, 1,6 Hz), 5,20 (dd, 1H, CH-All, $J = 10,4$ Hz, 1,5 Hz), 5,00 (s, 1H, H-1), 4,19-4,14 (m, 2H, CH_2 -All), 4,03-3,95 (m, 2H, H-4, H-5), 3,68-3,59 (m, 1H, H-3), 3,36-3,31 (m, 1H, H-2), 1,53 (s, 3H, CH_3), 1,35 (s, 3H, CH_3), 1,21 (d, 3H, CH_3), 0,16 (s, 9H, $\text{SiO}(\text{CH}_3)_3$)

3.3.5. Sinteza alil-2,3-O-izopropiliden-4-[2,3,4-tri-O-acetil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozida (**11**)

Flourid **9** (153,3 mg, 0,55 mmol) i sililni eter **10** (151,5 mg, 0,47 mmol) otopljeni su u suhom benzenu (6 mL) te je otapalo upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Postupak je ponovljen još 2 do 3 puta kako bi se u potpunosti uklonila vlaga iz reaktanata. Nakon uparavanja, smjesa **9** i **10** otopljena je u suhom toluenu (7,7 mL). U otopinu je dodan borov trifluorid dietil-eterat (6,7 μ L, 0,06 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na magnetskoj mješalici pod atmosferom argona pri sobnoj temperaturi kroz 3,5 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 4:1). Reakcija je prekinuta dodatkom jedne kapi TEA. Nakon 15 min, reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / eter, 1:1. Dobiveno je 203,5 mg (86 %) produkta **11** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,44$ (petroleter / eter, 1:1)

IR ν/cm^{-1} : 2985 (=C-H, alkeni), 2938 (C-H, alkani), 1754 (C=O, esteri), 1243 (C-O, eteri), 1213 (O-C=O, esteri)

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 5,94-5,85 (m, 1H, CH-All), 5,30 (qd, 2H, CH_2 -All), 5,21 (dd, 1H, CH_2 -All), 5,22-5,18 (m, 1H), 5,00-4,99 (m, 2H), 4,98-4,87 (m, 2H), 4,18-4,07 (m, 4H), 4,00-3,96 (m, 1H), 3,69-3,60 (m, 1H), 3,55-3,51 (m, 1H), 3,38-3,33 (m, 1H), 2,07-2,04 (3×s, 9H, 3×OAc), 1,51 (s, 3H, CH_3), 1,34 (s, 3H, CH_3), 1,25 (d, 3H, CH_3).

3.3.6. *Sinteza alil-4- $[\beta$ -D-ksilopiranozil-(1→4)]- α -L-ramnopiranozida (12) – uklanjanje izopropilidenske i acetilne zaštite*

Spoj **11** (1,36 g, 2,71 mmol) otopljen je u smjesi octene kiseline i vode (12 mL, $V(\text{HOAc}):V(\text{H}_2\text{O})=4:1$). Otopina je miješana na magnetskoj mješalici pri 60 °C kroz 5 h. Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / eter, 1:1). Po završetku reakcije, u reakcijsku smjesu je dodan toluen (2×15 mL), kako bi se lakše uklonila voda, te je otapalo upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiven je sirovi produkt koji je bez pročišćavnja korišten u sljedećem sintetskom koraku. Analizom NMR spektra ustanovljeno je da se radi o željenom spoju, koji nema izopropilidensku zaštitnu skupinu, ali još uvijek ima acetilne estere.

U okruglu tikvicu dodan je sirovi produkt, metanol (5 mL) i natrijev metoksid (110 μL , 0,47 mmol, 25% (m/m)). Tikvica je začepljena plastičnim čepom i reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi preko noći (16 h). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je uparena s toluenom (2×15 mL) na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Dobiven je sirovi produkt **12** koji je bez pročišćavnja korišten u sljedećem sintetskom koraku. Analizom NMR spektra ustanovljeno je da se radi o željenom spoju, kojem su uklonjene sve zaštitne skupine osim alila na anomernom položaju.

3.3.7. *Sinteza alil-2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1→4)]- α -L-ramnopiranozida (13)*

U okruglu tikvicu dodan je spoj **12** i DMF (5 mL). Smjesa je stavljena na ledenu kupelj i postupno je dodavana 50%-tna suspenzija NaH u mineralnom ulju (560 mg, 11,7 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici pri sobnoj temperaturi kroz 30 min.

Nakon toga, u reakcijsku smjesu je dokapan BnBr (1,7 mL, 14,4 mmol). Miješanje je nastavljeno pod atmosferom argona, pri sobnoj temperaturi preko noći (16 h). Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Idući dan u reakcijsku smjesu je dodano još NaH (95 mg, 1,98 mmol) i BnBr (300 μ L, 2,5 μ mol) te je reakcija ponovo ostavljena preko noći. Nakon završetka reakcije, otopina je prebaćena u lijevak za odjeljivanje u kojem su prethodno dodani etil-acetat (20 mL) i voda (30 mL). Organski ekstrakt ispran je s vodom (3 \times 30 mL), zasićenom otopinom NaCl-a (20 mL), potom osušen na bezvodnom Na₂SO₄ i uparen. Postupak dobivanja spoja **13** iz spoja **11** (875 mg, 1,74 mmol) je na jednak način ponovljen te su sirovi produkti spojeni i zajedno pročišćeni na uređaju za automatsku flash kromatografiju (otapalo A=petroleter, otapalo B=petroleter /etil-acetat, 1:1). Iz dvije reakcije dobiveno je ukupno 1,77 g (50,6 %) produkta **13** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,59$ (petroleter / etil-acetat, 5:1)

¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 7,34-7,22 (m, 25H, CH, Ar), 5,93-5,83 (m, 1H, CH-All), 5,26 (qd, 1H, CH₂-All), 5,18 (dd, 1H, CH₂-All), 4,92 (AB¹, 1H, CH₂-Bn, $J = 11,5$ Hz), 4,88-4,80 (m, 2H, CH₂-Bn), 4,77 (AB¹, 1H, CH₂-Bn, $J = 11,5$ Hz), 4,71-4,60 (m, 4H, 2 \times CH₂-Bn), 4,44 (AB², 1H, CH₂-Bn, $J = 11,0$ Hz), 4,34 (AB², 1H, CH₂-Bn, $J = 11,0$ Hz), 4,19-4,09 (m, 2H, CH₂-All), 3,98-3,85 (m, 3H), 3,81-3,78 (m, 1H), 3,73-3,72 (m, 1H), 3,68-3,56 (m, 2H), 3,53-3,49 (m, 1H), 3,31-3,27 (m, 1H), 3,19-3,14 (m, 1H), 1,32 (d, 3H, CH₃).

3.3.8. Sinteza 2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranoze (**14**)

Spoj **13** (300 mg, 0,38 mmol) i natrijev acetat (1,36 g, 16,6 mmol) otopljeni su u smjesi octene kiseline (6 mL) i vode (345 μ L). U otopinu je dodan PdCl₂ (460 mg, 2,6 mmol) i reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici pod atmosferom argona preko noći (16 h). Reakcija je praćena TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je prebaćena u lijevak za odjeljivanje u kojeg je prethodno dodana zasićena otopina NaHCO₃ (50 mL). Otopina je isprana s etil-acetatom (3 \times 30 mL). Spojeni organski ekstrakti osušeni su na bezvodnom Na₂SO₄, profiltrirani i upareni na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Postupak pripreve spoja **14** iz spoja **13** (200 mg, 0,25 mmol) prethodno je proveden na maloj skali kako bi se isprobala metoda. Sirovi produkti male skale i ovdje navedene reakcije spojeni su i zajedno pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / eter, 5:1.

Dobiveno je 451 mg (kombinirano iskorištenje = 95 %) produkta **14** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,39$ (petroleter / etil-acetat, 5:1)

Produkt je upotrijebljen u sljedećem stupnju bez prethodne detaljne karakterizacije. Naime, radi se o spoju sa slobodnom anomernom OH skupinom, zbog čega je prisutan u obliku smjese α - i β -anomera koji mogu prelaziti jedan u drugi, što znatno komplicira interpretaciju spektara.

3.3.9. Sinteza 2,3-di-O-benzil-4-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)]- α -L-ramnopiranozil-flourida (**15**)

Spoj **14** (348,2 mg, 0,47 mmol) otopljen je u suhom THF-u (11 mL) i smjesa je ohlađena na -25 °C (smjesa leda, soli i metanola). Dodan je DAST (74 μ L, 0,56 mmol) i reakcija je miješana na magnetskoj mješalici pod atmosferom argona na sobnoj temperaturi kroz 30 min. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Nakon pola sata, reakcijska smjesa je ponovo ohlađena i dodano je još DAST-a (100 μ L, 0,76 mmol), potom je nastavljeno miješanje na sobnoj temperaturi kroz 30 min. Reakcija je prekinuta polaganim dodatkom 4 kapi metanola pri -25 °C, nakon čega je otapalo upareno na rotacijskom uparivaču uz vakuum. Postupak dobivanja spoja **15** iz spoja **14** (75 mg, 0,1 mmol) prvo je napravljen na manjoj skali te su sirovi produkti spojeni i zajedno pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / eter, 7:1. Dobiveno je 285 mg (kombinirano iskorištenje = 67,2 %) produkta **15** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,31$ (petroleter / etil-acetat, 5:1), $[\alpha]_D^{26} = 0,49^\circ$ (c 0,66, CHCl_3)

IR ν/cm^{-1} : 3440 (=C-H, aromati), 3063 (=C-H, alkeni), 2925 (C-H, alkani), 697 (C-F)

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 7,32-7,23 (m, 25 H, CH, Ar), 5,47 (d, 1H, H-1, $J = 50,7$ Hz), 4,90 ($\underline{\text{AB}}^1$, 1H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, $J = 11,5$ Hz), 4,87-4,85 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$), 4,84-4,82 (m, 1H), 4,78 ($\underline{\text{AB}}^1$, 1H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, $J = 11,5$ Hz), 4,72-4,56 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2\text{-Bn}$), 4,50 ($\underline{\text{AB}}^2$, 1H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, $J = 11,1$ Hz), 4,36 ($\underline{\text{AB}}^2$, 1H, $\text{CH}_2\text{-Bn}$, $J = 11,1$ Hz), 3,93-3,89 (m, 2H), 3,83-3,73 (m, 3H), 3,62-3,57 (m, 1H), 3,54-3,50 (m, 1H), 3,32-3,28 (m, 1H), 3,20-3,15 (m, 1H), 1,34 (d, 3H, CH_3)

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 138,77 (C, Ar), 138,73 (C, Ar), 138,3 (C, Ar), 138,1 (C, Ar), 137,7 (C, Ar), 128,48-127,45 ($20 \times \text{CH}$, Ar), 107,6 (C1, CH), 105,4 (C7, CH), 103,2 (C9, CH), 84,0

(C4, CH), 82,4 (C8, CH), 79,5 (C3, CH), 78,2 (C10, CH), 75,5 (C2, CH), 75,6 (CH₂-Bn), 75,0 (CH₂-Bn), 73,2 (CH₂-Bn), 72,6 (CH₂-Bn), 70,1 (C5, CH), 63,8 (C11, CH₂), 17,9 (C6, CH₃)

3.3.10. Sinteza alil- α -D-fukopiranozida (**16**)

U okruglu tikvicu dodan je alil-alkohol (5 mL, 73,5 mol). Tikvica je smještena u ledenu kupelj te je postupno dodan acetil-klorid (850 μ L, 11,9 mmol) uz miješanje na magnetskoj mješalici. Miješanje je nastavljeno pri sobnoj temperaturi 1 h pod atmosferom argona. Nakon jednog sata, u reakcijsku smjesu je dodana D-fukoza (500 mg, 3,05 mmol) u malim obrocima. Reakcija je ostavljena na mješalici pod atmosferom argona preko noći (16 h). Po završetku reakcije, otapalo je upareno pod vakuumom (postavke: 40 °C, 7 mbar). Reakcija je praćena TLC-om (etil-acetat / metanol 1:1). Dobiven je sirovi produkt **16** u obliku bijele krutine koji je bez pročišćavanja korišten u idućem sintetskom koraku.

$R_f = 0,71$ (etil-acetat / metanol 1:1)

3.3.11. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden- α -D-fukopiranozida (**17**)

U okruglu tikvicu dodani su sirovi produkt **16**, 2,2-DMP (8 mL, 65,3 mmol) i *p*-TsOH \times H₂O (47 mg, 0,25 mmol). Reakcijska smjesa je miješana preko noći (16 h) na magnetskoj mješalici u atmosferi argona pri sobnoj temperaturi. Tijek reakcije praćen je TLC-om u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 3:1. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa je neutralizirana s NaHCO₃ (21 mg, 0,25 mmol), profiltrirana i uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 5:1 \rightarrow 3:1. Dobiveno je 545 mg (73 %) produkta **17** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,34$ (petroleter / etil-acetat, 3:1)

¹H NMR (CDCl₃) δ /ppm: 5,96-5,87 (m, 1H, CH-All), 5,30 (qd, 1H, CH₂-All, $J = 17,2$ Hz, 1,6 Hz), 5,21 (qd, 1H, CH₂-All, $J = 10,4$ Hz, 1,3 Hz), 4,87 (d, 1H, H-1, $J = 3,9$ Hz), 4,28-4,20 (m, 2H, H-3,H-4), 4,14 (dq, 1H, H-5, $J = 6,6$ Hz, 2,2 Hz), 4,08-4,03 (m, 2H, CH₂-All), 3,82-3,78 (m, 1H, H-2), 2,30 (d, 1H, OH, $J = 6,9$ Hz), 1,52 (s, 3H, CH₃), 1,34 (s, 3H, CH₃), 1,32 (d, 3H, CH₃).

3.3.12. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden-2-O-trimetilsilil- α -D-fukopiranozida (**18**)

Spoj **17** (492,1 mg, 2,01 mmol) otopljen je u suhom DCM-u (9,5 mL). U otopinu je zatim dodan jod (13 mg, 0,05 mmol) i heksametildisilazan (75 μ L, 0,36 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj mješalici u atmosferi argona, zaštićena aluminijskom folijom od svjetla pri sobnoj temperaturi kroz 1 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Nakon jednog sata u reakcijsku smjesu je dodano još heksametildisilazana (100 μ L, 0,48 mmol). Reakcija je prekinuta polaganim dodatkom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (16 mg, 0,1 mmol). Reakcijska smjesa je profiltrirna kroz vatu i uparena. Sirovi produkt je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela koji je tretiran s 0,3% TEA zbog nestabilnosti spoja i blage kiselosti silikagela. Sustav otapala bio je petroleter / eter, 30:1.

