

Glikozilacija upotrebom glikozil-fluorida kao donora i sililnih etera kao akceptora

Grdović, Filip

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:342566>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Filip Grdović

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**GLIKOZILACIJA UPOTREBOM
GLIKOZIL-FLUORIDA KAO DONORA I
SILILNIH ETERA KAO AKCEPTORA**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Zagreb, 2022.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

5. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Đani Škalamera

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Ugljikohidrati	2
2.1.1. Podjela i klasifikacija ugljikohidrata.....	4
2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije monosaharida.....	8
2.1.3. Reakcije hidroksilnih skupina	10
2.2. Glikozidi.....	13
2.2.1. Köenigs-Knorrova metoda glikozilacije	15
2.2.2. Trikloracetimidatna metoda glikolizacije	16
2.3. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-fluorida i sililnih etera.....	17
2.3.1. Priprava prekursora	20
2.3.2. One-pot pristup	21
2.3.3. Stereokemija sinteze O-glikozida	25
2.3.4. Povijesni pregled uporabe glikozil-fluorida kao donora glikozila	29
2.4. Zaključak.....	30
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXXI

§ Sažetak

Oligosaharidi i glikokonjugati igraju važnu ulogu u različitim biološkim procesima, uključujući virusne i bakterijske infekcije, rast i razvoj stanica, komunikaciju između stanica, kao i imunološki odgovor. Kako bi se mogli istraživati njihovi mehanizmi djelovanja i interakcije s drugim molekulama, potrebno ih je laboratorijski pripraviti, jer se u prirodi često nalaze u malim koncentracijama i u obliku teško odvojivih smjesa. Dosadašnje metode glikozilacije, odnosno sinteze glikozidne veze među monosaharidnim jedinicama, imaju određenih nedostataka te postoji još dosta mjesta za napredak. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-florida i sililnih akceptora mogla bi dovesti do revolucije u kemiji ugljikohidrata. Koristi prekursore koji se jednostavno sintetiziraju i relativno su stabilni, a sama reakcija nije osjetljiva na vlagu iz zraka, te ne zahtijeva suha otapala, kao tipične reakcije glikozilacije upotrebom drugih pristupa. Ova metoda otvara i mogućnost takozvane *one-pot* sinteze, koja pojednostavljuje cijeli proces.

§ 1. UVOD

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća brojna su istraživanja posvećena razvoju novih metoda glikozilacije, no unatoč napretku, učinkovit način sinteze složenih ugljikohidrata i dalje predstavlja izazov.⁸ Ugljikohidrati sadrže nekoliko vrsta funkcijskih skupina koje podliježu raznim reakcijama. Kako bi se postigla selektivnost, one se moraju međusobno razlikovati u reaktivnosti. Tako, na primjer, hidroksilne skupine za koje ne želimo da sudjeluju u reakciji, potrebno je zaštititi, tj. prevesti u neku vrstu etera, estera ili acetala, dok nezaštićena skupina ulazi u željenu reakciju. Osim kemoselektivnosti reakcije, problem se krije i u stereoselektivnosti. Anomerni ugljikov atom može postojati u α - ili β -konfiguraciji. Sintezom glikozidne veze, često se dobije smjesa anomera koji se kao takvi ne mogu koristiti u biološkim istraživanjima, već se moraju pročistiti, što dodatno komplicira sam postupak. Metoda glikozilacije korištenjem glikozil-fluorida kao donora i sililnih etera kao akceptora, koja je predstavljena u nastavku, nadilazi mnoge probleme sinteze glikozida. Metoda omogućava regio- i stereoselektivnu sintezu glikozida koja rezultira zadovoljavajućim prinosima. Prekursori za ovu metodu mogu se dizajnirati na način da su kompatibilni za *one-pot* sintezu, koja i sama ima svoje prednosti u ekonomičnosti, kako vremenskoj, tako financijskoj i ekološkoj.

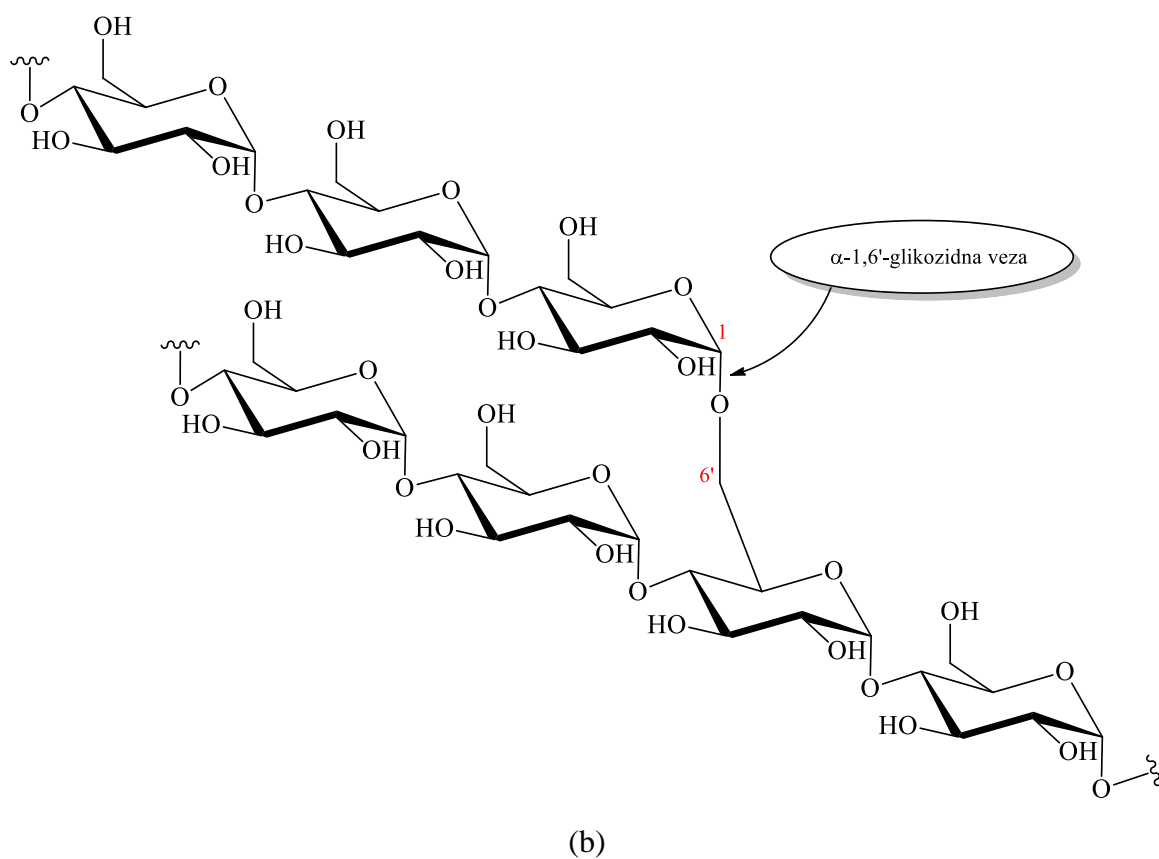
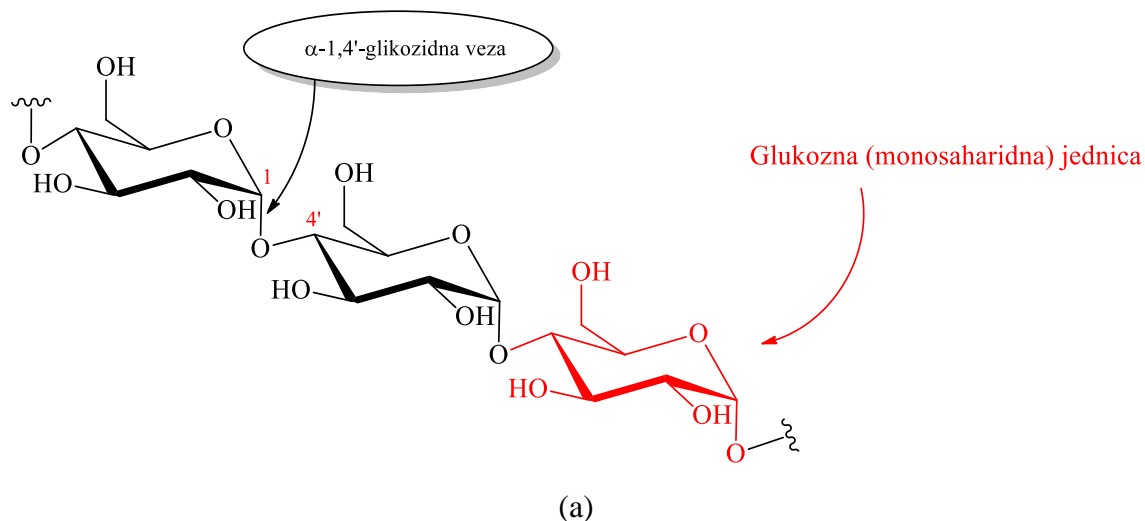
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati spadaju u skupinu bioloških molekula te su najrašireniji organski spojevi u prirodi. Jedna su od četiri glavnih vrsta biomolekula uz proteine, nukleinske kiseline i lipide.¹ Iako su građeni samo od atoma ugljika, kisika i vodika, mogu tvoriti razgranate strukture velikih molekulskih masa. Nekada se smatralo da su šećeri građeni od ugljičnog kostura na koje su vezane molekule vode te su po tome dobili ime ugljikohidrati (hidrati ugljika). Tome ide u prilog njihova empirijska formula koja za većinu šećera glasi $C_n(H_2O)_m$. Danas se zna da se ne radi o hidratima ugljika, već o polihidroksialdehidima, polihidroksiketonima ili vrstama koje u njih lako hidroliziraju.²

Najmanja jedinica ugljikohidrata naziva se monosaharid ili jednostavni šećer. Oni se međusobno povezuju na različite načine tvoreći iznimno velik broj struktura koje se mogu pronaći u prirodi. Zbog svoje kompleksnosti vezanja kojoj potpomaže ostvarivanje intramolekulskih i intermolekulskih vodikovih veza, imaju građevnu ulogu, prvenstveno u autotrofnim organizmima u kojima izgrađuju strukture staničnih stijenki. Daleko najraširenija uloga im je skladištenje energije koja se oslobađa njihovom oksidacijom do ugljikova(IV) oksida i vode. Građevni su elementi okosnice deoksiribonukleinske kiseline (DNA) i ribonukleinske kiseline (RNA) koje imaju ulogu prijenosu genetske informacije.¹

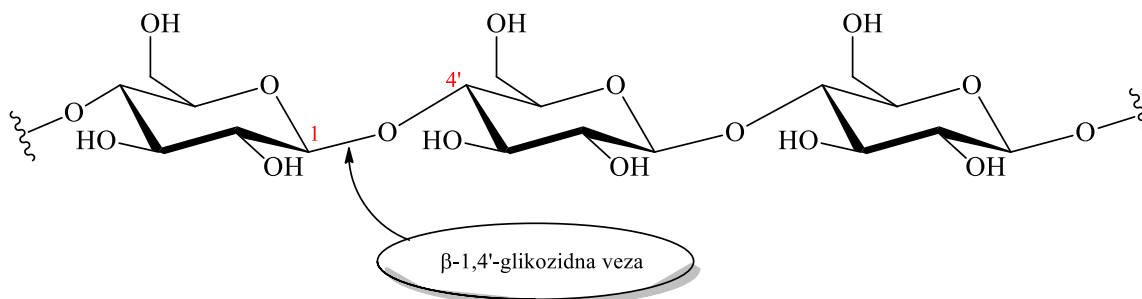
U biljkama ugljikohidrati nastaju nizom reakcija koje uz pomoć sunčevog svjetla fiksiraju ugljikov dioksid te ga prevode u glukozu i molekulski kisik koji potom otpuštaju. Taj proces se naziva fotosinteza. Sintetizirane molekule glukoze se međusobno povezuju u škrob ili celulozu. Škrob ima ulogu skladištenja energije u biljkama. Sastoji se od dvije vrste glukoznih polimera – amiloze i amilopektina. Amiloza je linearni polimer glukoze koji sadrži α -1,4-glikozidne veze, a amilopektin, razgranati polimer sadrži α -1,4- i α -1,6-glikozidne veze (slika 1).¹



Slika 1. Povezivanje glukopiranoznih jedinica u (a) amilozi, (b) amilopektinu.

Celuloza, s druge strane, ima građevnu ulogu, a smatra se i jednom od najrasprostranjenijih tvari u prirodi. Sintetizira se kao gradivni element biljke u obliku dugačkih molekula mikrofibrila. Polimer je D-glukoze čije su jedinice povezane β -1,4-glikozidnim vezama (slika

2). β -Konfiguracija glukoze omogućuje sintezu vrlo dugih i ravnih lanaca. Lanci se međusobno još povezuju i vodikovim vezama što doprinosi rigidnosti strukture.^{1,2}



Slika 2. Povezivanje glukopiranoznih jedinica u celulozi.

