

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**TADEJA JANC**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA**

Ljubljana, 2014

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**TADEJA JANC**

**Kemijska glikozilacija rodamina B in 6G z  
D-manozo in D-glukozo**

**Chemical glycosylation of rhodamine B and 6G with  
D-mannose and D-glucose**

Ljubljana, 2014

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo (NMR) in na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (masna spektroskopija), UV-VIS in fluorescentne spektre pa sem posnela sama na Fakulteti za farmacijo.

### ***Zahvala***

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Janezu Mravljaku in somentorju asist. dr. Stanetu Pajku za njuno strokovno pomoč in vodenje tekom eksperimentalnega dela v laboratoriju in tekom pisanja magistrske naloge.

Posebno se zahvaljujem svojim staršem in moji teti Emi, ki so mi nesebično stali ob strani tekom študija in me tudi finančno podpirali. Hvala!

Hvala pa tudi mojim sošolcem in prijateljem za vse dneve in noči, ki smo jih prebedeli ob branju študijskih knjig.

Na koncu pa še zahvala mojemu fantu Tomažu za vso njegovo podporo in pomoč.

### ***Izjava***

Izjavljam, da sem magistrsko naložko z naslovom Kemijska glikozilacija rodamina B in 6G z D-manozo in D-glukozo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Staneta Pajka, mag. farm.

Tadeja Janc

Ljubljana, 2014

**Predsednik komisije:** prof. dr. Albin Kristl

**Članica komisije:** asist. dr. Irena Prodan Žitnik

## KAZALO VSEBINE:

1. UVOD .....	1
1.1. GLIKOZILACIJA .....	1
1.1.1. Kemijska glikozilacija .....	1
1.1.2. Reaktivnost in strukture glikozilnih donorjev .....	1
1.1.3. Glikozilacijska kemija trikloroacetimidatnega donorja .....	3
1.1.4. Stereokemija glikozilacijske reakcije .....	3
1.1.5. Anomerni efekt .....	5
1.1.6. Promotorji, topila in reakcijski pogoji .....	6
1.1.7. Vrstni red dodajanja reagentov .....	6
1.2. FLUORESCENCA .....	7
1.2.1. Jablonski-jev diagram .....	7
1.2.2. Fluorescentni spekter .....	8
1.2.3. Fluorescentni signal .....	9
1.2.4. Fluorescenza ozadja .....	9
1.2.5. Spektrofluorometer .....	10
1.3. FLUORESCENTNA BARVILA .....	11
1.3.1. Želene lastnosti fluorescentnih sond .....	11
1.3.2. Specifičnost pH odvisnih sond .....	11
1.3.3. Rodamini .....	12
2. NAMEN DELA .....	13
2.1. SINTEZNI NAČRT .....	13
2.2. MERJENJE ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN <b>4a2</b> in <b>5c</b> .....	14
3. MATERIALI IN METODE .....	15
3.1. MATERIALI .....	15
3.2. METODE .....	15
4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ .....	17
4.1. ACETILIRANJE MANOZE IN GLUKOZE .....	17
4.1.1. SINTEZA (3S,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetata ( <b>1a</b> ) .....	17
4.1.2. SINTEZA (3R,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetata ( <b>2a</b> ) .....	18
4.2. SELEKTIVNA DEACETILACIJA ANOMERNEGA CENTRA .....	19
4.2.1. SINTEZA (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoksimetil)-6-hidroksitetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata ( <b>1b</b> ) .....	19

4.2.2. SINTEZA ( <i>2R,3R,4S,5R</i> )-2-(acetoksimetil)-6-hidroksitetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata ( <b>2b</b> ) .....	20
4.3. AKTIVACIJA ANOMERNE -OH SKUPINE .....	20
4.3.1. SINTEZA ( <i>2R,3R,4S,5S,6R</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trikloro-1-iminoetoksi) tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata ( <b>1c</b> ) .....	21
4.3.2. SINTEZA ( <i>2R,3R,4S,5R,6R</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trikloro-1-iminoetoksi) tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetata ( <b>2c</b> ) .....	21
4.4. ZAŠČITA -COOH SKUPINE SERINA .....	22
4.4.1. SINTEZA ( <i>R</i> )-3-hidroksi-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijev klorida ( <b>3a</b> ) .....	22
4.5. SINTEZA ETANOLAMIDNEGA IN PROPANOLAMIDNEGA DERIVATA RODAMINA 6G .....	23
4.5.1. SINTEZA 3',6'-bis(etilamino)-2-(2-hidroksietil)-2',7'-dimetilspiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-ona ( <b>4a</b> ) .....	23
4.5.2. SINTEZA 3',6'-bis(etilamino)-2-(3-hidroksipropil)-2',7'-dimetilspiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-on ( <b>4b</b> ) .....	24
4.6. SINTEZA ALKOHOLAMIDOV IZ RODAMINA B .....	25
4.6.1. POSTOPEK ZA SINTEZO <i>N</i> -(9-(2-(klorokarbonil)fenil)-6-(dietilamino)-3 <i>H</i> -ksanten-3-iliden)- <i>N</i> -etiletanaminijevega klorida ( <b>5</b> ) .....	26
4.6.2. 3',6'-bis(dietilamino)-2-(2-hidroksietil)spiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-on ( <b>5a</b> ) .....	26
4.6.3. 3',6'-bis(dietilamino)-2-(3-hidroksipropil)spiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-on ( <b>5b</b> ) .....	27
4.6.4. ( <i>R</i> )-metil 2-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)-3-hidroksipropanoat ( <b>5c</b> ) .....	28
4.7. KEMIJSKA GLIKOZILACIJA .....	29
4.7.1. ( <i>2S,3S,4R,5R</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksitetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetat ( <b>4a1</b> ) ..	31
4.7.2. ( <i>2S,3S,4R,5S,6S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetat ( <b>4a3</b> ) ..	32
4.7.3. ( <i>2S,3S,4R,5S,6S</i> )-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-3,4,5-triil triacetat ( <b>5a3</b> ) .....	33
4.8. ODSTRANITEV ACETILNE ZAŠČITE .....	34
4.8.1. SINTEZA natrijevega ( <i>2R,4aS,7R,8S,8aR</i> )-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)-7,8-dihidroksi-2-metilheksahidropirano[3,2- <i>d</i> ][1,3]dioksin-2-olata ( <b>4a2</b> ) .....	35
4.8.2. SINTEZA 3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-2-(2-((( <i>2R,3R,4S,5S,6R</i> )-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2 <i>H</i> -piran-2-il)oksi)etil)spiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-ona ( <b>4a4</b> ) .....	36
4.8.3. SINTEZA natrijevega ( <i>2R,4aS,6S,7S,8S,8aR</i> )-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-3-oksospiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)-7,8-dihidroksi-2-metilheksahidropirano[3,2- <i>d</i> ][1,3]dioksin-2-olata ( <b>5a4</b> ) .....	37

4.9. MERJENJE ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN <b>4a2</b> in <b>5c</b> .....	38
4.9.1. Priprava 250 mL 0,1 M raztopine citronske kisline in 250 mL 0,2 M raztopine Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	38
4.9.2. Priprava pufrov .....	38
4.9.3. Priprava osnovnih raztopin.....	39
4.9.4. Priprava testnih raztopin.....	39
4.9.5. Priprava vzorčne slepe raztopine za absorbanco .....	39
4.9.6. Inkubacija raztopin vsaj 6 ur .....	40
4.9.7. Merjenje absorbance .....	40
4.9.8. Merjenje fluorescence .....	40
4.9.10. Merjenje pH testnih raztopin.....	40
5. REAZULTATI IN RAZPRAVA .....	41
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV .....	41
5.1.1. Acetiliranje manoze in glukoze .....	41
5.1.2. Selektivna deacetilacija anomernega centra.....	41
5.1.3. Aktivacija anomerne –OH skupine .....	41
5.1.4. Zaščita –COOH skupine serina .....	42
5.1.5. Sinteza kislinskega klorida ( <b>5</b> ) .....	43
5.1.6. Sinteza alkoholamidov rodamina B in 6G .....	44
5.1.7. Kemijska glikozilacija.....	44
5.1.8. Odstranitev acetilne zaščite in nastanek orto-kisline .....	45
5.2. ABSORPCIJSKA IN FLUORESCENTNA SPEKTRA SPOJIN <b>4a2</b> in <b>5c</b> .....	47
5.2.1. Absorpcijska spektra .....	47
5.2.2. Fluorescentna spektroskopija .....	49
5.3. TITRACIJSKI KRIVULJI .....	51
5.3.1. Titracijska krivulja spojine <b>4a2</b> .....	51
5.3.2. Titracijska krivulja spojine <b>5c</b> .....	52
5.4. NORMALIZIRANE VREDNOSTI ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN <b>4a2</b> in <b>5c</b> .....	52
6. SKLEPI .....	54
7. LITERATURA.....	55

## **SLIKOVNO KAZALO:**

<b>Slika 1:</b> Princip kemijske glikozilacije .....	1
<b>Slika 2:</b> Mehanizem kemijske glikozilacije .....	4
<b>Slika 3:</b> Teorija dipol – dipol interakcije.....	5
<b>Slika 4:</b> Jablonski-jev diagram. ....	7
<b>Slika 5:</b> Stokes-ov premik .....	8
<b>Slika 6:</b> Elementi spektrofluorometra .....	10
<b>Slika 7:</b> Spreminjanje oblike analogov rodamina B ali 6G v odvisnosti od pH. ....	12
<b>Slika 8:</b> Peracetilacija D(+)manoze (sinteza spojine 1a) .....	17
<b>Slika 9:</b> Peracetilacija D(+)glukoze (sinteza spojine 2a) .....	17
<b>Slika 10:</b> Sinteza spojin 1b in 2b s selektivno odščito anomernega centra .....	19
<b>Slika 11:</b> Sinteza trikloroacetimidatnega donorja (sinteza spojin 1c in 2c).....	20
<b>Slika 12:</b> Zaščita –COOH skupine L(-)serina (sinteza spojine 3a) .....	22
<b>Slika 13:</b> Sinteza alkoholamidnih derivatov rodamina 6G (sinteza spojin 4a in 4b) .....	23
<b>Slika 14:</b> Sinteza alkoholaminskih derivatov rodamina B (sinteza spojin 5a, 5b, 5c) .....	25
<b>Slika 15:</b> Kemijska glikozilacija. Nastanek spojin 4a1, 4a3 in 5a3 .....	29
<b>Slika 16:</b> Odstranitev acetilne zaščite (sinteza spojin 4a2, 4a4 in 5a4).....	34
<b>Slika 17:</b> Mehanizem katalitične aktivnosti DMAP in piridina .....	41
<b>Slika 18:</b> Mehanizem po Schmidtu.....	42
<b>Slika 19:</b> Mehanizem metilacije –COOH skupine L-serina.....	43
<b>Slika 20:</b> Mehanizem nastanka kislinskega klorida iz rodamina B .....	43
<b>Slika 21:</b> Zemplenova metoda odstranitve acetilne zaščite in nastanek soli orto-kisline.....	45

## **POVZETEK**

Rodamini so družina spojin, ki spadajo med fluoronska barvila. V odvisnosti od pH reverzibilno spreminjajo obliko in s tem fluorescenco. Zaradi dobre fotostabilnosti in visoke občutljivosti so v celični biologiji pomembno orodje za proučevanje celičnih procesov s fluorescentnimi tehnikami.

Da bi povečali specifičnost barvil za točno določeno tarčo, raziskovalci pripenjajo na molekule barvila različne substituente, ligande ali protitelesa, ki predstavljajo specifične povezovalce med tarčo in barvilm.

V magistrskem delu smo poskušali pripraviti glikozidne analoge rodamina B in rodamina 6G s pomočjo kemijske glikozilacije s trikloroacetimidatno metodo.

Na rodamina 6G in B smo pripeli različne amino alkohole in dobili produkte **4a**, **4b**, **5a**, **5b** in **5c**, ki so amidi. Preko -OH skupine amino alkohola in C-1 atoma peracetilirane D-glukoze in D-manoze z aktiviranima anomernima mestoma smo sintetizirali  $\alpha$ -O-glikozidno (**4a1**) in  $\beta$ -O-glikozidno (**4a3** in **5a3**) vez. Kot glikozilna donorja smo uporabili 2,3,4,6-tetra-O-acetyl zaščiteno D-manozo oz. D-glukozo z aktivranim anomernim mestom (trikloroacetimidat), kot aktivator pa smo uporabili TMSOTf. Produktom glikozidne reakcije smo odstranili acetilne zaščitne skupine z Zemplenovo metodo in dobili spojine **4a2**, **4a4** in **5a4**. Ugotovili smo, da so spojine **4a1**, **4a3** in **5a3** 1,2 – *trans* produkti. Spojini **4a2** in **5a4** sta natrijevi oz. po čiščenju na kolonski kromatografiji trietilamonijevi soli orto-kislene. Orto-kislina nastane na mestu 4 in 6 manoznega oz. glukoznega dela molekule, med tem ko pri spojini **4a4** orto-kislina ne nastane.

Spojinama **4a2** in **5c** smo pomerili absorbanco in fluorescenco pri različnih pH vrednostih. Rezultate smo prikazali grafično in jih ovrednotili. S pomočjo titracijskih krivulj smo odčitali okvirni vrednosti pKa, ki sta za spojino **4a2** 4,6 in za **5c** 5,8.

Največja intenziteta fluorescence za spojino **4a2** je pri pH vrednosti 3,6 in za spojino **5c** pri pH vrednosti 4,4. Spojini **4a2** in **5c** sta glede na okvirne vrednosti pKa primerni za označevanje lizosomov in endosomov, katerih okolje ima pH vrednosti med 4,5 in 6, imata pa zelo šibko intenziteto fluorescence v fiziološkem pH območju. Spojina **4a2** ima Stokes-ov premik 25 nm, spojina **5c** pa 50 nm, kar je ugodno za fluorofore.

**Ključne besede:** kemijska glikozilacija, trikloroacetimidatna metoda, rodamin B, rodamin 6G, fluorescenza

## ABSTRACT

Rhodamines are compounds of a group of fluorone dyes. They change their chemical structure and their intensity of fluorescence as a function of the pH. Because of their good photostability and high sensitivity they are a powerful tool for studying cellular processes in the cell biology by fluorescent techniques.

In order to increase the specificity of dyes to a specific target, researchers attach the dye molecule to the various molecules, e. g. ligands, antibodies, which represent the specific linkers between the target and a dye.

We attempted to prepare glycoside analogues of rhodamine B and rhodamine 6G using chemical glycosylation or more specifically trichloroacetimidate method.

Firstly, several simple aminoalcohols were reacted with rhodamine B or rhodamine 6G to yield amides **4a**, **4b**, **5a**, **5b** and **5c**. Glycoside bonds were formed between hydroxyl groups of amides **4a**, **4b**, **5a**, **5b**, **5c** and C-1 of D-glucose and D-mannose derivatives. Glycosilation was performed by trichloroimidate method; 2,3,4,6-tetra-O-acetyl protected D-glucose and D-mannose with trichloroacemidate activated anomeric carbon (C-1) acting as glycosil donors and TMSOTf as an activator. Acetyl protecting groups were removed by Zemplen method to yield compounds **4a2**, **5a4**, and **4a4**. Products **4a1**, **4a3**, and **5a3** are 1,2 – *trans* compounds. Compounds **4a2** and **5a4** are sodium or after purification on column chromatography triethylammonium salts of the ortho-acid. Ortho-acid occurs at the 4 and 6 moiety of mannose or glucose while the compound **4a4** is not ortho-acid.

Absorbance and fluorescence spectra of compounds **4a2** and **5c** were measured at various pH values. The results were evaluated and shown graphically. Titration curves fluorescence intensity versus pH were plotted for compounds **4a2** and **5c** and approximate pKa values determined. The pKa values for compounds **4a2** is 4,6 and for compound **5c** is 5,8.

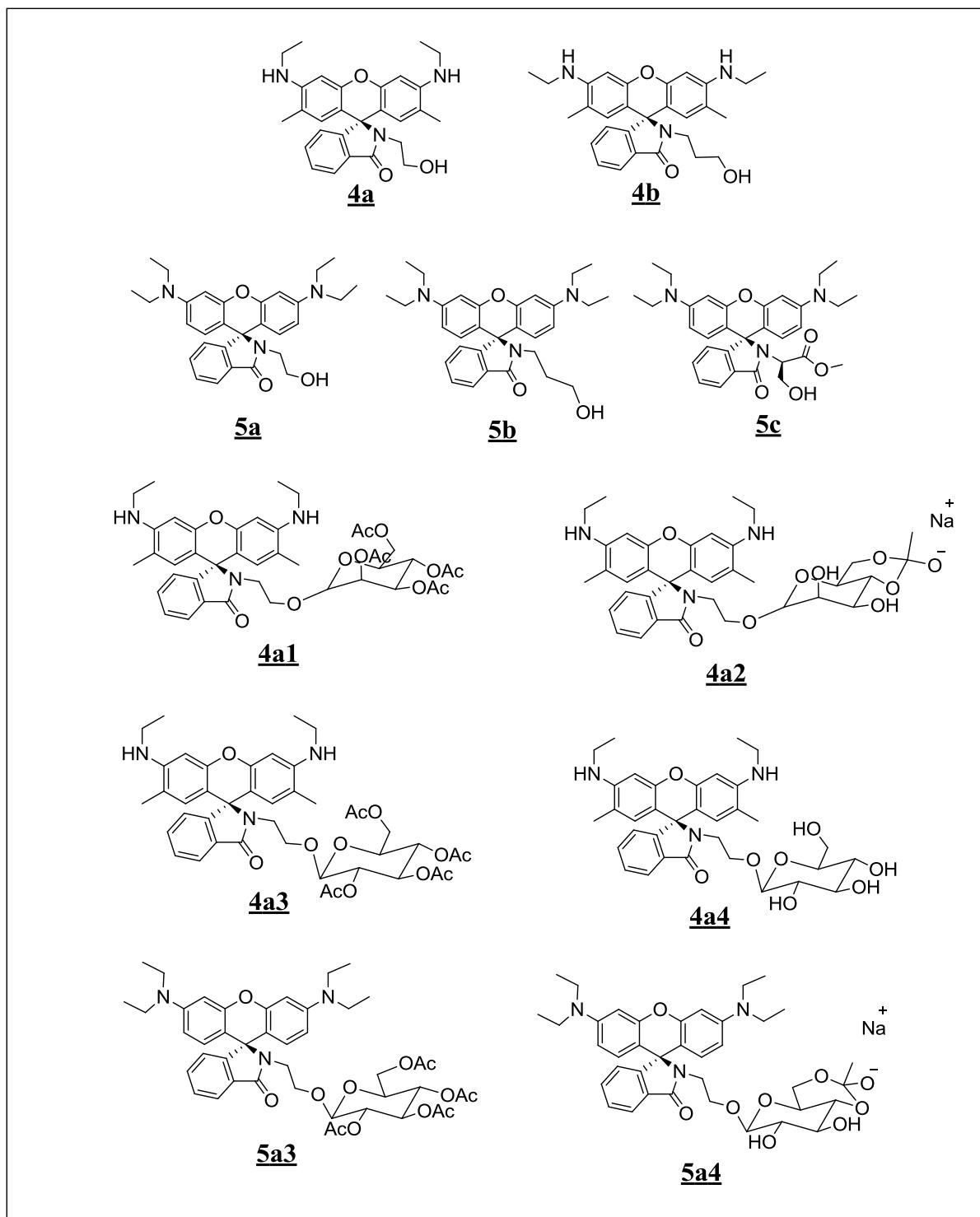
The maximum fluorescence intensity for compound **4a2** is at a pH value of 3,6 and for compound **5c** at a pH value of 4,4. However, both compounds exhibited very weak fluorescence intensity at physiological pH. According to an indicative values of pKa of compounds **4a2** and **5c** these two compounds are suitable for labeling lysosomes and endosomes, where the environment has a pH value between 4,5 and 6. Compound **4a2** has a Stokes shift of 25 nm and compound **5c** of 50 nm, which is favourable for the fluorophores.

**Keywords:** chemical glycosylation, trichloroacetimidate method, rhodamine B, rhodamine 6G, fluorescence

## GRAFIČNI POVZETEK / GRAPHICAL ABSTRACT

Spojine in njihove strukture, ki so omenjene v poglavju Povzetek, so predstavljene na spodnji sliki.

Compounds and their structures mentioned in the chapter Abstract are presented below.



## **SEZNAM OKRAJŠAV**

Ac = acetil

bs = širok singlet

d = doublet

dd = doublet doubleta

DBU = 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en

DMAP = 4-dimetilaminopiridin

DMF = dimetilformamid

DMSO = dimetilsulfoksid

DMSO-d<sub>6</sub> = devteriran DMSO

DMTST = dimetilsulfonijev triflat

ESI – MS = electro – spray ionisation mass spectrometry = masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem

eq = molarni ekvivalent

h = Planck-ova konstanta

HPLC = kromatografija visoke ločljivosti

HRMS = masna spektroskopija visoke ločljivosti

IR = infrardeča spektroskopija

J = sklopitvena konstanta v Hertzih

m = multiplet

n-Hex = n-heksan

NMR = nuklearna magnetna resonanca

PE = petroleter

pH = negativni dekadični logaritem koncentracije oksonijevih ionov

pKa = disociacijska konstanta

Pyr = piridin

Rf = retencijski faktor

s = singlet

t = triplet

TESOTf = trietilsilil triflat

Tf = trifluorometansulfonat

THF = tetrahidrofuran

TLC = tankoplastna kromatografija

TMS = tetrametilsilan

TMSOTf = trimetilsilil trifluorometansulfonat (triflat)

$T_{tal}$  = temperatura tališča

UV = ultravijolična svetloba

VIS = vidna svetloba

q = kvartet

$\nu$  = frekvenca

$\lambda$  = valovna dolžina

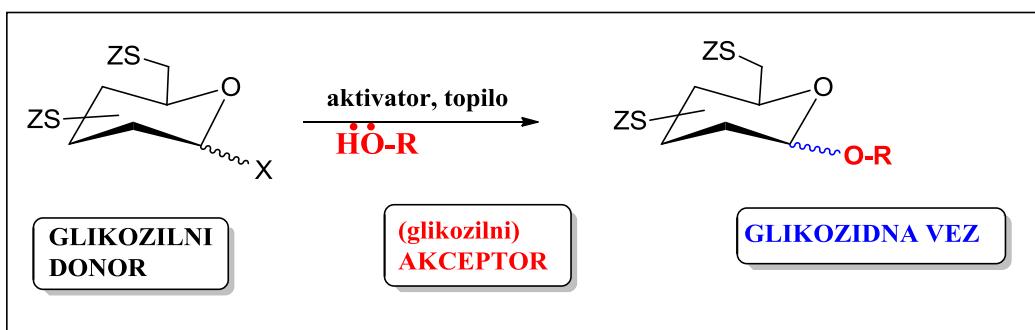
## 1. UVOD:

### 1.1. GLIKOZILACIJA:

Ločimo dve vrsti glikozilacije, to sta encimska in kemijska. Prednost encimske glikozilacije je, da ni potrebnih zaščitnih skupin, regio- in stereoselektivnost pa je zagotovljena in odvisna od vrste encima. Vendar pa za sintezo nendaravnih (oligo)saharidnih analogov taki encimi ne obstajajo ali so cenovno težje dostopni (3).