Dobiveno je 500 mg (81 %) produkta **18** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,29$ (petroleter / eter, 9:1), $[\alpha]_D^{26} = 17,47^\circ$ (c 1,6, CHCl_3)

IR ν/cm^{-1} : 2986 (=C-H, alkeni), 2904 (C-H, alkani), 1247 (C-O, esteri)

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 5,78-5,70 (m, 1H, CH-All), 5,19 (qd, 1H, CH_2 -All), 5,05 (qd, 1H, CH_2 -All), 4,55 (d, 1H, H-1), 4,05-3,98 (m, 3H, H-3, H-4, H-5), 3,92-3,87 (m, 2H, CH_2 -All), 3,58-3,56 (m, 1H, H-2), 1,36 (s, 3H, CH_3), 1,20 (s, 3H, CH_3), 1,18 (d, 3H, CH_3), 0,0 (s, 9H, $\text{SiO}(\text{CH}_3)_3$).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 134 (CH-All), 117,7 (CH_2 -All), 108,7 (C), 97,7 (C1, CH), 76,8 (C2, CH), 76,3 (C4, CH), 71,6 (C3, CH), 68,3 (CH_2 -All), 63,4 (C5, CH), 28,5, 26,4 ($2 \times \text{CH}_3$), 16,4 (C6, CH_3), 0,43 ($3 \times \text{CH}_3$, TMS)

3.3.13. Sinteza alil-3,4-O-izopropiliden-2-[2,3,4-tri-O-benzil- β -D-ksilopiranozil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-benzil- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- α -D-fukopiranozida (**19**)

Spoj **15** (105 mg, 0,14 mmol) i spoj **18** (61 mg, 0,19 mmol) otopljeni su u suhom benzenu (6 mL) te je otapalo upareno na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Postupak je ponovljen još 2 puta kako bi se u potpunosti uklonila moguća vlaga u reakcijskoj smjesi. Nakon uparavanja, smjesa **15** i **18** otopljena je u suhom toluenu (2,5 mL). U otopinu je dodan borov trifluorid dietil-eterat (2 μ L, 0,02 mmol) te je reakcijska smjesa miješana na magnetskoj mješalici pod atmosferom argona pri sobnoj temperaturi kroz 2 h. Tijek reakcije praćen je TLC-om (petroleter / etil-acetat, 5:1). Reakcija je prekinuta dodatkom jedne kapi TEA. Nakon 15 min, reakcijska smjesa je uparena na rotacijskom uparivaču uz sniženi tlak. Postupak dobivanja spoja **19** iz

spojeva **15** (156 mg, 0,21 mmol) i **18** (91 mg, 0,29 mmol) ponovljen je na većoj skali te su sirovi produkti spojeni i zajedno pročišćeni kromatografijom na stupcu silikagela u sustavu otapala petroleter / etil-acetat, 5:1. Dobiveno je 215.1 mg (kombinirano iskorištenje = 46 %) produkta **19** u obliku bezbojne uljaste tekućine.

$R_f = 0,31$ (petroleter / etil-acetat, 5:1), $[\alpha]_D^{26} = 0,002^\circ$ (c 1,3, CHCl_3)

IR ν/cm^{-1} : 3030 (=C-H, aromati), 2983 (=C-H, alkeni), 2902 (C-H, alkani), 1217 (C-O, eteri)

^1H NMR (CDCl_3) δ/ppm : 7,30-7,22 (m, 25 H, CH, Ar), 5,93-5,84 (m, 1H, CH-All), 5,32 (dd, 1H, CH_2 -All, $J = 17,1$ Hz), 5,14 (dd, 1H, CH_2 -All, $J = 10,3$ Hz), 5,08 (s, 1H, H-1), 4,93-4,59 (m, 10 H, CH_2 -Bn), 4,39-4,33 (m, 2H), 4,26-4,10 (m, 3H), 4,04-3,96 (m, 2H, CH_2 -All), 3,91-3,84 (m, 4H), 3,75-3,70 (m, 2H), 3,59-3,55 (m, 1H), 3,51-3,47 (m, 1H), 3,31-3,26 (m, 1H), 3,18-3,13 (m, 1H), 1,49 (s, 3H, CH_3), 1,35 (s, 3H, CH_3), 1,28 (d, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ/ppm : 138,8, 138,4, 138,3 ($5\times\text{C}$, Ar), 133,6 (CH-All), 128,46-127,44 ($20\times\text{CH}_2$, Bn), 117,7 (CH_2 -All), 108,9, 103,4 (C13, CH), 99,7 (C1, CH), 97,4 (C7, CH), 84,0 (C15, CH), 83,6 (C9, CH), 80,3 (C10, CH), 78,2 (C8, CH), 77,0 (C14, CH), 76,5 (C16, CH), 76,4 (C3, CH), 75,4 (C2, CH), 74,3 (C4, CH), 75,6 (CH_2 -Bn), 74,9 (CH_2 -Bn), 73,3 (CH_2 -Bn), 72,7 (CH_2 -Bn), 71,9 (CH_2 -Bn), 68,5 (CH_2 -All), 67,7 (C11, CH), 63,8 (C17, CH_2), 63,1 (C5, CH), 28,5 (CH_3), 26,6 (CH_3), 18,07 (C6, CH_3), 16,33 (C12, CH_3)

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

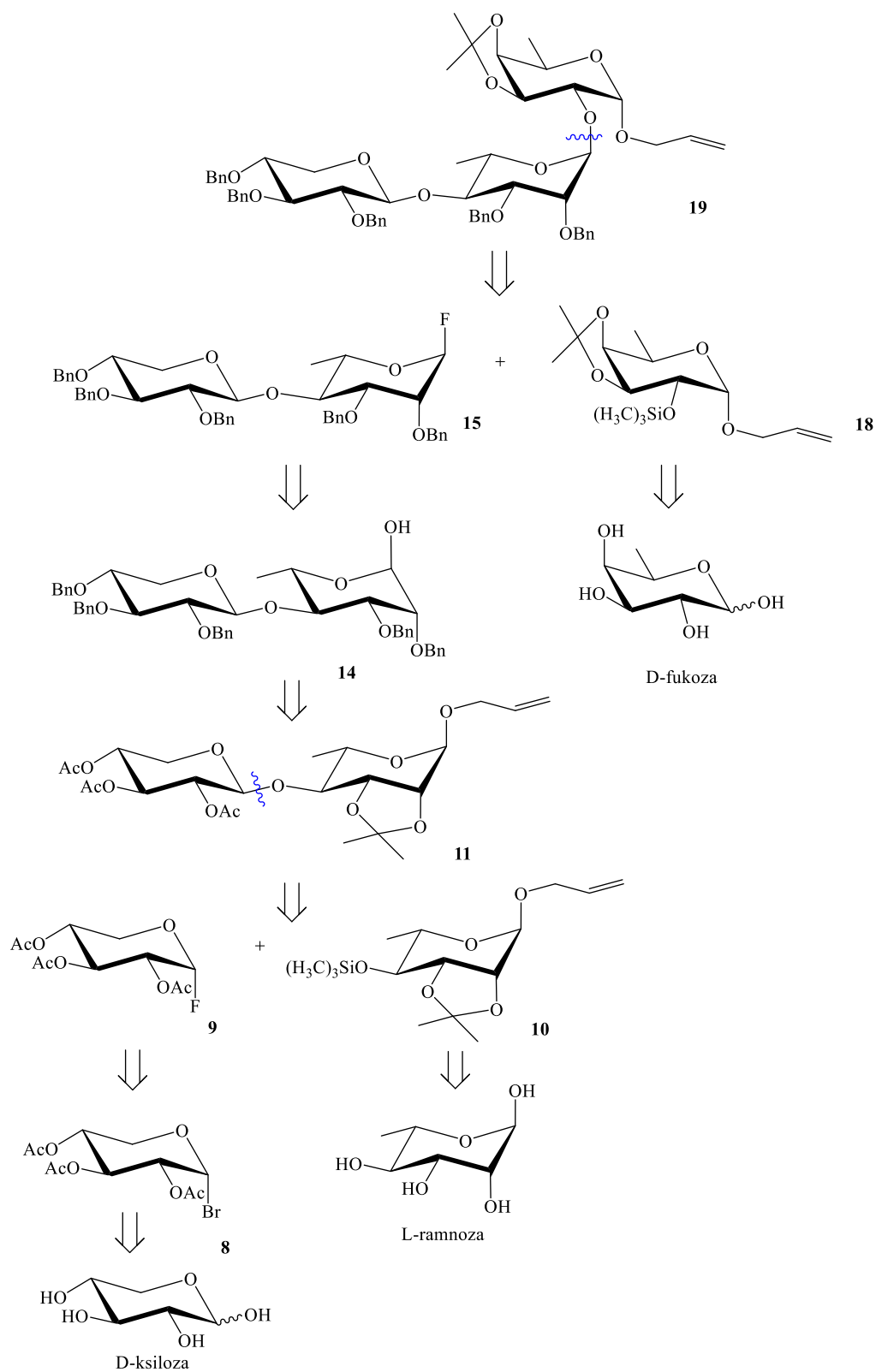
4.1. Uvod

U sklopu ovog diplomskog rada sintetiziran je potpuno zaštićeni trisaharid $\text{Xyl}(\beta 1-4)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Fuc}$ (**19**). Ovo je sažeti oblik naziva trisaharida te je korišten u većini dijelova diplomskog rada zbog jednostavnijeg zapisa. U naslovu diplomskog rada korišten je prošireni oblik ($\beta\text{-D-Xylp}-(1\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}-(1\rightarrow 2)\text{-D-Fucp}$), u eksperimentalnome dijelu dan je puni naziv spoja, a postoji i kratki oblik ($\text{Xyl}\beta\text{-4Rha}\alpha\text{-2Fuc}$). Pripravljene linearni trisaharid važna je strukturna domena imunostimulirajućeg saponina QS-21 i nužna za njegovu adjuvantsku aktivnost. Posljednjih nekoliko desetljeća provedena su mnoga istraživanja u kojima je ispitan utjecaj strukturnih modifikacija QS-21 na adjuvantsku aktivnost. Dokazano je da je za očuvanje aktivnosti minimalna duljina linearnog oligosaharida tri šećerne jedinice, dok se oligosaharid u prirodnom spoju QS-21 sastoji od četiri šećerne jedinice.¹⁷ Daljnjim istraživanjima ustanovljeno je da osim duljine lanca, utjecaj ima i njegov sastav. Zamjena ksiloze i ramnoze nekim drugim šećerima, npr. komercijalno dostupnom celobiozom ($\text{Glc}(\beta 1-4)\text{Glc}$) ili laktozom ($\text{Gal}(\beta 1-4)\text{Glc}$), rezultira analogima čija je imunoadjuvantska aktivnost značajno smanjena.¹⁹ Navedeno je razlog odabira upravo ove strukture (**19**) za ciljnu molekulu.

4.2. Retrosintetska analiza ciljnog spoja

Retrosintetsko razmatranje ciljne molekule, trisaharida $\text{Xyl}(\beta 1-4)\text{Rha}(\alpha 1-2)\text{Fuc}$ (**19**), dovodi do tri osnovna prekursora (slika 20). Diskonekcija glikozidne veze u prvom koraku rezultira nastankom flourida (**15**) i potpuno zaštićenog fukoznog prekursora (**18**), koji potječe iz komercijalno dostupne D-fukoze. Flourid (**15**) može se pripraviti interkonverzijom funkcijske skupine anomernog položaja spoja **14** (preko hemiacetala). Daljnja diskonekcija glikozidne veze rezultira s dvije monosaharidne jedinice - flouridom (**9**) (ksilozni prekursor) i potpuno zaštićenim ramnoznim prekursorom **10**. Flourid (**9**) je moguće dobiti reakcijom zamjene broma

fluorom iz **8**. Obje molekule, **8** i **10**, moguće je pripremiti iz komercijalno dostupnih spojeva, D-ksiloze i L-ramnoze.



Shema 22. Retrosintetska analiza ciljne molekule **19**

4.3. Sinteza ciljnog spoja

Sinteza ciljne molekule provedena je iz tri odgovarajuće zaštićena monosaharidna prekursora: D-ksiloze, L-ramnoze i D-fukoze. Korištene su dvije metode glikozilacije, čiji su rezultati uspoređeni. Strukture ovdje spomenutih spojeva prikazane su na shemama 22.-38.

Ksilozni prekursor pripremljen je iz D-ksiloze kojoj je u prvom koraku zaštićena anomerna hidroksilna skupina alilnom zaštitnom skupinom (**1**), a zatim i preostale OH skupine pivaloilnom zaštitom (**2**) u iskorištenju od 78 %. Idući korak je izomerizacija alilne skupine (aktivacija), pri čemu nastaje prop-1-enil-glikozid (**3**) u iskorištenju od 46 %.

Ramnozni prekursor pripremljen je iz L-ramnoze kojoj je u prvom koraku zaštićena anomerna hidroksilna skupina alilnom zaštitnom skupinom (**4**) istim postupkom kao i za spoj (**1**). Hidroksilne skupine na C2 i C3 atomima su međusobno u *cis*-položaju, što je omogućilo njihovo zaštićivanje izopropilidenskom zaštitom (**5**) u iskorištenju od 61 %. Reakcija glikozilacije odgovarajućih monosaharidnih prekursora (**3**) i (**5**) u disaharid (**6**) pri uvjetima NIS/cat. TfOH^{6,21} u ovom je radu rezultirala je iznimno malim iskorištenjem (10 %), te je izabran drugačiji sintetski put.

U drugoj metodi ksilozni prekursor pripremljen je iz D-ksiloze koja je u prvom koraku zaštićena acetilnim zaštitnim skupinama pri čemu nastaje peracetilirani šećerni derivat (**7**) u iskorištenju od 98,5 %. Idući korak je selektivno uklanjanje acetilne zaštitne skupine na anomernom ugljikovom atomu i njena zamjena bromom. Nastali bromid (**8**) (75 %) potom je preveden u flourid (**9**) u reakciji sa srebrovim flouridom u iskorištenju od 59 %.