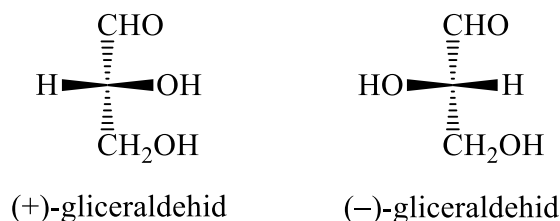
Za razliku od biljaka, kod životinja se energija skladišti povezivanjem glukoze u glikogen koji je analog škroba po strukturi i ulozi. Monosaharidne jedinice se međusobno povezuju α -1,4- i α -1,6-glikozidnim vezama i pospremaju u mišiće i jetru. U potrebi za energijom, tijelo hidrolizira glikozidne veze glikogena i otpušta glukozu u stanice gdje ulazi u procese oksidacije i sinteze energetske valute stanice, ATP-a.^{1,2}

2.1.1. Podjela i klasifikacija ugljikohidrata

Unatoč naizgled jednostavnoj strukturi, ugljikohidrati se klasificiraju na razne načine. Kao što je rečeno ranije, najmanje podjedinice svih ugljikohidrata su monosaharidi. Oni su najjednostavniji šećeri koji ne mogu hidrolizirati u manje jedinice. U tu kategoriju, između ostalih, spadaju glukoza i fruktoza. Kondenzacijom dvije monosaharidne jedinice nastaju disaharidi, a kondenzacijom tri jedinice, trisaharidi. Zajednički naziv za ugljikohidrate koji sadrže dvije do deset podjedinica je olihosaharid, a sve veće strukture nazivaju se polisaharidi.

Ostale podjele ugljikohidrata generalno se odnose na građu najmanjih, monosaharidnih jedinica. Oni u svojoj lančastoj formi mogu sadržavati aldehidnu skupinu pa se nazivaju aldoze ili pak keto-skupinu pa se nazivaju ketoze. U skupinu aldoza, primjerice spadaju glukoza, riboza i galaktoza, a daleko najpoznatija ketoza je fruktoza. Monosaharidi se klasificiraju se i prema broju ugljikovih atoma. Tako se primjerice monosaharidi s pet ugljikova atoma nazivaju pentoze, a sa šest heksoze. Klasifikacija na D- i L-šećere jedna je od najstarijih stereokemijskih notacija. Primijećeno je da odgradnja bilo kojeg prirodnog šećera uvijek daje desnozакрећујуći (+)-enantiomer gliceraldehida, dok neki sintetički pripremljeni daju lijevozакрећујуći (-)-

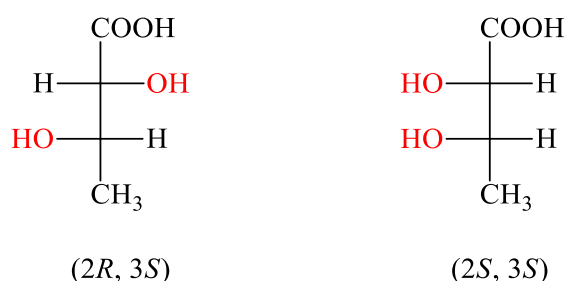
enantiomer. Stoga, prema *Fischer-Rozanovljevu pravilu* se stereokemijskim deskriptom D označuju šećeri koji se odgrađuju u (+)-gliceraldehid, a L oni koji odgradnjom daju (-)-gliceraldehid (slika 3).²



Slika 3. Fisherova projekcija D-gliceraldehida (lijevo) i L-gliceraldehida (desno).

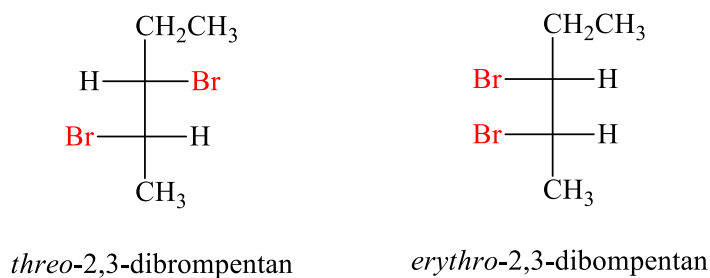
Produkt odgradnje određuje se na osnovi stereokemije referentnog ugljikovog atoma, odnosno asimetričnog C-atoma koji ima najviši lokant (najudaljeniji karbonilnoj skupini). Hidroksilna skupina (+)-gliceraldehida usmjerena je u Fisherovoj projekciji udesno pa će u svim šećerima D-niza hidroksilna skupina biti usmjerena na jednak način. Suprotno, u šećerima L-niza hidroksilna skupina zadnjeg asimetričnog ugljikovog atoma usmjerena je ulijevo.² Treba napomenuti da D i L oznake ne daju podatak o smjeru zakretaja ravnine polarizirane svjetlosti. Neki D-šećeri optički zakreću u (+), a drugi (-) smjeru.

Prema Fisherovoj projekciji eritroze (aldotetroze), obje hidroksilne skupine vezane na asimetrično supstituirane ugljikove atome jednako su usmjerene, dok su u treози te skupine usmjerene na različite strane.² Korištenjem početnih dijelova imena tih monosaharida, određuje se odnos dvaju susjednih asimetrično supstituiranih ugljikovih atoma. Prefiksom *erythro-* označuje se dijaseteroizomer u čijoj se Fisherovoj projekciji jednake skupine nalaze na istoj strani molekule, a prefiksom *threo-* se označavaju slične skupine koje su na različitim stranama Fisherove projekcije (slika 4).²



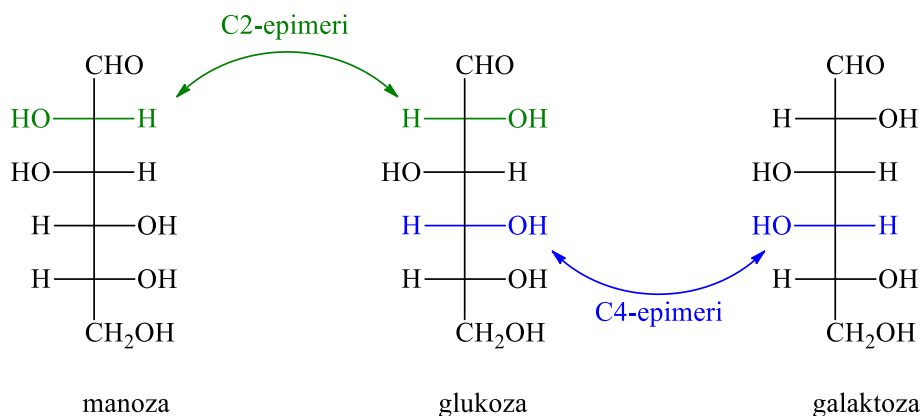
Slika 4. Fisherova projekcijska formula *threo*-2,3-dihidroksibutanske kiseline (lijevo) i *erythro*-2,3-dihidroksibutanske kiseline (desno).

Općenito, prefiksi *erythro*- i *threo*- koriste se za molekule koje imaju različite krajnje skupine, dok se za označavanje stereokemije molekula sa jednakim skupinama koriste oznake (*d,l*) ili (\pm) odnosno *meso*- (slika 5).² *Meso*-spojevi se definiraju kao spojevi koji imaju kiralne centre, ali su akiralni zbog prisustva ravnine simetrije ili nekog drugog elementa simetrije.



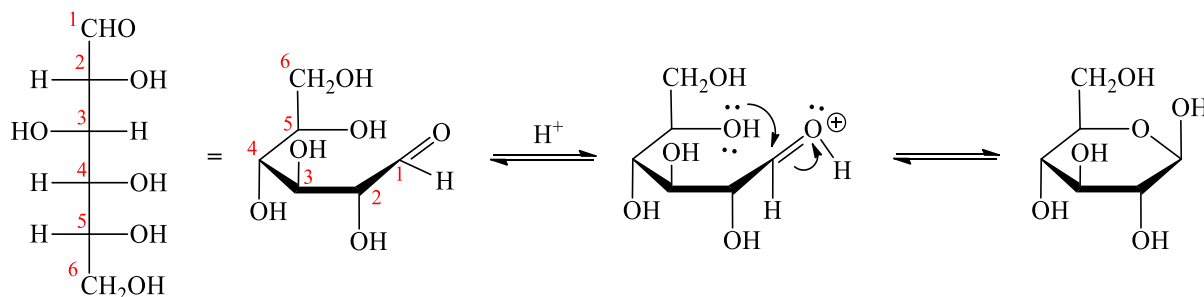
Slika 5. Fisherove projekcijske formule 2,3-dibrompentana.

Mnogi monosaharidi se razlikuju prema konfiguraciji samo jednog ugljikovog atoma. Primjerice, D-eritroza i D-treozna se razlikuju samo prema konfiguraciji C2 atoma. Takvi šećeri, koji se razlikuju samo po konfiguraciji jednog C-atoma, nazivaju se epimeri. D-Manoza je C2-epimer glukoze, a ona je pak C4-epimer D-galaktoze (slika 6).



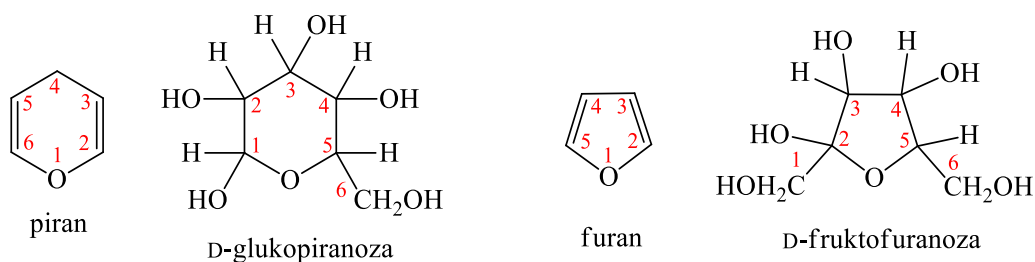
Slika 6. Epimeri D-glukoze: D-manoza i D-galaktoza.

Monosaharidi se u otopinama ne nalaze samo u lančastom obliku, već se takav oblik nalazi u ravnoteži sa onim cikličkim, poluacetalnim. Šećeri su, kao polihidroksialdehidi i polihidroksiketoni, podložni intramolekularnoj reakciji nukleofilne adicije alkohola na karbonilnu skupinu (slika 7) koja rezultira nastankom peteročlanih i šesteročlanih prstena koji su stabilniji od svojih lančastih analoga.²



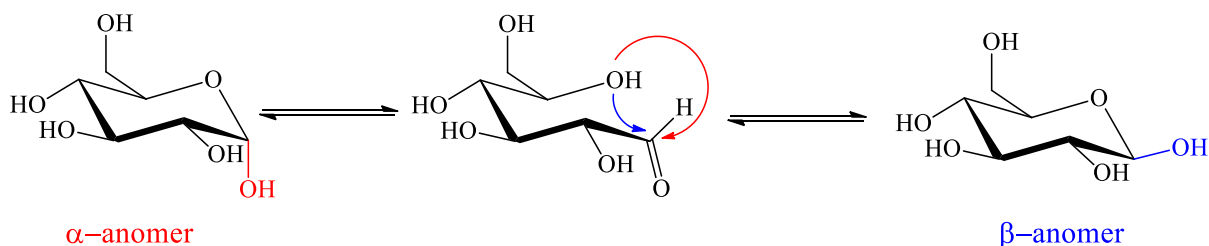
Slika 7. Tvorba poluacetalnog prstena D-glukoze iz njenog lančastog oblika.

Prema veličini poluacetalnog prstena monosaharidi se mogu podijeliti na piranoze i furanoze. Šesteročlani ciklički poluacetali čije je ime izvedeno iz šesteročlanog cikličkog etera pirana nazivaju se piranoze, a peteročlani ciklički poluacetali odgovarajućeg cikličkog etera furana nazivaju se furanoze (slika 8). Primjerice, šesteročlani prsten izveden iz glukoze naziva se glukopiranoza, dok se fruktozni peteročlani prsten naziva fruktofuranaza.²



Slika 8. Cikličke, poluacetalne strukture monosaharida.

Prilikom ciklizacije monosaharidnog prstena moguć je nastanak dva različita diastereomera. Nastali diastereomeri se nazivaju anomeri i označavaju se grčkim slovima α i β . Ovisno o tome s koje strane se odvija nukleofilni napad na planarnu karbonilnu skupinu, poluacetalna hidroksilna skupina u cikličkoj formuli biti će usmjerena ili prema gore (β) ili dolje (α) (slika 9), odnosno njezina konfiguracija u odnosu na referentni ugljikov atom biti će ista (β) ili različita (α). Anomerni ugljikov atom je onaj na kojem se nalazi aldehidna ili ketonska skupina u otvorenoj formi ugljikohidrata, a na njega vezana hidroksilna skupina naziva se anomernom hidroksilnom skupinom.



