

# Razvoj sintetske metode za pripremu $\alpha$ -O-manozida octene kiseline

---

Živković, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:179155>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-13**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Ivana Živković

Razvoj sintetske metode za pripravu  $\alpha$ -*O*-manozida octene kiseline

Diplomski rad

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: Marija Paurević, mag. chem

Osijek, 2018.

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku****Odjel za kemiju****Diplomski studij kemije****Znanstveno područje: Prirodne znanosti****Znanstveno polje: Kemija****Razvoj sintetske metode za pripremu  $\alpha$ -*O*-manozida octene kiseline**

Ivana Živković

**Rad je izrađen na:** Odjelu za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku**Mentor: doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik****Sažetak**

Ugljikohidrati su važne organske makromolekule koje se uglavnom spominju u kontekstu izvora energije, dok se rjeđe tumače njihove esencijalne uloge u biološkim sustavima. Oligosaharidi nose informacije koje su određene mjestom vezanja monosaharida, konfiguracijom glikozidne veze ( $\alpha$ - ili  $\beta$ -) te udjelom razgranatosti, što ih čini izvrsnim prenositeljima biološke informacije. Lektini su proteini koji specifično vežu šećerne strukture. Poseban tip lektina su manozni receptori koji su prisutni na površini različitih imunokompetentnih stanica te su potencijalne mete za vezanje manoziliranih antigena. Također se mogu koristiti za unos lijekova koji u svojoj strukturi sadrže manozu, te utjecati na tijek reakcija u imunološkom sustavu. Cilj ovog rada je razvoj metode pripreme manozilirane karboksilne kiseline, važne podstrukture u sintezi spoja koji bi bio potencijalni adjuvant.

Acetiliranjem *D*-manoze anhidridom octene kiseline uz jod kao katalizator, pripravljena je 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha,\beta$ -*D*-manopiranoza kojoj je selektivno uklonjena anomerna acetatna zaštita na tri različita načina te je dobivena 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-manopiranoza. U trećem koraku je pripremljen *O*-manozid reakcijom tetraacetilirane manoze s *tert*-butil-bromacetatom i kalijevim karbonatom pri čemu je preferirano nastao  $\alpha$ -anomer *O*-manozida. Anomerno čistom esteru uklonjena je *tert*-butilna zaštita pomoću trifluoroctene kiseline u suhom diklormetanu čime je pripravljena 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -*D*-manopiranoziloksi)octena kiselina u dobrom prinosu, a strukture produkata su okarakterizirane <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom.

**Diplomski rad obuhvaća:** 43 stranice, 17 slika, 5 tablica, 31 literaturnih navoda i 2 priloga.**Jezik izvornika:** hrvatski**Ključne riječi:** anomerna deacetilacija/ *D*-manoza/ glikozidi/ lektini/ ugljikohidrati**Rad prihvaćen:** 9.11.2017.**Stručno povjerenstvo za ocjenu:**

1. izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač, predsjednica
2. doc. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentor i članica
3. doc. dr. sc. Tomislav Balić, član
4. doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Prehrambeno-tehnološkog fakulteta u Osijeku, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

Department of Chemistry

Graduate Study of Chemistry

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Chemistry

**Development of a synthetic method for the preparation of  $\alpha$ -*O*-mannoside of acetic acid**

Ivana Živković

**Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

**Supervisor:** Assist. Prof. Martina Šrajcer Gajdošik, PhD

**Abstract**

Carbohydrates are important organic macromolecules mainly referred to in the context of energy sources, while their essential role in biological systems is rarely interpreted. Information carried in oligosaccharides is determined by the site of the monosaccharide binding s, the configuration of glycosidic bond ( $\alpha$ - or  $\beta$ -) and the amount of branching. All this makes them excellent transmitters of biological information. Lectines are proteins that specifically bind sugar structures. A special type of lectins are mannose receptors present on the surface of different immunocompetent cells and are potential targets for binding mannosylated antigens. They can also be used for injection of drugs containing mannose and thus affect the progress of specific reactions in the immune system. The aim of this paper is to develop a method for the preparation of mannosylated carboxylic acid, an important substructure in the synthesis of the compounds used as potential adjuvants.

Acetylation of D-mannose with anhydride of acetic acid and iodine as catalyst gave 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\alpha$ ,  $\beta$ -D-mannopyranose. Anomeric acetate protection, was selectively removed from the obtained compound using three different ways, all resulting in formation of 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranose. In the third step, *O*-mannoside was prepared by reacting tetraacetylated mannose with *tert*-butyl bromoacetate and potassium carbonate. This reaction gave preferably an  $\alpha$ -anomer of *O*-mannoside. *Tert*-butyl protection was removed from the pure  $\alpha$ -anomer using trifluoroacetic acid in dry dichloromethane giving 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopyranosyloxy) acetate in a good yield. The products structures were characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy.

**Thesis includes:** 43 pages, 17 figures, 5 tables, 31 references, 2 appendices

**Original in:** croatian

**Keywords:** anomeric deacetylation / D-mannose / glycosides / lectins / carbohydrates

**Thesis accepted:** 9.11.2017.

**Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Dajana Gašo-Sokač, PhD; chair
2. Assist. Prof. Martina Šrajcer Gajdošik, PhD; supervisor and member
3. Assist. Prof. Tomislav Balić, PhD; member
4. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović, PhD; substitute member

**Thesis deposited in:** Faculty of Food Technology Library in Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

## SADRŽAJ

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| 1         | UVOD .....  | 6  |
| 2         | LITERATURNI PREGLED .....                                 | 8  |
| 2.1       | UGLJIKOHIDRATI.....                                       | 8  |
| 2.1.1     | MONOSAHARIDI.....   | 9  |
| 2.1.1.1   | D-MANOZA .....  | 11 |
| 2.1.1.2   | METODE ZAŠTITE MONOSAHARIDA U ORGANSKOJ SINTEZI.....      | 12 |
| 2.1.1.2.1 | ANOMERNA DEACETILACIJA MONOSAHARIDA .....                 | 14 |
| 2.2       | GLIKOKONJUGATI.....                                       | 17 |
| 2.2.1     | KEMIJSKA SINTEZA O-GLIKOZIDA .....                        | 19 |
| 2.2.1.1   | DIREKTNA METODA .....                                     | 20 |
| 2.2.1.2   | TRIKLORACETIMIDNA METODA .....                            | 21 |
| 2.2.1.3   | KÖNIGS- KNORR METODA .....                                | 22 |
| 2.3       | LEKTINI.....  | 23 |
| 2.3.1     | LEKTINI KOJI VEŽU MANOZU .....                            | 24 |
| 3         | EKSPERIMENTALNI DIO.....                                  | 25 |
| 3.1       | MATERIJALI I METODE .....                                 | 25 |
| 3.1.1     | KEMIČALIJE .....  | 25 |
| 3.1.1.1   | OTAPALA .....   | 25 |
| 3.1.2     | METODE .....  | 26 |
| 3.2       | PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA SPOJEVA.....                   | 27 |
| 3.2.1     | ACETILIRANJE $\alpha$ -D-MANOPIRANOZE .....               | 27 |
| 3.2.2     | ANOMERNA DEACETILACIJA.....                               | 28 |
| 3.2.2.1   | DEACETILACIJA UZ CINKOV ACETAT .....                      | 29 |
| 3.2.2.2   | DEACETILACIJA UZ AMONIJEV ACETAT.....                     | 30 |
| 3.2.2.3   | DEACETILACIJA UZ MORFOLIN .....                           | 30 |
| 3.2.3     | SINTEZA O-MANOZIDA .....                                  | 30 |
| 3.2.4     | UKLANJANJE <i>TERT</i> -BUTILNE ZAŠTITE.....              | 32 |
| 4         | REZULTATI I RASPRAVA .....                                | 35 |
| 4.1       | ZAŠTITA HIDROKSILNIH SKUPINA D-MANOZE.....                | 35 |
| 4.2       | SELEKTIVNA DEACETILACIJA ANOMERNOG UGLJIKOVOG ATOMA ..... | 36 |
| 4.2.1     | DEACETILACIJA UZ CINKOV ACETAT .....                      | 36 |
| 4.2.2     | DEACETILACIJA UZ AMONIJEV ACETAT.....                     | 36 |
| 4.2.3     | DEACETILACIJA UZ MORFOLIN .....                           | 37 |
| 4.3       | SINTEZA O-GLIKOZIDA.....                                  | 38 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.4 | UKLANJANJE <i>TERT</i> -BUTILNE ZAŠTITE..... | 39 |
| 5   | ZAKLJUČAK .....                              | 40 |
| 6   | LITERATURNÁ VRELA.....                       | 41 |
| 7   | DODACI .....                                 | 43 |
| 7.1 | POPIS KRATICA .....                          | 43 |
| 7.2 | ŽIVOTOPIS .....                              | 44 |

## 1 UVOD

Ugljikohidrati su jedna od najzastupljenijih skupina organskih/prirodnih spojeva. Dije se na monosaharide i polisaharide. Osim šećera i škroba koji zadovoljavaju vitalnu i nutritivnu ulogu, ugljikohidrati također služe kao strukturni materijal (celuloza), kao mjesta prepoznavanja na staničnim površinama i jedna su od tri bitne strukturne komponente DNA i RNA te ATP-a, molekule za prijenos energije.

Glikokonjugat je općenito ime za ugljikohidrate koji su kovalentno vezani na druge kemijske vrste. U ovu skupinu spojeva ubrajaju se glikoproteini, glikopeptidi, peptidoglikani, glikolipidi i lipopolisaharidi. Sintetski glikopeptidi služe kao modelni spojevi u istraživanju uloga staničnih glikoproteina [1]. Zbog polifunkcionalnosti njihovih sastavnih dijelova, kemijska sinteza glikozida je otežana pa je pri sintezi nužno načiniti niz koraka selektivne zaštite i aktivacije.

Lektini su proteini koji prepoznaju i vežu ugljikohidrate. Neki od njih su vrlo specifični za određene monosaharide, kao što je D-manoza, što objašnjava razlog njihovog odabira kao sastavnog dijela sintetski pripremljenih glikokonjugata [2]. Dodatni razlog je i činjenica da se glikozilacijom biološki aktivnih spojeva često povećava aktivnost lektina [3].

D-Manoza je sastavni dio staničnih i transmembranskih glikoproteina, u kojima sudjeluje u procesima staničnog prepoznavanja i vezivanja [4]. Oligomanozidi su spojevi koji se vežu na skupinu lektina specifičnih za manozu tzv. proteini koji vežu manozu (MBP, engl. *mannose-binding proteins*), a imaju ključnu ulogu u imunološkoj reakciji organizma na mikrobijalne infekcije [2]. D-Manoza djeluje i na eliminaciju bakterije *Escherichia coli* kod infekcija urinarnog trakta. Vezanjem manoze na bakterijske lektine onemogućava se vezanje bakterija na stanice epitela [2].

U ovom će radu biti riječi o ugljikohidratima, gdje će se nešto više spominjati D-manoza. Priprava konačnog spoja ovom sintezom zahtijeva i određene korake zaštite, te potom uklanjanje samo jedne hidroksilne skupine, o čemu će biti riječ u poglavljima: metode zaštite monosaharida u organskoj sintezi i anomerna deacetilacija monosaharida. Sljedeće poglavlje su glikokonjugati u kojima će se, između ostalog, opisati kemijska sinteza *O*-glikozida. I na kraju literaturnog pregleda se spominju lektini te poseban tip lektina – manozni receptori i proteini koji vežu manozu. U eksperimentalnom dijelu navesti će se materijali i metode korištene za sintezu konačnog spoja, te opis pojedinih

koraka u sintezi. I na samom kraju će se prokomentirati rezultati i zaključiti ovaj diplomski rad.

Svrha ovog rada bila je priprava spoja 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline, važne podstrukture u sintezi spoja koji bi bio potencijalni adjuvant. Imunostimulatori, poznati i kao adjuvanti, su spojevi koji se dodaju cjepivima kako bi se ubrzala, produžila ili pojačala specifična imunoreakcija na određeni antigen.



## 2 LITERATURNI PREGLED

### 2.1 UGLJIKOHIDRATI

Ugljikohidrati, obično poznati kao jednostavni i složeni šećeri, su najrasprostranjenija skupina prirodnih spojeva [5]. Prisutni su u svim oblicima biljnog i životinjskog svijeta gdje imaju niz važnih uloga nužnih za život organizama. Ugljikohidrati su skladišta kemijske energije. Sintetiziraju se u zelenim biljkama i algama fotosintezom, procesom koji koristi energiju sunca za pretvorbu ugljikovog dioksida i vode u glukozu i kisik. Osim njihove uloge u metabolizmu i kao strukturnih građevnih blokova, oni su temeljni sastojci svake stanice, gdje su uključeni u ključne procese staničnog prepoznavanja.

Ugljikohidrati, možda najkorisnije molekule u živim sustavima, tradicionalno su povezani s proizvodnjom energije, no njihovo djelovanje s lektinima čini ih, sve više i više, atraktivnim u pogledu potencijalnih lijekova. U mnogim slučajevima, biološka aktivnost prirodnih proizvoda proizlazi iz šećernih dijelova. Pa tako promjene u strukturama šećera mogu utjecati na biološka svojstva roditeljskih spojeva. Nadalje, funkcijska svojstva lijekova kao što su topljivost, farmakokinetika ili farmakodinamika mogu se pojačati uključivanjem ugljikohidratnih dijelova u molekule [6].

Iako ugljikohidrati imaju važnu ulogu u ogromnom nizu bioloških procesa, ugljikohidratni lijekovi pokrivaju samo ograničeno područje svijeta terapeutika [7]. Mnoge patofiziološki važne interakcije ugljikohidrata i proteina još nisu iskoristive kao izvor novih lijekova. Jedan razlog mogu biti farmakokinetički nedostaci koji su inherentno povezani s ugljikohidratima. Kao rezultat njihovog visokog polariteta, ugljikohidrati ne mogu pasivno proći kroz enterocitni sloj u tankom crijevu, što je preduvjet za oralnu dostupnost [7]. U tu svrhu se sintetiziraju glikomimetici [8], spojevi dizajnirani kako ispravili nedostatke koje ugljikohidrati imaju (niska propusnost u tkiva, slaba stabilnost). Glikomimetici pokazuju poboljšane karakteristike slične lijekovima, oponašajući bioaktivnu funkciju ugljikohidrata.

