



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2019 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Forsøk på å syntetisere monogalaktosyldiacylglyseroler**

Attempt to synthesize monogalactosyl diacyl  
glycerols

**Tone Haga Dalberg**

Lektorutdanning i realfag

## Forord

Arbeidet med denne oppgaven har blitt utført ved kjemiavdelingen på fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), Ås.

Takk til min hovedveileder Professor Yngve Stenstrøm, biveileder Dr. Simen Antonsen og Dr. Jens M. J. Nolsøe for støtte og god veiledning. Jeg setter stor pris på all hjelpen jeg har fått. Jeg vil også takke stipendiat Lena O. Foseid for å få være en del av dette prosjektet.

En stor takk går også til de andre masterstudentene i gruppa for faglige innspill og sosialt samvær. En ekstra takk går til Dorentina Osmani for et godt samarbeid i dette prosjektet.

Tilslutt vil jeg takk familie og venner. Dere vet selv hvor mye dere har betydd for meg dette tøffe året. Bestemor, du er og vil alltid være dypt savnet og elsket.

Ås, mai, 2019

Tone Haga Dalberg

## Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å utvikle en syntesemetode for monogalaktosyldiacylglyseroler. Galaktolipidet skulle brukt som en intern standard i en LC-MS undersøkelse av stortare, *Laminaria hyperborea*.

Det ble testet ut to hovedstrategier for å få danne glykosidbindingen i galaktolipidet. Den første gikk ut på å syntetisere et 1-monosubstituert glyserid som skulle reagere med galaktose. Her ble det testet to metoder for å syntetisere 1-monosubstituert glyserid.

Den første metoden startet med beskyttelse av allyl alkohol. Dette ble etterfulgt av at alken ble dihydroksilert, og forsøkt reagert med syrehalid. Denne reaksjonen var ikke vellykket da esterbindingene mellom de to reaktantene ikke ble dannet. Dette ble lagt på is på grunn av forsinket leveranse av nye kjemikalier.

I den andre metoden ble det også testet ut å syntetisere 1-monosubstituert glyserid ut i fra L-serin igjennom en fem trinns syntese. Det var store opprensingsproblemer av de polare forbindelsene.

I den første hovedstrategien ble det også testet ut to metoder for aktivering av glukose før dannelse av glykosidbindingen. I den ene metoden ble acetyl brukt som en midlertidig beskyttelsesgruppe og i den andre metoden ble benzyl eter brukt som en permanent beskyttelsesgruppe.

Den andre hovedstrategien ble det testet ut å reagere allyl alkohol direkte inn i galaktose. En metode der det ikke ble brukt beskyttelsesgrupper forsøkt. Parallelt med dette ble det også undersøkt om beskyttelsesgrupper var nødvendig for å komme frem til målmolekylene. På grunn av mangel på kjemikaler og utstyr har ikke denne strategien blitt jobbet mye med.

## Abstract

The goal of this thesis was to develop a synthesis method for monogalactosyl diacyl glycerol. The galactolipid was to be used as an internal standard in an LC-MS study of *Laminaria hyperborea*.

Two main strategies were tested to form the glycosidic bond in the galactolipid. The first was to synthesize a 1-monosubstituted glyceride that would react with galactose. Two methods were tested to synthesize 1-monosubstituted glyceride.

The first method started with the protection of allyl alcohol. This was followed by the alkene being dihydroxylated and attempted to react with acyl halide. This reaction was not successful as the ester linkages between the two reactants were not formed. This has been put on ice due to delayed delivery of new chemicals.

In the second method, it was also tested to synthesize 1-monosubstituted glyceride from L-serine through a five-step synthesis. There were major clean-up problems of the polar compounds.

In the first main strategy, two methods were also tested to activate glucose before formation of the glycosidic bond. In one method, acetyl was used as a temporary protecting group and in the second method benzyl ether was used as a permanent protecting group.

The second major strategy was to test allyl alcohol directly into galactose. A method was attempted in which no protecting groups were used. Parallel to this we did some preliminary investigation to see if the target molecules could be obtained with the use of protecting groups. Due to the lack of chemicals and equipment, this strategy has not been worked much with.

## Forkortelser

Ac	acetyl
Bn	benzyl
CSA	kamfersulfonsyre
ddt	dobbel dobbel tripplet
DGDG	digalaktosyldiacylglyseroler
DHP	dihydropyran
DMF	dimetylformaid
EPA	eikosapentaensyre
MGDG	monogalaktosyldiacylglyseroler
Pg	beskyttelsesgruppe
Pyr-Ts	Pyridinium p-toluensulfonat
R <sub>f</sub>	retensjonsfaktor
rt	romtemperatur
TDP	dihydropyran
THP	tetrahydropyran

## Generelle bemerkninger

Alle nummererte forbindelser er navngitt ved hjelp av «ChemDraw 18.0».



# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>IV</b>
<b>Generelle bemerkninger</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Introduksjon</b> .....	<b>3</b>
1.1 Målet med oppgaven.....	3
1.2 Makroalger .....	3
1.3 Naturstoffer .....	5
1.4 Karbohydrater .....	6
1.4.1 Galaktolipider .....	6
1.4.2 Karbohydratsyntese.....	6
1.5 Syntesestrategier.....	9
<b>2. Resultater og diskusjon</b> .....	<b>10</b>
2.1 Syntetisere fettsyredelen .....	10
2.1.1 Metode 1.....	10
2.1.2 Metode 2.....	12
2.2 Forberedelse av sakkaridet til dannelse av glykosidbindingen.....	13
2.2.1 Metode 1.....	13
2.2.2 Metode 2.....	14
2.2.3 Metode 3.....	16
<b>3. Konklusjon</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Eksperimentelt</b> .....	<b>19</b>
4.1 Generelt .....	19
4.2 Syntese av fettsyren.....	20
4.2.1 Metode 1.....	20
4.2.1.1 Syntese av 2-(allyloksy)tetrahydro-2H-pyran (3).....	20



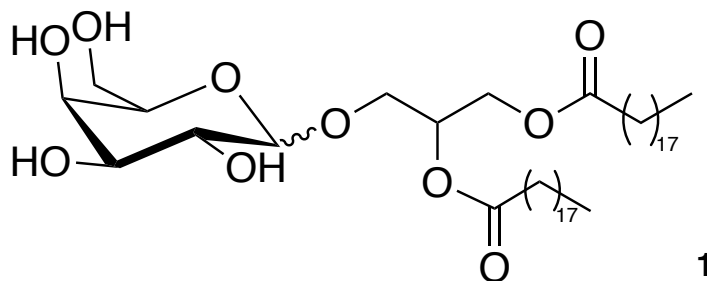
4.2.1.2 Syntese av 3-((tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oksy)propane-1,2-diol ( <b>4</b> ) .....	22
4.2.1.3 Syntese av nonadekanoylchlorid ( <b>6</b> ).....	24
4.2.1.4 Syntese av 3-hydroksypropan-1,2-diyl bisnonadekanat ( <b>2</b> ) .....	26
4.2.2 Metode 2.....	27
4.2.2.1 Syntese av metyl ( <i>S</i> )-2,3-dihydroksypropanat ( <b>9</b> ).....	27
<b>4.3 Forberedning av sakkariidet til dannelse av glykosidbindingen</b> .....	<b>28</b>
4.3.1 Metode 1.....	28
4.3.1.1 Syntese av (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>R</i> )-2-(allyloksy)-6-(hydroksymetyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol ( <b>12</b> )	28
4.3.2 Metode 2.....	29
4.3.2.1 Syntese av (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-6-(acetoxymetyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetat ( <b>13</b> )	29
4.3.2.2 Syntese av (2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2-(acetoxymetyl)-6-(fenyltio)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triyl triacetat ( <b>14</b> ).....	31
4.3.2.3 Syntese av (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2-(hydroksymetyl)-6-(fenyltio)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-3,4,5-triol ( <b>15</b> )	33
4.3.3 Metode 3.....	35
4.3.3.1 Syntese av (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-2,3,4,5-tetrakis(benzyloksy)-6-((benzyloksy)metyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran ( <b>16</b> ) .....	35
4.3.3.2 Syntese av (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i> )-3,4,5-tris(benzyloksy)-6-((benzyloksy)methyl)tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-ol ( <b>17</b> ) .....	37
<b>5. Referanser</b> .....	<b>39</b>

# 1. Introduksjon

## 1.1 Målet med oppgaven

Denne oppgaven er en del av et prosjekt i gruppa til Dag Ekeberg ved kjemiavdelingen på fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Prosjektet går ut på å lage en fettsyre profil at stortare, *Laminaria hyperborea*. I dette arbeidet har det blitt identifisert 186 MGDG og 166 DGDG i bladet til *L. hyperborea*. For å kvalitativt og kvantitativt bestemme galaktolipidene er det nødvendig med en analytisk referanse. Disse galaktolipidene er vanligvis ikke kommersielt tilgjengelig

Målet med denne oppgaven var har derfor vært å utvikle en syntesemetode for monogalaktosyldiacylglyseroler (MGDGer), for å komme videre med dette prosjektet. Det har blitt valgt å fokusere på syntese av MGDG med C19 som fettsyrer, 3-(((3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-3,4,5-trihydroksi-6-(hydroksimetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oksy)propan-1,2-diyl dinonadekanat (**1**)(se figur 1). Målmolekylet **1** skal deretter brukes som intern standard i en LC-MS analyse.



Figur 1 MGDG

## 1.2 Makroalger

Alger kan deles opp i mikroalger og makroalger. Mikroalger er encellede organismer, mens makroalger er flercellede organismer. Marine makroalger kan deles opp brunalger (*Phaeophyceae*), grønnalger (*Chlorophyt*) og rødalger (*Rhodophyta*). Tang og tare hører til i klassen brunalger.

Bruk av makroalger som medisin kan spores helt tilbake til Asia ca. 2700 f.Kr. I Europa har makroalger historisk sett blitt mest brukt i Irland, Storbritannia, Island og Norge. Irland har helt siden 1600 til dags dato brukt makroalger kommersielt. Gjødsel, kilde til jod, utvinne natriumkarbonat og pottaske til såpe er bare noen av bruksområdene de har brukt makroalger til.<sup>2</sup>

Makroalger blir også brukt som mat. De inneholder store mengder karbohydrater, samt mineraler og vitaminer. MacArtain *et al.*<sup>3</sup> har sett på næringsinnholdet i spiselige makroalger. De konkludert med at makroalger har et såpass høyt innhold av vitaminer og mineraler at de kan dekke det daglige behovet i et balansert kosthold. I Asia er allerede makroalger en del av kostholdet, men det er lite utbredt i vestlige samfunn.<sup>3</sup> Med den økende verdensbefolkningen er det nødvendig å utforske denne lite brukte ressursen i det vestlige samfunnet.

Makroalger kan vokse opp til 60 meter lange og danne store skoger i havet.<sup>2</sup> Tareskogen langs norskekysten består hovedsakelig av stortare *Laminaria hyperborea*. Utbredelsen av *L. hyperborea* strekker seg fra Portugal i sør, langs hele norskekysten og til Kolahalvøya i nord (figur 2).

Majoriteten av langs norskekysten blir *L. hyperborea* høstet fra Rogaland til Trøndelag.<sup>1</sup> Hvert år høstes det ca. 150 000 tonn *L. hyperborea*, >1% av den stående biomassen langs norskekysten. Sammen med grisetang, *Ascophyllum nodosum*, utgjør det en eksportverdi på ca. 1-1,5 milliarder per år.<sup>1</sup>

Norge bruker i dag blir *L. hyperborea* til å utvinne alginat og til dyrefôr. Potensielt sett kan denne biomassen brukes til blant annet brensel, forurensningsindikator for giftige materialer og opprensing av avløpsvann.<sup>1</sup> Det er også vist at enkelte monogalaktosyldiacylglyseroler viser en anti-tumor effekt.<sup>4</sup> For å finne ut hvordan vi kan bruke MGDG fra *L. hyperborea* til nye formål er det nødvendig å utvikle kvalitative- og kvantitative analyser for disse.

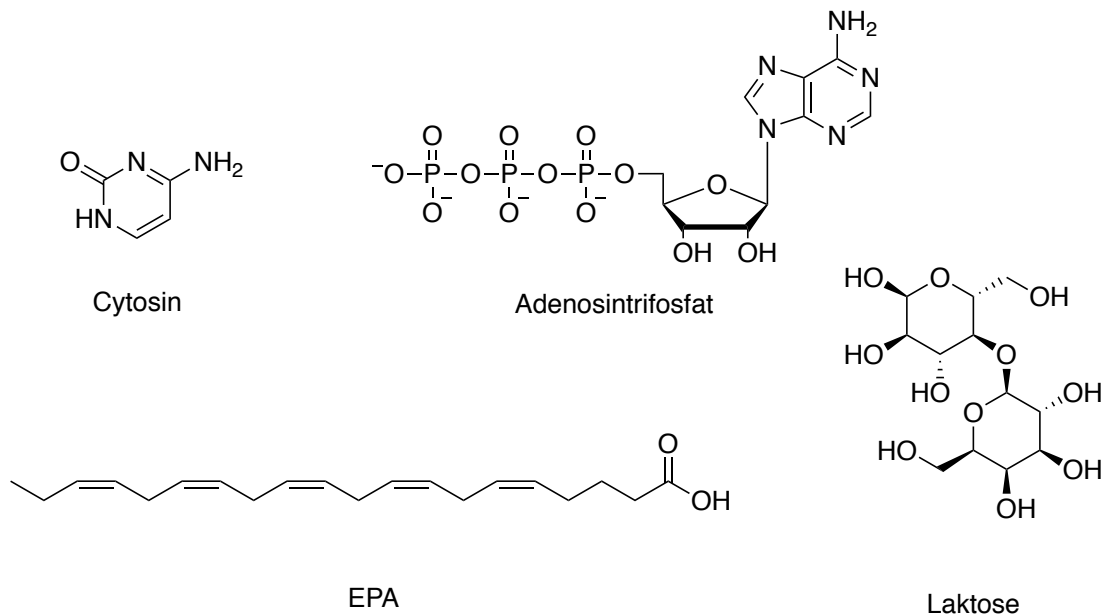


Figur 2 Utbredelsen av *L.hyperborea*.<sup>1</sup>

### 1.3 Naturstoffer

Naturstoffkjemi er studiene av kjemiske forbindelser som produseres av planter, dyr og andre levende organismer. Naturstoffkjemi kan deles inn i primære- og sekundære metabolitter.

Primær metabolitter omfatter de stoffene som finnes i nesten alle levende organismer og er direkte involvert i vekst, utvikling og reproduksjon. Dette omfatter blant annet lipider, proteiner, karbohydrater og aminosyrer. Sekundær metabolitter er ikke direkte involvert i vekst, utvikling og reproduksjon. De finnes heller ikke jevnt fordelt blant organismene, men er spesifikke for mindre grupper av arter eller celler.



Figur 3 Eksempler på primære og sekundære metabolitter.

Cytosin og adenosintrifosfat (figur 3) er eksempler på primære metabolitter. Cytosin finnes i alle levende organismer. Den har en viktig oppgave som en av de fire basene i DNA og RNA. Adenosintrifosfat er en annen primær metabolitt som er tilstede i alle levende organismer. I metabolismen har den som oppgave å frakte kjemisk energi i cellene. Laktose og EPA er sekundære metabolitter. Disakkaridet laktose finnes melk hos pattedyr. EPA er en polyumettet fettsyre som bl. a. finnes i fet fisk.