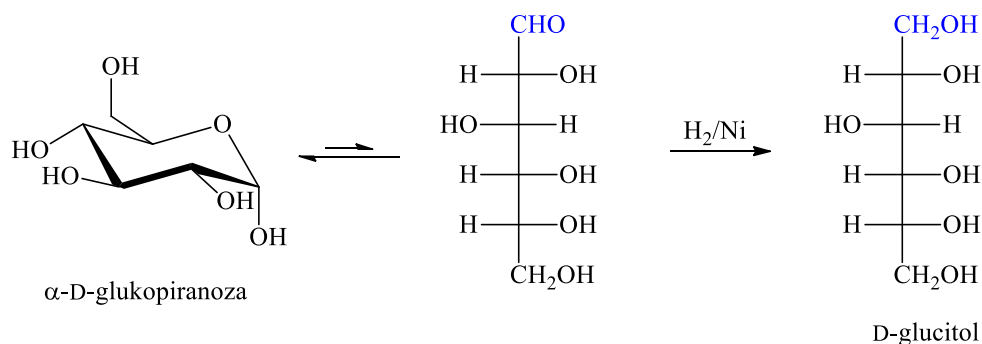
Slika 9. Ravnoteža između otvorenog i zatvorenih oblika (anomera) D-glukoze.

Budući da su anomeri diastereomeri, njihova se fizikalna svojstva, poput tališta i specifičnog zakretanja, razlikuju.²

2.1.2. Reakcije oksidacije i redukcije monosaharida

Prema svojoj strukturi, ugljikohidrati su polifunkcijski spojevi. Sadrže aldehidnu odnosno keto-skupinu te hidroksilnu skupinu i podliježu karakterističnim reakcijama za svaku od njih. Većina šećera postoji u obliku cikličkih poluacetalata, koji su u otopini u ravnoteži s odgovarajućim lančastim aldehydima ili ketonima što otvara mogućnost karakterističnim reakcijama svojstvenim za te skupine.

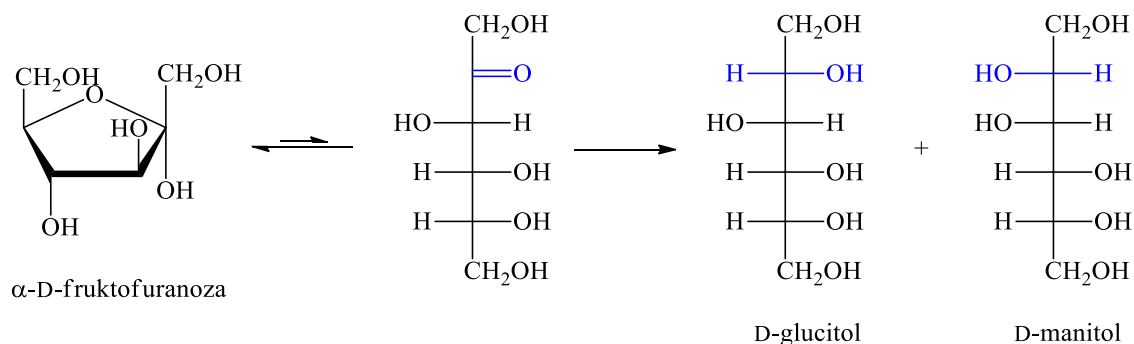
Poput aldehida i ketona, koji se mogu reducirati u odgovarajuće alkohole, aldoze i ketoze mogu se reducirati u odgovarajuće alditole ili šećerne alkohole. Reakcije redukcije monosaharida provode se korištenjem natrijeva borhidrida kao reducensa ili hidrogeniranjem uz Raney-nikal kao katalizator (slika 10).² Polioli koji nastaju redukcijom šećera, u pravilu, na svakom ugljikovom atomu imaju vezanu po jednu hidroksilnu skupinu.



Slika 10. Redukcija D-glukoze hidrogeniranjem uz nikal kao katalizator.

Šećerni alkoholi svoju primjenu pronalaze u prehrambenoj industriji. Oni ne spadaju u skupinu šećera niti alkohola, već se klasificiraju kao skupina slabo probavljivih ugljikohidrata. Imaju blago smanjene slatkoću i kalorijske vrijednosti u odnosu na saharozu pa se koriste kao

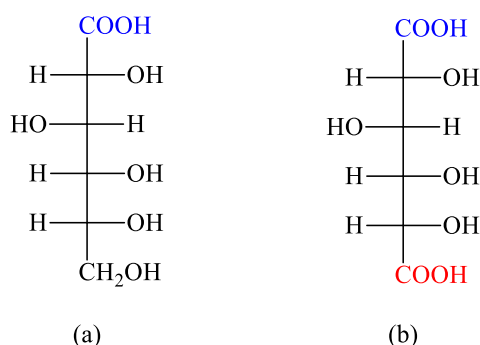
zaslađivači. Redukcijom D-glukoze nastaje alditol D-glucitol koji je poznat još i pod imenom D-sorbitol, a koristi se kao zamjena za kuhinjski šećer u pripravi kolača te kao sirovina za sintezu vitamina C.³ Redukcijom ketoza ne nastaje jedan produkt, već nastaje smjesa C2-epimera (slika 11).²



Slika 11. Redukcijom fruktoze natrijevim borhidridom nastaju C2-epimeri; D-glucitol i D-manitol.

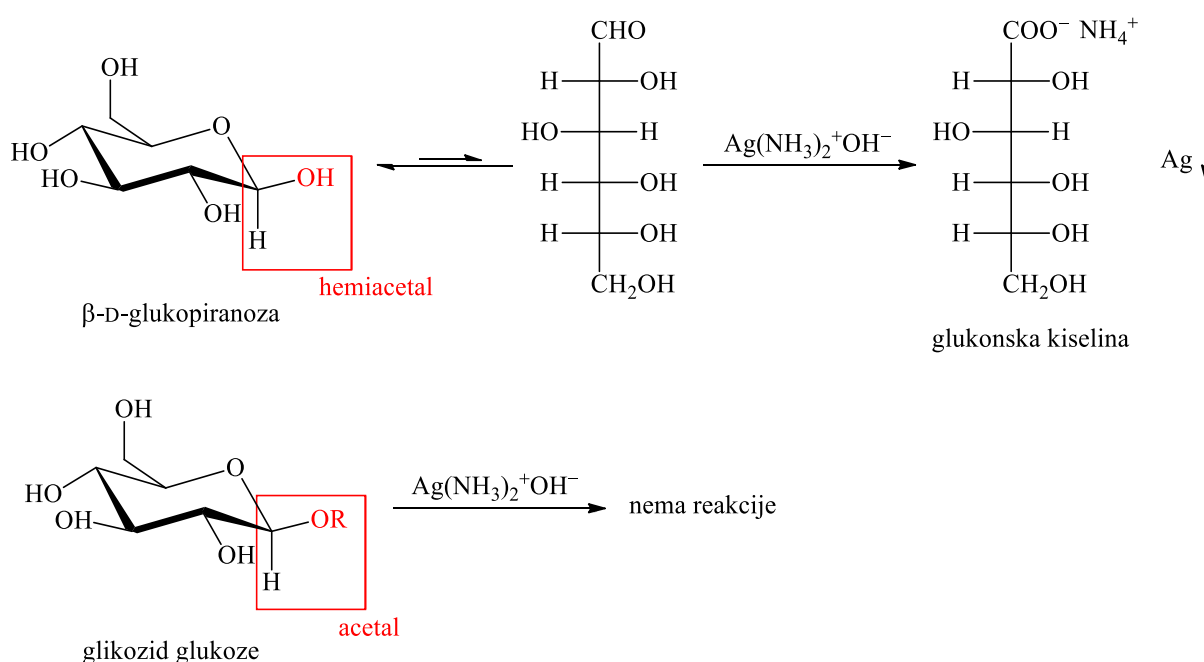
Osim dobivanja šećernih alkohola sintezom u laboratoriju, mogu se izolirati i iz prirodnog materijala. Nalaze se u raznom voću i bobicama, kao i u algama.^{2,3}

Aldehidne skupine šećera podliježu i reakcijama oksidacije do karboksilne skupine. Osim nje, nekim reagensima se selektivno može oksidirati i terminalna $-\text{CH}_2\text{OH}$ skupina. Oksidacija šećera služi prvenstveno kao oruđe za identifikaciju funkcijskih skupina, a potpomaže određivanju njihove stereokemije i pretvorbi jednog monosaharida u drugi. Kao reagens za sintezu aldonske kiseline koristi se bromna voda, a za sintezu aldarne kiseline, vodena otopina dušične kiseline (slika 12).²



Slika 12. Fisherova projekcijska formula (a) glukonske kiseline i (b) glukarne kiseline.

Tollensov, Benedictov i Fehlingov reagens neki su od standardno korištenih oksidirajućih reagensa za dokazivanje aldehydne skupine. Reakcija oksidacije aldehydne skupine u karboksilatni anion popraćena je stvaranjem taloga karakterističnog za svaki reagens. Za Tollensov test (slika 13) karakterističan je nastanak elementarnog srebra u obliku srebrnog zrcala, a redukcijom bakrova(II) iona Benedictovog i Fehlingovog reagensa, dolazi do pojave ciglasto-crvenog taloga bakrova(I) oksida.⁴ Ključ uspješnosti ovih testova je ravnoteža poluacetalne i lančaste strukture. Aldehydna skupina, kao takva, postoji samo u lančastom obliku što omogućuje reakciju oksidacije. Ukoliko je vezana u cikličkom, acetalnom obliku ne daje pozitivnu reakciju. Šećeri koji reduciraju ove reagense nazivaju se reducirajući šećeri.²



Slika 13. Reakcija poluacetalna glukoze (gore) i acetalna glukoze (dolje) s

Tollensovim reagensom.

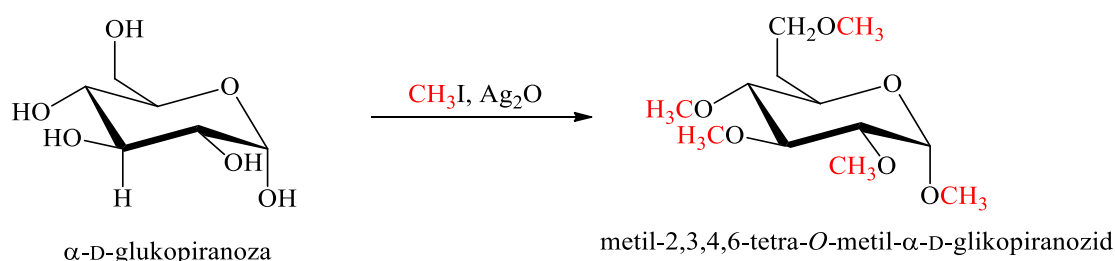
Valja napomenuti da se ovim testovima ne mogu razlikovati aldoze i ketoze jer se reakcije odvijaju u bazičnim uvjetima pri kojima dolazi do endiolnog pregrađivanja – lančasti oblik ketoze izomerizira u aldozu koja daje pozitivni test.²

2.1.3. Reakcije hidroksilnih skupina

Kao što je ranije rečeno, monosaharidi su po svojoj strukturi polihidroksialdehidi i polihidroksiketoni. Zbog prisustva nekoliko hidroksilnih skupina, vrlo su dobro topljivi u vodi, a gotovo netopljivi u organskim otapalima. Kako bi se mogli pročistiti prekrizacijom iz

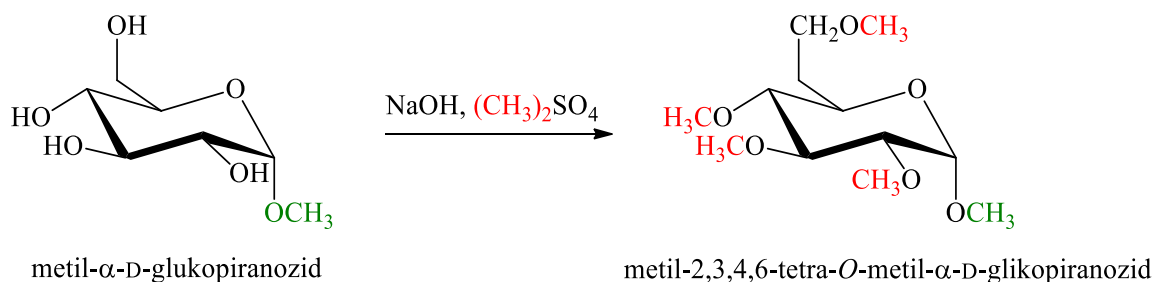
organskih otapala ili kromatografskim metodama, poseže se za reagensima koji hidroksilne skupine šećera prevode u etere ili estere.² Osim u svrhu pročišćavanja, reakcije hidroksilnih skupina mogu se koristiti kao alat u sintetskim reakcijama s monosaharidima. Kada kemijska sinteza zahtijeva selektivnu reakciju na određenoj hidroksilnoj skupini, ostale moraju privremeno biti blokirane.⁵ Zaštitna skupina mora zadovoljavati nekolicini zahtjeva. Ona mora selektivno reagirati sa supstratom u dobrom iskorištenju te se kasnije mora moći ukloniti jednostavnim postupkom i po mogućnosti netoksičnim reagensima koji neće napasti regeneriranu funkcijsku skupinu, također u dobrom iskorištenju.⁵ Najčešće se koriste acetalne, eterske i esterske zaštitne skupine. Prednosti esterskih skupina nad eterskim je lakše uvođenje i uklanjanje, dok su eterske skupine stabilnije i otpornije na širi spektar reakcijskih uvjeta.