#### 1.1.1. Kemijska glikozilacija:

Za kemijsko glikozilacijo so potrebni glikozilni donor in akceptor ter aktivacijski reagent. Glikozilni donor je sladkor z ustrezno izstopajočo skupino na anomernem mestu. (Glikozilni) akceptor pa je spojina z nezaščiteno hidroksilno skupino, ki napade C-atom oksokarbenijevega ali aciloksonijevega iona, ki je nastal med reakcijo. Aktivator je Lewisova kislina, ki omogoča izstopajoči skupini na anomernem mestu, da izstopi (Slika 1) (1, 2, 3).



Slika 1: Princip kemijske glikozilacije.  $X =$  izstopajoča skupina in  $ZS =$  zaščitne skupine

Pri glikozilaciji je poleg izkoristka pomembna tudi stereoselektivnost. Ločimo dve glavni skupini O-glikozidov. To so  $\alpha$ - in  $\beta$ - oz. 1,2-cis in 1,2-trans glikozidi. Kateri od teh dveh nastane med reakcijo, pa je odvisno od različnih dejavnikov, kot so temperatura, zaščitna skupina, topila, aktivator in izstopajoča skupina. Glikozilni donorji imajo različne izstopajoče skupine in od tega je odvisna izbira promotorja, topila in reakcijski pogoji (4,5).

#### 1.1.2. Reaktivnost in strukture glikozilnih donorjev:

Obstajajo številne glikozilacijske metode. Metode so poimenovane na osnovi izstopajočih skupin glikozilnih donorjev, izjemi sta le Fischerjeva glikozilacija z reducirajočimi sladkorji in Koenig-Knorr-ova metoda z glikozilnimi halidi (Tabela 1).

Reaktivnost anomernega mesta je med drugim odvisna od vrste zaščitne skupine na mestu C-2. Glede na ta kriterij razdelimo glikozilne donorje na dve skupini: »oborožene« z zaščitno skupino etrnega tipa in »razorožene« z zaščitno skupino estrskega ali amidnega tipa (3, 7).

Na reaktivnost vplivajo tudi različne vrste izstopajočih skupin in njihova konfiguracija. Dober glikozilni donor ima naslednje lastnosti: cenovno ugoden, dobra stabilnost med manipulacijo z zaščitnimi skupinami in aktivacija pod milimi pogoji (3).

IZSTOPAJOČA SKUPINA	IME GLIKOZILNEG A DONORJA	AKTIVATOR	IME GLIKOZILACIJSKE METODE
-Br	glikozilni bromidi	AgCO <sub>3</sub> , AgOTf, Hg(CN) <sub>2</sub> , HgBr <sub>2</sub>	
-Cl	glikozilni kloridi	AgOTf, Hg(CN) <sub>2</sub> , HgBr <sub>2</sub>	Koenig-Knorr-jeva metoda
-F	glikozilni fluoridi	SnCl <sub>2</sub> -AgOTf	
-OC(NH)CCl <sub>3</sub>	trikloroacetimidati	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O, TMSOTf*	trikloroacetimidatna metoda
-SR	tioglikozidi	TfOH-NIS, DMTST	tioglikozidna metoda
-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH <sub>2</sub>	<i>n</i> -pentenil glikozidi	TESOTf	<i>n</i> -pentenil glikozidna metoda
-OAc	anomerni acetati	BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O, SnCl <sub>4</sub> , TMSOTf	acetatna glikozidna metoda
oksazolin	oksazolinski glikozidi	p-TsOH, TMSOTf	oksazolinska glikozidna metoda

**Tabela 1:** Različne glikozilacijske metode glede na vrsto izstopajoče skupine. \*Ostali aktivatorji so naštetvi v poglavju glikozilacijska kemija trikloroacetimidatnega donorja (3).

### **1.1.3. Glikozilacijska kemija trikloroacetimidatnega donorja:**

Prednost te metode je, da aktiviramo imidat v dobro izstopajočo skupino že pri milih pogojih. Med glikozilacijo se sprosti trikloroacetamid. Ta proces katalizira Lewisova kislina, izbira le-te pa je odvisna od donorja in akceptorja ter želenih stereokemijskih rezultatov. Primerni aktivatorji za trikloroacetimidatno metodo so: borov trifluorid eterat kompleks, TMS triflat, anhidrid trifluorometansulfonske kisline (triflatni anhidrid), cinkov bromid, piridinijev para-toluensulfonat (PPTS), srebrov triflat in dibutilborov triflat (2, 3).

Trikloroacetimidatni donorji so v glikozilacijski reakciji različno reaktivni. Tisti z estrskimi in amidnimi zaščitnimi skupinami so manj reaktivni kot tisti z etrnimi (»oborožen-razorožen« efekt). Zelo slabo reaktivni trikloroacetimidatni donorji se med glikozilacijsko reakcijo reorganizirajo in postanejo stabilni trikloroacetamidi, zato reakcija slabo poteče. Med tem, ko zelo reaktivni donorji reagirajo tudi z ostalimi reagenti, čeprav se lahko temu delno izognemo s počasnim dodajanjem donorja v mešanico akceptorja in katalizatorja t.i. inverzni postopek, ki je razložen v nadaljevanju (3, 5).

### **1.1.4. Stereokemija glikozilacijske reakcije:**

Predvidevanje stereokemije produkta je zelo zahtevno, saj glikozilacijske reakcije ne moremo definirati z enostranskimi stereokemijskimi elementi. Tukaj je nekaj ugotovitev za stereokemijo glikozilacije in s tem načrt za sintezo želenega produkta.

- *Vpliv zaščitne skupine na mestu C-2 glikozilnega donorja:*

Etrske in amidne skupine (npr.: 2-O-acil, 2-O-benzoil, 2-N-acil ali 2-N-ftaloil) vplivajo na mehanizem glikozilacijske reakcije, tako da nastanejo 1,2-trans glikozidi, torej  $\beta$ -glukozni in  $\alpha$ -manozni tip glikozida (Slika 2; mehanizem B).

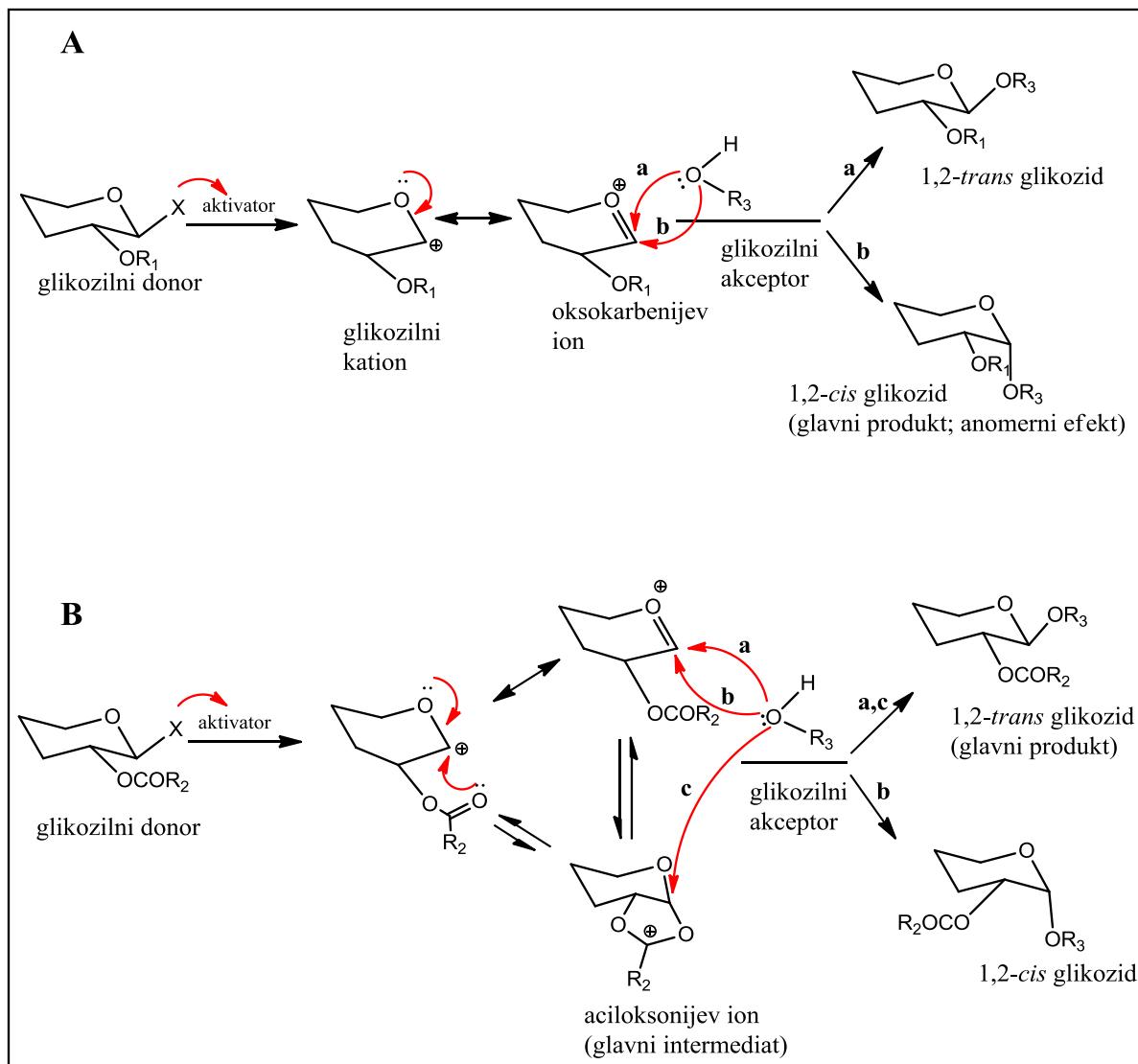
Pri etrnih skupinah (npr.: benzilni eter) pa reakcija poteka po mehanizmu A (Slika 2). Vpliv drugih faktorjev na stereoselektivnost je večji pri etrnih skupinah kot pri estrskih oz. amidnih (5, 7).

- *Substituent na mestu C-6:*

Dolgoverižni O-acil oz. veriga C-atomov vodi v nastanek  $\alpha$ -produkta. Skupina ima tako elektron akceptorske lastnosti ali pa sterično ovira napad nukleofila z zgornje strani obroča (7).

- Vpliv anomerne stereokemije glikozilnega donorja:*

Nizka temperatura, nepolarno topilo (npr. diklorometan) in šibko kisli katalizator (npr. borov trifluorid eterat) povzročijo, da reakcija poteka večinoma preko  $S_N2$  mehanizma.  $\alpha$ -trikloroacetimidatni donorji dajejo večinski delež  $\beta$ -produkta in  $\beta$ -trikloroacetimidati dajejo večinski delež  $\alpha$ -produkta (5).



**Slika 2:** Mehanizem kemijske glikozilacije s prikazanimi intermediati in glavnimi ter stranskimi produkti.

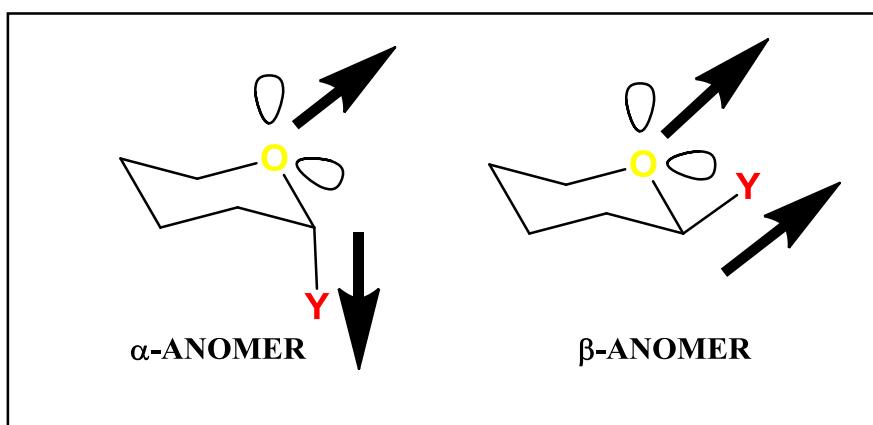
Višja temperatura, bolj polarna topila in/ali močnejši kislinski katalizator (npr.TMSOTf) vodijo do termodinamsko in kinetično favoriziranih produktov ( $\alpha$ -glukoznih in  $\alpha$ -manoznih glikozidov). Tako lahko vpliv topila na anomernem mestu pozitivno nabitega  $S_N1$  intermediata določa končno konfiguracijo produkta. Eter kot topilo ima tendenco, da na anomernem mestu zavzame ekvatorialno pozicijo glede na inverzni anomerni efekt (pozitivni naboje ležijo na kisiku etrnega topila). Torej eter leži na  $\beta$  strani glikozilacijskega kationa in zato nukleofil napade z  $\alpha$  strani in prevladuje  $\alpha$  produkt. Pri uporabi acetonitrila kot topila, pa nastane  $\beta$  produkt. Pri nizki temperaturi acetonitril napade glikozilni kation preko kinetično favoriziranega procesa. Nastane aksialno usmerjen  $\alpha$ -nitrilijev ion. Tako je končni produkt  $\beta$  usmerjen (5).

Vseeno reakcije glikozilacije pogosto potekajo po  $S_N1$  mehanizmu (7).

Anomerni C-atom je v oksakarbenijevem ionu  $sp^2$  hibridiziran. Zato je nukleofilni napad C-atoma možen tako s spodnje kot z zgornje strani slatkornega obroča in tako nastane  $\alpha$  ali  $\beta$  produkt. Večja možnost je, da nastane  $\alpha$  produkt, ki je termodinamsko favoriziran zaradi anomernega efekta (2, 7).

### 1.1.5. Anomerni efekt:

Hidroksilna skupina je na anomernem mestu prednostno v ekvatorialni legi. Torej bi pričakovali, da bo D-glukopiranoza tvorila  $\beta$ -anomer, saj so vsi substituenti ekvatorialno orientirani. Vendar je v vodni raztopini razmerje med  $\alpha$ - in  $\beta$ -anomeroma vedno 1:2.



**Slika 3:** Teorija dipol – dipol interakcije, ki razloži anomerni efekt.

Raymond Lemieux je razvil teorijo anomernega efekta, s katero lahko razložimo zgornji pojav, torej nastanek termodinamsko favoriziranega produkta. Velja za vse molekule z dvema ali več heteroatomi pripetimi na tetraedrični center. Gre za naslednjo skupino spojin: C-X-C-Y, kjer sta X = N, O ali S in Y = Br, Cl, F, N, O ali S. V to skupino spadajo tudi piranoze in njihovi derivati. Moč anomernega efekta je odvisna od polarnosti C-Y vezi in se proporcionalno viša z elektronegativnostjo Y substituenta. Pojav razložimo z dipol - dipol interakcijo. Nevezna elektronska para endocikličnega  $sp^3$  hibridiziranega kisikovega atoma tvorita dipolni moment, ki sega v smer izven obroča (Slika 3). Polarna vez med anomernimi C – atomi in izvencikličnim heteroatomom tudi tvori dipolni moment. Pri  $\beta$ -D-glikopiranoznem anomeru sta oba dipolna momenta skoraj vzporedna in usmerjena v isto smer. Interakcija teh dveh dipolnih momentov pa je energetsko neugodna. Pri  $\alpha$ -D-anomerih pa sta ta dva dipolna momenta obrnjena stran drug od drugega, zato je tukaj dipol-dipol interakcija manjša (1, 2).

#### **1.1.6. Promotorji, topila in reakcijski pogoji:**

Vloga promotorja oz. aktivatorja, ki je običajno Lewisova kislina, je aktivacija izstopajoče skupine, da ta zapusti anomerno mesto. Odvisno od narave promotorja delimo reakcije na homogene in heterogene, kar vpliva tudi na stereokemijo produkta. Tudi topila imajo pomembno vlogo pri procesu in stereokemiji, predvsem takrat, ko je na mestu 2 etrna oblika zaščitne skupine. Uporabljajo se brezvodna topila, da ne pride do kompeticijske reakcije z molekulo vode. Najpogosteje uporabljeni topili sta diklorometan in eter, ki sta nepolarna. Včasih pa so uporabljena polarna topila, kot sta acetonitril in nitrometan (1, 2)

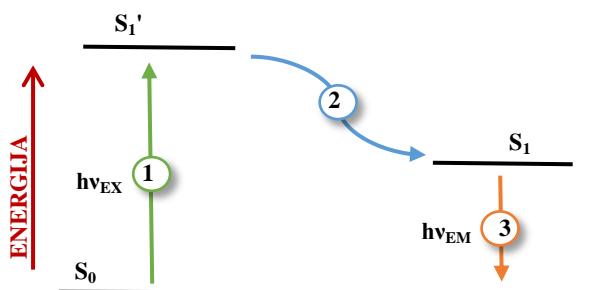
#### **1.1.7. Vrstni red dodajanja reagentov:**

Promotor dodajamo mešanici akceptorja in donorja, kadar imamo manj reaktivne (»razorožene«) donorje. Za visoko reaktivne donorje je bolj primeren inverzni postopek, kjer dodamo donor v mešanico akceptorja in promotorja (2).

## 1.2. FLUORESCENCA:

### 1.2.1. Jablonski-jev diagram:

Fluorescencija je rezultat tristopenjskega procesa, ki se pri organskih fluoroforih najpogosteje pojavi pri poliaromatskih ogljikovodikih, heterociklih in spojinah z več konjugiranimi dvojnimi vezmi. Fluorescentna sonda je fluorofor, ki se odzove na specifično stimulacijo ali ga lociramo na specifični lokaciji določenega biološkega vzorca. Jablonski-jev diagram prikazuje proces fluorescence s stanjem elektronov (Slika 4) (8, 9).

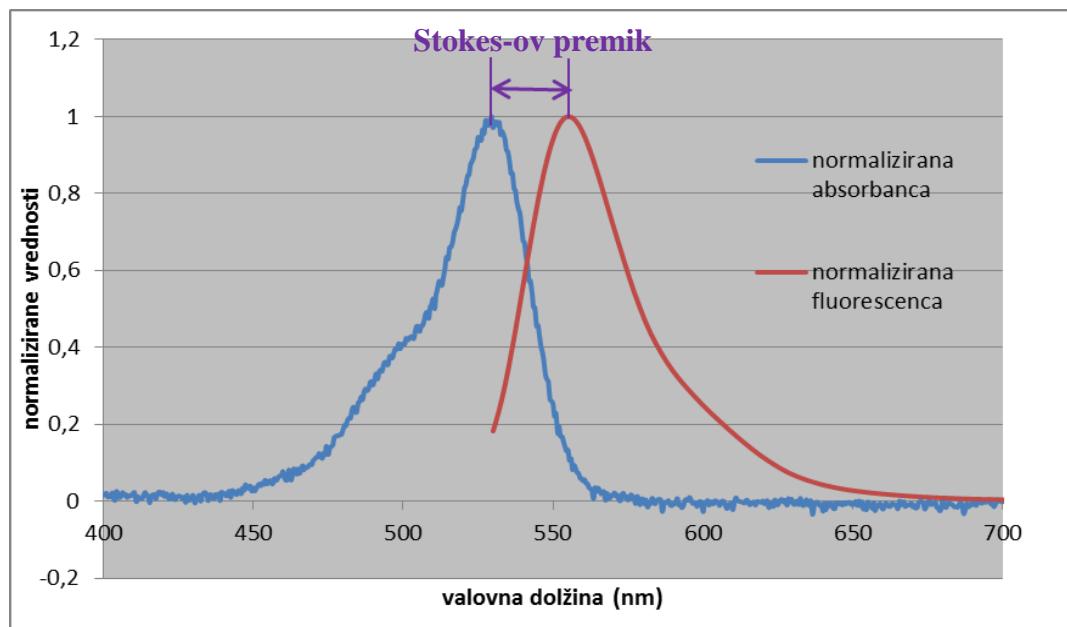


**Slika 4:** Jablonski-jev diagram. Princip fluorescence je razložen v spodnjem besedilu.

*Stanje 1 - vzbujeno stanje:* Fluorofor absorbira foton z energijo  $h\nu_{EX}$ , katerega vir energije je žarnica ali laser in s tem se ustvari vzbujeno stanje elektrona ( $S_1'$ ). Ta proces je ključen za razlikovanje med fluorescence in kemiluminiscenco, pri kateri je vzbujeno stanje rezultat kemijske reakcije.

*Stanje 2 – življenska doba vzbujenega stanja:* Vzbujeno stanje najpogosteje traja 1-10 nanosekund, v tem času se fluorofor konformacijsko spremeni. Energija stanja  $S_1'$  se deloma porabi za t.i. ne-relaksacijske prehode (rotacija, translacija in vibracija molekule), rezultat je vzbujeno stanje  $S_1$ , iz katerega izvira tudi fluorescentna emisija. Vse molekule, ki so bile vzbujene z absorpcijo, se ne vrnejo v osnovno stanje  $S_0$  z emisijo fluorescence ampak se del energije porabi za ne-relaksacijske prehode. Fluorescenčni kvantni izkoristek je razmerje med številom emitiranih fluorescenčnih fotonov (*Stanje 3*) in številom absorbiranih fotonov (*Stanje 1*).

*Stanje 3 - emisija fluorescence:* Foton energije  $h\nu_{EM}$  emitira svojo energijo in vrne fluorofor v njegovo osnovno stanje ( $S_0$ ). Zaradi razpršitve energije med stanjema  $S_1'$  in  $S_1$ , je energija tega fotona nižja in temu primerna daljša valovna dolžina kot pri fotonu  $h\nu_{EX}$ . Razlika v energiji ali valovni dolžini teh dveh fotonov ( $h\nu_{EX} - h\nu_{EM}$ ) imenujemo Stokes-ov premik (Slika 5). Stokes-ov premik je pomemben parameter občutljivosti fluorescentne tehnike, saj omogoča detekcijo emisijskih fotonov, kljub prisotnosti ekscitacijskih fotonov. Pri UV-VIS spektroskopiji pa merimo prepuščeno svetlobo relativno glede na slep vzorec. (8, 9).