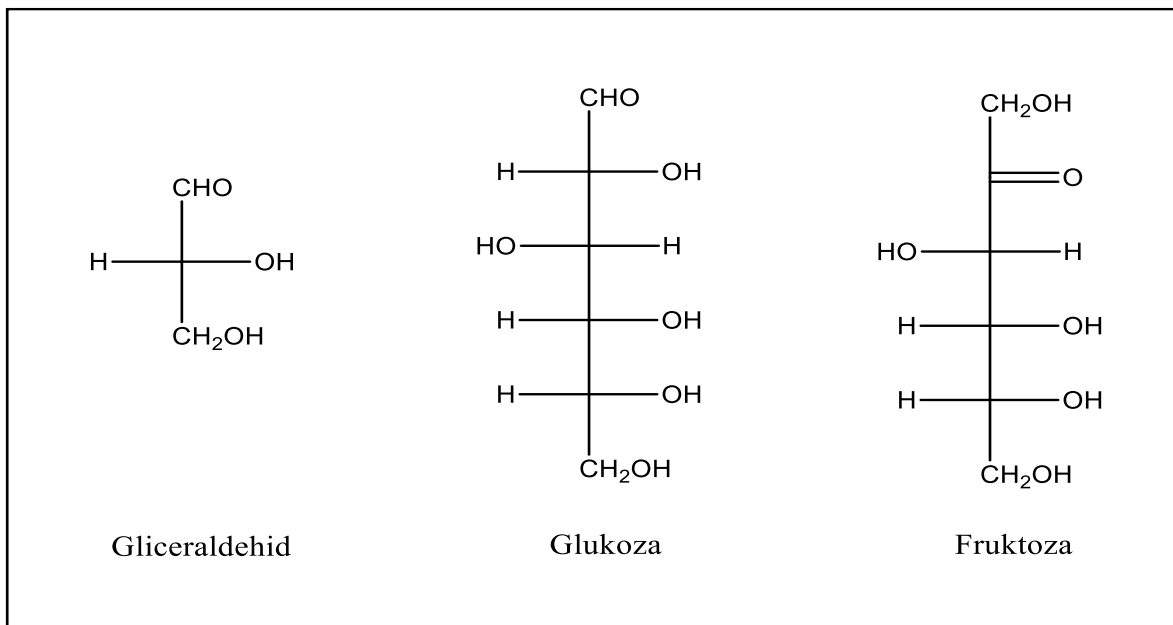
Ime, ugljikohidrati, su dobili zbog njihove općenite kemijske formule  $C_m(H_2O)_n$  što ih čini hidratima ugljika [5]. Dijeleg se na jednostavne (monosaharidi) i složene ugljikohidrate (disaharidi, oligosaharidi i polisaharidi).

Najrasprostranjeniji monosaharid u prirodi je glukoz, a disaharid saharoz, koja se sastoji od glukoze i fruktoze kao monosaharidnih jedinica. Oligosaharidi sadrže 3-10

monosaharidnih jedinica, a polisaharidi od 10 na više. Najčešći polisaharidi su škrob i glikogen koji imaju funkciju skladištenja energije te celuloza koja ima strukturnu ulogu u stanicama biljnog podrijetla.

### 2.1.1 MONOSAHARIDI

Najjednostavniji ugljikohidrati nazivaju se monosaharidi ili jednostavni šećeri [5]. U prirodi postoje kao aldoze (polihidroksialdehidi) i ketoze (polihidroksiketoni). Imaju tri do sedam atoma ugljika u lancu pa se prema tome dijele na treoze, tetroze, pentoze, heksoze itd. Ovi se pojmovi zatim kombiniraju s riječima aldoza i ketoza, kako bi se, uz broj atoma ugljika, odredilo i sadrže li aldehidnu ili keto-skupinu. Time bi gliceraldehid bio aldotrioza (tri atoma ugljika i aldehidna skupina), glukoza aldoheksoza (šest atoma ugljika i aldehidna skupina), a fruktoza je ketoheksoza (šest atoma ugljika i keto skupina) (Slika 1.).

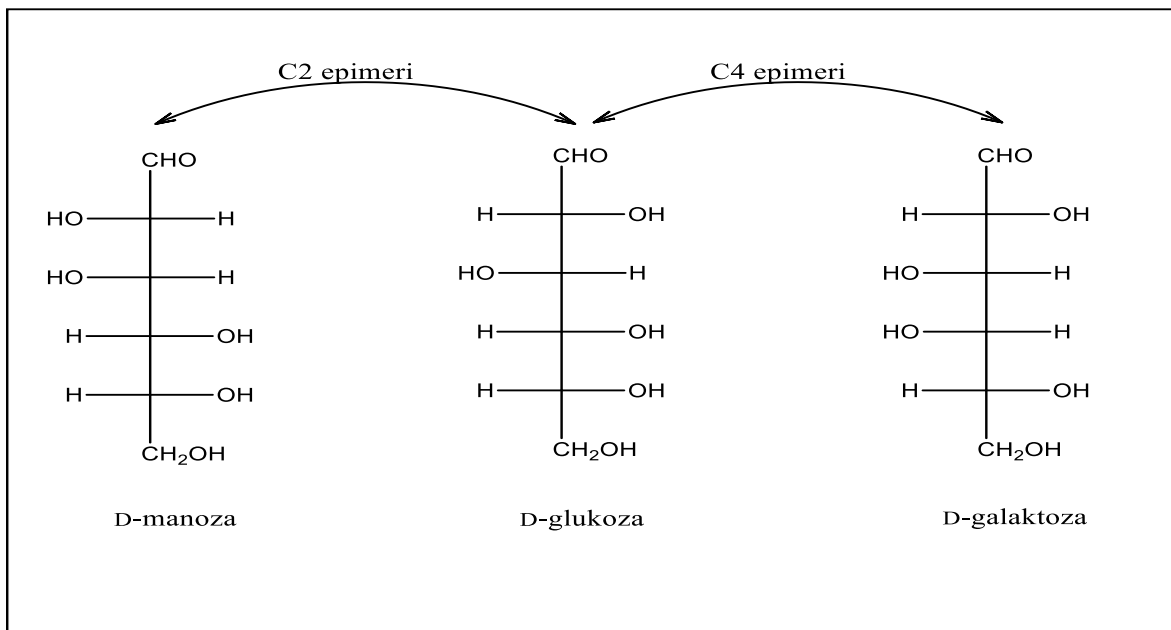


Slika 1. Fischerove projekcijske formule D-gliceraldehida, D-glukoze i D-fruktoze

Značajka ugljikohidratne strukture je prisustvo stereogenog ili asimetričnog centra [5]. Asimetrični ugljikov atom je onaj atom na kojem su vezane četiri različite skupine. Svi ugljikohidrati, osim dihidroksiacetona, sadrže jedan ili više stereogenih centara.

Najjednostavniji aldehid, gliceraldehid, ima jedan stereogeni centar pa postoje dva moguća enantiomera. Prefiksi R i S upotrebljavaju se za označavanje apsolutne konfiguracije stereogenih centara. Za prikazivanje gliceraldehida i ostalih monosaharida najčešće se koristi Fischerova projekcijska formula. Položaj hidroksilne skupine u gliceraldehidu na asimetričnom ugljikovom atomu određuje D- (hidroksilna skupina desno) ili L- (hidroksilna skupina lijevo) konfiguraciju. Glukoza i svi drugi prirodni šećeri su D-šećeri. Prema tome, monosaharidi se razlikuju po konfiguraciji njihovih stereogenih centara.

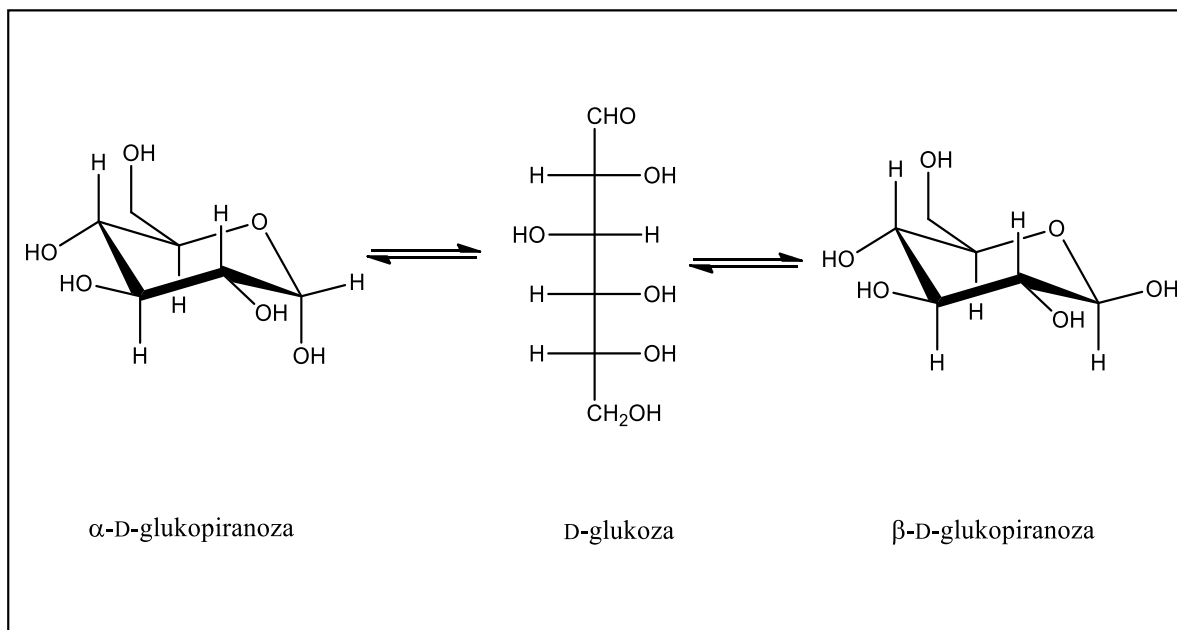
Dijastereomere koji se razlikuju u konfiguraciji na samo jednom asimetričnom centru, nazivamo epimerima. Tako je D-manoza C2 epimer, a galaktoza C4 epimer D-glukoze (Slika 2.) [5]. Monosaharidi, osim u ravnolančanom, postoje i u cikličkom, hemiacetalnom obliku [5]. Hidroksilne i karbonilne skupine monosaharida podliježu intramolekulskim reakcijama ciklizacije kako bi se formirali hemiacetali koji imaju ili pet ili šest atoma u prstenu. Kao posljedica povezivanja monosaharida u cikličku strukturu, javlja se novi asimetričan C-atom, tzv. anomerni ugljikov atom.



Slika 2. Strukturni odnosi D-manoze, D-glukoze i D-galaktoze

Ciklički hemiacetalni piranozni oblik nastaje intramolekulskom reakcijom hidroksilne skupine na C5 atomu s aldehidnom skupinom. Nastaju dva ciklička

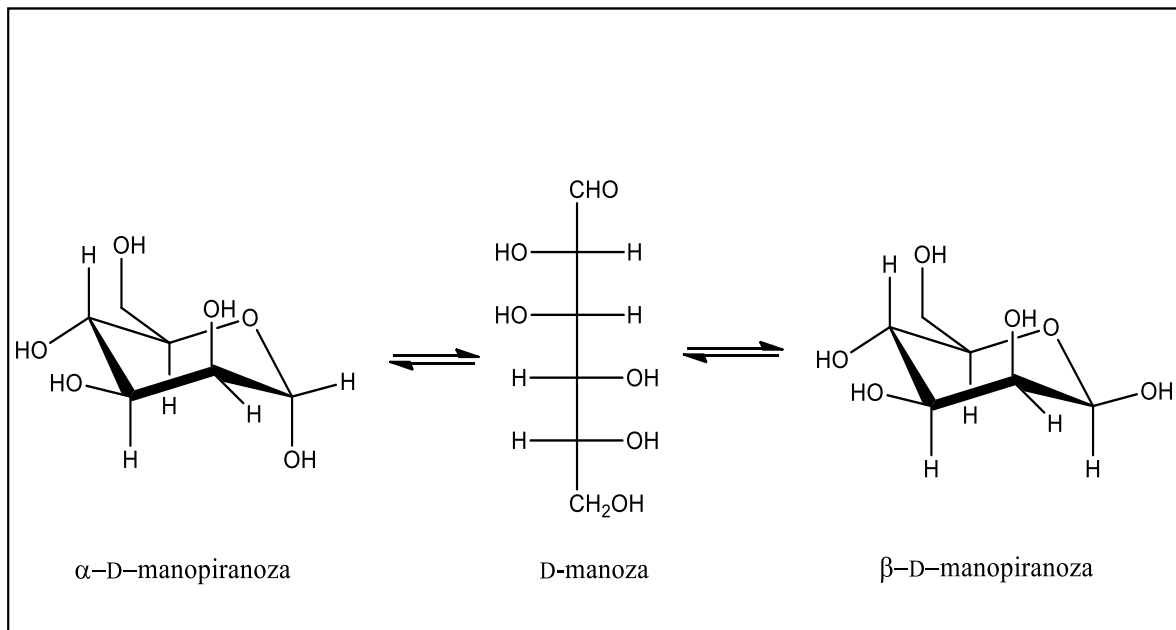
dijastereomera ( $\alpha$ - i  $\beta$ - anomeri) jer se adicijom na aldehidnu skupinu generira novi stereogeni centar, odnosno anomerni ugljikov atom. Slika 3. prikazuje ravnotežu između tri oblika D-glukoze u vodenoj otopini. Iako bi iz steričkih razloga bio preferiran  $\beta$ -anomer, s obzirom da su hidroksilne skupine na C1 i C2 položaju najudaljenije jedna od druge, u otopini D-glukoze omjer  $\alpha$ : $\beta$  iznosi 36 : 64 dok u otopini D-manoze taj omjer iznosi 69 : 31 [4]. Kod glikozida ovaj omjer ovisi o strukturnim svojstvima skupina koje su vezane na anomernom ugljikovom atomu.