Eteri su među najčešće korištenim zaštitnim skupinama u organskoj sintezi. Oni variraju od najjednostavnijeg, najstabilnijeg metil-etera do složenijih, supstituiranih tritil-etera razvijenih za upotrebu u sintezi nukleotida. Nastaju i uklanjaju se u raznim uvjetima.⁵ Djelovanjem metil-jodida uz srebrov(I) oksid na šećer, dolazi do pretvorbe hidroksilnih skupina u metilne etere (slika 14). Srebrov oksid ima ulogu sredstva koje potiče polarizaciju ugljik-jod veze, čineći metilni ugljik elektrofilnijim. Nukleofilnim napadom hidroksilne skupine uz kasnije deprotoniranje nastaje eter.²



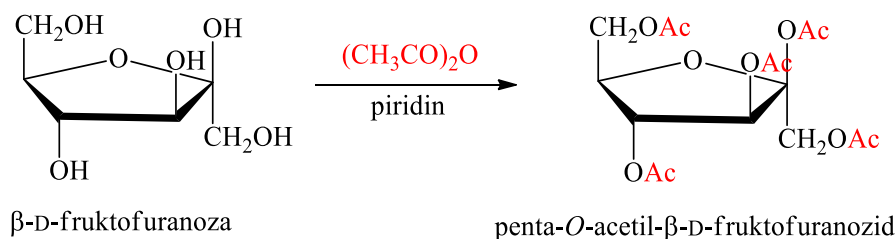
Slika 14. Tvorba metilnih etera

Hidroksilna skupina anomernog ugljikovog atoma također sudjeluje u reakciji. Stereokemija na anomernom položaju može se očuvati podešavanjem reakcijskih uvjeta pri kojima neće doći do pucanja poluacetalne veze ugljik-kisik.² Istim produktom rezultira i Williamsonova sinteza koja je uobičajeni postupak sinteze etera. Kao reagensi u ovoj reakciji koriste se natrijev hidroksid i dimetil-sulfat. Zbog nastanka jako bazičnog alkoksidnog iona jednostavni šećer izomerizira i raspada se tako da ova vrsta reakcije nije moguća sa poluacetalima. Ukoliko se poluacetal prethodno prevede u glikozid koji je stabilan u bazičnim uvjetima, ovaj se postupak može provesti na preostalim slobodnim hidroksilnim skupinama (slika 15).²



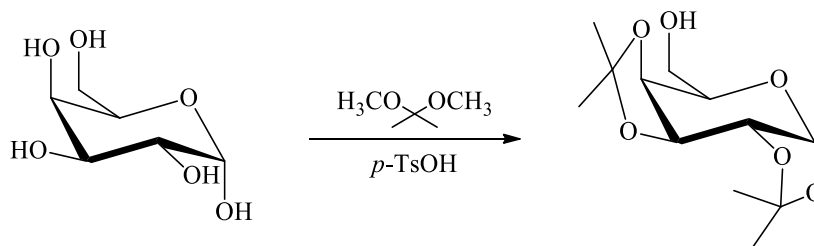
Slika 15. Tvorba metilnih etera Williamsonovom sintezom.

Reakcija acetiliranja hidroksilnih skupina rezultira sintezom šećernih estera. Jednostavno se pročišćavaju kristalizacijom iz uobičajenih organskih otapala. Reakcija se odvija korištenjem acetanhidrida uz piridin kao otapalo (slika 16). Piridin je slabo bazičan pa je stereokemija anomernog ugljikovog atoma očuvana jer ne dolazi do pucanja ugljik-kisik veze.² Analogno acetiliranju, hidroksilne skupine se može i benzoilirati korištenjem benzoil-klorida ili benzoil-anhidrida u piridinu. Navedene esterske zaštite se uklanjaju u bazičnom mediju uz dodatak metanola i natrijevog metoksida.⁵



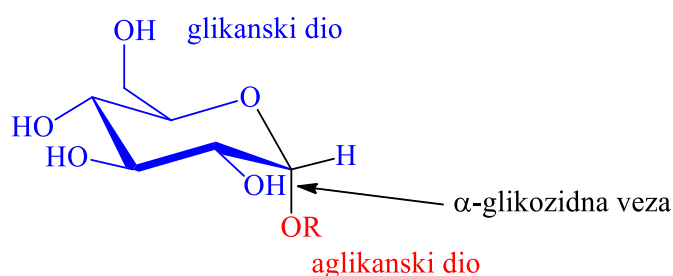
Slika 16. Tvorba acetatnih estera

Formiranje acetonida najčešće je korištena zaštita za 1,2- i 1,3-diole. Acetonid se koristi u kemiji ugljikohidrata za selektivno maskiranje hidroksilnih skupina mnogih šećera. U pripremi acetonida, 1,2-derivat je općenito favoriziran u odnosu na 1,3-derivat, dok 1,3-derivat ima prednost u odnosu na 1,4-derivat.^{5,6} Acetonidna (izopropilidenska) skupina uvodi se miješanjem šećera s acetonom ili 2,2-dimetoksiopropanom u velikom suvišku uz kiseli katalizator, najčešće *para*-toluensulfonsku kiselinu (slika 17). Uklanjanje ove zaštitne skupine vrši se kiselim hidrolizom pri povišenoj temperaturi.⁵

Slika 17. Uvođenje acetamidne zaštite na molekulu α -D-galaktopiranoze.

2.2. Glikozidi

Šećerni acetali nazivaju se glikozidi. Oni ne reagiraju s Tollenovim reagensom što znači da su nereducirajući šećeri.² To su spojevi koji na anomernom ugljikovom atomu nemaju slobodnu hidroksilnu skupinu, već se na njenom mjestu nalazi aglikon (slika 18). Šećerni acetali su stabilne vrste koje ne podliježu endiolnom pregrađivanju, što znači da ne mogu spontano preći u lančaste oblike te postoje u određenom anomernom obliku i ne mogu mutarotirati.²

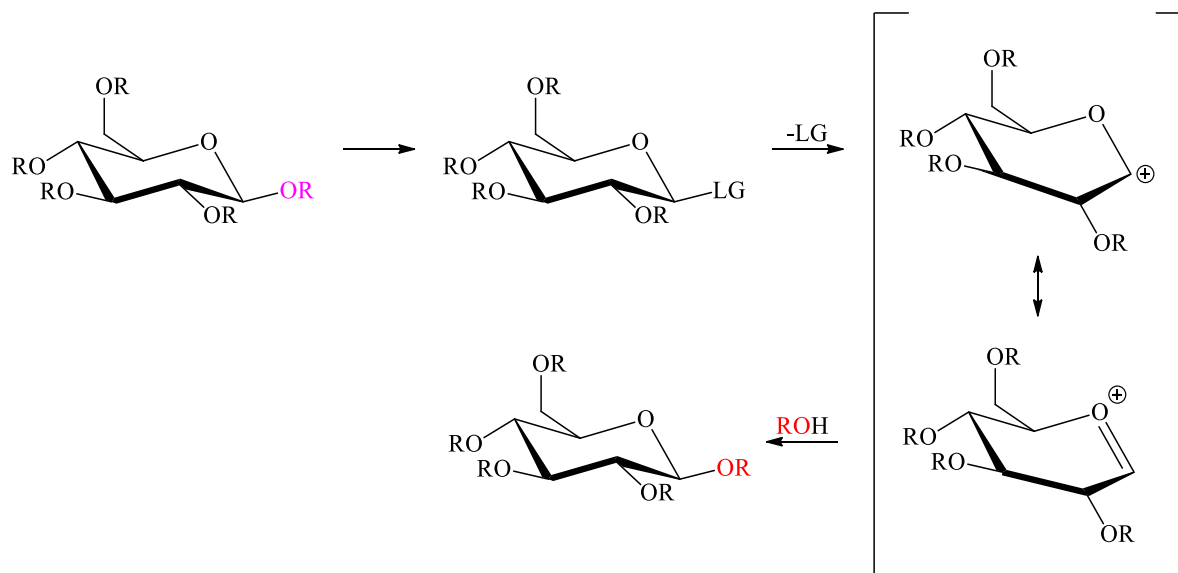


Slika 18. Strukturna formula glikozida D-glukoze.

Aglikon je skupina vezana na anomerni ugljikov atom glikanskog dijela kovalentnom, glikozidnom vezom preko nekog heteroatoma. Ovisno o heteroatomu vezanom na anomerni ugljikov atom, postoje različiti tipovi glikozidne veze: O-glikozidi, C-glikozidi, S-glikozidi, N-glikozidi i drugi. Potrebno je napomenuti da izraz N-glikozid nije preporučen, već se oni nazivaju glikozil-aminima.² Anomerni centar može postojati u dvije konfiguracije, kao α - i β -konfiguracija. Prema toj analogiji, i glikozidna veza može također postojati u dvije konfiguracije, α - i β -glikozidna veza.

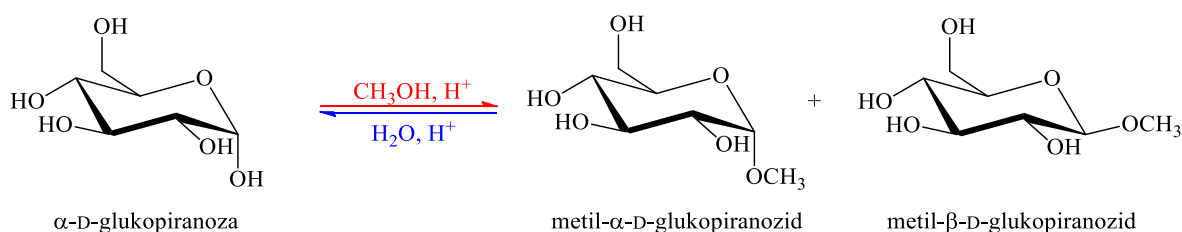
Postoje razne metode sinteze glikozida koje koriste različite reagense i pristupe. Cilj svake od njih je u što boljem prinosu sintetizirati željeni glikozid. Glikozilacija je jedna od najvažnijih sintetskih metoda u kemiji prirodnih spojeva. Za nju je potrebno imati glikozil-

donor i akceptor, kao i katalizator koji pokreće reakciju. Općenito govoreći, prvi korak u glikozilaciji je aktivacija glikozil-donora prevođenjem hidroksilne skupine anomernog C-atoma u dobru izlaznu skupinu. U drugom koraku slijedi selektivno vezanje glikozil-akceptora na donor (slika 19).⁷



Slika 19. Općeniti mehanizam sinteze O-glikozida (O-glikozilacije).

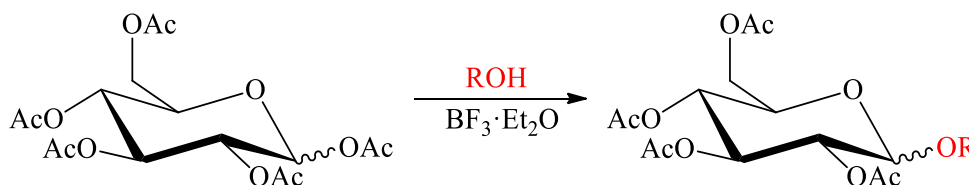
Aldoze i ketoze prelaze u acetale u kiselinom kataliziranoj reakciji s jednostavnim alkoholom. Pripravom O-glikozida na ovaj način nastaju oba anomera metil-glikozida (slika 20). Reakcija se odvija samo na anomernom ugljikovom atomu jer je njegova reaktivnost drukčija od reaktivnosti ostalih C-atoma u molekuli. On jedini sadrži dvije ugljik-kisik veze. Poput ostalih acetala, glikozidi su stabilni pri bazičnim vrijednostima pH, a u prisustvu razrijeđenih kiselina hidroliziraju na slobodni šećer i alkohol.²



Slika 20. Kiselinom katalizirana reakcija D-glukoze s metanolom.

Izravna metoda glikozilacije najčešće se koristi za pripremu jednostavnih O-glikozida. Za reakciju je potreban peracetilirani šećer kao izvor glikozila i alkohol koji će tvoriti aglikanski

dio (slika 21). Reakcija je katalizirana Lewisovom kiselinom, najčešće borovim trifluoridom dietil-eteratom ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$).⁷

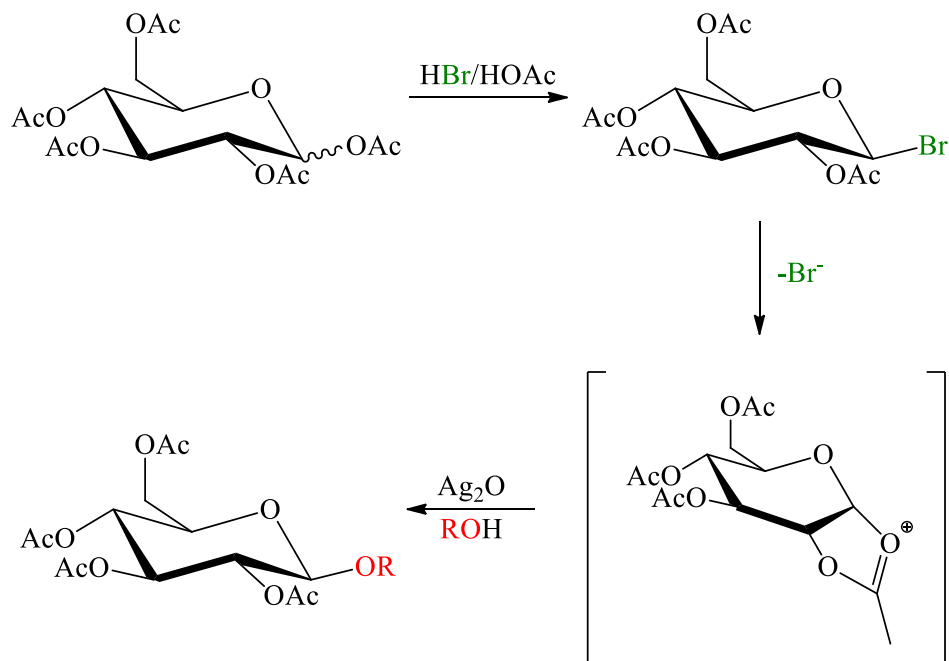


Slika 21. Reakcija izravne metode glikozilacije.