**Slika 5:** Stokes-ov premik.

### 1.2.2. Fluorescentni spekter:

Proces fluorescence je cikličen. Isti fluorofor lahko ponovno vzbujamo in detektiramo v primeru, da se le-ta tekom vzbujanja ireverzibilno ne uniči. Ena molekula fluorofora je lahko udeležena v več tisoč ciklov vzbujanja in emisije. Jablonski-jev diagram fluorofora v raztopini lahko prikažemo kot fluorescentni ekscitacijski in fluorescentni emisijski spekter. Vzbujanje fluorofora pri različnih valovnih dolžinah ne spremeni emisijskega profila, spremeni pa se emisijska intenziteta, ki ustreza amplitudi vzbujevalnega spektra (8).

### 1.2.3. Fluorescentni signal:

Intenziteta fluorescence je odvisna od enakih parametrov kot intenziteta absorbance. Ti parametri so združeni v Beer–Lambert-ovem zakonu (Enačba 1). Poleg tega je odvisna od fluorescenčnega kvantnega izkoristka in intenzitete vzbujevalne svetlobe (Enačba 2). V razredčenih raztopinah (kadar je absorbanca pri valovni dolžini ekscitacije in nad njo manjša od 0.05) je intenziteta fluorescence linearno odvisna od koncentracije (Enačba 3) (8).

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

**Enačba 1:** *Beer-Lambert-ov zakon;  $\varepsilon$  = molarni ekstincijski koeficient,  $b$  = dolžina poti svetlobe,  $c$  = molarna koncentracija vzorca*

$$F = \Phi I_o (1 - e^{-\varepsilon bc})$$

**Enačba 2:** *Intenziteta fluorescence;  $F$  = Intenziteta fluorescence,  $\Phi$  = kvantni izkoristek (karakteristična vrednost vsakega fluorofora v specifičnem topilu),  $I_o$  = moč sevanja svetlobnega izvora,  $\varepsilon$  = molarni ekstincijski koeficient,  $b$  = dolžina poti svetlobe,  $c$  = molarna koncentracija vzorca*

$$\varepsilon bc < 0.05 \rightarrow F = \Phi I_o \varepsilon bc$$

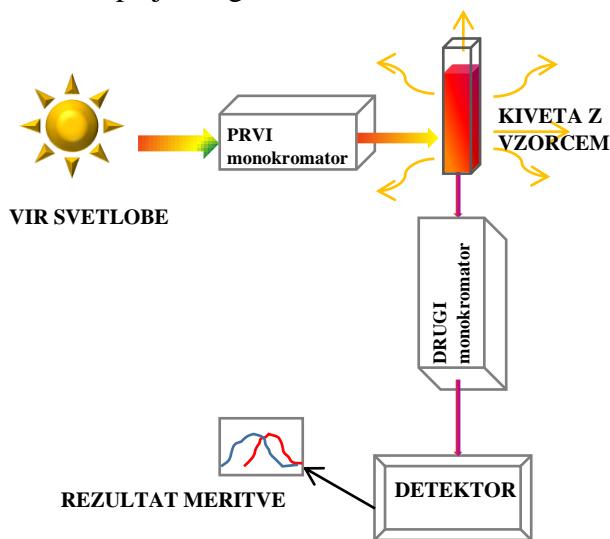
**Enačba 3:** *Intenzitete fluorescence v razredčenih raztopinah*

### 1.2.4. Fluorescenza ozadja:

Detekcijo fluorescence velikokrat motijo drugi signali, ki izvirajo primarno iz (biološkega) vzorca in/ali nevezanih ali nespecifično vezanih fluorescentnih označevalcev. Vpliv signala biološkega vzorca lahko zmanjšamo s selektivnimi filtri, ki zmanjšajo prepustnost emisijske energije relativno glede na vzbujevalno energijo ali z izborom fluorescentnih prob, ki absorbirajo in emitirajo svetlobo pri daljših valovnih dolžinah. Vpliv signala celic, tkiv in bioloških tekočin najpogosteje zmanjšamo z uporabo fluorescentnih prob, ki jih vzbujamo pri valovnih dolžinah večjih od 500 nm. Pri daljših valovnih dolžinah se v gostih vzorcih, kot so tkiva, zmanjša tudi razpršenost vzbujene svetlobe (8, 14).

### 1.2.5. Spektrofluorometer:

Za razliko od UV-VIS spektrometra, kjer je detektor postavljen pod kotom  $180^\circ$  relativno glede na kot vpadne svetlobe, je pri spektrofluorometru detektor postavljen pod kotom  $90^\circ$  (Slika 6). S tem se izognemo detekciji prepuščene vzbujevalne svetlobe. Vendar noben monokromator ni popolnoma selektiven, zato nekaj prepuščene svetlobe še vseeno doseže detektor, ta svetloba pa je druge valovne dolžine kot fluorescenza.



**Slika 6:** Elementi spektrofluorometra. Detektor je postavljen pod kotom  $90^\circ$  relativno glede na kot vpadne svetlobe.

Kot viri vzbujevalne svetlobe se lahko uporabljajo laserji, LED diode ter ksenonske in živosrebrne žarnice. Svetloba iz vira potuje preko filtra ali monokromatorja in obsveti vzorec. Monokromator nam omogoča izbiro primerne valovne dolžine vzbujevalne svetlobe. Fluorescensa iz vzorca se razprši na vse strani. Nekaj te svetlobe potuje preko drugega filtra ali monokromatorja in doseže detektor (8, 9).

### 1.3. FLUORESCENTNA BARVILA:

Sintetični fluorescentni derivati so v celični biologiji močno orodje za proučevanje celičnih procesov zaradi preprostosti in ne-destruktivnosti metode. V primerjavi z ostalimi spektroskopskimi metodami imajo fluorescentni derivati višjo občutljivost in nižjo mejo detekcije. Protoni so zelo pomembna tarča proučevanja, saj intracelularni pH igra pomembno vlogo pri mnogih fizioloških celičnih procesih (celična rast, regulacija kalcija, endocitoza, celična adhezija,...) in patofizioloških procesih (kancerogeneza, okužbe z različnimi patogeni,...). Detekcija poteka preko fluorescenčnih tehnik. V splošnem so razvili fluorescentne derive, ki ne fluorescirajo pri pH = 6,8 - 7,4 (pH citosola) in fluorescirajo pri pH 4,5 - 6,0 (pH lizosomov in endosomov) ali obratno (14, 15).

#### 1.3.1. Želene lastnosti fluorescentnih sond:

Idealna fluorescentna sonda naj bi imela naslednje lastnosti:

- i. brez fluorescence v ekstracelularnem območju pri pH = 7,4
- ii. močna fluorescencija pri kislih pogojih (npr. pod pH = 6)
- iii. vzbujanje pri dolgih valovnih dolžinah ( $\geq 500$  nm) in signal emitirane fluorescence je veliko močnejši od fluorescence ozadja
- iv. kovalentna vezava na tarčne ligande ali protitelesa
- v. na izbiro čim več barvil z različnimi pKa, za optimalno izbiro sonde, ki nam ponuja velik količnik med signalom tarčnega tkiva in signalom okoliškega (19)

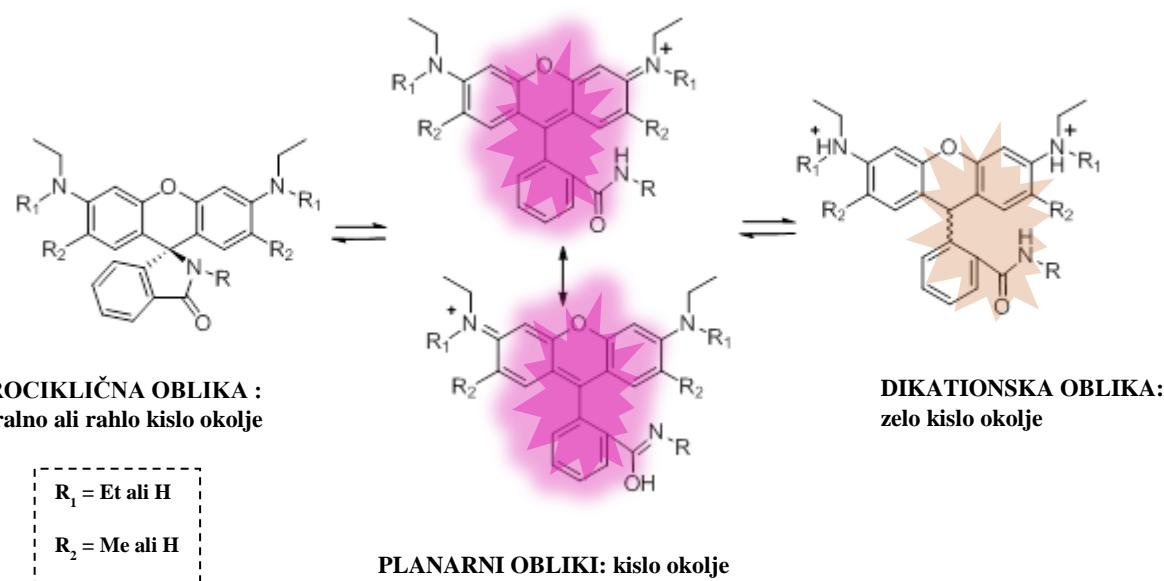
#### 1.3.2. Specifičnost pH odvisnih sond:

Da bi povečali specifičnost barvil za točno določeno tarčo, raziskovalci pripenjajo na molekule barvila različne substituente, ligande ali protitelesa, ki predstavljajo specifični povezovalec med tarčo in barvilm in hkrati lahko zagotavljajo fluorescenco pri različnih pH vrednostih(11, 18).

### 1.3.3. Rodamini:

Rodamine odlikuje dobra fotostabilnost, visoka občutljivost in močna odvisnost od pH. Imajo odlične fotofizikalne lastnosti, kot so absorpcija in emisija pri dolgih valovnih dolžinah v vidnem spektru svetlobe, velik absorpcijski koeficient ter visok fluorescentni kvantni izkoristek (8, 14).

Rodamini v odvisnosti od pH reverzibilno spreminjajo obliko in s tem fluorescenco. Spirociklična oblika ne fluorescira, je brezbarvna in prevladuje v nevtralnem do rahlo kislem mediju. Planarni oblici prevladujeta v kislem mediju. Eden od aromatskih aminov se protonira in nastane imin. Zaradi nastanka planarne strukture poteče konjugacija sistema, posledica tega pa je fluorescenco. V zelo kislem mediju ( $\text{pH} < 2$ ) se protonira še drugi aromatski amin, s tem dobimo dikationsko obliko, konjugiran sistem se poruši. Taka oblika ima nižjo fluorescenco v primerjavi s planarnima oblikama. Ko rodamin 6G in B ter njuni analogi fluorescirajo, s prostim očesom vidimo rožnato barvo (Slika 7) (15).



**Slika 7:** Spreminjanje oblike analogov rodamina B ali 6G v odvisnosti od pH.

## 2. NAMEN DELA:

Cilj našega dela je proučiti, kako reakcijski pogoji kemijske glikozilacije, reagenti in različni analogi rodaminov vplivajo na izkoristek in vrsto produkta glikozilacije. Poleg tega nas zanima, kako strukturi spojin **4a2** in **5c** vplivata na profil absorbančnega in fluorescenčnega spektra v odvisnosti od različnih pH vrednosti medija. Narisali bomo titracijski krivulji teh dveh spojin in določili približni vrednosti pKa, ter določili Stokes-ova premika za ti dve spojini.

### 2.1. SINTEZNI NAČRT:

#### i. Priprava glikozilnega donorja:

D-manozo in D-glukozo bomo peracetilirali (spojini **1a** in **2a**). V naslednji stopnji reakcije bomo odščitili anomerno -OH skupino (spojini **1b** in **2b**) in jo v tretji stopnji reakcije aktivirali v dobro izstopajočo skupino, t.j. trikloroacetimidat (spojini **1c** in **2c**).

#### ii. Priprava akceptorja za glikozilacijo:

Pripravili bomo različne aminoalkoholne naloge rodamina 6G (spojini **4a** in **4b**) in rodamina B (spojine **5a**, **5b**, in **5c**). Pred tem bomo pripravili spojino **3a**, tako da bomo zaščitili karboksilno skupino L(-)serina, ki bo z rodaminom B reagirala v spojino **5c**.

#### iii. Kemijska glikozilacija:

S kemijsko glikozilacijo bomo tvorili glikozidno vez med naslednjimi spojinami (glej Tabelo 2). Pri tem bodo pogoji reakcije, izvedba reakcije in reagenti namenoma variirali (glej Tabelo 3, str. 30).

GLIKOZILNI DONOR	AKCEPTOR	PRODUKT glikozilacije
<b><u>1c</u></b>	<b><u>4a</u></b>	<b><u>4a1</u></b>
<b><u>2c</u></b>	<b><u>4a</u></b>	<b><u>4a3</u></b>
<b><u>2c</u></b>	<b><u>5a</u></b>	<b><u>5a3</u></b>

**Tabela 2:** Prikaz kombinacij glikozilnih donorjev in akceptorjev ter njihovih glavnih produktov.

**iv. Odstranitev acetilne skupine:**

Produktom glikozilacije bomo odstranili acetilne zaščitne skupine z Zemplenovo metodo na sladkornem delu (spojine **4a2**, **4a4** in **5a4**).

**2.2. MERJENJE ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN **4a2** in **5c**:**

Pripravili bomo raztopine spojin **4a2** in **5c** različnih pH vrednosti in različnih koncentracij ( $10^{-5}$  M za UV-VIS spektroskopijo in  $10^{-7}$  M za fluorescenčno spektroskopijo) in jim pomerili absorbančne in fluorescenčne spektre. Podatke bomo grafično ovrednotili. Narisali bomo titračijski krivulji, grafično določili pKa vrednosti in ovrednotili spojini.

### 3. MATERIALI IN METODE:

#### 3.1. MATERIALI:

Pri sintezah in čiščenju produktov smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Sigma, Merck, Acros, Apollo Scientific). Brezvodni diklorometan in THF smo pripravili tik pred uporabo topila z destilacijo ob prisotnosti  $\text{CaH}_2$  pod argonovo atmosfero.

#### 3.2. METODE:

- **Kromatografske metode:**

Tankoplastna kromatografija: uporabljali smo TLC ploščice proizvajalca Merck z oznako Silica gel 60 F254. Na aluminijastem nosilcu z dimenzijami 20 x 20 cm, je nanesen 0,20 mm debel nanos silikagela, ki mu je dodan fluorescenčni indikator. Kromatograme smo razvili v mobilnih fazah, ki so navedene v eksperimentalnem delu v nadaljevanju, pri vsaki sintezi. Spojine na kromatografskih ploščicah smo detektirali z UV svetlobo ( $\lambda = 254 \text{ nm}$  in  $\lambda = 366 \text{ nm}$ ) in različnimi orositvenimi reagenti v ustreznih raztopinah (ninhidrin, 20 %  $\text{H}_2\text{SO}_4$  v EtOH).

»Flash« kolonska kromatografija: uporabili smo jo kot separacijsko tehniko za čiščenje surovih produktov sinteze. Stacionarno fazo je predstavljal silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm (Merck). Mobilne faze so navedene v eksperimentalnem delu pri opisih posameznih sintez.

Pri čiščenju produktov **4a**, **4a2** (topna v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), **4a4**, **5a4**, **4b**, **5a**, **5b**, **5c** (topni v MeOH) smo uporabili metodo suhega nanosa.

- **Spektroskopske metode:**

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektre so posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometu na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Kot interni standard smo uporabili TMS. Kemijske premike ( $\delta$ ) smo podali v »parts per million« (ppm) glede na interni standard. Spektre smo obdelali s programom NMRnotebook 2.70 (NMRTEC S.A.S.).

Infrardeča spektroskopija: Spektre IR smo posneli na spektrometru Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Masna spektrometrija: Masne spektre so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

UV-VIS spektroskopija: Za snemanje absorpcijskih spektrov spojin **4a2** in **5c** smo uporabili aparaturo UV-VIS spektrofotometer Varian 50 Conc, USA na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Fluorescenčna spektroskopija: Fluorescenčne spektre spojin **4a2** in **5c** smo posneli na Fluorimeter ParkinElmer LS 55, UK na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

- **Določanje  $T_{tal}$ :**

Temperature tališča spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo. Tališča niso korigirana.

- **Določanje pH vrednosti:**

Za določanje pH vrednosti smo uporabili pH meter: Mettler Toledo, MP 220 (1900 Polaris Parkway, Columbus, USA).

- **Poimenovanje in risanje spojin:**

Za risanje spojin in poimenovanje le teh po IUPAC nomenklaturi smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0.

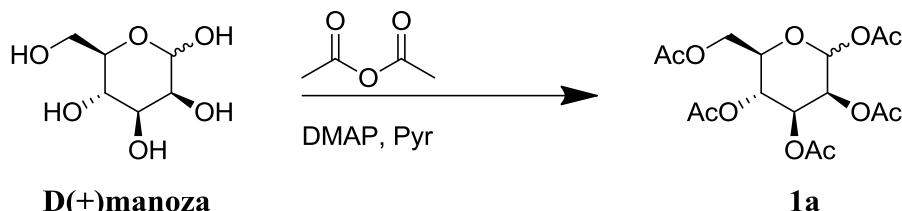
- **Risanje grafov in obdelava podatkov:**

Podatke pridobljene z merjenjem UV-VIS in fluorescenčnih spektrov smo obdelali in grafično prikazali z uporabo računalniškega programa Microsoft Excel (Microsoft, ZDA).

#### 4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ:

##### 4.1. ACETILIRANJE MANOZE IN GLUKOZE (20):

###### REAKCIJA:



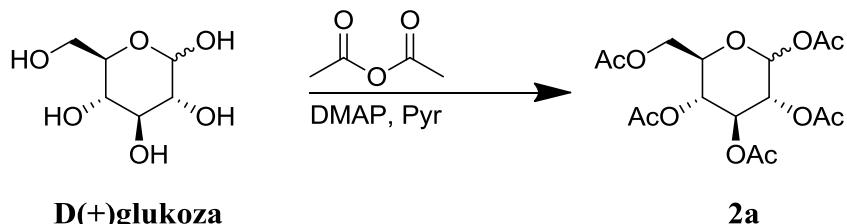
**Slika 8:** Peracetilacija D(+)manoze (sinteza spojine **1a**)

##### 4.1.1. SINTEZA (3S,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetata (**1a**):

(Mw = 390,34 g/mol)

Manozo (20,0 g; 111 mmol; 1,0 eq) raztopimo v piridinu (200 mL) in dodamo 4-dimetilaminopiridin (DMAP) (10 zrnc). Na ledeni kopeli po kapljicah preko kapalnika dodamo acetatni anhidrid (68,0 g; 666 mmol; 6,0 eq). Mešamo pri sobni temperaturi 24 ur pod Ar-atmosfero. Reakcijsko zmes zlijemo na 500 g ledu. Dodamo 200 mL etil acetata in 30 g citronske kisline ter prenesemo v lij ločnik. Ločimo fazi in organsko fazo zaporedoma spiramo s 300 mL 10% citronske kisline, 300 mL nasičene raztopine NaCl, 300 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> (dvakrat) in zopet s 300 mL nasičene raztopine NaCl. Sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Produkta (43,9 g) ne čistimo ampak nadaljujemo z naslednjo stopnjo reakcije.

###### REAKCIJA:



**Slika 9:** Peracetilacija D(+)glukoze (sinteza spojine **2a**)

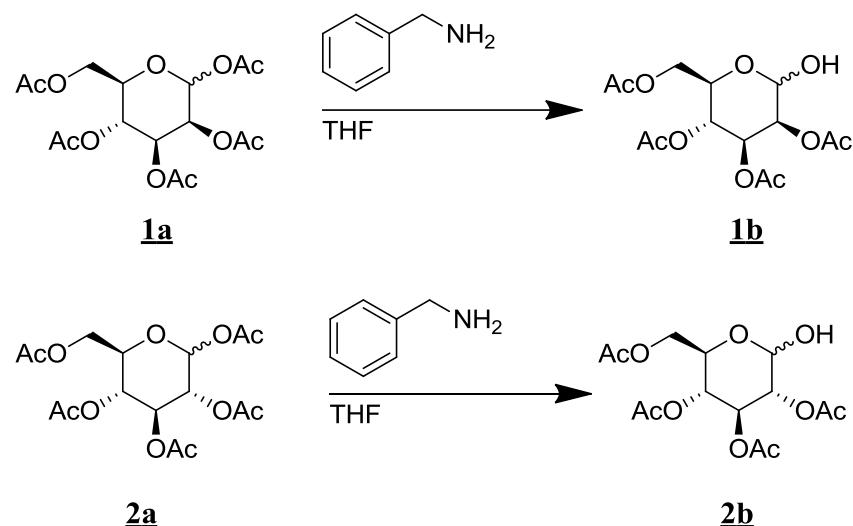
#### **4.1.2. SINTEZA (3R,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetata (2a):**

Destiliranemu piridinu (975 mL) dodamo acetatni anhidrid (703 g; 6,89 mol; 9,5 eq), postavimo na ledeno kopel in dodamo D(+)glukozo (130 g; 0,72 mol; 1,0 eq). Ko se glukoza raztopi, odstavimo z ledene kopeli, počakamo da se reakcijska zmes segreje na sobno temperaturo in dodamo DMAP (7 zrnc). Reakcijo pustimo teči 20 ur pri sobni temperaturi in pod Ar-atmosfero. Potek reakcije preverimo s TLC. Reakcijsko zmes prelijemo v mešanico ledu in destilirane vode, vakuumsko filtriramo izpadle kristale ter pustimo sušiti na zraku preko noči. Kristale čistimo s prekristalizacijo iz etanola.

<b>(3R,4S,5R,6R)-6-(acetoksimetil)tetrahidro-2H-piran-2,3,4,5-tetraacetat (<u>2a</u>)</b>	
<b>Mw</b> = 390,34 g/mol	
<b>Izgled:</b> bel prah	<b>Rf</b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 20:1) = 0,62
<b>Izkoristek:</b> 82 % (230 g)	<b>T<sub>tal</sub></b> = 113 °C
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> ( $\alpha/\beta$ anomera = 3/1) δ 1,90–2,20 (4s; CH <sub>3</sub> $\alpha/\beta$ anomera; 12H); 3,71 (m; ABX sistem; 1H-5 $\beta$ anomer); 3,95–4,25 (m; 1H-5 $\alpha$ anomer; 2H-6 $\alpha/\beta$ anomera); 4,70 (d; $J$ = 8,0 Hz; 1H-1 $\beta$ anomer); 4,83 (dd; $J$ = 3,6; 10,1 Hz; 1H-2 $\alpha$ anomer); 4,86 (dd; $J$ = 8,1; 9,7 Hz; 1H-2 $\beta$ anomer); 5,03 (t; $J$ = 9,7 Hz; 1H-4 $\alpha/\beta$ anomera); 5,18 (t; $J$ = 9,6 Hz; 1H-3 $\beta$ anomer); 5,38 (d; $J$ = 3,5 Hz; 1H-1 $\alpha$ -anomer); 5,47 (t; $J$ = 9,7 Hz; 1H-3 $\alpha$ anomer); ppm (10)	

## 4.2. SELEKTIVNA DEACETILACIJA ANOMERNEGA CENTRA (22):

### REAKCIJA:



Slika 10: Sinteza spojin **1b** in **2b** s selektivno odščito anomernega centra

### POSTOPEK:

Ustrezen acetiliran sladkor (1,0 eq) raztopimo v brezvodnem THF in na ledeni kopeli po kapljicah dodamo benzilamin (1,0 eq). Na ledeni kopeli pustimo še 15 minut, nato pa mešamo pri sobni temperaturi in pod Ar-atmosfero 48 ur. THF uparimo pod znižanim tlakom, zaostalemu olju dodamo 250 mL EtOAc, spiramo  $5 \times$  z 200 mL 1M HCl in še  $2 \times$  z 200 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Surovi produkt ne čistimo ampak nadaljujemo z naslednjo stopnjo reakcije.