## 1.4 Karbohydrater

Karbohydrater er en av den største gruppen av naturstoffer. De har en rekke essensiell roller i naturen, som for eksempel produksjon og lagring av energi, signalmolekyler, metabolske mellomprodukt og som strukturelle komponenter.<sup>5</sup>

Karbohydrater deles inn i monosakkarider, oligosakkarider og polysakkarider. Sakkarider som er koblet til en annen kjemisk forbindelse kalles glykokonjugater. Når det anomere karbonet i et sakkarid er koblet til et lipid kalles det et glykolipid. Glykolipider finnes som en av komponentene i cellemembraner, men den fulle funksjonen av disse er ikke kjent.<sup>6</sup>

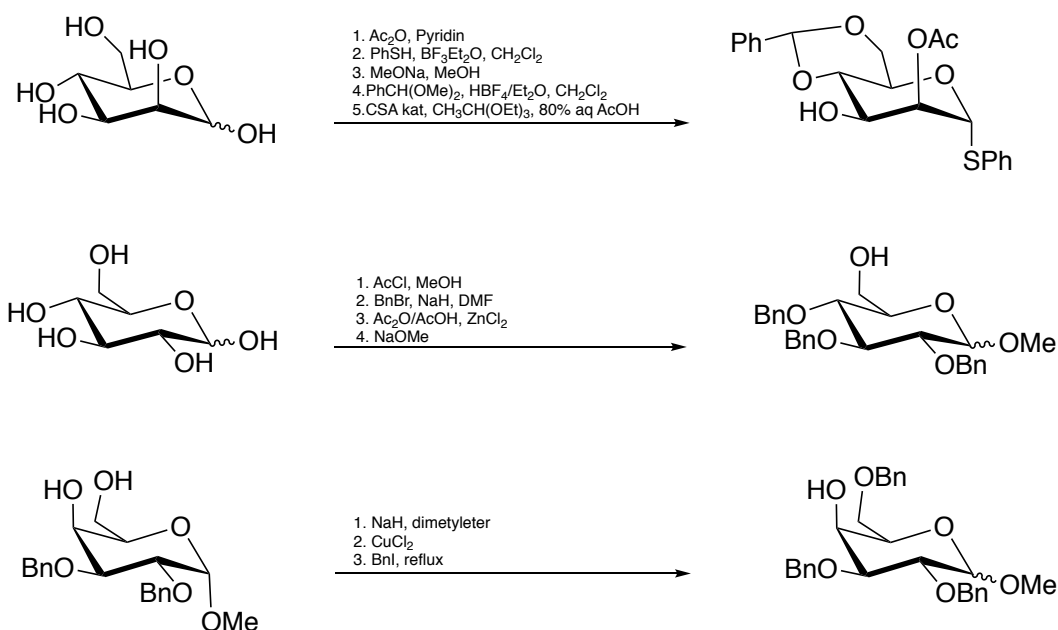
### 1.4.1 Galaktolipider

Galaktose er en av de vanligste aldoheksosene. Den finnes oftest i glykokonjugater og sjelden i fri form. I mennesker og planter forekommer galaktose vanligst bundet til et annet monosakkarid eller som en komponent i glykosider, som glykoproteiner og glykolipider.<sup>7-8</sup>

Galaktolipid er et glykolipid der sakkaridet består av en eller flere galaktose-enheter. Membranlipidene i planteblader består av ca. 75 % av galaktolipidene monogalaktosyldiacylglyseroler (MGDG) og digalaktosyldiacylglykerol (DGDG). Dette står i motsetningen til membranlipidene i dyr og bakterier der det mest forekommende membranlipidet er fosfolipider.<sup>9</sup> Dette kan komme av at MGDG og DGDG er de to største gruppene membranlipider i kloroplast.<sup>10</sup> På bakgrunn av den store delen galaktolipider i membranlipidene i kloroplast og på grunn av deres fravær i ikke-fotosynterende organsimer, har det blitt foreslått at galaktolipider har en direkte rolle i fotosyntesen.<sup>9</sup>

### 1.4.2 Karbohydratsyntese

På grunn av store forekomster av funksjonelle grupper i karbohydrater dreier karbohydratsyntese seg mye om kjemoselektivitet, altså kontroll på hvilke(n) funksjonell gruppe reaksjonene skal skje på. Dette kan gjøres ved å blokkere de gruppene man ikke ønsker reaksjonen på med beskyttelsesgrupper (skjema 1).<sup>11-12</sup>

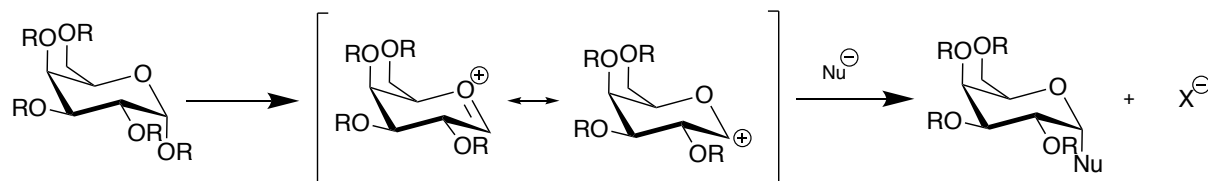


Skjema 1 Eksempler på ulike metoder for å beskytte sakkarider<sup>13-15</sup>

I valget av beskyttelsesgrupper er det flere krav en må ta hensyn til. Det er viktig at beskyttelsesgruppen er inert under de reaksjonsbetingelsene en skal bruke. Samtidig må den lett kunne fjernes på en måte som ikke påvirker resten av molekylet og helst kvantitativt.<sup>12</sup> I syntese av glykosidbinding er acetal, benzoyl og benzyl de vanligste beskyttelsesgruppene. Dette kommer av at de er rimelige og lett kan fjernes under basiske eller nøytrale forhold.<sup>11</sup> I valg av beskyttelsesgrupper må det også vurderes hvor lenge en ønsker de skal sitte på. Beskyttelsesgrupper kan deles inn i midlertidige og permanente beskyttelsesgrupper. Midlertidige beskyttelsesgrupper sitter kun på en eller noen trinn. Permanente beskyttelsesgrupper sitter på til siste syntesetrinn, der sakkaridet avbeskyttes.<sup>16</sup>

For alkoholer må beskyttelsesgruppen fjerne det sure hydrogenet i hydroksylgruppa. Dette kan gjøres ved å omdanne alkoholgruppen til f. eks. en ester, eter eller acetal. Eter er en attraktiv beskyttelsesgruppe for alkoholer da transformasjonen til eter gir et høyt utbytte og et relativt inert produkt. De er derimot ikke alltid like lette å avbeskytte. Acetaler er lettere å hydrolysere og innehar mye av den samme inerte karakteren. Den siste gruppen som egner seg som beskyttelsesgruppe for alkoholer er estere, men da flere reagenser kan reagere med acyl karbonet i esteren er den ikke alltid en like egnet beskyttelsesgruppe som etere og acetaler.<sup>17</sup>

Glykosidbindingen er en binding til acetal-gruppen i karbohydratet og er den kovalente bindingen som binder sakkariidet og en annen gruppe sammen. Glykosidbinding dannes når hydroksylgruppen på det anomere karbonet blir substituert med en nukleofilgruppe (skjema 2). For at denne substitusjonen skal finne sted må hydroksylgruppen først blitt substituert av en godt egnet utgående gruppe.<sup>18</sup>

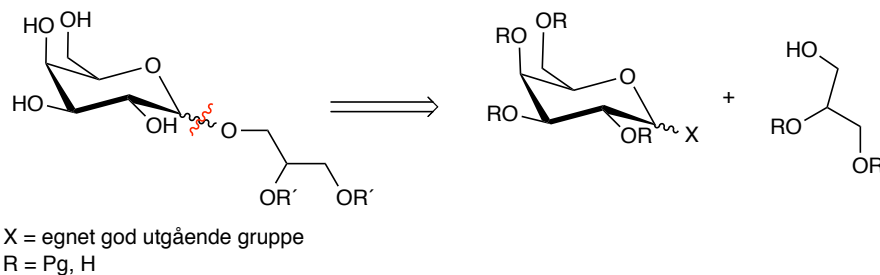


Nu = R-OH, R-NH<sub>2</sub>, R-SH, R-CH<sub>2</sub>-  
 X= utgående gruppe

Skjema 2 Dannelse av glykosidbinding<sup>18</sup>

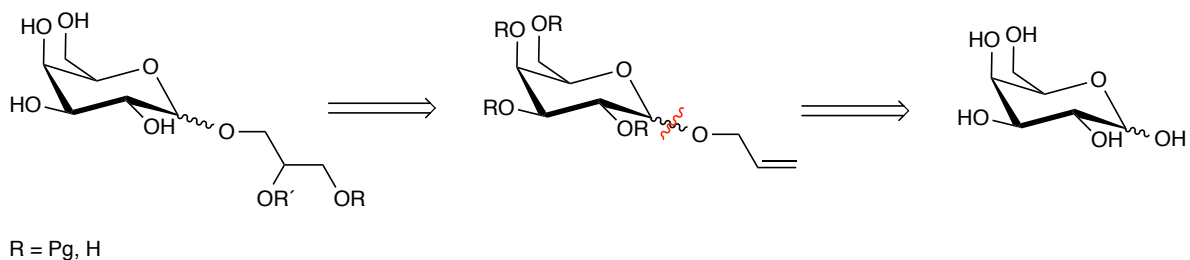
## 1.5 Syntesestrategier

Det ble prøvd med to hovedsyntesestrategier for å danne glykosidbindingen mellom fettsyredelen og galaktose. I syntesestrategi 1 (skjema 3) ble det testet ut ulike måter å syntetisere fettsyredelen før den skulle reagere med sakkariidet. Her har det blitt testet ut to ulike metoder for å syntetisere fettsyredelen. Det har også blitt testet ut to ulike metoder å forberede sakkariidet på dannelsen av glykosidbindingen, én med permanente beskyttelsesgrupper og én med midlertidige beskyttelsesgrupper.



Skjema 3 Syntesestrategi 1

I syntesestrategi 2 (skjema 4) ble det testet ut å reagere allylalkohol direkte med galaktose. Deretter skulle alkenet oksideres til en diol som kunne reagere med fettsyren. Her har det blitt testet ut en metode uten beskyttelsesgruppe på sakkariidet. Det ble planlagt en annen syntese med bruk av beskyttelsesgrupper. Den ble ikke gjennomført grunnet mangel på nødvendige kjemikaler.



Skjema 4 Syntesestrategi 2

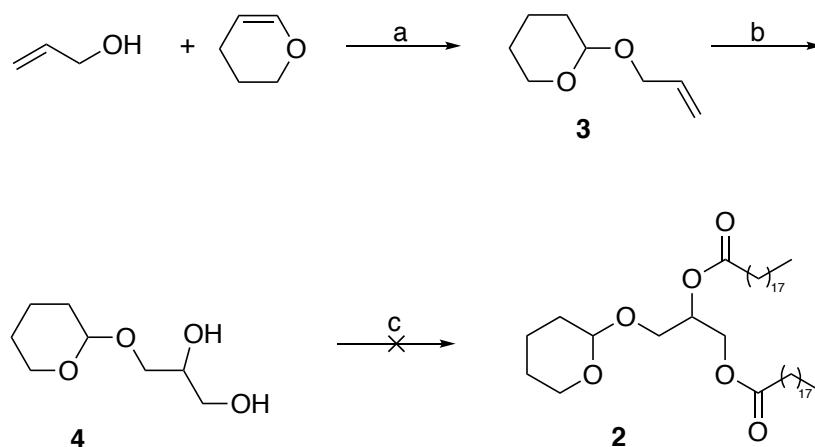


## 2. Resultater og diskusjon

### 2.1 Syntetisere fettsyredelen

#### 2.1.1 Metode 1

Målet var å lage 1-monosubstituert glyserid **2**. Å få til dette ved direkte reaksjon mellom sakkaridet og 1,2,3-propantriol er lite sannsynlig og vil i praksis gi blandinger som uansett vil være svært vanskelig å separere. I stedet startet vi med å beskytte allylalkohol med DHP. Dette ga et THP-derivatet **3**. (Se skjema 5). Deretter kan dobbeltbindingen oksideres til diolen **4**. Det finnes mange metoder for å konvertere en dobbeltbinding til diol. De fleste av disse gir kun rasemisk blanding<sup>19</sup>, men det finnes også enantioselektive metoder for dette f. eks. Sharpless' dihydroksyleringsmetode<sup>20</sup> dersom det skulle være ønskelig. Imidlertid skal målmolekylet være referanse ved LC-MS-undersøkelse av stortare, og det er i første omgang ikke nødvendig å se på enantiomerer av disse. Vi konsentrerte oss derfor om den rasemiske syntesen siden denne er enklere og billigere. En av de enkleste måtene å lage diolen på er å benytte  $\text{KMnO}_4$  for å oksidere alkenet.



Skjema 5 Reagenser og betingelser: (a) pyr-Ts, destillert ved 50 °C ved 14 torr; (b)  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KMnO}_4(\text{aq})$ ; (c) Nonadekanoylklorid,

Syntesen av THP-derivatet **3** (skjema 5, reaksjon a) startet derfor med en addisjonsreaksjon mellom allylalkohol og DHP basert på en prosedyre av Barry *et al.*<sup>21</sup>. Dette ga et utbytte på 25 %. Barry *et al.*<sup>21</sup> fikk i denne reaksjonen et utbytte på 78 %. Denne signifikante forskjellen på utbytte kommer trolig av mangel på erfaring. Koepunktet er rapportert til 165-167°C, som er nær det vi får (160-170°C).  $^1\text{H-NMR}$ -spekteret (figur 4) var i overensstemmelse med

litteraturen<sup>22</sup>. NMR-spekterene (figur 4-5) viste også tegn til forurensninger, som ikke er overraskende med tanke på at forbindelsen ble destillert over et stort temperaturområde.

Videre ble **3** oksidert av  $\text{KMnO}_4$  til diolen **4** (skjema 5, reaksjon b). Dette ga et utbytte på 9,2 %. I den samme reaksjonen oppnådde Barry *et al.*<sup>21</sup> et utbytte på 66,5 %. Hovedgrunnen til det lave utbytte er trolig mangel på erfaring. Spektrale data stemmer overens med litteraturen<sup>23</sup>.

Å reagere fettsyren direkte med diolen **4** etter Fischer's estersyntese, er lite effektiv. For at reaksjonen skulle kunne bli mer effektiv og helst gi nær kvantitative utbytter, ble fettsyren gjort om til det tilsvarende syrekloridet. Dette ble gjort ved å reagere nondekansyre (**5**) med tionylklorid. Reaksjonen skjer ved at tionylklorid reagerer med syregruppa for å gi en god utgående gruppe som spaltes av når kloridionet kommer inn som en nukleofil.

