

# Metode priprave O-glikozida

---

Krmpotić, Nikola

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:910821>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**

Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Nikola Krmpotić

# **METODE PRIPRAVE *O*-GLIKOZIDA**

Završni rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: dr. sc. Marija Paurević

Osijek, 2024.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA Završni rad

---

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Organska kemija

## METODE PRIPRAVE *O*-GLIKOZIDA

NIKOLA KRMPOTIĆ

**Rad je izrađen na:** Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Neposredni voditelj:** dr. sc. Marija Paurević

**SAŽETAK:** Ugljikohidrati se ubrajaju među najvažnije biološke makromolekule, a u prirodi se često pojavljuju u obliku glikozida. Po kemijskom sastavu, glikozidi su miješani acetali, najčešće sastavljeni od šećernog dijela koji je glikozidnom vezom povezan s nešećernim aglikanskim dijelom na anomernom ugljikovom atomu. Metode njihove sinteze uključuju uvođenje zaštitnih skupina kako bi se postigla kemoselktivnost reakcije, aktivaciju glikozidnih donora pomoću raznih katalizatora i konačno, nukleofilni napad glikozidnog akceptora. Osim tradicionalnih metoda, u novije vrijeme razvijene su napredne sintetske strategije, poput „one-pot“ sinteze i primjene „armed-disarmed“ koncepta, koje omogućuju učinkovitiju i bržu sintezu s manjim brojem koraka i boljom kontrolom reakcije u kontekstu čistoće produkta i prinosa reakcije. Ove inovacije ne samo da pojednostavljuju sintezu glikozida, već otvaraju mogućnosti za njihovu širu primjenu. Ovaj rad istražuje biološku važnost *O*-glikozida i detaljno analizira tradicionalne i suvremene metode njihove sinteze.

**Ključne riječi:** *O*-glikozidi, sinteza glikozida, biološka važnost.

**Jezik izvornika:** hrvatski jezik

**Završni rad obuhvaća:** 38 stranica, 25 shema i 42 reference

**Rad prihvaćen:** 10. rujna 2024. godine

**Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:**

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, članica
4. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, zamjena člana

**Rad je pohranjen:** Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek  
Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Scientific branch:** Organic chemistry

## METHODS FOR THE PREPARATION OF *O*-GLYCOSIDES

NIKOLA KRMPOTIĆ

**The paper was created on:** Department of Chemistry

**Supervisor:** izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Assistant supervisor:** dr. sc. Marija Paurević

**ABSTRACT:** Carbohydrates are among the most important biological macromolecules, and in nature, they often occur in the form of glycosides. Chemically, glycosides are mixed acetals, typically composed of a sugar unit linked to the non-sugar aglycon moiety via a glycosidic bond through the anomeric center. Methods of their synthesis involve the introduction of protecting groups in order to achieve chemoselectivity in the reaction, activation of glycoside donors using various catalysts, and finally, nucleophilic attack of the glycoside acceptor. In addition to traditional methods, advanced synthetic strategies have been recently developed, such as one-pot synthesis and the armed-disarmed concept, which enabled a more efficient synthesis with fewer synthetic steps and better control of the reaction in the context of product purity and reaction yield. These innovations not only simplify glycoside synthesis but also open the possibility for wider application. This paper explores the biological significance of *O*-glycosides and provides a detailed analysis of traditional and contemporary methods of their synthesis.

**Keywords:** *O*-glycosides, glycoside synthesis, biological significance.

**Original language:** Croatian language

**Thesis includes:** 38 pages, 25 figures and 42 references

**Thesis accepted:** September 10, 2024

**Reviewers:**

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, president
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentor and member
3. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić, member
4. izv. prof. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović, member replacement

**Thesis deposited in:** Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek  
Repository of the Department of Chemistry, Osijek

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	5
2. LITERATURNI PREGLED .....	6
2.1. UGLJIKOHIDRATI I MONOSAHARIDI .....	6
2.2. GLIKOKONJUGATI .....	11
2.3. OSNOVE KEMIJE O-GLIKOZIDA .....	12
2.3.1. GLIKOZIDNA VEZA .....	13
2.3.2. ANOMERNI EFEKT .....	14
2.3.3. UTJECAJ OTAPALA NA REAKCIJE O-GLIKOZILACIJE .....	15
2.3.4. ZAŠTITNE SKUPINE MONOSAHARIDA .....	15
2.4. BIOLOŠKE AKTIVNOSTI O-GLIKOZIDA .....	17
2.4.1. GLIKOZIDNI ANTIBIOTICI .....	18
2.4.2. GLIKOZIDI VITAMINA .....	19
2.4.3. GLIKOZIDI STEROIDA I TERPENOIDA .....	20
2.5. UOBIČAJENE METODE O-GLIKOZILACIJE .....	21
2.5.1. DIREKTNA METODA GLIKOZILACIJE .....	22
2.5.2. KÖENIGS-KNORROVA METODA GLIKOZILACIJE .....	23
2.5.3. TRIKOROACETIMIDATNA METODA GLIKOZILACIJE .....	26
2.5.4. TIOGLIKOZIDI .....	28
2.5.5. n-PENTENIL GLIKOZIDI .....	29
2.6. NOVIJE METODE O-GLIKOZILACIJE .....	30
2.6.1. GLIKOZILACIJA UPOTREBOM ALIL-GLIKOZIDA .....	30
2.6.2. GLIKOZILACIJA POMOĆU ENZIMA .....	33
3. ZAKLJUČAK .....	35
4. POPIS LITERATURE .....	36

## 1. UVOD

Ugljikohidrati se ubrajaju u jedne od najvažnijih bioloških makromolekula uz masti, proteine te nukleinske kiseline te su najrasprostranjenija skupina spojeva u prirodi. Osim što služe kao rezerve energije te kao gradivni elementi biljnih, životinjskih i bakterijskih staničnih membrana, također sudjeluju u brojnim biokemijskim procesima u organizmu. Ugljikohidrati su spojevi ugljika koji sadrže više hidroksilnih skupina te se dijele na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Najpoznatiji predstavnik monosaharida jest glukoza. Oligosaharide čine dvije do deset monosaharidnih jedinica međusobno povezanih glikozidnom vezom, dok su polisaharidi puno veći te su građeni od stotinjak monosaharidnih jedinica.

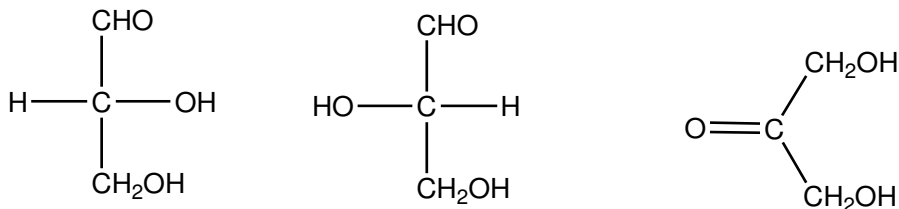
U prirodi se ugljikohidrati nalaze u obliku polisaharida, glikokonjugata ili glikozida. Glikokonjugati, među koje se ubrajaju glikoproteini i glikolipidi, su spojevi koji u organizmu imaju važnu biološku ulogu. Sudjeluju u prepoznavanju molekula, interakcijama između stanica, imunološkim reakcijama, prijenosu bioloških informacija itd. Zbog svoje značajne važnosti u organizmu, ugljikohidrati su ubrzo postali jedan od temeljnih predmeta proučavanja znanstvenika, a znanstvena grana koja se bavi funkcijom, strukturom te sintezom ugljikohidrata naziva se glikobiologija. Budući da je izolacija veće količine ugljikohidrata i različitih glikokonjugata iz prirodnih izvora izrazito teška, znanstvenici se intenzivno bave proučavanjem novijih metoda sinteze različitih šećernih struktura. Strategije sinteze kompleksnih šećernih struktura temelje se na stvaranju glikozidnih veza između monomernih jedinica s točno određenom stereokemijskom i regiokemijskom konfiguracijom. Cilj ovog rada je detaljno prikazati i objasniti različite metode sinteze glikozida, uz usporedbu tradicionalnih i suvremenih tehnika. Također, cilj je istaknuti njihovu biološku važnost i moguće primjene, te razmotriti prednosti i nedostatke pojedinih pristupa u sintezi ovih spojeva. [1,2].

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. UGLJIKOHIDRATI I MONOSAHARIDI

Ugljikohidrati su po kemijskom sastavu aldehidi ili ketoni s više hidroksilnih skupina u svojoj strukturi. Jedno od temeljnih svojstava ove skupine spojeva je velika strukturna raznolikost. Temeljnu gradivnu podjedinicu čine monosaharidi koji također strukturno variraju obzirom na broj C-atoma, ali i prema stereokemijskoj konfiguraciji na jednom ili više stereogenih ugljikovih centara. Monosaharidi se glikozidnim vezama povezuju u razne vrste oligosaharida. Također, blokovi monosaharida grade složenije ugljikohidrate, odnosno polisaharide. Najistaknutiji predstavnici polisaharida su glikogen kod životinja i škrob kod biljaka, koji služe kao skladišta energije. Glikogen je građen od glukoznih jedinica koje su povezane  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnim vezama dok je škrob strukturno sličan glikogenu, no ima manji stupanj grananja te je građen od manjih podjedinica amiloze i amilopektina. Uz ova dva predstavnika važan je i polisaharid celuloza koji se nalazi u staničnim stijenkama biljaka [2,3].

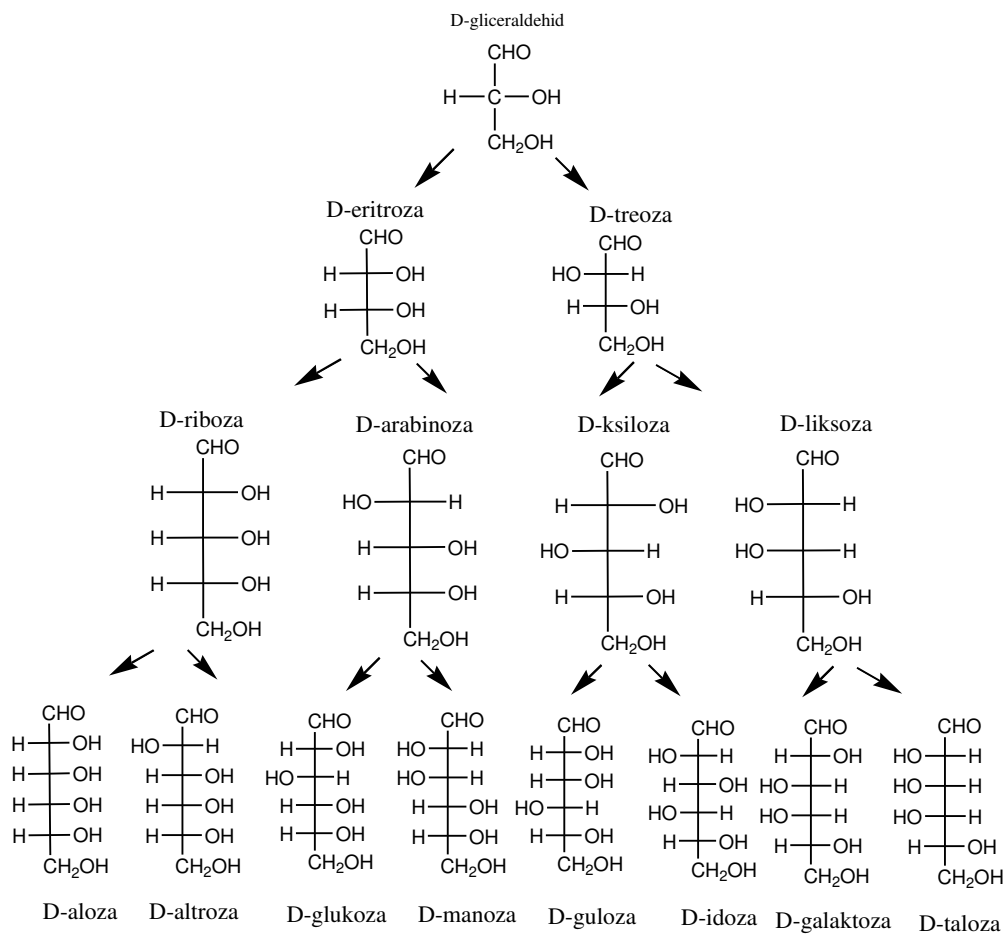
Najjednostavnija skupina ugljikohidrata jesu monosaharidi. Oni se mogu podijeliti na aldoze (polihidroksialdehide) te na ketoze (polihidroksiketone). Uobičajena je i podjela monosaharida prema broju ugljikovih atoma koje sadrže. Najjednostavnije su trioze koje sadrže tri ugljikova atoma. U trioze se ubraja dihidroksiacetone koji je ketoza te gliceraldehid koji je aldoza. Obzirom da gliceraldehid ima jedan asimetričan ugljikov atom i postoji u obliku dva stereoizomera, L-gliceraldehida i D-gliceraldehida, koji su enantiomeri i odnose se kao predmet i njegova zrcalna slika, molekula gliceraldehida je kiralna. Za prikaz kiralnih spojeva, ali i samih monosaharida često se koriste Fischerove projekcijske formule. U Fischerovoj projekcijskoj formuli, atomi vezani vodoravnim linijama za asimetrični ugljikov atom nalaze se ispred ravnine papira, dok se atomi vezani okomitim linijama nalaze iza ravnine papira (**Slika 1**) [3].