### 4.2.1. SINTEZA (2R,3R,4S,5S)-2-(acetoksimetil)-6-hidroksitetrahidro-2H-piran-3,4,5-tril triacetata (**1b**):

Mw = 348,30 g/mol
Reagenti: <b>1a</b> (43,9 g), THF (300 mL), fenilmelanamin (11,9 g; 111 mmol)

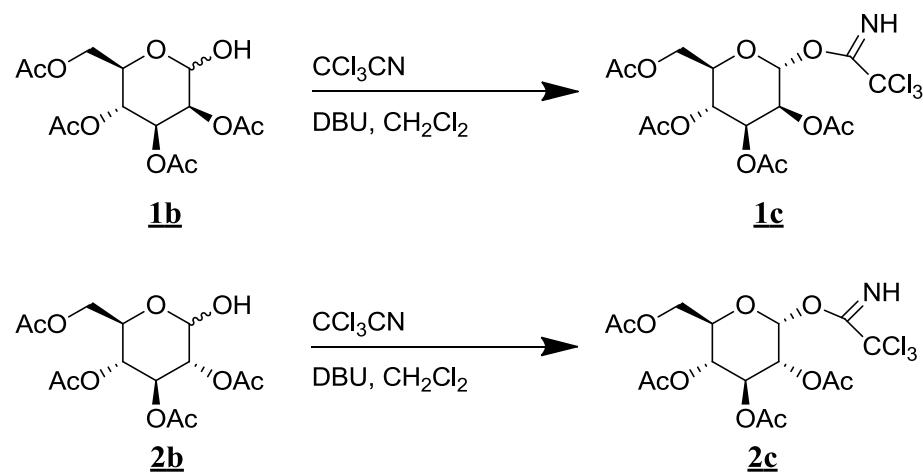
#### 4.2.2. SINTEZA (*2R,3R,4S,5R*)-2-(acetoksimetil)-6-hidroksitetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetata (**2b**):

**Mw** = 348,30 g/mol

**Reagenti:** **2a** (21,70 g; 55,6 mmol; 1,0 eq), THF (150 mL), fenilmelanamin (5,96 g; 55,6 mmol; 1,0 eq)

#### 4.3. AKTIVACIJA ANOMERNE -OH SKUPINE (22):

##### REAKCIJA:



**Slika 11:** Sinteza trikloroacetimidatnega donorja (sinteza spojin **1c** in **2c**)

##### POSTOPEK:

Neočiščen sladkor **1b** ali **2b** (1,00 eq) raztopimo v brezvodnem  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Bučko opremimo s septumom in Ar-atmosfero ter postavimo na ledeno kopel s temperaturo  $-9^\circ\text{C}$  (led, aceton in NaCl). Preko septuma dodamo 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-en (DBU) (0,28 eq) in trikloroacetonitril (3,00 eq). Bučko pustimo na ledeni kopeli, dokler se led ne stali, nato mešamo pri sobni temperaturi preko noči. Surovi produkt očistimo s kolonsko kromatografijo. Uporabimo metodo suhega nanosa.

**4.3.1. SINTEZA (*(2R,3R,4S,5S,6R)-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trikloro-1-iminoetoksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (1c)*:**

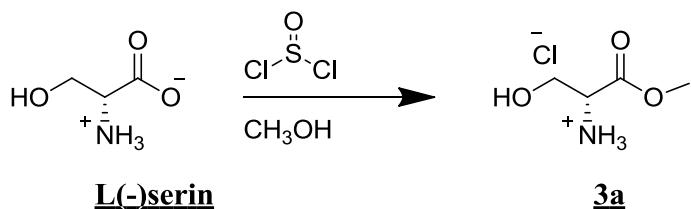
<b>Mw = 492,69 g/mol</b>	<b>Rf (EtOAc:n-Hex = 2:1) = 0,53</b>
<b>Reagenti:</b> <b>1b</b> (44,7 g), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (300 mL), DBU (4,3 g; 28 mmol), trikloroacetonitril (43,3 g; 300 mmol)	<b>Kolonska kromatografija:</b> MF1 = EtOAc:n-Hex = 1:3 MF2 = EtOAc:n-Hex = 1:2
<b>Izgled:</b> rumeno olje	<b>Izkoristek:</b> 59 % (32,4 g)
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 2,20; 2,07; 2,09; 2,29 (12H; 4 x s; 4 x -OAc); 4,15-4,22 (2H; m; H-5; H-6); 4,28 (1H; dd; <i>J</i> = 4,3 Hz; <i>J</i> = 11,8 Hz); 5,40-5,42 (2H; m; H-3; H-4); 5,48 (1H; t; <i>J</i> = 2,1 Hz); 6,29 (1H; d; <i>J</i> = 1,9 Hz); 8,80 (1H; s; -NH) ppm (22)	

**4.3.2. SINTEZA (*(2R,3R,4S,5R,6R)-2-(acetoksimetil)-6-(2,2,2-trikloro-1-iminoetoksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetata (2c)*:**

<b>Mw = 492,69 g/mol</b>	<b>Rf (EtOAc:n-Hex = 2:1) = 0,58</b>
<b>Reagenti:</b> <b>2b</b> (18,3 g), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (150 mL), DBU (2,4 g; 15,6 mmol), trikloroacetonitril (24,1 g; 166,8 mmol)	<b>Kolonska kromatografija:</b> MF1 = EtOAc:n-Hex = 1:3, MF2 = EtOAc:n-Hex = 1:2, MF3 = EtOAc:n-Hex = 1:1
<b>Izgled:</b> rumeno olje	<b>Izkoristek:</b> 46 % (12,6 g)
<b><sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ 8,67 (s; 1H; NH); 6,53 (d; 1H; <i>J</i> = 3,7 Hz; 1-H); 5,53 (t; 1H; <i>J</i> = 9,9 Hz; 3-H); 5,14 (t; 1H; <i>J</i> = 10,0 Hz; 4-H); 5,10 (dd; 1H; <i>J</i> = 10,2 Hz; <i>J</i> = 3,7 Hz; 2-H); 4,25 (dd; 1H; <i>J</i> = 12,3 Hz; <i>J</i> = 4,1 Hz; 6-H); 4,18 (ddd; 1H; <i>J</i> = 10,3 Hz; <i>J</i> = 4,0 Hz; <i>J</i> = 2,0 Hz; 5-H); 4,13 – 4,07 (m; 1H; 6'-H); 2,05; 2,02; 2,00; 1,99 (4s; 12H; OAc) ppm (21)	

#### 4.4. ZAŠČITA –COOH SKUPINE SERINA:

##### REAKCIJA:



**Slika 12:** Zaščita –COOH skupine L(-)serina (sinteza spojine **3a**)

##### POSTOPEK:

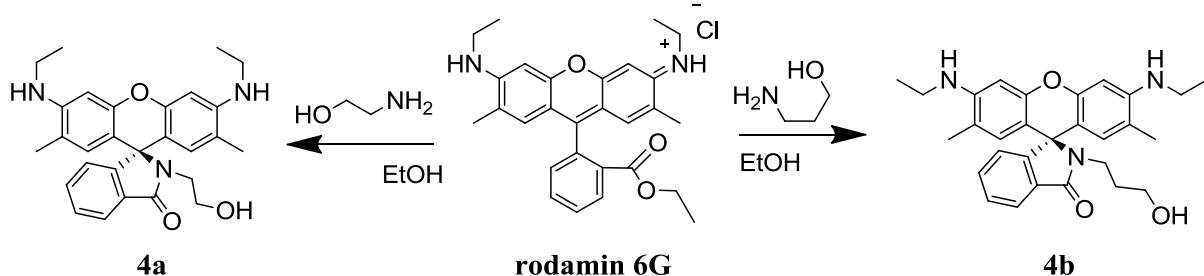
L(-)serinu (3,00 g; 28,55 mmol; 1 eq) dodamo 10 mL CH<sub>3</sub>OH in mešamo na ledeni kopeli pod Ar-atmosfero. Z injekcijsko brizgo po kapljicah dodamo tionil klorid (6,80 g; 57,10 mmol; 2 eq). Mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan reakcijsko zmes refluktiramo pri 80 °C 90 minut in nato mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan dodamo še tionil klorid (3,40 g; 28,6 mmol; 1 eq) in refluktiramo pri 80 °C 90 minut. Potek reakcije preverimo s TLC. Produkta ne čistimo, saj je reakcija potekla kvantitativno.

##### 4.4.1. SINTEZA (*R*)-3-hidroksi-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijev klorida (**3a**) (6):

Mw = 155,58 g/mol	Izgled: bel prah
Izkoristek: 95 %	Rf (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH=4:1 + 1% Et <sub>3</sub> N) = 0,39
<b><sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD):</b> δ 4,03 (m; 1H); 3,90 (dd; 1H; J = 6,6 Hz; J = 18,6 Hz); 3,82 (dd; 1H; J = 4,8 Hz; J = 17,4 Hz); 3,81 (s; 3H) ppm (6)	

#### 4.5. SINTEZA ETANOLAMIDNEGA IN PROPANOLAMIDNEGA DERIVATA RODAMINA 6G:

##### REAKCIJA:



**Slika 13:** Sinteza alkoholamidnih derivatov rodamina 6G (sinteza spojin **4a** in **4b**)

##### SPLOŠNI POSTOPEK:

Rodaminu 6G dodamo ustrezen aminoalkohol, katalitično količino KCN in topilo EtOH. Reakcijsko zmes mešamo pod refluksom na 90 °C preko noči pod Ar-atmosfero. Naslednji dan potek reakcije preverimo s TLC. Surovi produkt čistimo s kolonsko kromatografijo. Uporabimo metodo suhega nanosa.

##### 4.5.1. SINTEZA 3',6'-bis(etylamino)-2-(2-hidroksietil)-2',7'-dimetilspiro[isoindolin-1,9'-ksanten]-3-ona (**4a**):

<b>Mw = 457,24 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> rodamin 6G (1,10 g; 2,30 mmol; 1,0 eq), 2-aminoetanol (378 µl; 6,90 mmol; 3,0 eq), 10 mL EtOH	<b>Kolonska kromatografija:</b> 40 g stacionarne faze, MF1 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 60:1 + 3‰ Et <sub>3</sub> N MF2 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 50:1 + 3‰ Et <sub>3</sub> N.
<b>Izgled:</b> svetlo-rjav prah <b>Izkoristek:</b> 73% (694 mg)	<b>Rf</b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 10:1 + 3‰ Et <sub>3</sub> N) = 0,59 <b>T<sub>tal</sub></b> = 284-286 °C
<b>IR (KBr):</b> 3420, 2968, 2866, 2364, 1682, 1622, 1519, 1468, 1421, 1395, 1272, 1220, 1201, 1160, 1096, 1078, 1033, 1014, 867, 812, 744 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 1,22 (t; 6H; J = 7,11 Hz; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,87 (s; 6H; 2 x Ar-CH <sub>3</sub> ); 2,91-3,03 (m; 4H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,14 (q; 4H; J = 7,11 Hz; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,53 (bs; 1H; -OH); 5,10 (bs; 2H; 2 x -NH-); 6,07 (s; 2H; H <sup>4'</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar); 6,27 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 6,96-6,98 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,48-7,51 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,76-7,78 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	

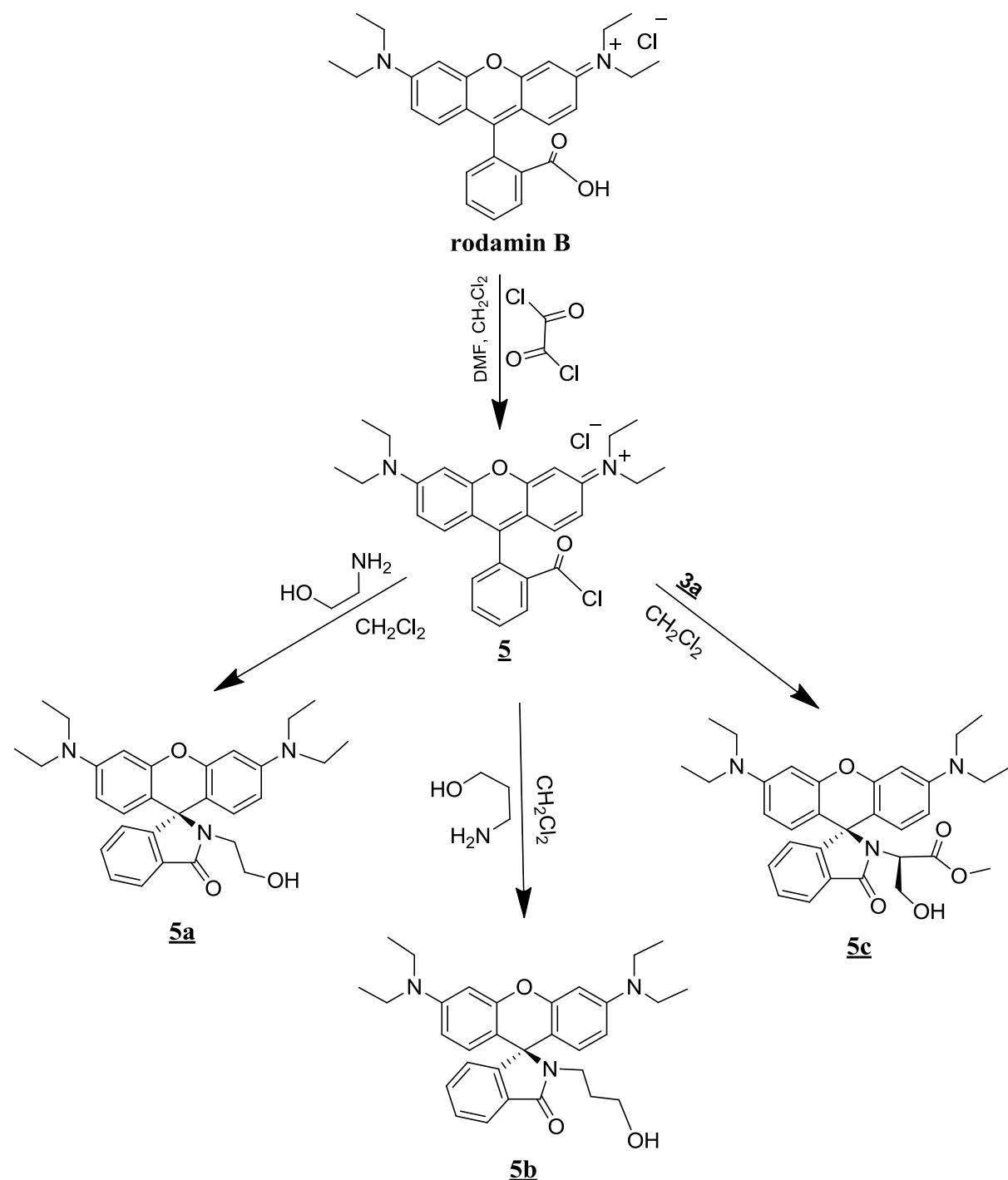
<b><sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 14,17 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 17,03 (2 x Ar-CH <sub>3</sub> ); 37,50 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 41,82 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 58,08 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 64,17 (Ar <sub>3</sub> C <sup>1</sup> N); 95,60 (C <sup>4'</sup> (Ar), C <sup>5'</sup> (Ar)); 104,60 (Ar-C-C <sup>1</sup> -C-Ar); 118,29 (C <sup>2'</sup> (Ar); C <sup>7'</sup> (Ar)); 122,29 (C <sup>4</sup> (Ar)); 123,62 (C <sup>7</sup> (Ar)), 127,51 (C <sup>1'</sup> (Ar); C <sup>8'</sup> (Ar)); 128,25 (C <sup>5</sup> (Ar)); 130,43 (C <sup>6</sup> (Ar)); 132,66 (C <sup>4</sup> -C(Ar)-C <sup>3</sup> ); 147,67 (C <sup>3'</sup> (Ar); C <sup>6'</sup> (Ar)); 150,98 (C <sup>4'</sup> -C(Ar)-O; C <sup>5'</sup> -C(Ar)-O); 153,52 (C <sup>7</sup> -C(Ar)-C <sup>1</sup> ); 166,88 (C <sup>3</sup> =O) ppm
<b>MS (ESI):</b> <i>m/z</i> (relativna intenziteta) 458 (MH <sup>+</sup> , 100)
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M+H] <sup>+</sup> 458,2444, ugotovljen 458,2451

#### 4.5.2. SINTEZA 3',6'-bis(etilamino)-2-(3-hidroksipropil)-2',7'-dimetilspiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on (4b):

<b>Mw = 471,25 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> Rodamin 6G (1,00 g; 2,09 mmol; 1 eq), 3-aminopropan-1-ol (0,94 g; 12,50 mmol; 6 eq), 5 mL EtOH	<b>Kolonska kromatografija:</b> 60 g stacionarne faze, MF = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 9:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N
<b>Izgled:</b> svetlo-roza prah <b>Izkoristek:</b> 50% (483 mg)	<b>Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH=10:1 + 3 % Et<sub>3</sub>N)</b> = 0,44 <b>T<sub>tal</sub></b> = 277-279 °C
<b>IR (KBr):</b> 3425, 3337, 2961, 2858, 1682, 1636, 1620, 1517, 1470, 1421, 1326, 1271, 1219, 1159, 1144, 1042, 1014, 868, 814, 782, 746 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 1,15–1,19 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 1,22 (t; 6H; J = 7,25 Hz; 2 × CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,87 (s; 6H; 2 × Ar-CH <sub>3</sub> ); 3,02 (t; 2H; J = 7,51 Hz; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,10–3,16 (m; 6H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH; 2 × CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,33 (bs; 1H; -OH); 5,07 (t; 2H; J = 5,32 Hz; 2 × -NH- ); 6,08 (s; 2H; H <sup>4'</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar); 6,27 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 6,96–6,98 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,48–7,50 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,77–7,79 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 14,15; 17,02; 31,02; 37,27; 37,47; 54,91; 64,28; 95,61; 104,66; 118,16; 122,19; 123,51; 127,51; 128,15; 130,49; 132,52; 147,58; 150,96; 153,64; 166,93 ppm	
<b>MS (ESI):</b> <i>m/z</i> (relativna intenziteta) 472 (MH <sup>+</sup> , 100)	
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> 472,2600, ugotovljen 472,2597	

#### 4.6. SINTEZA ALKOHOLAMIDOV IZ RODAMINA B:

##### REAKCIJA:



**Slika 14:** Sinteza alkoholaminskih derivatov rodamina B (sinteza spojin **5a**, **5b**, **5c**)

#### **4.6.1. POSTOPEK ZA SINTEZO *N*-(9-(2-(klorokarbonil)fenil)-6-(dietilamino)-3H-ksanten-3-iliden)-*N*-etiletanaminijevega klorida (**5**): (Mw = 497,46 g/mol)**

Rodamin B (6,00 g; 12,53 mmol; 1,0 eq) raztopimo v 120 mL brezvodnega  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Ohladimo na ledeni kopeli, dodamo 1 kapljico DMF in z brizgo po kapljicah dodamo oksalil klorid (3,82 g; 30,07 mmol; 2,4 eq) ob konstantnem mešanju. Reakcijsko zmes pustimo na ledeni kopeli še 15 minut, nato 15 minut pri sobni temperaturi in pod Ar-atmosfero. 45 minut mešamo pod refluksom pri 50 °C. Pod znižanim tlakom uparimo topilo, da nastane stabilna pena zlato-vijolične barve, ki jo raztopimo v 20 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in vsebino bučke razdelimo po enakih delih v 3 bučke in takoj nadalujemo z naslednjimi stopnjami reakcij.

#### **POSTOPEK za sintezo **5a**, **5b** in **5c**:**

Ustrezen aminoalkohol raztopimo v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (pri **5c** dodamo še  $\text{Et}_3\text{N}$ ) in po kapljicah ob konstantnem mešanju na ledeni kopeli dodamo spojino **5** (2,00 g; 4,03 mmol; 1,0 eq) raztopljeni v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Po 15 minutah odmaknemo z ledeni kopeli in nadalujemo z mešanjem pri sobni temperaturi in pod Ar-atmosfero. Potek reakcije preverimo s TLC. Surovi produkt očistimo s kolonsko kromatografijo. Uporabimo metodo suhega nanosa.