U nastavku su opisane dvije klasične metode glikozilacije: Koenigs-Knorrova i trikloracetimidatna metoda.

2.2.1. Koenigs-Knorrova metoda glikozilacije

Ovo je jedna od najstarijih metoda glikozilacije, prvi puta objavljena 1901. godine,⁸ a još uvijek je jedna od najkorisnijih reakcija za pripremu širokog spektra O-glikozida.⁴ Daleko najveći nedostatak ove metode je potreba za uporabom soli teških metala. Nekada su se koristile i živine soli koje su danas zamijenjene srebrovim. Ulogu glikozil-donora ima peracetilirani monosaharid koji na anomerni ugljikov atom ima vezan halogenid, odnosno izlaznu skupinu. Glikozil-akceptori su ponajprije alkilni ili aromatski alkoholi, ali i šećeri s jednom slobodnom hidroksilnom skupinom. Reakcija zahtijeva i srebrne soli kao katalizatore, među kojima se najčešće koriste srebrovi(I): karbonat, nitrat i triflat te oksid.⁴ Također, preporučuje se dodatak sredstva za sušenje poput kalcijeva sulfata, kalcijeva klorida ili molekulskih sita. Poboljšani prinosi postižu se upotrebom jodida kao izlazne skupine, snažnim miješanjem i zaštitom reakcijske smjese od svjetlosti.⁴ Stereokemija sintetiziranog glikozida je u većini slučajeva 1,2-*trans*-tipa, kao posljedica sudjelovanja susjedne skupine. Kada je zaštitna skupina na C-2 atomu acetatna skupina, dolazi do intramolekulskog napada karbonilnog kisika na oksokarbenijev ion. Taj međuprodukt je odgovoran za ugradnju alkohola na β -položaj i nastanak β -1,2-*trans*-glikozida (slika 22).



Slika 22. Reakcija sinteze β -1,2-trans-O-glikozida Koenigs-Knorrovom metodom.

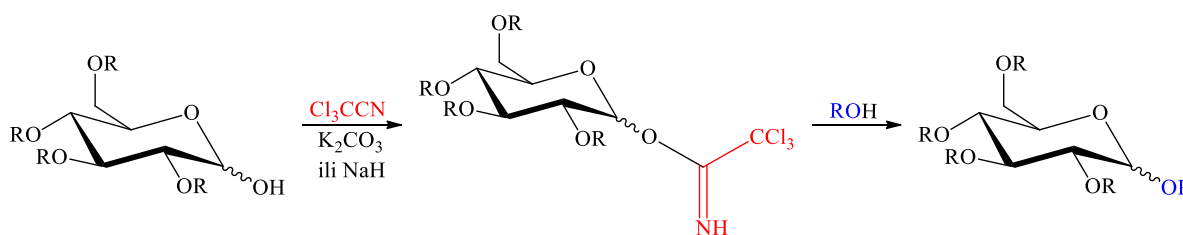
Prvi korak općenitog postupka izvedbe ove reakcije je priprema glikozil-halogenida koja se može postići tipičnom izmjenom anomerne hidroksilne skupine s halogenirajućim sredstvima. Različiti glikozil-halogenidi imaju vrlo različite reaktivnosti i stabilnosti koje uglavnom ovise o prirodi atoma halogena i zaštitnim skupinama šećera. Kloridi su stabilniji od bromida, dok su jodidi obično vrlo nestabilni.⁹ Glikozil-fluorid je najstabilnija glikozil-halogenidna vrsta te se ona jedina može pročistiti destilacijom pa čak i kromatografijom na koloni silikagela.¹² Uvođenje bromida kao izlazne skupine odvija se na peracetiliranom šećernom derivatu uz dodatak otopine bromovodika u octenoj kiselini.

Ova jednostavna metoda glikozilacije ima i svoje nedostatke. Glikozil-halogenidi su u principu nestabilne vrste podložne hidrolizi i 1,2-eliminaciji. Njihova priprava odvija se pri žestokim uvjetima, a koaktivatori korišteni u ovoj metodi su često toksične, a ponekad i eksplozivne vrste.⁹

2.2.2. Trikloracetimidatna metoda glikolizacije

Trikloracetimidatna metoda razvijena je iz Koenigs-Knorrove metode u potrazi za boljom izlaznom skupinom od halogenidnog iona.¹⁰ Ova metoda sinteze glikozida koristi O-glikoziltriacetimidate kao glikozil-donore. Takvi derivati glikozila odlikuju se većom stabilnošću od analognih glikozil-halida. Glikozil-donori sintetiziraju se reakcijom anomernog

ugljikovog atoma s trikloroacetonitrilom u prisustvu baze.⁶ Treba napomenuti da je dobiveni derivat imidata osjetljiv na zrak i da ga treba koristiti u reakcijama glikozilacije neposredno nakon pripreme.⁴ Glikozil-trikloracetimidati su relativno stabilni u bazičnim ili neutralnim uvjetima, ali lako reagiraju u kiselim uvjetima. S različitim kiselim nukleofilima, kao što su karboksilne kiseline i derivati fosforne kiseline, odgovarajući glikozilni esteri nastaju bez ikakvog dodatnog katalizatora. Reakcija sa glikozil-donorima odvija se u prisutnosti katalitičkih količina Brønstedove ili Lewisove kiseline koje imaju ulogu aktivatora (promotora). Izvorno su korišteni *p*-TsOH i $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$, a danas se uobičajeno koristi TMSOTf.⁶ Glikozilacije s ovim promotorima odvijaju se na niskim temperaturama u blagim uvjetima. Nakon aktivacije, dolazi do reakcije s glikozil-akceptorom te nastaje glikozidna veza (slika 23). Efekt participirajuće skupine rezultira stvaranjem 1,2-*trans*-glikozida. Utjecaj na stereokemiju produkta imaju i uvjeti reakcije. Termodinamičkom kontrolom reakcije prevladava 1,2-*trans*-glikozidni produkt, a kinetičkom kontrolom 1,2-*cis*-glikozidni produkt.⁶



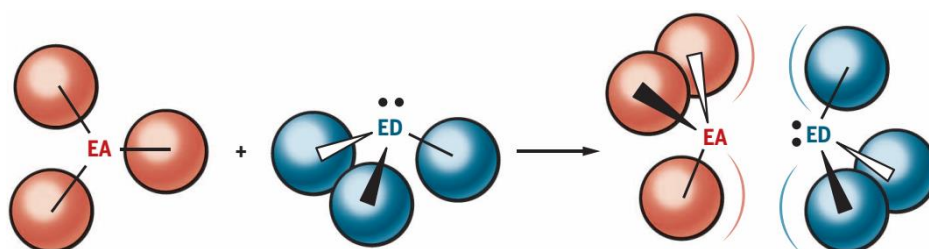
Slika 23. Sinteza O-glikozida trikloracetimidatnom metodom.

2.3. Metoda glikozilacije upotrebom glikozil-fluorida i sililnih etera

Posljednjih godina, glikozil-fluoridi se koriste kao svestrani glikozil-donori u sintezi prirodnih ugljikohidrata.¹¹ Glikozil-fluoridi se široko i učinkovito koriste za reakcije O- i C-glikozilacije. Jedna od značajnih prednosti glikozil-fluorida kao donora glikozila je njegova visoka termička i kemijska stabilnost u usporedbi sa stabilnošću ostalih glikozil-halogenida, kao što su glikozil-kloridi, bromidi i jodidi.¹² Ono što ovu metodu, u odnosu na ostale, čini posebno pristupačnom je njena jednostavnost izvedbe. Odvija se pri sobnoj temperaturi, a kontakt reakcijske smjese s vlagom u zraku ne utječe na uspješnost reakcije. Nudi mogućnost iterativne sinteze oligosaharida koristeći monosaharidne jedinice, modificirane fluoriranjem anomernog ugljikovog atoma, kao donore glikozila i sililne etere kao akceptore. Reakcijom ove dvije vrste nastaje O-glikozidna veza između dva modificirana ugljikova atoma (mono)saharidnih jedinica

te stabilni nusprodukt, trialkilsilicijev fluorid. Stvaranje izrazito stabilne silicij-fluor veze čija energija iznosi 582 kJ/mol zapravo je pokretačka sila ove reakcije glikozilacije.^{13,14}

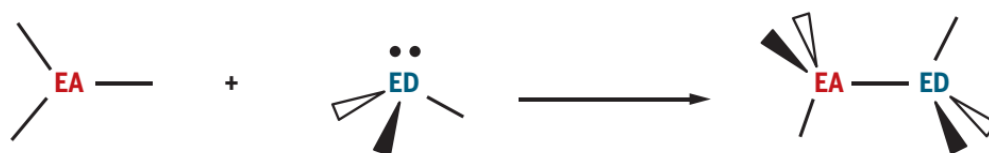
Izazov u razvoju ovog procesa je potreba za stabilnom i katalitički aktivnom Lewisovom kiselinom koja će aktivirati glikozil-fluorid i Lewisovom bazom koja će omogućiti cijepanje stabilne veze silicij-kisik akceptora glikozila.¹⁴ Reakcija Lewisove kiseline i baze, odnosno stvaranje adukta Lewisova kiseline-Lewisova baza poništava njihovo katalitičko djelovanje i ovaj postupak čini neodrživim. Ovaj problem je riješen korištenjem frustriranog Lewisovog para (engl. *Frustrated Lewis Pair*) koji nastaje u prisustvu sterički zahtjevnih L. kiseline odnosno baza te im omogućuje interakciju s trećom molekulom, a time i reakciju (slika 24).¹⁵



Slika 24. Frustrirani Lewisov par između sterički smetane Lewisove baze (elektron donor, ED) i Lewisove kiseline (elektron akceptor, EA). Ne dolazi do poništavanja djelovanja kiseline i baze stvaranjem adukta – iako su u kontaktu, zadržavaju svoju funkciju.

(preuzeto iz reference 15)

Na slici 25 prikazana je interakcija L. kiseline i L. baze u općenitom slučaju u kojem dolazi do stvaranja kemijske veze pomoću elektrona koji potječu od L. baze. U slučaju frustriranog Lewisovog para, ne može doći do nastanka kovalentne veze iz steričkih razloga pa takav par može aktivirati reakciju.



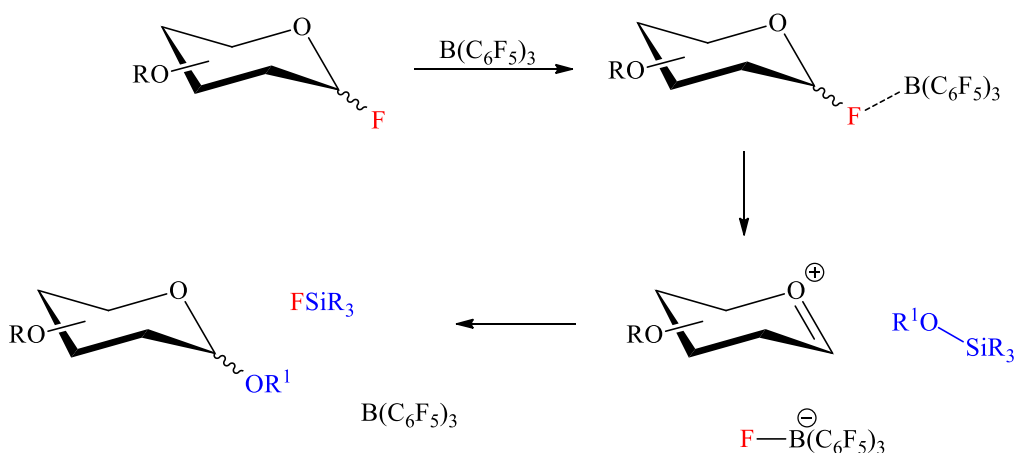
Slika 25. Deaktivacija Lewisove kiseline (EA) Lewisovom bazom (ED) stvaranjem adukta.