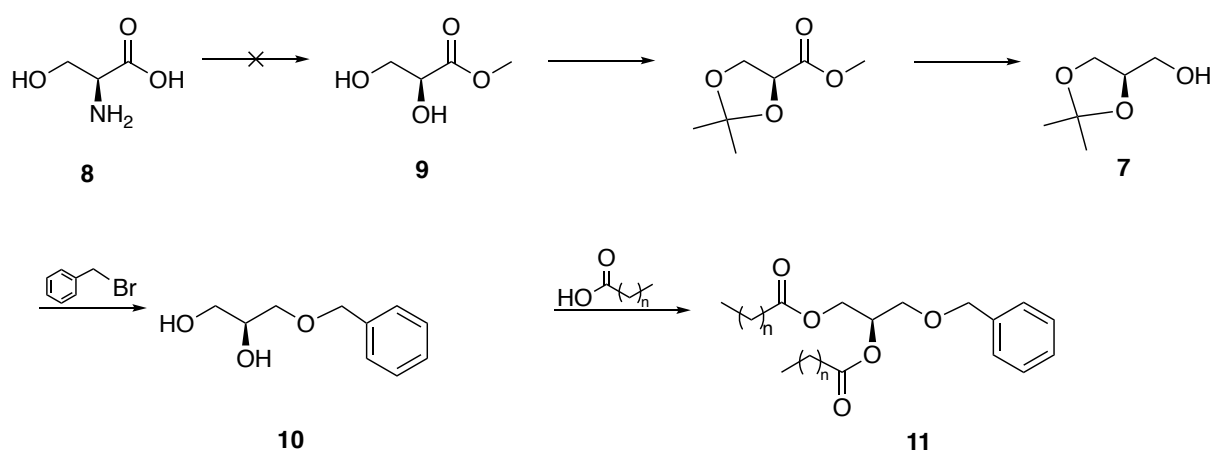
Syntesen av syrekloridet **6** var vellykket. Selv om **6** er rapportert er det ikke blitt funnet noen spektrale data for strukturen. Våre spektrale data stemmer overens med det som forventes.<sup>24</sup> Om **5** ikke hadde reagert hadde vi forventet en brei singlet i  $^1\text{H}$ -NMR-spekteret (figur 9). Dette ble ikke observert. Karbonyl-karbonet i syrehalidet **6** kan observeres ved 174,00 ppm i  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekteret (figur 10). Det er stor grad av overlapp mellom resonansene til flere av metylen-karbonene i hydrokarbonkjeden. Utenom dette overlappet har spekteret alle toppene som forventes. I følge NMR-spektrene (figur 9-10) inneholder stoffet et par forurensninger. Inkludert forurensningene ga reaksjonen et utbytte på 92 %. Det er ikke oppgitt noe utbytte i litteraturen.

I forsøket på å danne 1-monosubstituert glyserid **2** (skjema 5, reaksjon c) ble diolen **4** reagert med syrekloridet **6**. De ble henholdsvis løst i pyridin og  $\text{CHCl}_3$ , blandet forsiktig sammen og varmet opp. Reaksjonen var ikke vellykket. Mangel på to karboksyl-karboner i spekteret viste at den ønskede esterbindingen ikke hadde blitt dannet. Dette ble bekreftet i  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekteret ved manglende topper for O-CH og O- $\text{CH}_2$  som ville være forventet for diesteren. I tillegg tydet mangel på resonans for acetalkarbonet på at THP hadde blitt avspaltet. THP ble trolig spaltet av på grunn av HCl som dannes under forestringen. Dette kan ha vært på grunn av for lite base til stede. Et bedre alternativ ville trolig vært en annen aktiveringsmetode,

som for eksempel CDI for å danne imidatet<sup>25</sup>. Dessverre fikk vi ikke mulighet til å teste andre varianter da leveranse av essensielle kjemikalier ikke kom frem i tide.

## 2.1.2 Metode 2

Vi bestilte acetonidet **7**, men grunnet treg levering ble den også forsøkt laget fra L-serin. L-serin (**8**) skulle gjøres om til en diol (**9**) igjennom en Sandmeyer-type reaksjon etterfulgt av en forestring med tionylklorid og metanol. Planen var å danne et acetonid **7** for å beskytte hydroksylgruppene mens esteren reduseres til hydroksyl. Det skulle bli satt på en benzengruppe og deretter skulle acetonidet hydrolyseres til diolen **10**. Tilslutt skulle **10** reagere med ønskede fettsyrer og danne et 1-monosubstituert glyserid **11** (se skjema 6). Denne strategien var basert på prosedyrer beskrevet av Mailik *et al.*<sup>26-27</sup> og Kristinsson *et al.*<sup>28</sup>.



Skjema 6 Syntesestrategi for metode 2

Da L-serin er optisk aktiv aminosyre ville denne syntesestrategien ført fram til et 1-monosubstituert glyserid med kjent stereokjemi ved det stereogenesentertet i festtsyredelen. Det hadde vært en fordel å ha kjennskap til både med tanke på karakterisering ved hjelp av NMR, men også da galaktolipidet skulle bli brukt som intern standard i en LC-MS analyse.

Syntesen av diolen **9** fra L-serin **8** var derimot ikke vellykket. NMR-spekterene av forbindelsen før opprensning viste en god del forurensninger. Det ble observert topper i de ønskede områdene, men områdene viste også tegn til forurensninger. Etter opprensning kunne heller ikke NMR-spektret bekrefte tilstedeværelse av diolen **8**. Dette kommer fram av mangel på resonans for karbonylkarbonet i <sup>13</sup>C-NMR-spekteret. Dette kan enten komme av

at forbindelsen ikke var blitt dannet eller at opprensingen ikke var optimal. Til opprensning ble det benyttet normal fase kolonnekromatografi. Da diolen **8** er hydrofil kunne det vært mer suksessfullt å benytte seg av omvendt-fase kolonnekromatografi.

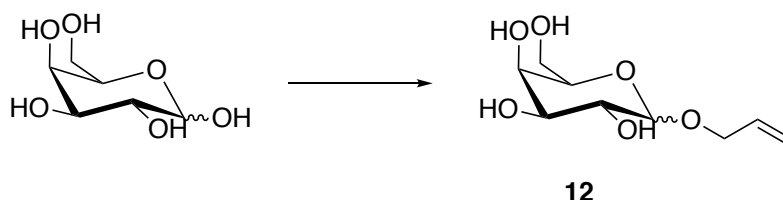
## 2.2 Forberedelse av sakkaridet til dannelse av glykosidbindingen

En utfordring i syntesen av MGDGer er å få fettsyredelen til å feste seg i riktig posisjon på sakkaridet. Da D-galaktose består av fem hydroksylgrupper vil fettsyredelen kunne feste seg på fem ulike steder om de uønskede gruppene ikke blokkeres. For å få en kjemoselektiv dannelse av glykosidbindingen ble det derfor benyttet beskyttelsesgrupper på hydroksylgruppene. I denne fasen av prosjektet har det ikke blitt fokusert på stereokjemien ved glykosidbindingen.

Det har blitt testet ut to ulike beskyttelsesgrupper, acetyl og benzyl. For at glykosidbindingen skal dannes må det i tillegg settes på en god utgående gruppe på det anomere karbonet. I denne oppgaven har det blitt benyttet tiofenol og hemiacetal.

### 2.2.1 Metode 1

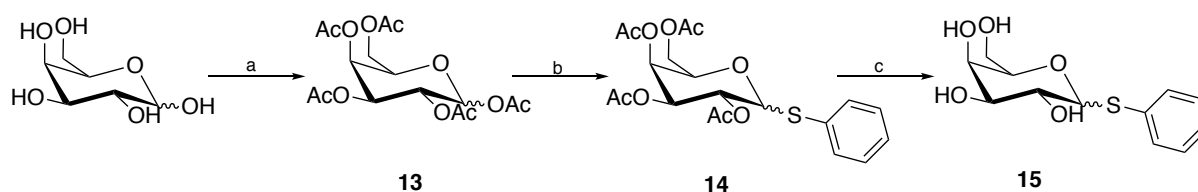
Det ble først testet ut danne glykosidbindingen uten å beskyttelsesgrupper på sakkaridet. På grunn av mangel på omvendt-fase silika, klarte vi ikke å få rent stoff. Uten opprensning av sakkaridet **12** er det vanskelig å si noe om reaksjonen var vellykket. Dette ble derfor forkastet, og vi bestemte oss for å beskytte alle hydroksylgruppene slik at forbindelsen også ble mer lipofil.



Skjema 7 Syntese av **12**

## 2.2.2 Metode 2

Den andre strategien gikk ut på å peracetylere sakkariidet og deretter sette på en god utgående gruppe, slik at glyseroldelen kan settes inn (skjema 8). Meng *et al.*<sup>29</sup> har rapportert at tiofenolen vil favorisere  $\alpha$ -posisjon grunnet den anomere effekten. Deretter kan en sette fettsyredelen inn i  $\beta$ -posisjon i en  $S_N2$  reaksjon. Dette er dog ikke av viktighet for vårt prosjekt, og ble derfor ikke undersøkt mer i detalj.



Skjema 8 Reagenser og betingelser: (a)  $Ac_2O$ ,  $NaOAc$ ,  $70^\circ C$ , 24t; (b) tiofenol,  $BF_3 \cdot Et_2O$ , rt, 5t; (c)  $NaOMe$  (aq),  $NaOMe$  (s), pH 9, 24t.

Acetater blir dannet ved en  $S_N2$ -reaksjon mellom alkoholen og eddiksyreanhydrid eller alkoholen og eddiksyreklorid i pyridin eller trietyleter. Avspaltingen av acetylgruppen fra alkoholen kan skje ved en hydrolyse med base eller syre. Det spalter esteren opp i en alkohol og en syre. Esteren kan også spaltes til en alkohol og etanol ved tilsetning av  $LiAlH_4$  som reduserer esteren.<sup>30</sup>

Acetyl ble valgt som beskyttelsesgruppe i denne syntesen da den kan settes på og fjernes med et høyt utbytte under basiske forhold.<sup>16</sup> Problematikken med å bruke acetylgrupper som beskyttelsesgruppe i syntese av galaktolipider er at hydrolysen som fjerner acetylgruppen også vil hydrolysere bort fettsyrene. For å unngå denne problematikken ble det tiofenol reagert inn på det anomere karbonet for å danne en tiogalaktosyl donor. Deretter kunne den midlertidige beskyttelsesgruppen avspaltes med en hydrolyse og danne ubeskyttet tiogalaktosyl. Glykosyl-donoren kan da sørge for en kjemoselektiv reaksjon med fettsyredelen. Samtidig unngås problematikken med å avbeskytte sakkariidet etter glykosidbindingen er dannet.

D-galaktose reagerte med eddiksyreanhydrid og dannet peracetyllert D-galaktose (**13**) etter en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup> (skjema 8, reaksjon a). Reaksjonen var vellykket, men med enkelte forurensninger. Spektral data stemmer overens med spektral data til Chen L. Z. *et al.*<sup>31</sup> Det ble ikke gjennomført opprensning før neste trinn.

Syntesen av peracetyllert fenyltioglykosid (**14**) ble gjennomført etter en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup> (skjema 8, reaksjon b). Reaksjonen var vellykket, men med forurensninger. Opprensning ble gjennomført med normale fase kolonnekromatografi, men ikke alle forurensninger var det mulig å fjerne. Prosedyren oppga ingen spektrale data for forbindelsen, men de spektrale dataene stemmer med Cheng *et al.*<sup>32</sup> Aromaten kommer godt frem i begge NMR-spektrene (figur 12-13). Det anomere karbonet viser at sakkariidet **13** har reagert med tiofenolen. I <sup>13</sup>C-NMR-spekteret (figur 11) til **13** kom det anomere karbonet ut ved 92,29 ppm. Etter reaksjonen kom denne toppen ut ved 86,69 ppm (figur 13). Dette tyder på at sakkariidet **14** har blitt dannet.

Sakkariidet **14** ble hydrolysert til ubeskyttet 1-tiofenylgalaktose (**15**) etter en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup> (skjema 8, reaksjon c). Det ble brukt NaOMe løsning og fast NaOMe for å få ned på til 9. Acetater er stabile ved pH 1-8.<sup>33</sup> Blir blandingen mer basisk vil det gi basisk hydrolyse. På grunn av NaOMe-løsningen kom det vann i løsningen som var problematisk å fjerne. Opprensning ble gjennomført med normal-fase kolonnekromatografi. På grunn av de fire ubeskyttede hydroksylgruppene hadde sakkariidet en hydrofil karakter. En omvendt-fase kolonnekromatografi kunne derfor vært en mer suksessfull opprensning.

Prosedyren til Meng *et al.*<sup>29</sup> oppga ikke spektrale data for den ubeskyttede tiogalaktosylen **15**. <sup>1</sup>H-NMR-spekter (figur 14) ble derfor sammenlignet med Chen H. M. *et al.*<sup>34</sup>. Toppene ved 7,62-7,45 ppm og 7,38-7,30 ppm, stemmer med litteraturen. De resterende oppgitt toppene er i det riktige området i forhold til prosedyren, men ifølge integralet er det kun sju hydrogenatomer der. Det var forventet at dette området skulle ha 11 hydrogenatomer. Det kan tyde på at **15** ikke hadde blitt dannet. På en annen side baserer integralene seg på en kalibrering med en kjent topp. I dette spekteret ble det brukt 7,62-7,45 ppm. Dette området kan ha vært forurenset og påvirket kalibreringen.

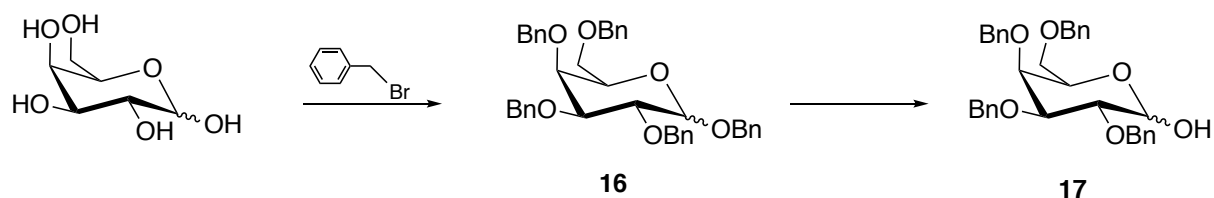
Da ubeskyttet tiogalaktosyl **15** ikke lot seg rense opp og det var usikkerhet om siste reaksjon var vellykket, ble det ikke arbeidet mer med denne metoden.

### 2.2.3 Metode 3

Den andre beskyttelsesgruppen som ble benyttet på sakkariidet var benzyleter. Benzyletere blir dannet ved at alkoholen i et basisk miljø reagerer til et alkoksid. Deretter reagerer det med enten benzyklorid eller benzylbromid. Benzyleteren spaltes tilbake til alkohol på flere ulike metoder, men den mest brukte er en katalytisk hydrogenering med en palladium katalysator.<sup>35</sup>

Benzyl ble valgt som beskyttelsesgruppe da den i denne syntesen kan brukes som en permanent beskyttelsesgruppe i syntesen av glykolipidet. I motsetning til acetatet vil ikke benzylertgalaktose påvirke andre funksjonellgrupper i dette galaktolipidet når beskyttelsesgruppene fjernes. Det er dermed ikke nødvendig å gjennomføre en ubeskyttet dannelse av glykosidbindingen.

Når galaktosen er beskyttet med benzyl vil det også føre til en mer lipofil forbindelse enn sakkariidene i metode 2, **13-15**. Dette gjorde opprensingen av de benzylerte sakkariidene lettere da normal-fase silika er mer egnet for opprensningen. Da benzyl også vil fungere som en permanent beskyttelsesgruppe vil den bidra til en lipofil forbindelse helt til siste trinn i syntesen.



Skjema 9 Syntese av **16** og **17**

I vår syntese ble perbenzylert D-galaktose (**16**) dannet i en reaksjon med benzylbromid (se skjema 9). Reaksjonen var vellykket og ble gjennomført etter en prosedyre av Lu *et al.*<sup>36</sup>. Det har ikke blitt funnet spektrale data for **16** i litteraturen. I Lu *et al.*<sup>36</sup> sin prosedyre ble det syntetisert benzyl-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-  $\beta$ -D -glukopyranosid<sup>21</sup>. <sup>1</sup>H-NMR-spekteret (figur 15) vårt stemmer delvis med de spektrale dataene til sakkaridet til Lu *et al.*<sup>36</sup> Forskjellen kan lett forklares med at vi benytter galaktose mens han rapporterer dette for tilsvarende glukose-derivat. Det opprensede stoffet viste likevel tegn til forurensninger. I tillegg vil stoffet forekomme i både  $\alpha$ - og  $\beta$ -anomerene. I <sup>13</sup>C-NMR-spekteret (figur 16) kan det observeres mindre topper som muligens kan komme av den anomere formen.