Priprema ramnoznog prekursora nastavljena je iz spoja (**5**) na koji je zatim uvedena trimetilsililna zaštitna skupina na slobodnu OH-skupinu (**10**) u iskorištenju od 84 %. Druga metoda glikozilacije,⁹ odnosno reakcija pripremljenog flourida (**9**) i silinog etera (**10**) uz katalizator BF₃·OEt₂ daje željeni disaharid (**11**) u odličnom iskorištenju od 86%. Idući korak je uklanjanje izopropilidenske i acetilnih zaštitnih skupina sa disaharida (**11**) i njihova zamjena benzilnim zaštitama uz benzil bromid i natrijev hidrid. Nastali spoj (**13**) (51 %) u reakciji s paladijevim (II) kloridom rezultira uklanjanjem alilne zaštitne skupine na anomernoj OH skupini pri čemu nastaje hemiacetal (**14**) u iskorištenju od 95 %. Reakcijom DAST-a i hemiacetala (**14**) nastaje flourid (**15**) u iskorištenju od 67 %.

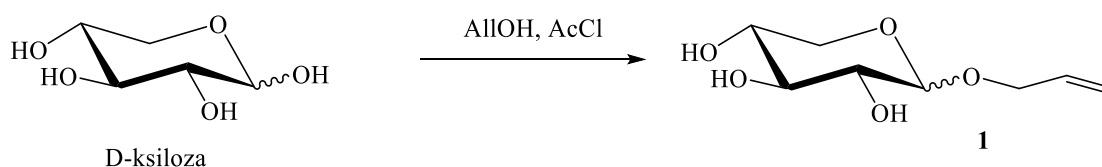
Fukozni prekursor pripremljen je iz D-fukoze jednakim nizom reakcija kao i ramnozni prekursor iz L-ramnoze. U prvom koraku zaštićena je anomerna hidroksilna skupina alilnom

zaštitnom skupinom (**16**), a zatim hidroksilne skupine na C3 i C4 (*cis*) izopropilidenskom zaštitom (**17**) u iskorištenju od 73 %. Preostala hidroksilna skupina (na C2) zaštićena je uvođenjem trimetilsilane zaštitne skupine pri čemu nastaje silini eter (**18**) u iskorištenju od 81 %. Reakcija glikozilacije flourida (**15**) i silinog etera (**18**) katalizirana s $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ daje konačan produkt, trisaharid (**19**) (46 %). Time je postignut cilj ovog rada, koji je bio što jednostavnijim sintetskim putem i u što boljem iskorištenju doći do ciljnog linearnog trisaharida.

4.4. Metoda glikozilacije s alil-glikozidima kao glikozil-donorima (metoda I)

4.4.1. Sinteza ksiloznog prekursora

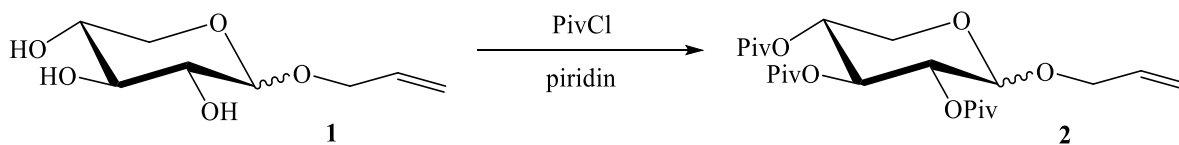
D-Ksiloza je, poput L-ramnoze i D-fukoze, ugljikohidrat te pripada skupini polihidroksialdehida. Kako bi se postigla regioselektivnost te sintetski put usmjerio u željenom smjeru, hidroksilne skupine potrebno je na odgovarajući način zaštititi. Naslovna metoda glikozilacije koristi alil-glikozide kao glikozil-donore, zbog čega je u prvome koraku uvedena alilna zaštitna skupina na anomerni OH. Alilna zaštitna skupina uvedena je u Fischerovim uvjetima. Reakcijom alilnog alkohola s acetil-kloridom (1 h) generira se HCl koji čini reakcijsku smjesu kiselom (uvjeti su bezvodni). Postupnim dodatkom D-ksiloze u smjesu dolazi do protoniranja njene anomerne -OH skupine koja potom izlazi kao voda, dok alilni alkohol, koji je prisutan u velikom suvišku, nukleofilno napada anomerni C atom. Reakcija je miješana preko noći (16 h) pri čemu je došlo do nastanka produkta **1** (shema 23).



Shema 23. Uvođenje alilne zaštitne skupine na anomerni položaj

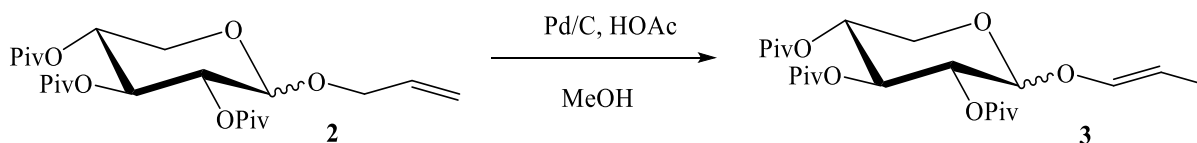
U idućem koraku slijedi uvođenje zaštitnih skupina na preostale OH skupine. Odabrana je pivaloilna zaštitna skupina iz razloga što je ona esterska zaštitna skupina. Takve skupine na C-2 atomu su participirajuće skupine, što znatno utječe na dijastereoselektivnost reakcije glikozilacije. Reakcijom spoja **1** i trimetilacetil-klorida u piridinu (16 h) dobiven je potpuno

zaštićeni alil-glikozid **2** u iskorištenju od 78 % (lit. 8 %²²) nakon kromatografskog pročišćavanja (shema 24).



Shema 24. Uvođenje pivaloilne zaštitne skupine

Alilna skupina sama po sebi nije dobra izlazna skupina i potrebno ju je prevesti u nestabilni enol-eter koji lako hidrolizira. Izomerizacija alil-glikozida u reaktivni prop-1-enil-glikozid pokušana je uz nekoliko različitih reagensa, no ti pokušaji su većim dijelom bili bezuspješni (tablica 2). Izomerizacija je konačno uspjela uz katalizator Pd/C u metanolu kao otapalu i uz kap octene kiseline kako bi se postigli blago kiseli uvjeti (refluks, 1 h). Reakcijom je dobiven prop-1-enil-glikozid **3** u iskorištenju od 46 % (shema 25).



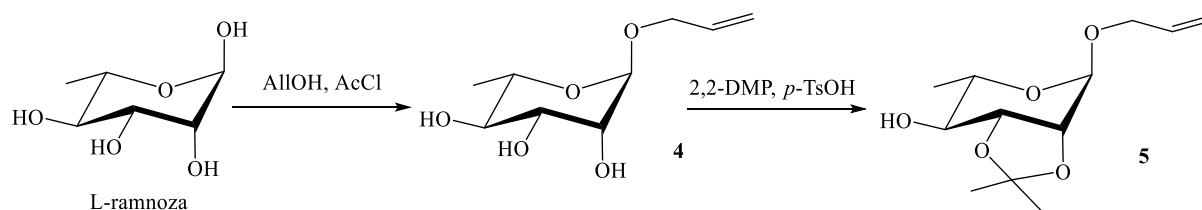
Shema 25. Izomerizacija alilne skupine

Tablica 2. Isprobani uvjeti izomerizacije alilne skupine

Reagensi	Reakcijski uvjeti	Uspješnost
Pd[PPh ₃] ₄ , MeOH	refluks, 1 h	– (raspad reaktanta)
[RhCl(PPh ₃) ₃], TEA, EtOH/benzen/H ₂ O	refluks, 1 h	– (nema promjene)
[RhCl(PPh ₃) ₃], DABCO, MeOH/H ₂ O	refluks, 2 h	– (nastali spoj ne odgovara željenom produktu)
Pd/C, benzen	refluks, 1 h	– (nema promjene)
PdCl ₂ , MeOH	refluks, 1 h	– (potpuno uklanjanje alilne skupine)
Pd/C, DABCO, MeOH	refluks, 1 h	– (nema promjene)
Pd/C, HOAc, MeOH	refluks, 1 h	+

4.4.2. Sinteza ramnoznog prekursora

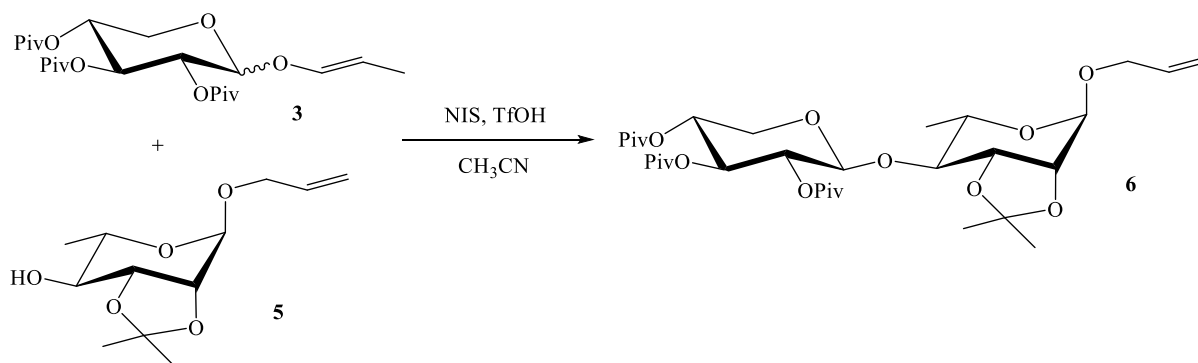
Nakon pripreve prop-1-enil-glikozida, koji predstavlja glikozil-donor, potrebno je pripremiti i glikozil-akceptor. U prvom koraku zaštićena je anomerna OH skupina L-ramnoze istim postupkom kao i za spoj **1**, pri čemu je dobiven produkt **4**. Idući korak je bio uvođenje izopropilidenske zaštitne skupine na hidroksilne skupine na položajima C2 i C3. Kako bi se zaštitile ovom skupinom, hidroksilne skupine moraju biti u *cis* položaju jedna u odnosu na drugu, pri čemu u reakciji nastaje peteročlani prsten. Reakcija se odvija uz 2,2-DMP (2,2-dimetoksipropan) i *p*-TsOH (16 h) te nastaje spoj **5** u iskorištenju od 61 % nakon kromatografskog pročišćavanja (shema 26). U spoju **5** su sve OH skupine L-ramnoze zaštićene, osim one na C4, preko koje će doći do glikozilacije.



Shema 26. Uvođenje alilne i izopropilidenske zaštitne skupine na L-ramnozu

4.4.3. Sinteza disaharida (6) - reakcija glikozilacije (I)

Reakcija prop-1-enil-glikozida (3) i glikozil-akceptora (5) provodi se u strogo bezvodnim uvjetima, zbog čega je tikvica prethodno vakuumirana i sušena plamenikom, a spojevi azeotropirani suhim toluenom. Reakcija se odvija u suhom acetonitrilu uz katalitičku količinu TfOH i ekvimolarnu količinu NIS kao aktivatora koji omogućava nastajanje željenog produkta glikozilacije. Mehanizam reakcije odvija se na način opisan u §2.3. Reakcija je miješana na magnetskoj mješalici pod atmosferom argona, pri sobnoj temperaturi 5 min, nakon čega je TLC-om pokazana potpuna konverzija reaktanata. Reakcija je zaustavljena dodatkom dvije kapi TEA. Dobiven je disaharid (6) u malom iskorištenju od 10 % (shema 27). Razlog iznimno malog iskorištenja može biti vlaga u reakcijskoj smjesi i korištenim otapalima, iako su poduzete sve mjere kako bi se postigli bezvodni uvjeti (sušenje aparature, otapala, azeotropiranje reaktanata). U literaturi opisana reakcija²¹ provedena je u uvjetima gdje je korištena Schlenkova linija i Schlenkova reakcijska tikvica, što je jedan od najboljih sustava za postizanje strogo bezvodnih uvjeta. U slučaju reakcija opisanih u ovom diplomskom radu, inertna atmosfera u reakcijskom sustavu postignuta je upotrebom balona punjenih argonom, koji potencijalno mogu biti izvor male količine vlage. Kako je reakcija iznimno osjetljiva na vlagu, a uz to provedena je i na maloj skali, i najmanja količina H₂O značajno smanjuje njezino iskorištenje. Zbog premalog iskorištenja, metoda se nije pokazala zadovoljavajućom te je izabran drugačiji sintetski put.

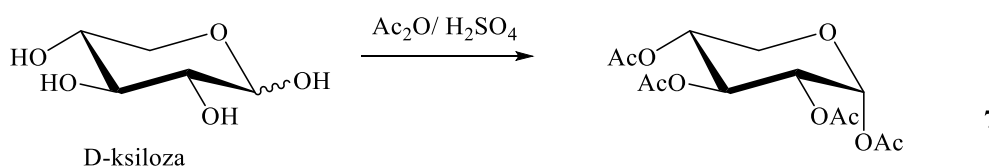


Shema 27. Reakcija glikozilacije metodom I

4.5. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-flourida i sililiranih akceptora (metoda II)

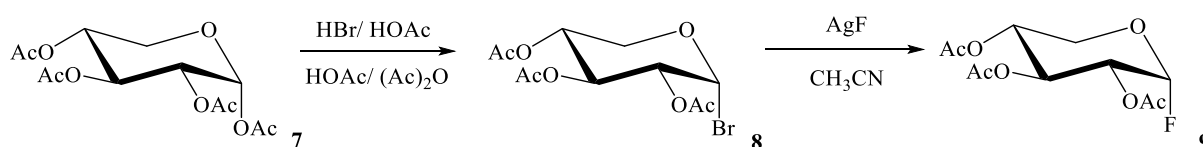
4.5.1. Sinteza ksiloznog prekursora

Metoda glikozilacije s glikozil-flouridima kao glikozil-donorima i silil-eterima kao glikozil-akceptorima nadilazi mnoge trenutne prepreke u sintezi oligosaharida zbog svoje jednostavnosti i činjenice da nisu potrebni strogi uvjeti bez vlage i zraka. Glikozil-flouridi mogu se pripraviti na mnogo načina, a za pripravu ksiloznog prekursora odabran je pristup iz glikozil-halogenida korištenjem metalnih flourida. U prvom koraku potrebno je zaštititi OH skupine D-ksiloze. Odabrana je acetilna zaštitna skupina koja je, poput pivaloilne, participirajuća skupina i ima važnu ulogu u postizanju selektivnosti kod reakcije glikozilacije. Aciliranje D-ksiloze odvija se u acetanhidridu uz par kapi konc. H_2SO_4 (1,5 h, 100 °C). Reakcijom nastaje potpuno zaštićeni, peracetilirani šećer **7** u izvrsnom iskorištenju od 98,5 % nakon kromatografskog pročišćavanja (shema 28). Struktura dobivene potpuno zaštićene D-ksiloze potvrđena je 1H spektroskopijom.