#### **4.6.2. 3',6'-bis(dietilamino)-2-(2-hidroksiethyl)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on (**5a**):**

<b>Mw</b> = 485,62 g/mol	
<b>Reagenti:</b> 2-aminoetanol (1,48 g; 24,18 mmol; 6,0 eq), 5 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	<b>Kolonska kromatografija:</b> 100 g silikagela, MF1 = $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 60:1 + 3\% \text{ Et}_3\text{N}$ , MF2 = $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 50:1 + 3\% \text{ Et}_3\text{N}$
<b>Izgled:</b> svetlo-vijoličen prah <b>Izkoristek:</b> 82% (1, 604 g)	<b>Rf</b> ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 10:1 + 3\% \text{ Et}_3\text{N}$ ) = 0,62 <b>T<sub>tal</sub></b> = 219-220 °C
<b>IR (KBr):</b> 3482, 2965, 2927, 1684, 1661, 1617, 1584, 1516, 1466, 1428, 1331, 1266, 1220, 1151, 1119, 1036, 968, 867, 810, 785, 764, 704 $\text{cm}^{-1}$	

<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 Hz):</b> δ 1,09 (t; 12H; <i>J</i> = 6,95 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 2,95-3,05 (m; 4H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,33 (q; 8H; <i>J</i> = 6,80 Hz; 4 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,58 (t; 1H; <i>J</i> = 5,3 Hz; -OH); 6,30 in 6,33 (2 x s; 2H; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>4'</sup> -Ar); 6,36-6,38 (m; 4H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>2'</sup> -Ar; H <sup>7'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,00-7,04 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,47-7,53 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,76-7,80 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm
<b><sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):</b> 12,62; 44,38; 44,67; 62,72; 65,90; 97,75; 104,73; 108,21; 122,92; 123,82; 128,17; 128,52; 130,42; 132,74; 148,88; 153,27; 153,92; 170,14 ppm
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>30</sub> H <sub>36</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> 486,2757; ugotovljen 486, 2761

#### 4.6.3. 3',6'-bis(dietilamino)-2-(3-hidroksipropil)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-on (**5b**):

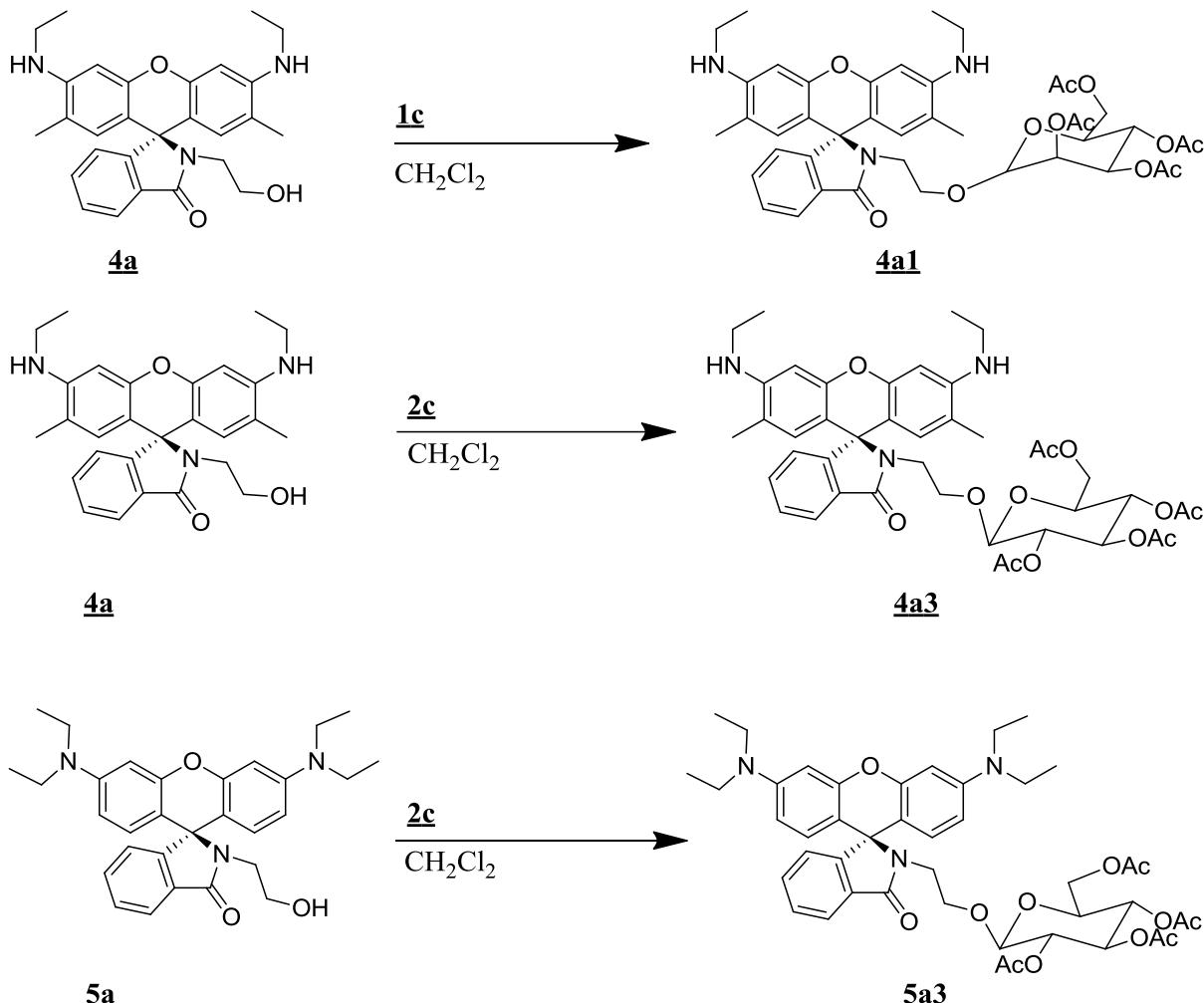
<b>Mw</b> = 499,64 g/mol	
<b>Reagenti:</b> 3-aminopropan-1-ol (1,82g; 24,18 mmol; 6,0 eq), 5 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<b>Kolonska kromatografija:</b> 100 g silikagela, MF1 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH=60:1 + 3 %o Et <sub>3</sub> N, MF2 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH=50:1 + 3 %o Et <sub>3</sub> N
<b>Izgled:</b> vijoličen prah <b>Izkoristek:</b> 90% (1,814 g)	<b>Rf</b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 20:1 + 3 %o Et <sub>3</sub> N) = 0,57 <b>T<sub>tal</sub></b> = 220-221 °C
<b>IR (KBr):</b> 3434, 2972, 2928, 2869, 1686, 1665, 1631, 1616, 1583, 1543, 1515, 1467, 1449, 1427, 1330, 1267, 1220, 1151, 1119, 1077, 1017, 935, 866, 815, 784, 764, 702 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 Hz):</b> δ 1,09 (t; 12H; <i>J</i> = 7,0 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,19-1,26 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,03 (t; 2H; <i>J</i> = 7,7 Hz; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,18 (q; 2H; <i>J</i> = 5,9 Hz; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH); 3,32 (q; 8H; <i>J</i> = 6,67 Hz; 4 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 4,34 (t; 1H; <i>J</i> = 5,3 Hz; -OH); 6,31 in 6,33 (2 x s; 2H; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>4'</sup> -Ar); 6,36 (d; 2H; <i>J</i> = 2,5 Hz; H <sup>2'</sup> -Ar; H <sup>7'</sup> -Ar); 6,38 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,00-7,02 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,48-7,51 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,77-7,79 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):</b> 12,60; 30,78; 35,53; 44,40; 58,27; 65,44; 97,66; 105,18; 108,07; 122,84; 123,88; 128,23; 128,71; 131,03; 132,64; 148,89; 153,45; 169,22 ppm	
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>31</sub> H <sub>38</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> [M + H] <sup>+</sup> 500,2913; ugotovljen 500,2899	

**4.6.4. (*R*)-metil 2-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)-3-hidroksipropanoat (**5c**):**

<b>Mw</b> = 543,65 g/mol	
<b>Reagenti:</b> <b>3a</b> (0,93 g; 6,05 mmol; 1,5 eq), 10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , Et <sub>3</sub> N (1,43 g; 14,10 mmol; 3,5 eq)	<b>Kolonska kromatografija:</b> 130 g silikagela, MF = EtOAc:n-Hex = 1:1
<b>Izgled:</b> roza prah <b>Izkoristek:</b> 51 % (1,12 g)	<b>Rf</b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 10:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N) = 0,67 <b>T<sub>tal</sub></b> = 191-192 °C
<b>IR (KBr):</b> 3316, 2967, 2926, 2869, 1740, 1666, 1633, 1615, 1544, 1517, 1470, 1429, 1402, 1348, 1334, 1120, 1042, 953, 864, 822, 782, 764, 705 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 Hz):</b> δ 1,09 (t; 12 H; J = 7,0 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 3,28-3,37 (m; 12H; -O-CH <sub>3</sub> ; 4 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ; -N-CH-CH <sub>2</sub> -OH); 3,74-3,84 (m; 2H; -CH-CH <sub>2</sub> -OH); 3,88 (bs; 1H; J = 7,5 Hz; 4,6 Hz; -OH); 6,35 (d; 6H; J = 4,7 Hz; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>2'</sup> -Ar H <sup>4'</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>7'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,00-7,02 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,50-7,57 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,79-7,81 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 12,38; 12,40; 43,66; 51,42; 56,83; 60,08; 65,11; 96,90; 96,96; 103,52; 104,05; 107,48; 108,00; 122,43; 123,79; 128,40; 128,94; 129,81; 129,98; 133,11; 148,41; 152,74; 153,29; 166,80; 169,04 ppm	
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>32</sub> H <sub>38</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> [M + H] <sup>+</sup> 544,2811; ugotovljen 544,2797	

#### 4.7. KEMIJSKA GLIKOZILACIJA:

##### REAKCIJA:



**Slika 15:** Kemijska glikozilacija. Nastanek spojin 4a1, 4a3 in 5a3

##### POSTOPEK:

Pri vsakem poskusu izvedba in pogoj reakcije namenoma variirajo. Vsem pa je skupno naslednji vrstni red in pogoji:

Ves pribor s katerim pridejo reagenti neposredno v stik, je ustrezno posušen, da ni prisotne vode, prav tako je reakcijska bučka ves čas priprave in nato med potekom reakcije nepredušno zaprta in pod Ar-atmosfero.

- A. Aktivirani sladkor in ustrezen alkoholni analog rodamina sušimo na vakuumski črpalki vsaj eno uro.
- B. Bučko postavimo na kopl, ki je zmes metanola in acetona in jo ohlajamo s potopnim hladilnikom in ves čas reakcije kontroliramo temperaturo.
- C. Preko septuma dodamo brezvodni  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  in nato TMSOTf.
- D. Pri določeni T pustimo teči reakcijo, ki pa jo nato ustavimo z dodatkom  $\text{Et}_3\text{N}$  ali vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$ .

IZVEDBA IN POGOJI REAKCIJE				
SPOJINA	A	B	C	D
<b><u>4a1</u></b>	<b><u>4a</u></b> in <b><u>1c</u></b> združena v bučki.	-30 °C		1 h pri -30 °C, 0,5 h pri -15 °C. Segrejemo na sobno T in dodamo $\text{Et}_3\text{N}$ .
<b><u>4a3</u></b>	<b><u>4a</u></b> in <b><u>2c</u></b> ločena. Vsak v svoji bučki.	-35 °C	<b><u>2c</u></b> raztopimo v $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ohladimo na kopeli in dodamo s pomočjo brizge <b><u>4a</u></b> raztopljen v $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , nato dodamo TMSOTf.	Po dodatku TMSOTf, izklopimo hlajenje in pustimo, da se T sama dvigne iz -35 °C na 0 °C (3 h). Nato čez noč pustimo v zmrzovalniku na -18 °C in naslednji dan dodamo $\text{Et}_3\text{N}$ .
<b><u>5a3</u></b>	<b><u>5a</u></b> in <b><u>2c</u></b> v isti bučki, vendar ločena; <b><u>5a</u></b> je v penicilinki, ki je postavljena pokončno v bučki.	-35 °C	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ v bučko. Penicilinko po 3 min prevrnemo, da se vsebini med seboj premešata, dodamo TMSOTf.	Hlajenje izklopimo, pustimo naraščati T do -5 °C (2 h) in dodamo vodno raztopino $\text{NaHCO}_3$ .

**Tabela 3:** Pogoji in izvedbe glikozilacijskih reakcij.

**4.7.1. (2S,3S,4R,5R)-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksitetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat (4a1):**

<b>Mw = 787,85 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> <b>4a</b> (513 mg; 1,12 mmol; 1 eq); <b>1c</b> (614 mg; 1,25 mmol; 1,1 eq) 20 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; TMSOTf (1,24 mmol; 1,1 eq) 2,0 eq Et <sub>3</sub> N	<b>Kolonska kromatografija:</b> 40 g silikagela MF1 = EtOAc:n-Hex = 2:1 MF2 = EtOAc:n-Hex = 3:1
<b>Izgled:</b> rumena pena <b>Izkoristek:</b> 38 % (334 mg)	<b>Rf (etil acetat : heksan = 2:1) = 0,34</b> <b>T<sub>tal</sub> = 115-117 °C</b>
<b>IR (KBr):</b> 3422, 2973, 2368, 1752, 1624, 1522, 1420, 1376, 1225, 1158, 1047, 895, 746, 600 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 1,22 in 1,23 (2 x t; 6H; J = 7,1 Hz; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,43 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 1,86 in 1,87 (2 x s; 6H; 2 x Ar-CH <sub>3</sub> ); 1,97 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 1,99 (s; 6H; 2 x -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,91-2,98 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 3,01-3,08 (m; 1H; N-CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 2,12-3,17 (m; 5H; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ; N-CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 3,89 (ddd; J = 2,6; 4,5; 10,0 Hz; 1H; H <sup>5</sup> -Man.); 4,00-4,06 (m; 2H; H <sup>2</sup> -Man.; H <sup>4</sup> -Man.); 4,09 (dd; J = 4,3; 12,4 Hz; 1H; H <sup>6a</sup> -Man; 4,94 (dd; J = 9,7; 9,7 Hz; 1H; H <sup>6b</sup> -G); 5,02-5,23 (m; 2H; 2 x -NH-); 5,29 (dd; J = 9,9; 4,0 Hz; 1H; H <sup>3</sup> -Man.); 5,35 (d; J = 2,4 Hz; 1H; H <sup>1</sup> -Man.); 6,08 (s; 2H; H <sup>4'</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar); 6,28 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 6,98-7,00 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,50-7,52 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,76-7,79 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>; 100 MHz):</b> δ 14,77 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 16,70 (2 x Ar-CH <sub>3</sub> ); 20,71; 20,77; 20,97 (3 x -COCH <sub>3</sub> ); 24,94 (-CO-CH <sub>3</sub> ); 38,44 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 39,79 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 59,50 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 62,36 (C <sup>6</sup> -Man.); 64,90 (Ar <sub>3</sub> C <sup>1</sup> N); 65,83 (C <sup>4</sup> -Man.); 68,59 (C <sup>5</sup> -Man.); 70,17 (C <sup>3</sup> -Man.); 71,19 (C <sup>2</sup> -Man.); 96,49; 96,52 (C <sup>4'</sup> (Ar); C <sup>5'</sup> (Ar)); 97,38 (C <sup>1</sup> -Man.); 105,60; 106,12 (Ar-C-C <sup>1</sup> -C-Ar); 117,88; 117,99 (C <sup>2'</sup> (Ar); C <sup>7'</sup> (Ar)); 122,82 (C <sup>4</sup> (Ar)); 123,80 (C <sup>7</sup> (Ar)); 124,43 (-O <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub> ); 128,07 (C <sup>5</sup> (Ar)); 128,47; 128,60 (C <sup>1'</sup> (Ar); C <sup>8'</sup> (Ar)); 130,84 (C <sup>6</sup> (Ar)); 132,55 (C <sup>4</sup> -C(Ar)-C <sup>3</sup> ); 147,42; 147,46 (C <sup>3'</sup> (Ar); C <sup>6'</sup> (Ar)); 151,64; 151,68 (C <sup>4'</sup> -C(Ar)-O; C <sup>5'</sup> -C(Ar)-O); 153,77 (C <sup>7</sup> -C(Ar)-C <sup>1</sup> ); 168,23 (C <sup>3</sup> =O); 169,50; 170,21; 170,70 (3 x -COCH <sub>3</sub> ) ppm	
<b>MS (ESI):</b> m/z (relativna intenziteta) 788 (MH <sup>+</sup> , 100)	

**HRMS (ES<sup>+</sup>):** izračunan za C<sub>42</sub>H<sub>50</sub>N<sub>3</sub>O<sub>12</sub> [M+H]<sup>+</sup> 788,3394, ugotovljen 788,3401

**4.7.2. (2S,3S,4R,5S,6S)-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triil triacetat (4a3):**

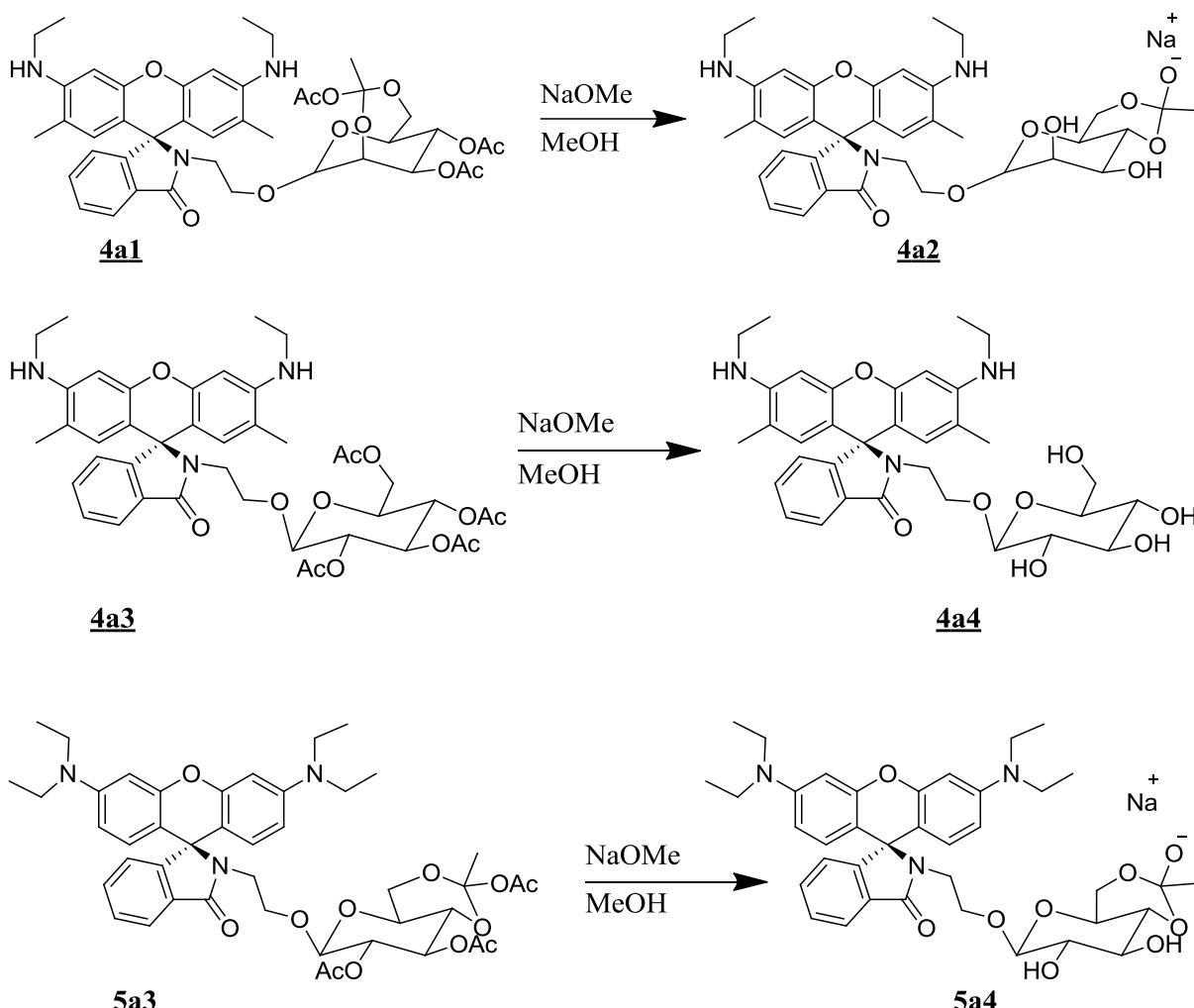
<b>Mw = 787,85 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> <b>4a</b> (1,00 g; 2,20 mmol; 1,0 eq); <b>2c</b> (1,23 g; 2,50 mmol; 1,1 eq); TMSOTf (2,20 mmol; 1,0 eq); 10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> za <b>2c</b> ; 30 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> za <b>4a</b> ; 2,0 eq Et <sub>3</sub> N	<b>Kolonska kromatografija:</b> 75 g silikgela; MF1 = PE:EtOAc = 2:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N; MF2 = PE:EtOAc = 1:2 + 3 % Et <sub>3</sub> N in MF3 = EtOAc
<b>Izgled:</b> rumena pena <b>Izkoristek:</b> 33 % (0,58 g)	<b>Rf (EtOAc:n-Hex = 2:1) = 0,30</b> <b>T<sub>tal</sub> = 98-99 °C</b>
<b>IR (KBr):</b> 3423, 2972, 1751, 1690, 1622, 1518, 1421, 1376, 1221, 1158, 1039, 886, 746 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 1,21 (t; 6H; J = 7.11 Hz; 2 × -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,86 (s; 6H; 2 × Ar-CH <sub>3</sub> ); 1,98 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,01 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,02 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,07 (s; 3H; -CO-CH <sub>3</sub> ); 2,90-3,09 (m; 4H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 2,11-3,17 (m; 4H; 2 × -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 3,83 (ddd; J = 3,29; 5,14; 9,08 Hz; 1H; H <sup>5</sup> -G); 4,07-4,14 (m; 3H; H <sup>2</sup> -G; H <sup>4</sup> -G; H <sup>6a</sup> -G); 4,75 (dd; J = 3,76; 9,21 Hz; 1H; H <sup>6b</sup> -G); 4,96 (t; J = 3,56 Hz; 1H; H <sup>3</sup> -G); 5,12-5,15 (m; 2H; 2 × -NH-); 5,43 (d; J = 5,24 Hz; 1H; H <sup>1</sup> -G); 6,09 (s; 2H; H <sup>4</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar); 6,28 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8</sup> -Ar); 6,99-6,01 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,50-7,53 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,77-7,80 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 12,29; 15,14; 18,73; 18,79; 18,95; 20,24; 35,65; 57,25; 57,96; 60,82; 62,39; 65,19; 65,43; 67,96; 71,63; 93,72; 94,62; 102,60; 102,65; 116,50; 116,56; 119,23; 120,53; 121,85; 125,79; 126,51; 128,61; 130,98; 145,95; 149,23; 151,43; 164,94; 167,11; 167,54; 168,28 ppm	
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>42</sub> H <sub>50</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> [M + H] <sup>+</sup> 788,3394; ugotovljen 788,3386	

**4.7.3. (*2S,3S,4R,5S,6S*)-2-(acetoksimetil)-6-(2-(3',6'-bis(dietilamino)-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)tetrahidro-2*H*-piran-3,4,5-triil triacetat (**5a3**):**

<b>Mw = 815,90 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> <b>5a</b> (0,55 g; 1,14 mmol; 1,0 eq); <b>2c</b> (0,67 g; 1,37 mmol; 1,2 eq); 10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ; TMSOTf (0,91 mmol; 0,8 eq); vodna raztopina NaHCO <sub>3</sub> (2,28 mmol; 2,0 eq)	<b>Kolonska kromatografija:</b> 45 g silikagela MF1 = EtOAc:n-Hex = 2:1; MF2 = EtOAc:n-Hex = 3:1 Produkta ne uspemo popolnoma očistiti, zato nadaljujemo z 0,40 g neočiščenega produkta z naslednjo stopnjo reakcije.

#### 4.8. ODSTRANITEV ACETILNE ZAŠČITE:

##### REAKCIJA:



**Slika 16:** Odstranitev acetilne zaščite (sinteza spojin **4a2**, **4a4** in **5a4**)

##### POSTOPEK:

Ustrezen glikozidni rodamin raztopimo v brezvodnem MeOH in dodamo NaOCH<sub>3</sub>.