Slika 3. Oblici D-glukoze

### 2.1.1.1 D-MANOZA

D-manoza je aldoheksoza, C2 epimer D-glukoze, čija je struktura prikazana na Slici 4. D-manoza je bijeli kristalni prah, topljiv u vodi, koji obično dolazi u dva različita prstenasta oblika, piranozni (šesteročlani) i furanozni (peteročlani). Svaki prsten može imati  $\alpha$ - ili  $\beta$ -konfiguraciju na anomernom položaju.  $\alpha$ -D-manoza je slatkog okusa dok je  $\beta$ -D-manoza gorka [4]. Čista otopina  $\alpha$ -D-manoze vremenom gubi svoju slatkoću prelaskom u  $\beta$ -D-manozu [4]. Otprilike 60 % D-manoze u otopinama se javlja u kristaliziranom obliku  $\alpha$ -D-manopiranoze, a ostalo je  $\beta$ -D-manopiranoza [9].



Slika 4. Oblici D-manoze

Pokazano je da manozna ima važnu ulogu u glikozilaciji određenih proteina. U ovom procesu uključeni su neki unutarstanični proteini, kao što su lektini, šaperoni i enzimi za preradu polisaharida. Manozna nije esencijalna hranjiva tvar, može se proizvesti u ljudskom tijelu od glukoze [9]. Važna je komponenta polisaharida te staničnih i transmembranskih glikoproteina gdje ima ulogu u staničnom prepoznavanju i vezivanju. Naširoko se koristi u hrani, farmaceutskoj (kao dodatak prehrani te kao početni materijal za sintezu lijekova) i peradarskoj industriji.

### 2.1.1.2 METODE ZAŠTITE MONOSAHARIDA U ORGANSKOJ SINTEZI

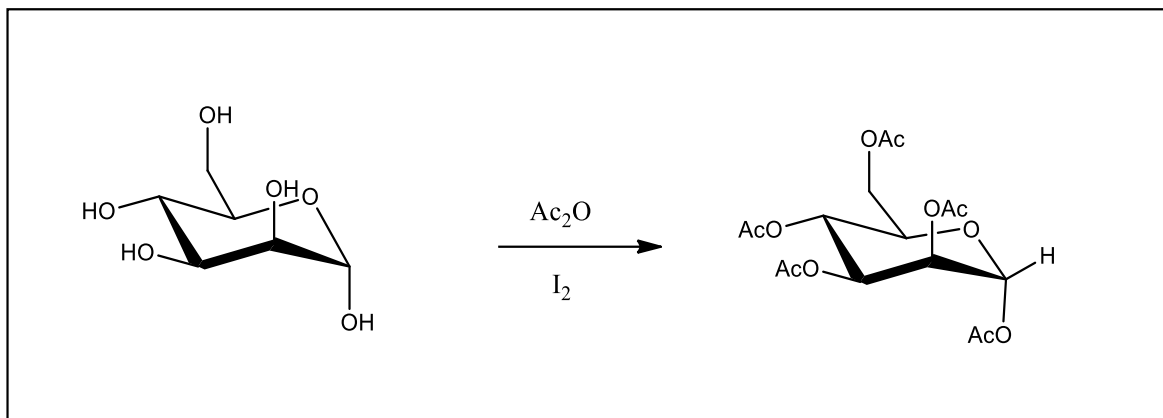
Kada se kemijska reakcija selektivno odvija na jednom mjestu u spoju koji ima više reaktivnih funkcijskih skupina, druga reaktivna mjesta moraju biti privremeno zaštićena [10]. Mnogo se zaštitnih skupina razvija i razvijeno je u tu svrhu. Zaštitna grupa mora ispuniti niz zahtjeva [10]. Mora reagirati selektivno i u dobrom iskorištenju kako bi se dobio zaštićeni supstrat koji je stabilan za slijedeće reakcije. Ona također, mora biti uklonjena s dobrim prinosom, uz netoksični reagens koji ne reagira s regeneriranom

funkcijskom skupinom. Uvođenjem zaštitne skupine treba nastati derivat (bez stvaranja novih stereogenih centara) koji se lako može odvojiti od ostalih produkata. Zaštitna skupina treba imati minimalno dodatnih funkcijskih skupina kako bi se izbjegla nova reakcijska mjesta. Može se reći da nijedna zaštitna skupina nije najbolja zaštitna skupina, s obzirom da je vrlo teško ispuniti sve ove zahtjeve.

Za odabir specifične zaštitne skupine, moraju se detaljno razmotriti uvjeti reakcije i funkcijske skupine u polaznom spoju, kako bi se odredile one koje bi bile nestabilne u određenim reakcijskim uvjetima. Zatim treba ispitati reaktivnost mogućih zaštitnih skupina, u svrhu određivanja njihovih kompatibilnosti s uvjetima reakcije. Jedna skupina se može upotrijebiti kao zaštita za više različitih funkcijskih skupina. Time se poboljšava ukupan prinos reakcije i smanjuju koraci u samoj sintezi željenog spoja (npr. benzilna skupina, uklonjena hidrogenolizom, za zaštitu alkohola i karboksilne kiseline) [10].

Hidroksilne skupine su prisutne u brojnim spojevima koji su biološki i sintetski značajni, kao npr. ugljikohidrati, nukleozidi, steroidi, makrolidi te polieteri. Najvažnije zaštitne skupine za alkohole su eteri i miješani acetali [11]. Eteri su među najčešćim korištenim zaštitnim skupinama u organskoj sintezi. Oni se razlikuju od najjednostavnijeg i najstabilnijeg metil-etera do složenijih, supstituiranih etera, razvijenih za uporabu u sintezi nukleotida. Esterska zaštita blokira hidroksilnu skupinu kako ne bi reagirala s oksidansima, elektrofilima i bazama tako što delokalizira elektronski par s kisikova atoma hidroksilne skupine [6]. Esteri su vrlo stabilne zaštitne skupine, pružaju učinkovitu zaštitu u reakcijama glikozidacije kao i u mnogim drugim reakcijama. Najčešće korištena esterska skupina je acetatna.

U ugljikohidratnoj se kemiji, koristi jod za promicanje formiranja i cijepanja izopropiliden acetala, za reakcije glikolizacije, te za promicanje sintetički korisnih reakcija aciliranja, kao što su acetilacija i benzoiliranje [12]. Fenoli i tercijarni alkoholi se kvantitativno acetiliraju uz acetanhidrid ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) i jod uz iskorištenje od 85 do 100% (Slika 5.) [12]. Lewisova kiselost joda dobro je karakterizirana: reagira s elektron bogatim otapalima i reagensima (može poslužiti za polarizaciju kiselih anhidrida, te se može reći da je promotor reakcija aciliranja) [12]. Tipičan postupak acetilacije nezaštićenih šećera uključuje dodavanje joda u suspenziju šećera u anhidridu octene kiseline na sobnoj temperaturi (reakcija je egzotermna).



Slika 5. Uvođenje acetatne zaštitne skupine

#### 2.1.1.2.1 ANOMERNA DEACETILACIJA MONOSAHARIDA

Per-*O*-acetilacija, acetilacija u kojoj su sve hidroksilne skupine acetilirane, jedna je od najčešće korištenih metoda za zaštitu hidroksilnih skupina ugljikohidrata [13]. Strukturna razjašnjenja mnogih prirodnih proizvoda koji sadrže ugljikohidrate, potvrđena su transformacijom u njihove per-*O*-acetate [13]. Acetilacija šećera se obično provodi uporabom anhidrida octene kiseline u prisustvu bazičnog ili kiselog katalizatora kao što su piridin,  $ZnCl_2$ , litijev perklorat,  $HClO_4-SiO_2$ , jod i molekularna sita [13].

Piridin je najčešće korišten katalizator u per-*O*-acetilaciji šećera [13]. Međutim, zbog toksičnosti i neugodnog mirisa piridina, rukovanje velikim količinama nije sigurno. Prikladnija metoda za reakcije acetiliranja je ona koja koristi jod kao katalizator. Kako je već napomenuto, jod je djelotvorna Lewisova kiselina koja u kontroliranim uvjetima može dovesti do regioselektivne acetilacije ugljikohidratnih derivata uz visoki prinos. Jod se može ukloniti iz reakcijske smjese filtracijom.

Per-*O*-acetilacijom šećera s acetatnim anhidridom i katalitičkim jodom nastaju piranozni proizvodi kao anomerne smjese u visokom iskorištenju (90-99 %). Rezultati za per-*O*-acetilaciju, uz jod, ilustrirani su u Tablici 1. za niz pentoza, heksoza i disaharida [14].

Tablica. 1 Per-*O*-acetilacija šećera, uz acetanhidrid i jod kao katalizator [14]

| Šećer                       | Produkt                          | Vrijeme (h) | $\alpha:\beta$ | Iskorištenje (%) |
|-----------------------------|----------------------------------|-------------|----------------|------------------|
| <b>D-glukoza</b>            | D-glukopiranoza<br>pentaacetat   | 2           | 10:1           | 98               |
| <b>L-arabinoza</b>          | L-arabinopiranoza<br>tetraacetat | 1           | 1:3            | 95               |
| <b>D-ksiloza</b>            | D-ksilopiranoza<br>tetraacetat   | 1           | 4:1            | 93               |
| <b>D-galaktoza</b>          | D-galaktopiranoza<br>pentaacetat | 2           | 10:1           | 98               |
| <b>D-manoza</b>             | D-manopiranoza<br>pentaacetat    | 0,5         | 2,5:1          | 98               |
| <b>L-ramnoza monohidrat</b> | L-ramnopiranoza<br>tetraacetat   | 0,25        | 3:1            | 94               |
| <b>L-fukoza</b>             | L-fukopiranoza<br>tetraacetat    | 0,25        | 11:1           | 98               |
| <b>D-maltoza monohidrat</b> | D-maltoza<br>octaacetat          | 2           | 10:1           | 89               |
| <b>D-laktoza</b>            | D-laktoza<br>octaacetat          | 2           | 12:1           | 91               |
| <b>D-celebioza</b>          | D-celebioza<br>octaacetat        | 2           | 12:1           | 93               |

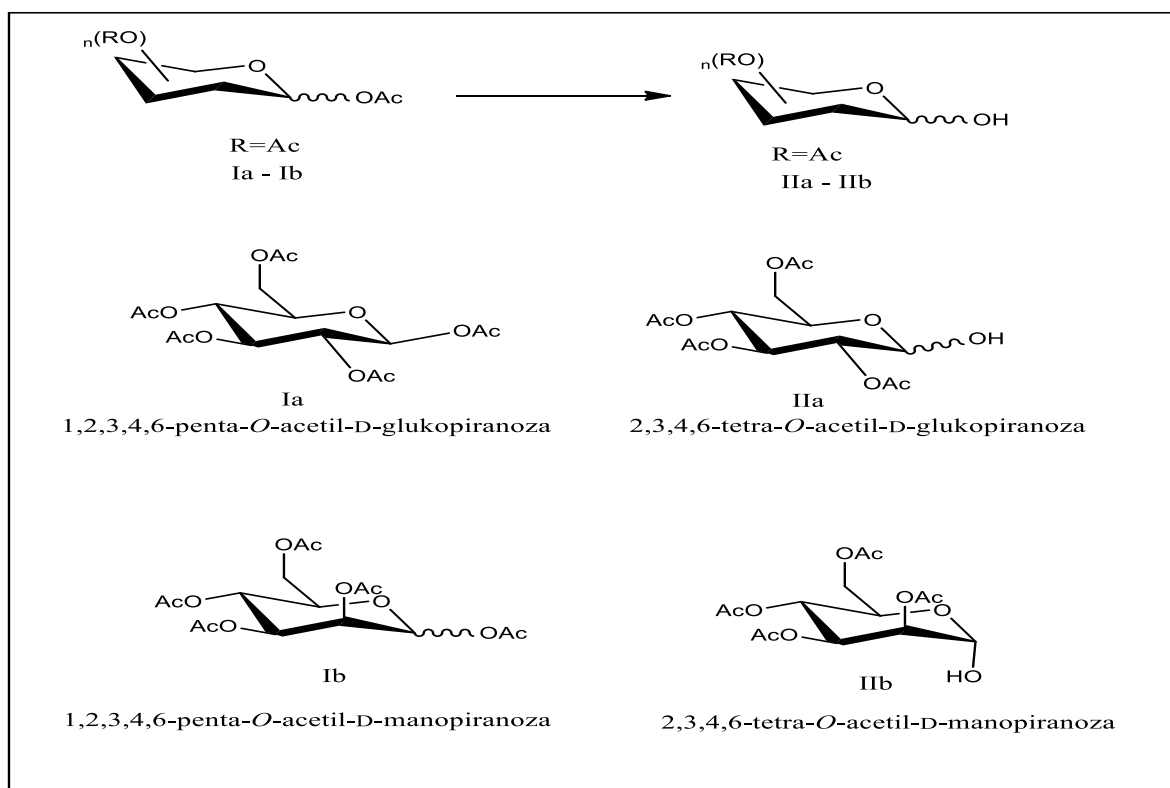
Različiti per-*O*-acetilirani glikopiranozidi (mono- ili disaharidi) se mogu transformirati u cijeli skup različitih, monooksidiranih 1-alkohola, 3-alkohola, 4-alkohola i



6-alkohola u visokim prinosima [15]. Prikladno zaštićeni 1-hidroksi šećeri, naročito acetilirani 1-hidroksi šećeri, važni su građevini blokovi za izgradnju raznih glikozilnih donora, koje se široko koriste za reakcije glikozilacije [16].

Osim hidrolizom glikozil-halida, acetilirani 1-hidroksi šećeri obično se pripremaju anomernim deacetiliranjem potpuno acetiliranih derivata s bazičnim ili kiselim reagensima. Selektivna anomerna deacetilacija često je ključni korak u sintezi oligosaharida. Brzina same reakcije varira ovisno o anomernoj konfiguraciji šećera i acetatnoj skupini [16]. Stoga je korisno imati veliki izbor reagenasa koji se primjenjuju u tu svrhu.