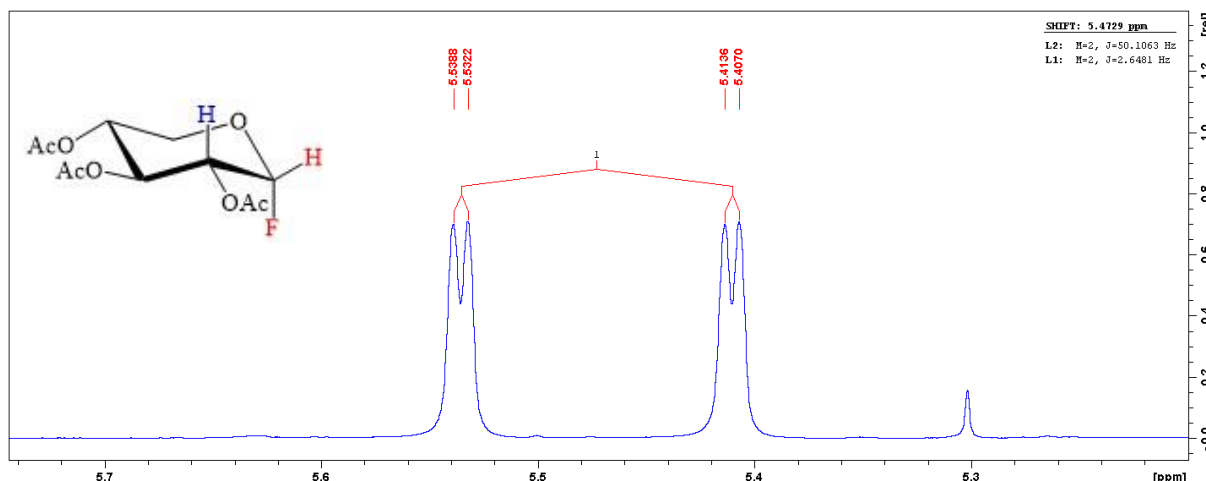
Shema 28. Reakcija aciliranja D-ksiloze

Idući korak je selektivno uklanjanje acetilne zaštitne skupine na anomernom C-atomu i njena zamjena bromom. Reakcija se provodi u smjesi acetanhidrida i octene kiseline uz postupno dodavanje HBr-a u octenoj kiselini (2,5 h). Nakon obrade reakcijske smjese i izolacije glikozil-bromida **8** u iskorištenju od 75 %, slijedi reakcija zamjene bromo s fluorom. Bromid **8** u reakciji sa srebrovim fluoridom u acetonitrilu (2 h) daje glikozil-flourid **9** u iskorištenju od 59 % i visokoj čistoći (shema 29). Reakcija se odvija S_N2 mehanizmom pri čemu je izlazak bromo olakšan zbog koordinacije Ag⁺ iona.⁸ Kod rukovanja bromidom **8** i fluoridom **9** te kod njihovog pročišćavanja, potvrđeno je da su glikozil-flouridi znatno stabilniji od glikozil-bromida. Pročišćavanje bromida bilo je znatno zahtjevnije zbog njegove sklonosti raspadu. Struktura dobivenog flourida **9** potvrđena je ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom.



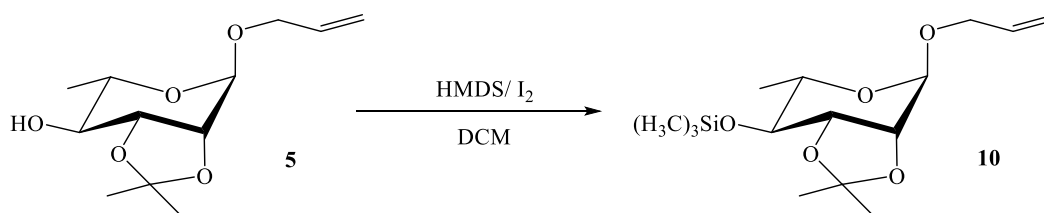
Shema 29. Priprava glikozil-bromida **8** i glikozil-flourida **9**

U ¹H NMR spektru spoja **9** vidljiv je signal anomernog protona koji se pojavljuje kao dublet dubleta (dd) (slika 30). Kod bromida **8**, signal istog protona je dublet (d). Naime, sprege vodika i flouora vrlo je jaka i najčešće iznosi oko 50 Hz za spregu kroz dvije veze.²³ Razlog toga je činjenica da kvantni broj nuklearnog spina (*I*) izotopa flouora ¹⁹F iznosi ½, što ga čini NMR aktivnom jezgrom te signal protona cijepa na n+1 broj signala. Dublet dubleta prisutan u spektru flourida **9** ukazuje na cijepanje anomernog protona s flourom uz konstantu sprege od 50,1 Hz i s protonom na susjednom C atomu uz konstantu sprege od 2,6 Hz, što odgovara *cis*-odnosu s protonom na položaju C2 (tj. fluor je u aksijalnom položaju, α-anomer).

Slika 30. Uvećani prikaz signala anomernog H spoja **9** u ^1H NMR spektru

4.5.2. Sinteza ramnoznog prekursora

U ovoj metodi glikozilacije glikozil-akceptore predstavljaju sililni eteri čija je sinteza nastavljena iz spoja (**5**) (shema 31). Reakcija je provedena u suhom DCM-u uz heksametildisilazan i jod kao katalizator čime je uvedena najjednostavnija TMS zaštita na slobodnu OH skupinu. Nastali potpuno zaštićeni ramnozni prekursor (**10**) pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela koji je deaktiviran s TEA zbog nestabilnosti spoja na silikagelu, koji je inače blago kiseo. Naime, TMS skupina izuzetno je osjetljiva na kisele uvjete i vrlo lako otpada. Spoj (**10**) dobiven je u dobrom iskorištenju od 84 % i visokoj čistoći. Struktura dobivenog ramnoznog prekursora potvrđena je ^1H spektroskopijom.

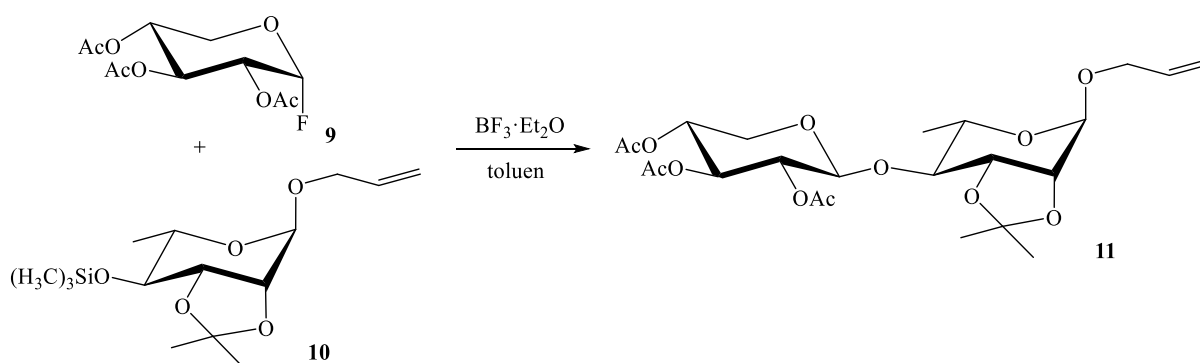


Shema 31. Uvođenje TMS zaštitne skupine

4.5.3. Sinteza disaharida - reakcija glikozilacije (II)

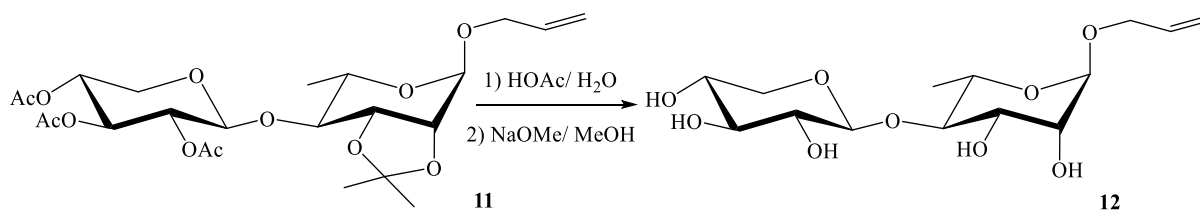
Flourid **9** i sililni eter **10** azeotropirani su suhim benzenom kako bi se u potpunosti uklonila vlaga iz reaktanata. Smjesa je potom otopljena u suhom toluenu i dodan je $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ koji, kao Lewisova kiselina, ima ulogu aktivatora glikozil-donora. Detaljan mehanizam reakcije opisan

je u §2.4. Prednost $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ kao katalizatora je njegova komercijalna dostupnost. Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi kroz 3,5 h uz praćenje TLC-om. Nakon potpune konverzije reaktanata, reakcija je prekinuta dodatkom TEA. Reakcijom je dobiven i izoliran željeni disaharid (**11**) u odličnom iskorištenju od 86 %, čime je potvrđena učinkovitost ove metode glikozilacije (shema 32). Struktura dobivenog disaharida potvrđena je ^1H NMR spektroskopijom.



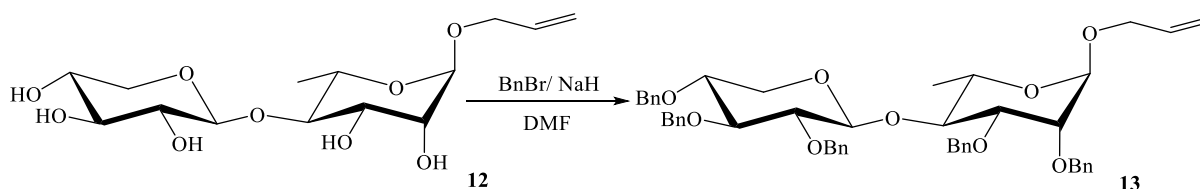
Shema 32. Reakcija glikozilacije metodom II

U idućem koraku sinteze potrebno je pripremiti novi glikozil-donor, koji će u ovome slučaju biti disaharid (**11**). Kako bi se postigla ortogonalnost zaštitnih skupina na disaharidu i trećoj monosaharidnoj jedinici, fukozi, potrebno je ukloniti postojeće acetilne i izopropilidensku zaštitnu skupinu i zamijeniti ih benzilnim. Naime, kasnijim bi uklanjanjem acetilnih zaštita sa ksilozne jedinice uklonili i one na fukozi, a poznato je da je aciliranost fukoze od presudne važnosti za smjer imunološkog odgovora derivata *Quillaja* saponina.²⁴ Uklanjanje izopropilidenske zaštitne skupine provodi se u smjesi octene kiseline i vode pri 60 °C kroz 5 h. Produkt je bez pročišćavanja korišten u sljedećem sintetskom koraku, a analizom NMR spektra ustanovljeno je da se radi o željenom spoju, koji nema izopropilidensku zaštitnu skupinu, ali još uvijek ima acetilne estere. Uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina provodi se u Zemlénovim uvjetima²⁵ u metanolu uz NaOMe (16 h). Reakcijom je dobiven sirovi produkt **12** čijom je analizom NMR spektra ustanovljeno da se radi o željenom spoju, kojemu su uklonjene sve zaštitne skupine osim alila na anomernom položaju (shema 33).



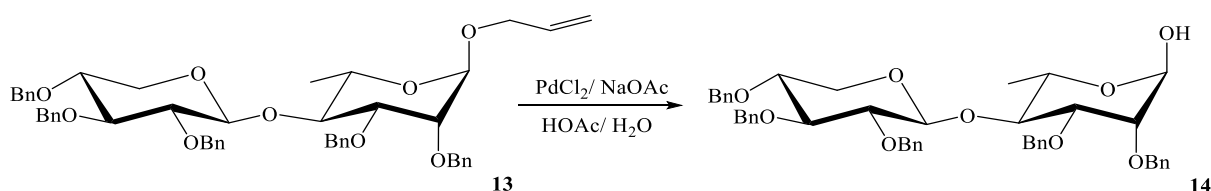
Shema 33. Uklanjanje acetilnih i izopropilidenske zaštitne skupine

Za ortogonalnu zaštitnu skupinu odabrana je benzilna zaštita zbog jednostavnog i učinkovitog uklanjanja katalitičkom hidrogenolizom pri čemu ne dolazi do promjene na ostalim funkcijskim skupinama ciljne molekule. Reakcija benziliranja slobodnih OH skupina disaharida (**12**) provodi se u DMF-u uz NaH i BnBr (16 h). Reakcijom je dobiven benzilirani disaharid (**13**) u iskorištenju od 51 % (lit. 87 %¹⁸) nakon kromatografskog pročišćavanja (shema 34).



Shema 34. Benziliranje disaharida

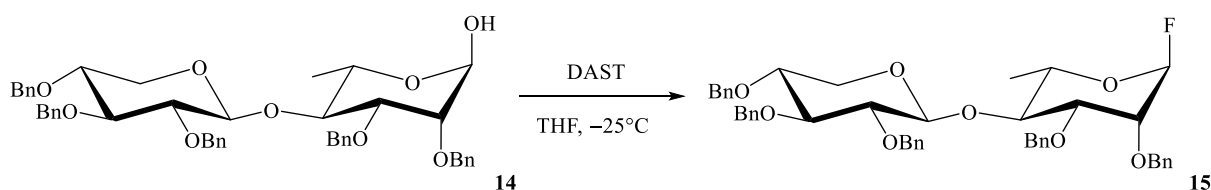
Jedan od načina pripreme glikozil-flourida (glikozil-donora) je pristup iz hemiacetalnih šećera uz DAST koji je poznat kao najbolji reagens za flouriranje slobodne anomerne -OH skupine. Stoga, u idućem koraku sinteze potrebno je ukloniti alilnu zaštitnu skupinu. Reakcija se uspješno provodi uz PdCl₂ i natrijev acetat u smjesi octene kiseline i vode (16 h). Reakcijom je dobiven hemiacetal (**14**) u izvrsnom iskorištenju od 95 % (shema 35).