Reakcijo pustimo teči 60 minut pri sobni temperaturi in pod Ar-atmosfero. Potek reakcije preverimo s TLC. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo.

**4.8.1. SINTEZA natrijevega (*2R,4aS,7R,8S,8aR*)-**6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)-7,8-dihidroksi-2-metilheksahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioksin-2-olata (4a2):****

<b>Mw = 661,74 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> <b>4a1</b> (334 mg; 0,424 mmol; 1,0 eq); CH <sub>3</sub> OH 10 mL; NaOMe (5mg; 0,085 mmol; 0,2 eq)	<b>Kolonska kromatografija:</b> 15 g silikagela MF1 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 9:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N
<b>Izgled:</b> svetlo rumena stabilna pena <b>Izkoristek:</b> 73 % (193 mg)	<b>Rf</b> (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 9:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N) = 0,24 <b>T<sub>tal</sub></b> = 123-125 °C
<b>IR (KBr):</b> 3405, 2969, 2930, 2364, 1718, 1670, 1637, 1621, 1518, 1472, 1420, 1387, 1270, 1218, 1202, 1158, 1054, 887, 814, 745, 693, 551 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 1,22 (t; 3H; J = 7,2 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,23 (t; 3H; J = 7,2 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,37 (s; 3H; -O <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub> ); 1,87 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 1,88 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 2,81-2,92 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 2,98-3,08 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -O-; H <sup>5</sup> -Man.); 3,12-3,18 (m; 4H; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 3,20-3,27 (m; 2H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -O-; H <sup>4</sup> -Man.); 3,40-3,44 (m; 2H; H <sup>2</sup> -Man., H <sup>3</sup> -Man.); 3,64 (dd; 1H; J = 11,5 Hz; 3,4 Hz; H <sup>6a</sup> -Man); 3,74 (dd; 1H; J = 4,1 Hz; 2,4 Hz; H <sup>6b</sup> -Man); 4,57 (bs; 1H; -OH); 4,98 (d; 1H; J = 5,0 Hz; -OH); 5,03 (bs; 1H; -OH); 5,04 (d; 1H; J = 2,3 Hz; H <sup>1</sup> -Man.); 5,10 (t; 1H; J = 5,3 Hz; -NH-); 5,14 (t; 1H; J = 5,5 Hz; -NH-); 6,05 in 6,08 (2 x s; 2H; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>4'</sup> -Ar); 6,30 in 6,28 (2 x s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,00-7,02 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,50-7,53 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,78-7,80 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>1</sup>H-NMR (MeOD, 400 MHz):</b> δ 1,31-1,35 (m; 6H; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,48 (s; 3H; -O <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub> ); 1,93 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 1,94 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 2,97-3,03 (m; 1H; N-CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 3,07-3,17 (m; 3H; N-CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -CH <sub>2</sub> -O-; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -O-; H <sup>5</sup> -Man.); 3,25 (q; 4H; J = 6,9 Hz; 2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 3,35-3,38 (m; 1H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>a</sub> H <sub>b</sub> -O-); 3,46 (dd; 1H; J = 9,1 Hz; 9,1 Hz; H <sup>4</sup> -Man.); 3,55-3,57 (m; 1H; H <sup>3</sup> -Man.); 3,63 (dd; 1H; J = 11,9 Hz; 5,7 Hz; H <sup>6a</sup> -G); 3,82 (m; 2H; H <sup>6b</sup> -G; H <sup>2</sup> -Man.); 5,14 (s; 1H; H <sup>1</sup> -Man.); 6,11 in 6,15 (2 x s; 2H; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>4'</sup> -Ar); 6,41 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,05-7,06 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,54-7,55 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,88-7,89 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	

<b><sup>13</sup>C-NMR (MeOD-d<sub>6</sub>; 100 MHz):</b> δ 14,47; 14,80 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 17,14 (2 x Ar-CH <sub>3</sub> ); 26,16 (-N-CO-CH <sub>3</sub> ); 39,23 (2 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 40,61 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 59,92 (N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-); 62,77 (C <sup>6</sup> -Man.); 67,06 (Ar <sub>3</sub> C <sup>1</sup> N); 68,47 (C <sup>4</sup> -Man.); 73,53 (C <sup>3</sup> -Man.); 76,96 (C <sup>5</sup> -Man.); 81,21 (C <sup>2</sup> -Man.); 97,49; 97,59 (C <sup>4'</sup> (Ar); C <sup>5'</sup> (Ar)); 99,01 (C <sup>1</sup> -Man.); 105,92; 106,29 (Ar-C-C <sup>1</sup> -C-Ar); 119,96; 120,12 (C <sup>2'</sup> (Ar); C <sup>7'</sup> (Ar)); 123,57 (C <sup>4</sup> (Ar)); 125,04 (C <sup>7</sup> (Ar)); 125,15 (C <sup>5</sup> (Ar)); 129,03; 129,31; 129,58 (C <sup>1'</sup> (Ar); C <sup>8'</sup> (Ar); -O <sub>3</sub> C-CH <sub>3</sub> ); 132,06 (C <sup>6</sup> (Ar)); 134,21 (C <sup>4</sup> -C(Ar)-C <sup>3</sup> ); 149,51 (C <sup>3'</sup> (Ar); C <sup>6'</sup> (Ar)); 153,29 (C <sup>4'</sup> -C(Ar)-O; C <sup>5'</sup> -C(Ar)-O); 155,12 (C <sup>7</sup> -C(Ar)-C <sup>1</sup> ); 169,85 (C <sup>3</sup> =O) ppm
<b>MS (ES<sup>+</sup>):</b> m/z (rel. intenziteta): 662 (MH <sup>+</sup> , 20), 500 (25), 458 (100), 220 (20), 102 (29)
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>36</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> [M+H] <sup>+</sup> 662,3078, ugotovljen 662,3071

#### 4.8.2. SINTEZA 3',6'-bis(etilamino)-2',7'-dimetil-2-(2-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oksi)etyl)spiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-3-ona (**4a4**):

<b>Mw = 619,70 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> <b>4a3</b> (0,30 g; 0,38 mmol; 1,0 eq); 10 mLCH <sub>3</sub> OH; NaOMe ( 4,3 mg; 0,08 mmol; 0,2 eq)	<b>Kolonska kromatografija:</b> 15 g silikagela MF1 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 9:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N
<b>Izgled:</b> brezbarvna stabilna pena <b>Izkoristek:</b> 20 % (47 mg)	<b>Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH = 10:1) = 0,23</b> <b>T<sub>tal</sub> = 129-131 °C</b>
<b>IR (KBr):</b> 3422, 2926, 1670, 1522, 1495, 1400, 1270, 1201, 1076, 1016, 888, 747 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):</b> δ 0,95 (t; 3H; J = 6,90 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,22 (t; 3H; J = 7,16 Hz; -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,88 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 2,05 (s; 3H; Ar-CH <sub>3</sub> ); 2,91–3,28 (m; 12H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O; 2 × -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ; H <sup>2</sup> -G; H <sup>3</sup> -G; H <sup>4</sup> -G; H <sup>5</sup> -G); 3,50–3,53 (m; 1H; H <sup>6a</sup> -G); 3,74–3,79 (m; 1H; H <sup>6b</sup> -G); 4,06–4,15 (m; 1H; -OH); 4,54–4,58 (m; 2H; 2 × -OH); 4,65 (bs; 1H; -OH); 4,89 (d; 1H; J = 4,9 Hz; H <sup>1</sup> -G); 4,93 (t; 1H; J = 4,0 Hz; -NH-); 5,18 (t; 1H; J = 5,14 Hz; -NH-); 6,12 (s; 1H; H <sup>4'</sup> -Ar); 6,29 (s; 2H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,01–7,04 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,31 (d; 1H; J = 5,37 Hz; H <sup>5'</sup> -Ar); 7,50–7,52 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,81–7,79 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	

<b><sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 14,18; 14,27; 17,05; 17,78; 37,53; 42,05; 48,64; 58,06; 61,64; 64,01; 70,40; 70,56; 78,13; 78,35; 92,97; 93,04; 95,59; 104,09; 114,01; 114,17; 118,64; 122,50; 123,73; 127,53; 128,29; 128,51; 130,23; 132,90; 147,93; 148,82; 148,85; 149,40; 149,47; 150,81; 153,23; 167,05 ppm
<b>MS (ESI) m/z</b> (relativna intenziteta) 620 (MH <sup>+</sup> , 100)
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>34</sub> H <sub>42</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> [M + H] <sup>+</sup> 620,2972; ugotovljen 620,2971

**4.8.3. SINTEZA natrijevega (2*R*,4*a*S,6*S*,7*S*,8*S*,8*a*R)-6-(2-(3',6'-bis(etilamino)-3-oksospiro[izoindolin-1,9'-ksanten]-2-il)etoksi)-7,8-dihidroksi-2-metilheksahidropirano[3,2-*d*][1,3]dioksin-2-olata (5a4):**

<b>Mw = 689,79 g/mol</b>	
<b>Reagenti:</b> Neočiščen <u>5a3</u> (0,40 g); CH <sub>3</sub> OH 10 mL; NaOCH <sub>3</sub> (5,40 mg; 0,10 mmol)	<b>Kolonska kromatografija:</b> 15 g silikagela MF1 = CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CH <sub>3</sub> OH = 9:1 + 3 % Et <sub>3</sub> N
<b>Izgled:</b> prozorna stabilna pena	<b>Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH = 10:1) = 0,22</b>
<b>Izkoristek:</b> 8,4 % (62 mg)	<b>T<sub>tal</sub> = 88-90 °C</b>
<b>IR (KBr):</b> 3413, 2969, 2930, 2363, 2345, 1635, 1616, 1517, 1384, 1328, 1305, 1264, 1219, 1119, 1091, 1019, 899, 816, 788, 756, 703 cm <sup>-1</sup>	
<b><sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 Hz):</b> δ 1,09 (t; 12H; J = 6,9 Hz; 4 x -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ); 1,36 (s; 3H; O <sub>3</sub> HC-CH <sub>3</sub> ); 2,92-3,19 (m; 4H; N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O); 3,28-3,61 (m; 14H; 4 x CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ; H <sup>2</sup> -G; H <sup>3</sup> -G; H <sup>4</sup> -G; H <sup>5</sup> -G; H <sup>6ab</sup> -G); 3,84 (t; 1H; -OH) 4,61 (bs; 1H; -O <sub>2</sub> C(CH <sub>3</sub> )-OH); 5,09 (d; 1H; -OH); 5,30 (d; 1H; H <sup>1</sup> -G); 6,30-6,40 (m; 6H; H <sup>1'</sup> -Ar; H <sup>2'</sup> -Ar; H <sup>4'</sup> -Ar; H <sup>5'</sup> -Ar; H <sup>7'</sup> -Ar; H <sup>8'</sup> -Ar); 7,05-7,07 (m; 1H; H <sup>7</sup> -Ar); 7,51-7,54 (m; 2H; H <sup>5</sup> -Ar; H <sup>6</sup> -Ar); 7,78-7,80 (m; 1H; H <sup>4</sup> -Ar) ppm	
<b><sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):</b> δ 12,37; 23,59; 45,59; 58,45; 61,11; 63,86; 68,27; 73,38; 74,09; 78,64; 97,07; 97,19; 104,65; 104,70; 108,10; 120,24; 122,32; 123,68; 128,36; 130,38; 132,80; 148,43; 152,61; 153,13; 166,62 ppm	
<b>MS (ESI):</b> m/z (relativna intenziteta) 690,33 (MH <sup>+</sup> , 100)	
<b>HRMS (ESI):</b> izračunan za C <sub>38</sub> H <sub>48</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> [M+H] <sup>+</sup> 690,3401, ugotovljen 690,3391	

#### **4.9. MERJENJE ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN 4a2 in 5c:**

Absorpcijske in emisijske spektre smo posneli raztopinam spojin **4a2** in **5c** pri različnih pH vrednostih.

##### **4.9.1. Priprava 250 mL 0,1 M raztopine citronske kisline in 250 mL 0,2 M raztopine Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:**

Natehtali smo 9,6 g citronske kisline in 14,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Natehti smo kvantitativno prenesli vsako v svojo 250 mL polnilno bučko, raztopili v vodi za HPLC in dopolnili z vodo do oznake.

##### **4.9.2. Priprava pufrov:**

Pripravili smo pufre različnih pH vrednosti. Za pripravo smo uporabili Sigma Aldrich-ovo recepturo (25). Za pripravo 50 mL pufra z določeno vrednostjo pH smo potrebovali naslednje količine:

pH pufra	Volumen 0,1 M citronske kisline (mL)	Volumen 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)
2,6	44,6	5,4
3,0	39,7	10,3
3,6	33,9	16,1
4,0	30,7	19,3
4,4	28,0	22,0
4,8	25,4	24,6
5,2	23,2	26,8
5,6	21,0	29,0
6,0	18,4	31,6
6,6	13,6	36,4
7,2	6,5	43,5
7,6	3,2	46,8

**Tabela 4:** Količine za pripravo 50 mL pufra izbrane pH vrednosti.

Pufrom smo nato izmerili pH vrednost s pH metrom, ki smo ga predhodno umerili s standardnimi raztopinami in z dodajanjem kisline ali baze uravnali pH pufra do želene vrednosti.

**4.9.3. Priprava osnovnih raztopin:** Pripravili smo raztopine s koncentracijo  $10^{-3}$  M. Uporabili smo spodnjo formulo (Enačba 4) za izračun mase spojine ob upoštevanju želene koncentracije in volumna raztopine približno 5 mL. Natehtali smo približno natančno izračunano maso, nato pa po spodnji formuli izračunali točni volumen DMSO z upoštevanjem natehtane mase. Topilo DMSO smo izbrali zaradi dobre topnosti spojin **4a2** in **5c** v DMSO in slabe topnosti v vodnih raztopinah.

$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{V \times M}$$

**Enačba 4:**  $n = \text{množina snovi (mol)}$ ,  $V = \text{volumen raztopine (L)}$ ,  $m = \text{masa snovi (g)}$ ,  $M = \text{molska masa (g/mol)}$ .

spojina	<b>4a2</b>	<b>5c</b>
<i>izračunana masa</i>	3,94 mg	2,72 mg
<i>natehtana masa</i>	4,00 mg	3,05 mg
<i>volumen DMSO</i>	5077 $\mu\text{L}$	5610 $\mu\text{L}$

**Tabela 5:** Količine spojin **4a2** in **5c** za pripravo osnovne raztopine s koncentracijo  $10^{-3}$  M.

**4.9.4. Priprava testnih raztopin:** Za UV / VIS spektroskopijo smo pripravili  $10^{-5}$  M za fluorescenčno pa  $10^{-7}$  M raztopine po naslednjem postopku:

- $10^{-5}$  M: 5000  $\mu\text{L}$  vode za HPLC + 4900  $\mu\text{L}$  pufra z ustreznim pH + 100  $\mu\text{L}$   $10^{-3}$  M (osnovne) raztopine
- $10^{-7}$  M: 5000  $\mu\text{L}$  vode za HPLC + 4900  $\mu\text{L}$  pufra z ustreznim pH + 100  $\mu\text{L}$   $10^{-5}$  M raztopine v ustremnem pufru

**4.9.5. Priprava vzorčne slepe raztopine za absorbanco:** To raztopino smo uporabili za odštevanje ozadja (Baseline). Izbrali smo si pufer s pH vrednostjo v sredini intervala med 2,6 in 7,6.

- Vzorčna sleva: 5000  $\mu\text{L}$  vode za HPLC + 4900  $\mu\text{L}$  pufra s pH = 4,8 + 100  $\mu\text{L}$  DMSO

Fluorescenčna metoda ne potrebuje slepe raztopine, ker je absolutna metoda.

**4.9.6. Inkubacija raztopin vsaj 6 ur:** Testne raztopine smo pustili v temnem prostoru čez noč, da se vzpostavi ravnotežje med obliko z odprtim obročem (planarna, konjugirana oblika) in spirociklično obliko.

**4.9.7. Merjenje absorbance:** Absorbanco smo merili pri valovnih dolžinah od 400 do 700 nm. Pred samo meritvijo testnih raztopin smo pomerili absorbanco vzorčni slepi raztopini, da nam je program odštel ozadje.

**4.9.8. Merjenje fluorescence:** Pred samo meritvijo smo v programu nastavili naslednje parametre:

PARAMETRI	<u>4a2</u>	<u>5c</u>
<i>Start</i>	520 nm	
<i>End</i>	700 nm	
<i>Excitation</i>	510 nm	517 nm
<i>Ex Slit</i>	13,0 nm	7,0 nm
<i>Em Slit</i>	11,0 nm	15,0 nm
<i>Scan speed</i>	200 nm/min	

**Tabela 6:** Nastavljeni parametri v programu za merjenje fluorescence.

**4.9.10. Merjenje pH testnih raztopin:** Po koncu spektrofotometričnih meritev smo še enkrat preverili pH vrednost testnih raztopin. Rezultati so podani v spodnji tabeli.

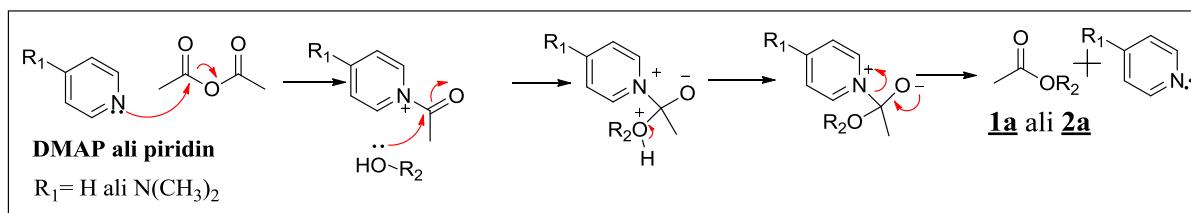
<b>pH pufrs</b>	<u>4a2</u>		<u>5c</u>	
	<b><math>10^{-5}</math> M</b>	<b><math>10^{-7}</math> M</b>	<b><math>10^{-5}</math> M</b>	<b><math>10^{-7}</math> M</b>
2,6	2,7	2,8	2,7	2,8
3,0	3,1	3,1	3,1	3,1
3,6	3,7	3,7	3,7	3,7
4,0	4,2	4,2	4,1	4,1
4,4	4,6	4,5	4,5	4,5
4,8	5,0	5,0	5,0	5,0
5,2	5,4	5,4	5,4	5,4
5,6	5,9	5,8	5,8	5,8
6,0	6,3	6,2	6,3	6,3
6,6	6,8	6,7	6,8	6,7
7,2	7,4	7,3	7,3	7,3
7,6	7,7	7,6	7,7	7,7

**Tabela 7:** Izmerjene pH vrednosti raztopin

## 5. REAZULTATI IN RAZPRAVA:

### 5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV:

#### 5.1.1. Acetiliranje manoze in glukoze:



Slika 17: Mehanizem katalitične aktivnosti DMAP in piridina

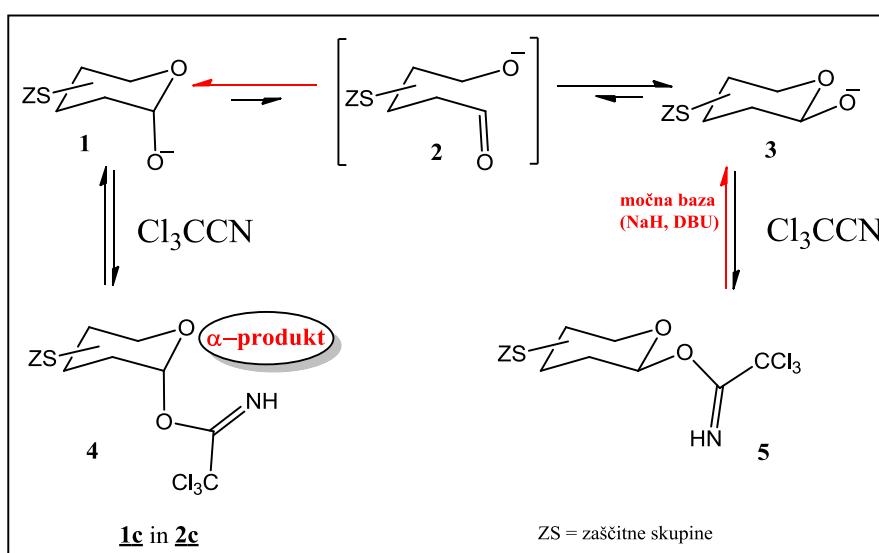
Piridin in DMAP imata katalitično aktivnost (Slika 17). Piridin sodeluje tudi kot topilo. Kot produkt smo dobili zmes  $\alpha$  in  $\beta$  produktov, lahko pa bi reakcijo izvedli stereoselektivno. Uporaba NaOAc kot šibke baze raztopljene v  $Ac_2O$  vodi preko kinetičnega anomernega efekta do  $\beta$  produkta, med tem ko uporaba močne Lewisove kisline kot je  $ZnCl_2$ , vodi v nastanek termodinamsko vodenega  $\alpha$  produkta. Da bi se izognili toksičnosti DMAP, lahko kot alternativno sintezo uporabimo acetilacijo z jodom kot katalizatorjem ( $Ac_2O/I_2$ ) (1, 3).

#### 5.1.2. Selektivna deacetilacija anomernega centra:

Anomerni estri so manj stabilni kot ostali, zato jih lahko selektivno odstranimo s šibko bazo. Prav tako bi lahko za deacetilacijo uporabili encime: in sicer lipaze, kot je npr. prašičja pankreatična lipaza (2).