(preuzeto iz reference 15)

Svojstvo frustriranog Lewisovog para pokazuje molekula tris(pentafluorofenil)borana, $B(C_6F_5)_3$. Ona može aktivirati jake, nepolarne veze silana u prisustvu odgovarajuće Lewisove

baze bez da aktivira organski supstrat.¹⁶ Elektrofилни $B(C_6F_5)_3$ apstrahira fluoridni ion iz glikozidnog donora, a zatim ga isporučuje kao Lewisovu bazu za aktivaciju sililnog etera (slika 26).¹⁴ Tris(pentafluorofenil)boran higroskopna je krutina kojom se obično rukuje u uvjetima inertne atmosfere. Reakcijom glikozilacije s 5 mol % navedenog katalizatora rezultira visokim prinosima regio- i stereoselektivnim produktima. U svim prijašnjim metodama glikozilacije, kao i u većini katalitičkih metoda potrebno je između 10 i 50 mol % katalizatora, što je 2-10 puta više no što zahtijeva ova metoda.¹⁴ Komercijalno se, osim bezvodan, $B(C_6F_5)_3$ može nabaviti i kao monohidrat. Korištenjem 5 mol % monohidrata $B(C_6F_5)_3$, primijećeno je da se također dobije zadovoljavajući rezultat na sobnoj temperaturi, a potrebno je samo nešto dulje vrijeme reakcije.¹⁴ Upravo ovo svojstvo katalizatora omogućuje metodi široku primjenu i jednostavnost. $B(C_6F_5)_3$ monohidrat, osim što je stabilan na vlagu i zrak, jednostavno se skladišti, tolerantan je na vodu i jednostavan za rukovanje.¹⁴

Glavna pokretačka sila ove reakcije je fluorofilnost, odnosno veliki afinitet silicija prema fluoru zbog čega u reakciji uz željeni produkt nastaje i nusprodukt $FSiR_3$.



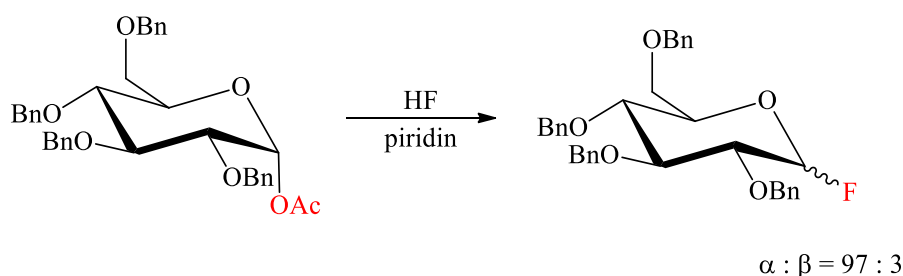
Slika 26. Mehanizam sinteze O-glikozidne veze između glikozil-fluorida aktiviranog tris(pentafluorofenil)boranom i sililnog etera.

Druge uobičajene Lewisove kiseline kao što su $SnCl_4$, $ZnCl_2$ ¹⁷, $BF_3 \cdot Et_2O$ ¹⁸ i TMSOTf također su prikladne za reakcije glikozilacije. Među njima ipak se, uz $B(C_6F_5)_3$ i njegov hidrat koji daju najbrže i najučinkovitije rezultate, ističe i $BF_3 \cdot Et_2O$. On je također komercijalno dostupan, jednostavan za rukovanje te daje zadovoljavajuće prinose.¹⁹ Značajno je da je učinkovitost $B(C_6F_5)_3$ u udjelima od 10 mol % opisana u glikozilacijama slobodnih alkohola korištenjem

donora trikloracetimidata, ali njegova uporaba s donorima glikozil-fluorida ili akceptorima sililnih etera nije prethodno opisana.¹⁴

2.3.1. Priprava prekursora

Zbog primjene glikozil-fluorida u metodama glikozilacije razvijene su mnoge metode njihove sinteze iz odgovarajućeg šećera. Najčešći načini priprave koriste fluorovodik, DAST (dietilaminosumporov trifluorid) te metalne fluoridae. 1-Hidroksi i 1-O-acetilirani šećeri mogu se prevesti u odgovarajuće glikozil-fluoride pomoću smjese fluorovodika i piridina (slika 27).¹¹ S obzirom na otrovnost bezvodnog fluorovodika, kao i nemogućnost rada u standardnom laboratorijskom staklenom posuđu, ova metoda više nije uobičajena kao što je bila 1980-ih godina.²³



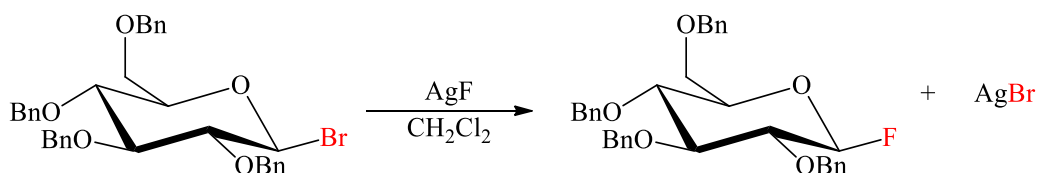
Slika 27. Sinteza O-glikozida korištenjem fluorovodika u piridinu. Glikozilacija rezultira nastankom smjese 97% α -anomera, odnosno 3% β -anomera. (prilagođeno prema ref. 11)

Druga često korištena metoda sinteze koristi reagens DAST za pripravu glikozil-fluorida iz monosaharida (slika 28). DAST je jedan od najboljih reagensa za fluoriranje hidroksilne skupine, pa tako i slobodne anomerne skupine šećera.¹¹



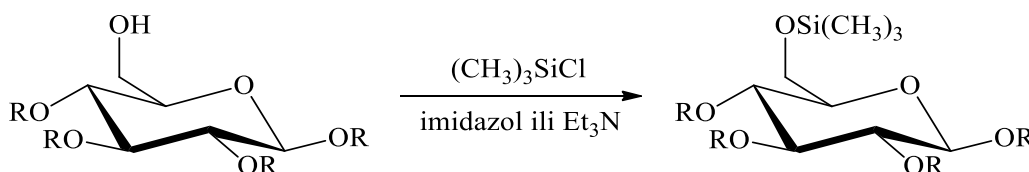
Slika 28. Sinteza O-glikozida korištenjem DAST-a. Ukoliko je THF korišten kao otapalo, glikozilacija rezultira nastankom 10 puta više β -anomera od α -anomera, dok ga u CH₂Cl₂ nastaje tek 2 puta više. (prilagođeno prema ref. 11)

Treća metoda sinteze glikozil-fluorida koristi glikozil-halogenide i metalne fluoride. U reakciji nukleofilne supstitucije S_N2 mehanizmom, dolazi do zamjene klorida, odnosno bromida sa fluoridom koji potječe iz reagensa (slika 29). Najčešće se, kao fluorirajući reagens, koristi srebrov fluorid. Ireverzibilnost ove reakcije potiče nastanak teško topljivog taloga srebrovog(I) klorida, odnosno bromida.¹¹



Slika 29. Sinteza O-glikozida uporabom srebrova(I) fluorida.

Drugi prekursor potreban za glikozilaciju je glikozil-akceptor. Ova metoda koristi sililne etere kao akceptore. Sililni eteri pronalaze svoju ulogu u kemiji ugljikohidrata kao zaštita hidroksilnih skupina. Velika prednost korištenja sililnih skupina je to što mogu na silicij imati vezane različite alkilne supstituente. Ova mogućnost se iskorištava u takozvanim *one-pot* metodama glikozilacije, gdje steričke smetnje imaju utjecaj na brzinu reagiranja pojedinih skupina.¹⁴ Često se koriste zaštite poput trimetilsililnih etera (TMS), trietilsililnih etera (TES) i *tert*-butildimetilsililnih etera (TBDMS). Ova vrsta spada u etersku zaštitnu skupinu koja se lako postavlja i uklanja. Hidroksilna skupina alkohola nukleofilno napada trialkilsilil-klorid stvarajući produkt (slika 30). Sintaza se odvija korištenjem trietilamina ili imidazola kao baze.⁵



Slika 30. Reakcija sinteze sililnog prekursora koji ima ulogu akceptora glikozila.

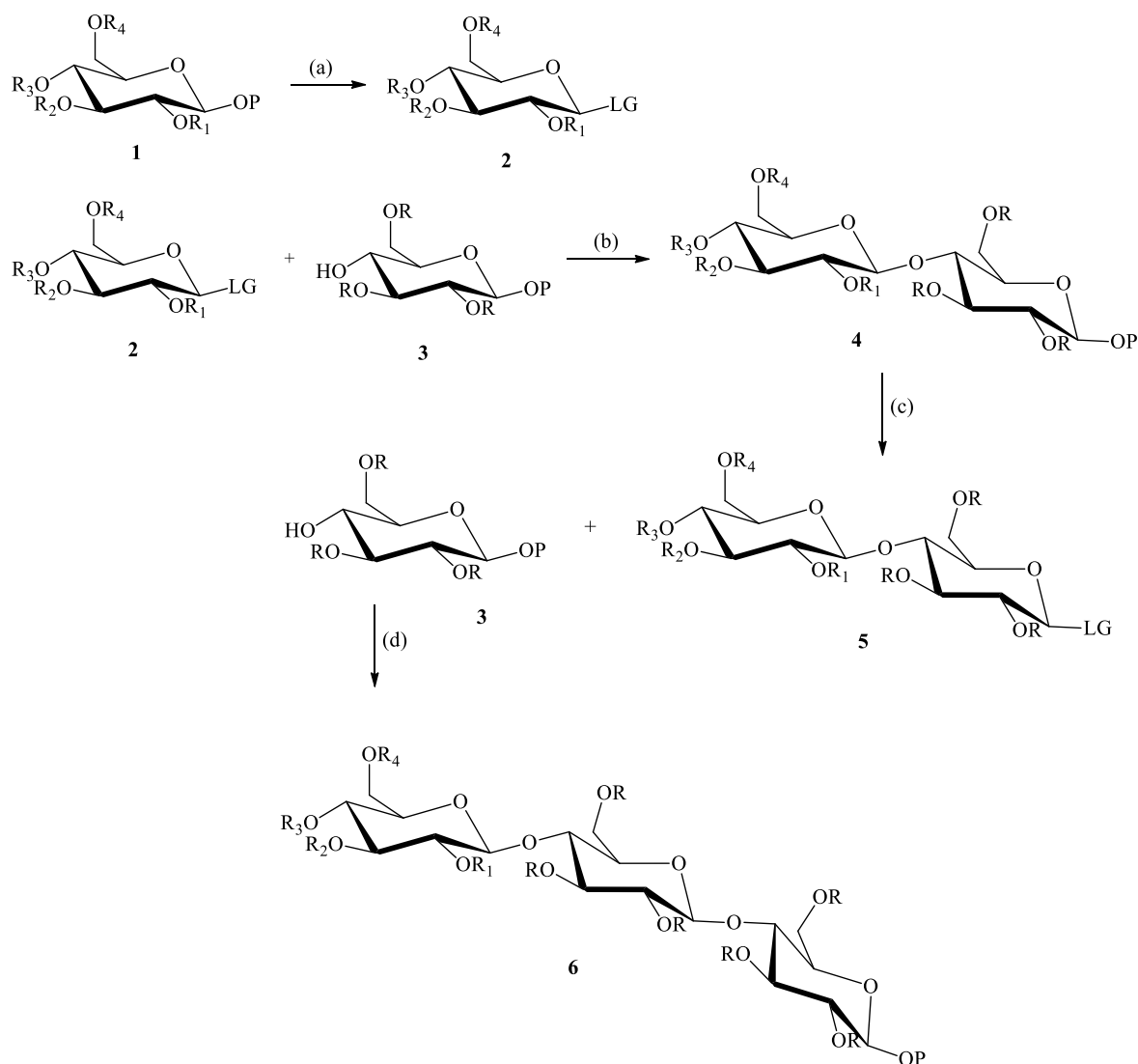
2.3.2. One-pot pristup

U tradicionalnim pristupima sinteze oligosaharida, produkt reakcije glikozilacije trebalo je izolirati te kemijski transformirati kako bi bio prikladan za idući korak glikozilacije.⁶ Nakon stvaranja glikozidne veze, produljenje oligosaharida se može provesti na dva načina:

transformacijom anomerne zaštitne skupine u odlazeću skupinu (sintezom glikozil-donora) i njenim spajanjem s odgovarajućim akceptorom ili selektivnim uklanjanjem zaštitne skupine za stvaranje glikozil-akceptora i njegovo naknadno spajanje s prikladnim donorom.²⁰ Ovaj postupak se ponavlja sve dok se ne postigne željena duljina ciljanog lanca oligosaharida. Vrijeme utrošeno za sintezu zaštićenih donorskih i akceptorskih građevnih blokova šećera, njihovo postupno produljenje i potreba za pročišćavanjem produkta svakog međukoraka sinteze kolonskom kromatografijom, čini sintezu oligosaharida teškim i dugotrajnim zadatkom.²¹

Kako bi se povećala učinkovitost i ekonomičnost, razvijen je pristup u kojem se produkt jedne reakcije glikozilacije koristi izravno u sljedećoj reakciji. Upravo taj pristup otvara sintetski put na način da se izostavi izolacija i pročišćavanje produkta nakon svakog koraka te da se cijeli proces višestruke glikozilacije izvodi u jednoj posudi (engl. *one-pot*).⁶ U *one pot* pristupu, monosaharidni građevni blok uzastopno reagira s drugim građevnim blokovima šećera i reagensima u istoj posudi (tikvici) bez ikakvih dorada ili pročišćavanja među koracima. Tako se nekoliko glikozilacija može povezati u jedan proces, na čijem se kraju, nakon jednog pročišćavanja može dobiti ciljani oligosaharid. S takvim pristupom, gubici zbog rukovanja tijekom rada i pročišćavanja su minimizirani i mogu se očekivati veći prinosi.