Shema 35. Uklanjanje alilne zaštitne skupine

Hemiacetal (**14**) je upotrijebljen u sljedećem koraku bez prethodne detaljne karakterizacije. Naime, radi se o spoju sa slobodnom anomernom OH skupinom, zbog čega je prisutan u obliku smjese α i β -anomera koji mogu prelaziti jedan u drugi, što znatno komplicira interpretaciju

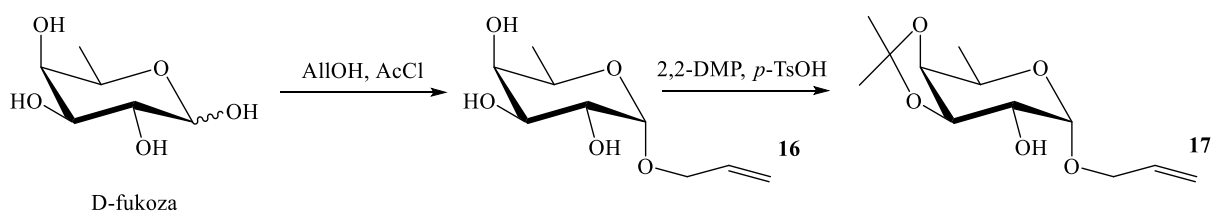
spektara. Flouriranje hemiacetala **14** provodi se u THF-u uz DAST dodan pri $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega je reakcijska smjesa ostavljena da spontano dostigne sobnu temperaturu kroz 30 min. Reakcija je zaustavljena dodatkom metanola pri $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i nakon obrade izoliran je flourid **15** u dobrom iskorištenju od 67 % (shema 36). Struktura dobivenog flourida **15** potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, pri čemu je u ^1H NMR spektru također vidljiv karakterističan dublet dubleta kao i u spektru fluorida **9**.



Shema 36. Flouriranje hemiacetala uz DAST

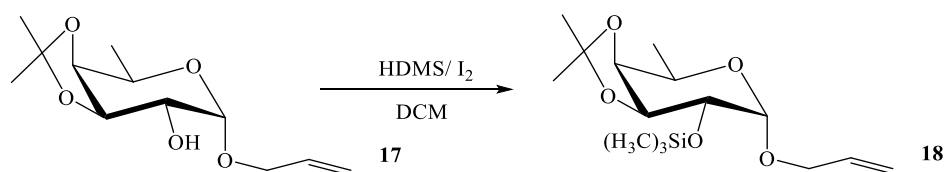
4.5.4. Sintaza fukoznog prekursora

Nakon pripreve glikozil-flourida (glikozil-donora) potrebno je pripremiti glikozil-akceptor za iduću reakciju glikozilacije. Fukozni glikozil-akceptor pripremljen je iz D-fukoze na isti način kao i ramnozni iz L-ramnoze. U prvome koraku zaštićena je anomerna OH skupina D-fukoze alilnom zaštitom istim postupkom kao za spojeve **1** i **4**, pri čemu nastaje produkt **16**. Idući korak je uvođenje izopropilidenske zaštitne skupine na hidroksilne skupine na položajima tri i četiri. Reakcijom nastaje spoj **17** u dobrom iskorištenju od 73 % (lit. 85 %²²) nakon pročišćavanja kromatografijom (shema 37).



Shema 37. Uvođenje alilne i izopropilidenske zaštite

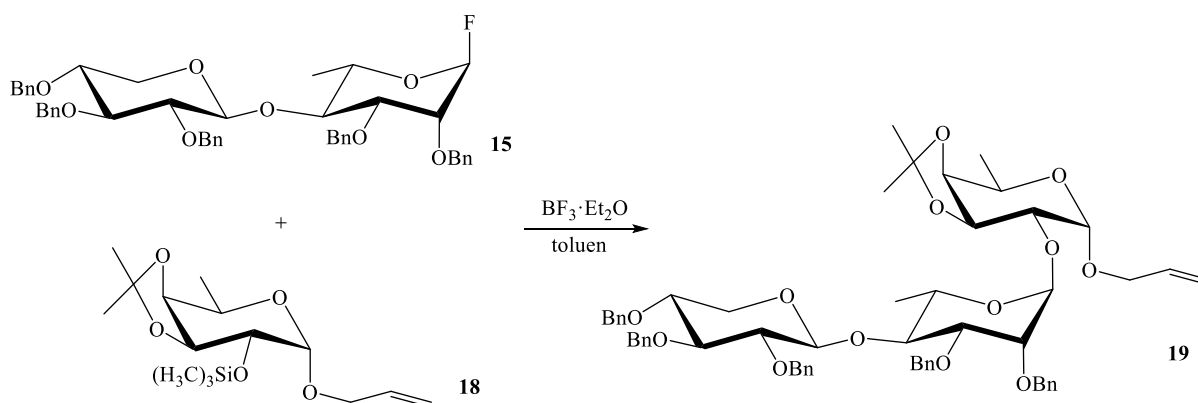
Preostala hidroksilna skupina zaštićena je uvođenjem trimetilsilane zaštitne skupine istim postupkom kao i za spoj **10**, pri čemu nastaje silini eter **18** u dobrom iskorištenju od 81 % i visokoj čistoći (shema 38). Struktura dobivenog potpuno zaštićenog fukoznog prekursora potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.



Shema 38. Uvođenje TMS zaštite

4.5.5. Sinteza trisaharida - reakcija glikozilacije (metoda II)

Konačni korak u sintezi bila je reakcija fluorida **15** i silinog etera **18** (shema 39). Reakcija glikozilacije provedena je istim postupkom kao i za pripravu disaharida **11**. Reakcijom je dobivena i izolirana ciljna molekula, trisaharid Xyl(β 1-4)Rha(α 1-2)Fuc (**19**) u iskorištenju od 46 %. Povećavanjem duljine oligosaharidnog lanca, veći je broj mogućih nusprodukata i reakcije su kompleksnije, što je razlog manjeg, ali i dalje vrlo zadovoljavajućeg iskorištenja. Struktura dobivenog trisaharida potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom.



Shema 39. Reakcija glikozilacije metodom II

4.5.6. Usporedba metode I i metode II

Usporedbom dvije metode glikozilacije (dva sintetska puta) potvrđena je jednostavnost i veća učinkovitost metode II, koja koristi glikozil-flouride kao glikozil-donore. Razlog boljih rezultata ove metode je njena robusnost. Metoda glikozilacije II, ima jednostavan pristup, stabilne reaktante koji se daju laku pročititi, komercijalno dostupan katalizator ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$), dok se u metodi glikozilacije s alilima pojavio problem s reakcijom izomerizacije alilne skupine. To je rezultiralo s puno neuspješnih pokušaja te trošenja skupih katalizatora. Reakcija

izomerizacije inače se provodi uz KO t Bu u DMSO-u, što nije bilo primjenjivo zbog pivaloilnih i acetilnih zaštitnih skupina koje nisu stabilne u navedenim uvjetima, a može se provesti i uz [Ir(COD)(PMePh₂)₂]PF₆ katalizator u neutralnim i blagim uvjetima, no ovaj katalizator je iznimno skup. Također, činjenica da nisu potrebni strogi uvjeti bez vlage i zraka uvelike je olakšala provođenje reakcije kod metode II, što je rezultiralo dobrim iskorištenjem i izostankom nastanka neželjenih nusprodukata. Suprotno tome, kod metode glikozilacije s alilima moguće je da je upravo vlaga razlog iznimno malog iskorištenja. Navedeno je dokazano i usporedbom iskorištenja reakcije glikozilacije metodom II koje iznosi 86 % te je dvostruko veće od literaturnog iskorištenja metode I koje za ovu reakciju iznosi 43 %.¹⁸ Metoda glikozilacije s glikozil-flouridima kao glikozil-donorima ima potencijala postati široko korištena metoda glikozilacije koja omogućava *one-pot* sintezu oligosaharida iz odgovarajućih monosaharidnih jedinica.⁹ Prednost obje metode (I i II) je provođenje reakcije na sobnoj temperaturi. Usporedba iskorištenja reakcija za dva sintetska puta pripreve disaharida prikazana je u tablici 3.

Tablica 3. Iskorištenja reakcija za dva sintetska puta

	Sintetski put I			Sintetski put II	
	Spoj	η / %		Spoj	η / %
ksilozni prekursor	2	78 %	ksilozni prekursor	7	98,5 %
	3	46 %		8	75 %
ramnozni prekursor	5	61 %		9	59 %
glikozilacija (metoda I)- disaharid	6	10 %	ramnozni prekursor	10	84 %
			glikozilacija (metoda II)- disaharid	11	86 %
Ukupno iskorištenje sintetskog puta¹		3,6 %	Ukupno iskorištenje sintetskog puta²		44 %
			disaharidni glikozil-donor	13	51 %
				14	95 %
				15	67 %
			fukozni prekursor	17	73 %
				18	81 %
			glikozilacija (metoda II)- trisaharid	19	46 %
			Ukupno iskorištenje sintetskog puta³		5,6 %

¹ Najdulji linearni slijed (polazeći iz Xyl, 4 koraka)

² Najdulji linearni slijed (polazeći iz Rha, 4 koraka)

³ Najdulji linearni slijed (polazeći iz Xyl, 9 koraka)

Zbog velikog vremenskog opsega izrade diplomskog rada i količine izoliranog trisaharida **19**, nisu provedeni sintetski koraci uklanjanja izopropilidenske zaštitne skupine i zamjene acetilnim zaštitama na fukozi. U daljnjim se istraživanjima (izvan okvira ovog rada) ovaj trisaharid može koristiti u svrhu pripreve analoga QS-21 u kojima će trisaharidni dio, bitan za aktivnost, biti sačuvan, dok se ostale strukturne podjedinice osnovne strukture QS-21 mogu varirati/modificirati te tako pratiti utjecaj promjene strukture na imunoadjuvantsku aktivnost.

§ 5. ZAKLJUČAK

Sintetiziran je trisaharid Xyl(β 1-4)Rha(α 1-2)Fuc (**19**) iz tri monosaharidna prekursora: D-ksiloze, L-ramnoze i D-fukoze. Korištene su dvije metode glikozilacije čiji su rezultati uspoređeni.

1. Metoda I, glikozilacija s alil-glikozidima kao glikozil-donorima:

Reakcijom prop-1-enil-glikozida **3** i glikozil-akceptora **5** s NIS uz kat. TfOH, nastaje disaharid **6** u malom iskorištenju od 10 %. Razlog malog iskorištenja može biti iznimno velika osjetljivost reakcije na i najmanje tragove vlage. Zbog iznimno malog iskorištenja izabran je drugačiji sintetski put.

2. Metoda II, glikozilacija s glikozil-fluoridima kao donorima i sililnim eterima kao akceptorima:

a) Ksilozni prekursor sintetiziran je u tri koraka i predstavlja glikozil-donor:

1. Aciliranje D-ksiloze odvija se u acetanhidridu uz konc. H₂SO₄. Reakcijom nastaje potpuno zaštićeni, peracetilirani šećer **7** u izvrsnom iskorištenju od 98,5 %.
2. Glikozil-bromid **8** dobiven je iz acetata **7** u uvjetima HBr/octena kiselina u iskorištenju od 75 %.
3. Zamjenom broma fluorom uz AgF dobiven je fluorid **9** koji je mnogo stabilniji od glikozil-bromida. Iskorištenje reakcije je 59 %.

b) Ramnozni prekursor sintetiziran je u jednom koraku iz spoja **5** i predstavlja glikozil-akceptor:

1. Reakcijom spoja **5** i heksametildisilazana uz jod kao katalizator uvedena je TMS zaštita na slobodnu OH skupinu. Dobiven je spoj **10** u odličnom iskorištenju od 84 %.

c) Sinteza disaharida:

1. Reakcijom flourida **9** i sililnog etera **10** uz BF₃·Et₂O kao katalizator dobiven je željeni disaharid **11** u odličnom iskorištenju od 86 %, čime je potvrđena učinkovitost ove metode glikozilacije.
2. Uklanjanje izopropilidenske zaštitne skupine sa spoja **11** provodi se u smjesi octene kiseline i vode, a uklanjanje acetilnih zaštitnih skupina uz NaOMe/MeOH, pri čemu nastaje spoj **12** kojemu su uklonjene sve zaštitne skupine osim alila na anomernom položaju.

3. Reakcija benziliranja slobodnih OH skupina disaharida **12** provedena je uz NaH i BnBr, pri čemu je dobiven benzilirani disaharid **13** u iskorištenju od 51 %.
4. Uklanjanje alilne zaštitne skupine uspješno je provedeno uz PdCl₂ i natrijev acetat u smjesi octene kiseline i vode pri čemu je dobiven hemiacetal **14** u izvrsnom iskorištenju od 95 %.
5. Flouriranje hemiacetala **14** provedeno je uz DAST pri čemu je pripravljen flourid **15** u dobrom iskorištenju od 67 %. Ovaj spoj je novi glikozil-donor u idućoj reakciji glikozilacije.

a) Fukozni prekursor sintetiziran je u tri koraka i predstavlja glikozil-akceptor:

1. Reakcijom D-fukoze s alilnim alkoholom u kiselim uvjetima dobivena je alil- α -D-fukoza (**16**).
2. Reakcijom **16** sa 2,2-DMP i *p*-TsOH uvodi se izopropilidenska zaštitna skupina i nastaje spoj **17**.
3. Reakcijom spoja **17** i heksametildisilazana uz jod kao katalizator uvedena je TMS zaštita na slobodnu OH skupinu. Dobiven je spoj **18** u vrlo dobrom iskorištenju od 81 %.

d) Sinteza konačnog trisaharida:

1. Reakcijom flourida **15** i sililnog etera **18** uz BF₃·Et₂O kao katalizator dobiven je konačni produkt, trisaharid **19**, u iskorištenju od 46 %. Povećavanjem duljine oligosaharidnog lanca, veći je broj mogućih nusprodukata i reakcije su kompleksnije, što je razlog manjeg, ali i dalje vrlo zadovoljavajućeg iskorištenja.