Ved å hydrolysere acetalet i sakkaridet **16** fikk vi dannet halvacetalet **17** (skjema 9). Det ble gjennomført etter en prosedyre av Cribú *et al.*<sup>37</sup>. Også her kan vi se flere resonanser enn forventet. Disse kan være for både  $\alpha$ - og  $\beta$ -anomerene, samt åpenkjedet karbohydrat. Toppen ved 101,06 ppm i <sup>13</sup>C-NMR-spekteret (figur 18) kan tyde på dette. Prosedyren til Cribú *et al.*<sup>37</sup> var for hydrolyse av perbenzylert  $\beta$ -disakkarid. Den ga et utbytte på 29% og en fordeling av  $\alpha$ : $\beta$  på ca. 7:1, Vår syntese hadde et utbytte på 17 %. Det ble ikke funnet spektrale data for hemiacetalet **17** i litteraturen. På grunn av tidsrammen til denne oppgaven ble de ikke jobbet mer med denne strategien.

### 3. Konklusjon

Det lyktes ikke å syntetisere målmolekylet **1** innen oppgavens tidsrammer.

Syntesen av MGDG viste seg å by på flere problemer. Da flere av mellomproduktene var hydrofile ble opprensning med normal-fase kolonnekromatografi problematisk. Utstyr og kjemikaler til å gjennomføre omvendt-fase kolonnekromatografi ankom ikke i tide til å teste ut dette.

I videre arbeid på dette prosjektet er det verdt å teste ut noen av syntesestrategiene i denne oppgaven på nytt med kjemikaler og utstyr som ikke var tilgjengelig våren 2019. Syntesen av ubeskyttet tiogalaktosyl **14** kunne ha funket ved bruk av omvendt-fase kolonnekromatografi.



Det er også verdt å teste ut syntesestrategien presentert i 2.1.2 med kommersielt acetonid **7**. Denne kunne gitt en kjent stereokjemi ved det stereogene senteret i festtsyredelen. Videre arbeid bør også innebære en videreføring av arbeidet med hemiacetalet **16**.

Det er også verdt å teste ut hovedsyntesestrategi 2 med beskyttet galaktose etter en prosedyre av Zuffo *et al.*<sup>38</sup>. Denne syntesestrategien ble planlagt, men ikke gjennomført grunnet mangel på kjemikaler.

For videre arbeid med dette prosjektet er det nødvendig å finne metode(r) som fullfører syntetesen MGDGer. Det er også nødvendig å finne metode(r) for å syntetisere DGDGer. Disse interne standardene av galaktolipidene er avgjørende for å fullføre fettsyre-profilen av *L. hyperborea*.

## 4. Eksperimentelt

### 4.1 Generelt

Alle reaksjoner ble utført i nitrogenatmosfære. Alle løsemidlene som ble brukt var av teknisk kvalitet. Der det har blitt benyttet vannfrie løsemidler har det blitt brukt forseglede flasker.

Det har blitt benyttet normal fase kolonnekromatografi med silika gel 60 (0,040-0,063 mm) fra Merck ble benyttet til opprensning. Tynnsjikt-kromatografi (TLC) ble utført på TLC silika gel 60 F<sub>254</sub> aluminiumsplater. Kaliumpermagnat-løsning og UV ble brukt til deteksjon.

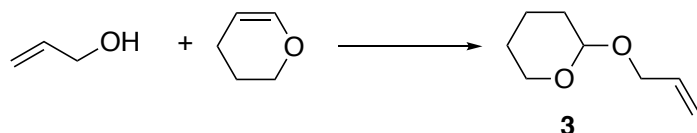
NMR-spekter ble tatt opp på et Bruker Ascend 400 instrument ved romtemperatur.

Flere planlagte synteser har ikke blitt gjennomført eller rensset opp da det har vært mangel på kjemikalier og utstyr. De nødvendige kjemikaliene og utstyret har blitt bestilt, men har ikke ankommet i tide.

## 4.2 Syntese av fettsyren

### 4.2.1 Metode 1

#### 4.2.1.1 Syntese av 2-(allyloksy)tetrahydro-2H-pyran (**3**)



Metoden er basert på en prosedyre av Barry *et al.*<sup>21</sup>

#### Framgangsmåte:

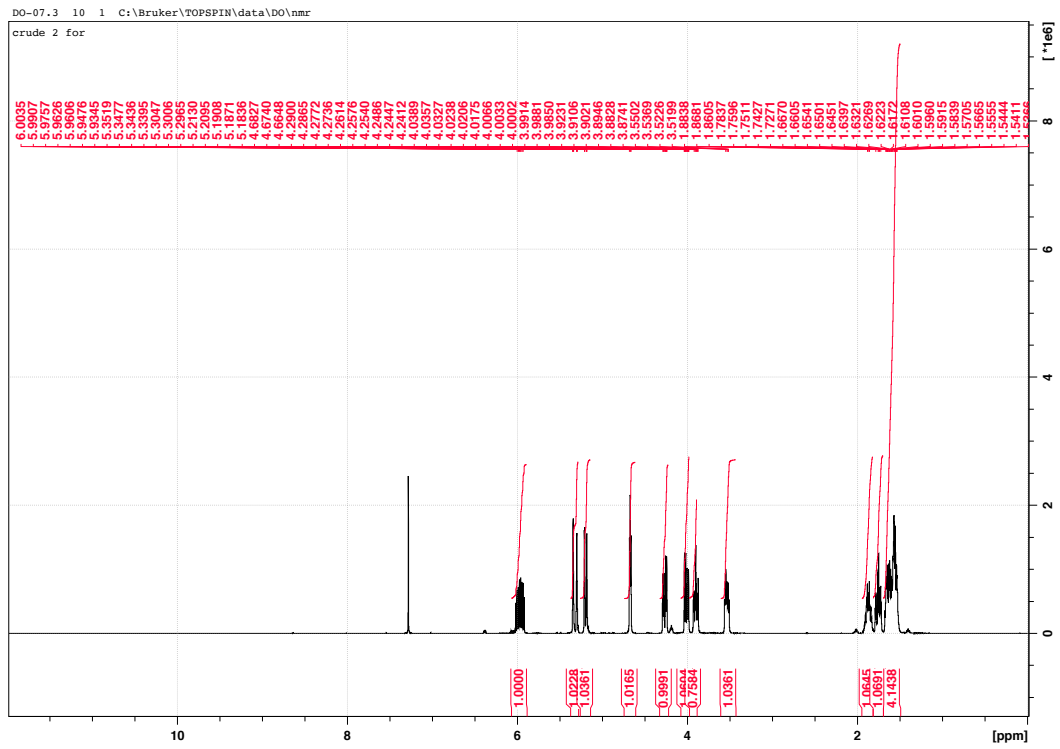
Til en løsning av allylalkohol (14 mL, 0,20 mol) og DHP (18 mL, 0,20 mol) ble det tilsatt pyridinium *p*-toluensulfonat (0,31 g, 1,2 mmol). Etter å ha rørt over natten, ble blandingen destillert ved 50°C, 14 torr. Utbytte ble målt til 25 %. Spektrale data er i overensstemmelse med tidligere publiserte.<sup>22</sup> Kokepunktet er stemmer med litteratur.<sup>21</sup>

#### Data:

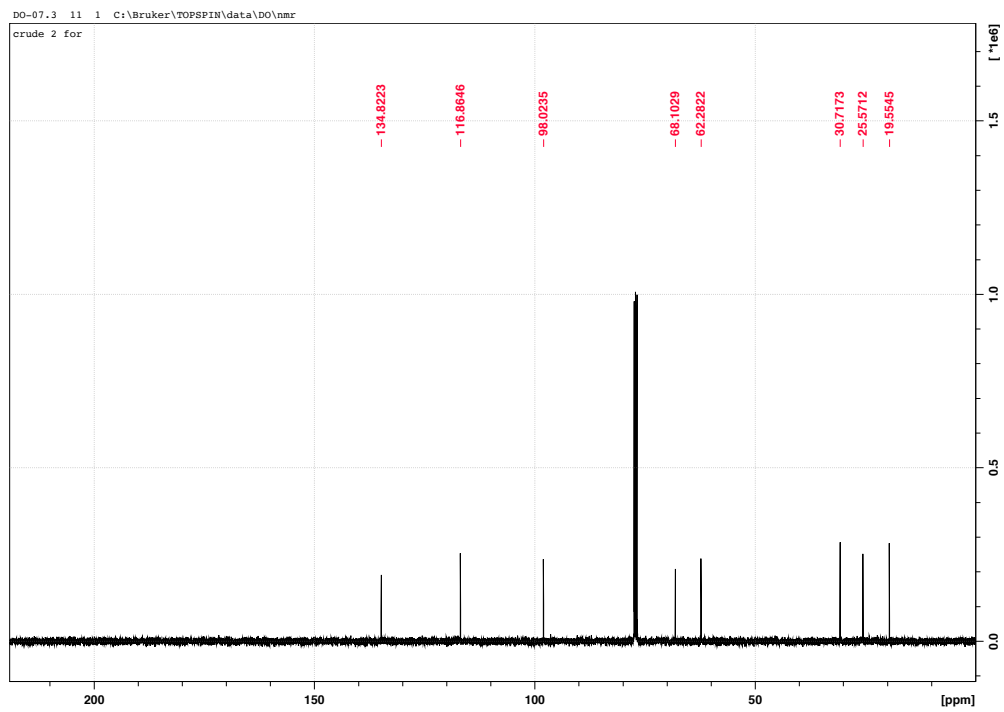
**<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 5,91-6,02 (m, 1H), 5,28-5,36 (m, 1H), 5,18-5,22 (m, 1H), 4,67 (t, J=7,7 Hz, 1H), 4,27 (ddt, J=6,5, 1,5, 2,2, 7,8, 13 Hz, 1H), 4,01 (ddt, J= 1,3, 2,6, 6,1, 6,1 Hz, 1H), 3,87-3,94 (m, 1H), 3,50-3,58 (m, 1H), 1,82-1,94 (m, 1H), 1,70-1,81(m, 1H), 1,49-1,69(m, 4H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 134,82 (C), 116,86 (CH<sub>2</sub>), 98,02 (CH), 68,10 (CH<sub>2</sub>), 62,28 (CH<sub>2</sub>), 30,71 (CH<sub>2</sub>), 25,57 (CH<sub>2</sub>), 19,55 (CH<sub>2</sub>).

**Kokepunkt:** 160-170°C (165-167°C).

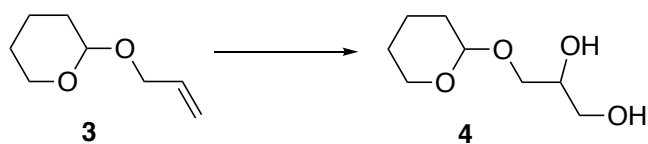


Figur 4  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 3



Figur 5  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av forbindelse 3

#### 4.2.1.2 Syntese av 3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oksy)propane-1,2-diol (**4**)



Metoden er basert på en prosedyre av Barry *et al.*<sup>21</sup>

##### Framgangsmåte:

THP- derivatet **3** (3,5 g, 25 mmol) ble blandet med vann (15 mL) over et vannbad. Den ble tilsatt en løsning av KMnO<sub>4</sub> (4,0 g) og vann (85 mL). Etter 2 timer med røring ble løsningen kokt i 1 time. Løsningen ble så filtrert, avkjølt til romtemperatur og mettet med K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Blandingen ble ekstrahert med dietyler (3x 50 mL), tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og dampet inn.

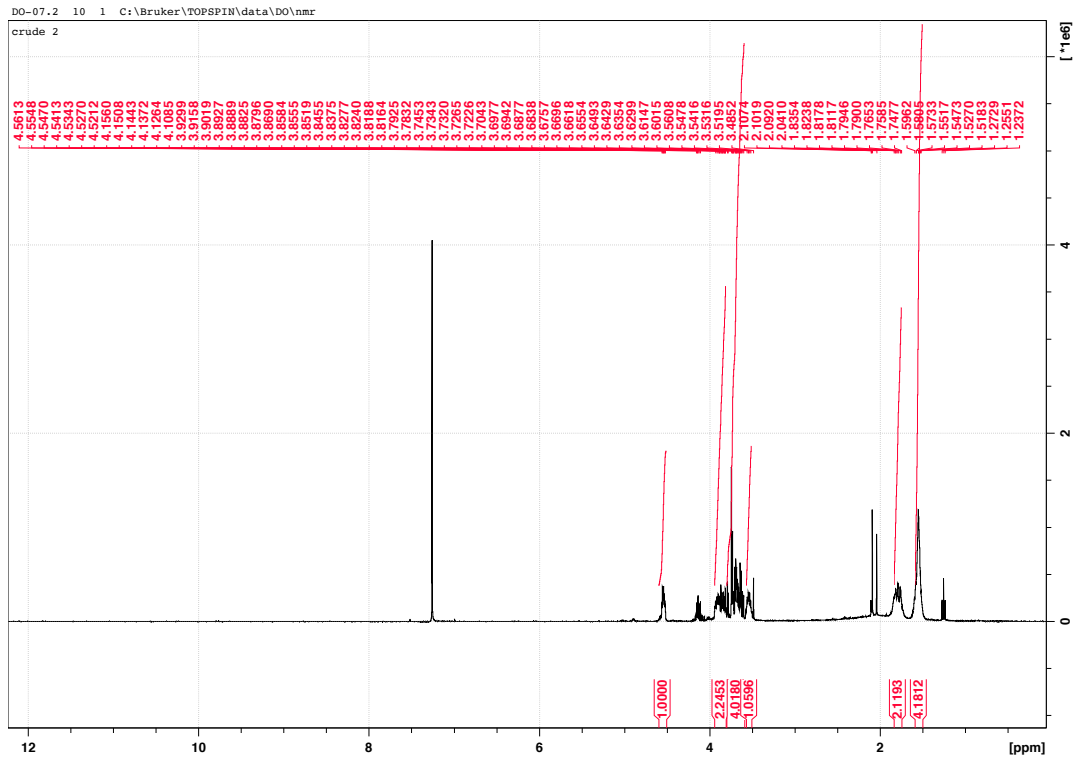
Deretter ble stoffet rensert med kolonnekromatografi (SiO<sub>2</sub>, heksan:EtOAc 4:1 → metanol).

Utbytte ble målt til 9,2 %.