Razvijena je alternativna metoda za anomernu deacetilaciju potpuno acetiliranih ugljikohidratnih derivata koja, kao katalizator, koristi cinkov acetat dihidrat u metanolu pod blagim uvjetima. Eksperimentalna jednostavnost, niska cijena, prihvatljivo iskorištenje, uporaba jednostavnog kiselog katalizatora i ekološki prihvatljivija reakcija, neke su od prednosti ove metode. Cinkov acetat se koristi kao blagi katalizator (Lewisova kiselina) u mnogim organskim reakcijama. Anomerom deacetilacijom potpuno acetiliranih šećera cinkovim acetatom dihidratom (Slika 6.) nastaju acetilirani 1-hidroksi šećeri, što je



Slika 6. Selektivna deacetilacija anomerne acetatne skupine uz cinkov acetat

prikazano u Tablici 2. Ova metoda je osobito vrijedna kada su osnovni reagensi nepovoljni za anomernu deacetilaciju [17].

Tablica 2. Anomerna deacetilacija odabranih ugljikohidrata uz cink-acetat kao katalizator [17]

| Substrat | Produkt | Vrijeme reakcije (h)   | Iskorištenje (%) | $\alpha:\beta$ |
|----------|---------|------------------------|------------------|----------------|
| Ia       | IIa     | 4                      | 75               | 4 : 1          |
| Ia       | IIa     | 24 (sobna temperatura) | 72               | 4 : 1          |
| Ib       | IIb     | 3                      | 80               | 1 : 0          |

## 2.2 GLIKOKONJUGATI

Glikokonjugati se sastoje od oligosaharida kovalentno vezanog s proteinima ili lipidima. Konjugati ugljikohidrata povezanih s proteinima mogu biti proteoglikani ili glikoproteini. Ove dvije skupine glikokonjugata imaju različite funkcije. U proteoglikanima su oligosaharidi kovalentno vezani na male polipeptide te stoga imaju vrlo visok sadržaj ugljikohidrata u usporedbi s glikoproteinima [18].

Glikoproteini su strukturno različiti i imaju mnoge funkcije (Tablica 3.). Pojavljuju se u topljivim oblicima u ekstracelularnim tekućinama ili se vežu za membranu. Udio ugljikohidrata značajno varira u glikoproteinima izvedenim iz različitih tkiva i različitih izvora. U glikoproteinima ugljikohidrati mogu biti povezani s tri vrste veza: *O*-glikozidna veza, *N*-glikozidna veza i glikozilfosfatidilinozitol (GPI) - sidreno vezanje [18]. Približno 50% proteina dobivenih iz eukariotskih stanica su glikozilirani [19]. Strukture polisaharida su važne jer mogu utjecati na mnoga biološka svojstva glikoproteina uključujući farmakokinetiku, bioaktivnost, sekreciju, topljivost te prepoznavanje receptora [19].

Aminokiselinski ostatak koji sudjeluje u *N*-glikozidnoj vezi je asparagin, a aminokiselinski ostatci koji sudjeluju u *O*-glikozidnoj vezi su serin, treonin, hidroksilizin i

hidroksiprolin. Glikoproteini s *O*-glikozidnim vezama ne pokazuju zajedničke značajke glikoproteina s *N*-glikozidnom vezom. Broj šećernih ostataka može varirati od jednog do mnogo više.

Oligosaharidni bočni lanci glikoproteina sastoje se od ograničenog broja (oko 11) različitih monosaharida. To su heksoze i njihovi derivati (*N*-acetilheksozamin, uronska kiselina i deoksiheksoza), pentoze i sialne kiseline dobivene od neuraminske kiseline, šećera s devet ugljikovih atoma. Najčešća sialinska kiselina je *N*-acetilneuraminska kiselina.

U svim glikoproteinima, polipeptidna komponenta se sintetizira prva na ribosomima vezanim na membranu grubog endoplazskog retikuluma. Ugljikohidratni bočni lanci se dodaju tijekom prolaska polipeptida kroz endoplazmatski retikulum i Golgijevo tijelo [18]. Dodaci ugljikohidrata uključuju specifične glikoziltransferaze i njihove supstrate (uridin difosfatni šećeri) i, u nekim glikoproteinima, oligosaharidni nosač poznat kao dolikol (lipid) [18].

**Tablica 3. Uloge glikoproteina u tijelu**

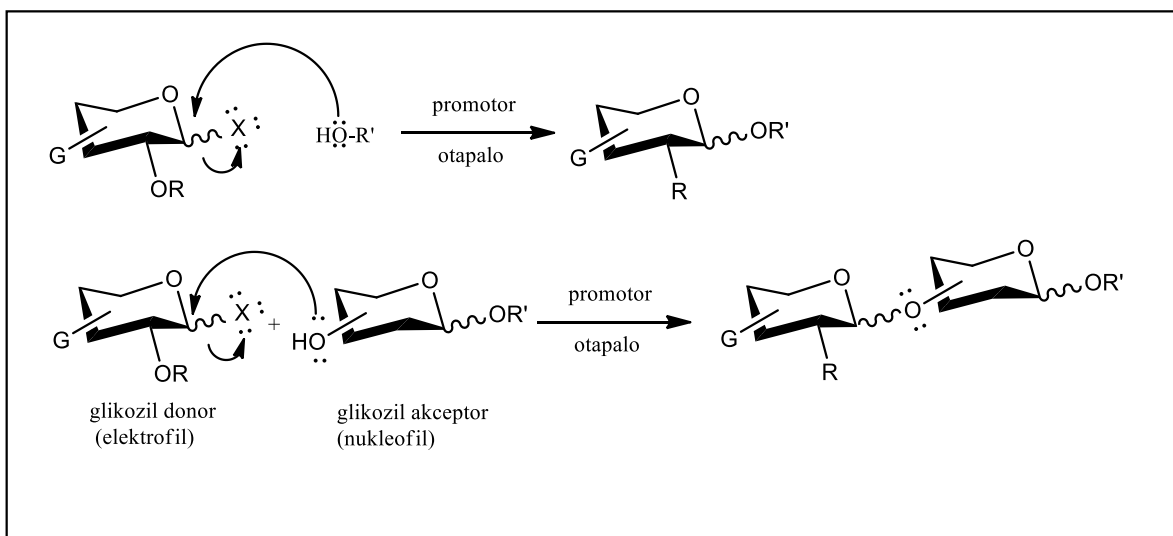
| <b>Funkcija</b>                                 | <b>Primjer</b>  |
|---|---|
| <b>Struktura</b>                                | Kolagen   |
| <b>Transport</b>                                | Ceruloplazmin (nosač bakra), transferin (nosač željeza)                                 |
| <b>Endokrina regulacija</b>                     | Tirotropin, korionski gonadotropin, eritropoetin  |
| <b>Kataliza</b>                                 | Proteaze, nukleaze, glikozidaze, hidrolaze  |
| <b>Obrana protiv infekcije</b>                  | Imunoglobulini, komplement proteini, interferon, selektini i integrini                  |
| <b>Membranski receptori</b>                     | Receptori hormona (npr. inzulin), acetilkolin, elektromagnetno zračenje (npr. rodopsin) |
| <b>Prepoznavanje stanica i adhezija stanica</b> | Fibronektin, lam  |

Glikokonjugati su bioaktivne molekule koje imaju ključnu ulogu u mnogim normalnim i patološkim procesima [20]. Mehanizmi koji upravljaju njihovim biološkim ponašanjem na molekularnoj razini, uključuju, u velikoj mjeri, interakcije ugljikohidrata i proteina i ugljikohidrata s ugljikohidratima [20]. Ključna karakteristika ugljikohidrata je izrazito slab afinitet. Stoga se oni u biološkim sustavima obično pojavljuju raspoređeni u multivalentnim klasterima s pravilnom orijentacijom i razmakom kako bi se postigao visoki afinitet za odgovarajuće ligande [20]. Iz tog su razloga, istraživanja o dizajnu i sintezi viševalentnih modelnih sustava, koji bi mogli oponašati prirodu biomolekula, od vrlo velike važnosti.

### 2.2.1 KEMIJSKA SINTEZA O-GLIKOZIDA

Glikozidi su ciklički acetali koji se sastoje od šećerne komponente tj. glikona i aglikona koji je vezan na njegov anomerni centar glikozidnom vezom. Veza može biti ostvarena preko različitih atoma i time razlikujemo *O*-, *N*-, *S*- i *C*-glikozidnu vezu [21].

Stvaranje glikozidne veze (Slika 7.) općenito zahtijeva aktivaciju šećera na anomernom centru. U tu svrhu koriste se anomerne reakcije izmjene kisika, kao što je Königs-Knorr metoda i varijacije ili, alternativno, aktivacija kroz zadržavanje anomernog kisika, trikloracetimidnom metodom. Postoji, također i direktna metoda stvaranja glikozidne veze iz peracetiliranog šećera [22].



Slika 7. Formiranje glikozidne veze

Opća strategija za stvaranje glikozidnih veza:

- prvi korak je aktivacija anomernog centra pri stvaranju stabilnog glikozil-donora
- drugi korak je katalitički prijenos glikozil-donora na akceptor [22].

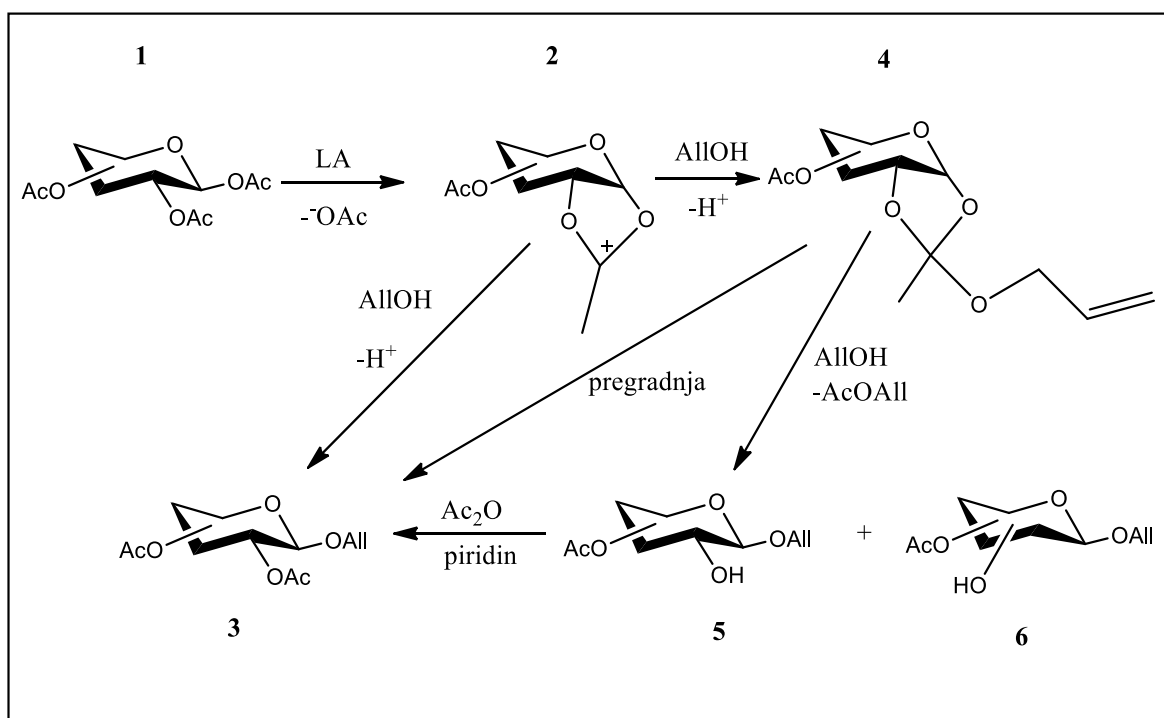
Glikozidna veza se formira nukleofilnim premještanjem odlazeće skupine (X), vezane na anomernom ugljiku šećernog ostatka, od strane alkohola ROH, ili OH grupe djelomično zaštićenog dijela šećera. Spoj koji „daje“ glikozilnu skupinu, zove se glikozil-donor a alkohol koji ga prima, poznat je kao glikozilni akceptor. Reakcija je općenito izvedena u prisutnosti aktivatora nazvanog „promotor“. Uloga promotora je pospješiti izdvajanje odlazeće skupine. Promotori se često upotrebljavaju u katalitičkim količinama, iako se u nekim slučajevima koriste stehiometrijski [21].

### 2.2.1.1 DIREKTNA METODA

Direktna metoda glikozilacije koristi se u sintezi jednostavnih glikozida koristeći peracetilirane monosaharide kao glikozil-donore uz Lewisove kiseline kao aktivatore, Najčešće Lewisove kiseline su  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , trimetil-silil-trifluormetan sulfonat (TMSOTf) ili  $\text{SnCl}_4$ .

Iako postoje izvještaji o visokim prinosima glikozilacije i dobrim stereokontrolama ostvarenim s peracetiliranim donorima, posebno za sintezu *O*-aril glikozida, često su reakcijske učinkovitosti razočaravajuće niske. Stoga je, unatoč činjenici da se klasični peracetilirani donori mogu lako pripremiti i pohraniti, njihova upotreba uglavnom zamijenjena modernim glikozilnim donorima kao što su trikloracetimidi i tioglikozidi [23].

Sam mehanizam reakcije se odvija prema shemi prikazanoj na Slici 8: Lewisova kiselina (LA) potiče glikozilaciju s peracetiliranim glikozilnim donorima **1**. Alilni alkohol može reagirati s kationskom vrstom **2** na dva različita položaja koja dovode do alilglikozida **3** ili orto-estera **4**, koji se mogu prerasporediti da proizvode alil-glikozid **3** ili reagiraju s alil-alkoholom djelomično oslobođenog alil-glikozida pri čemu nastaje **5** i eventualno **6**, a koji mogu biti reacetilirani do **3** [23].