#### 5.1.3. Aktivacija anomerne $-OH$ skupine:

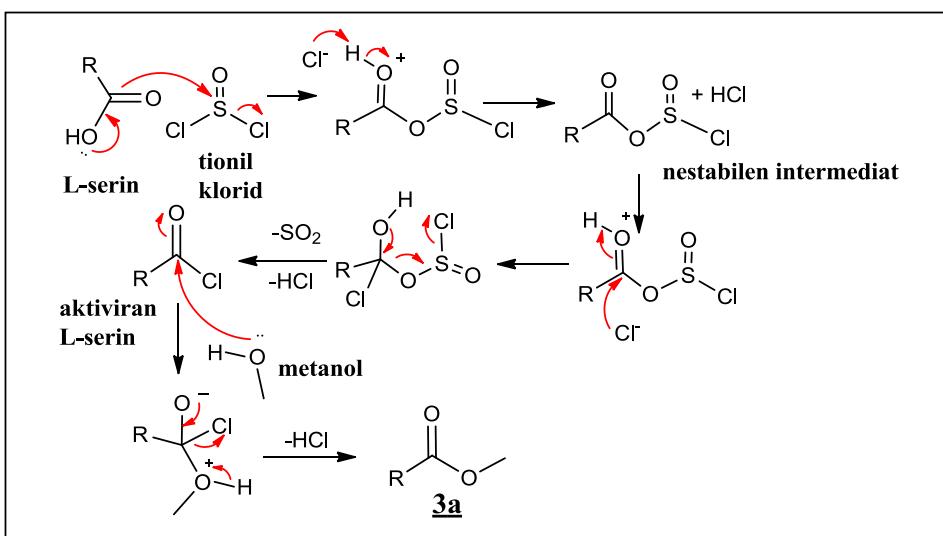
Od moči baze je odvisen nastanek  $\alpha$ - in  $\beta$ -anomera (Slika 18). Bazična kataliza povzroči mutarotacijo in nastane  $\alpha$ -anomer (1), odprt obroč sladkorja, alkoksid (prisoten v zelo malih količinah) (2) in  $\beta$ -anomer (3). Ekvatorialni  $\beta$ -anomer reagira hitreje od aksialnega  $\alpha$ -anomera zaradi manjše sterične oviranosti, zato je  $\beta$  produkt glavni produkt kinetično usmerjene reakcije. Zato ob dodatku šibke baze (npr.  $K_2CO_3$ ) nastane  $\beta$ -anomer. Mi smo dodali močno bazo (DBU) in tako je selektivno potekla reakcija do nastanka  $\alpha$  produkta, ki je glavni produkt termodinamsko usmerjene reakcije. Anomerni kisikov atom je nukleofil, ki napade elektrofilni C-atom (nitrilni trikloroacetonitrila) (5).

**Slika 18:** Mehanizem po Schmidtu

#### 5.1.4. Zaščita $-\text{COOH}$ skupine serina:

Karboksilna skupina serina reagira s tionil kloridom v kislinski klorid, ki je zelo reaktivен (slika 19). Metanol ima pri tej reakciji vlogo topila in reagenta, saj kot nukleofil napade elektrofilno karbonilno mesto kislinskega klorida in tako nastane metilni ester L-serina (**3a**). Med reakcijo nastaneta plina  $\text{SO}_2$  in  $\text{HCl}$ , ki izhajata iz reakcijske zmesi.

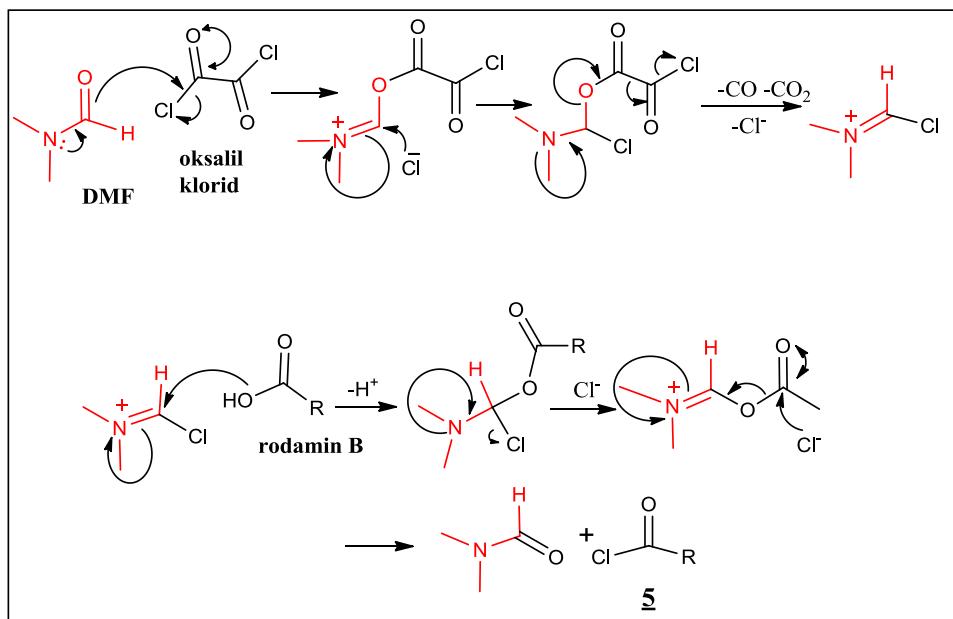
Reakcija je pri sobni temepraturi slabo potekala, zato smo reakcijski zmesi dodali še prebitek tionil klorida in reakcijsko zmes segreli. Z gretjem reakcijske zmesi smo tvegali nastanek stranskega produkta reakcije med hidroksilno skupino L-serina in tionil kloridom, zato smo reakcijsko zmes segreli le na  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  za 1,5 ure.



Slika 19: Mehanizem metilacije  $-\text{COOH}$  skupine L-serina

### 5.1.5. Sinteza kislinskega klorida (5):

Sinteza kislinskega klorida je potekla po naslednjem mehanizmu (Slika 20). DMF nastopa kot katalizator. Pri dodajanju oksalil klorida smo imeli bučko odprto, da so lahko iz bučke izhajali naslednji plini: CO,  $\text{CO}_2$  in HCl. Kislinski kloridi so na zraku neobstojne spojine, ki hitro hidrolizirajo, zato smo takoj po sintezi le-tega nadaljevali z naslednjo stopnjo reakcije in spojine **5** nismo okarakterizirali.



Slika 20: Mehanizem nastanka kislinskega klorida iz rodamina B in oksalil klorida preko DMF katalizatorja

### 5.1.6. Sinteza alkoholamidov rodamina B in 6G:

Spojini **4a** in **4b** smo sintetizirali iz rodamina 6G, ki ima kot funkcionalno skupino ester. Spojine **5a**, **5b** in **5c** smo sintetizirali iz spojine **5**, ki ima kot funkcionalno skupino kislinski klorid. Te reakcije so nukleofilne substitucije na  $sp^2$  hibridiziranem C-atomu (-CO-O- oz. -CO-Cl), ki je elektrofil. Kot nukleofil nastopa  $-NH_2$  skupina aminoalkohola.

### 5.1.7. Kemijska glikozilacija:

Glede na stereokemijo nastalih produktov **4a1**, **4a3** in **5a3** ( $\alpha$ -,  $\beta$ - in  $\beta$ -anomer) in estrskih zaščitnih skupin na mestu C-2, lahko sklepamo, da so navedeni produkti nastali po mehanizmu B, ki ga prikazuje slika 2.

Glavni produkt tega mehanizma je 1,2-*trans* glikozid, ki nastane iz aciloksonijevega intermediata, katerega nukleofil napade iz nasprotne strani (pri D-glukozi iz zgornje in pri D-manozi iz spodnje strani). Tako je 1,2-*trans* oblika pri D-manozi  $\alpha$ -anomer, pri D-glukozi pa  $\beta$ -anomer.

Stereokemija  $\alpha$ -trikloroacetimidatnega donorja ima verjetno manjši vpliv na stereokemijo produktov, saj bi v primeru tega vpliva nastal  $\beta$ -manozni (1,2 – *cis*) anomer.

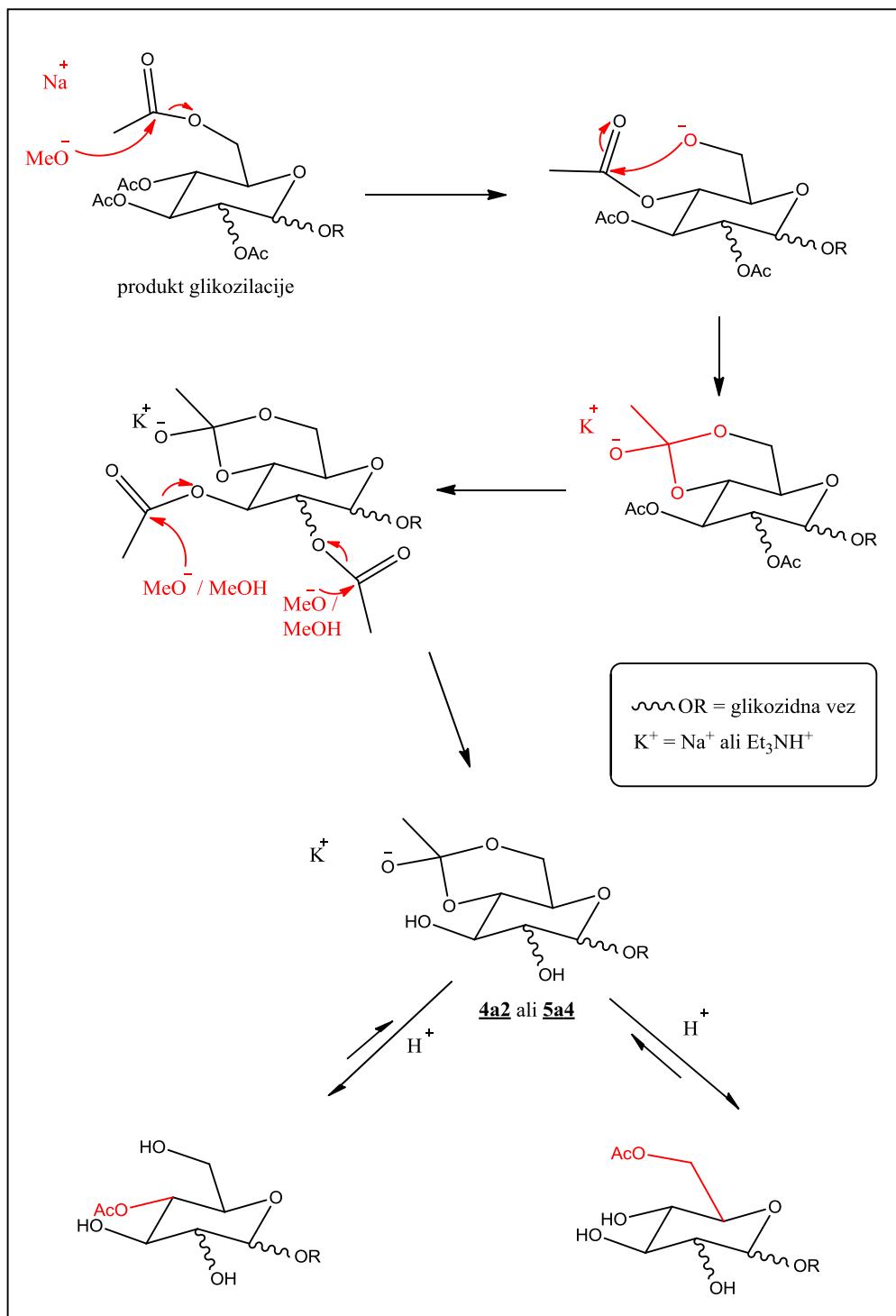
Ob zaključku smo potek reakcije prekinili z dodatkom  $Et_3N$  pri spojinah **4a1** in **4a3**, pri spojini **5a3** pa smo dodali vodno raztopino  $NaHCO_3$ . Z bazo smo deaktivirali kisli promotor.

Pri izolaciji glavnih produktov na kolonski kromatografiji smo mobilni fazi dodali  $Et_3N$  z namenom, da bi preprečili odstranitev zaščitnih skupin tekom izolacije, saj je silikagel rahlo kisel.

Za dodatek različnih baz smo se odločili, da bi ugotovili ali dodatek različne baze ob koncu reakcije vpliva na to, da bo kot produkt nastal ortoester ali ne. Spojine **4a1**, **4a3** in **5a3** niso ortoestri, zato lahko predvidevamo, da različni vrsti baze nista bistvenega pomena za nastanek ortoestra.

### 5.1.8. Odstranitev acetilne zaščite in nastanek orto-kisline:

Spojinam **4a1**, **4a3** in **5a3** smo odstranili acetilne zaščite in dobili produkte **4a2**, **4a4** in **5a4**. Ta metoda je znana pod imenom Zemplenova metoda de-O-acilacije, kjer dodamo NaOMe kot katalizator in brezvodni metanol kot topilo in reagent (24).



**Slika 21:** Zemplenova metoda odstranitve acetilne zaščite in nastanek soli orto-kisline (23)

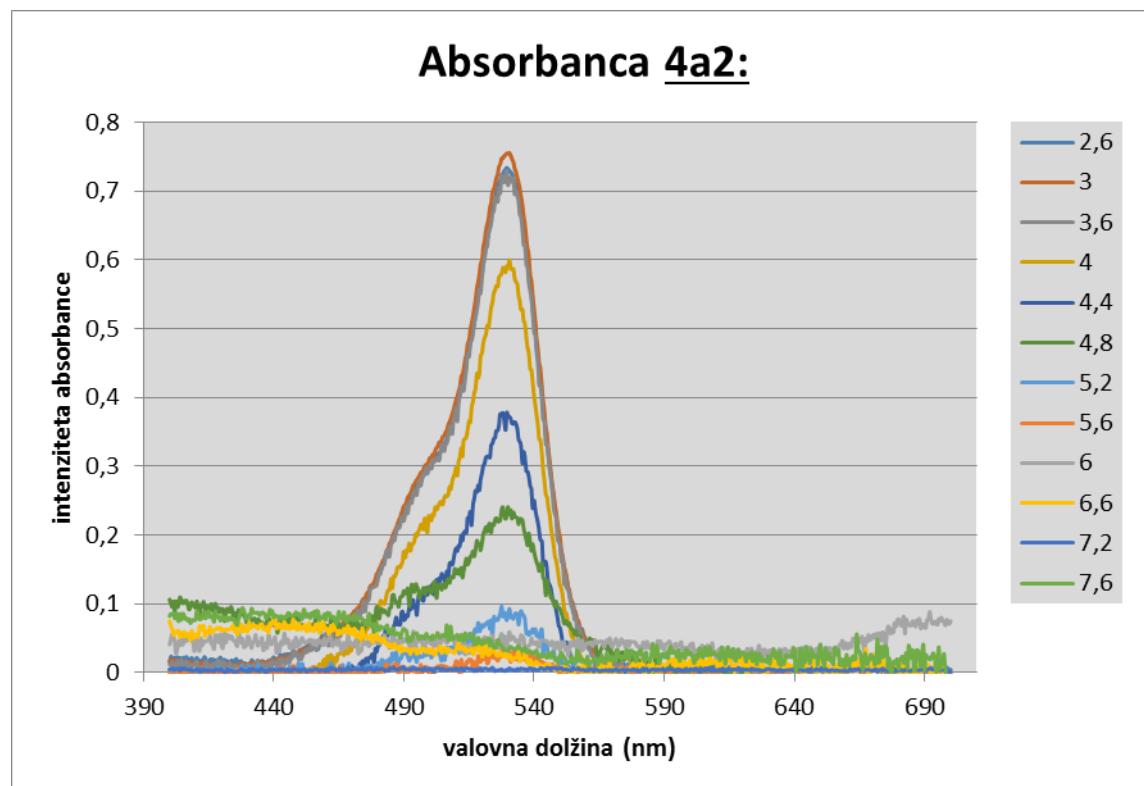
Po odstranitvi acetilne zaščite nastaneta pri spojinah **4a2** in **5a4** na mestih 4,6 soli orto-kisline. Mehanizem je predstavljen na sliki 21. Tako po Zemplenovi reakciji je protion orto-kisline natrijev ion, po izolacije surovega produkta na kolonski kromatografiji, kjer smo uporabili v mobilni fazi tudi Et<sub>3</sub>N, pa je protion trietilamonijev kation.

## 5.2. ABSORPCIJSKA IN FLUORESCENTNA SPEKTRA SPOJIN 4a2 in 5c:

### 5.2.1. Absorpcijska spektra:

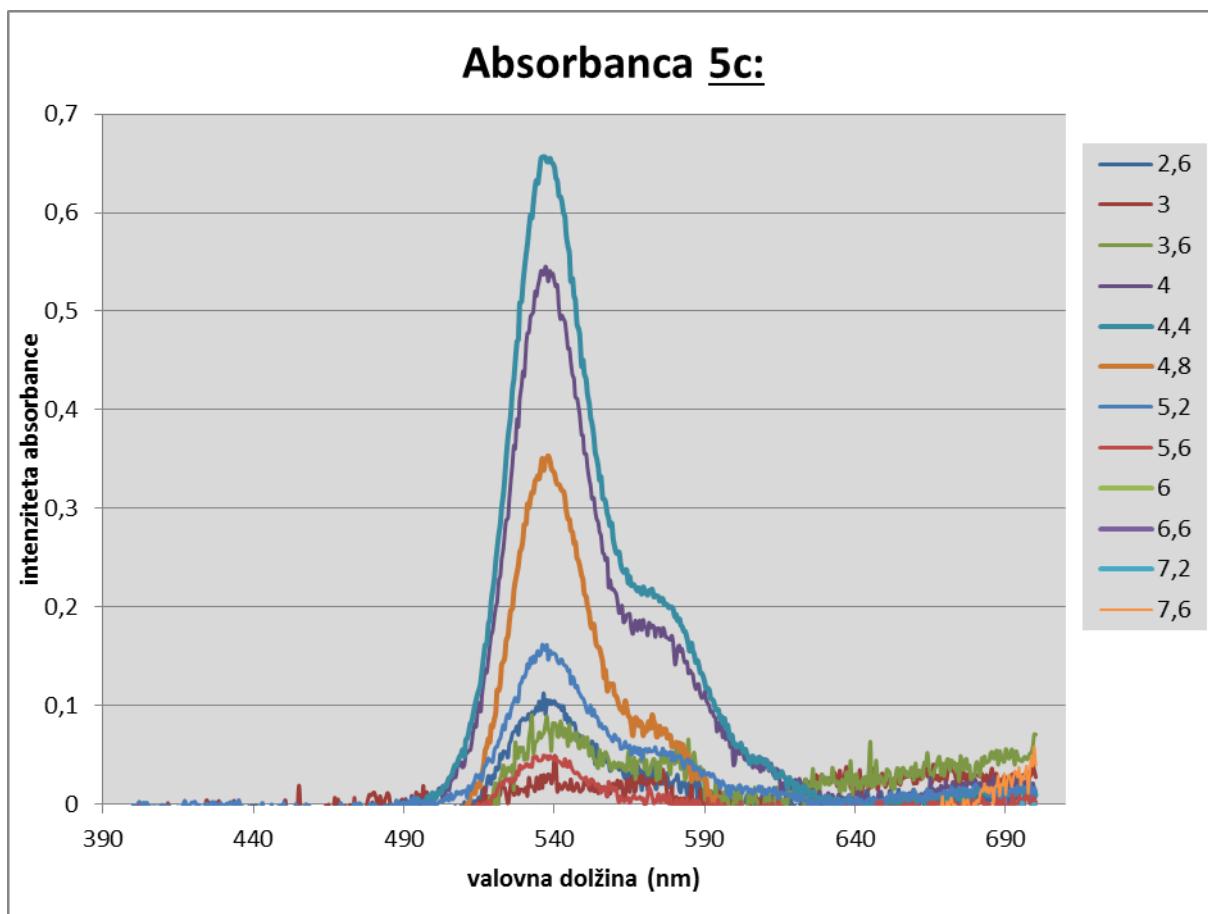
Oba absorpcijska spektra prikazujeta odvisnost absorbance od pH vrednosti medija. Na x-osi je definirana valovna dolžina v nm na y-osi pa izmerjena vrednost absorbance pri različnih pH vrednostih. Absorbance smo merili raztopinam s koncentracijo  $10^{-5}$  M.

*Absorpcijski spekter spojine 4a2:*



**Graf 1:** Absorpcijski spekter  $10^{-5}$  M raztopine spojine 4a2 pri različnih pH vrednostih.

Spojina 4a2 ima glede na rezultate najvišjo vrednost absorbance pri pH 3,0 in valovni dolžini 529,1 nm. Raztopina s pH 3,0 je bila tudi najbolj obarvana (rožnata).

**Absorpcijski spekter spojine 5c:**

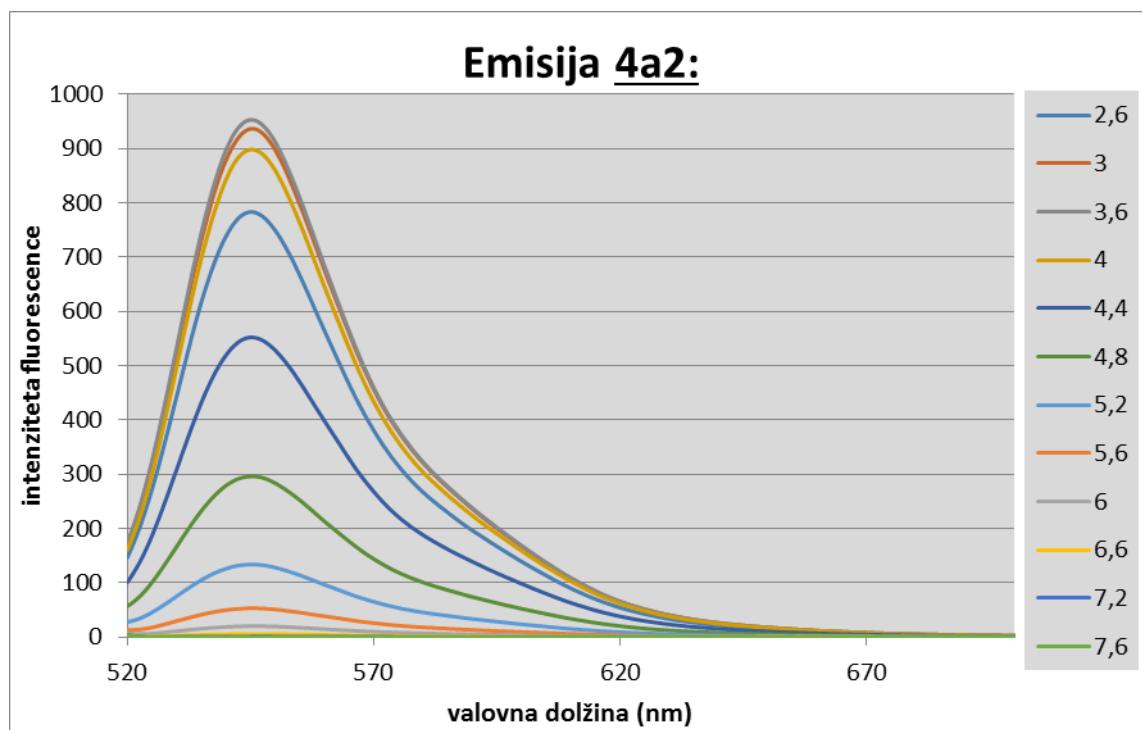
**Graf 2:** Absorpcijski spekter  $10^{-5}$  M raztopine spojine 5c pri različnih pH vrednostih.

Spojina 5c ima glede na rezultate najvišjo vrednost absorbance pri pH 4,4 in valovni dolžini 536,4 nm. Raztopina s pH 4,4 je bila tudi najbolj obarvana (rožnata).