Za *one-pot* sintezu oligosaharida od nereducirajućeg prema reducirajućem kraju koristi se bifunkcionalni akceptor glikozila, tzv. donor-akceptor (**3**). On nosi nukleofilni alkohol, kao i aktiviranu izlazeću skupinu. U prvom ciklusu, glikozil-donor reagira s akceptorom koji nosi izlazeću skupinu (**2**). Izlazeća skupina bifunkcionalnog akceptora glikozila **3** stabilna je pri prvim uvjetima i aktivira se tek u drugom ciklusu (**5**), nakon dodavanja promotora. Bifunkcionalni građevni blok djeluje samo kao akceptor u prvom koraku, a nakon završetka prve glikozilacije, formirani glikozid djeluje kao donor (**5**) (slika 31).²⁰



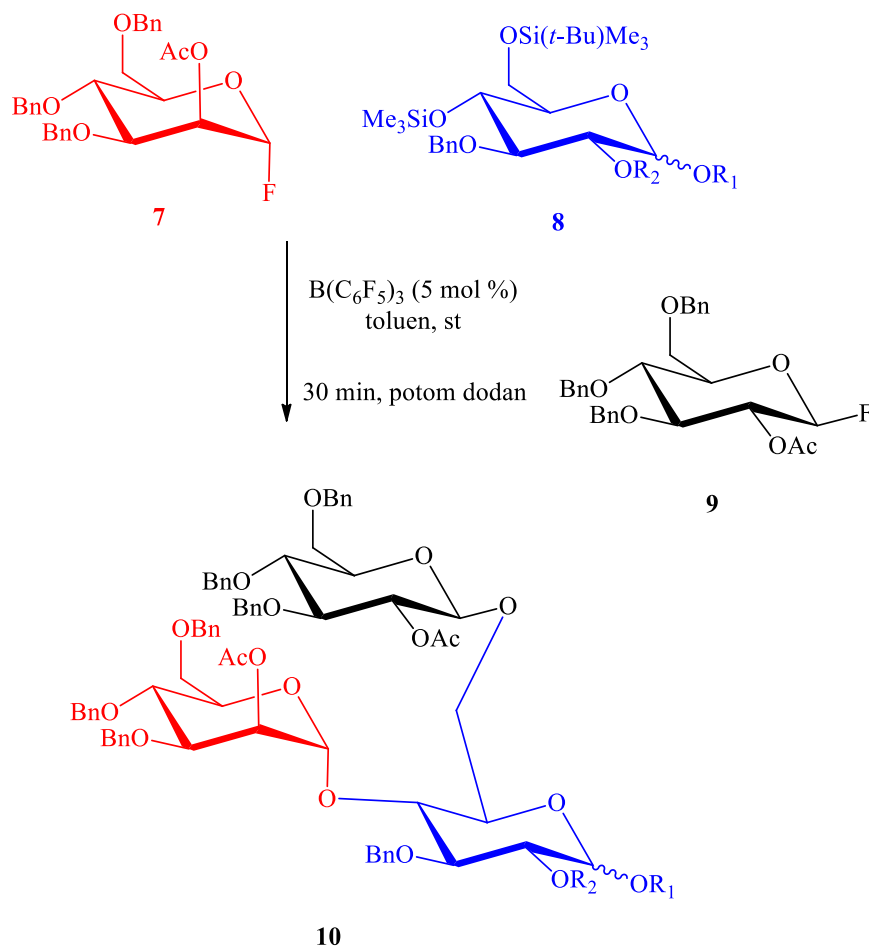
Slika 31. Sinteza oligosaharida *one-pot* metodom od reducirajućem prema nereducirajućem kraju. (a) Aktivacija izlazne skupine glikozil-donora u uvjetima kada je izlazeća skupina bifunkcionalnog bloka stabilna; (b) Reakcija glikozilacije između generiranog glikozil-donora i bifunkcionalnog bloka; (c) Promjena reakcijskih uvjeta u kojima se aktivira izlazna skupina bifunkcionalnog bloka (donor-akceptora); (d) Reakcija glikozilacije bifunkcionalnog bloka kao donora glikozila s akceptorom. (prilagođeno prema ref. 20)

Pristupi *one-pot* metodama uglavnom se oslanjaju na tri strategije. Prva strategija se temelji na razlici u reaktivnosti. Glikozilni građevni blokovi imaju različite anomerne reaktivnosti koje se mogu koristiti za dizajniranje *one-pot* glikozilacije. Temelje se na uzastopnim reakcijama donora i to na način da prvi reagira onaj s najvećom reaktivnosti, a na kraju onaj s najmanjom. Na anomernu reaktivnost glikozilnog donora utječu zaštitne skupine, orijentacija različitih supstituenata, izlazeća skupina i njena orijentacija, kao i temperatura i otapalo.²⁰ Druga

strategija *one-pot* glikozilacije koristi razliku u uvjetima aktivacije izlazećih skupina glikozil-donora. Različite izlazeće skupine zahtijevaju različite uvjete aktivacije pa metode ovog tipa uključuju kemoselektivnu aktivaciju jedne vrste izlazeće skupine nad drugom prisutnom u građevnom bloku. Građevni blok koji djeluje kao akceptor u prvoj glikozilaciji sadrži anomernu izlaznu skupinu koja se aktivira u drugoj. Na primjer, glikozil-trikloracetimidati aktiviraju se upotrebom TMSOTf, dok su tioglikozidi stabilni u takvim kiselim uvjetima i zahtijevaju jače elektrofilne promotore kao što su NIS/TfOH, DMTST (dimetil(metiltio)sulfonijev trifluorometansulfonat) ili MeOTf.²⁰ Nakon reakcije glikozilacije gdje je izlazna skupina trikloracetimidat, dodaje se novi promotor koji aktivira drugu izlaznu skupinu. Treća strategija *one-pot* glikozilacija temelji se na preaktivaciji glikozil-donora. Ova vrsta glikozilacije neovisna je o reaktivnosti donora. Ovim pristupom, reakcije *one-pot* glikozilacije mogu se izvesti neovisno o anomernim reaktivnostima korištenjem građevnih blokova koji sadrže isti aglikon, pod istim reakcijskim uvjetima. Selektivnost se postiže aktiviranjem donora korištenjem stehiometrijske količine promotora u odsutnosti akceptora kako bi se formirao reaktivni međuprodukt. Tek dodatkom akceptora dolazi do formiranja nove glikozidne veze.²⁰

U pogledu zelene i održive kemije, kemičari imaju dubok interes za svjetlo kao izvor energije za sintetičke transformacije. Tako se danas razvijaju i fotokemijske metode *one-pot* glikozilacije.²⁰ U procesu fotoinduciranih glikozilacija, aktivacija donora tioglikozida prvenstveno se oslanja na redoks potencijal fotokatalizatora. Nažalost, primjena ovog pristupa je otežana zbog ograničenog opsega supstrata i niskog prinosa glikozilacije. Kako bi se zaobišla neka od postojećih ograničenja, korišten je suvišak akceptora glikozila i produljeno je vrijeme reakcije.²⁰

Pristup *one-pot* glikozilaciji koji iskorištava suptilne razlike u reaktivnosti donora ili akceptora glikozila, najčešće se izvodi od nereducirajućeg kraja prema reducirajućem kraju iako se može odvijati i suprotnim smjerom, kao i kombinacijom ovih sintetskih strategija.²⁰ Na primjer, glikozil-fluoridi (donori) se mogu razlikovati u redosljedju dodavanja u reakcijsku posudu, dok se sililni akceptor razlikuju u alkilnim skupinama koje su vezane za silicij zaštitne skupine. Zbog razlike u steričkim zahtjevima alkilnih skupina, reakcija će se prije odvijati na manje sterički smetanom silicijevom atomu, a tek onda na onom više smetanom. Ovakvom metodom dobivaju se regio- i stereoselektivni produkti.¹⁴



Slika 32. Sinteza regio- i stereoselektivnog trisaharida *one-pot* metodom glikozilacije.
(prilagođeno prema ref 14)

Glikozil-akceptor **8** sadrži dvije sililne zaštitne skupine koje se razlikuju prema supstituentima vezanim za silicij. Na položaju 4 nalazi se trimetilsililna zaštita, dok se na položaju 6 nalazi *tert*-butildimetilsililna zaštita. Reakcijom **7** i **8** uz prisustvo Lewisove kiseline B(C₆F₅)₃ te dodatkom **9** nakon 30 minuta nastaje regio- i stereoselektivni produkt **10**. Iz slike 32 može se zaključiti kako 1,4-glikozidna veza između **7** i **8** nastaje brže od 1,6-glikozidne veze koja nastaje tek nakon pola sata dodatkom **9**.

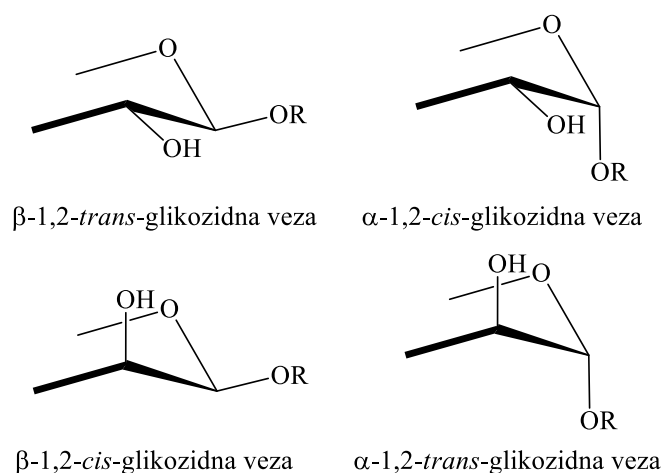
2.3.3. Stereokemija sinteze *O*-glikozida

Stereoselektivno stvaranje glikozilnih veza je poželjno, ali na njega utječu mnogi čimbenici kao što su odlazeće skupine, otapala, aktivacijski sustavi, aditivi, i što je još važnije, zaštitne skupine donora i akceptora.⁸ Obično se zaštitna skupina uvodi kako bi se privremeno maskirala funkcijska skupina koja ne može preživjeti korištene reagense ili kemijsko okruženje. Zaštitne

skupine, osim što se selektivno vežu na pojedine funkcijske skupine, mogu povećati ili smanjiti reaktivnost, a mogu i pasivno sudjelovati u reakcijama, utječući na stereokemijske ishode glikozilacija. Na primjer, 2-*O*-acilna skupina se obično bira za uvođenje 1,2-*trans*-glikozida, dok se 2-*O*-eterska zaštitna skupina koristi za stvaranje 1,2-*cis*-glikozida.²¹

Sinteza O-glikozida predstavlja veliki izazov u laboratorijskoj sintezi. Mnogi oligosaharidi koji sadrže 1,2-*cis*-O-glikozidne veze od velike su važnosti zbog svoje biološke uloge i terapijskog potencijala. Na primjer, imunomodulatorni pentasaharid FPS-1 iz *Aconitum carmichaeli* sastoji se od α -(1 \rightarrow 6)-glikozidnom vezom povezane okosnice s nešto α -(1 \rightarrow 3) grananja. Gljiva *Pseudallescheria boydii* sadrži strukture slične glikogenu s α -(1 \rightarrow 4)-vezanom glukanskom okosnicom i povremenim α -(1 \rightarrow 6)-glukozilnim granama.²¹