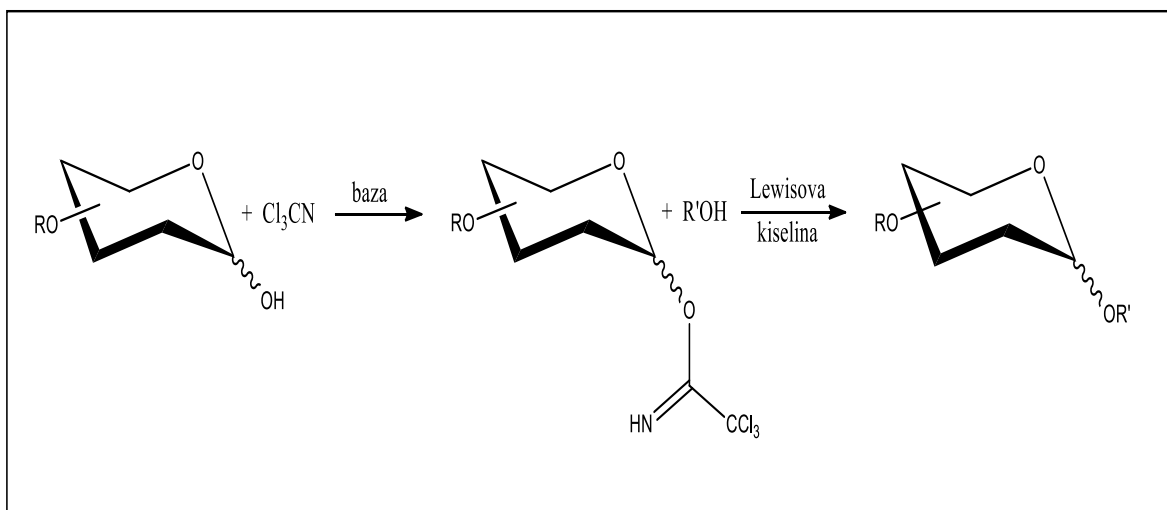
Slika 8. Shema sinteze glikozida direktnom metodom

### 2.2.1.2 TRIKLORACETIMIDNA METODA

Aktivacijski se korak sastoji od jednostavno bazno-katalizirane adicije (najčešće  $NaH$ ,  $DBU$  i  $K_2CO_3$  [24]) anomerne hidroksilne skupine na trostruku vezu trikloroacetonitrila, dok glikozilacijski korak zahtjeva samo katalitičke količine jednostavne (Lewisove) kiseline (najčešće su to adukti borova (III) fluorida i dietil-etera ( $BF_3 \cdot Et_2O$ ) i  $TMSOTf$ ) za stvaranje jakih glikozil donorskih svojstava, što dovodi do željenog glikozida (Slika 9.). Uporabom jače baze reakcija ide stereospecifično prema  $\alpha$ -anomeru [24].

Zbog slabe bazičnosti oslobođenog trikloroacetamida, (Lewisova) kiselina potrebna za aktivaciju *O*-glikozil trikloroacetimida se otpušta i spremna je za daljnju aktivaciju neizreagiranih glikozilnih donora [22].

Ako je monosaharid zaštićen npr. acetatima, reakcija glikozilacije dat će 1,2-trans glikozid dok se 1,2-cis glikozidi mogu pripraviti uporabom jače Lewisove kiseline i polarnijeg otapala te izvođenjem reakcije pri nešto višoj temperaturi [24].



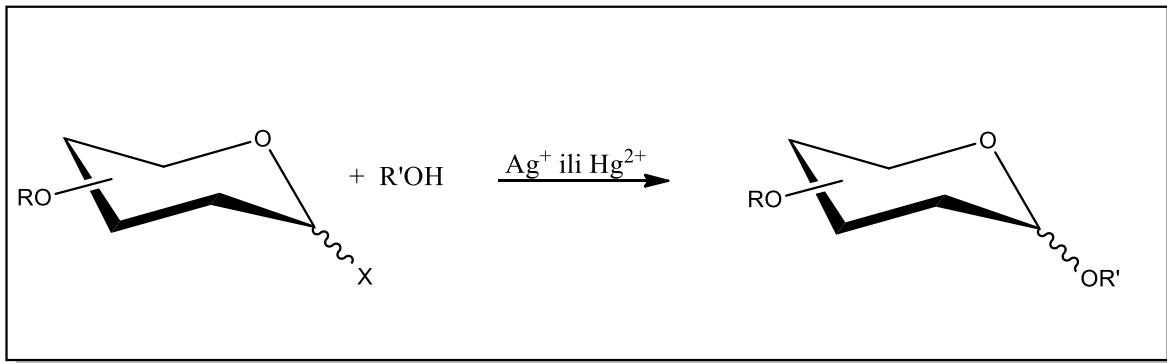
Slika 9. Shema Trikloracetimidne metode

### 2.2.1.3 KÖNIGS- KNORR METODA

Aktivacija šećera koja se događa izmjenom anomerne hidroksilne skupine pomoću broma i klora, a kojom nastaju glikozil halogenidi, dobro je poznata kao Königs-Knorr metoda (Slika 10.) [22]. Metoda je općenito manje učinkovita za oligosaharide. Nastali halogenid,  $\alpha$ -haloeter, se lako može aktivirati u koraku glikozilacije pomoću halofilnih promotora, obično teških metala (soli srebra i žive), što rezultira nepovratnim nastankom glikozida [22].

Općenito, zahtjev za barem ekvimolarnom količinom (često do 4 ekv.) metalne soli kao promotora i problemi oko odlaganja otpadnog materijala (npr. živine soli) mogu biti ograničavajući čimbenici za velike pripravke ovom metodom [22].

Neovisno o zaštitnim skupinama i njihovoj participaciji te činjenici da halogeniranjem anomernog centra zbog anomernog efekta nastaju  $\alpha$ -anomeri, ova metoda stereospecifično daje 1,2-trans glikozide [24].



Slika 10. Shema Königs-Knorr metode

### 2.3 LEKTINI

Lektini su proteini koji vežu ugljikohidrate i biomolekule koje sadrže ugljikohidratne skupine [25]. Sveprisutni su u prirodi, u životinjama, biljkama, virusima i mikroorganizmima. Lektin obično sadrži dva ili više veznih mjesta za ugljikohidrate, a specifičnost vezanja ugljikohidrata na lektin određena je aminokiselinskim ostacima [25]. Aktivni dio lektina naziva se domenom za prepoznavanje lektina ili CRD domenom (engl. *Carbohydrate-recognition domain*). Ugljikohidrati na površini jedne stanice vežu se na vezna mjesta lektina prisutnih na površini druge stanice. Na temelju aminokiselinskog slijeda CRD domene i ostalih biokemijskih svojstava, lektini se mogu podijeliti na 4 velike skupine; C-tip, S-tip, P-tip i I-tip lektina [25]. Općenito se dijele na pet osnovnih skupina s obzirom na šećer prema kojem pokazuju najveći afinitet; manozu, galaktozu/*N*-acetilgalaktozamin, *N*-acetilglukozamin, fukoza i *N*-acetilneuraminska kiselina.

Lektini tipa C čine najveću skupinu i tako su nazvani jer ovise o ionu kalcija (Ca<sup>2+</sup>). Ion kalcija na proteinu djeluje kao most između proteina i šećera izravnim interakcijama sa šećernom -OH skupinom [26]. Primjeri lektina tipa C uključuju trombomodulin, koji regulira koagulaciju krvi ovisnu o trombocitima, i selektine koji kontroliraju kretanje bijelih krvnih stanica tijekom upale. Elektrostatske interakcije, van der Waalsove te vodikove veze su odgovorne za snagu i stabilnost kompleksa lektina i ugljikohidrata [26]. Lektini utječu na širok raspon bioloških procesa npr. mnogi lektini bakterija i sisavaca kontroliraju kako se stanice kreću i pridržavaju jedna drugu, dok su neki biljni lektini, osobito ricin i abrin, poznati po njihovoj letalnosti [27].



Lektini imaju mnoge različite biološke funkcijama kod životinja, od regulacije stanične adhezije do sinteze glikoproteina i kontrole razine proteina u krvi. Oni također mogu vezati topljive izvanstanične i unutarstanične glikoproteine. Neki se lektini nalaze na površini jetrenih stanica sisavaca koje specifično prepoznaju ostatke galaktoze. Vjeruje se da su ti receptori s površine stanice odgovorni za uklanjanje određenih glikoproteina iz cirkulacijskog sustava. Također, lektini imaju važnu ulogu i u imunološkom sustavu. Unutar imunološkog sustava lektini, kao što je lektin koji veže manozu (MBL, engl. *mannose-binding lectin*), pomažu u posredovanju prve linije obrane od invazivnih mikroorganizama [26].

Lektini iz biljaka mahunarki, kao što je konkanavalin A, široko se koriste kao modelni sustavi za razumijevanje molekularne osnove procesa u kojem proteini prepoznaju ugljikohidrate. Oni su relativno jednostavni za dobivanje i imaju širok izbor specifičnih šećera [23]. Mnoge kristalne strukture leguminoznih lektina dovele su do detaljnog uvida u atomske interakcije između ugljikohidrata i proteina.

### 2.3.1 LEKTINI KOJI VEŽU MANOZU

U skupini C lektina ističu se lektini koji vežu manozu ili MBL lektini, i manozni receptori (MR). MBL je ključni topljivi efektor urođenog imunološkog sustava koji prepoznaje patogene polisaharide na površini stanica [28].

MBL specifično prepoznaje uzorke ugljikohidrata koji se nalaze na površini velikog broja patogenih mikroorganizama, uključujući bakterije, viruse, protozoe i gljivice [29]. Vežanje MBL na mikroorganizam rezultira aktivacijom lektinskih putova komplementarnog sustava. MBL se veže na niz šećera uključujući *N*-acetil-D-glukozamin, manozu, *N*-acetil-manozamin, fukozu i glukozu [28]. Interakcije lektin-manoza ostvaruju se tako da se dvije molekule glutamata iz proteina vežu na  $\text{Ca}^{2+}$  i na šećer, tvoreći tako jake vodikove veze s hidroksilnim skupinama na C3 i C4 položaju manoze [25].

Genetska, biološka, i klinička svojstva MBL-a su široko istraživana tijekom posljednjih desetljeća, iako neki zanimljiviji potencijalni klinički značaj još uvijek je slabo poznat. Prepoznavanje između ugljikohidrata i lektina se intenzivno proučava u svrhu razvoja glikofarmaceutika. Teži se ka sintezi boljih i sigurnijih lijekova, uz olakšavanje dostave lijekova do mjesta djelovanja.

### 3 EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJALI I METODE

##### 3.1.1 KEMIKALIJE

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Popis korištenih kemikalija:

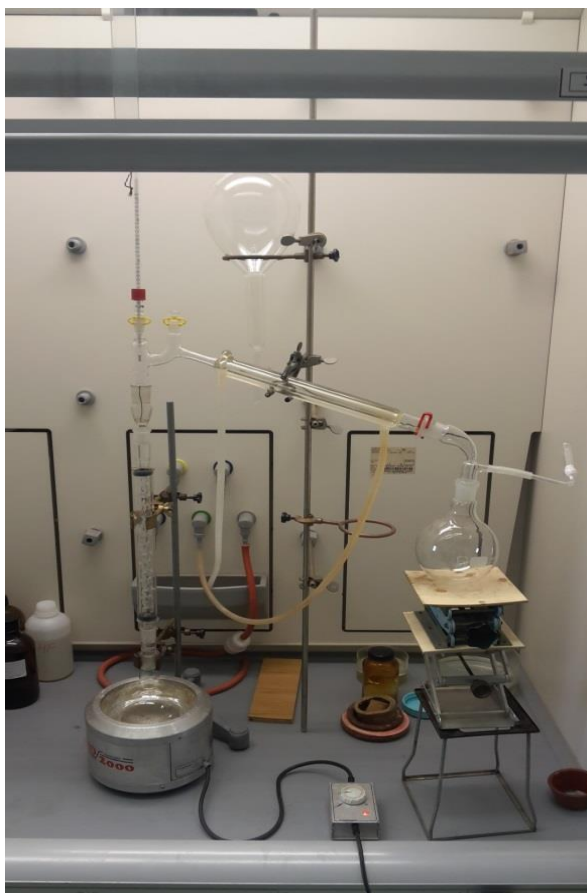
- $\alpha$ -D-(+)-manoza** (M = 180,16 g/mol, p.a. Sigma – Aldrich)
- acetanhidrid** (M = 102,09 g/mol, p.a. Sigma – Aldrich)
- elementarni kristalni jod** (M = 253,81 g/mol, p.a. Sigma – Aldrich)
- natrijev tiosulfat pentahidrat** (M = 248,18 g/mol, p.a. Merck)
- natrijev karbonat** (M = 105, 98 g/mol, p.a. GRAM – MOL)
- magnezijev sulfat** (M = 120,36 g/mol, p.a. GRAM – MOL)
- cinkov acetat dihidrat** (M = 219, 51 g/mol, p.a. Merck)
- natrijev sulfat** (M = 142,04 g/mol, p. a. GRAM – MOL)
- amonijev acetat** (M = 77,08 g/mol, p.a. GRAM – MOL)
- morfolin** (M = 87,12 g/mol, p.a. Sigma – Aldrich)
- natrijev hidrogen karbonat** (M = 84,01 g/mol, p.a. GRAM – MOL)
- natrijev klorid** (M = 58,44 g/mol, p.a. GRAM – MOL)
- tert-butil-bromacetat** (M = 196,05 g/mol, p.a. Sigma – Aldrich)
- kalijev karbonat** (M = 100,09 g/mol, p.a. T.T.T. d.o.o. Sveta Nedjelja)
- trifluorocetna kiselina** (M = 114,02 g/mol, p.a. Fluka)
- klorovodična kiselina** (M = 36, 46 g/mol, p.a. CARLO ERBA)

##### 3.1.1.1 OTAPALA

U radu su korištena otapala: diklormetan, heksan, metanol, tetrahidrofuran, kloroform, acetonitril, voda, *N,N*-dimetilformamid, dietil-eter i etil-acetat.

Otapala korištena u radu pročišćena su prema standardnim literaturnim postupcima: pripravljeno je 250 ml suhog diklormetana. Najprije se 250 mL diklormetana izmućka u lijevku za odjeljivanje od 1L sa 300 ml 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> te se odvoji donji organski sloj. Organski sloj se zatim ispere s 600 mL vode, izlije u suhu Erlenmeyerovu tikvicu te se dodaje CaCl<sub>2</sub> sve dok se ne prestane stvarati talog. Otopina se ostavi sušiti preko noći te se

idući dan napravi destilacija diklormetana. Složi se aparatura kao na Slici 11. U okruglu tikvicu od 1 L se ulije 250 mL suhog diklormetana kroz lijevak s malo vate i dodaju kamenčići za vrenje. Otopina se grije na grijačoj kapi te skuplja frakcija koja destilira pri 38 °C.