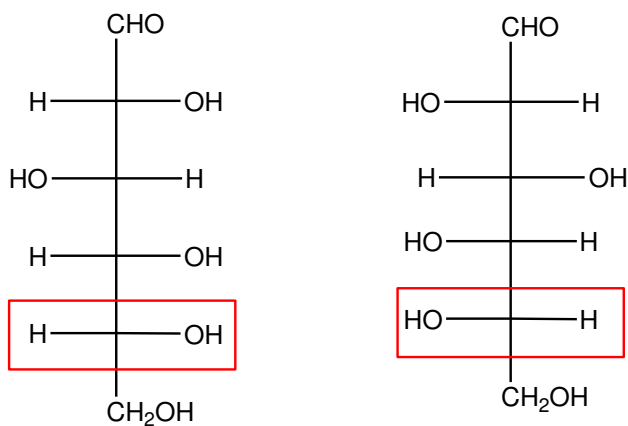
**Slika 1.** Fischerove projekcijske formule D-gliceraldehida, L-gliceraldehida i dihidroksiacetona

Molekule monosaharida sadrže najmanje jedan, ali češće sadrže i više asimetričnih ugljikovih atoma, odnosno stereogenih centara. Postoje monosaharidi sa četiri, pet, šest i sedam ugljikovih atoma. Kako ovi monosaharidi imaju više asimetričnih ugljika gleda se njihova relativna konfiguracija prema asimetričnom ugljikovom atomu koji je najudaljeniji od aldehidne ili keto skupine šećera. D- ili L- konfiguraciju monosaharida ustvari određuje položaj hidroksilne skupine na zadnjem stereogenom C-atomu koji se još naziva i konfiguracijski atom. Prema tome šećer će pripadati L-seriji ako mu je konfiguracija na predzadnjem ugljikovom atomu jednaka L-gliceraldehidu te isto pravilo vrijedi i za D-seriju (**Slika 2**). Primjerice, kod D-glukoze, hidroksilna skupina na pretposljednem C-5 atomu u Fischerovoj projekciji nalazi se na desnoj strani, dok se u L-glukozi ta hidroksilna skupina nalazi na lijevoj strani (**Slika 3**) [3,4].





**Slika 2.** Fischerove projekcije D-aldoza

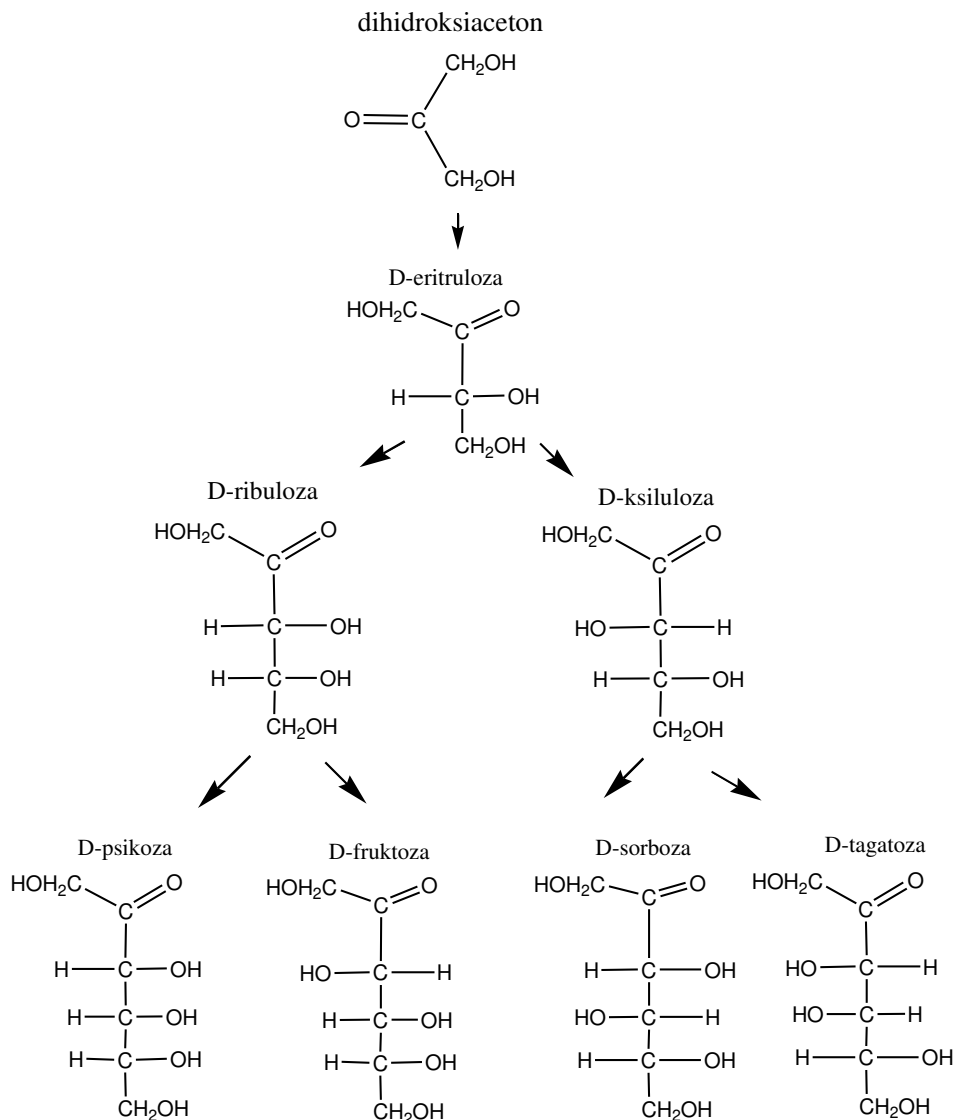


**Slika 3.** Fischerove projekcije D-glukoze i L-glukoze

Aldotetrozama pripadaju D-eritroza i D-treoza, koje se razlikuju samo po konfiguraciji na C-2 atomu pa se ubrajaju u diastereoizomere jer su kiralne molekule, ali se ne odnose kao predmet i

zrcalna slika. Općenito se spojevi koji se razlikuju u konfiguraciji samo po jednom stereogenom centru nazivaju epimeri [3].

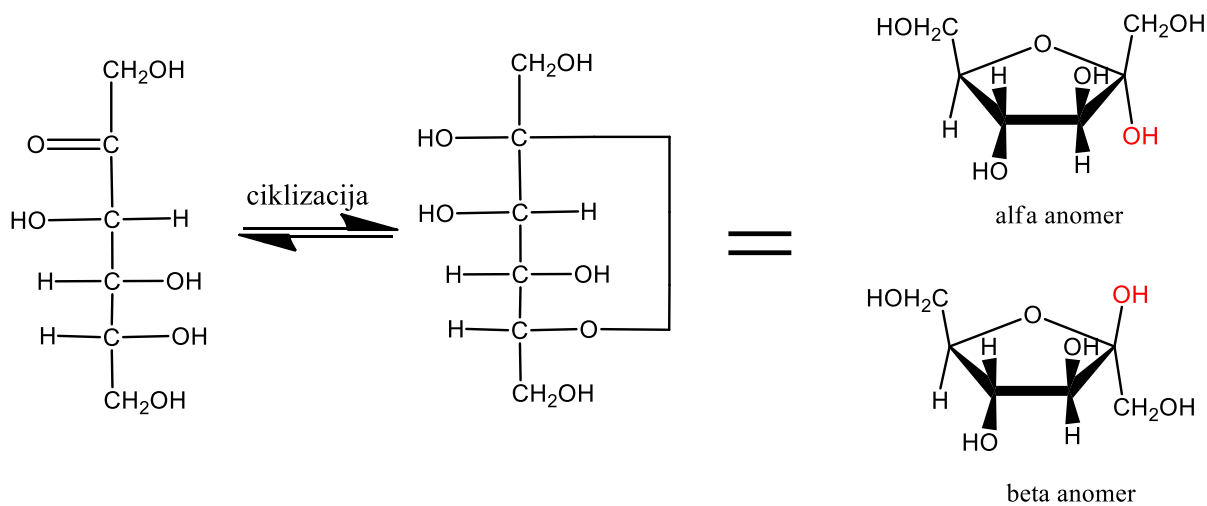
Ketoze imaju keto skupinu te zbog toga sadrže jedan anomerni ugljik manje od aldoza, a najjednostavnija ketoza je dihidroksiacetone (Slika 4).



**Slika 4.** Strukturne formule ketoza

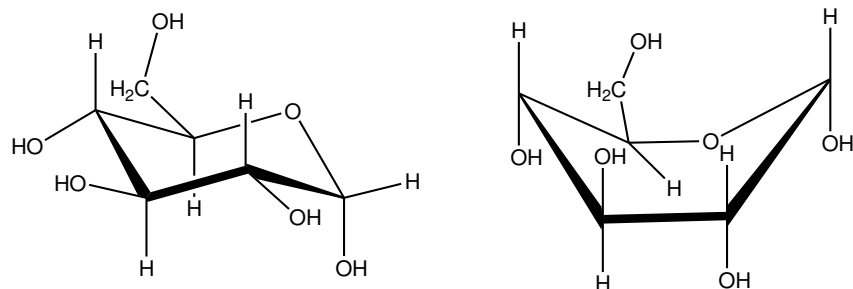
Monosaharidi postoje u lančanom obliku koji je prikazan u navedenim Fischerovim projekcijama, no njihovim otapanjem u vodi dolazi do promjena u strukturi i ciklizacije pentoza i heksoza u furanozne i piranozne prstene. Osnova nastajanja tih prstenastih struktura je stvaranje intramolekulskih poluacetalata te poluketalata. Kod aldoheksoza C-1 reagira s hidroksilnom skupinom

na C-5 atomu i nastaje piranozni prsten, dok kod ketoheksoza keto skupina na C-2 atomu reagira s hidroksilnom skupinom na C-5 atomu i nastane furanozni prsten ili s hidroksilnom skupinom na C-6 atomu pri čemu nastaje piranozni prsten. Ciklički oblici monosaharida najčešće su prikazani Haworthovim formulama gdje ugljikovi atomi prstena nisu prikazani, a ravnina prstena okomita je na ravninu papira. Ciklizacijom monosaharida nastaje dodatni stereogeni centar, odnosno C-1 atom postaje asimetrični stereogeni centar. Taj C-1 atom naziva se anomerni ugljik te prilikom ciklizacije fruktoze mogu nastati dva anomerna oblika,  $\alpha$ -D-fruktofuranosa te  $\beta$ -D-fruktofuranosa (**Slika 5**). Promjena optičke aktivnosti uzrokovana prijelazom  $\alpha$ -anomera u  $\beta$ -anomer ili obratno naziva se mutarotacija. Kod anomera s  $\alpha$  oznakom hidroksilna skupina C-1 atoma nalazi se sa suprotne strane od  $-\text{CH}_2\text{OH}$  skupine koja je vezana na C-5 atom šećera. Kod anomera s  $\beta$  oznakom hidroksilna skupina C-1 atoma nalazi se s iste strane od  $-\text{CH}_2\text{OH}$  skupine [3,4].



**Slika 5.** Ravnoteža D-fruktoze u vodenoj otopini i njezini anomerni oblici

Zbog tetraedarskih ugljikovih atoma konformacija šestoročlanog prstena piranoze nije planarna već postoji u dva oblika; konformacija stolca i konformacija čamca (**Slika 6**). Supstituenti u navedenim konformacijama imaju dvije orijentacije; mogu biti ekvatorijalni kada su paralelni s ravninom prstena ili aksijalni kada su okomiti na ravninu prstena. Aksijalni supstituenti više zasjenjuju jedan drugoga ukoliko se nalaze s iste strane prstena, dok su kod ekvatorijalnih supstituenata steričke smetnje manje [3].



Slika 6. Konformacija stolca i čamca  $\alpha$ -D-glukopiranoze

## 2.2. GLIKOKONJUGATI

Glikokonjugati predstavljaju složene molekule koje se sastoje od monosaharida, oligosaharida ili polisaharida povezanih s proteinima ili lipidima, pri čemu se ugljikohidratna komponenta naziva glikan, a neugljikohidratna komponenta aglikan. Glikokonjugati dijele se na glikoproteine, glikolipide i proteoglikane te je ova skupina spojeva iznimno heterogena zbog različitih kombinacija ugljikohidratnih jedinica, što rezultira velikom raznolikošću njihovih struktura i funkcija. Glikani, kroz razne interakcije, imaju ključnu ulogu u biološkim procesima kao što su stanično prepoznavanje, signalizacija i imunološki odgovori. Diferencijacija u strukturi ovih spojeva ključna je za njihovu specifičnu funkcionalnost unutar bioloških sustava. Glikoproteini i glikolipidi nalaze se na vanjskoj površini plazmatske membrane koja okružuje stanice, a također su prisutni u biološkim tekućinama poput seruma. Prije nego što dođu na površinu stanice, glikokonjugati se moraju proizvesti unutar stanice, u lumenu endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata, procesom glikozilacije. U procesu glikozilacije ugljikohidratni dio glikokonjugata veže se s aglikanom pomoću glikozidne veze koja se može ostvariti preko kisikovog, dušikovog, sumporovog ili ugljikovog atoma, no unutar glikokonjugata najčešće su prisutne *O*- i *N*-glikozidne veze [5].

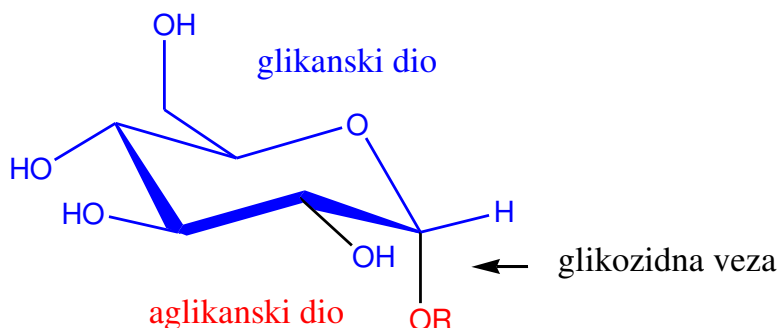
U glikokonjugatima obično se nalazi samo nekoliko od stotine mogućih heksoza, najčešće su to D-glukoza i njezini epimeri D-manoza i D-galaktoza. U glikokonjugatima nalaze se i supstituirane heksoze poput *N*-acetilglukozamina i *N*-acetilgalaktozamina, ali i modificirani oblici spomenutih heksoza poput L-fukoze, D-ksiloze i glukuronske kiseline. Osim navedenih heksoza, u

glikokonjugatima sisavaca može se pronaći i jedan od članova sijalinske kiseline, odnosno *N*-acetilneuraminska kiselina.