### 5.2.2. Fluorescentna spektroskopija:

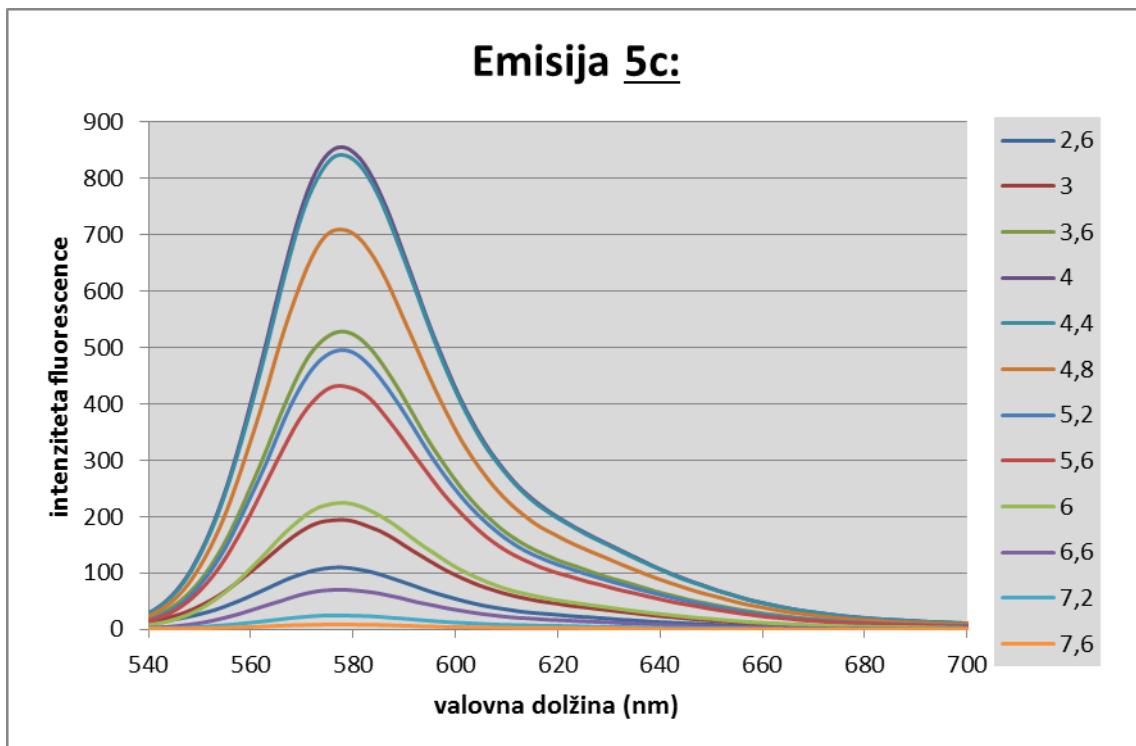
Emisijske spektre smo posneli raztopinam s koncentracijo  $10^{-7}$  M. Ker so bile raztopine zelo razredčene, se je obarvanost planarne konjugirane oblike s prostim očesom slabo videla (nežno rožnata). Oba emisijska spektra kažeta odvisnost jakosti fluorescence od pH vrednosti.

#### *Fluorescenčni spekter spojine 4a2:*



**Graf 3:** Emisijski spekter raztopine spojine 4a2 s koncentracijo  $10^{-7}$  M pri različnih pH vrednostih in ekscitaciji pri 510 nm.

Največja vrednost fluorescence je pri pH vrednosti 3,6 in valovni dolžini 545 nm. Pri vseh ostalih vrednostih pH pa so največje vrednosti fluorescence pri valovnih dolžinah  $\lambda_{\max} = 545 \pm 0,5$  nm.

***Fluorescenčni spekter spojine 5c:***

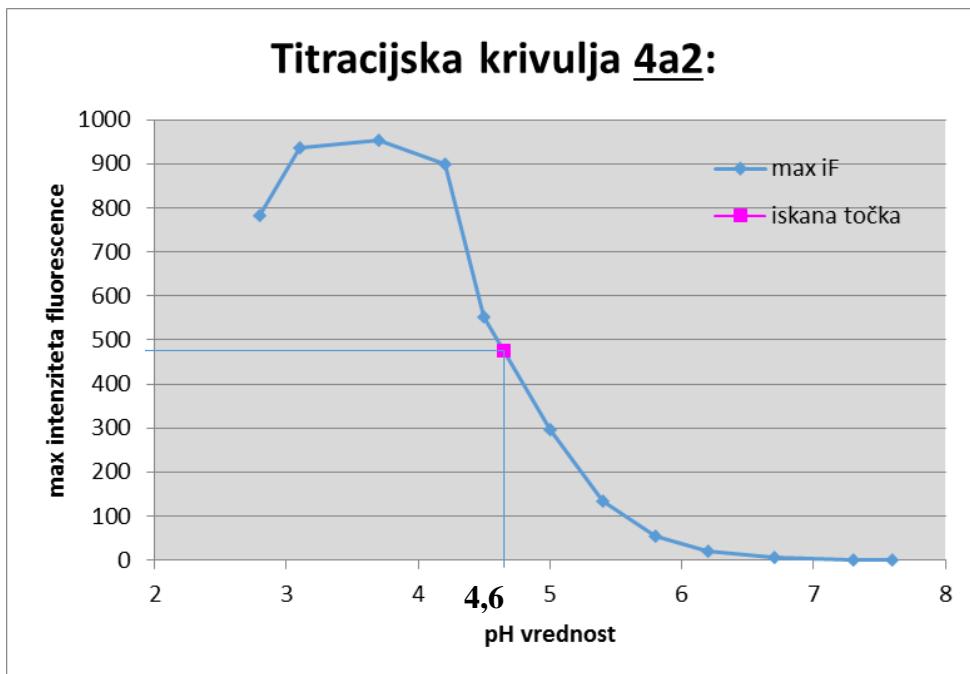
**Graf 4:** Emisijski spekter raztopine spojine 5c s koncentracijo  $10^{-7} M$  pri različnih pH vrednostih in ekscitaciji pri 517 nm.

Največja jakost fluorescence je pri pH vrednosti 4,0 in valovni dolžini 578 nm. Največja vrednost fluorescence pri vseh ostalih pH vrednostih je pri valovnih dolžinah  $\lambda_{\max} = 578 \pm 1$  nm.

### 5.3. TITRACIJSKI KRIVULJI:

Titracijski krivulji prikazujeta intenziteto fluorescence v odvisnosti od pH vrednosti. Na x osi je definirana vrednost pH raztopin, na y osi pa maksimalna vrednost fluorescence za posamezno pH vrednost. Določili smo približno vrednost konstante pKa za spojini **4a2** in **5c**. pKa je točka na grafu, ki predstavlja polovično vrednost med zgornjim in spodnjim platojem na grafu. Vrednost tako dobljene pKa je najbolj relevantna, kadar pustimo, da se vzpostavi ravnotežje med spirociklično in konjugirano obliko, kar je v našem primeru pomenilo, da smo pustili raztopine spojin stati pri sobni temperaturi v temi čez noč. Na grafu smo kot vrednosti pH vzeli izmerjene pH vrednosti raztopin spojin **4a2** in **5c** s koncentracijo  $10^{-7}$  M (Tabela 7).

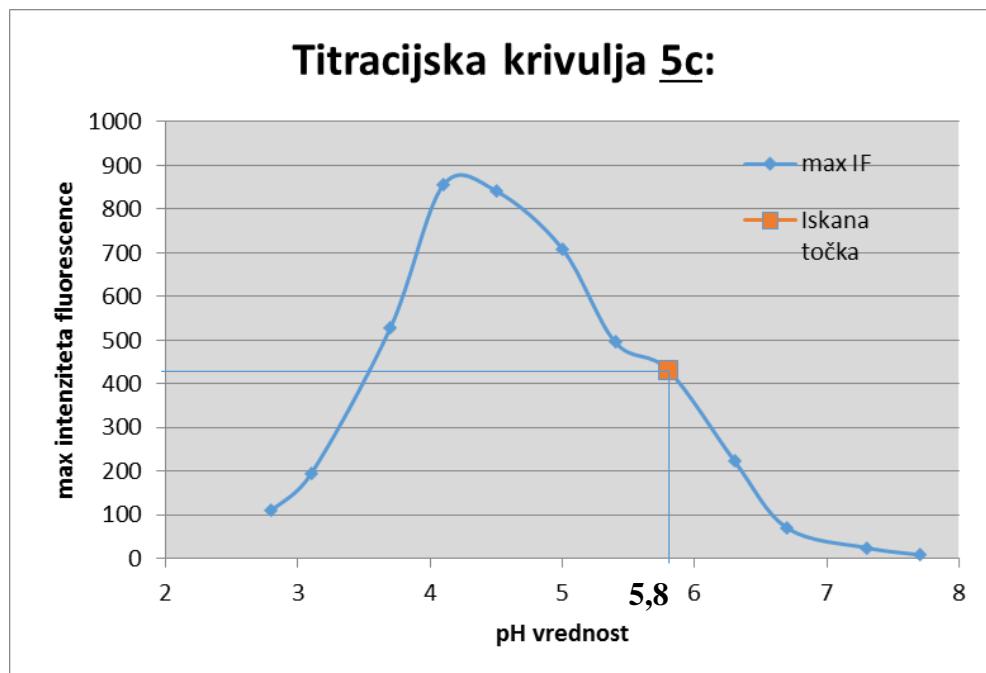
#### 5.3.1. Titracijska krivulja spojine **4a2**:



**Graf 5:** Titracijska krivulja  $10^{-7}$  M raztopine spojine **4a2**, skupaj z iskanotočko, ki označuje okvirno vrednost pKa. max iF = maksimalna intenziteta fluorescence

Ocenjena vrednost pKa za spojino **4a2** je 4,6. Maksimalno fluorescenco ima pri pH vrednosti 3,6. Izrazit preskok v obarvanosti smo opazili pri prehodu iz vrednosti pH 3,6-5,2.

### 5.3.2. Titracijska krivulja spojine 5c:



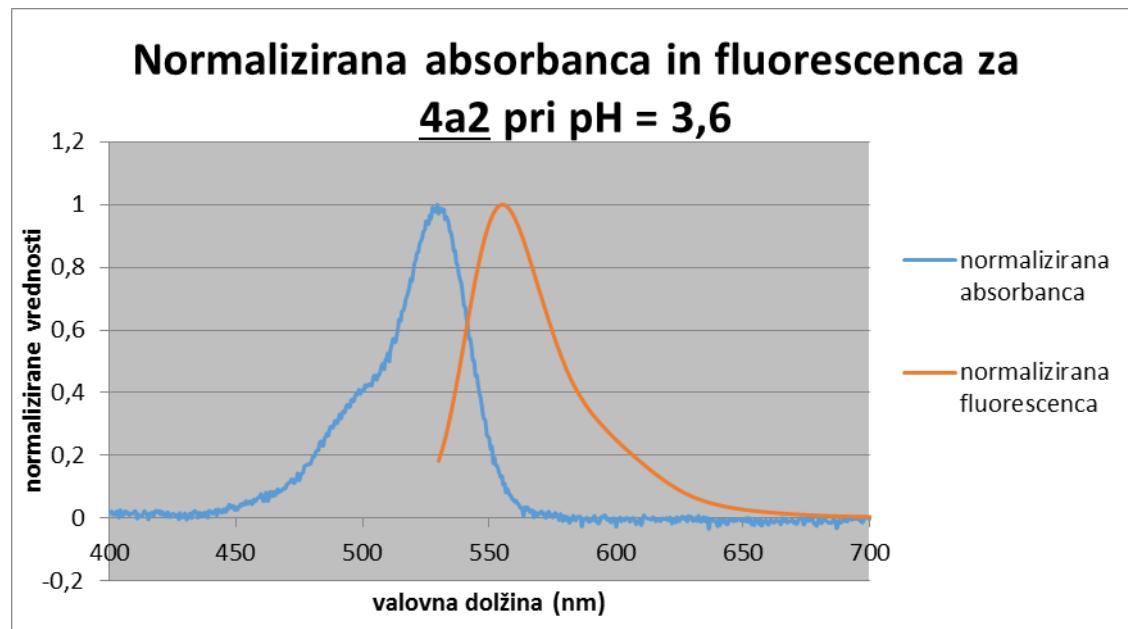
**Graf 6:** Titracijska krivulja  $10^{-7} M$  raztopine spojine 5c skupaj z iskano točko, ki označuje okvirno vrednost  $pK_a$ .  $\text{max IF}$  = maksimalna intenziteta fluorescence

Ocenjena vrednost  $pK_a$  za spojino 5c je 5,8. Maksimalno fluorescenco ima pri pH vrednosti 4,4. Izrazit preskok v obarvanosti smo opazili pri prehodu z vrednosti pH 4,2 na 6,0.

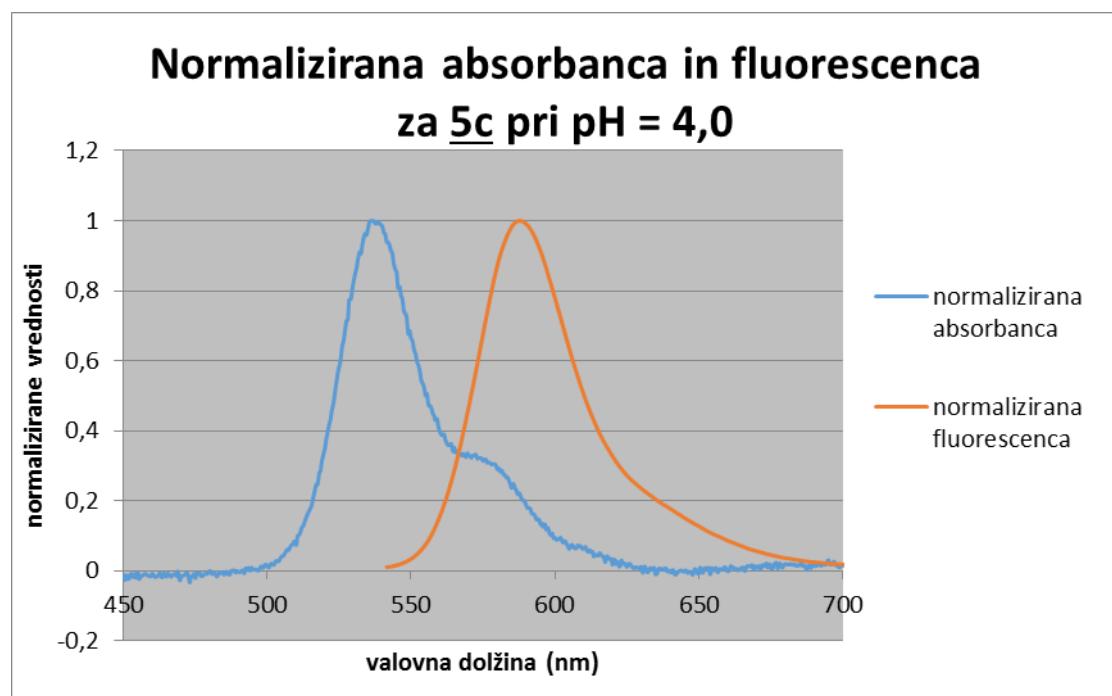
V kislem območju pH vrednosti intenziteta fluorescence pada, ker prevladuje dikationska oblika molekule. Triciklični sistem molekule pri dikationski obliki ni konjugiran oz. planaren, zato fluorescencija ni mogoča (Slika 7).

### 5.4. NORMALIZIRANE VREDNOSTI ABSORBANCE IN FLUORESCENCE SPOJIN 4a2 in 5c:

Normalizirali smo rezultate meritev absorbance in fluorescence pri tisti vrednosti pH, pri kateri je bila dosežena maksimalna fluorescencija. Spektri emitirane svetlobe so pomaknjeni k daljšim valovnim dolžinam (Stokes-ov premik).



**Graf 7:** Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence spojine 4a2 pri vrednosti pH 3,6. Ocenjen Stokes-ov premik je 25 nm.



**Graf 8:** Normalizirane vrednosti absorbance in fluorescence spojine 5c pri vrednosti pH 4,0. Ocenjen Stokes-ov premik je 50 nm.

**6. SKLEPI:**

- Spojina **4a1** je  $\alpha$ -produkt, spojini **4a3** in **5a3** pa sta  $\beta$ -produkta.
- Produkta **4a2** in **5a4** sta orto-kislini v obliki natrijeve oz. trietilamonijeve soli.
- Spojine **4a1**, **4a3** in **5a3** so nastale po mehanizmu B, ki ga prikazuje slika 2, zaradi prisotnosti estrskih zaščitnih skupin, posebno na mestu C-2.
- Stereokemija  $\alpha$ -trikloroacetimidatnega donorja ne vpliva na stereokemijo produktov **4a1**, **4a3** in **5a3**.
- Različni vrsti baze ( $\text{Et}_3\text{N}$  ali  $\text{NaHCO}_3$ ) za prekinitev reakcije glikozilacije nista bistvenega pomena za nastanek ortoestra.
- Spojini **4a2** in **5c** v odvisnosti od pH spreminjata strukturi iz spirociklične oblike v planarno in večji kot je delež planarne oblike, večja je intenziteta fluorescence.
- Grafično določeni vrednosti  $\text{pKa}$  iz titracijskih krivulj za spojini **4a2** in **5c** sta 4,6 in 5,8.
- Največja intenziteta fluorescence za spojino **4a2** je pri pH vrednosti 3,6 in za spojino **5c** pri pH vrednosti 4,4.
- Izrazit preskok v obarvanosti pri spojini **4a2** je pri pH vrednosti med 3,6 in 5,2 in pri spojini **5c** pri pH vrednosti med 4,2 in 6,0.
- Spojini **4a2** in **5c** sta glede na okvirne vrednosti  $\text{pKa}$  primerni za označevanje lizosomov, katerih okolje ima pH vrednosti med 4,5 in 6.
- Spojina **4a2** ima Stokes-ov premik 25 nm, spojina **5c** pa 50 nm.

**7. LITERATURA:**

1. Miljković M: Carbohydrates Syntesis, Mechanisms, and Stereoelectronic Effects, Springer, New York, 2009: 379-84
2. Levy D E, Fügedi P: The Organic Chemistry of Sugars, CRC Taylor & Francis Group, New York, 2006: 116-45
3. Lindhorst T K: Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, 2nd edition, WILEY-VCH, Weinheim, 2003: 115-39
4. Collins P, Ferrier R: Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products, Wiley, England, 1995: 151-89
5. Osborn HMI: Carbohydrates, Academic Press, UK, 2003: 115-30
6. Sorrells JL, Menger FM: Hydrogen-Bond-Induced Hysteresis in the Compression/Relaxation of Monolayer Films (supporting info); J. Am. Chem. Soc., 130 (31), 2008: pp 10073–10072 (S13)
7. Demchenko A: Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance; WILEY-VCH; Weinheim; 2008: 21-1
8. Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer, Singapore, 2006: 70-1
9. Johnson I, Spence MTZ: The Molecular Probes® Handbook; A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies; 11th edition; Life Technologies Corporation; USA; 2010: 78-3
10. Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cocca J, Mateo C, Moro P, Terreni M, Fernandez-Lafuenteb R, Guisanb JM: Regio-selective deprotection of peracetylated sugars via lipase hydrolysis; Tetrahedron; 2003: 59 5711–5705
11. Hurlera J, Žakelj S, Mravljak J, Pajk S, Kristl A, Schubert R, Škalko-Basnet N: The effect of lipid composition and liposome size on the release properties of liposomes-in-hydrogel; International Journal of Pharmaceutics; vol 456; 2013: 57-49
12. Yu B, Yang Z, Cao H: One-Pot Glycosylation (OPG) for the Chemical Synthesis of Oligosaccharides; Current Organic Chemistry; vol 9; 2005: 194-179
13. Wang DZ, Mo Y, Chiou CL, Liu M: A Simple Preparation of 2,3,4,6-Tetra-O-acyl-Gluco-, Galacto and Mannopyranoses and Relevant Theoretical Study; molecules; vol 15; 2010: 384-374

14. Zhang W, Tang B, Liu X, Liu Y, Xu K, Ma J, Tong L, Yang G: A highly sensitive acidic pH fluorescent probe and its application to HepG2 cells; *Analyst*; 2008: 371-367
15. Wang J, Yang Q, Song H, Zhang W: A fluorescent probe of N'-formyl-rhodamine B hydrazide: structure and spectral properties of protonation behaviour; *Organic & Biomolecular Chemistry*; 2012: 10, 7680-7677
16. Persson G, Sandén T, Sandberg A, Widengren J: Fluorescence cross-correlation spectroscopy of a pH-sensitive ratiometric dye for molecular proton exchange studies; *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2009: 11, 4418-4410
17. Han J, Burgess K: Fluorescent Indicators for Intracellular pH; *Chem. Rev.*; 2010: 110, 2728–2709
18. Yapici NB, Jockusch S, Moscatelli A, Mandalapu SR, Itagaki Y, Bates DK, Wiseman S, Gibson KM, Turro NJ, Bi L: New Rhodamine Nitroxide Based Fluorescent Probes for Intracellular Hydroxyl Radical Identification in Living Cells; *Org. Lett.*, 2012: 14 (1), pp 53–50
19. Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M, Nagano T, Watanabe T, Hasegawa A, Choyke PL, Kobayashi H: Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes; *Nature Medicine*; 2008: 15, 109 – 104
20. Šardzik R, Noble GT, Weissenborn MJ, Martin A, Webb S, Flitsch SL: Preparation of aminoethyl glycosides for glycoconjugation (Supporting Information); *Beilstein J. Org. Chem.*, 2010: 6, 703-699
21. Wendeln C; Heile A, Arlinghaus HF, Ravoo BJ: Carbohydrate Microarrays by Microcontact Printing (Supporting Information); *Langmuir*; 2010: 26(7), 4940–4933
22. Çarçabal P, Hünig I, Gamblin D P, Liu B, Jockusch RA, Kroemer RT, Snoek LC, Fairbanks AJ, Davis BG, Simons JP: Building Up Key Segments of N -Glycans in the Gas Phase: Intrinsic Structural Preferences of the  $\alpha(1,3)$  and  $\alpha(1,6)$  Dimannosides; American Chemical Society, 2006: 128 , 1976-1981; (Supporting Information)
23. Bouchra M, Calinaud P, Gelas J: A new method of orthoesterification, under kinetic control, at non-anomeric positions. Application to the D-glucose and D-mannose series and selective hydrolysis of the corresponding orthoesters; *Elsevier Carbohydrate Research*; 1995: 237-227

24. Jarglis P, Göckel V, Lichtenthaler FW: A convenient access to the 1,5-anhydro forms of D-tagatose, L-rhamnulose and D-xylulose via 2-hydroxyglycal esters; Tetrahedron: Asymmetry; vol 20; 2009: 960–952
25. Sigma Aldrich-ova receptura za pufre dostopna na spodnji spletni strani dne 6.6.2014:  
<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/core-bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html#citric>