Slika 11. Aparatura za destilaciju diklormetana

### 3.1.2 METODE

Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela ALUGRAM<sup>®</sup>, 0,20 mm tvrtke Macherey-Nagel. Detekcija je provedena prskanjem 10 %-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje. Za kromatografiju na stupcu korišten je silikagel veličine zrna 0,063-0,200 mm (Merck). Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je TLC-om, te pomoću nuklearne magnetske rezonancije (NMR).

$^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV600 (600 MHz za  $^1\text{H}$ , 150 MHz za  $^{13}\text{C}$ ). Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS,  $[(\text{CH}_3)_4\text{Si}]$ ) kao unutarnjem standardu.

## 3.2 PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA SPOJEVA

### 3.2.1 ACETILIRANJE $\alpha$ -D-MANOPIRANOZE

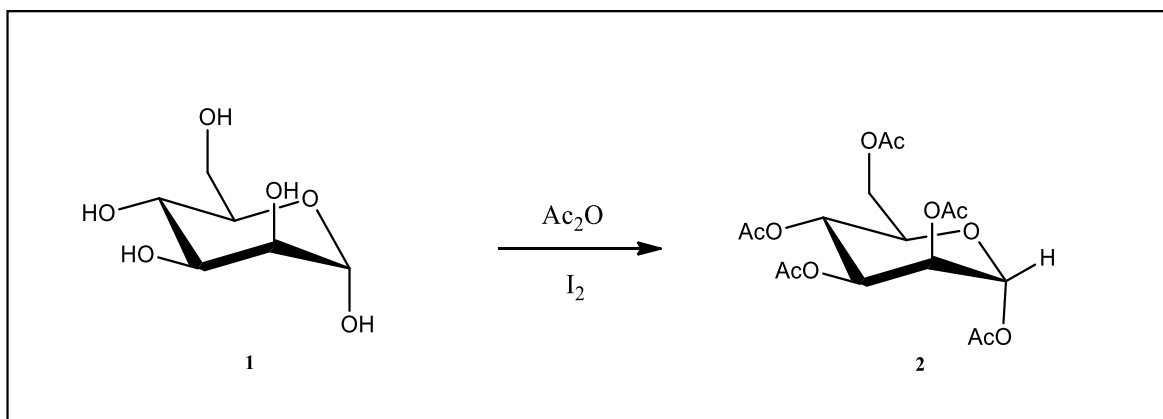
U prvom koraku pripremljena je 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (**2**) (Slika 12.).

U okruglu se tikvicu doda  $\alpha$ -D-(+) manoza (**1**) (2,071 g, 11,5 mmol), acetanhidrid (14 ml) te elementarni kristalni jod (0,1234 g). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska se smjesa miješa pomoću magnetske miješalice na sobnoj temperaturi 1h i 30 minuta. Nastala smjesa je smeđe boje i uočavaju se pare joda. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se razrijedi s diklormetanom (100 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazila otopina natrijevog tiosulfata ( $2,5 \text{ mol/dm}^3$ , 100 mL) i usitnjeni led. Nakon ekstrakcije organski se sloj obojio svijetlo-žutom bojom. Slojevi se odvoje, a organski sloj se ekstrahira još dva puta sa zasićenom otopinom natrijevog karbonata (100 mL). Nakon što se slojevi ponovno odvoje, organski sloj se suši na bezvodnom magnezijevom sulfatu. Otopina se profiltrira i otapalo se upari. Dobiveni produkt je u obliku žute uljaste tekućine. Zatim se produkt se otopi u dietil-eteru te se na otopinu dodaje heksan dok otopina ne postane mliječno-bijela i zamuti se. Otopina se ostavi u frižideru dva dana dok se faze ne odvoje. Otapalo se ukloni kapalicom, a produkt zaostane na dnu tikvice u obliku žute uljaste tekućine. Dobiveno je 4,321 g (97 %) čistog produkta **2**,  $\alpha$ -konfiguracije.

$$R_f = 0,66 \text{ (kloroform : acetonitril = 3:1)}$$

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 6,09 (d, 1H,  $J = 1,8 \text{ Hz}$ , H-1  $\alpha$ ); 5,35 (m, 2H, H-3, H-4); 5,26 (m, 1H, H-2); 4,29 (dd, 1H,  $J = 4,8 \text{ Hz}$ ,  $J = 12,4 \text{ Hz}$ , H-6a); 4,06-4,14 (m, H-5, H-6b); 2,18 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 170,64; 169,99; 169,74; 169,55; 168,09 (5 C=O; Ac); 90,61 (C1); 70,62; 68,76; 68,35; 65,55 (C2-C5); 62,11 (C6); 20,85; 20,76; 20,71; 20,66; 20,63 (5  $\text{CH}_3$ ; Ac).



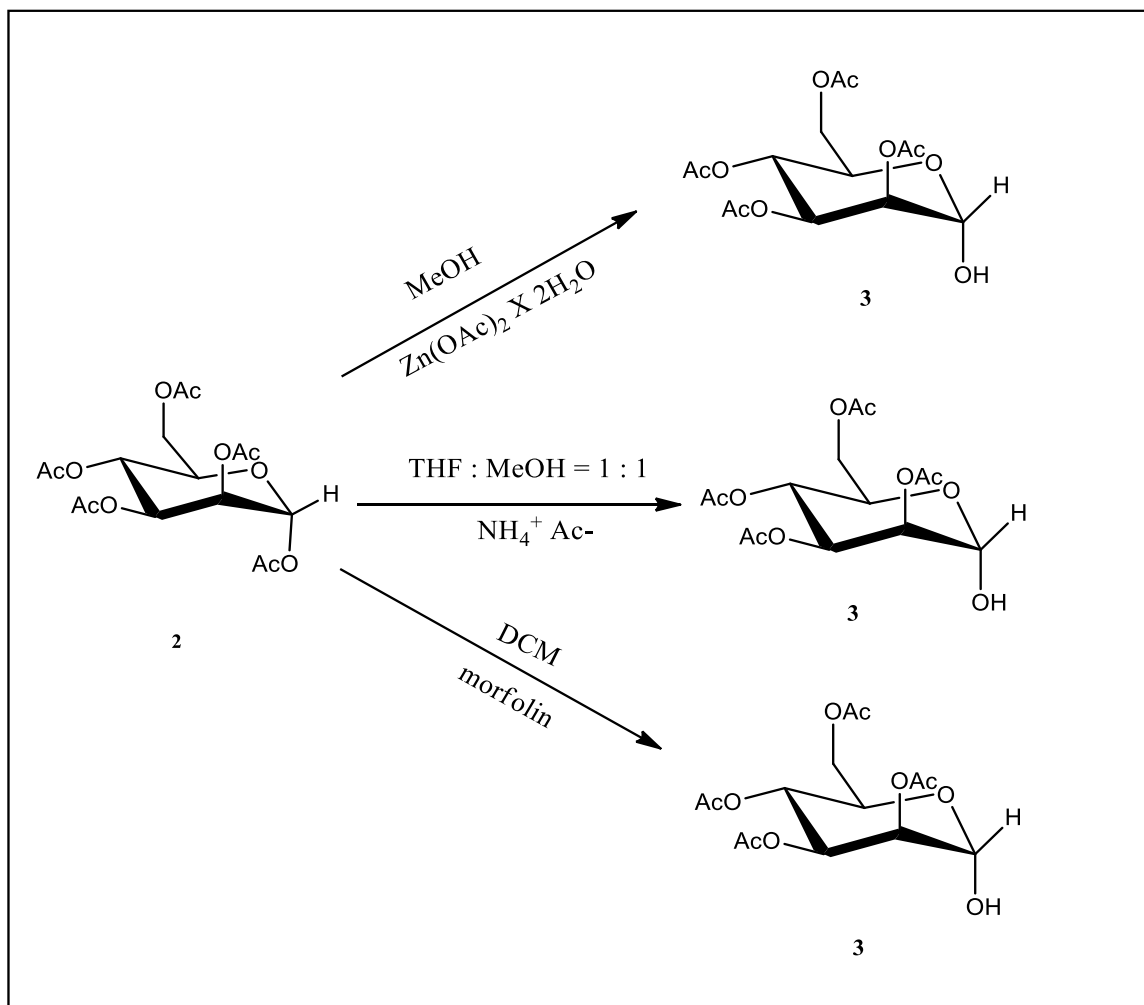
Slika 12. Uvođenje acetatne zaštitne skupine. Reakcijski uvjeti: acetanhidrid, elementarni kristalni jod

### 3.2.2 ANOMERNA DEACETILACIJA

U drugom koraku (na tri načina) pripremljena je 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (**3**) (Slika 13.).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 5,42 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3,2$  Hz,  $J_{3,4} = 10,0$  Hz, H-3); 5,34-5,24 (m, 3H, H1, H-4, OH); 4,29-4,12 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3,71 (d, 1H,  $J_{2,3} = 3,9$  Hz, H2); 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  / ppm: 170,86; 170,21; 170,05; 169,80 (4 C=O; Ac); 92,13 (C1); 70,00; 68,73; 68,44; 66,14 (C2-C5); 62,54 (C6); 20,88; 20,74; 20,68; 20,67 (4  $\text{CH}_3$ ; Ac).



Slika 13. Anomerna deacetilacija na tri načina: cinkov acetat dihidrat, metanol; amonijev acetat, smjesa otapala THF : metanol = 1 : 1, morfolin, diklormetan;

### 3.2.2.1 DEACETILACIJA UZ CINKOV ACETAT

Spoj **2** (1 g, 2,6 mmol) otopi se u apsolutnom metanolu (25,5 mL). U otopinu se doda cinkov acetat dihidrat (62,8 mg). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa 18h na sobnoj temperaturi. Metanol se upari, a dobiveni se produkt otopi u etil-acetatu (15 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. U lijevak se doda voda (30 mL) i sadržaj lijevka dobro izmućka. Organski ekstrakti se spoje i odvoje u suhu Erlenmeyerovu tikvicu, a vodeni sloj se ekstrahira još dva puta s etil-acetatom (2x15 mL). Organski ekstrakti se spoje i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Smjesa se profiltrira, a otapalo upari. Sirovi produkt (0,528 g) se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz

kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens. Dobiveno je 0,313 g (35 %) čistog produkta **3**, u obliku žute uljaste tekućine.

$$R_f = 0,59 \text{ (kloroform : acetonitril = 3:1)}$$

### 3.2.2.2 DEACETILACIJA UZ AMONIJEV ACETAT

Spoj **2** (1,046 g, 2,7 mmol) se otopi u smjesi THF : metanol = 1:1 (THF = 2 mL, metanol = 2 mL). Doda se amonijev acetat (0,418 g). Na reakcijsku smjesu se stavi klor-kalcijeva cijevčica te se smjesa miješa 24h na magnetnoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Dobiveni produkt **3** (1,307 g) se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens. Dobiveno je 0,754 g (81 %) čistog produkta **3**.

$$R_f = 0,61 \text{ (kloroform : acetonitril = 3:1)}$$

### 3.2.2.3 DEACETILACIJA UZ MORFOLIN

Spoj **2** (1 g, 2,6 mmol) se otopi u diklormetanu (1 mL). U otopinu se doda morfolin (0,895 mL). Reakcijska smjesa se miješa 1h na magnetnoj miješalici na sobnoj temperaturi u zatvorenoj tikvici. Reakcijska smjesa se nakon završetka reakcije razrijedi s etil-acetatom i ispere se vodenim otopinama HCl i 5% NaHCO<sub>3</sub>, zatim vodom, zasićenom otopinom NaCl i na kraju se suši u bezvodnom natrijevom sulfatu. Reakcijska smjesa se profiltrira te se upari otapalo. Produkt **3** (0,514 g) je dobiven kao prozirna uljasta tekućina. Pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens. Dobiveno je 0,391 g (43 %) čistog produkta **3**.

$$R_f = 0,58 \text{ (kloroform : acetonitril = 3:1)}$$

## 3.2.3 SINTEZA O-MANOZIDA

U trećem koraku pripremljen je spoj *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat (**4**) (Slika 14.). U Tablici 4. su prikazani reakcijski uvjeti te količine reaktanata za sva tri načina, kao i iskorištenja reakcije (cinkov acetat, amonijev acetat i morfolin).

Spoj **3** otopi se u suhom *N,N*-dimetilformamidu. U otopinu se doda *tert*-butil-bromacetat i kalijev karbonat. Reakcijska smjesa se miješa na magnetnoj miješalici 2h na sobnoj temperaturi u zatvorenoj tikvici. Nakon završetka reakcije smjesa se profiltrira u epruvetu za odsisavanje, preko Hirschovog lijevka. Tikvica se ispere s dietil-eterom i profiltrira u epruvetu. Dobivena otopina se prebaci u lijevak za odjeljivanje i ispere tri puta s vodom. Organski sloj se prebaci u suhu tikvicu i osuši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon sušenja, otopina se profiltrira preko lijevka s malo vate, a otapalo upari. Dobiveni sirovi produkt **4** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela gdje se kao eluens koristi smjesa otapala kloroform : acetonitril = 3:1. Dobiveni produkt **4** je bio u obliku žute uljaste tekućine.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 5,41-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,96 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,0$  Hz; H-1); 4,30 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 4,8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz, H-6b); 4,20 - 4,02 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 9H; CH<sub>3</sub>; *t*-Bu).