Usporedbom dvije metode glikozilacije (dva sintetska puta) potvrđena je jednostavnost i veća učinkovitost metode glikozilacije s glikozil-flouridima kao glikozil-donorima (metoda II), što je očekivano zbog njezine robusnosti. Ova metoda ima potencijala postati široko korištena metoda glikozilacije koja omogućava *one-pot* sintezu oligosaharida iz odgovarajućih monosaharidnih jedinica.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

AB - AB kvartet

All - alil

Ar - aril

Bn - benzil

DABCO - 1,4-diazobiciklo[2.2.2]oktan

DAST - dietilaminosumporov triflourid

d - dublet

dd - dublet dubleta

DCM - diklormetan

DMF- dimetilformamid

2,2-DMP - 2,2-dimetoksiopropan

EtOAc - etil-acetat

Fuc - fukoza

HOAc - octena kiselina

HMDS - heksametildisilazan

IR - infracrveno

m - multiplet

MeOH - metanol

NaOMe - natrijev metoksid

NIS - *N*-jodsukcinimid

NMR - nuklearna magnetska rezonancija

Nu – nukleofil

p-TsOH - *para*-toluensulfonska kiselina

ppm – dijelovi na milijun (engl. *parts per milion*)

Pd/C (10 %) - paladij na ugljiku

PivCl - trimetilacetil klorid

py - piridin

QS - *Quillaja* saponin

qd – kvartet dubleta

R_f - faktor zaostajanja

Rha - ramnoza

s - singlet

SAR - odnos strukture i reaktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*)

t - triplet

TEA - trietilamin

TfOH - trifluorometansulfonska kiselina

THF - tetrahidrofuran

TLC - tankoslojna kromatografija

TMS - tetrametilsilan

TMS - trimetilsililna zaštitna skupina

Xyl - ksiloza

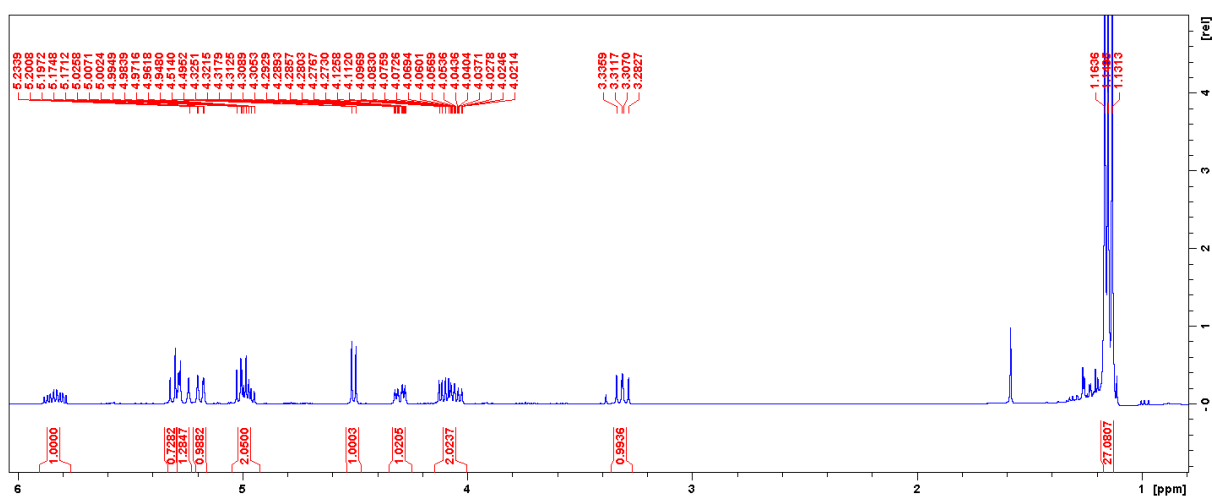
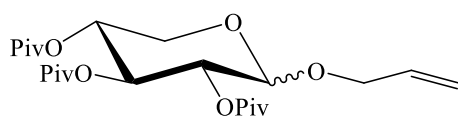
§ 7. LITERATURNI IZVORI

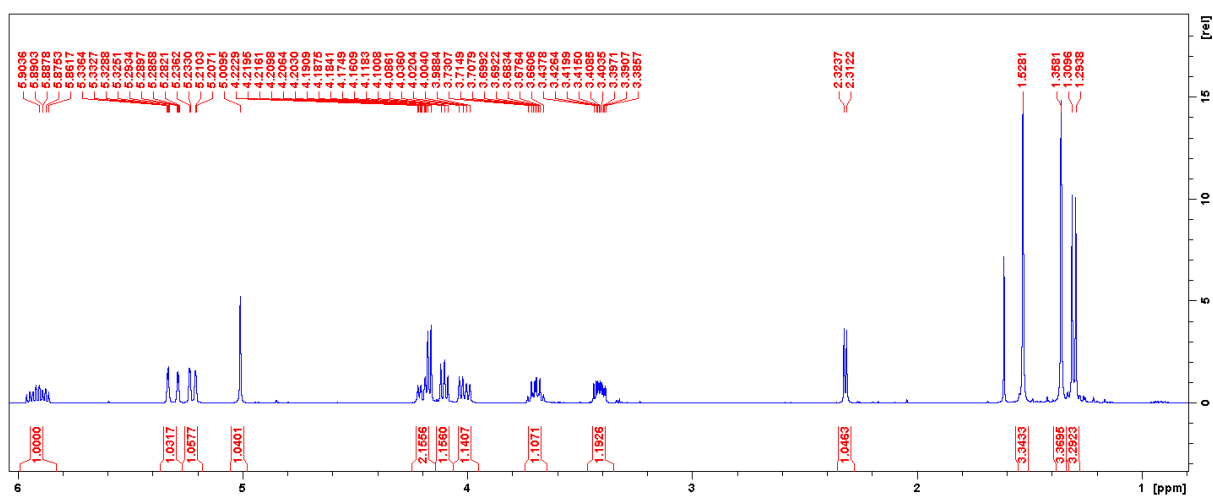
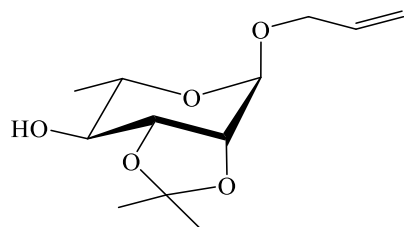
1. L. G. Wade, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2017, str. 1097-1134.
2. S. S. Nigudkar, A. V. Demchenko, *Chem. Sci.* **6** (2015) 2687-2704.
3. L. Kurti, B. Czako, *Strategic Applications of Organic Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, 2005, str. 246-247.
4. D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
5. J. Guo, X. S. Ye, *Molecules*, **15** (2010) 7235-7265.
6. P. Wang, P. Haldar, Y. Wang, H. Hu, *J. Org. Chem.* **72** (2015) 5870-5873.
7. A. V. Demchenko, *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*, Wiley-VCH, Weinheim, 2008., str. 1-93.
8. K. Toshima, *Carbohydrate Research*, **327** (2000) 15-26.
9. G. C. Sati, J. L. Martin, Y. Xu, T. Malakar, P. M. Zimmerman, J. Montgomery, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 7235-7242.
10. P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition, United Kingdom, John Wiley & Sons, 2009., str. 242-260.
11. B. Caballero, P. Finglas, F. Toldrá, *Encyclopaedia of Food Science and Nutrition*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, 2003., str. 595-598.
12. K. Hostettmann, A. Marston, *Saponins*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
13. P. Wang, *Vaccines*, **9** (2021) 222.
14. R. Brunner, E. Jensen-Jarolim, I. Pali-Scholl, *Immunol. Lett.* **128** (2010) 29-35.
15. A. Di Pasquale, S. Preiss, F. Tavares Da Silva, *Vaccines*, **3** (2015) 320-343.
16. G. Del Giudice, R. Rappuoli, A. M. Didierlaurent, *Semin. Immunol.* **39** (2018) 14.-21.
17. A. Fernandez-Tejada, D. S. Tan, D. Y. Gin, *Acc. Chem. Res.* **49** (2016) 1741-1756.
18. Đ. Škalamera, H. Kim, P. Zhang, S. M. Michalek, P. Wang, *J. Org. Chem.* **85** (2020) 15837-15848.
19. R. Fuentes, A. Ruiz-de-Angulo, N. Sacristán, C. Daniel Navo, G. Jiménez-Osés, J. Anguita, A. Fernández-Tejada, *Chem. Eur. J.* **27** (2021) 4731-4737.
20. A. I. Vogel, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edition, Pearson, 1996.
21. H. Yang, P. Wang, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 1858-1863.

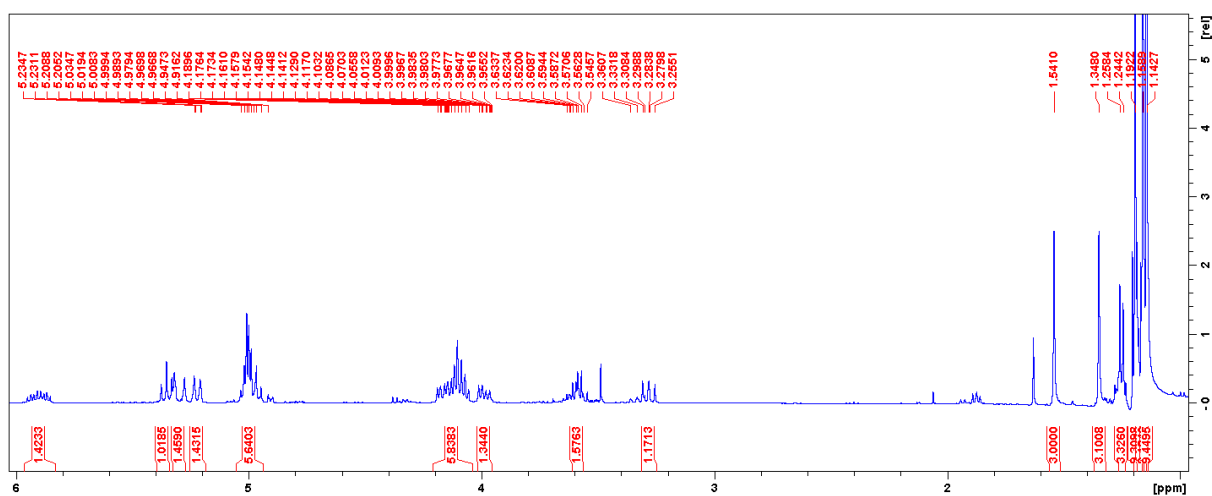
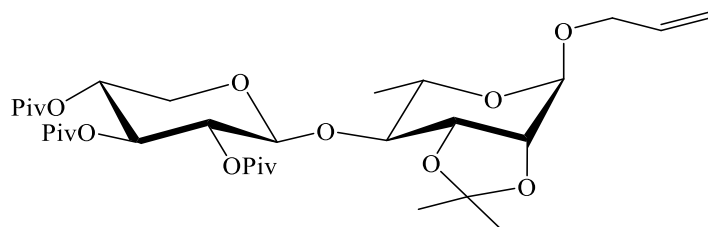
22. P. Wang, Q. Dai, P. Thogaripally, P. Zhang, S. M. Michalek, *J. Org. Chem.* **78** (2013) 11525-11534.
23. M. Michalik, M. Hein, M. Frank, *Carbohydr. Res.* **327** (2000) 185-218.
24. P. Wang, Đ. Škalamera, X. Sui, P. Zhang, S. M. Michalek, *ACS Infect. Dis.* **5** (2019) 974-981.
25. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, 2010., str. 3123-3127.

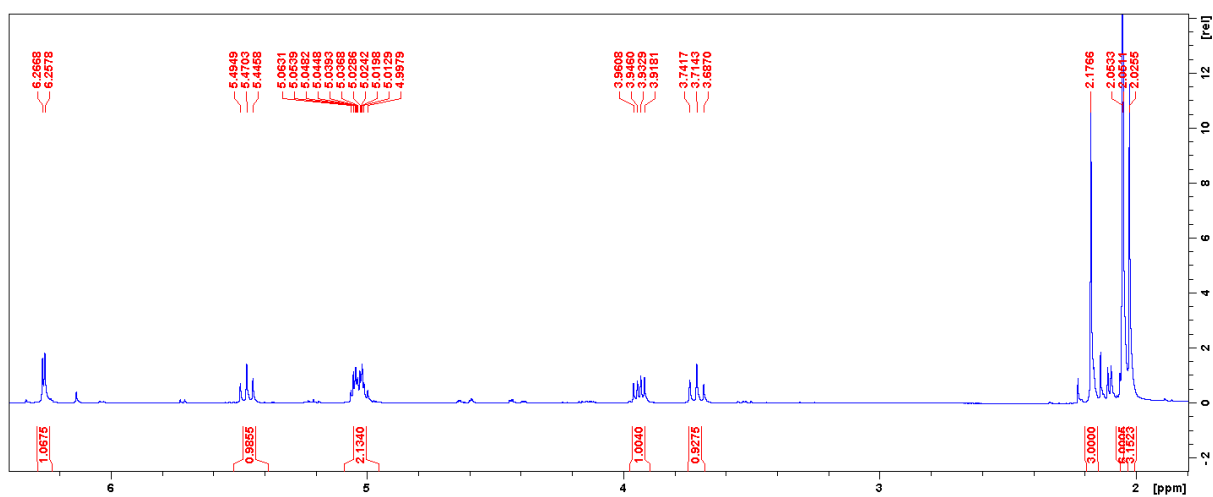
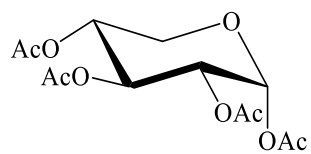
§ 8. DODATAK