Unutar *N*-vezanih glikoproteina ugljikohidratni dijelovi povezani su s amidnim dušicima bočnih lanaca asparagina, a transport tih glikoproteina unutar stanice usmjeravaju lektini. Lektini su posebna vrsta integralnih membranskih proteina koji su orijentirani tako da njihove domene za prepoznavanje ugljikohidrata, CRD domene (engl. *carbohydrate-recognition domain*) budu smještene u izvanstaničnim ili luminalnim prostorima. Oni prepoznaju i vežu specifične ugljikohidratne strukture te imaju ključnu ulogu u biološkim procesima poput stanične komunikacije, imunološkog odgovora i transporta samih glikoproteina [5].

### 2.3. OSNOVE KEMIJE O-GLIKOZIDA

Glikozidi su prema definiciji ciklički acetali koji se sastoje od glikanskog dijela i aglikanskog dijela koji je vezan glikozidnom vezom za anomerni centar glikanskog dijela (**Slika 7**). *O*-glikozidi su široko rasprostranjeni u prirodi i čine važnu skupinu bioloških molekula. Međutim, metode za njihovu učinkovitu i jednostavnu sintezu, s precizno određenom stereokemijskom i regiokemijskom konfiguracijom, predstavljaju značajan izazov u kemiji ugljikohidrata. [6,7]



**Slika 7.** Strukturalna formula glikozida *D*-glukoze

### 2.3.1. GLIKOZIDNA VEZA

Glikozidna veza formira se kada nukleofil istisne odlazeću skupinu s anomernog ugljikovog atoma ugljikohidrata. U ovom procesu sudjeluju glikozidni donor, koji djeluje kao elektrofil i sadrži anomerni ugljikov atom, te glikozidni akceptor, koji je nukleofil i napada anomerni ugljikov atom. Ako je nukleofil hidroksilna skupina, produkt reakcije glikozilacije je *O*-glikozid.

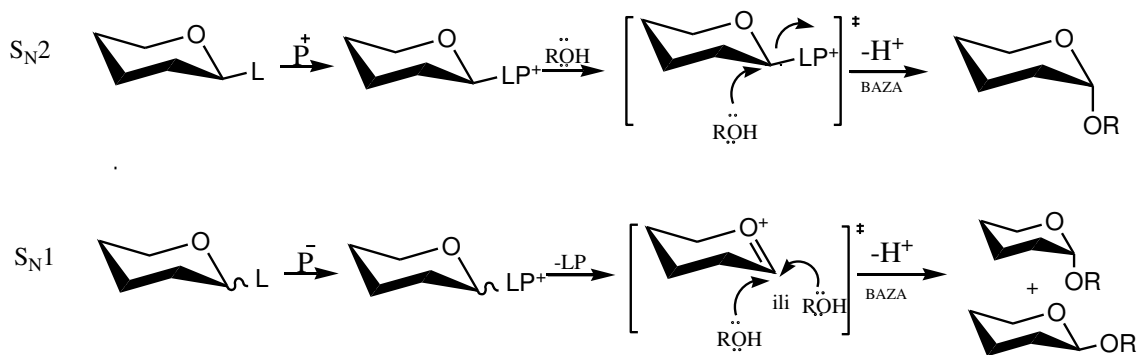
Najčešći primjer reakcije glikozilacije jest stvaranje glikozidne veze između dva monosaharida pri čemu nastaje disaharid, a daljnjom glikozilacijom disaharida nastaju oligosaharidi. Unutar disaharida, glikozidna veza ostvaruje se između anomernog ugljikovog atoma jednog monosaharida te između hidroksilne skupine koja može biti na neanomernom ugljiku pri čemu nastane reducirajući disaharid ili na anomernom ugljiku pri čemu nastane nereducirajući disaharid koji nema slobodnu hemiacetalnu ili hemiketalnu skupinu [7,8].

Proces glikozilacije odnosno sinteze glikozida uključuje nekoliko koraka:

- 1) zaštita hidroksilnih skupina ugljikohidrata zbog njihove reaktivnosti;
- 2) aktivaciju šećera u glikozidni donor s odlazećom skupinom LG (engl. *leaving group*) na anomernom centru i
- 3) povezivanje glikozidnog donora s akceptorom potaknuto određenim aktivatorom [6].

Glavni izazov u reakcijama glikozilacije je postizanje stereokemijske kontrole, jer se reakcija stvaranja glikozidne veze može odvijati putem  $S_N2$  ili  $S_N1$  mehanizma (**Slika 8**), no put koji uglavnom prevladava je  $S_N1$ . U  $S_N2$  mehanizmu, odlazeća skupina glikozidnog donora aktivira se promotorom, nakon čega slijedi nukleofilni napad glikozidnog akceptora (ROH). Odlazeća skupina se otpušta, a uklanjanjem protona pomoću baze nastaje disaharid s 1,2-*cis* glikozidnom vezom, odnosno s  $\alpha$ -glikozidnom vezom.

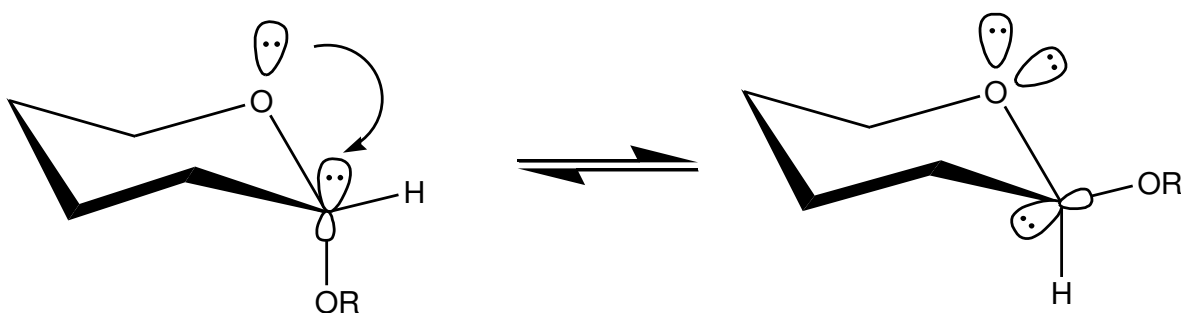
U  $S_N1$  mehanizmu, glikozidni donor također aktivira promotor. Kisik unutar prstena sudjeluje u nukleofilnoj supstituciji aktivirane odlazeće skupine glikozidnog donora, pri čemu nastaje kationski međuprodukt. ROH akceptor može napasti kationski međuprodukt s obje strane, što rezultira stvaranjem disaharida s 1,2-*cis*  $\alpha$ -glikozidnom vezom ili 1,2-*trans*  $\beta$ -glikozidnom vezom [8].



**Slika 8.** Putevi stvaranja glikozidne veze

### 2.3.2. ANOMERNI EFEKT

Anomerni efekt prvi su definirali Edward i Lemieux između 1955. i 1958. godine. Riječ je o tendenciji elektronegativnog supstituenta (polarne skupine) koji je susjedan heteroatomu unutar piranoznog prstena, odnosno nalazi se na anomernom ugljikovom atomu, da se radije smjesti u aksijalni položaj nego u ekvatorijalan, iako su na ekvatorijalnom položaju steričke smetnje manje (**Slika 9**). Postoji nekoliko fizikalnih tumačenja ovoga učinka, a jedno od njih je teorija molekulskih orbitala. Prema teoriji molekulskih orbitala, aksijalni anomer je stabiliziran pojavom hiperkonjugacije pri kojoj heteroatom unutar prstena ima mogućnost doniranja svog slobodnog elektronskog para u antiveznu  $\sigma^*$  orbitalu susjedne C-OR veze. Na ovaj način se smanjuje energija sustava delokalizacijom elektronske gustoće [1,9].



**Slika 9.** Anomerni efekt [1]

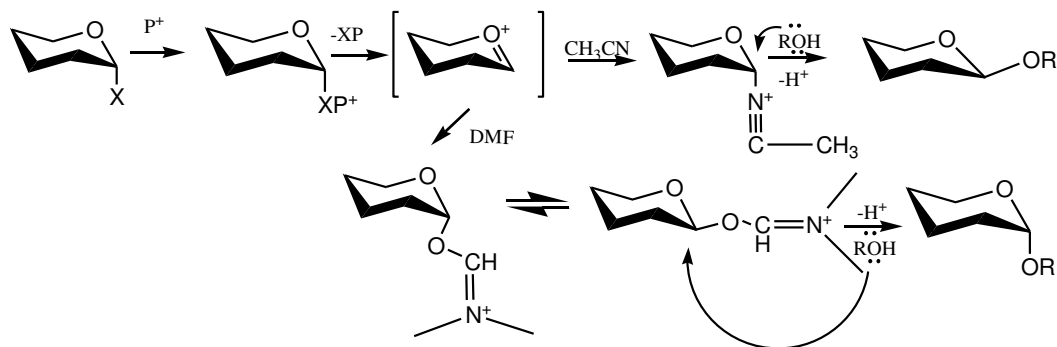
Uz ovu pretpostavku postoji tumačenje da aksijalni supstituenti smanjuju molekularni dipolni moment sustava. Kada je supstituent u aksijalnom položaju, dipoli povezani vezama C-OR i C-O suprotno su orijentirani te se međusobno poništavaju i na taj način smanjuju energetska barijeru,

dok se u ekvatorijalnom položaju zbrajaju i odbijaju. S obzirom na ova pojašnjenja, aksijalni stereoisomer predstavlja termodinamički kontrolirani produkt, dok ekvatorijalni izomer predstavlja kinetički kontrolirani produkt [1,5,9].

### 2.3.3. UTJECAJ OTAPALA NA REAKCIJE *O*-GLIKOZILACIJE

Otapala mogu igrati ključnu ulogu u postizanju određene stereoselektivnosti pri glikolitičkim reakcijama. Kada stereoselektivnost produkta nije bitna, često se koriste nepolarna otapala koja ne sudjeluju u reakcijama glikozilacije, poput diklormetana i toulena.

Za dobivanje  $\alpha$ -glikozidne veze najčešće se koriste eterska otapala te *N,N*-dimetilformamid (DMF). Kada  $S_N1$  mehanizmom nastane oksokarbenijev kation izdvajanjem odlazeće skupine, DMF kinetički napada kation, pri čemu inicijalno nastaje  $\alpha$ -*O*-imidat (Slika 10). Uspostavljanjem ravnoteže dolazi do formiranja  $\beta$ -*O*-imidata, koji zatim, uvođenjem nukleofilnog glikozidnog akceptora, dovodi do stvaranja  $\alpha$ -glikozidne veze. Za dobivanje  $\beta$ -glikozidne veze najčešće se koristi acetonitril kao otapalo, pri čemu nastaje 1,2-*cis*-nitril te zatim dodatkom glikozidnog akceptora u konačnici nastane 1,2-*trans*-produkt sa  $\beta$ -glikozidnom vezom [10,11,12,13].



Slika 10. Utjecaj otapala na *O*-glikozilaciju

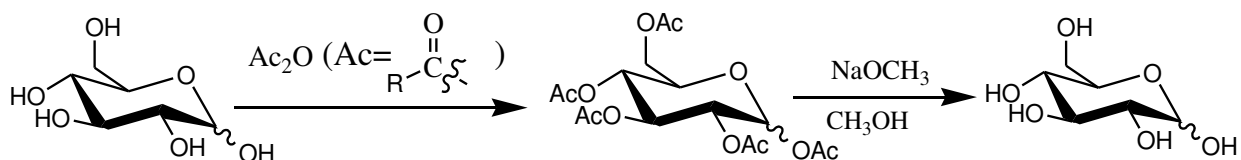
### 2.3.4. ZAŠTITNE SKUPINE MONOSAHARIDA

Stereoselektivnost i regioselektivnost u reakcijama *O*-glikozilacije ključne su za dobivanje specifičnih spojeva, ali predstavljaju izazov zbog različite reaktivnosti hidroksilnih skupina unutar šećernih struktura. Reaktivnost hidroksilnih skupina varira ovisno o tome nalaze li se na anomernom ugljikovom atomu, primarnom ili sekundarnom ugljiku. Stoga se u kemiji



ugljikohidrata i njihovim sintezama često koriste zaštitne skupine koje omogućuju kontrolu regioselektivnosti i utječu na stereokemiju produkta. Za sintezu specifičnih *O*-glikozida, pomno se biraju zaštitne skupine kako bi se omogućilo provođenje točno određenog sintetičkog puta i dobivanje željenog spoja. Postoje trajne zaštitne skupine koje ostaju na šećeru do kraja sinteze i privremene zaštitne skupine koje se uklanjaju tijekom sinteznih modifikacija. Kako bi se zaštitili, šećeri se tijekom reakcija glikozilacije najčešće prevode u estere, etere i acetale. Pri odabiru zaštitne skupine važno je uzeti u obzir željenu stereokemiju konačnog produkta te uvjete daljnjih sintetskih koraka. Nakon odabira, zaštitna skupina se uvodi u molekulu u odgovarajućem kiselom ili bazičnom mediju u kojem je stabilna, a na kraju sintetskog procesa, zaštitna skupina se uklanja pomoću specifičnih reagensa [6,14].