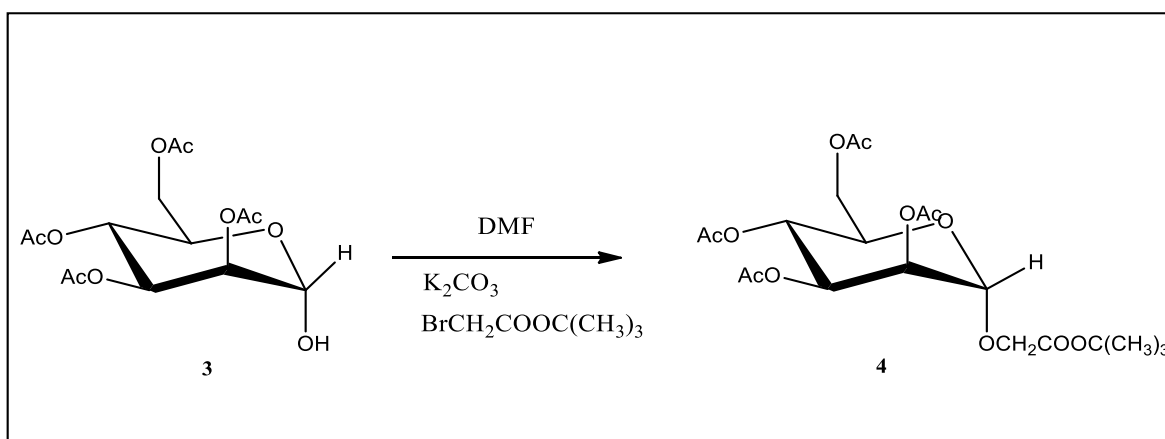
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,62; 169,78; 169,75; 169,69; 168,17 (5 C=O); 97,70 (C1); 82,30 (C; *t*-Bu); 69,32; 69,03; 68,87; 65,92 (C2, C3, C4, C5); 64,89; 62,29 (C6, OCH<sub>2</sub>); 28,03 (CH<sub>3</sub>; *t*-Bu); 20,84; 20,73; 20,68; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>).

Tablica 4. Reakcijski uvjeti za sintezu *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetata (**4**).

| Metoda deacetilacije | Reagensi   | Vrijeme reakcije | Masa čistog produkta i $\eta$ | $R_f$ (kloroform : acetonitril = 3:1) |
|----------------------|--|------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| <u>Cinkov acetat</u> | Spoj <b>3</b> (0,313 g, 9 mmol)<br>DMF (1,5 mL)<br><i>tert</i> -butil-bromacetat (0,210 mL)<br>K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,678 mg) | 2h               | 0,252 g, 60 %                 | 0,74                                  |



|                        |   |    |               |      |
|------------------------|---|----|---------------|------|
| <u>Amonijev acetat</u> | Spoj <b>3</b> (0,754 g, 2,2 mmol)<br>DMF (6 mL)<br><i>tert</i> -butil-bromacetat (0,485 mL)<br>K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,62 g)  | 2h | 0,405 g, 40 % | 0,71 |
| <u>Morfolin</u>        | Spoj <b>3</b> (0,782 g, 2,2 mmol)<br>DMF ( 8 mL)<br><i>tert</i> -butil-bromacetat (0,495 mL)<br>K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,55 g) | 2h | 0,430 g, 42 % | 0,70 |



Slika 14. Sinteza *O*-manozida. Reakcijski uvjeti: *N,N*-dimetilformamid, kalijev karbonat i *tert*-butil-bromacetat

### 3.2.4 UKLANJANJE *TERT*-BUTILNE ZAŠTITE

U četvrtom i posljednjem koraku pripravljena je 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (**5**) (Slika 15.). U Tablici 5. su prikazani reakcijski uvjeti te količine za sva tri načina, kao i iskorištenja reakcije (cinkov acetat, amonijev acetat i morfolin).

Spoj **4** otopi se u suhom diklormetanu te se doda trifluorocetna kiselina. Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica. Reakcijska smjesa se miješa na magnetnoj miješalici 30

min. Nakon završetka reakcije, smjesa se razrijedi s 30 mL diklormetana i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Zatim se reakcijska smjesa ispere s 20 mL vode. Nakon što se slojevi odijele, donji organski sloj se ispusti u suhu tikvicu, a vodeni sloj se dodatno ekstrahira s 20 mL diklormetana.

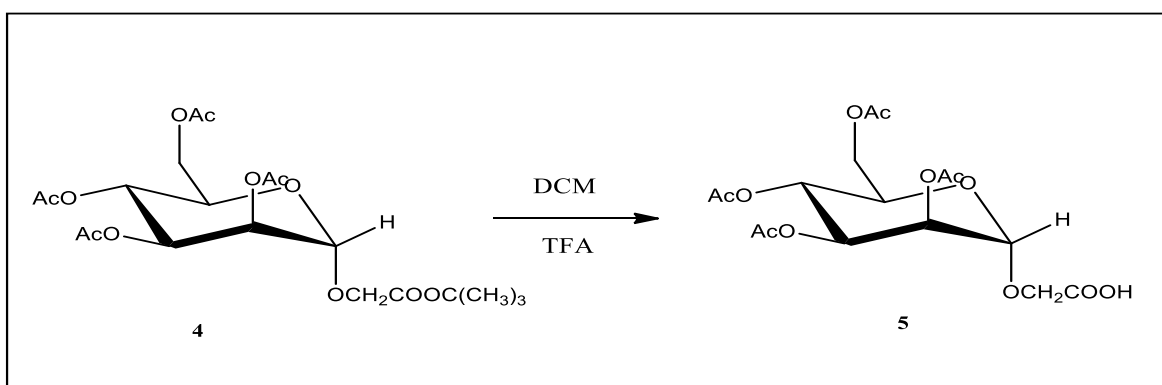
Organski slojevi se spoje u tikvicu i osuše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon toga se otopina profiltrira, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi spoj **5** se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15:1 kao eluens. Dobiveni produkt **5** je bio u obliku žute uljaste tekućine.

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 5,35-5,25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,95 (d, 1H,  $J_{1,2} = 0,9$  Hz; H-1); 4,58 (s, <1H, OH); 4,32-4,16 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 4,11 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 1,7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11,5$  Hz, H-6b); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 172,45; 172,57; 171,50 (5 C=O); 99,17 (C1); 70,69; 70,49; 70,42; 67,16 (C2, C3, C4, C5); 63,50 (C6, OCH<sub>2</sub>); 20,68; 20,65; 20,60 (4 CH<sub>3</sub>).

Tablica 5. Reakcijski uvjeti za sintezu 2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline (5).

| Metoda deacetilacije   | Reagensi   | Vrijeme reakcije | Masa čistog produkta i $\eta$ | $R_f$ (kloroform : metanol = 15:1) |
|------------------------|--|------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| <u>Cinkov acetat</u>   | Spoj <b>4</b> (0,252 g, 0,54 mmol)<br>DCM (1,3 mL)<br>TFA (0,455 mL) | 30 minuta        | 0,142 g, 65 %                 | 0,61                               |
| <u>Amonijev acetat</u> | Spoj <b>4</b> (0,405 g, 0,88 mmol)<br>DCM (2 mL)<br>TFA (0,730 mL)   | 30 minuta        | 0,169 g, 48 %                 | 0,60                               |
| <u>Morfolin</u>        | Spoj <b>4</b> (0,430 g, 0,93 mmol)<br>DCM (2,2 mL)<br>TFA (0,77 mL)  | 30 minuta        | 0,133 g, 35 %                 | 0,59                               |



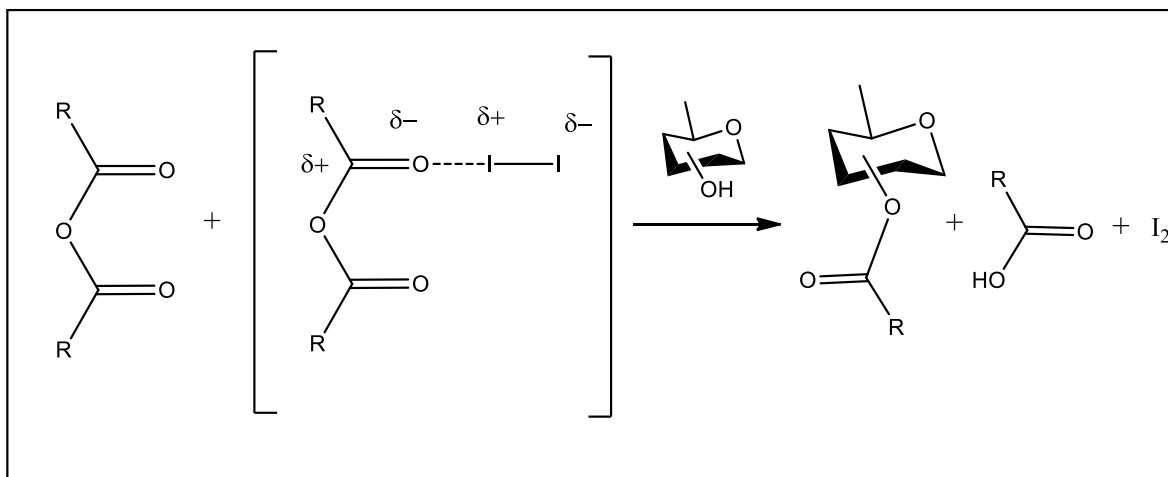
Slika 15. Uklanjanje *tert*-butilne zaštite. Reakcijski uvjeti: DCM, trifluoroctena kiselina

## 4 REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 ZAŠTITA HIDROKSILNIH SKUPINA D-MANOZE

Polazni spoj u sintezi manozilirane karboksilne kiseline je 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (**2**). Kako bi se provela regioselektivna transformacija skupine na anomernom centru, prvo su uvedene zaštite na slobodne hidroksilne skupine. Korištena je acetatna zaštita koja je uvedena u molekulu reakcijom acetanhidrida i manoze uz prisutnost joda kao aktivatora uz iskorištenje od 97 % (Slika 12.).

Jod tvori kompleks s kisikovim atomom jedne od karbonilnih skupina acetanhidrida, dodatno polarizirajući C=O vezu, čime je olakšan nukleofilni napad hidroksilnih skupina D-manoze (Slika 16.). Pri obradi reakcijske smjese, jod se uklanja ekstrakcijom s otopinom natrijevog tiosulfata pentahidrata, a suvišak acetanhidrida i nastala octena kiselina ispiranjem zasićenom otopinom natrijevog karbonata.



Slika 16. Mehanizam djelovanja joda kao katalizatora reakcije acetiliranja

Reakcija je egzotermna i odvija se 1 sat i 30 minuta. TLC pokazuje prisutnost isključivo nastalog pentaacetata s gotovo kvantitativnim iskorištenjem. Struktura spoja **2** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR, i dodatno tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom.

## 4.2 SELEKTIVNA DEACETILACIJA ANOMERNOG UGLJIKOVOG ATOMA

Dobivenoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -manopiranozi **2** selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštita i to na tri načina: pomoću cinkova acetata dihidrata u apsolutnom metanolu, pomoću morfolina i treći način uz amonijev acetat kao reagens. Dobivena je 2,3,4,6- tetra-*O*-acetil-manopiranoza **3** (Slika 13.). Tijek reakcije kontroliran je TLC-om u sustavu otapala kloroform : acetonitril = 3:1.

Struktura spoja **3** potvrđena je  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama, i dodatno tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom.

### 4.2.1 DEACETILACIJA UZ CINKOV ACETAT

Ovom metodom nastala je smjesa  $\alpha$  i  $\beta$  anomera tetraacetilirane manoze što se moglo vidjeti na TLC pločicama. Reakcijska smjesa se miješala 18 h pri sobnoj temperaturi. Od početnih 1 g pentaacetilirane manoze nastalo je 0,528 g produkta. Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens, ostalo je 0,313 g čiste tetraacetilirane manoze. Iskorištenje reakcije je 35 %. Obzirom da nam je u ovoj reakciji nastala smjesa anomera, koje je bilo zahtjevno pročistiti kromatografijom na stupcu te smo dobili najmanje iskorištenje, ova metoda nam se je pokazala najlošijom.

### 4.2.2 DEACETILACIJA UZ AMONIJEV ACETAT

Deacetilacijom uz amonijev acetat u smjesi otapala THF : metanol = 1:1, od početnih 1,046 g pentaacetilirane manoze nastalo je 1,307 g sirovog produkta. Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens, ostalo je 0,754 g čiste tetracetilirane manoze. Ovaj postupak deacetilacije je trajao 24h i nije napravljena ekstrakcija nakon završetka miješanja reakcijske smjese, samo je upareno otapalo. Iskorištenje dobiveno ovim načinom iznosilo je 81 % što je i najveće iskorištenje usporedbom s ostala dva načina selektivne deacetilacije. Reakcija deacetilacije u navedenoj smjesi otapala je razvijena u sklopu ovog diplomskog rada. Literaturno je

poznata deacetilacija uz amonijev acetat u suhom DMF-u, ali zbog velike polarnosti otapala, a time i teškog uklanjanja iz reakcijske smjese, odlučili smo se promijeniti otapalo i pronašli dobar sustav [30].

#### 4.2.3 DEACETILACIJA UZ MORFOLIN

Deacetilacija uz morfolin je napravljena više puta. Najprije je s 0,8 g pentaacetilirane manoze dobiveno 0,421 g produkta. Prve TLC-pločice indicirale da je produkta vrlo malo nastalo, pa samo dodali nove količine (diklormetan = 1 mL i morfolin = 375  $\mu$ L) reaktanata i produžili reakciju. Međutim, kada smo nakapali smjesu i standard, uočili smo da je produkt prisutan i da daljnjim napredovanjem reakcije dolazi do postepenog uklanjanja i preostalih acetata što dovodi do nastanka triacetiliranih produkata. Iz prethodno opisanih razloga, reakcija se zaustavlja nakon vremena navedenog prema literaturi [31] te se neizreagirana pentaacetilirana manozna **2** odvaja prilikom kromatografskog pročišćavanja spoja **3** i ponovno koristi u sljedećoj selektivnoj deprotekciji.