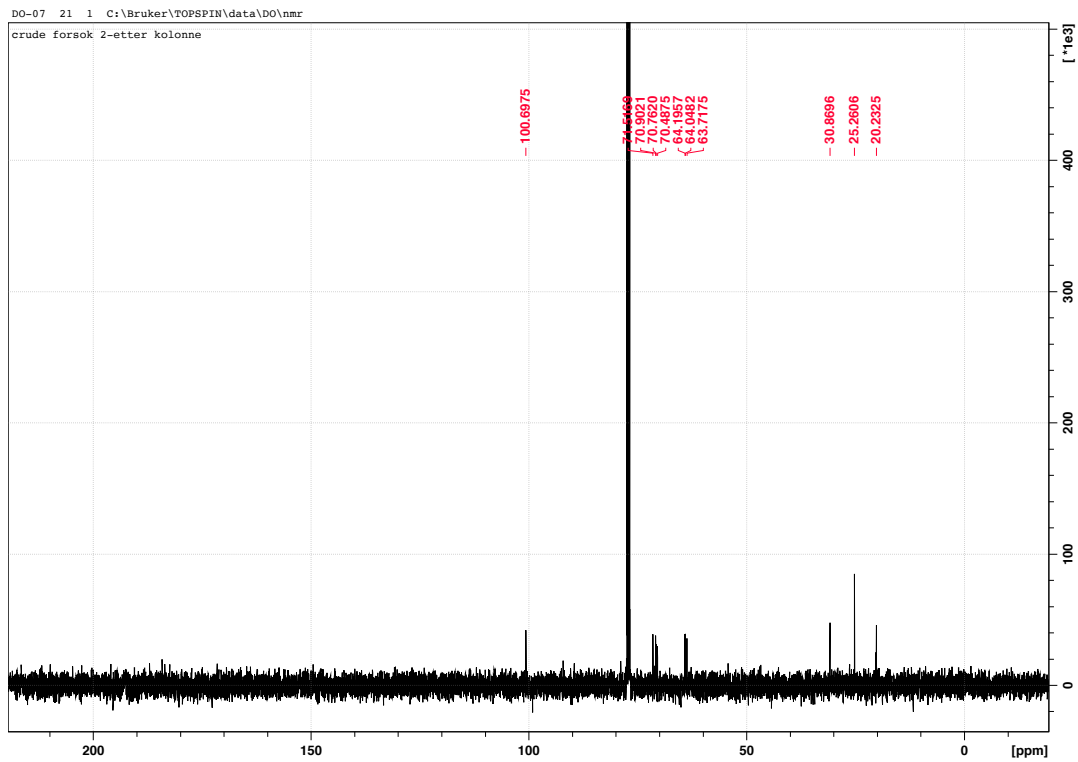
##### Data:

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 4,50-4,60 (m, 1H), 3,81-3,95 (m, 2H), 3,59-3,80 (m, 4H), 3,50-3,57 (m, 1H), 1,75-1,84(m, 2H), 1,50-1,59 (m, 4H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 100,70 (CH), 71,52 (CH<sub>2</sub>), 70,90 (CH), 64,20 (CH), 64,05 (CH), 30,87 (CH<sub>2</sub>), 25,26 (CH<sub>2</sub>), 20,23 (CH<sub>2</sub>).

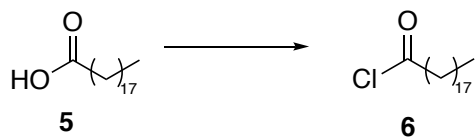


Figur 6  $^1\text{H-NMR}$ -spekter av forbindelse 4



Figur 7  $^{13}\text{C-NMR}$ -spekter av forbindelse 4

#### 4.2.1.3 Syntese av nonadekanoylchlorid (6)



Metoden er basert på en prosedyre av Nguyen *et al.*<sup>39</sup>

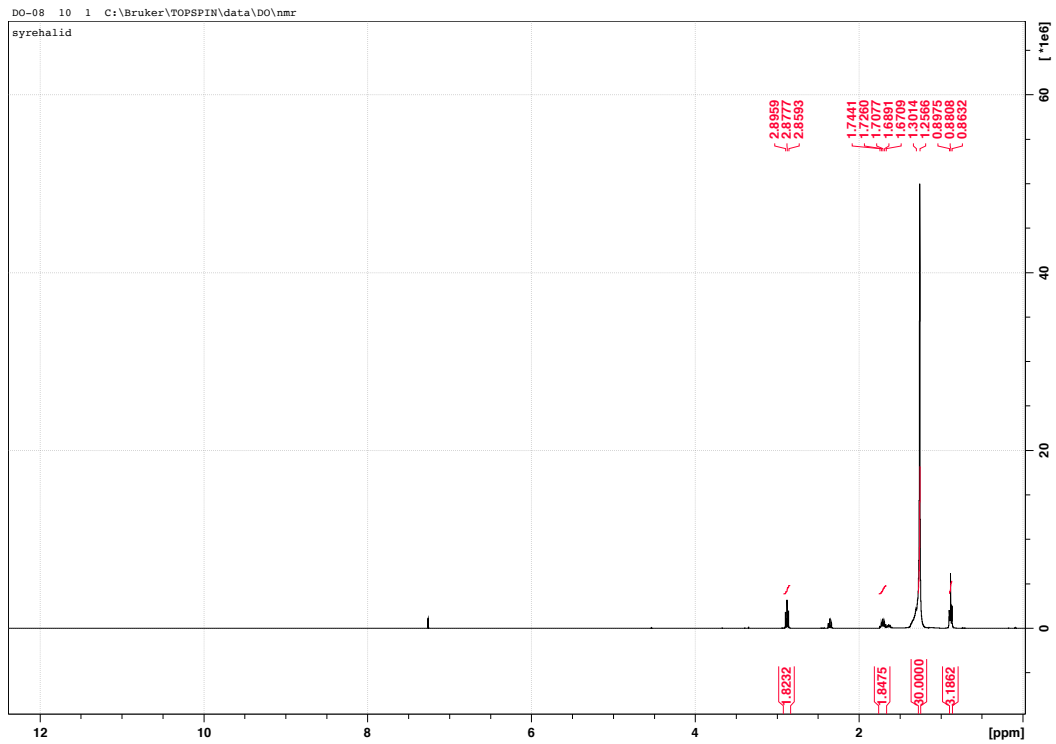
##### Framgangsmåte:

En kolbe med nonadekansyre, **5**, (0,2 g, 0,7 mmol) ble flushet med nitrogen og tilsatt tionylchlorid (0,38 mL, 5,2 mmol). Etter 2 timer ble prøven dampet inn. Dette ga 94 % utbytte (0,2 g, 0,7 mmol).

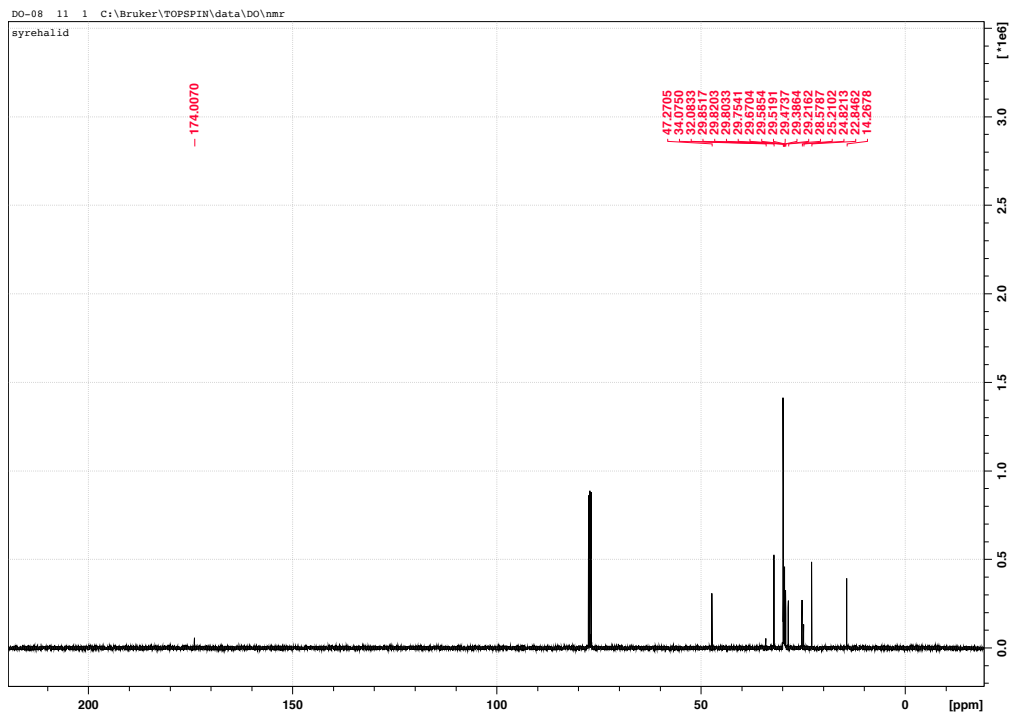
##### Data:

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 2,88 (t, J=7,3 Hz, 2H), 1,66-1,75 (m, 2H), 1,20-1,39 (m, 32H), 0,88 (t, J=13,7, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 174,00 (C), 47,27 (CH<sub>2</sub>), 34,08 (CH<sub>2</sub>), 32,08 (CH<sub>2</sub>), 29,85 (CH<sub>2</sub>), 29,82 (CH<sub>2</sub>), 29,80 (CH<sub>2</sub>), 29,75 (CH<sub>2</sub>), 29,67 (CH<sub>2</sub>), 29,59 (CH<sub>2</sub>), 29,52 (CH<sub>2</sub>), 29,47 (CH<sub>2</sub>), 29,39 (CH<sub>2</sub>), 29,22 (CH<sub>2</sub>), 28,58 (CH<sub>2</sub>), 25,21 (CH<sub>2</sub>), 24,82 (CH<sub>2</sub>), 22,85 (CH<sub>2</sub>), 14,27(CH<sub>3</sub>).



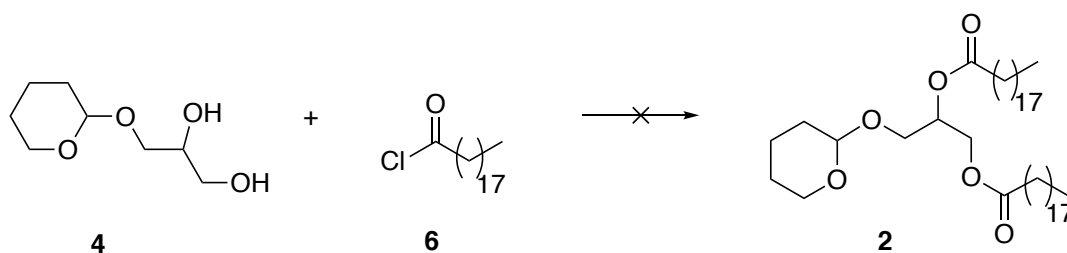
Figur 8  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 6



Figur 9  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av forbindelse 6



#### 4.2.1.4 Syntese av 3-hydroksypropan-1,2-diyl bisnonadekanat (**2**)



Metoden er basert på en prosedyre av Barry *et al.*<sup>21</sup>

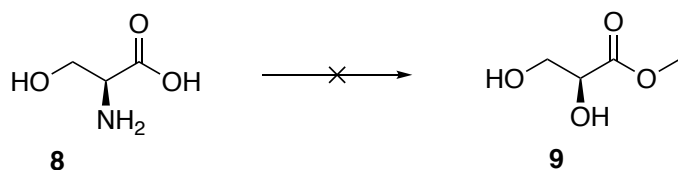
##### Framgangsmåte:

3-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oksi)propan-1,2-diol, **4**, (0,056 g, 0,32 mmol) løses i en blanding av pyridin (0,12 mL) og CHCl<sub>3</sub> (0,42 mL). Nonadekanoylchlorid (0,2 g, 0,7 mmol) ble løst i CHCl<sub>3</sub> (0,12 mL). De to blandingen ble deretter forsiktig blandet sammen. Etter 1 time ved romtemperatur ble det satt på varme til reflux, og blandingen sto over natta.

Blandingen ble ekstrahert med heksan (40 mL) og vasket med vann (40 mL), deretter ble den organiske fasen vasket med 10 % HCl (40 mL) og deretter med vann (40 mL). Den organiske fasen ble filtrert og dampet inn. Prøven ble omkrystallisert med aceton og ble satt i fryseren over natta. Prøven ble dampet inn og analysert med NMR. NMR viser at stoffet ikke har blitt dannet.

## 4.2.2 Metode 2

### 4.2.2.1 Syntese av metyl (S)-2,3-dihydroksypropanat (9)



Metoden er basert på en prosedyre av Mallik *et al.* <sup>26-27</sup>

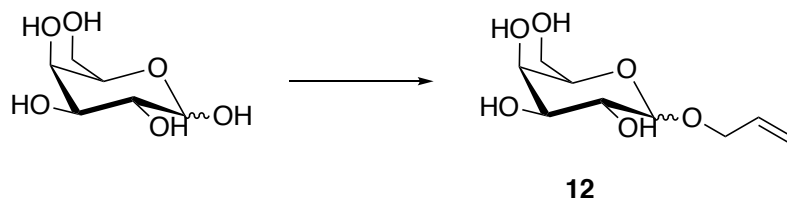
#### Framgangsmåte:

L-serin (5,0 g, 48 mmol) ble løst i 18 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5,3 mL, 0,095 mol). Deretter ble det tilsatt en løsning av natrium nitritt (6,59 g, 95,2 mmol) i vann (10 mL) sakte til blandingen over 30 minutter ved 0°C. Blandingen ble så varmet opp til romtemperatur. Etter 48 timer ble blandingen dampet inn og fortynnet med etanol (40 mL). Blandingen ble så filtrert gjennom en celite pad og dampet inn. Metanol (25 mL) ble tilsatt blandingen ved 0 °C. Blandingen ble så dråpevis tilsatt tionylklorid (6,8 mL, 94 mmol) over en tidsramme på 30 minutter ved 0 °C. Etter 24 timer med omrøring ble den gule blandingen dampet inn. Fortynnet med metanol og dampet inn. Fortynnet med metanol (3 x 40 mL) og dampet inn tre ganger og deretter renset med celite pad to ganger. Deretter ble stoffet renset med kolonnekromatografi (SiO<sub>2</sub>, heksan:EtOAc 80:20→50:50). NMR-spekter viste at stoffet ikke hadde blitt dannet.

## 4.3 Forberedning av sakkaridet til dannelsen av glykosidbindingen

### 4.3.1 Metode 1

#### 4.3.1.1 Syntese av (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-2-(allyloksy)-6-(hydroksymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triol (**12**)



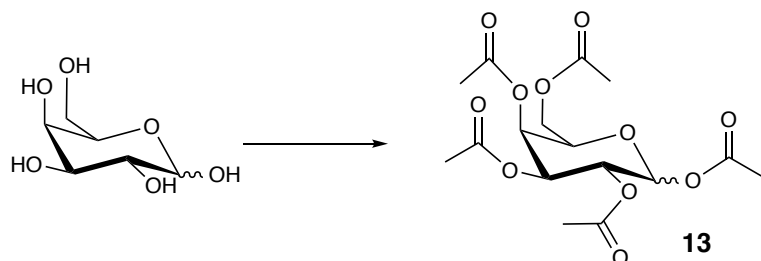
Metoden er basert på en prosedyre av Busch *et al.*<sup>40</sup>

#### Fremgangsmåte:

Til en løsning av allylalkohol (40 mL, 0,59 mol) og acetylklorid (1,35 mL, 17,5 mmol) ble det tilsatt D-galaktose (5,0 g, 28 mmol) ved romtemperatur. Etter 1 t ble blandingen varmet opp til ca. 60 °C. Etter 24 t ble løsningen kjølnet ned til romtemperatur og tilsatt Et<sub>3</sub>N (5 mL, mol). Blandingene ble dampet inn ved 60°C. På grunn av utstyr mangel ble stoffet ikke rensset opp.