Dodatak 1. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja 2

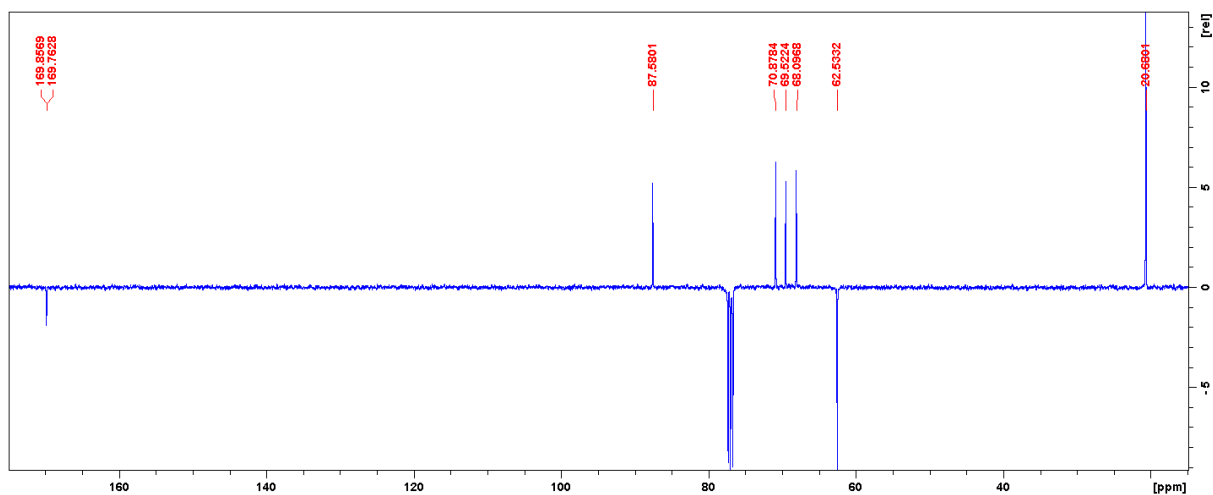
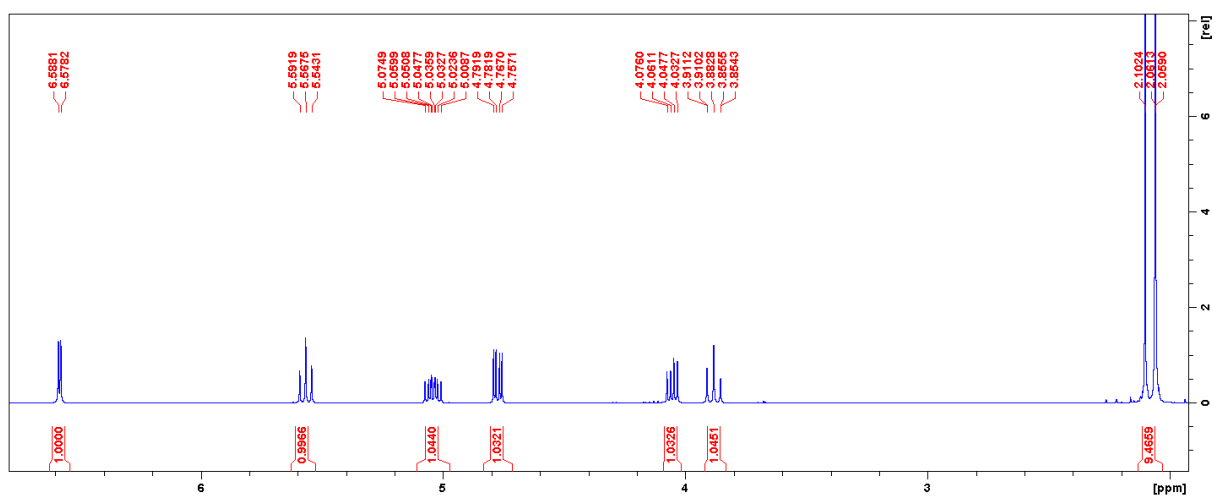
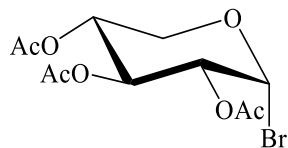


Dodatak 2. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja **5**

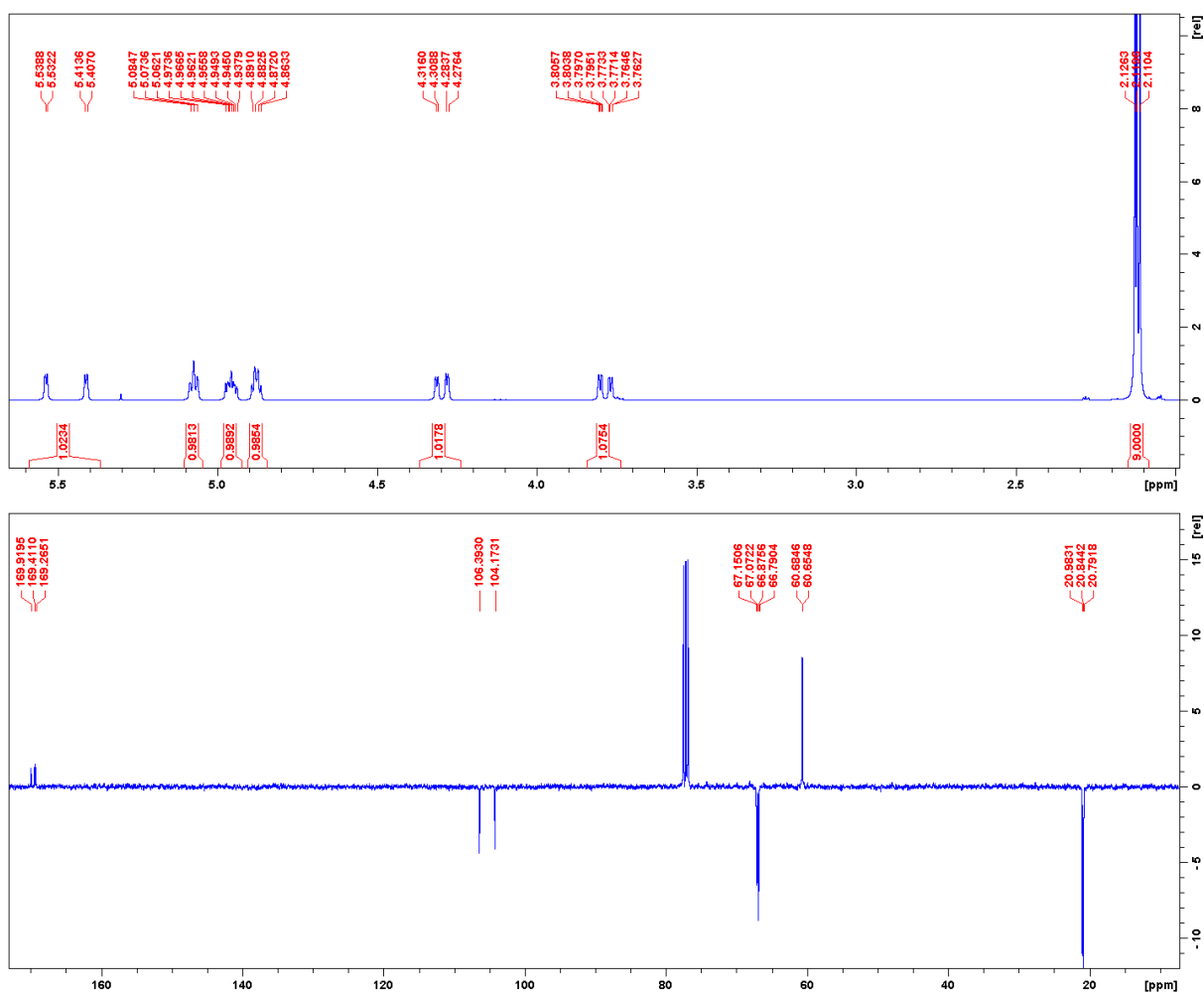
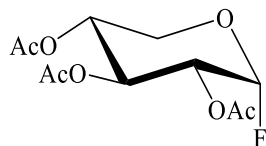
Dodatak 3. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja **6**

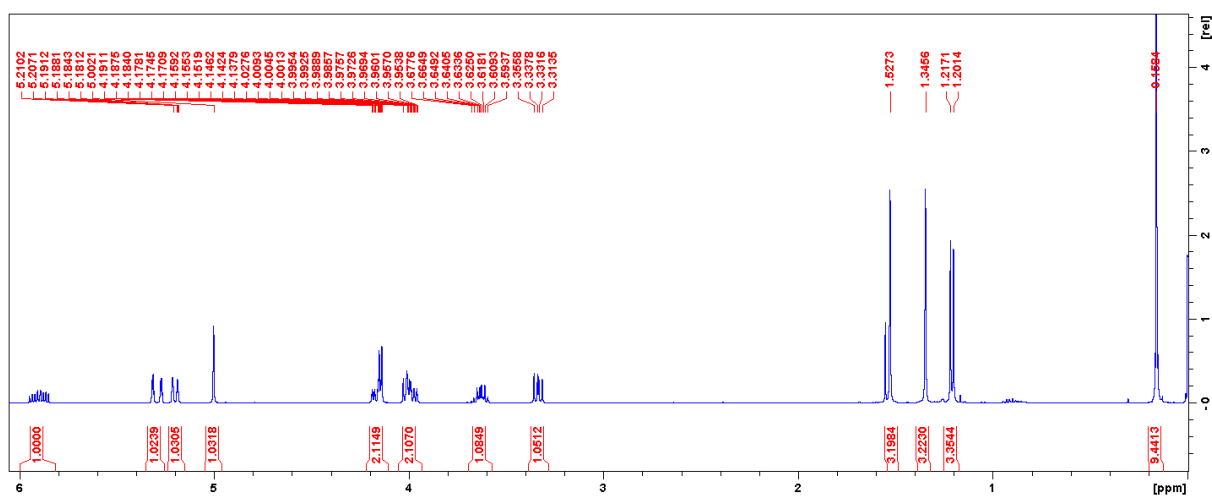
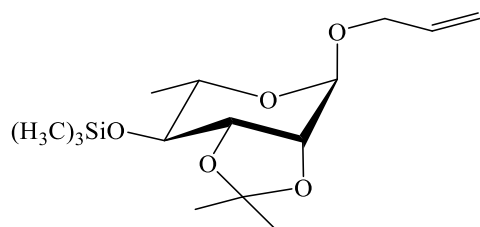
Dodatak 4. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja **7**

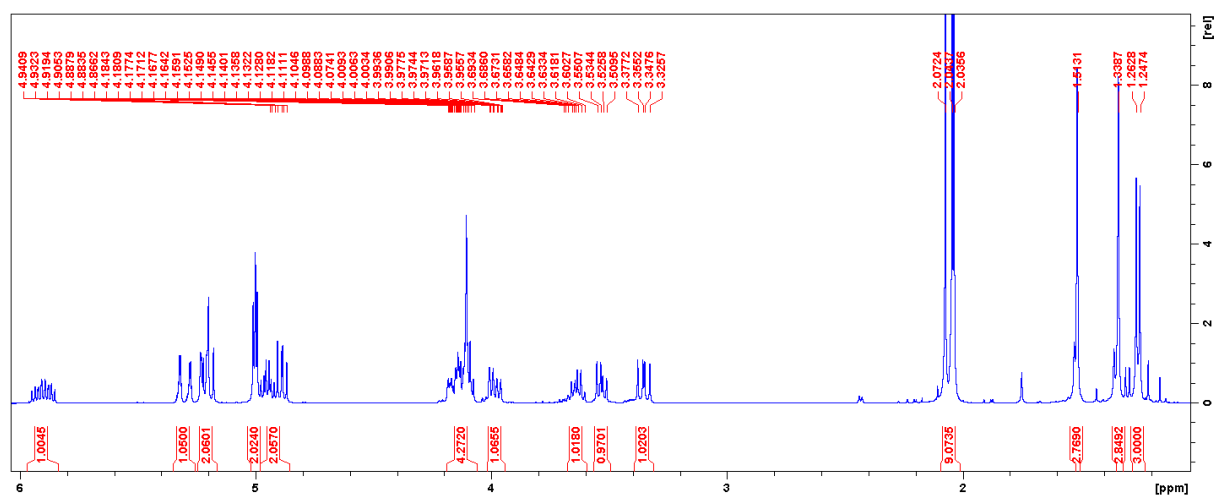
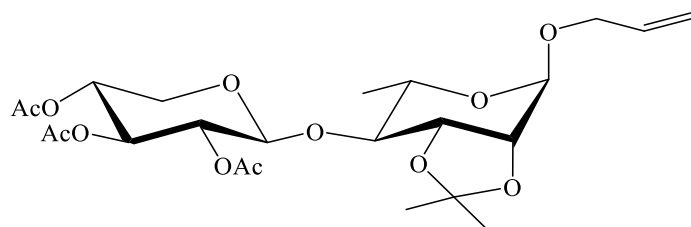
Dodatak 5. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **8**

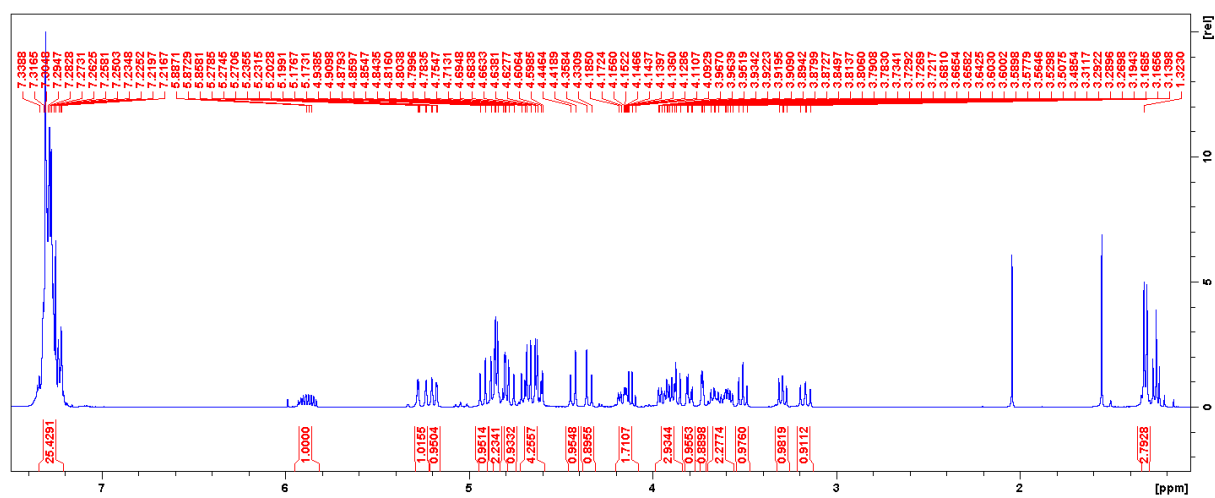
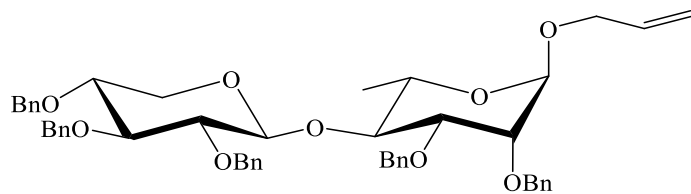