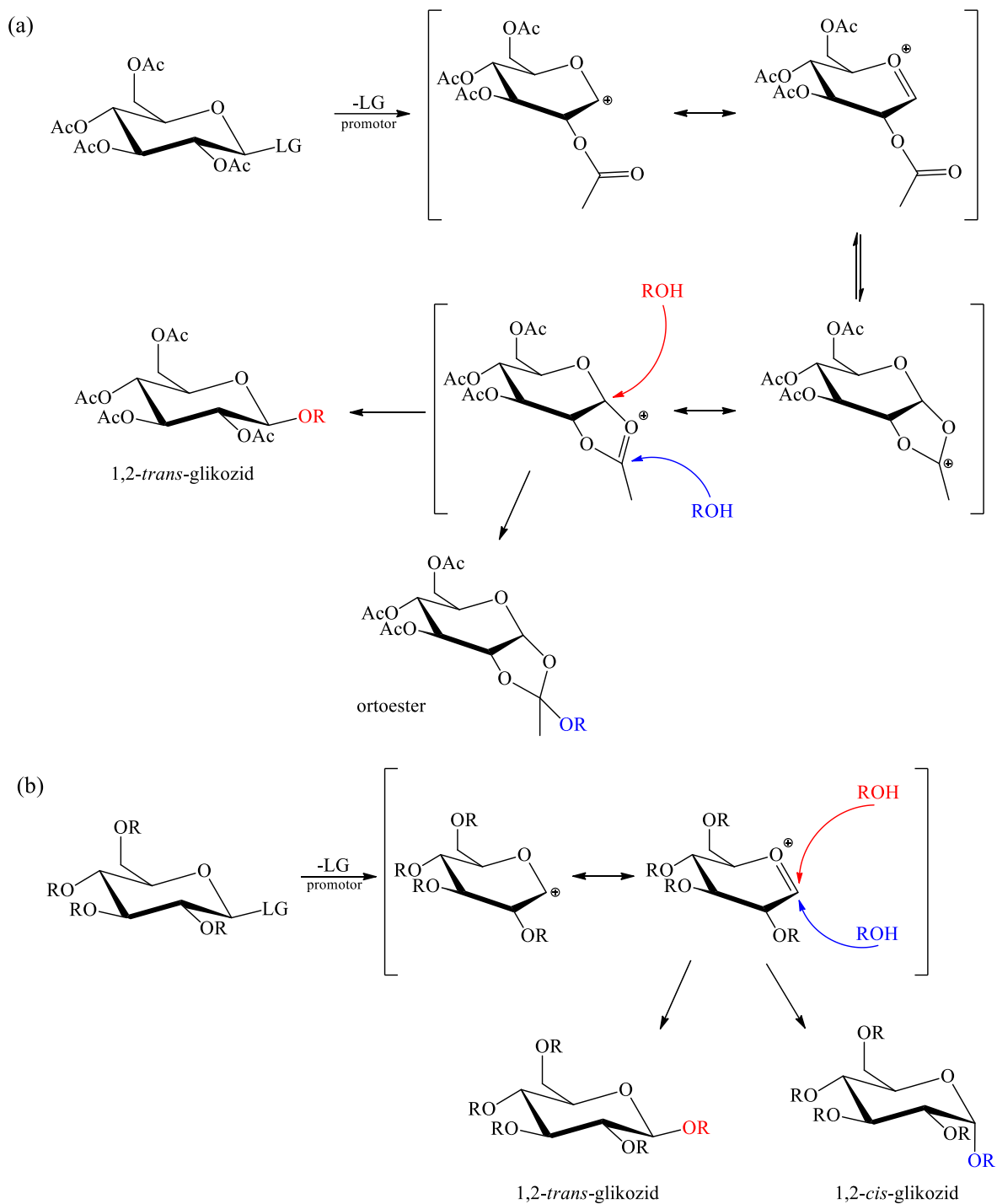
Postoje 4 osnovne vrste O-glikozidne veze koje se, najčešće definiraju kao 1,2-*cis* α - i β - te 1,2-*trans* α - i β -glikozidne veze. I 1,2-*cis* i 1,2-*trans* glikozidi važne su klase veza koje su obično komponente u raznim prirodnim spojevima (slika 33). Međutim, sinteza α -1,2-*cis*-glikozida D-glukoze, D-galaktoze, odnosno β -1,2-*cis*-glikozida D-manoze, L-ramnoze, pokazala se kao sintetska prepreka za kemičare.¹¹



Slika 33. Prikaz četiri osnovne vrste 1,2-O-glikozidnih veza.

U velikom broju slučajeva za reakciju glikozilacije, osim glikozil-donora i akceptora, potreban je i aktivator ili promotor. Aktivaciji slijedi odlazak izlazeće skupine uz pomoć promotora koja rezultira stvaranjem glikozilnog kationa. Nastali kation, oksokarbenijev ion, rezonantno je stabiliziran preko obližnjeg kisikovog atoma. Karbokationi su općenito kratkoživuće vrste te su podložne nukleofilnom napadu. U ovom slučaju taj napad vrši glikozil-akceptor. Konačni produkt će ovisiti o poziciji s koje dolazi nukleofilni napad. Glikozil-akceptor može napasti

bilo s gornje ili donje strane ravnine prstena. Kao produkt nastaje 1,2-*trans* ili 1,2-*cis* glikozid u odnosu na susjedni supstituent na C-2 atomu, a nekontrolirane reakcije mogu dovesti do njihove smjese.^{11,22} Na stereokemijski ishod glikozilacije osim temperature, tlaka, koncentracije i strukture glikozil-donora/akceptora utječe i zaštitna skupina na C-2 atomu.⁹ Zaštitna skupina na C-2 atomu može biti participirajuća ili neparticipirajuća skupina. Upravo ona određuje udjele i stereokemiju produkata u reakcijskoj smjesi (slika 34).



Slika 34. Utjecaj participirajuće skupine (a) i neparticipirajuće skupine (b) na stereokemijski ishod reakcije.

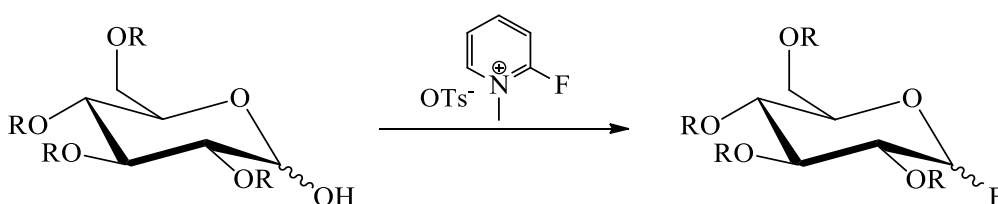
Esterska skupina na C-2 atomu je participirajuća skupina i ima važnu ulogu u aktivaciji glikozil-donora aktiviranjem izlazne skupine. Preko nje dolazi do 1,2-*trans*-glikozilacije, točnije preferirani anomerni ishod je produkt 1,2-*trans*-glikozid.²¹ U ovom slučaju, oksokarbonijev ion dodatno je stabiliziran preko bicikličkog aciloksonijevog međuprodukta, koji postaje ključni

međuprodukt. Budući da je donja strana prstena blokirana, nukleofilni napad glikozil-akceptora usmjeren je sa suprotne, gornje strane. To omogućuje pristup 1,2-*trans* vezi s vrlo visokom ili potpunom stereoselektivnošću (slika 33, a). Međutim, ponekad nastaju i značajnije količine 1,2-*cis*-vezanih produkata ili dolazi do stvaranja ortoestera. Dok se stereoselektivna sinteza 1,2-*trans* veza može pouzdano postići participacijom susjednih grupa, formiranje 1,2-*cis* veza je obično mnogo izazovnije.^{21,9} Za sintezu 1,2-*cis* glikozida potrebna je prisutnost skupine koja ne sudjeluje u aktivaciji. Takva neparticipirajuća skupina ne može osigurati stereoselektivnost, iako je α -anomerni produkt favoriziran zbog anomernog efekta. Stereoselektivnost glikozilacije može biti slaba i zahtijeva druge načine stereokontrole.²¹

2.3.4. Povijesni pregled uporabe glikozil-fluorida kao donora glikozila

Atom fluora ima najmanji kovalentni radijus među halogenim elementima i najveću elektronegativnost među svim elementima. Zbog velike energije disocijacije veze C–F, vjerovalo se da su glikozil-fluoridi previše stabilni kako bi se koristili kao glikozil-donori u metodama glikozilacije. Ta uvjerenja dugo su vremena utjecala na sintetske kemičare i dovela do toga da glikozil-fluoridi imaju manje značajnu ulogu od drugih glikozil-halogenida u kemiji ugljikohidrata, sve dok se prva publikacija s metodom koja koristi glikozil-fluoride nije pojavila 1981. godine.²³

Otkriće metode korištenjem glikozil-fluorida kao donora glikozila potječe iz dva neočekivana otkrića tijekom ranih eksperimenata. Prvo otkriće bila je realizacija novog sintetskog puta do glikozil-fluorida korištenjem reagensa za dehidrataciju, 2-fluoro-1-metilpiridinijevog tosilata.²² Početkom 1980-ih, sinteza glikozil-fluorida predstavljala je problem jer su preparativne metode obično uključivale upotrebu opasnog bezvodnog fluorovodika. Budući da reakcija fluoriranja koja koristi 2-fluoro-1-metilpiridinijev tosilat nije zahtijevala opasne reagense, ova je metoda pokrenula opsežna istraživanja glikozil-fluorida kao glikozil-donora (slika 35).²²



Slika 35. Fluoriranje šećera 2-fluoro-1-metilpiridinijevim tosilatom.

(prilagođeno prema ref. 23)

Drugo neočekivano otkriće dogodilo se tijekom ispitivanja različitih Lewisovih kiselina kao potencijalnih katalizatora za reakciju spajanja glikozil-fluorida i alkohola. Reakcija glikozilacije korištenjem poprilično slabe Lewisove kiseline, SnCl_2 , pri sobnoj temperaturi, rezultirala je sintezom 1,2-*cis*-glikozida.²⁴ Karakteristika spojeva dvovalentnog kositra je u tome što imaju praznu orbitalu i slobodni par elektrona. U ovoj reakciji glikozilacije, SnCl_2 ponaša se kao Lewisova kiselina čija prazna orbitala prihvaća jedan od tri slobodna elektronska para na atomu fluora glikozil-fluorida. Kao rezultat ove interakcije, ugljik-fluor veza se cijepa dajući međuprodukt oksokarbenijev ion koji napada alkohol, što rezultira stvaranjem glikozidne veze.²²

Ova temeljna otkrića uvelike su potaknula razvoj niza novih reakcija glikozilacije koje koriste različite kombinacije glikozil-fluorida i Lewisovih kiselina na temelju fluorofilnosti elemenata Lewisovih kiselina. U konačnici, fluorofilni karakter Lewisovih kiselina presudan je za aktivaciju glikozil-fluorida i puno važniji od same Lewisove kiselosti.

2.4. Zaključak

Korištenje sililnih etera kao akceptora glikozila i glikozil-fluorida kao donora dovelo je do prekretnice u sintezi oligosaharida. Ova metoda, osim svoje jednostavnosti izvedbe, nadišla je neke od osnovnih problema pri sintezi glikozida. Reakcija se odvija pri sobnoj temperaturi uz pomoć komercijalno dostupnog katalizatora, a vlaga iz zraka ne utječe na tijek reakcije. Kombinacijom raznih strategija moguće je pripremiti glikozide sa svim mogućim stereokemijskim odnosima C1 i C2. Sama reakcija traje nekoliko minuta i rezultira zadovoljavajućim prinosima. Korištenjem ovih prekursora otvara se i mogućnost *one-pot* sinteze koja olakšava cjelokupnu sintezu na način da eliminira potrebu za pročišćavanjem svakog međuprodukta sintetskog puta, a na taj način štedi vrijeme te otapala i reagense. Metoda glikozilacije koja koristi glikozil-fluoride kao donore i sililne etere kao akceptore nova je, perspektivna metoda koja će se s vremenom nastaviti razvijati te bi mogla iz upotrebe istisnuti danas najkorištenije metode glikozilacije.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Strayer, Biokemija, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 303-312.
2. L. G. Wade, Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 2017, str. 1097-1137.
3. S. Ghosh, M. L. Sudha, Int. J. Food. Sci. Nutr. 63 (2012) 372-379.
4. M. Brito-Arias, Synthesis and Characterization of Glycosides, Springer, 2016, str. 7-9, 86-92, 97-107.
5. P. G. M. Wuts, T. W. Greene, Greene's protective groups in organic synthesis, John Wiley & Sons, Inc, 2007, str. 24-28, 306-315.
6. D. E. Levy, P. Fügedi, The Organic Chemistry of Sugars, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
7. Y. Manabe, T. Matsumoto, Y. Ikinaga, Org. Lett. 24 (2022) 6–10.
8. W. Koenigs; E. Knorr, Chem. Ber. 34 (1901) 957–981.
9. L. Kurti, B. Czako, Strategic Applications of Organic Named Reactions in Organic Synthesis, Elsevier Academic Press, 2005, str. 246-247.
10. R. R. Schmidt, Angew Chem Int Ed 25 (1986) 212–235.
11. M. Yokoyama, Carbohydrate Research 327 (2000) 5–14.
12. K. Toshima, Carbohydrate Research 327 (2000) 15–26.
13. <https://cen.acs.org/articles/86/i43/SiF-Bond-Strength> (datum pristupa 15.8.2022.)
14. G. C. Sati, J. L. Martin, Y. Xu, T. Malakar, P. M. Zimmerman, J. Montgomery, J. Am. Chem. Soc. 142 (2020) 7235-7242.
15. D. W. Stephan, Science 354 (2016) 1248-1257.
16. W. E. Piers, A. J. V. Marwitz, L. G. Mercier, Inorg. Chem. 50 (2011) 12252-12262.
17. D. Benito-Alifonso, M. C. Galan, Selective Glycosylation: Synthetic Methods and Catalysts, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2017, str. 155-172.
18. H. Kunz, W. Sager, Helv. Chim. Acta 68 (1895), 283-287.
19. I. Tuković, Sinteza trisaharida β -D-Xylp-(1 \rightarrow 4)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)-D-Fucp, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021, str. 50.
20. S. S. Kulkarni, Chem. Rev. 118 (2018) 8025–8104.

21. S. S. Nigudkar, A. V. Demchenko, Chem. Sci. 6 (2015) 2687-2704.
22. J. Guo, X. S. Ye, Molecules, 15 (2010) 7235-7265.
23. S. Shin-ichiro, Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 93 (2017) 125–145.
24. M. Teruaki, M. Yoshiyuki, S. Shin-Ichiro, Chem. Lett. 10 (1981) 431-432.