## 4.3.2 Metode 2

### 4.3.2.1 Syntese av (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-6-(acetoxymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetraol tetraacetat (**13**)



Metoden er basert på en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup>

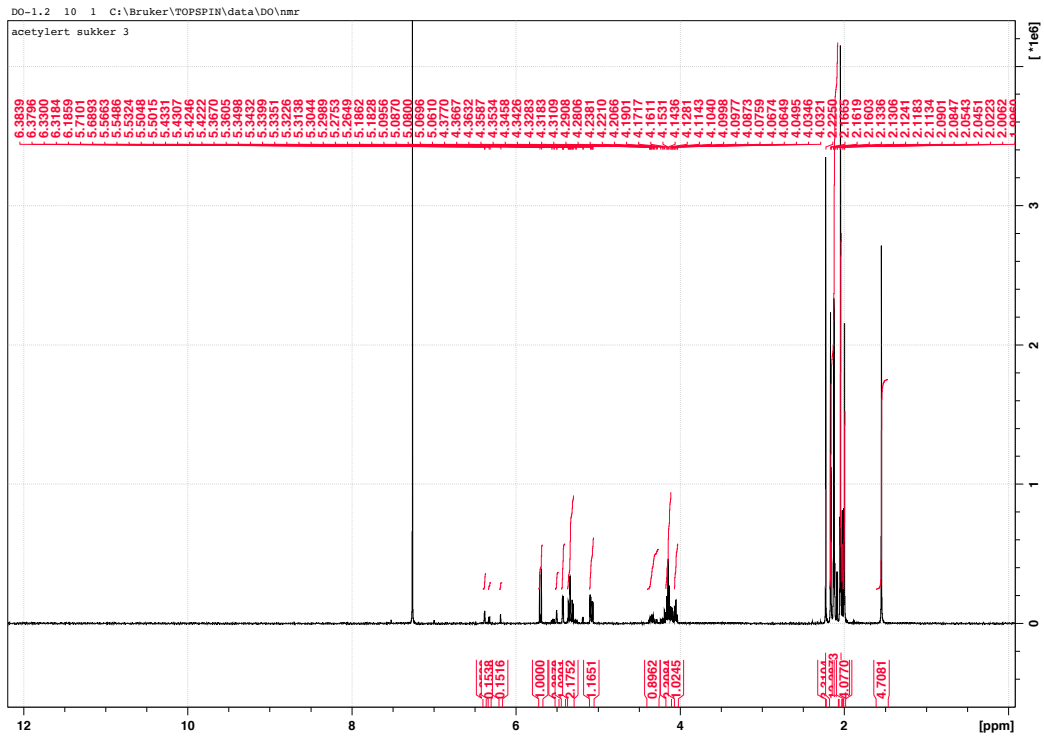
#### Framgangsmåte:

NaOAc (2,5 g, 31 mmol) ble løst opp i Ac<sub>2</sub>O (25 mL, 0,26 mol). Løsningen ble tilsatt (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(hydroksymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetraol (5,0 g 28 mmol) og varmet opp til 70°C. Etter 24 t ble løsningen helt over is og deretter stoppet ved å tilsette mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (30 mL). Vannfasen ble ekstrahert med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Den organiske fasen ble deretter vasket med mettet, vandig natriumklorid (50 mL) og deretter tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Løsningen ble dampet inn. NMR-spekter tydet på at prøven inneholdt syre, antagelig eddiksyre. Den organiske fasen ble derfor vasket med NaHCO<sub>3</sub> (2 x 40 mL) og CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 50 mL) for å øke pH til 8-9. Dette ga stoffet med urenheter (Se figur 10-11), men videre opprensing ble ikke utført. Spektraldata stemmer med litteratur.<sup>31</sup>

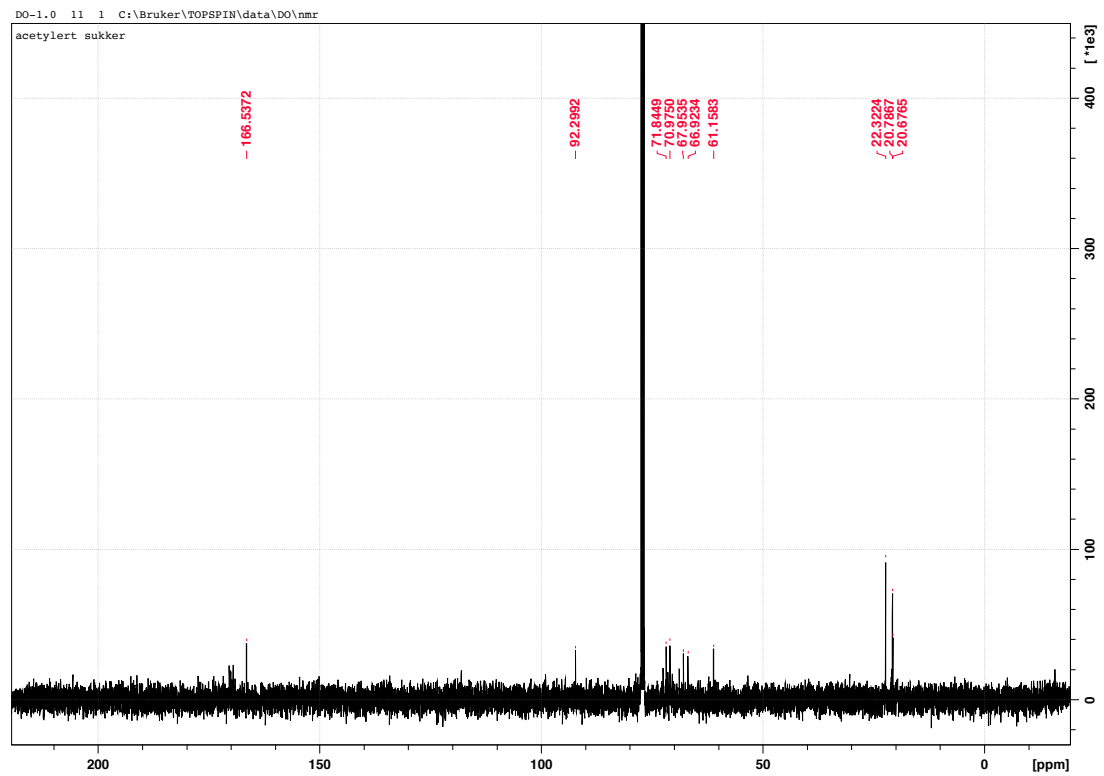
#### Data:

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  5,70 (d, J = 8,33 Hz, 1H), 5,42-5,44 (m, 1H), 5,30-5,37 (m, 2H), 5,06-5,10 (dd, J=10,4, 3,4 Hz, 1H), 4,11-4,17 (m, 2H), 2,22 (s, 3H), 2,08-2,18 (m, 12H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  166,54 (C), 92,29 (CH), 71,84 (CH), 70,98 (CH), 67,95 (CH), 66,92 (CH), 61,16 (CH<sub>2</sub>), 22,32 (CH<sub>3</sub>), 20,79 (CH<sub>3</sub>), 20,68 (CH<sub>3</sub>).

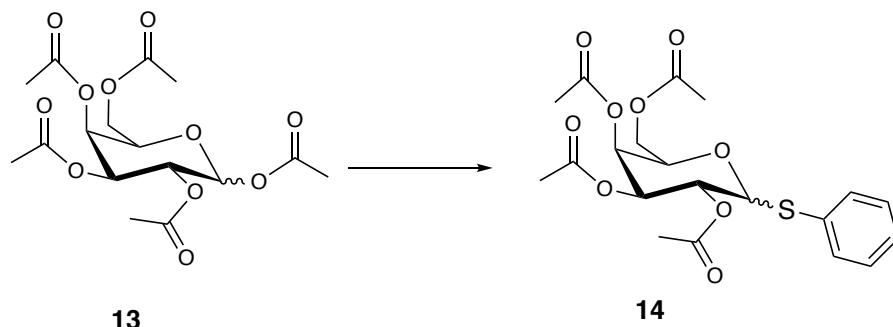


Figur 10  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 13



Figur 11  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av forbindelse 13

#### 4.3.2.2 Syntese av (2*R*,3*S*,4*S*,5*R*)-2-(acetoxymetyl)-6-(fenyltio)tetrahydro-2*H*-pyran-3,4,5-triyl triacetat (**14**)



Metoden er basert på en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup>

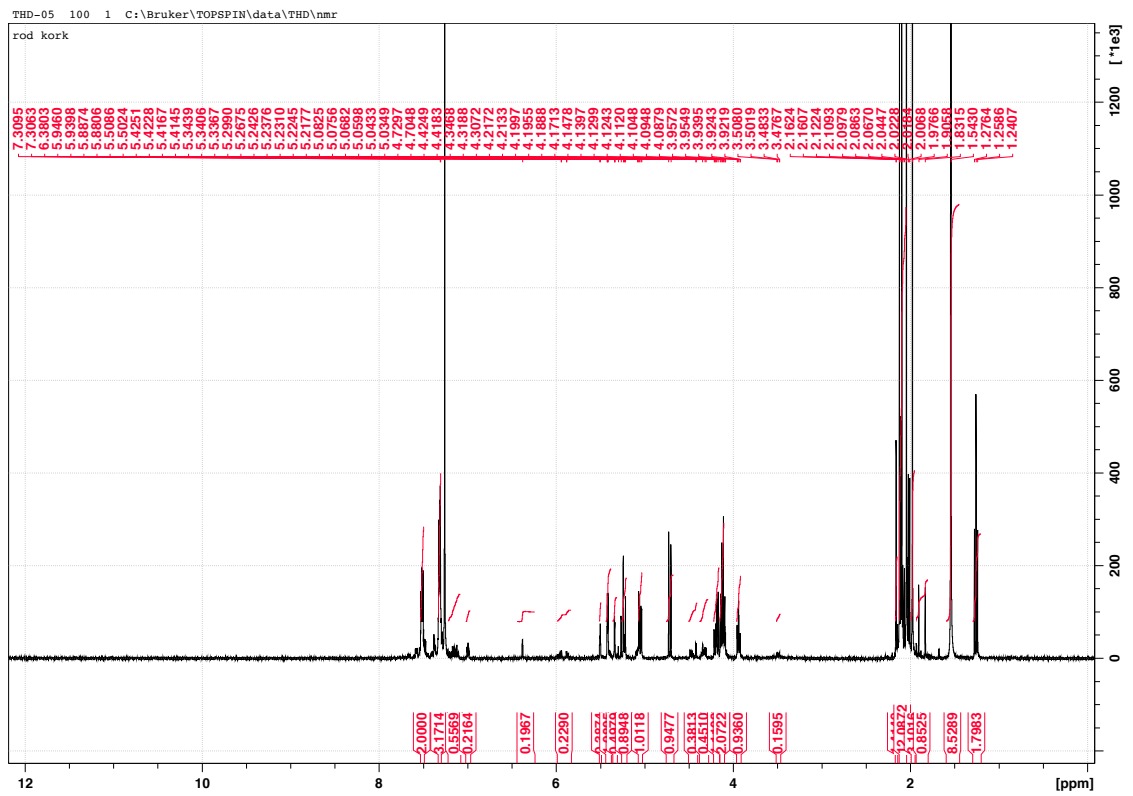
##### Framgangsmåte:

(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-6-(acetoxymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetrayl tetraacetat (4,7 g, 10,7 mmol) ble løst i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) og tilsatt tiofenol (1,7 mL, 14 mmol) ved 0°C. Etter 30 minutter med omrøring ble BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O (4,8 mL, 39 mmol) injisert sakte til blandingen. Løsningen sto i nitrogenatmosfære med omrøring i 2-3 dager. Blandingen ble så fortynnet med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) og vasket med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) og vandig mettet natriumklorid (40 mL). Prøven ble tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og dampet inn. Stoffet ble rensert med kolonnekromatografi (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol 95:5). Dette ga stoffet med urenheter (Se figur 12-13), men videre opprensing ble ikke utført. Spektraldata stemmer med litteraturen<sup>32</sup>.

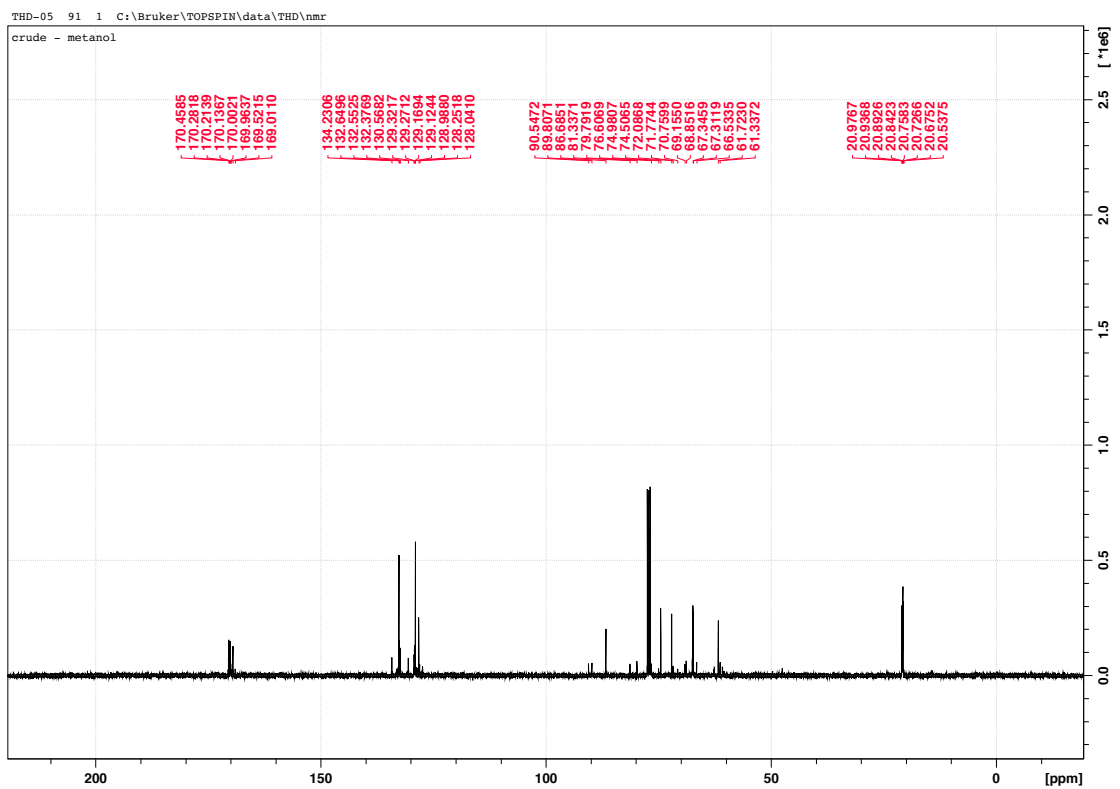
##### Data:

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,49-7,53 (m, 2H), 7,30-7,7,33 (m, 3H), 5,39-5,44 (m, 1H), 5,20-5,26 (m, 1H), 5,03-5,07 (dd, J=3,4, 10 Hz, 1H), 4,69-4,74 (d, J=10 Hz, 1H), 4,10-4,15 (m, 2H), 3,91-3,96 (m, 1H), 2,04-2,12 (m, 12H).

<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170,46 (C), 170,28 (C), 170,14 (C), 169,52 (C), 132,65 (C), 132,55 (CH), 132,38(CH), 128,99(CH), 128,25 (CH), 86,69 (C), 74,50 (CH), 72,09 (CH), 67,35 (CH), 67,31 (CH), 61,72 (CH<sub>2</sub>), 20,94 (CH<sub>3</sub>), 20,76 (CH<sub>3</sub>), 20,73 (CH<sub>3</sub>), 20,68 (CH<sub>3</sub>).