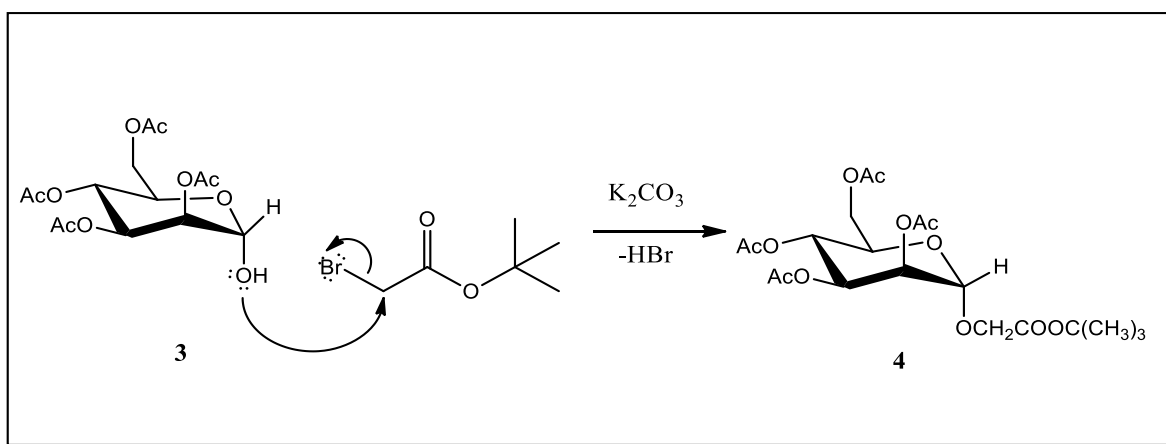
S novom količinom pentaacetilirane manoze od 0,706 g ponovno je provedena reakcija selektivne deacetilacije. Za razliku od ostalih pokušaja, u ovom je korišten dietil-eter za ekstrakciju produkta, ali se nije pokazao kao najbolje rješenje. Na TLC pločicama je vidljivo da je došlo do uklanjanja i preostalih acetatnih skupina. Ipak, nastalo je 0,290 g produkta.

Zadnjim pokušajem s 1 g pentaacetilirane manoze dobiveno je 0,514 g sirovog produkta, a nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens, dobiveno je 0,391 g čiste tetraacetilirane manoze. Iskorištenje ovim postupkom iznosilo je 43 %. U ovoj sintezi vrijeme je imalo značajnu ulogu, trebalo je znati kada prekinuti reakciju, ovisno o količini polaznog spoja kojem se uklanja zaštitna skupina. U zadnjem pokušaju reakcijska smjesa se miješala 40 minuta i to vrijeme nam se je pokazalo optimalnim.

Također, količine od 0,267 g i 0,390 g su spojene i nakon pročišćavanja kromatografijom na koloni nastalo je 0,394 g čiste tetraacetilirane manoze. Ova količina je spojena s količinom od 0,391 g i nakon njihovog uparavanja dobivena je smjesa od 0,782 g čiste tetraacetilirane manoze koja je korištena u daljnjem postupku u sintezi *O*-manozida.

### 4.3 SINTEZA *O*-GLIKOZIDA

Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze **3** i *tert*-butil-bromoacetata uz kalijev karbonat u suhom *N,N*-dimetilformamidu, provedena je *O*-glikozilacija. Mehanizam reakcije glikozilacije je prilično jednostavan i ide u jednom koraku. Odnosi se na  $S_N2$  mehanizam u kojem se brom iz *tert*-butil-bromoacetata supstituira s tetraacetiliranom manozom  $\alpha$ -konfiguracije (Slika 17.).



Slika 17. Mehanizam sinteze *O*-manozida. Reakcijski uvjeti: *tert*-butil-bromoacetat, kalijev karbonat, suhi *N,N*-dimetilformamid

Reakcija glikozilacije pri navedenim reakcijskim uvjetima rezultirala je preferentno  $\alpha$  anomerom *O*-manozida. Veća zastupljenost  $\alpha$  manozida objašnjava se njegovom većom termodinamičkom stabilnošću koja je posljedica snažnog anomernog efekta. Jedino je sintezom u kojoj je kao reagens korišten cinkov acetat nastala smjesa anomera.

Sirova reakcijska smjesa pročišćena je kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3:1 kao eluens. Iskorištenja za cinkov acetat, amonijev acetat i morfolin su redom iznosila: 60 %, 40 % i 42 %.

Struktura spoja **4** potvrđena  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijom, te tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom.

#### 4.4 UKLANJANJE *TERT*-BUTILNE ZAŠTITE

Anomerno čistom esteru **4** uklonjena je *tert*-butilna zaštita pomoću trifluoroctene kiseline u suhom diklormetanu (Slika 13.). Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15:1 kao eluens, iskorištenja za cinkov acetat, amonijev acetat i morfolin iznosila su redom kako slijedi: 65 %, 48 % i 35 %. Struktura spoja **5** potvrđena je <sup>1</sup>H NMR i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijama. Važno je naglasiti kako je i u ovom koraku bitno vrijeme odvijanja reakcije. Nakon nekoliko ponavljanja ovog koraka sinteze, pokazalo se da je i 20 minuta (do najviše pola sata, ovisno o količini reaktanta) dovoljno za selektivno uklanjanje *tert*-butilne zaštite. Ukoliko se reakcija provodi dulje od navedenog vremena, uklanjaju se i acetatne skupine s hidroksilnih skupina manoze.



## 5 ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada razvijena je metoda za pripravu spoja 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline, važne podstrukture u sintezi spoja koji bi bio potencijalni adjuvant. Ciljni spoj se sastoji od manoze koja je na anomernom ugljikovom atomu funkcionalizirana s karboksilnom skupinom na kojoj će se u daljnjem istraživanju provoditi željene reakcije.

2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza dobivena je regio i stereoselektivnom deacetilacijom 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze uz pomoć cinkovog acetata dihidrata, amonijevog acetata i morfolina, te je potom stereospecifičnom reakcijom nukleofilne supstitucije nastao *O*-manozid, točnije *tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat. U posljednjem je koraku uklonjena *tert*-butilna zaštita i nastao ciljni spoj 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina. Ključni korak sinteze je zapravo drugi korak, a metoda koja se pokazala najboljom je ona uz amonijev acetat kao reagens u smjesi otapala THF : metanol = 1 : 1. Iskorištenje ove reakcije je bilo jako zadovoljavajuće (81 %). Osim iskorištenja, reakcija se pokazala dobrom jer nije nastala smjesa anomera, niti je došlo do uklanjanja preostalih acetata kao što je bio slučaj kod ostale dvije metode.

Struktura ciljne molekule kao i svih međuprodukata u pojedinim reakcijskim koracima, potvrđena je  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama.

## 6 LITERATURNA VRELA

- [1] C. R. Bertozzi, L. L. Kiessling, *Science* 291 (2001), 2357 - 2364.
- [2] D. Šahnić, Diplomski rad: Sinteza adamantilnih amida *O*-manozil i *O*-galaktozil L-serina, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovni-matematički fakultet, Zagreb, 2007.
- [3] B. G. Davis, *Chem. Rev.* 102 (2002), 579 - 601.
- [4] M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2012.
- [5] J. G. Smith, *Organic Chemistry*, The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 2011.
- [6] M. Čičak, Diplomski rad: Razvoj sintetske metode za pripravu dimanoziliranih desmuramilpeptida, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovni-matematički fakultet, Zagreb, 2016.
- [7] B. Ernst, J. L. Magnani, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8 (2009), 661 - 677.
- [8] J. L. Magnani, B. Ernst, *Discov. Med.* 8 (2009), 247 - 252.
- [9] X. Hu et al., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf* 15 (2016), 773 - 785.
- [10] T. W. Greene, P. G. M. Wuts, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2007.
- [11] G. S. Zweifel, M. H. Nantz, *Modern Organic Synthesis: An Introduction*, W.H. Freeman and Company, New York, 2007.
- [12] K.P. Ravindranathan Kartha, R. A. Field, *Tetrahedron* 53 (1997), 753 - 766.
- [13] M. Mahrova, Master's work: 1, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl-2-*O*-trifluoromethanesulfonyl- $\beta$ -D-mannopyranose as FDG precursor, University of Tartu, Faculty of Science and Technology, Institute of Chemistry, 2009.
- [14] B. Mukhopadhyay et al., *Org. Chem.* 69 (2004), 7758 - 7760.
- [15] M. Filice et al., *Nat. Prot.* 7 (2012), 1783 - 1796.
- [16] L. Yu-Wen et al., *Chinese J. Chem.* 22 (2004), 117 - 118.
- [17] E. Kaya et al., *Chem. Pap.* 66 (2012), 312 - 315.
- [18] N.V. Bhagavan, C. E. Ha, *Essentials of Medical Biochemistry with Clinical Cases.*, Academic Press, Elsevier Inc., 2011.
- [19] M. Butler, H. Perreault, *Protein Glycosylation: Methods for Determination*, *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [20] M. Marradi, M. L. Martín-Lomas, S. Penadés, *Glyconanoparticles: Polyvalent Tools to Study Carbohydrate-based Interactions*, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 64 (2010), 211 - 290.
- [21] I. Robina, A. T. Carmona, A. J. Moreno-Vargas, *Curr. Org. Synth.* 5 (2008), 33 - 60.
- [22] R. R. Schmidt, J. C. Castro-Palomino, O. Retz, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999), 729 - 744.
- [23] J. Khamsi et al., *Carbohydr. Res.* 357 (2012), 147 - 150.

- [24] M. Štivojević, Diplomski rad: Sinteza i konformacijska analiza manoziliranog adamantiltetrapeptida, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb. 2012.
- [25] R. Ribić, Doktorska disertacija: Sinteze i biološke aktivnosti manoziliranih derivata 1-aminoadamanata, adamantil-tripeptida i peptidoglikan monomera, Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb. 2011.
- [26] F. S. Santos et al., *Curr. Top. Pept. Protein Res.* 15 (2014), 41 - 62.
- [27] C. K.F. Chan, R. C. Ransom, M. T. Longaker, *eLife* 5 (2016), 1 - 3.
- [28] M.W. Turner, *Mol. Immunol.* 40 (2003), 423 – 429.
- [29] C. Auriti et al., *Hindawi J. Immunol. Res.* (2017), 1 – 12.
- [30] S. Chittaboina, B. Hodges, Q. Wang, *Lett. Org. Chem.* 3 (2006), 35 – 38.
- [31] C. Ionescu, V. Barragan–Montero, J.–L. Montero, *REV. CHIM.* 63 (2012), 412 – 415.

## 7 DODACI

### 7.1 POPIS KRATICA

|   |   |
|---|---|
| <b>DNA</b>  | deoksiribonukleinska kiselina   |
| <b>RNA</b>  | ribonukleinska kiselina   |
| <b>ATP</b>  | adenozin trifosfat  |
| <b>MBP</b>  | Proteini koji vežu manozu (engl. <i>mannose-binding proteins</i> )                    |
| <b>GPI</b>  | glikozilfosfatidilinozitol  |
| <b>LA</b>   | Lewisova kiselina (engl. <i>Lewis acid</i> )  |
| <b>DBU</b>  | diazabiciklo undekan  |
| <b>TMSOTf</b>   | trimetilsilil trifluoro metan sulfonat  |
| <b>CRD</b>  | domena koja prepoznaje ugljikohidrate (engl. <i>carbohydrate-recognition domain</i> ) |
| <b>MR</b>   | manozni receptor  |
| <b>NMR</b>  | nuklearna magnetna rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )             |
| <b>TLC</b>  | tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin-layer chromatography</i> )                  |
| <b>TMS</b>  | trimetilsilan   |
| <b>DMF</b>  | <i>N,N</i> -dimetilformamid   |
| <b>THF</b>  | tetrahidrofuran   |
| <b>Ac<sub>2</sub>O</b>                                  | acetanhidrid  |
| <b>I<sub>2</sub></b>                                    | jod   |
| <b>Ac</b>   | acetat  |
| <b>ROH</b>  | opća formula alkohola   |
| <b>AlOH</b>   | alilni alkohol  |
| <b>ZnCl<sub>2</sub></b>                                 | cinkov klorid   |
| <b>HClO<sub>4</sub>·SiO<sub>2</sub></b>                 | perklorna kiselina-silicijev dioksid  |
| <b>BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O</b>                   | kompleks borova (III) fluorida i dietil-etera   |
| <b>SnCl<sub>4</sub></b>                                 | kositrov klorid   |
| <b>NaH,</b>   | natrijev hidrid   |
| <b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>                      | kalijev karbonat  |
| <b>Cl<sub>3</sub>CN</b>                                 | trikloronitril  |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b>                                  | divalentni ion kalcija  |
| <b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>                     | natrijev karbonat   |
| <b>CaCl<sub>2</sub></b>                                 | kalcijev klorid   |
| <b>THF</b>  | tetrahidrofuran   |
| <b>HCl</b>  | klorovodična kiselina   |
| <b>NaHCO<sub>3</sub></b>                                | natrijev hidrogen karbonat  |
| <b>NaCl</b>   | natrijev klorid   |
| <b>DCM</b>  | diklormetan   |
| <b>TFA</b>  | trifluoroctena kiselina   |
| <b>BrCH<sub>2</sub>COOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub></b> | <i>tert</i> -butilbromacetat  |

## 7.2 ŽIVOTOPIS

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Osobni podaci:</b>         |   |
| Ime i prezime:                | Ivana Živković  |
| Datum i mjesto rođenja:       | 10. listopada 1994., Vinkovci   |
| Adresa u mjestu prebivališta: | Kostrč 130 A, BiH   |
| Adresa u mjestu boravišta:    | Vijenac Ivana Meštrovića 1H, Osijek   |
| Državljanstvo:                | Hrvatsko i BiH  |
| e-mail:                       | <a href="mailto:zivkovicivana11@gmail.com">zivkovicivana11@gmail.com</a><br><a href="mailto:izivkovic@kemija.unios.hr">izivkovic@kemija.unios.hr</a>  |
|                               |   |
| <b>Obrazovanje:</b>           |   |
| 2016. – diplomski             | Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, diplomski studij kemije, prosjek ocjena 4,722   |
| 2013. – 2016.                 | Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, preddiplomski studij kemije, prosjek ocjena 4,553<br>završni rad: Kemija vitamina B <sub>6</sub> i sinteza novih analoga vitamina B <sub>6</sub><br>mentor: izv.prof.dr.sc. Dean Marković |
| 2009. – 2013.                 | Opća gimnazija fra Ilije Starčevića, Orašje   |
| 2005. – 2009.                 | Osnovna škola fra Ilije Starčevića, Tolisa  |
| 2001. – 2005.                 | Osnovna škola fra Ilije Starčevića, Kostrč  |
|                               |   |
| <b>Jezici:</b>                | Engleski aktivno, njemački pasivno  |
|                               |   |
| <b>Sudjelovanje:</b>          | 1. međunarodna studentska GREEN konferencija, 2018., postersko izlaganje  |
|                               |   |
| <b>Nagrade i priznanja:</b>   | Lions club Osijek, nagrada za uspjeh 2016.  |