Među *O*-glikozidima razlikuju se dvije ključne vrste skupina: susjedna i direktna. Susjedna skupina se odnosi na funkcionalnu grupu koja je smještena uz ugljikov atom na kojem se nalazi glikozidna veza, te može značajno utjecati na stereokemiju te veze. S druge strane, direktna skupina je ona koja je izravno povezana s anomernim ugljikovim atomom šećernog ostatka putem glikozidne veze. Za dobivanje 1,2-*trans*-glikozida često se koristi utjecaj susjedne skupine, što se postiže primjenom acilnih supstituenata na C-2 položaju. Najčešći supstituenti su *O*-acetil, koji se dobije korištenjem acetanhidrida uz jod kao katalizator, *O*-benzoil, koji se dobije korištenjem benzoil-klorida u prisustvu baze te se uklanja katalitičkom hidrogenolizom, te *O*-pivaloil. Ovi supstituenti stvaraju steričke smetnje koje blokiraju donji dio glikozidnog donora, čime usmjeravaju nukleofilni napad glikozidnog akceptora s gornje strane na anomerni ugljikov atom, te tako omogućuju formiranje  $\beta$ -glikozidne veze. Na ovaj se način monosaharidi zaštićuju prevodenjem u estere, a esterske skupine se po završetku sintetskog puta lako uklanjaju u bazičnom mediju ili se češće uklanjaju u reakciji Zemplén transesterifikacije korištenjem otopine natrijevog metoksida u metanolu (**Slika 11**)[6,8,14].



**Slika 11.** Zaštita monosaharida pomoću acilnih skupina i njihovo uklanjanje [6]

Za privremenu zaštitu ugljikohidrata koriste se posebni eteri koji se mogu razgraditi pod specifičnim reakcijskim uvjetima. Benzilni eteri, koji se mogu ukloniti katalitičkom hidrogenolizom, i alilni eteri koji postaju nestabilni nakon izomerizacije u vinilni eter, često su korištene zaštitne skupine u kemiji ugljikohidrata uz esterske skupine. Također, tritilni eteri mogu se koristiti za selektivnu zaštitu primarnih hidroksilnih skupina zbog specifičnih steričkih zahtjeva ove zaštitne skupine. Uz njih, sililni eteri su također važni, pri čemu je najčešće korištena *t*-butildimetilsilil (TBDMS) skupina. Eteri se formiraju pod klasičnim uvjetima Williamsonove sinteze, koristeći natrijev hidrid ili natrijev hidroksid kao bazu u polarnom aprotičnom otapalu poput DMF-a, zajedno s odgovarajućim alkil-bromidom ili alkil-kloridom. S obzirom na to da takvi bazični uvjeti nisu pogodni za acetatne skupine i reakcije esterifikacije, uvođenje eterske zaštite treba izvesti prije same esterifikacije. Stoga su selektivne reakcije pripreve etera s ugljikohidratima znatno teže izvedive od selektivnih reakcija aciliranja. Često se za istovremenu zaštitu dviju hidroksilnih skupina u šećeru koriste ciklički acetali koji se obično pripremaju kiselokataliziranim reakcijama aldehida i ketona. Najčešći primjeri acetalnih zaštitnih skupina su priprava izopropilidena, koji nastaje reakcijom diola s acetonom, te benzilidena koji se dobije reakcijom diola s benzaldehidom [6].

## 2.4. BIOLOŠKE AKTIVNOSTI *O*-GLIKOZIDA

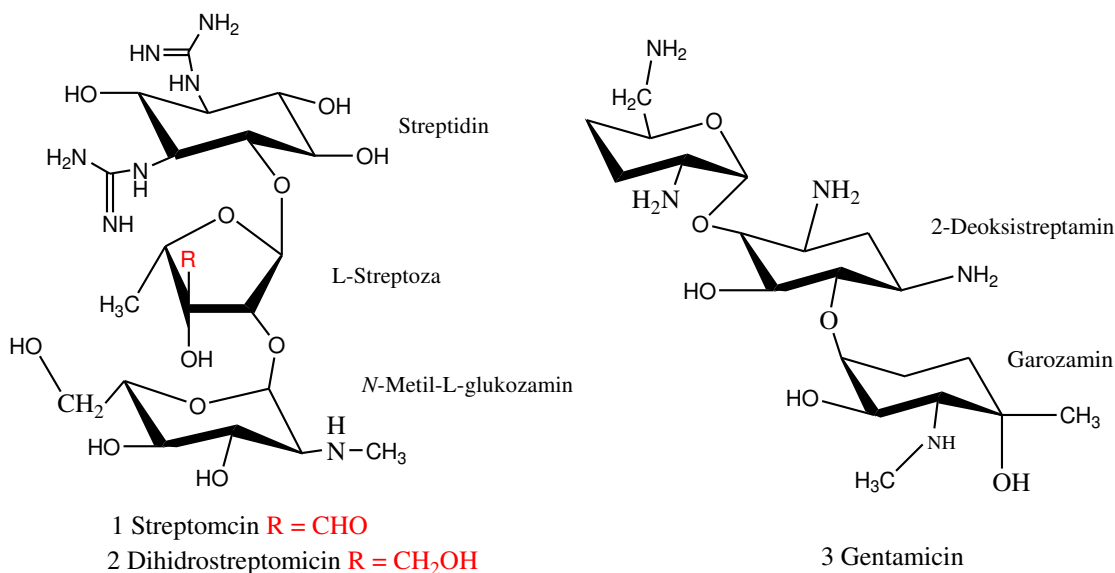
Glikozidi su biološki važne molekule koje imaju ključnu ulogu u mnogim fiziološkim procesima. Ovi spojevi prisutni su u raznim organizmima, uključujući ljude, biljke, mikroorganizme i životinje. Postoji širok spektar glikozidnih spojeva koji se koriste u medicini, kao i glikozidnih metabolita s određenom biološkom aktivnošću. Među njima se posebno ističu glikozidni antibiotici, glikozidni vitamini, te glikozidni steroidi i terpenoidi. Struktura *O*-glikozida, koja uključuje šećerni dio vezan za aglikanski dio, značajno utječe na njihove farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine, često poboljšavajući njihovu topljivost u vodi, stabilnost i biološku aktivnost. Aglikanski dio može biti farmakološki aktivan sam po sebi, no vezivanje jednog ili više šećernih ostataka, odnosno proces glikozilacije, mijenja biološka svojstva molekule. To može omogućiti prolazak molekule kroz biološke barijere, kao što su krvno-moždana i placentna barijera, ili specifično vezivanje za određene receptore na površini stanica. Zbog toga glikozidna veza može biti ključna kod aktivnosti antibiotika i drugih lijekova, gdje je potrebna specifična interakcija s receptorima na staničnim membranama. Neki glikozidi imaju jedinstvenu biološku aktivnost koja ovisi o njihovoj cjelovitoj molekularnoj strukturi, a ne samo od aktivnosti osnovnog

aglikana (neglikozidnog dijela molekula). Uspoređivanje aktivnosti ovih spojeva može pomoći u razumijevanju strukture i funkcije, kao i u procjeni korisnosti dodavanja šećernih dijelova farmakološki važnim molekulama [15].

### 2.4.1. GLIKOZIDNI ANTIBIOTICI

Glikozidni antibiotici su skupina antibiotika koji sadrže glikozidne veze, koje značajno utječu na njihovu biološku aktivnost i predstavljaju jednu od najvažnijih grupa u liječenju bakterijskih infekcija. Glikozidni antibiotici, posebice aminoglikozidi i glikopeptidi, imaju ključnu ulogu u suvremenoj medicini. Njihova struktura i mehanizam djelovanja omogućuju učinkovitost protiv širokog spektra patogena, posebno onih koji su otporni na druge oblike antibiotika [15].

Aminoglikozidni antibiotici su važna podskupina glikozidnih antibiotika koja uključuje spojeve kao što su streptomycin, gentamicin, i dihidrostreptomycin (**Slika 12**). Ovi antibiotici sadrže aminosaharide povezane s aminociklitolom ili ciklitolom. Njihov mehanizam djelovanja uključuje vezanje na ribosomalnu RNA (rRNA) u 30S podjedinici ribosoma, što uzrokuje inhibiciju sinteze proteina. To dovodi do smanjenja preciznosti translacije i inhibicije translokacije ribosoma, što rezultira baktericidnim učinkom [15,16].



**Slika 12.** Strukture predstavnika aminoglikozidnih antibiotika

Glikopeptidni antibiotici su kompleksni antibiotici koji se sastoje od polipeptidnog aglikana koji je višestruko glikoziliran s monosaharidima, disaharidima ili tetrasaharidima. Ovi antibiotici su posebno važni u liječenju infekcija uzrokovanih višestruko rezistentnim bakterijama, uključujući meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA). Glavni primjer ove skupine je vankomicin koji ima složenu strukturu koja se sastoji od cikličkog heptapeptida povezanog sa šećernim jedinicama, uključujući vankozamin i glukozu. Zbog svoje sposobnosti da cilja bakterije koje su otporne na druge antibiotike, vankomicin se često koristi kao lijek u liječenju teških infekcija. Međutim, s vremenom su se pojavile bakterije otporne na vankomicin što je potaknulo razvoj novih derivata vankomicina s poboljšanim svojstvima [15,16].

## 2.4.2. GLIKOZIDI VITAMINA

Glikozidi vitamina su spojevi u kojima je vitamin povezan s molekulom šećera glikozidnom vezom. Ovi spojevi mogu se naći u prirodi, ali se također mogu sintetizirati putem kemijskih i enzimatskih metoda. Glikozidi vitamina igraju ključnu ulogu u biološkim procesima, često poboljšavajući stabilnost i topljivost vitamina. Glikozidi vitamina mogu se podijeliti na lipofilne i hidrofilne ovisno o njihovoj topljivosti. Hidrofilni glikozidi se lako otapaju u vodi, poput onih od vitamina C i B, pa se lakše izlučuju iz tijela, dok se lipofilni glikozidi lakše otapaju u mastima pa se mogu lakše skladištiti u lipidnim membranama [15,17].

Glikozidi vitamina imaju ključnu ulogu u optimizaciji bioloških funkcija vitamina, omogućujući bolju apsorpciju, stabilnost i primjenu u različitim medicinskim terapijama. Iako se glikozidi vitamina mogu naći u prirodi, njihova sinteza često se provodi kako bi se poboljšala njihova topljivost i transport. Tako se primjerice riboflavin (vitamin B2) često može naći u obliku riboflavin-5'- $\alpha$ -D-glukozida koji se sintetizira u jetri procesom transglikozilacije. Ovaj oblik riboflavina sporije se apsorbira u hepatocite te se tamo hidrolizira u slobodan riboflavin [18,19]. Isto se tako askorbinska kiselina (vitamin C) može glikozilirati kako bi se stvorio 2-O- $\alpha$ -glukopiranozil-L-askorbinska kiselina, koja je stabilnija u reakcijama oksidacije i uslijed djelovanja UV-zračenja u usporedbi s neglikoziliranim oblikom. Ova dodatna stabilizacija čini glikozide vitamina korisnima i u prehranbenim i farmaceutskim proizvodima, kao i u kozmetici gdje se koriste kao antioksidansi i sredstva za posvjetljivanje kože [15,20,21].

### 2.4.3. GLIKOZIDI STEROIDA I TERPENOIDA

Glikozidi steroida i terpenoida čine veliku i biološki značajnu skupinu spojeva čija je aktivnost uvelike ovisna o njihovoj cjelokupnoj strukturi, uključujući glikozidnu komponentu koja je povezana s terpenoidnim ili steroidnim aglikanom. Ova fiziološki aktivna skupina spojeva važna je u mnogim biološkim procesima i često pokazuje jaku farmakološku aktivnost, što ih čini korisnim u različitim medicinskim primjenama [15].

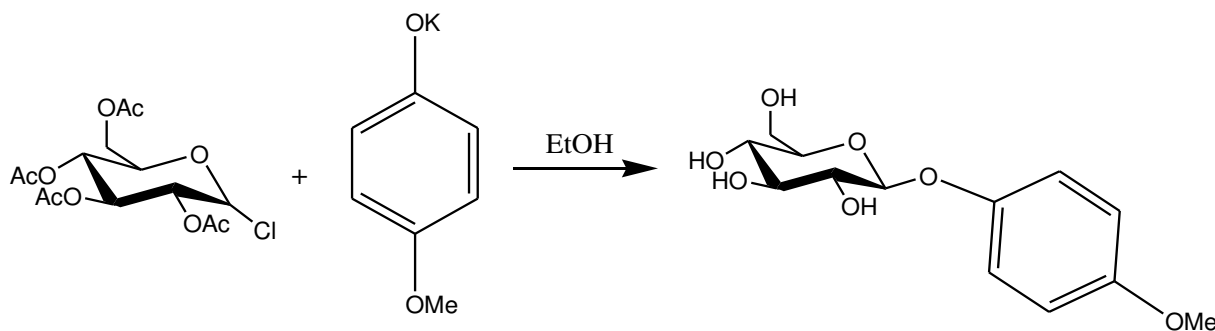
Jedni od glavnih predstavnika glikozidnih steroida jesu srčani glikozidi. Ovi spojevi, pronađeni u biljkama poput *Digitalis spp.*, često se koriste u medicini za liječenje različitih srčanih bolesti, uključujući srčanu aritmiju i zatajenje srca. Ovi se glikozidi sastoje od aglikanskog dijela genina, koji predstavlja steroidnu jezgru i postoji u više različitih strukturnih oblika, kao što su kardenoidi ili bufadienolidi, i od jednog ili više šećernih ostataka vezanih glikozidnom vezom na 3-hidroksilnu skupinu aglikana. Šećerne jedinice u srčanim glikozidima nemaju inherentnu biološku aktivnost, ali kad su vezane za steroidni dio, značajno modificiraju farmakokinetička svojstva spoja. Ovi glikozidi djeluju na način da inhibiraju  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPaze, enzime odgovorne za regulaciju ionskog balansa u srčanim stanicama, što dovodi do povećanja snage srčanih kontrakcija i kao takvo je korisno u tretmanu srčanih oboljenja [15].

Još jedna velika skupina biološki aktivnih spojeva jesu saponini. Saponini, koji su često prisutni u mnogim biljkama, su glikozidi triterpenoida poznati po sposobnosti stvaranja pjene u vodenim otopinama te učinkovitog uklanjanja nečistoća i sposobnosti uzrokovanja hemolize crvenih krvnih stanica. Ova svojstva čine ih zanimljivima za farmakološka istraživanja i primjenu, iako njihova toksičnost može biti ograničavajući faktor [15].

## 2.5. UOBIČAJENE METODE O-GLIKOZILACIJE

Sinteza glikozida je grana organske kemije koja se bavi formiranjem glikozidnih veza između šećernih jedinica (glikana) i nešećernih jedinica (aglikana), poznata kao reakcija glikozilacije. Zbog svoje kompleksnosti, glikozilacija je vrlo zahtjevna i dugo je bila predmet intenzivnog proučavanja u području kemije ugljikohidrata. Prve metode sinteze glikozida razvijene su krajem 19. stoljeća, a bavile su se sintezom alkilnih i arilnih glikozida [22].

Prva uspješna sinteza glikozida zabilježena je 1879. godine od strane A. Michaela, čime je započelo sustavno proučavanje kemije glikozida. U svom istraživanju, Michael je tretirao 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-glukopiranozil-klorid s kalijevom soli 4-metoksifenolata u apsolutnom etanolu (**Slika 13**). Produkt ove reakcije bio je  $\beta$ -D-*O*-4-metilfenil-glikozid. Međutim, zbog jakih bazičnih uvjeta reakcije, acetilne skupine su se hidrolizirale. Ova metoda bila je prikladna samo za sintezu arilnih glikozida, jer se acetilne funkcionalne skupine nisu mogle očuvati pod tim uvjetima. Ovom su se metodom postavile osnove za proučavanje daljnjih puteva sinteze složenijih glikozida [22].

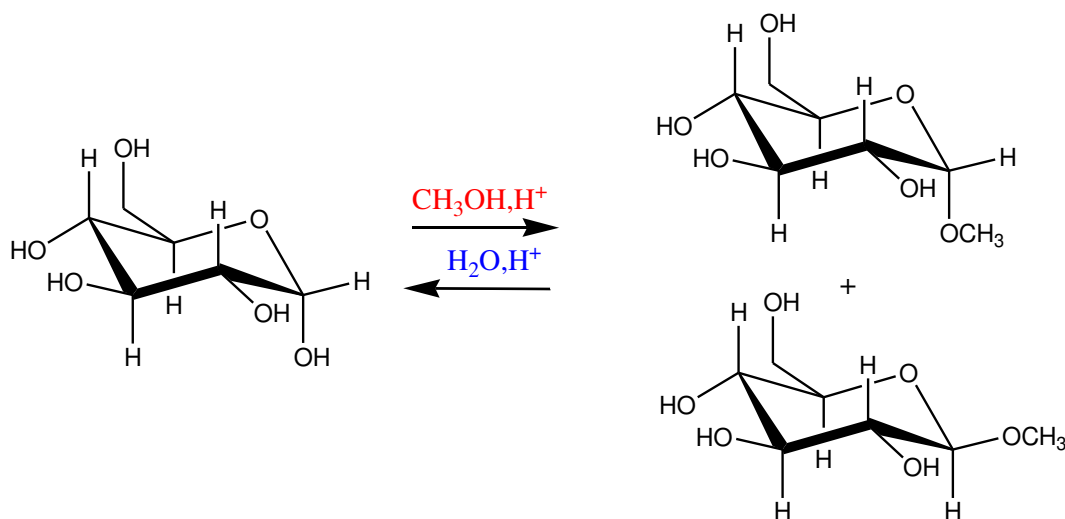


**Slika 13.** Michaelova metoda sinteze glikozida [22]

Tijekom 20. stoljeća, metode sinteze glikozida su dalje evoluirale. Razvijene su različite tehnike koje su omogućile specifičnu kontrolu nad reaktivnošću i stereoizomerijom glikozida. Neke od ovih metoda uključuju direktnu metodu glikozilacije, Koenigs-Knorr metodu, trikloracetimidatnu metodu, tioglikozide i n-pentenilglikozide. Svaka od ovih metoda donijela je specifične prednosti i izazove, te su postale osnovne tehnike u sintezi glikozida [1,6].

### 2.5.1. DIREKTNA METODA GLIKOZILACIJE

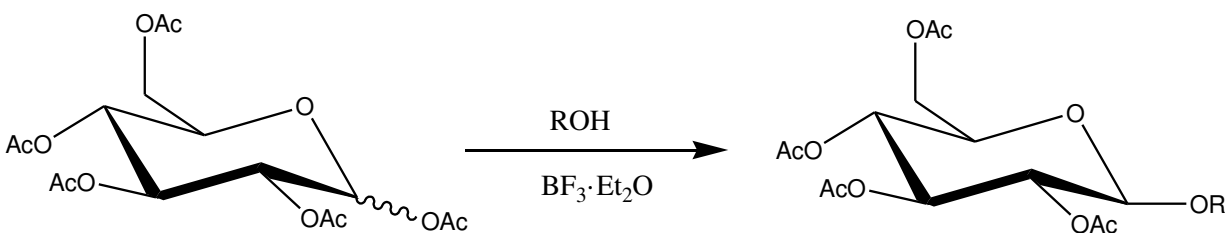
Općenito glikozidi nastaju pretvaranjem aldehida i ketona u acetale kada se oni tretiraju alkoholom uz prisustvo kiselog katalizatora te se takva vrsta reakcije naziva Fischerova glikozilacija. Bez obzira na početni glikozidni donor koji se koristi, rezultat ove reakcije uvijek je smjesa dvaju anomera. Poput drugih acetala, glikozidi su stabilni u bazičnim uvjetima, ali se u vodenoj otopini kiseline hidroliziraju do slobodnog šećera i alkohola. Primjerice, kiselo katalizirana reakcija glukoze u metanolu dati će kao produkte smjesu metil-glikozida (**Slika 14**) [23].



**Slika 14.** Reakcija  $\alpha$ -D-glukopiranoze s metanolom [16]

Iz ovih načela razvijena je direktna metoda koja se često koristi za sintezu jednostavnih O-glikozida. U ovoj metodi kao glikozidni donori koriste se peracilirani monosaharidi, tj. monosaharidi zaštićeni acilnim skupinama, dok se kao glikozidni akseptori upotrebljavaju alkoholi (**Slika 15**). Katalizatori koji se primjenjuju u ovoj reakciji najčešće su Lewisove kiseline poput borovog trifluorida dietil-eterata ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), trimetilsilil-trifluorometansulfonata (TMSOTf) ili kositrovog(IV) klorida ( $\text{SnCl}_4$ ). Stereokemijski ishod ovih reakcija uvelike ovisi o sudjelovanju susjedne skupine na C-2 atomu. Ako je na tom položaju prisutna susjedna skupina,

reakcija će rezultirati 1,2-*trans* glikozidom. U slučaju da se glikozilacija odvija bez utjecaja susjedne skupine, dolazi do formiranja i 1,2-*trans* i 1,2-*cis* glikozida [6].



**Slika 15.** Izravna metoda glikozilacije

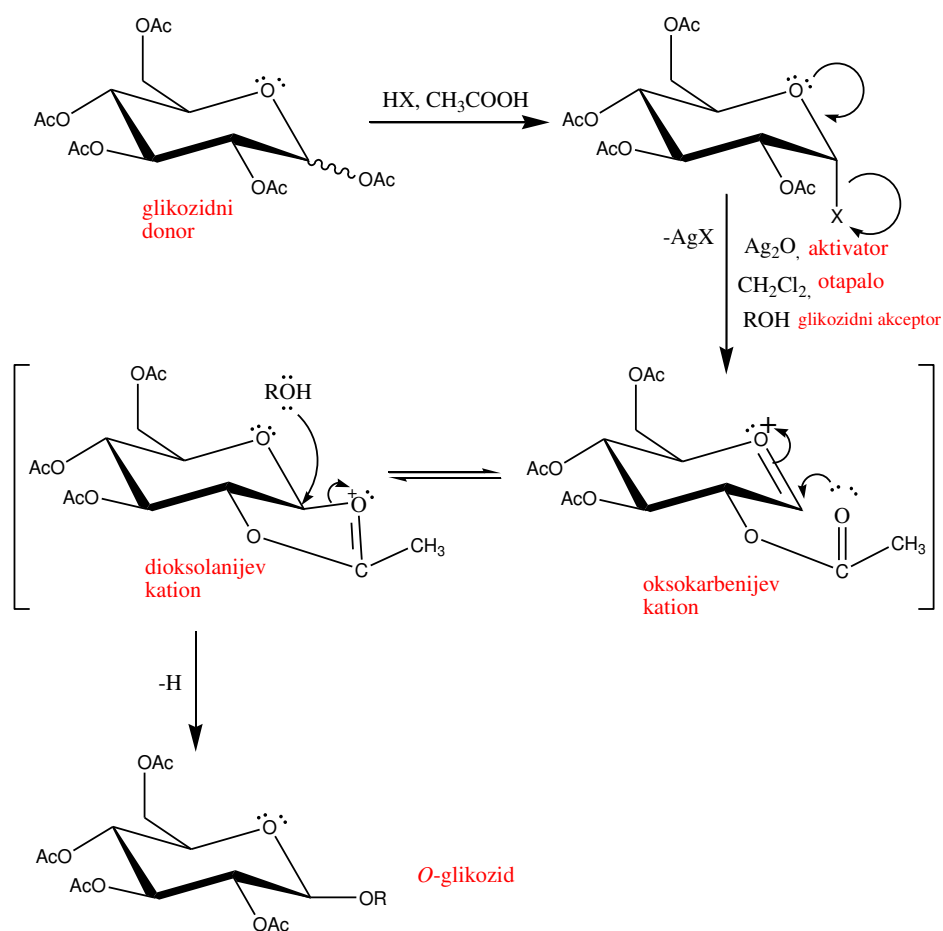
## 2.5.2. KÖENIGS-KNORROVA METODA GLIKOZILACIJE

Wilhelm Koenigs i Eduard Knorr 1901. godine uveli su najstariju i još uvijek najrasprostranjeniju metodu sinteze 1,2-*trans*-glikozida. U njihovim reakcijama glikozilacije, prvi korišteni glikozidni donori bili su glikozil-halogenidi, najčešće u obliku glikozil-klorida ili bromida. Zbog anomernog efekta, glikozil-halogenidi s aksijalno smještenim halogenima stabilniji su od svojih ekvatorijalnih izomera. Njihova stabilnost i reaktivnost dodatno su pod utjecajem zaštitnih skupina, pri čemu elektron-odvlačeće skupine, poput acilnih, smanjuju reaktivnost, dok elektron-donirajuće skupine, poput eterskih, povećavaju njihovu reaktivnost [6,24].

Koenigs-Knorr glikozilacija ustvari predstavlja metodu sinteze *O*-glikozida u kojoj glikozil-halogenidi služe kao glikozidni donori, a alkoholi kao glikozidni akceptori. Reakcija se odvija u prisustvu soli teških metala ili Lewisovih kiselina koje djeluju kao aktivatori. Najčešći aktivatori koji se koriste pri ovoj metodi su soli srebra poput srebrovog(I) oksida ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ), srebrovog(I) karbonata ( $\text{Ag}_2\text{CO}_3$ ), srebrovog trifluorometansulfonata ( $\text{AgOTf}$ ) i srebrovog(I) perklorata ( $\text{AgClO}_4$ ). Helferichova modifikacija ove metode uvela je uporabu živinih soli poput živina(II) bromida ( $\text{HgBr}_2$ ) i živina(II) cijanida ( $\text{Hg}(\text{CN})_2$ ) [6,22].



Koenigs-Knorr glikozilacija odvija se kroz nekoliko ključnih koraka (**Slika 16**). Prvi korak uključuje uvođenje zaštitnih skupina, poput acetilacije monosaharida, kako bi se osigurao utjecaj susjedne skupine koji favorizira formiranje 1,2-*trans*-glikozida. Nakon toga, na anomerni ugljikov atom monosaharida uvodi se atom halogena u kiselom mediju. Na primjer, glikozil-bromidi se dobivaju reakcijom peracetiliranih šećera s HBr u octenoj kiselini, dok se glikozil-kloridi mogu sintetizirati na sličan način uz primjenu kositrovog(IV) klorida ( $\text{SnCl}_4$ ). U završnom koraku, dolazi do supstitucije halogene skupine na glikozil-halogenidu, kada se na njega djeluje odgovarajućim glikozidnim akceptorom (ROH), u prisustvu aktivatora koji povećava reaktivnost glikozil-halogenida (poput srebrovih ili živinih soli). Kao otapalo reakcije najčešće se koriste diklorometan, cikloheksan, petroleter i slični. Najprije odlaskom halogena nastaje oksokarbenijev kation, koji pod utjecajem susjedne skupine uspostavlja ravnotežu prelaskom u dioksolanijev ion. U konačnosti, nukleofilni napad glikozidnog akceptora dovodi do formiranja *O*-glikozida [6,22,24].



**Slika 16.** Koenigs-Knorrrova metoda *O*-glikozilacije

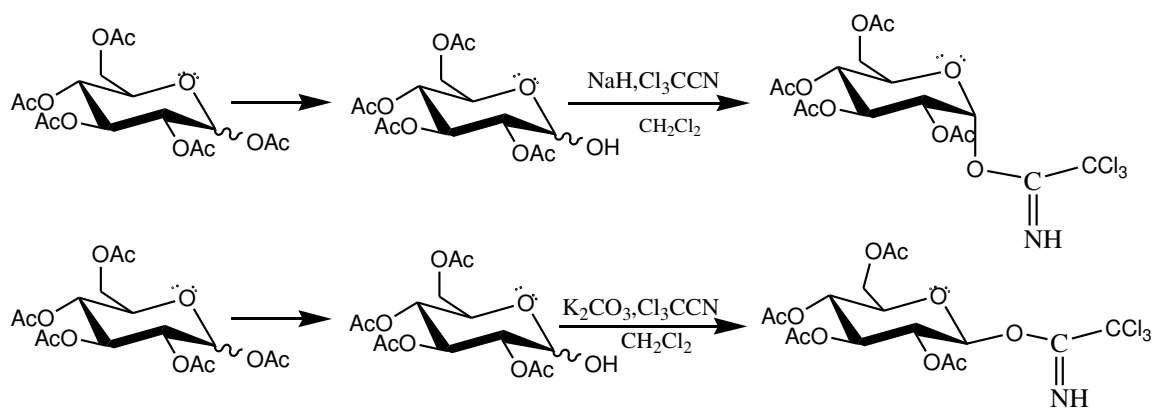
U usporedbi različitih glikozil-halogenida koji se koriste u reakcijama glikozilacije, važno je istaknuti da reaktivnost i stabilnost ovih spojeva značajno ovise o prirodi halogenog atoma i supstituentima na ugljikohidratnoj strukturi. Glikozil-kloridi su stabilniji od glikozil-bromida, dok su glikozil-jodidi obično vrlo nestabilni i imaju ograničen vijek trajanja. To čini glikozil-jodide nepovoljnim donorima u reakcijama glikozilacije. Međutim, kasnija istraživanja pokazala su da glikozil-jodidi imaju određene prednosti u pogledu stereoselektivnosti, što je potaknulo razvoj učinkovitih metoda koje koriste glikozil-jodide kao donore u glikozilaciji. Glikozil-fluoridi su relativno noviji glikozidni donori uvedeni 1981. godine, a zbog svoje visoke stabilnosti i otpornosti na hidrolizu u bazičnim uvjetima, sve se češće koriste u glikozilacijama aktiviranim Lewisovim kiselinama. Zbog svoje niske reaktivnosti, glikozil-fluoridi ne mogu se aktivirati u standardnim Koenigs-Knorr uvjetima i zbog toga su kasnije istraženi kao glikozidni donori. Reaktivnost glikozil-halogenida također ovisi o izboru otapala, temperaturi i vrsti koaktivatora (Lewisova kiselina ili sol teškog metala). Ovi faktori značajno utječu na uspješnost glikozilacije i izbor glikozidnog donora [1,6,22,24].

Koenigs-Knorr glikozilacija, iako dugo vremena najčešće korištena metoda za sintezu glikozida, ima nekoliko značajnih nedostataka. Prvo, glikozil-halogenidi, koji u ovoj reakciji djeluju kao donori su nestabilni spojevi. Zbog toga ih je potrebno uvesti neposredno prije same glikozilacije, što značajno otežava proces sinteze. Nadalje, aktivacija ovih halogenida zahtijeva upotrebu soli teških metala ili Lewisovih kiselina, koje su često toksične, skupe i osjetljive na svjetlost i vlagu. Ti se koaktivatori obično koriste u ekvimolarnim količinama, čime se dodatno povećavaju troškovi i složenost reakcije. Konačno, sama reakcija mora se odvijati na sobnoj temperaturi ili nižoj, kako bi se spriječila razgradnja reaktanata, što dodatno ograničava primjenjivost ove metode [6,22,24].

### 2.5.3. TRIKLOROACETIMIDATNA METODA GLIKOZILACIJE

Od svog uvođenja 1980. godine od strane Schmidta i njegovih suradnika, glikozil-trikloroacetimidati su postali izuzetno važni i široko primjenjivani reagensi u reakcijama glikozilacije. Ovi donori su relativno stabilni u bazičnim i neutralnim uvjetima, dok u kiselim uvjetima lako ulaze u reakciju. Za razliku od glikozil-halogenida, glikozil-trikloroacetimidati su stabilniji i mogu se sigurno skladištiti na niskim temperaturama i do nekoliko mjeseci. Dodatno, njihova aktivacija ne zahtijeva upotrebu skupih soli teških metala, što čini ovu metodu praktičnijom za primjenu u sintezama [6,24].

Glikozil-trikloroacetimidati mogu se pripremiti u nekoliko ključnih koraka (**Slika 17**). Proces započinje peracetiliranim monosaharidom, pri čemu se selektivno uklanja zaštitna skupina s anomernog ugljikovog atoma pomoću različitih baza. U bazičnim uvjetima dolazi do stvaranja anomernog oksianiona, na koji se potom lako veže elektronima siromašan trikloroacetonitril. U prisutnosti slabih baza, poput kalijevog karbonata ( $K_2CO_3$ ), reakcija daje  $\beta$ -trikloroacetimidat, koji je kinetički produkt i manje stabilan. S druge strane, upotrebom jakih baza poput natrijevog hidrida (NaH) ili DBU (1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en), nastaje  $\alpha$ -trikloroacetimidat, koji je termodinamički produkt; iako se stvara sporije, ovaj produkt je stabilniji. Ova razlika u pripravi  $\beta$ - i  $\alpha$ -trikloroacetimidata naglašava važnost izbora baze u sintezi željenog produkta, ovisno o potrebama specifične reakcije [1,6,24].

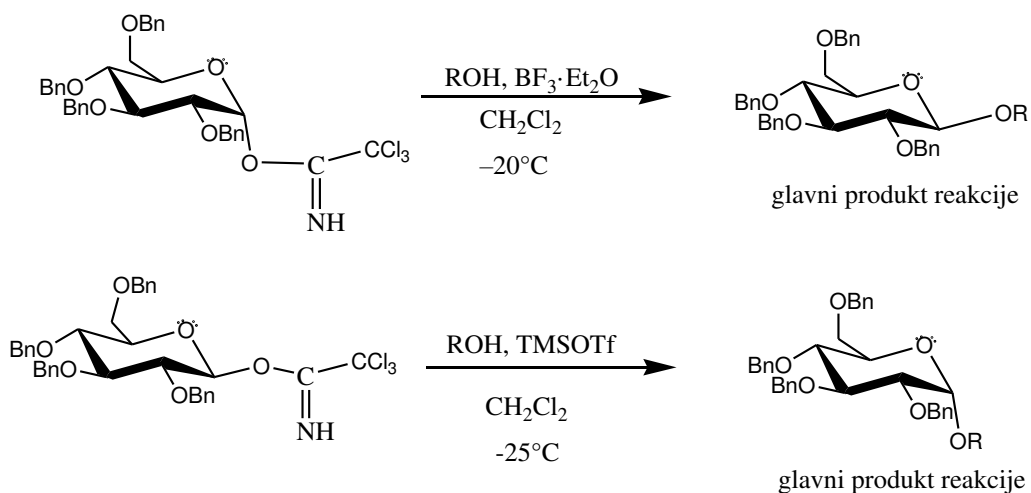


**Slika 17.** Sinteza glikozil-trikloroacetimidata

Glikozil-trikloroacetimidati su snažni glikozidni donori koji lako otpuštaju svoju odlazeću skupinu u prisustvu blago kiselih katalizatora. U procesu glikozilacije, glikozidni donor i akceptor miješaju se u inertnom otapalu, kao što su diklorometan ili acetonitril, a reakcija započinje dodavanjem katalitičke količine Lewisove kiseline (**Slika 18**). Odabir aktivatora igra ključnu ulogu u postizanju stereokemijske kontrole nad konačnim produktom. Stereokemija produkta može biti pod utjecajem susjednih skupina, pri čemu esterske zaštitne skupine, kao što su acilne skupine, favoriziraju formiranje 1,2-*trans*-glikozida. U ovom kontekstu, najčešće korišteni aktivatori pri glikozilaciji trikloroacetimidatnom metodom su borov trifluorid dietil-eterat ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) i trimetilsilil-trifluorometansulfonat (TMSOTf).

Ako su zaštitne skupine na glikozidu nesudjelujuće, poput eterskih skupina, reakcija može teći  $\text{S}_{\text{N}}2$  mehanizmom pri nižim temperaturama, uz upotrebu  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  kao katalizatora, koji favorizira inverziju konfiguracije na anomernom centru. Na primjer, ako je u reakciji korišten  $\alpha$ -imidat kao produkt će se dobiti 1,2-*trans*-glikozid s  $\beta$ -glikozidnom vezom.

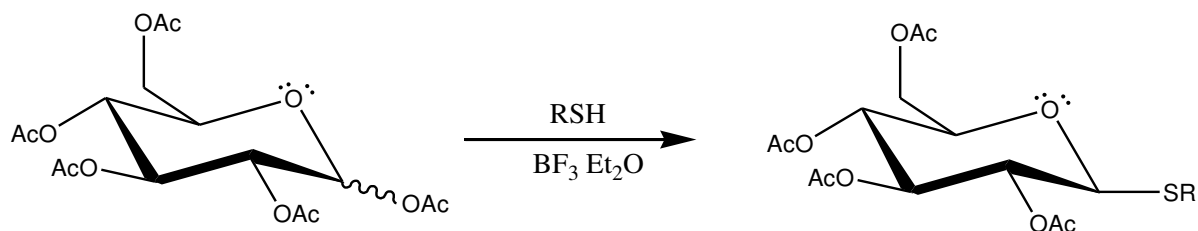
S druge strane, pri višim temperaturama i uz primjenu jačih Lewisovih kiselina, kao što je TMSOTf, te polarnijih otapala,  $\beta$ -imidat kao donor dovodi do formiranja 1,2-*cis*-glikozida s  $\alpha$ -glikozidnom vezom. Ova kontrola stereokemije omogućuje prilagodbu reakcijskih uvjeta za postizanje željene konfiguracije glikozidne veze [1,6,24,25,26,27].



**Slika 18.** Stereoselektivnost u reakciji glikozilacije s glikozil-trikloroacetimidatima [24]

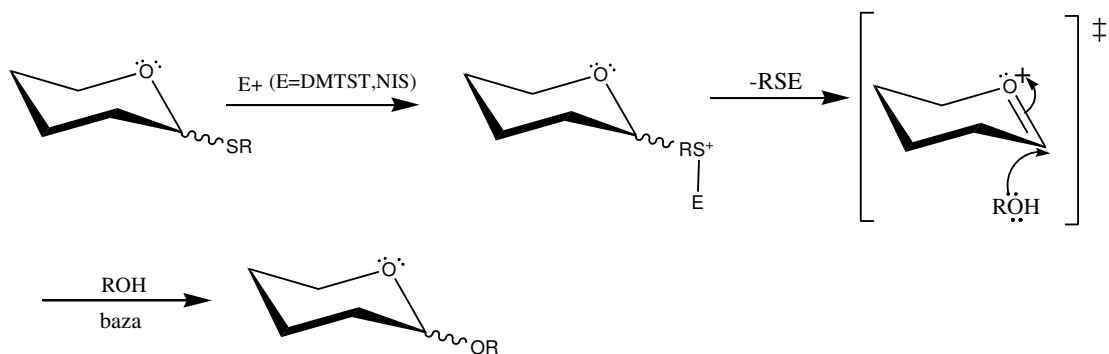
## 2.5.4. TIOGLIKOZIDI

Tioglikozidi se ubrajaju u najsvestranije glikozidne donore koji se često koriste u sintezi oligosaharida. Oni su relativno stabilni i imaju dug vijek trajanja, što ih čini izuzetno pogodnima za različite sinteze. Tioglikozidi se najčešće pripremaju reakcijom tiola s acetiliranim monosaharidima, glikozil-halogenidima ili glikozil-trikloroacetimidatima (**Slika 19**). Ova reakcija se odvija u prisustvu Lewisove kiseline, poput borovog trifluorid dietil-etera ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), što obično rezultira stvaranjem 1,2-*trans*-glikozida [24,6].



**Slika 19** *Sinteza tioglikozida*

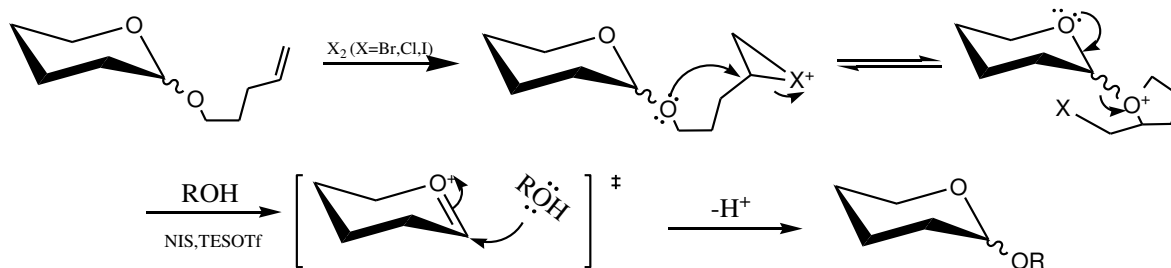
Tioglikozidi su glikozidni donori visoke reaktivnosti zbog slabije C-S veze u usporedbi s C-O vezom, što ih čini pogodnima za sintezu *O*-glikozida. Iako su stabilni u odsutnosti tiolofilnih promotora, njihova aktivacija u početku je zahtijevala upotrebu teških metala poput žive i olova. Međutim, u novije vrijeme su se počeli primjenjivati halogenirani i metilirani reagensi za lakši prijenos šećerne skupine s tioglikozida na akceptor. Među najčešće korištenim aktivatorima nalaze se *N*-jodosukcinimid (NIS) i trifluorometansulfonat (DMTST) (**Slika 20**) [6,28,29,30,31].



**Slika 20.** *O-glikozilacija upotrebom tioglikozidnih donora*

## 2.5.5. n-PENTENIL GLIKOZIDI

n-Pentenil glikozide kao vrstu glikozidnih donora prvi je uveo Fraser-Reid 1988. godine. U usporedbi s glikozil-halogenidima, ovi donori pružaju iznimnu stabilnost tijekom različitih manipulacija zaštitnim skupinama. n-Pentenil glikozidi imaju lanac od pet ugljikovih atoma vezan na anomerni centar monosaharida, koji služi kao jedinstvena zaštitna skupina. Mogu se sintetizirati Koenigs-Knorr metodom glikozilacije, gdje se n-pentenil alkohol koristi kao glikozidni akceptor koji direktno reagira s peracetiliranim monosaharidima. Međutim, ova vrsta spojeva ima zahtjevne uvjete za aktivaciju. Ključna metoda aktivacije n-pentenil glikozida uključuje halogenaciju dvostruke veze, pri čemu dolazi do stvaranja halonijevog iona, koji se zatim brzo ciklizira u međuprodukt (**Slika 21**). Disocijacija aglikona rezultira stvaranjem reaktivnog oksokarbenijevog kationa, koji dalje reagira s glikozidnim akceptorima u reakciji glikozilacije. Ove reakcije glikozilacije kataliziraju *N*-jodosukcinimid (NIS) u kombinaciji s katalitičkim količinama kiseline poput trifluorometansulfonske kiseline (TfOH) ili Lewisovih kiselina kao što su TESOTf, Sn(OTf)<sub>2</sub> ili BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O [6,24,32].



**Slika 21.** O-glikozilacija upotrebom *n*-pentenil glikozida

n-Pentenil glikozidi su važni zbog svoje sposobnosti da služe kao gradivni blokovi u sintezi složenijih oligosaharida. Njihova struktura omogućuje daljnje kemijske modifikacije, što ih čini svestranim prekursorima u sintezi različitih monosaharidnih derivata [6]. Fraser-Reid je, proučavajući n-pentenil glikozide, otkrio razliku u reaktivnosti između glikozida zaštićenih benzilnim skupinama („armed“) i aciliranim skupinama („disarmed“). Benzilirani glikozidi pokazali su se reaktivnijima, dok su acilirani bili manje reaktivni. Na temelju toga, razvio je "armed-disarmed" strategiju u kojoj benzilirani n-pentenil glikozid djeluje kao donor, a acilirani

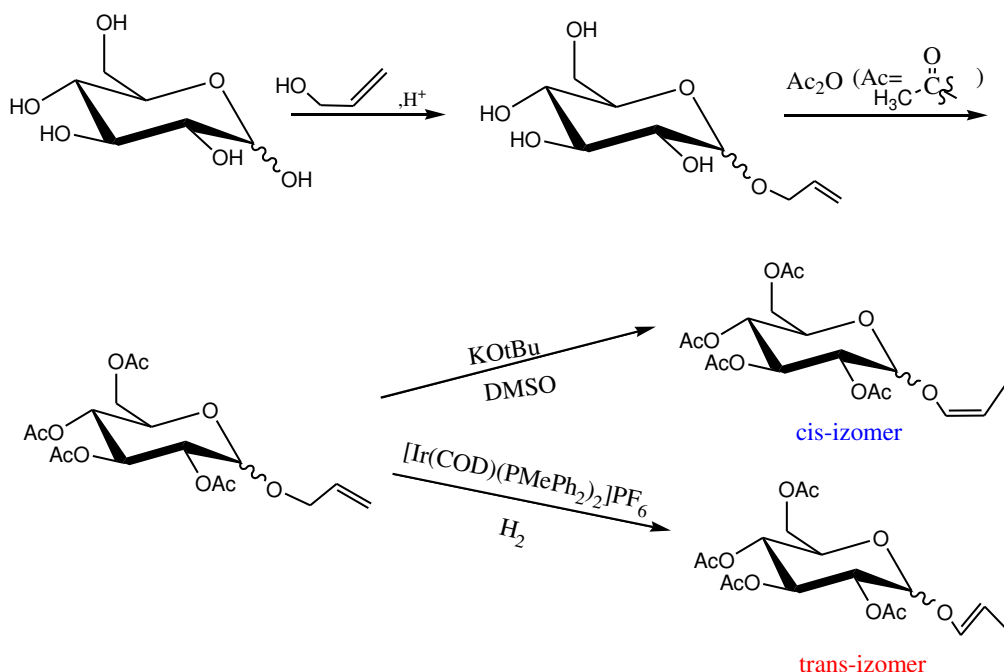
kao akceptor te je ova strategija omogućila je preciznu sintezu složenih oligosaharida [24,33,34,35].

## 2.6. NOVIJE METODE O-GLIKOZILACIJE

### 2.6.1. GLIKOZILACIJA UPOTREBOM ALIL-GLIKOZIDA

Glikozilacija pomoću alil-glikozida prvi je put predstavljena 1992. godine, kada je Sinay sa suradnicima dokazao da se *O*-alilna skupina, smještena na anomernom ugljiku, može jednostavno prevesti (izomerizirati) u *O*-vinil, što omogućuje daljnju sintezu disaharida. Premda su početni rezultati ukazivali na mogućnosti, metoda nije odmah našla široku primjenu. Tek 2007. godine, Wang je optimizirao ovu tehniku, ali čak i tada, metoda je ostala na marginama interesa znanstvenika. Ono što ovu metodu izdvaja je njena jednostavnost kroz "one-pot" sintezu, gdje se acetilirani glikozidni donor prvo pretvara u aktivni *O*-vinilni oblik, a zatim se, uz pomoć *N*-jodosukcinimida (NIS) i glikozidnog akceptora, provodi reakcija na sobnoj temperaturi. Ova strategija smanjuje složenost i broj potrebnih koraka, što je suprotno tradicionalnim metodama koje zahtijevaju uklanjanje zaštitne skupine prije postavljanja odlazeće skupine (LG) [36,37,38].

Jedinstvenost metode također leži u tome što se alilna zaštitna skupina PG (engl. *protecting group*) prvo postavlja na anomerni ugljik nezaštićenog monosaharida tipičnom reakcijom Fischerove glikozilacije dodatkom alilnog alkohola u kiselim uvjetima, nakon čega slijedi zaštita drugih pozicija (**Slika 22**). Nakon sinteze alil-glikozida, *O*-alil se izomerizira u *O*-vinil koristeći reagent kao što su kalijev *tert*-butoksid (KO*t*Bu) u DMSOu ili kompleks [Ir(COD)(PMePh<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>, aktiviran vodikom. Kada je *O*-vinil-glikozid aktiviran, dodavanjem odgovarajućeg akceptora u kratkom vremenskom periodu može se dobiti željeni disaharid [36,39].

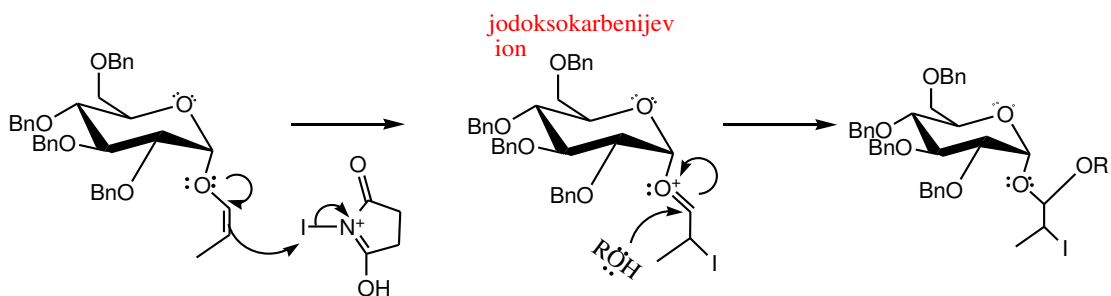


**Slika 22.** Fischerova glikozilacija, uvođenje zaštitnih skupina i izomerizacija alil-glikozida u vinil-glikozid

Jedna od ključnih prednosti ove metode je uvođenje „one-pot“ strategije, koja je značajno unaprijedila sintezu oligosaharida. Strategija se temelji na izvođenju svih koraka sinteze u jednoj posudi, bez potrebe za izolacijom ili pročišćavanjem međuprodukata između reakcija. Temelj strategije je primjena „armed-disarmed“ koncepta ili kemoselektivne aktivacije glikozidnog donora, čime se omogućuje dodavanje reagensa i zaštitnih skupina u preciznom redosljed, što rezultira željenim produktom. Time se smanjuje broj koraka potrebnih za sintezu glikozida, omogućujući brži i učinkovitiji proces [40,41].

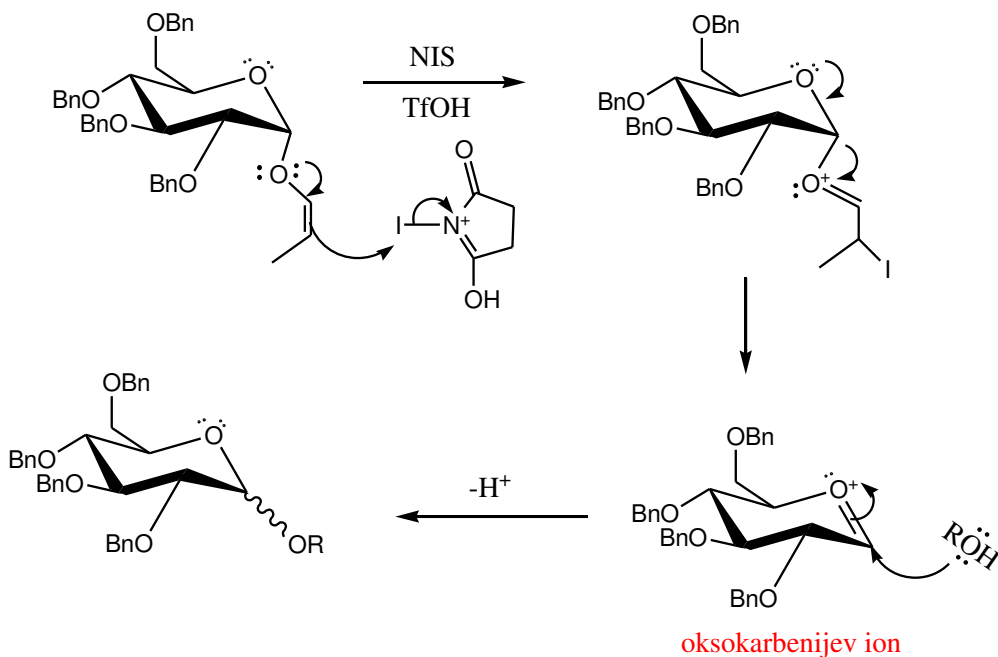
U kasnijim istraživanjima, Wang je primijetio da uporaba NIS-a sama po sebi rezultira nižim prinosima reakcije i većom pojavom neželjenog adicijskog nusprodukta (**Slika 23**). Kako bi optimizirao proces, Wang je uveo kombinaciju NIS-a s trifluorometansulfonskom kiselinom ( $\text{TfOH}$ ) za aktivaciju reakcije.  $\text{TfOH}$  ima ključnu ulogu u pretvaranju adicijskog nusprodukta, koji može nastati kada, uz adiciju joda na donor, dođe i do adicije glikozidnog akceptora, u željeni glikozid. Osim toga, u reakciji s NIS-om,  $\text{TfOH}$  stvara vrlo reaktivan jodov triflat ( $\text{IOTf}$ ), čime se značajno poboljšava učinkovitost reakcije [36,41].





**Slika 23.** Nastajanje neželjenog adicijskog nusprodukta

Reakcijom aktiviranog *O*-vinila u kombinaciji s NIS i TfOH dolazi do adicije joda na odlazeću skupinu, pri čemu se formira jodoksokarbenijev ion. Nakon odlaska odlazeće skupine, stvara se oksokarbenijev ion koji zatim nukleofilno napada glikozidni akceptor. Tijekom ovog procesa može nastati i neželjeni adicijski nusprodukt, no TfOH učinkovito preusmjerava ovaj nusprodukt u željeni glikozid (**Slika 24**) [36].



**Slika 24.** Mehanizam glikozilacije upotrebom vinil-glikozida i odgovarajućih reagensa

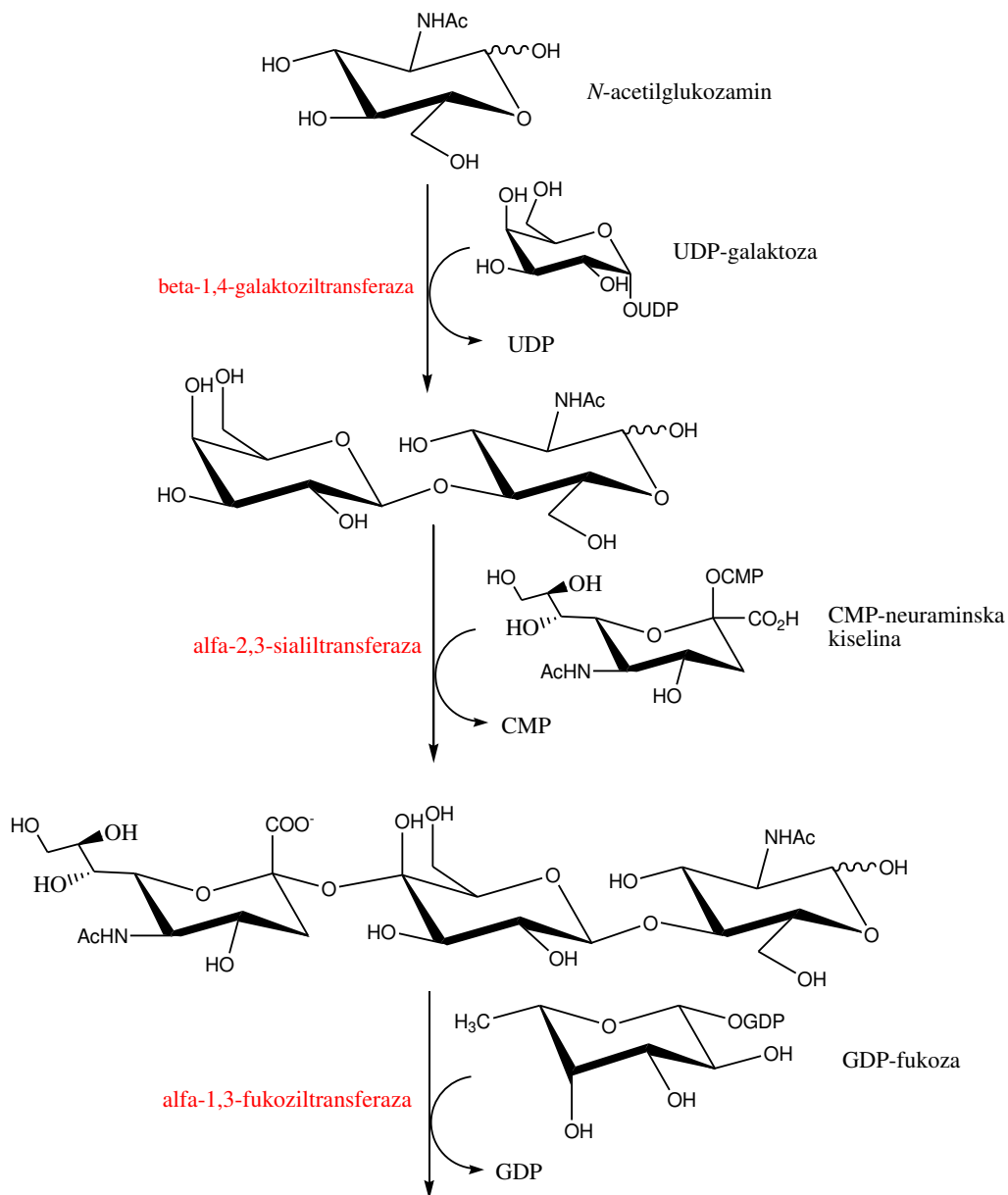
## 2.6.2. GLIKOZILACIJA POMOĆU ENZIMA

Glikozilacija pomoću enzima predstavlja učinkovitu metodu za sintezu glikozida, gdje enzimi djeluju kao biokatalizatori za formiranje glikozidnih veza. Ova metoda ima značajne prednosti u usporedbi s uobičajenim pristupima sinteze glikozida, uključujući visoku selektivnost, blage reakcijske uvjete i izbjegavanje upotrebe zaštitnih skupina. Jedna od glavnih prednosti enzimске glikozilacije je visoka specifičnost, gdje enzimi omogućuju formiranje samo jednog produkta bez potrebe za dodatnim koracima pročišćavanja. To je posebice korisno u sintezi oligosaharida i glikokonjugata. Ovom metodom također se izbjegava korištenje soli teških metala, dok je glavni nedostatak metode ograničena dostupnost specifičnih enzima, koji su rijetki i skupi. Dvije glavne klase enzima koje se koriste u ovim reakcijama su glikozidaze i glikoziltransferaze [6,36].

Glikozidaze su enzimi koji primarno kataliziraju hidrolizu glikozidnih veza u prirodnim spojevima, kao što su oligosaharidi i polisaharidi. Međutim, pod određenim uvjetima, glikozidaze mogu katalizirati i sintezu glikozida u reverzibilnoj reakciji kod koje su prinosi reakcija niski. Ova vrsta enzima može se iskoristiti za reakcije transglikozilacije gdje se glikozidaze koriste za prijenos šećernih ostataka s jednih molekula na druge. Ovdje se koriste posebni donori, poput glikozil-florida ili *p*-nitrofenil-glikozida, koji imaju dobre odlazeće skupine. Glikozidaze su prilagodljive i nisu strogo specifične prema supstratu, niti su regioselektivne u povezivanju saharidnih jedinica, što im omogućuje proizvodnju širokog spektra produkata [6].

Glikoziltransferaze su skupina enzima koji kataliziraju prijenos šećernih ostataka s nukleotid-difosfat šećera (npr. uridin-difosfat glukoza, UDP-glukoza) na hidroksilnu skupinu akceptora. Prednosti korištenja glikoziltransferaza u glikozilaciji uključuju visoku specifičnost, što minimizira stvaranje nusprodukata i omogućuje sintezu specifičnih glikokonjugata. Glavni nedostatak glikoziltransferaza je što su nukleotid-difosfatom aktivirani monosaharidi skupi supstrati koje je teško sintetizirati. Ovaj je problem riješen uvođenjem višestupanjskog enzimatskog procesa u kojemu se korištenjem više enzima u čitavom procesu omogućava sinteza željenog supstrata, ali i kontinuirana ciklička regeneracija kofaktora potrebnih za njegovu sintezu. Primjer ovog višestupanjskog procesa je sinteza sialil-Lewis<sup>x</sup> tetrasaharida. Proces započinje na način da  $\beta$ -1,4-galaktoziltransferaza dodaje galaktozu na *N*-acetilglukozamin koristeći UDP-galaktozu kao donor (**Slika 25**). UDP-galaktoza se također regenerira korištenjem različitih

enzima, a kao glavni produkt ovog početnog koraka dobije se produženi disaharid. U drugom koraku  $\alpha$ -2,3-sialiltransferaza zatim dodaje neuraminsku kiselinu (sijalinsku kiselinu) na disaharid koristeći citidin-5'-monofosfat-*N*-acetilneuraminsku kiselinu kao donor pri čemu nastaje sialilni trisaharid kao glavni produkt te se u završnom koraku na njega dodaje fukoza iz GDP-fukoze korištenjem enzima  $\alpha$ -1,3-fukoziltransferaze. Svaki od koraka uključuje i korištenje drugih enzima za regeneraciju aktiviranih nukleotid-difosfat monosaharida [6].



**Slika 25.** Glikozilacija pomoću glikoziltransferaza

### 3. ZAKLJUČAK

*O*-glikozidi čine važnu skupinu bioloških molekula koje imaju nezamjenjivu ulogu u mnogim fiziološkim procesima, uključujući staničnu komunikaciju, imunološke odgovore i stabilizaciju proteina. Postoji širok spektar glikozidnih spojeva koji se primjenjuju u medicinske svrhe. Među njima se posebno ističu glikozidni antibiotici, glikozidni vitamini te glikozidni steroidi i terpenoidi. Struktura *O*-glikozida, koja uključuje šećerni dio vezan za aglikanski dio, značajno utječe na njihove farmakokinetičke i farmakodinamičke osobine, često poboljšavajući njihovu topljivost u vodi, stabilnost i biološku aktivnost.

Razvoj preciznih i učinkovitih metoda sinteze ključan je za razumijevanje funkcija ovih spojeva u različitim organizmima te njihove primjene u medicini, farmaciji i biotehnologiji. Iako su tradicionalne metode sinteze *O*-glikozida, poput Koenigs-Knorr glikozilacije, postavile temelje za daljnja istraživanja, one su često bile ograničene niskom selektivnosti, složenim reakcijskim uvjetima i višestupanjskim procesima. Ova metoda, iako je omogućila određenu stereokemijsku kontrolu, suočavala se s nedostacima poput nestabilnosti glikozil-halogenida i potrebe za skupim solima teških metala kao katalizatorima. S razvojem glikozil-trikloracetimidatne metode, u kojoj su glikozidni donori stabilniji i ne zahtijevaju soli teških metala za aktivaciju, postignut je značajan napredak u sintezi *O*-glikozida. Nadalje, upotrebom različitih glikozidnih donora ustanovljeno je da njihova specifična struktura određuje način aktivacije i potrebne kemijske modifikacije. Tako je razvijena „armed-disarmed“ strategija, koja pomoću zaštitnih skupina omogućuje kontrolu reaktivnosti glikozidnih donora. Novija metoda glikozilacije u kojoj se primjenjuju alil-glikozidi značajno je unaprijedila učinkovitost i selektivnost sinteze *O*-glikozida. Uvođenjem „one-pot“ strategije, sinteza oligosaharida postala je brža i jednostavnija, te se primjenom te metode sinteze glikozida smanjio broj koraka pročišćavanja međuprodukata. Alil-glikozidi, kao lako dostupni i jednostavni reaktanti za aktivaciju, pokazali su se izuzetno dobrim glikozidnim donorima. Današnji napredak u sintezi *O*-glikozida, zahvaljujući novim i poboljšanim metodama te korištenju inovativnih i pristupačnih reagensa, omogućio je jednostavnije i učinkovitije postupke koji uključuju smanjenje nusprodukata te bolju stereoselektivnost reakcije. Ove inovacije od iznimne su važnosti za primjenu u dizajnu lijekova i istraživanju bioloških sustava, čime se otvaraju nove mogućnosti za daljnja istraživanja i primjene ovih važnih organskih molekula.

#### 4. POPIS LITERATURE

1. R. Das, B. Mukhopadhyay, Chemical *O*-Glycosylations: An Overview. *ChemistryOpen*. **2016**, *5*, 401-433.  
doi: 10.1002/open.201600043. PMID: 27777833; PMCID: PMC5062006.
2. SCRIBD. URL:  
<https://www.scribd.com/document/502458581/Introduction-to-Carbohydrates>  
(20.5.2024.)
3. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Zagreb, Školska knjiga, **2013**, 303-326.
4. Edutorij. URL:  
<https://edutorij-admin-api.carnet.hr/storage/extracted/fd4e4aca-de35-49a7-9436-638df9b1c154/ugljikohidrati.html> (20.5.2024.)
5. M. E. Taylor, K. Drickamer, *Introduction to Glycobiology*, Oxford, Oxford University Press, **2006**, 3-158.
6. T. K. Lindhorst, *Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry*, 2. izd., Weinheim, Wiley VCH, **2003**, 3-115.
7. L. K. Mydock, A.V. Demchenko, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 497-510.
8. D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, Boca Raton, CRC Press, **2006**, 25-269.
9. IUPAC, *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the „Gold Book“) 1997. Online corrected version: **1996** „Anomeric Effect.
10. C. Y. Liu, S. Mulani, K. K. Mong, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3299-3310.
11. S. Kaeothip, J. P. Yasomanee, A. V. Demchenko, *J. Org. Chem.*, **2012**, *77*, 291-299.
12. R. Eby, C. Schuerch, *Carbohydr. Res.* **1974**, *34*, 79-90.
13. C. S. Chao, C. Y. Lin, S. Mulani, W. C. Hung, K. K. Mong, *Chem.-Eur. J.*, **2011**, *17*, 12193-12202.
14. D. R. Mootoo, P. Konradsson, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 55883-85584.
15. V. Kren, L. Martínková, Glycosides in Medicine: "The Role of Glycosidic Residue in Biological Activity". *Curr. Med. Chem.*, **2001**, *8*, 1303-1328.
16. K. J. Shaw, P. N. Rather, R. S. Hare, G. H. Miller, *Microbiol. Rev.*, **1993**, *57*, 138.
17. J. F. Gregory III, *Annu. Rev. Nutr.*, **1998**, *18*, 277.

18. Y. Suzuki, K. Uchida, *Meth. Enzymol.*, **1980**, *66*, 327.
19. T. Joseph, D. B. McCormick, *J. Nutr.*, **1995**, *125*, 2194.
20. I. Yamamoto, N. Muto, E. Nagata, T. Nakamura, Y. Suzuki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, *1035*, 44.
21. H. Aga, M. Yoneyama, S. Sakai, I. Yamamoto, *Agric. Biol. Chem.*, **1990**, *55*, 1751.
22. L. Kurti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Cambridge, Elsevier Academic Press, **2005**, 246-247.
23. L. G. Wade, *Organic Chemistry*, 8th ed., Boston, Pearson Education International, **2013**, 1139-1195.
24. D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, Boca Raton, CRC Press, **2006**, 25-269.
25. R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1986**, *25*, 212-235.
26. X. M. Zhu, R. R. Schmidt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1900-1934.
27. R. R. Schmidt, J. C. Castro-Palomino, O. Retz, *Pure Appl. Chem.*, **1999**, *71*, 729-744.
28. R. J. Ferrier, R. W. Hay, N. A. Vethaviayasar, *Mercury. Carbohydr. Res.*, **1973**, *27*, 55-61.
29. K. Takeda, K. Tsuboyama, K. Torii, K. Furuhata, N. Sato, H. Ogura, *Lead. Carbohydr. Res.*, **1990**, *203*, 57-63.
30. H. Lonn, Methylating agents. *J. Carbohydr. Chem.*, **1987**, *6*, 301-306.
31. F. Andersson, P. Fügedi, P.J. Garegg, M. Nashed, Thiophiles. *Tetrahedron Lett.*, **1986**, *27*, 3919-3922.
32. W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Bericte*, **1901**, *34*, 957-981.
33. M. H. S. Marqvorsena, A. Brinkøb, H. H. Jensen *Carbohydr. Res.*, **2020**, *487*, 107886.
34. D. R. Motto, P. Konradsson, U. Udodong, B. Fraser-Reid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 5583-5584.
35. D. Crich, M. Li, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 4115-4118.
36. M. Prosinečki. Glikozilacija upotrebom alil-glikozida, 2020.  
URL;<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:959222> (17.7.2024.)
37. A. Marra, J. Esnault, A. Veyrieres, P. Sinay, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 6354-6360
38. P. Wang, P. Haldar, Y. Wang, H. Hu, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 5870-5873.
39. M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycoside*, Boston, Springer, **2016**, 1-417.

40. W. J. Lennarz, M. D. Lane, *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 2, Cambridge, Elsevier Academic Press, **2013**, 362-367.
41. a) N. L. Douglad, S. V. Ley, U. Lucking, S. L. Warriar, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1998**, 51-65; b) Z. Zhang, I. R. Ollmann, X. S. Ye, R. Wischnat, T. Baasov, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 734-753.