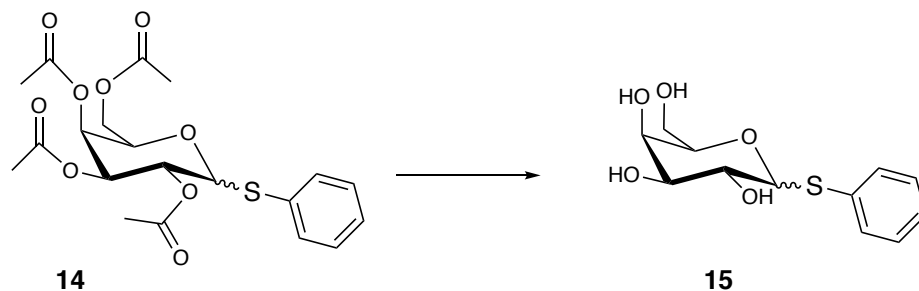


Figur 12  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 14



Figur 13  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av forbindelse 14

#### 4.3.2.3 Syntese av (2R,3R,4S,5R)-2-(hydroksymetyl)-6-(fenyltio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triol (**15**)



Metoden er basert på en prosedyre av Meng *et al.*<sup>29</sup>

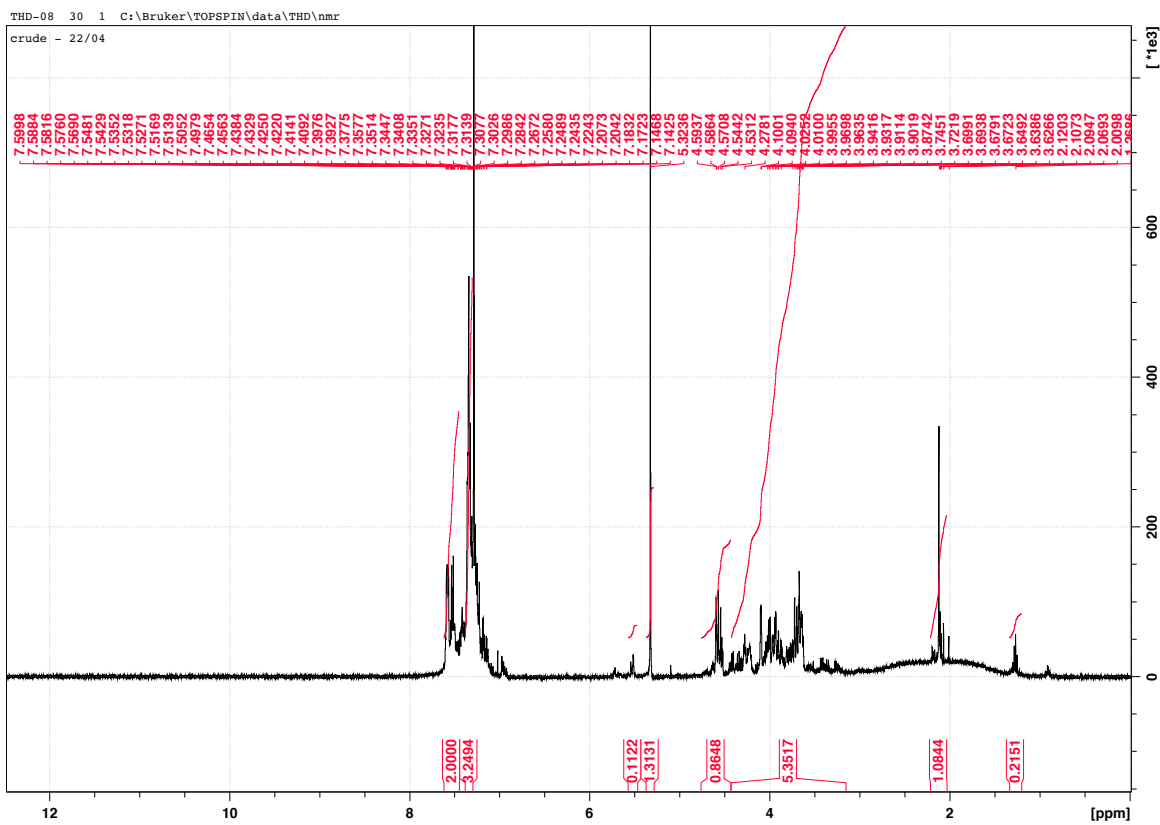
##### Framgangsmåte:

(2R,3S,4S,5R)-2-(acetoxymetyl)-6-(fenyltio)tetrahydro-2H-pyran-3,4,5-triyl triacetat (3,01 g, 11,1 mmol) ble løst i metanol (20 mL). En løsning av NaOMe ble tilsatt blandingen til pH ble målt til ca 8. Deretter ble det brukt fast NaOMe til pH ble målt til ca 9. Etter 24 t ble løsningen ekstrahert med vann (20 mL) og EtOAc (20 mL). Prøven ble tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> og dampet inn.

##### Data:

<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,45-7,62 (m, 2H), 7,30-7,38 (m, 3H), 5,31-5,35 (s, 1H), 4,43-4,75 (m, 1H), 3,17-4,42 (m, 5H).

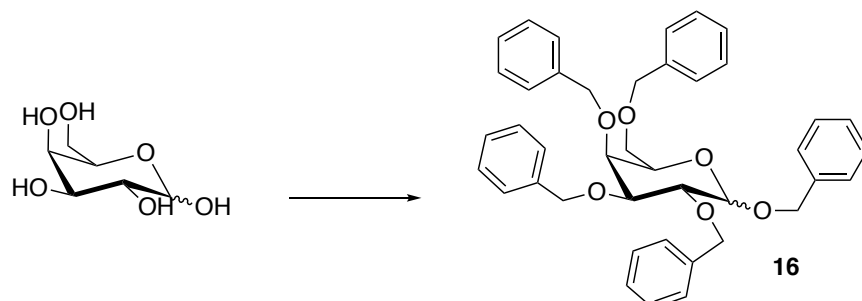




Figur 14  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 15

### 4.3.3 Metode 3

#### 4.3.3.1 Syntese av (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrakis(benzyloksi)-6-((benzyloksi)metyl)tetrahydro-2*H*-pyran (**16**)



Metoden er basert på en prosedyre av Lu *et al.*<sup>36</sup>

#### Framgangsmåte:

En løsning av (3*R*,4*S*,5*R*,6*R*)-6-(hydroksymetyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2,3,4,5-tetraol (5,0 g, 28 mmol) i dimetylformamid (140 mL) ble tilsatt NaH (60% dispersjon i mineral olje, 3,3 g, 83 mmol). Etter 30 minutter med omrøring ble blandingen kjølnet ned i et isbad og porsjonsvis tilsatt benzylbromid (12 mL, 0,10 mmol) over en periode på 5 minutter. Etter 10 minutter ble isbadet fjernet og blandingen sto i 2,5 timer. Prosedyren ble så gjentatt fra og med tilsetningen av natriumhydriden. Etter nye 2,5 timer ble det tilsatt NaH (60% dispersjon i mineral olje, 2,2 g, 55 mmol) og benzylbromid (6,7 mL, 56 mmol) etter hverandre. Etter 24 timer ble den gulhvite blandingen tilsatt metanol (7 mL) sakte. DMF ble så fjernet med ved å dampe inn blandingen på 55 °C. Den ble så fortynnet med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) og vasket med mettet, vandig natriumklorid (100 mL) og deretter vann (100 mL). Blandingene ble tørket med MgSO<sub>4</sub>, filtrert og dampet inn ved 60 °C. Stoffet ble rensert opp med kolonnekromatografi (SiO<sub>2</sub>, heksan:EtOAc 4:1).

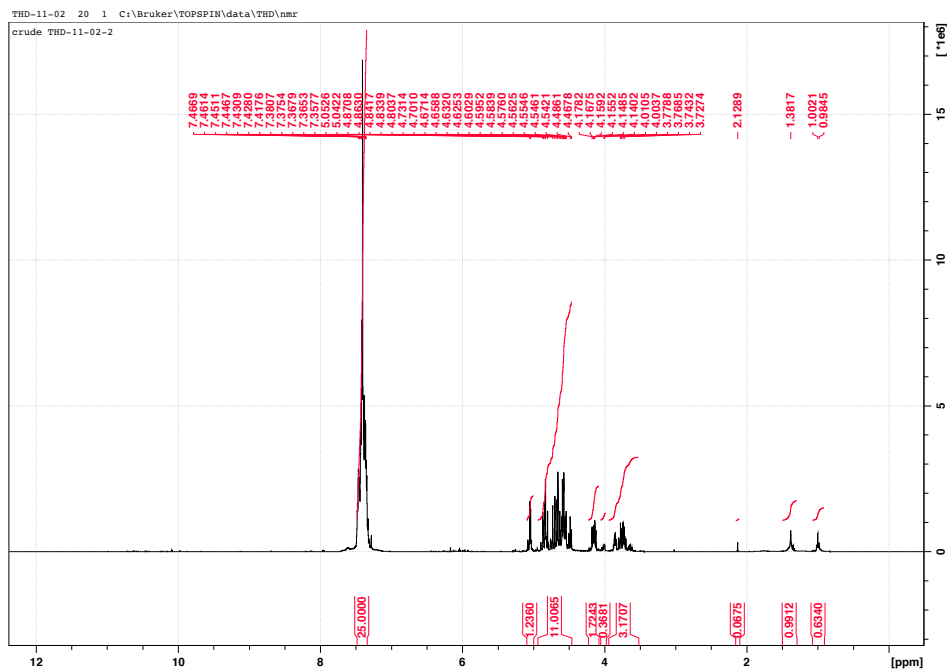
#### Data:

**R<sub>f</sub>:** 0,47 (Heksan:EtOAc 4:1)

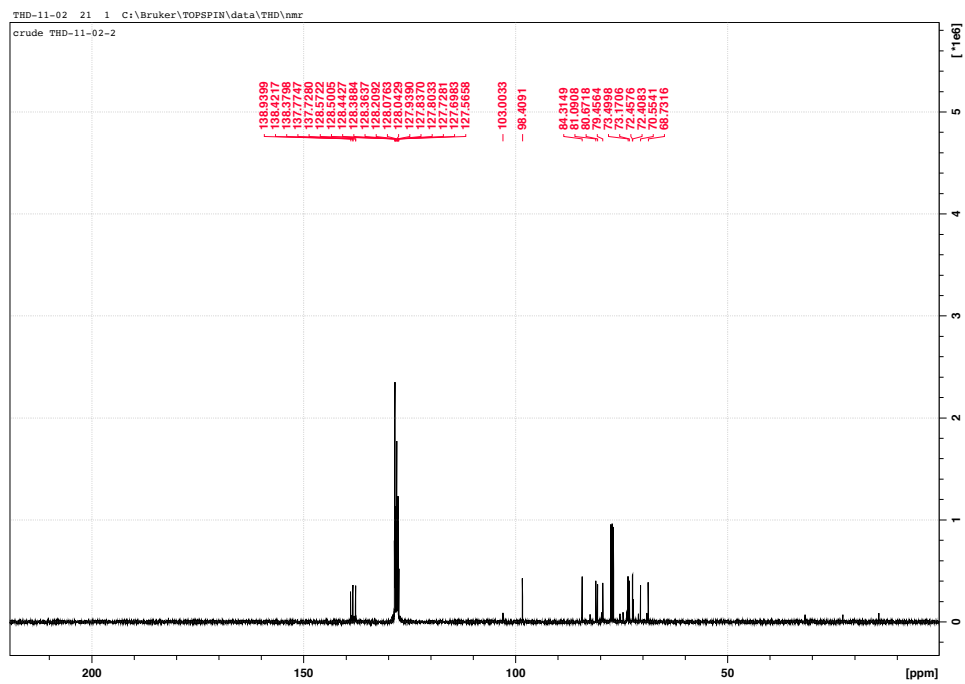
**<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,28-7,50 (m, 25H), 5,02-5,07 (m, 1H), 4,46-4,91 (m, 11 H), 4,11-4,20 (m, 2H), 3,58-3,90 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 138,94 (C), 138,42 (C), 138,38 (C), 137,77 (C), 137,73 (C), 128,57 (CH), 128,50 (CH), 128,44 (CH), 128,39 (CH), 128,36 (CH), 128,21 (CH), 127,94 (CH),

127,84 (CH), 127,80 (CH), 127,73 (CH), 127,70 (CH), 127, 57 (CH), 98,41 (CH), 84,31 (CH), 81,09 (CH), 80,67 (CH), 79,46 (CH), 73,50 (CH<sub>2</sub>), 73,17 (CH<sub>2</sub>), 72,46 (CH<sub>2</sub>), 72,40 (CH<sub>2</sub>), 70,55 (CH<sub>2</sub>), 68,73 (CH<sub>2</sub>).

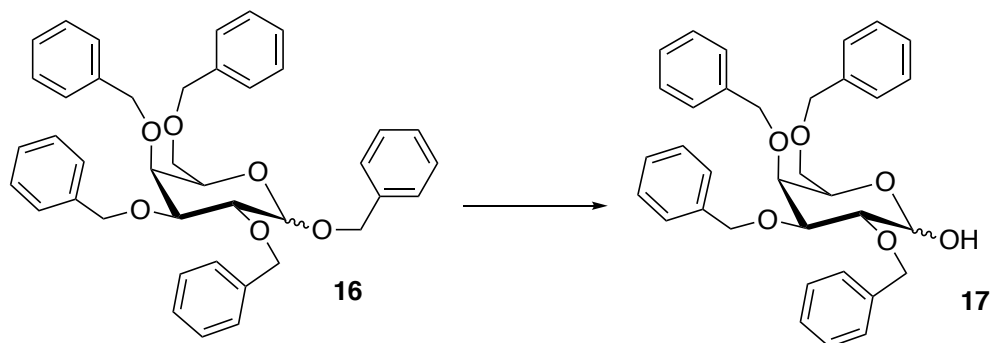


Figur 15 <sup>1</sup>H-NMR-spekter av forbindelse 16



Figur 16 <sup>13</sup>C-NMR-spekter av forbindelse 16

#### 4.3.3.2 Syntese av (3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-tris(benzyloksy)-6-((benzyloksy)metyl)tetrahydro-2*H*-pyran-2-ol (**17**)



Metoden er basert på en prosedyre av Cribiú *et al.*<sup>37</sup>

##### Framgangsmåte:

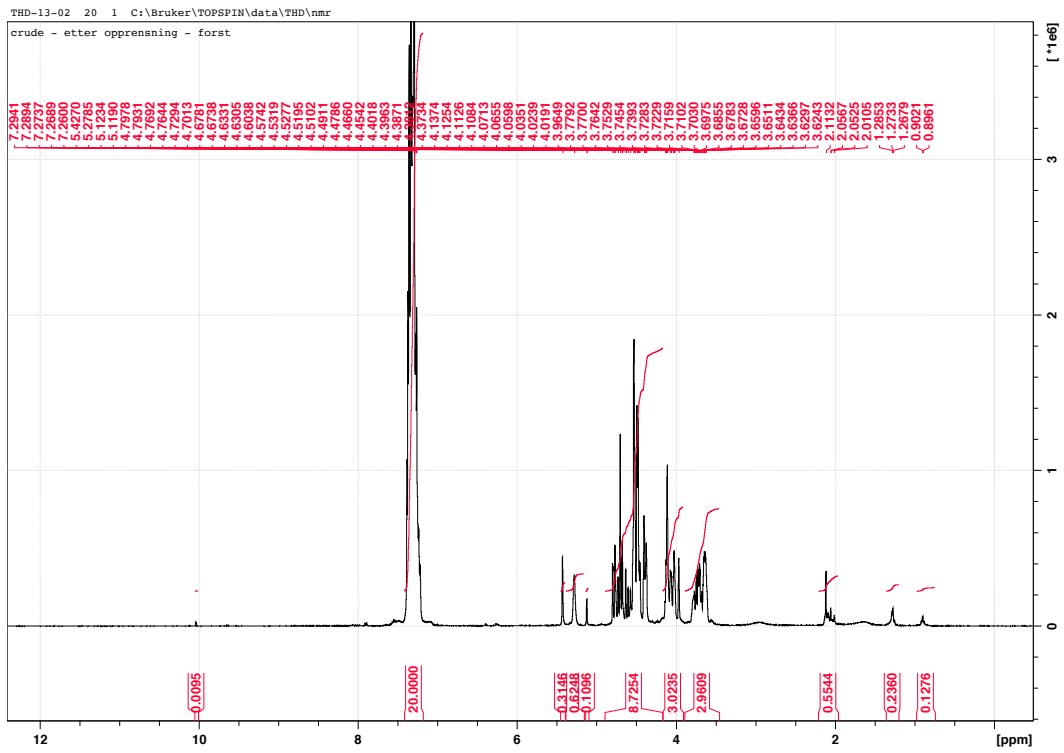
(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-2,3,4,5-tetrakis(benzyloksy)-6-((benzyloksy)metyl)tetrahydro-2*H*-pyran (2,00 g, 3,14 mmol) ble løst i 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4,9 mL) og eddiksyre (37 mL). Blandingen ble varmet opp til 85°C med omrøring og kjølerør. Etter 12 timer ble løsningen kjølnet ned til romtemperatur og stoppet med vann (100 mL). Blandingen ble ekstrahert med toluen (2 x 100 mL). Videre ble den organiske fasen vasket med mettet vandig NaHCO<sub>3</sub> (100 mL), tørket med Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og dampet inn. Stoffet ble rensert opp med kolonnekromatografi (SiO<sub>2</sub>, Heksan:EtOAc 3:1→metanol). Utbytte ble målt til 17 %.