Dodatak 6. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **9**

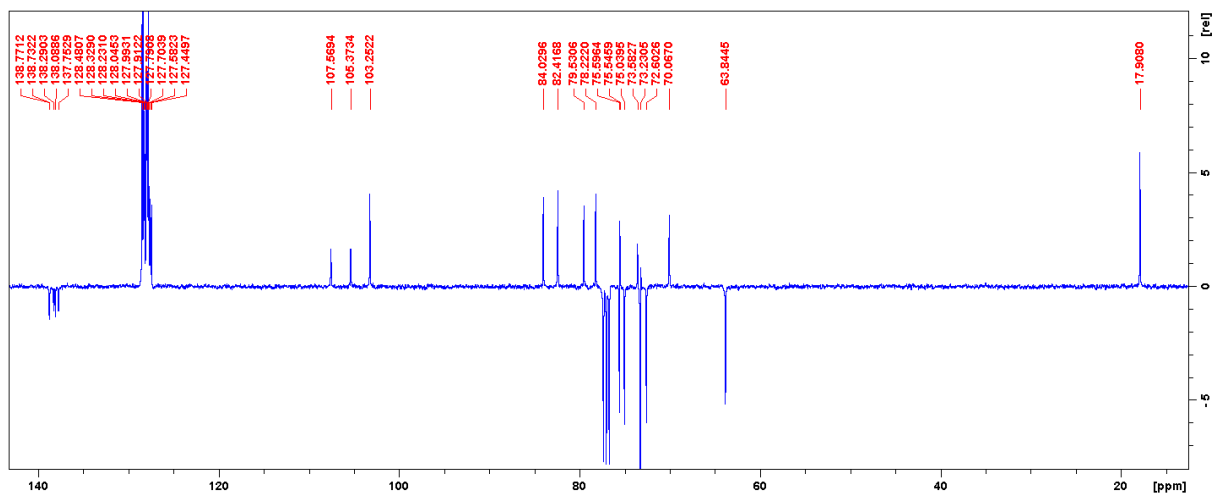
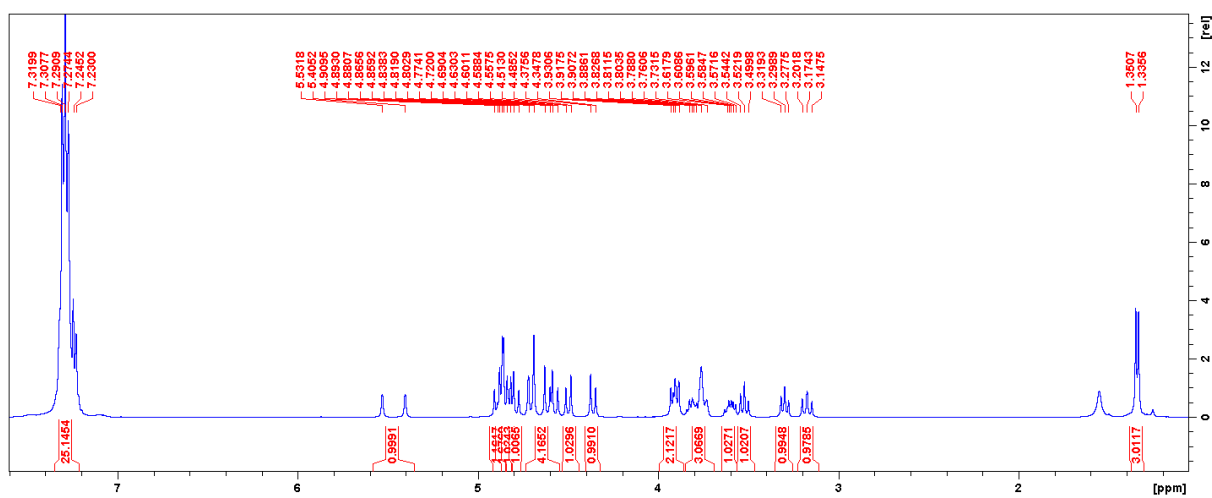
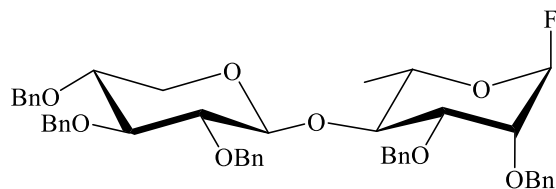


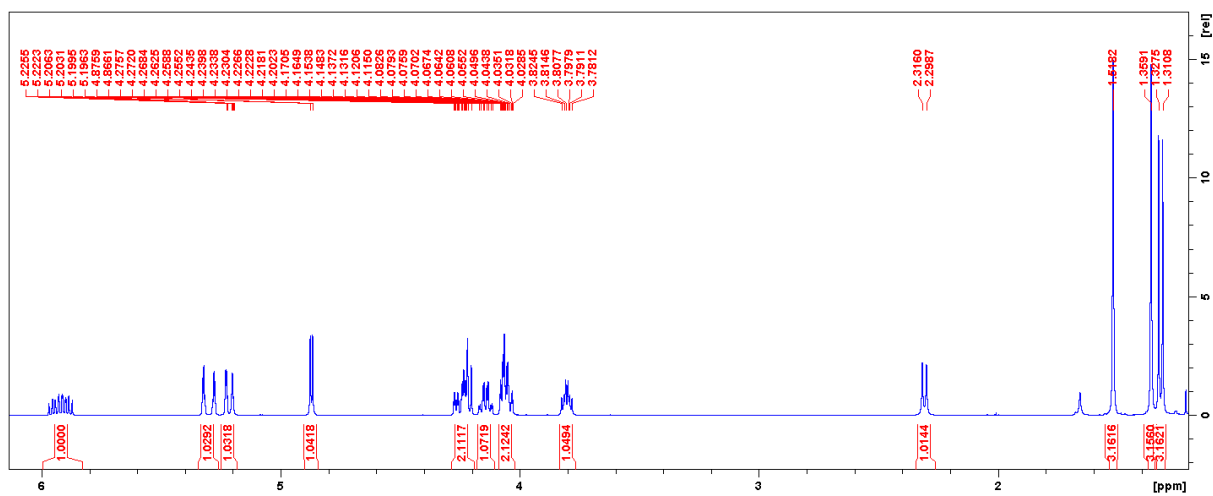
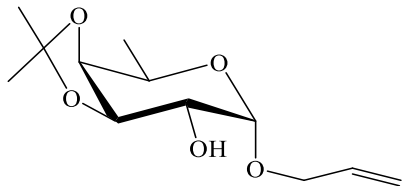
Dodatak 7. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja **10**

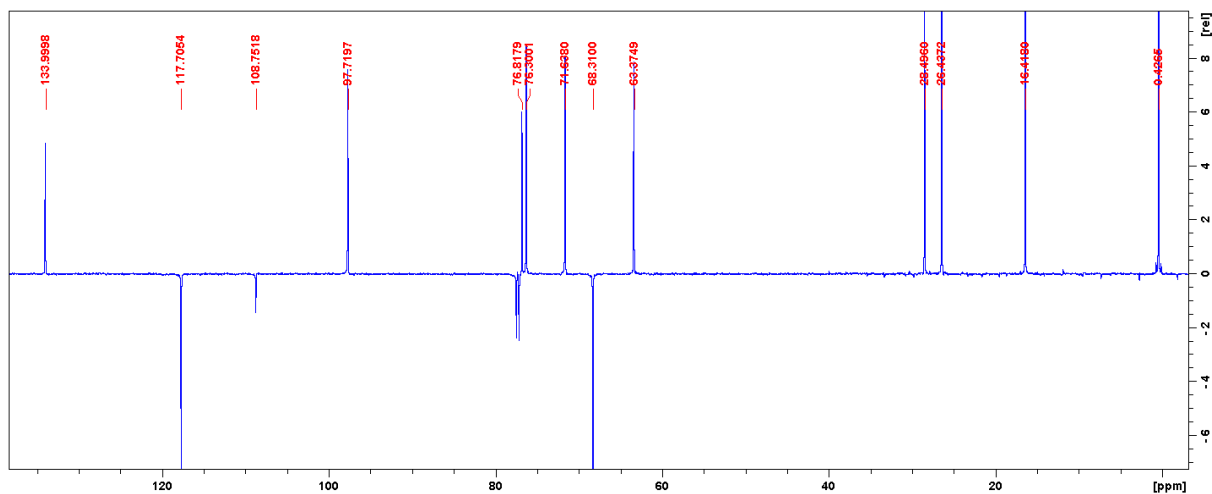
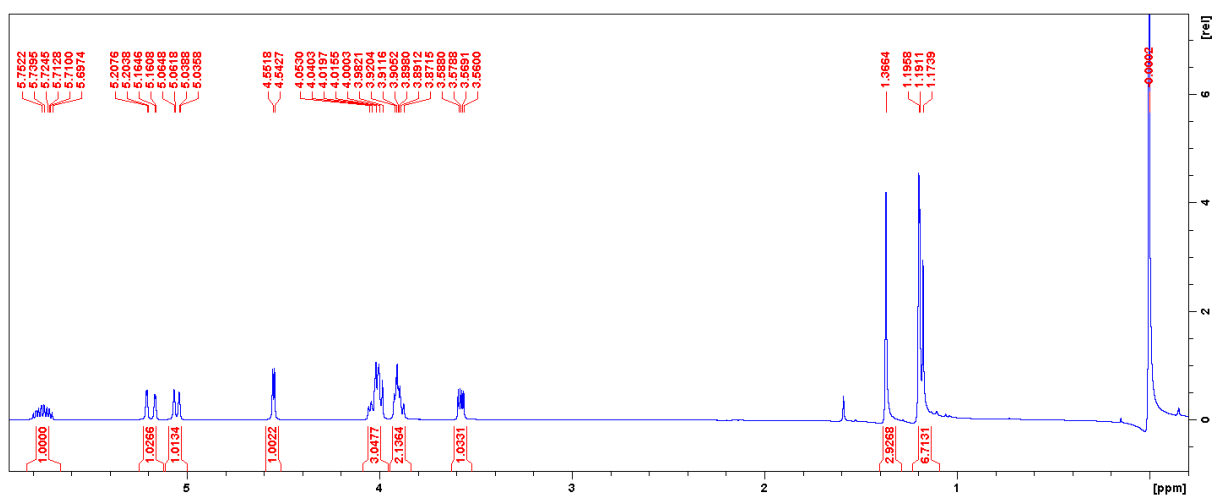
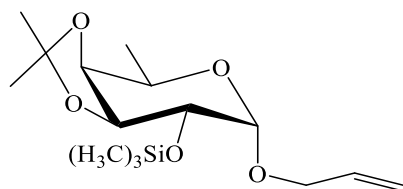
Dodatak 8. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja **11**

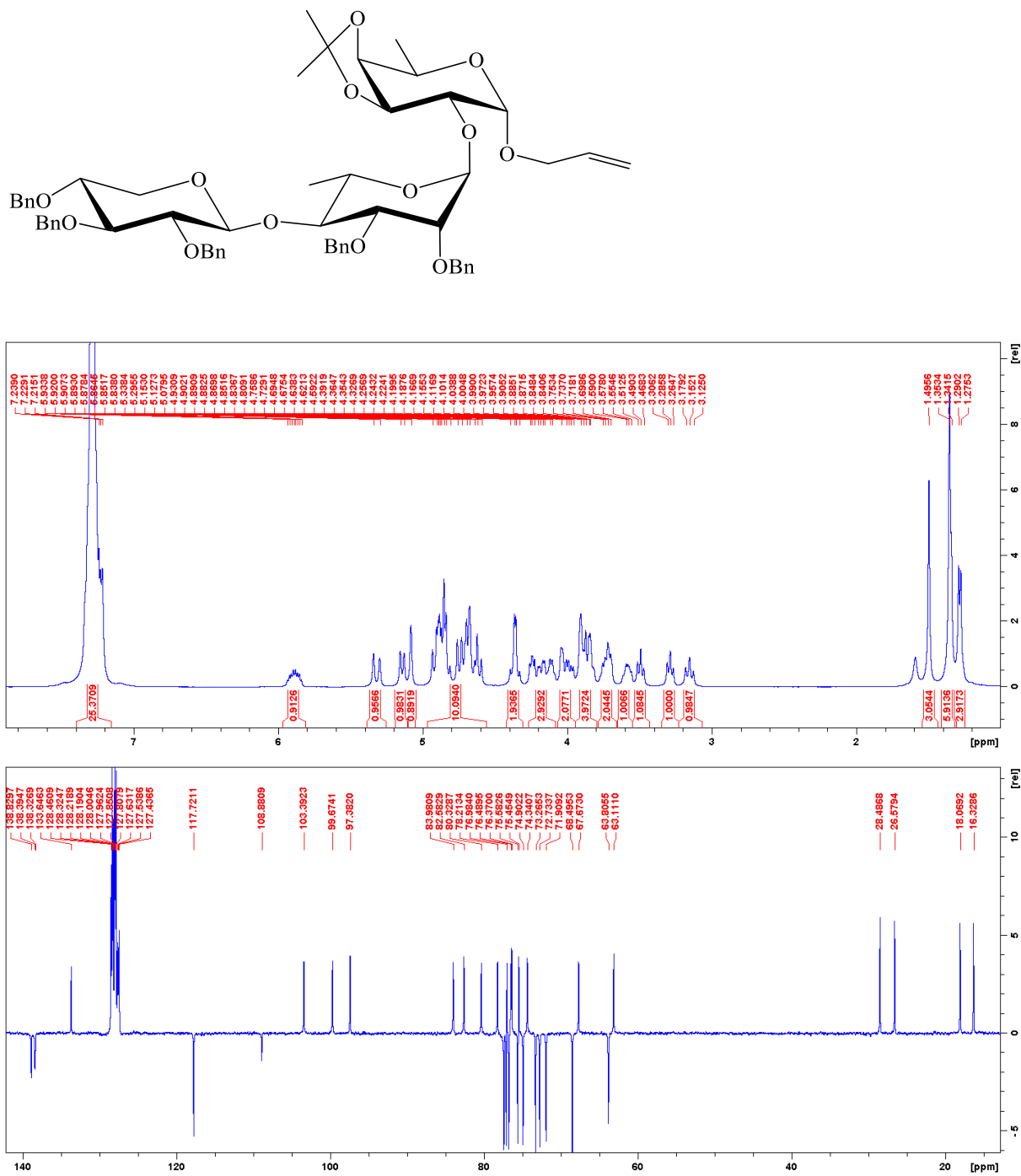
Dodatak 9. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) NMR spoja 13

Dodatak 10. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **15**



Dodatak 11. ^1H (CDCl₃, 400 MHz) NMR spoja **17**

Dodatak 12. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **18**

Dodatak 13. ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) i ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) NMR spoja **19**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ivana Tuković

Datum rođenja: 15. ožujka 1997.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2003.–2011. Osnovna škola Jure Kaštelan, Zagreb

2011.–2015. Prva gimnazija, Zagreb

2015.–2019. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

2019.– Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer, grane: analitička i organska kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016.–2019. Otvoreni dani kemije

2017. Znanstvene čarolije