##### Data:

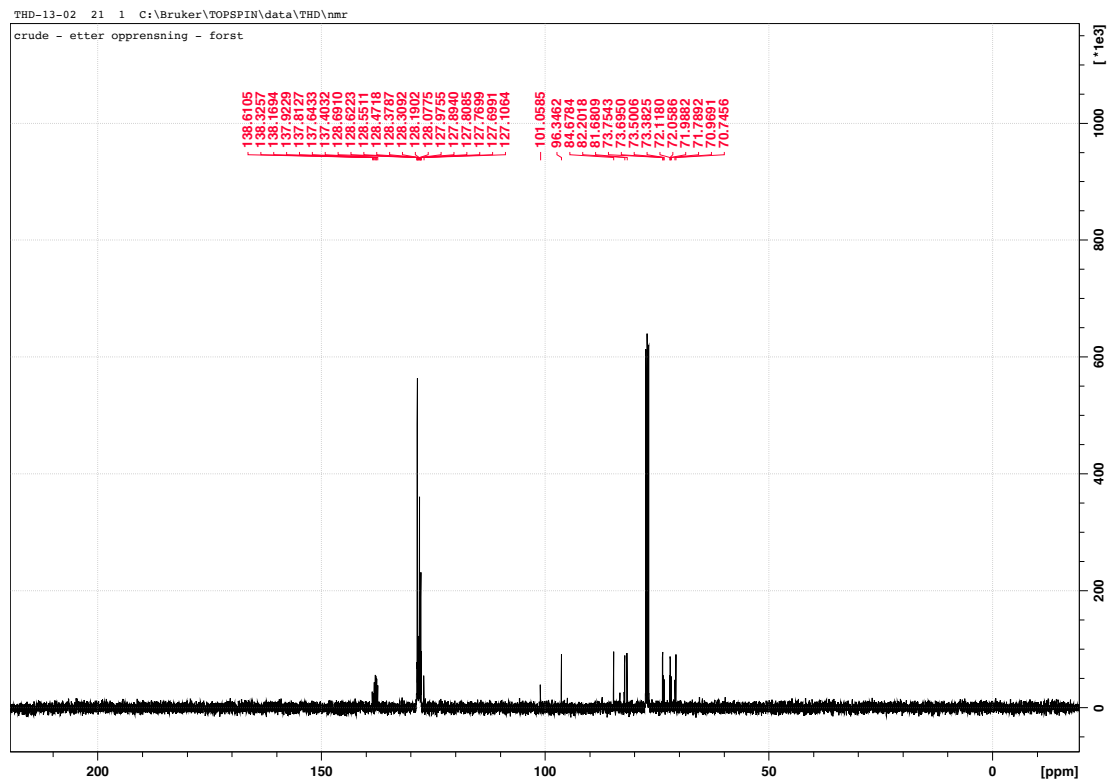
**R<sub>f</sub>:** 0 (Heksen:EtOAc 3:1)

**<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,19-7,42 (m, 20H), 5,23-5,31 (s, 1H), 4,32-4,85 (m, 9H), 3,91-4,17 (m, 3H), 3,46-3,87 (m, 3H).

**<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 138,17 (C), 137,92 (C), 137,81 (C), 137,64 (C), 128,69 (CH), 128,62 (CH), 128,55 (CH), 128,47 (CH), 128,38 (CH), 128,31 (CH), 128,19 (CH), 128,08 (CH), 127,98 (CH), 127,89 (CH), 127,81 (CH), 127,77 (CH), 127,70 (CH), 96,35 (CH), 84,68 (CH), 82,20 (CH), 81,68 (CH), 73,75 (CH<sub>2</sub>), 73,70 (CH<sub>2</sub>), 72,06 (CH<sub>2</sub>), 71,99 (CH<sub>2</sub>), 70,75 (CH<sub>2</sub>).



Figur 17  $^1\text{H}$ -NMR-spekter av forbindelse 17



Figur 18  $^{13}\text{C}$ -NMR-spekter av forbindelse 17

## 5. Referanser

1. Steen, H. *Havforskningsrapporten 2017*; Havforskningsinstituttet: 28.06.2017, 2017; p 75.
2. Mouritsen, O. G., What are seaweeds and marinealgae and where do we find them? In *Seaweeds edible, available & sustainable*, The University of Chicago Press: 2013; pp 2-10. 978-0-226-04453
3. MacArtain, P. G., Christopher I. R.; Brooks, Mariel; Campbell, Ross; Rowland Ian R., Nutritional value of edible seaweeds.(Special Article). *Nutrition Reviews* **2007**, 65 (12), 535-543.
4. Maeda, N. K., Yasuo; Ohtani, Seiji; Sahara, Hiroeki; Kumamoto-Yonezawa, Yuko; Kuriyama, Isoko; Hada, Takahiko; Sato, Noriyuki; Yoshida, Hiromi; Mizushima, Yoshiyuki, Antitumor Effect of Orally Administered Spinach Glycolipid Fraction on Implanted Cancer Cells, Colon-26, in Mice. *Lipids* **2008**, 43 (8), 741-748.
5. Brito-Arias, M., Glycosides, Synthesis and Characterization. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Cham: Springer International Publishing: 2016; p 14. 9783319323084
6. Koskinen, A. M. P., Sugars. In *Asymmetric Synthesis of Natural Products*, John Wiley & Sons: 2012; p 134. 1118347331
7. Lv, Y. Y., Guangli,, Galactose: Chemical structure, dietary sources and clinical significance. In *Galactose : Structure and Function in Biology and Medicine*, Pomin, V. H., Ed. Nova Science Publishers, Inc.: 2014. 978-1-63117-928-0
8. Kohlmeier, M., Galactose. In *Nutrient Metabolism : Structures, Functions, and Genetics*, Elsevier Ltd: 2003; pp 216-222.
9. Dörmann, P. B., Christoph; , Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science* **2002**, 7 (3), 112.
10. Li, H.-m. Y., Chun-Wei,, Chloroplast Galactolipids: The Link Between Photosynthesis, Chloroplast Shape, Jasmonates, Phosphate Starvation and Freezing Tolerance. *Plant and Cell Physiology* **2018**, 59 (6), 1128-1134.
11. Brito-Arias, M., Glycosides, Synthesis and Characterization. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Cham: Springer International Publishing: 2016; pp 46-55. 9783319323084
12. Smith, M. B., Protecting groups. In *Organic Synthesis*, 2011; pp 589-594. 9781890661403
13. Chevalier, R. E., Jacques; Vandewalle, Peggy; Sendid, Boualem; Colombel, Jean-Frederic; Poulain, Daniel; Mallet, Jean-Maurice, Synthetic yeast oligomannosides as biological probes:  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp and  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 3)  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp (1 $\rightarrow$ 2)  $\alpha$ -D-Manp as Crohn's disease markers. *Tetrahedron* **2005**, 61 (32), 7669-7677.
14. Fernandez-Herrera, M. A. L.-M., Hugo; Hernandez-Vazquez, Jose M. V.; Lopez-Davila, Moises; Mohan, Sankar; Escobar-Sanchez, Maria L.; Sanchez-Sanchez, Luis; Pinto, B. Mario; Sandoval-Ramirez, Jesus,, Synthesis and biological evaluation of the glycoside (25R)-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diacetoxy-22-oxocholest-5-en-26-yl  $\beta$ -L-glucopyranoside: A selective anticancer agent in cervicouterine cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, 46 (9), 3877-3886.
15. Oscarson, S., Protective Group Strategies. In *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis group: 2006; pp 64-71. 0-8247-5355-0

16. Oscarson, S., Protective Group Strategies. In *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis group: 2006; pp 54-60. 0-8247-5355-0
17. Smith, M. B., Protecting groups. In *Organic Synthesis*, 2011; pp 594-595. 9781890661403
18. Brito-Arias, M., Glycosides, Synthesis and Characterization. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Cham: Springer International Publishing: 2016; pp 37-38. 9783319323084
19. Heravi, M. M. Z., Vahideh; Esfandyari, Maryam; Lashaki, Tahmineh Baie;, Applications of Sharpless asymmetric dihydroxylation in the total synthesis of natural products. *Tetrahedron: Asymmetry* **2017**, *28* (8), 987-1043.
20. Heravi, M. M. L., Tahmineh Baie; Fattahi, Bahareh; Zadsirjan, Vahideh, Application of asymmetric Sharpless aminohydroxylation in total synthesis of natural products and some synthetic complex bio-active molecules. *RSC Advances* **2018**, *8* (12), 6634-6659.
21. Barry, P. J. C., B. M., Glyceride synthesis. I. Synthesis of symmetrical diglycerides from dihydroxyacetone and allyl alcohol. *Canadian Journal of Chemistry* **1955**, *33*, 716-721.
22. Kumar, B. A., Mushtaq A.; Mukherjee, Debaraj; Chimni, Swapandeep S.; Taneja, Subhash C., Allyl tetrahydropyranyl ether: a versatile alcohol/thiol protecting reagent. *Tetrahedron Letters* **2009**, *50* (46), 6236-6240.
23. Kim, B.-G. J., Eun Jeong; Kwon, Ki Hwan; Yoo, Yeong-Eun; Choi, Doo-Sun; Kim, Jinsang, Controlling Mold Releasing Propensity-The Role of Surface Energy and a Multiple Chain Transfer Agent. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4* (7), 3465-3470.
24. Williams, D. F., Ian;, Nuclear magnetic resonance spectra. In *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, McGraw-Hill Higher Education: 2008; p 164. 9780077118129
25. Johansson, S. J. R. J., Tonje; Ellefsen, Chistine F.; Ristun, Mali S.; Antonsen, Simen; Hansen, Trond Vidar; Stenstrøm, Yngve H.; Nolsøe, Jens M. J., A Convenient Protocol for the Synthesis of Fatty Acid Amides. *Synlett : Accounts and Rapid Communications in Synthetic Organic Chemistry* **2019**, *30* (2), 213-217.
26. Mallik, S. P., Ramesh; Bhattacharya, Anindita; Sen, Prosenjit; , Synthesis of Phosphatidylserine and Its Stereoisomers: Their Role in Activation of Blood Coagulation.
27. Mallik, S. P., Ramesh; Bhattacharya, Anindita; Sen, Prosenjit;, Synthesis of phosphatidylserine and its stereoisomers: Their role in activation of blood coagulation. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2018**, *9* (5), 1948-5875.
28. Kristinsson, B. L., Kaisa M.; Kallio, Heikki; Haraldsson, Gudmundur G., Synthesis of enantiopure structured triacylglycerols. *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25* (2), 125-132.
29. Meng, B. Z., Zhenqian; Baker, David C., 1,2-cis Alkyl Glycosides: Straightforward Glycosylation from Unprotected 1-Thioglycosyl Donors. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2014**, *12* (28), 27.
30. Smith, M. B., Protecting groups. In *Organic Synthesis*, 2011; pp 605-606. 9781890661403
31. Chen, L. Z., Jianbo; Shi, Chunjuan; Wang, Xiaohu; Zhang, Bo; Tang, Jie, Vinyl acetate and sodium carbonate as a fast and efficient catalyst for per-O-acetylation of monosaccharides. *Journal of Chemical Research* **2008**, (7), 380-382.
32. Cheng, M. S. W., Qian L.; Tian, Quan; Song, Hong Y.; Liu, Yong X.; Li, Qiang; Xu, Xin; Miao, Hong D.; Yao, Xin S.; Yang, Zhen, Total Synthesis of Methyl Protodioscin: A Potent Agent with Antitumor Activity. *Journal of Organic Chemistry* **2003**, *68* (9), 3658-3662.

33. Brito-Arias, M., Glycosides, Synthesis and Characterization. In *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Cham: Springer International Publishing: 2016; p 50. 9783319323084
34. Chen, H.-M. W., Stephen G., Syntheses of p-nitrophenyl 3- and 4-thio- $\beta$ -D-glycopyranosides. *Carbohydrate Research* **2010**, *345* (18), 2596-2604.
35. Smith, M. B., Protecting groups. In *Organic Synthesis*, 2011; p 596. 9781890661403
36. Lu, W. N., Latifeh; Taylor, Scott D., An expedient synthesis of benzyl 2,3,4-tri-O-benzyl-O-beta-D-glucopyranoside and benzyl 2,3,4-tri-O-beta-D-mannopyranoside. *Carbohydrate Research* **2005**, *340* (6), 1213-1217.
37. Cribeu, R., K. Eszter Borbas, Ian Cumpstey, On the synthesis of vinyl and phenyl C-furanosides by stereospecific debenzylative cycloetherification. *Tetrahedron* **2009**, *65* (10), 10.
38. Zuffo, M. S., A.; Campos-Salinas, J.; Cabello-Donayreb, M.; Martínez-García, M.; Belmonte-Reche, E.; Pérez-Victoria, J.M.; Mergny, J.L.; Freccero, M.; Morales, J-C.; Doria, F., Carbohydrate-naphthalene diimide conjugates as potential antiparasitic drugs: Synthesis, evaluation and structure-activity studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *163*, 54-66.
39. Nguyen, K.-A. P., Marine; Magnard, Sandrine; Haudecoeur, Romain; Boyere, Cedric; Mounien, Saravanan; Benammar, Ikram; Zampieri, Veronica; Igonet, Sebastien; Chaptal, Vincent; Jawhari, Anass; Boumendjel, Ahcene; Falson, Pierre, Glycosyl-Substituted Dicarboxylates as Detergents for the Extraction, Overstabilization, and Crystallization of Membrane Proteins. **2018**, *57* (11).
40. Busch, B. B. S. C. L. S., Jonathan M.; Shea, Kenneth J., The living polymerization of sulfur ylides. Synthesis of terminally functionalized and telechelic polymethylene. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8330-8337.





**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway