



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2022 60 stp

Fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Syntese av xylan-baserte glykokonjugater

Synthesis of xylan-based glycoconjugates

Hans Olav Hovtun Palm

Kjemi og bioteknologi

Forord

Denne oppgaven ble gjennomført skoleåret 2021/2022. Det praktiske arbeidet med denne oppgaven ble utført ved kjemiavdelingen på fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

Jeg vil takke professor Yngve Stenstrøm og Dr Simen Antonsen (OsloMet) for en interessant oppgave. Takk for god veiledning både ved det praktiske arbeidet og skrivingen. Den har vært uvurderlig og settes stor pris på.

Takk til Anne Gravidahl for bestilling av kjemikalier.

Takk også til Bjørge Westereng og Shaun Leivers for bakgrunn for prosjektet. Takk også for den gode hjelpen dere har gitt ved å komme med gode ideer underveis med det praktiske arbeidet og god hjelp til å få analysert prøver på MALDI-ToF.

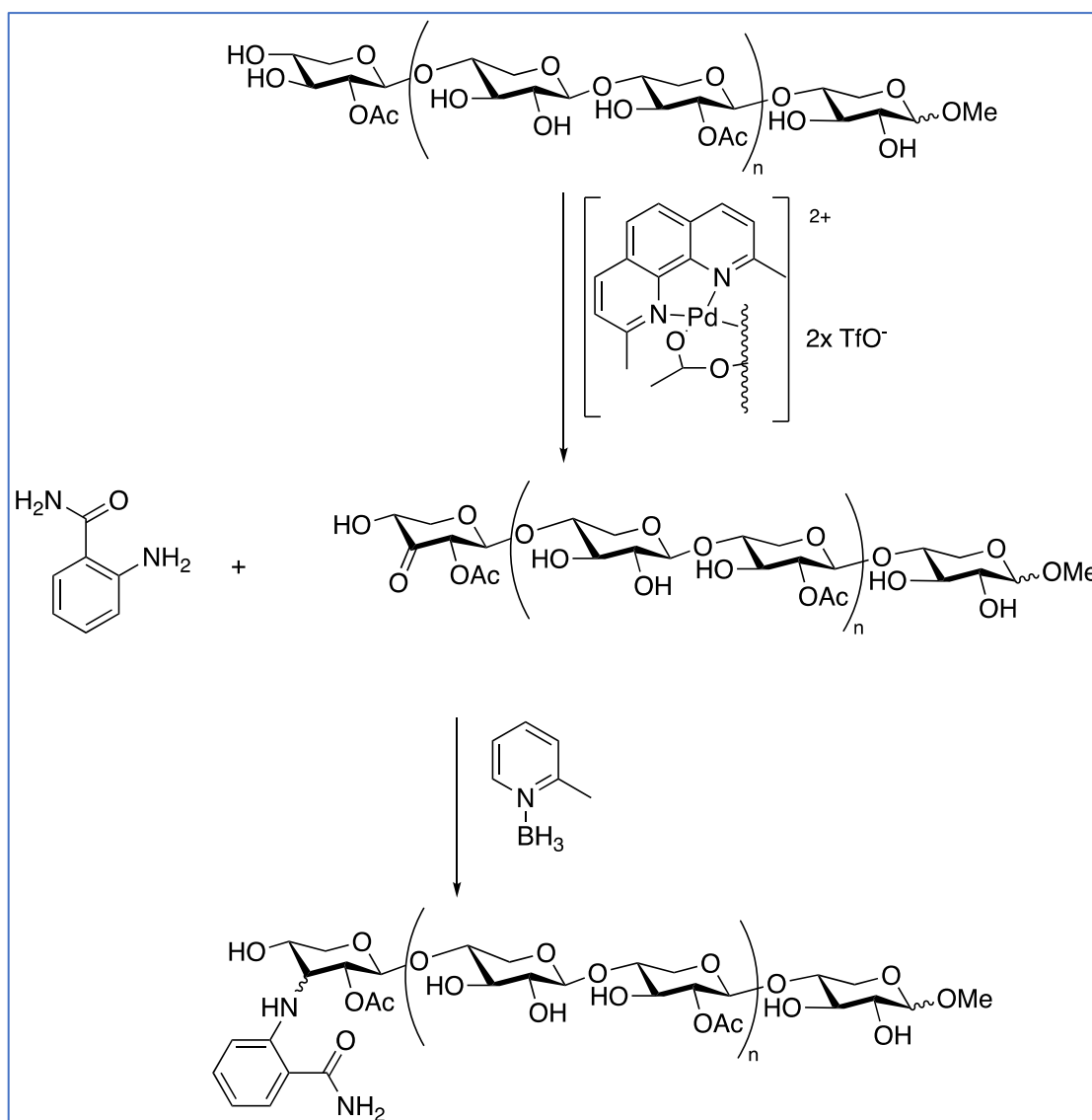
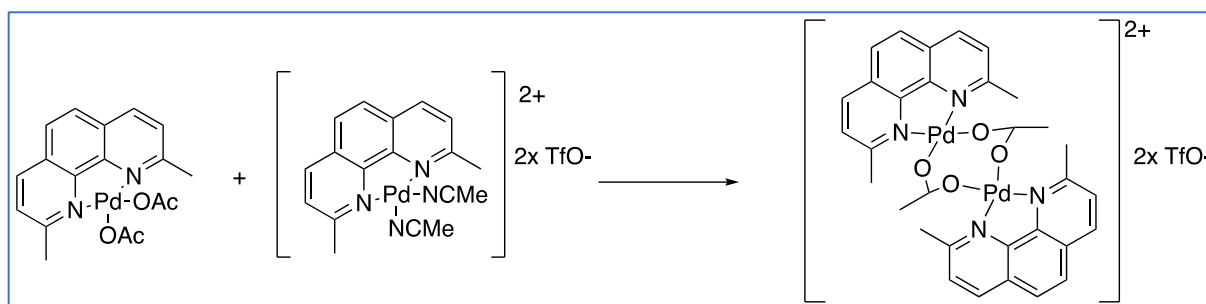
Takk til medstudentene på syntesegruppen for gode samtaler og fine dager på laboratoriet.

Til slutt vil jeg takke familie og venner for støtten dere har gitt meg under studiet.

Ås, mai 2022

Hans Olav Hovtun Palm

Grafisk sammendrag



Sammendrag

Det jobbes stadig mot utvikling av mer bærekraftige og miljøvennlige produkter. Det å danne glykokonjugater ved å modifisere karbohydrater hentet fra trær er et eksempel på dette. Disse produktene vil ha bruksområdet innen en rekke områder som for eksempel medisin. I denne oppgaven skulle xylan, som er hentet fra biomassen til trær, oksideres på C-3 på ikke-reduserende enden. Den nødvendige palladiumkatalysatoren måtte lages separat. Videre skulle den oksiderte xylan-molekylet så modifiseres til et glykokonjugat.

Første del av oppgaven gikk ut på å lage Waymouth-katalysatoren [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(μ -OAc)]₂(OTf)₂. Denne katalysatoren har vist å ha gode egenskaper til å oksidere C-3 hydroksylgruppen på ikke-reduserende enden av oligosakkardier til en karbonylgruppe. Deretter skulle 2-aminobenzamid kobles til karbonylgruppen på xylan via reduktiv aminering. Siden dette fungerte, ble det testet om flere aminer kunne kobles til xylan. Det andre aminet som ble koblet til xylan via reduktiv aminering ble laget ved å reagere palmitoylchlorid med *N*-Boc piperazin. Piperazin-enheten som var mono-beskyttet, ble avbeskyttet noe som gir mulighet for videre reaksjoner. Dette molekylet kan ha emulgatoregenskaper som kan benyttes i fôr-pellets til dyr.

Abstract

Much effort is constantly put in the development of more sustainable and environmental friendly products. Making glycoconjugates by modifying carbohydrates extracted from the biomass of trees is an example of this. These glycoconjugates may have properties which can be used in many fields, for example medicine. In this thesis, xylan, which is extracted from the biomass of trees, was to be oxidized at the C-3 hydroxyl group at the non-reducing end. The necessary palladium-based catalyst was synthesized. The oxidized xylan-molecule was then further modified to become a glycoconjugate.

The first part of the thesis was to synthesize the Waymouth catalyst [(2,9-dimethyl-1,10-fenantroline)Pd(μ -OAc)]₂(OTf)₂. This catalyst has shown good properties to oxidize the C-3 hydroxyl group at the non-reducing end on carbohydrates to a carbonyl group. Then 2-aminobenzamide was attached to the carbonyl group on xylan by reductive amination. Since this reaction worked, it was tested whether more amines could be attached to xylan or not. The second amine to be attached to xylan was made by reacting palmitoyl chloride with *N*-Boc piperazine. The piperazine-unit, which was mono-protected, was then deprotected opening up for further reactions, as well. This molecule may have emulsifier properties which may be used in animal pellets.

Forkortelsesliste

ATP	Adenosin trifosfat (Adenosine triphosfat)
Bn	Benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloksikarbonyl
CDH	Cellbiose dehydrogenase
Dibm	Diisobutyrylmetan
Dipm	Dipivaloylmetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinsyre
FAD	Flavin adenin dinukleotid
HAA	H-atom fjerning (H-atom abstraction)
LPMO	Lytic polysaccharide monooxygenases
NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
P2O _x	Pyranose 2-oksidase
PDH	Pyranose dehydrogenase
Ppyz	Pyrido[2,3-b]pyrazine
RNA	Ribonukleinsyre
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBS	<i>tert</i> -butyldimetyl
THF	Tetrahydrofuran
TMSCl	Trimetylsilyllklorid
TMPPhA	Trimetylfenylamin
TON	Turn over number
ZBNMPP	<i>N</i> -metylpiperidin zinkborhyrdid
Xy	Xyloseenhet

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Grafisk sammendrag	ii
Sammendrag	iii
Abstract	iv
Forkortelsesliste	v
Innholdsfortegnelse	vi
Innledning	1
<i>Mål med oppgaven</i>	1
<i>Naturprodukter</i>	2
<i>Karbohydrater</i>	4
<i>Glykokonjugat</i>	5
<i>Xylan</i>	6
<i>Kjemisk bakgrunn</i>	6
<i>Karbohydratkjemi</i>	6
<i>Beskyttelsesgrupper</i>	8
<i>Regioselektive reaksjoner</i>	9
<i>Amidsyntese</i>	12
<i>Reduktiv aminering</i>	14
<i>Organometallisk kjemi</i>	17
<i>Regioselektiv oksidasjon</i>	19
<i>Enzymatisk oksidasjon</i>	24
<i>Mikrobølgeoppvarming</i>	26
<i>Syntesestrategi</i>	27
Resultater	31
<i>Syntese av palladiumkatalysator 41</i>	31
<i>Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ 39</i>	31
<i>Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ 40</i>	32
<i>Syntese av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ 41</i>	32
<i>Metylering av den reduserende enden til xylan 15a</i>	33
<i>Optimalisering</i>	35
<i>Oksidasjon av xylan</i>	35
<i>Oksidasjon av xylan med ikke-beskyttet reduserende ende</i>	36
<i>Oksidasjon av xylan med metylert reduserende ende</i>	38
<i>Test av katalysatoren sin holdbarhet</i>	38
<i>Test av mengde tilsatt katalysator</i>	39

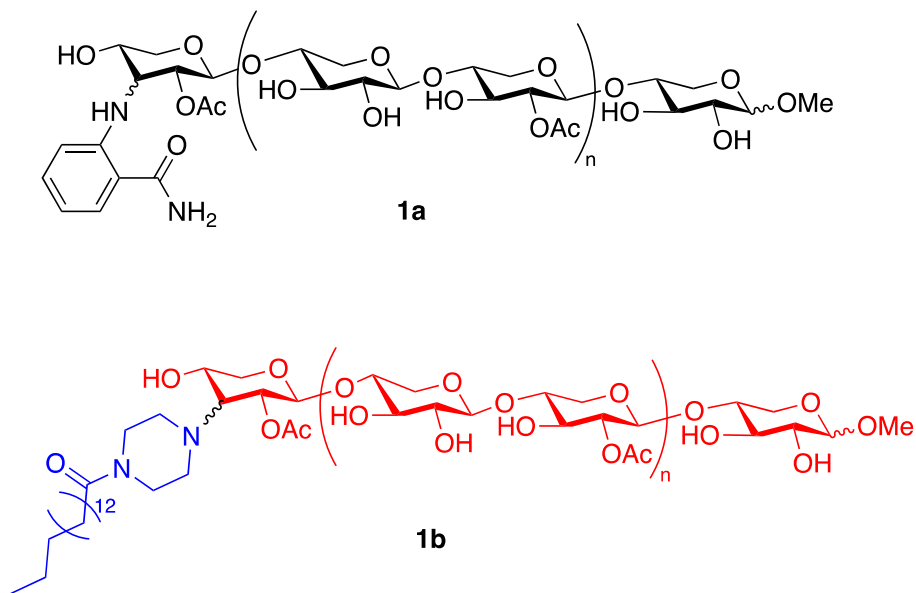
Tilsetning av etylbenzen og styren 54	39
Mikrobølgeoppvarming	39
2AB (2-aminobenzamid (68))-merking, dannelse av målmolekylet 1a	41
Syntese av 1-(palmitinoyl) piperazin 72	42
Syntese av tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat 71	42
Avbeskytning av tert-butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat 71	43
Dannelse av målmolekylet (1b)	44
To timer mikrobølgeoppvarming på 90 og 120 grader, hvor det skummet over	44
5 dager i romtemperatur	45
Mikrobølgeoppvarming på 90 og 120 grader	45
Diskusjon	46
Konklusjon og videre arbeid	56
Eksperimentelt	59
Syntese av palladumkatalysatoren 41	59
Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc) ₂ 39	59
Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN) ₂ OTf ₂ 40	62
Syntese av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)] ₂ OTf ₂ 41	65
Metylering av reduserende enden til Xylan 15a	68
Metylering ved bruk av mikrobølgeoppvarming	74
Optimaliseringsforsøk som ikke fungerte	74
Oksidasjon av Xylan med ikke-beskyttet reduserende ende 15a	74
Oksidasjon av Xylan med metylert reduserende ende 15b	75
Forsøk som ikke fungerte	75
Forsøk som fungerte	75
Test av katalysatoren	76
Test av mengde tilsatt katalysator	77
Mikrobølgeoppvarming	78
2AB (2-aminobenzamid (68))-merking	80
Dannelse av målmolekylet 1a	80
2AB-merking av 15a	81
Syntese av 1-(palmitinoyl) piperazin 72	81
Syntese av tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat 71	81
Avbeskyttelse av tert butyl 4-(palmitinoyl) piperazin-1-karboksylat 71	85
Dannelse av målmolekylet 1b	88
Mikrobølgeoppvarming to ekstraksjoner, skummet over	88
Mikrobølgeoppvarming fire ekstraksjoner, skummet over	88
Mikrobølgeoppvarming fire ekstraksjoner	89
Romtemperatur	89
Referanseliste	93

Innledning

Mål med oppgaven

Det er stadig større oppmerksomhet rundt utviklingen av mer miljøvennlig og bærekraftige måter å lage nyttige produkter. Et eksempel på dette er å hente ut polysakkarider fra biomassen til trær. Dette blir sett på som den største kilden til fornybare hydrokarboner.¹ Polysakkaridene kan videre modifiseres til et godt utvalg av glykokonjugater som for eksempel kan benyttes til å lage vaksiner for medisinsk behandling.²⁻⁴ Disse modifikasjonene kan enten gjøres via enzymatisk eller kjemisk katalyse. For eksempel er LPMOer (lytic polysakkarid monooksydaser) enzymer som har blitt benyttet for å få en oksidasjon til å skje ved et bestemt karbon i cellulose/kitin/mannan/xylan.⁵ Posisjonene som LPMOene kan oksidere i cellulose er enten C1 eller C4. Karbonylgruppen kan brukes til videre kjemisk modifisering som for eksempel reduktiv aminering.

Oksidasjon av den ikke-reduserende enden til karbohydrater kan også skje via kjemisk katalysator. Målet med denne oppgaven er å undersøke om den etablerte prosedyren for oksidasjon av karbohydrater og reduktiv aminering kan benyttes på xylan til å lage målmolekylet (**1a**). Og hvis dette virker så er det et sekundært mål å se om andre aminer også kunne kobles til xylan. Disse er illustrert i Figur 1.

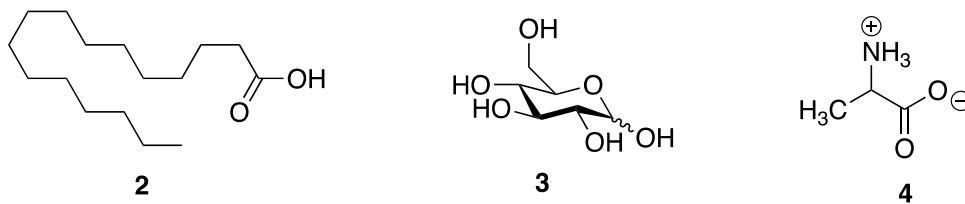


Figur 1 viser strukturen til målmolekylene **1a** og **1b**. Glykokonjugatet **1b** består av en polar del (rød) og en upolar del (blå)

For å komme fram til målmolekyl **1a** og **1b** illustrert i Figur 1 måtte en palladium-basert katalysator syntetiseres. Målmolekylet **1a** og **1b** er forbindelser som ikke forekommer i naturen. Målmolekylet **1b** inneholder en polar del og en upolar del som gir den egenskaper som en emulgator. Hovedmålet med oppgaven er å benytte seg av biomasseavfall fra trær for å lage et bærekraftig produkt som kan benyttes som emulgator i fôr-pellets til dyr.

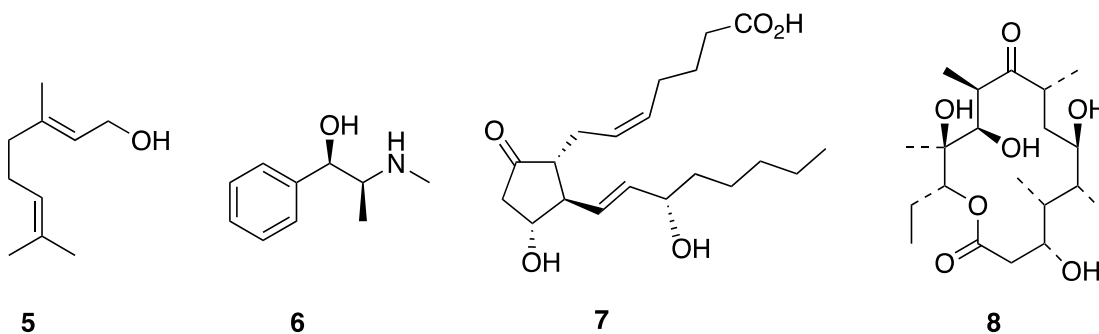
Naturprodukter

Naturstoffkjemi omhandler kjemien til alle forbindelser som metaboliseres av levende organismer. Alle levende organismer produserer en rekke organiske forbindelser som er nødvendig for at organismen skal kunne overleve. Disse forbindelsene kan deles inn i primære og sekundære metabolitter avhengig om forbindelsene er essensielle for liv eller ikke. Primære metabolitter er de naturproduktene som er essensielle for at en organisme skal kunne være levedyktig. Dette inkluderer for eksempel nukleinsyrer, karbohydrater, fettsyrer og aminosyrer.⁶ Disse metabolittene finnes i alle organismer og er viktige for utvikling og reproduksjon. Figur 2 illustrerer noen eksempler.



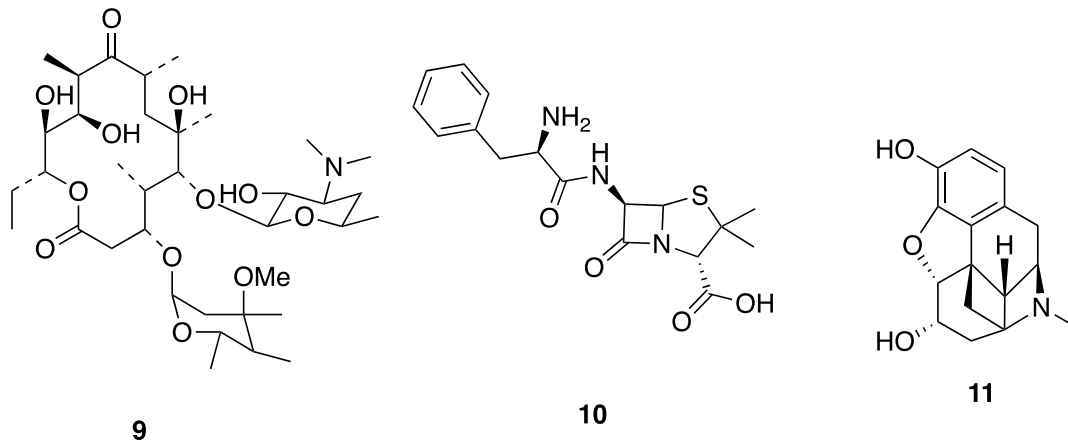
Figur 2 viser strukturen på primær metabolittene palmitinsyre (2), glukose (3), og alanin (4)

Sekundære metabolitter er ikke nødvendigvis vitale for en organisme. Derfor vil hvilke sekundære metabolitter som finnes i ulike arter variere ut fra arten sitt behov. De sekundære metabolittene har egenskaper som er en fordel for organismen ved å for eksempel gi beskyttelse eller tiltrekke seg bytte. Eksempler på sekundære metabolitter er terpenener, alkaloider, prostagladiner og polyketider.⁶ Noen eksempler er illustrert i Figur 3.



Figur 3 viser strukturen til de sekundære metabolittene geraniol (5), efedrin (6), prostagladinet PGE₂ (7) og erytronolid B (8)

Noen kjente sekundære metabolitter er veldig viktig for medisin er antibiotikum og diverse smertestillende forbindelser. Enkelte beta-lactamer og modifiserte polyketider har antibiotisk effekt. Et eksempel på dette er penicillin G. En rekke kraftige smertestillende medisiner som blir brukt etter blant annet en operasjon er alkaloider som for eksempel morfin. Figur 4 viser strukturen til noen forbindelser som enten har antibiotisk effekt eller brukes som smertestillende.

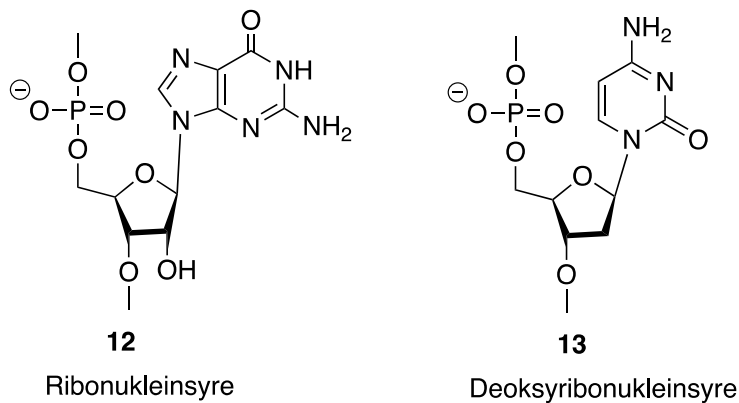


Figur 4 viser noen naturprodukter med antibiotisk eller smertestillende effekt. Erytromycin A (9), penicillin G (10), og morfin(11)

Karbohydrater

Karbohydrater er en samlebetegnelse for forbindelser med en generell formell $C_x(H_2O)_x$.⁷ Karbohydrater dannes i fotosyntesen ved at planten omgjør karbondioksid (CO_2) og vann (H_2O) til et karbohydrat med formelen $C_6(H_2O)_6$. Karbohydrater kan brukes som energi, energilager, eller omdannes til andre strukturellekomponenter som planten trenger.⁷ Et eksempel på en viktig komponent for planter er cellevegg. Celleveggen blir bygd opp av lignin, hemicellulose og cellulose. Sistnevnte er den mest forekommende organiske forbindelsen på jorden.

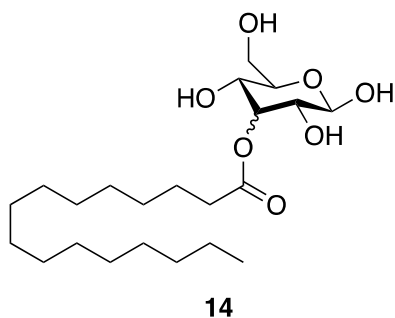
Karbohydrater er viktige forbindelser for at det skal kunne eksistere liv på jorden. De er byggesteiner i RNA(12) og DNA(13) via ribose og deoksyribose, og er derfor en essensiell del i arvematerialet til levende organismer.⁷ De er med på å bygge opp «ryggraden» i nukleinsyrene som er en essensiell del av arvestoffet, illustrert i Figur 5.



Figur 5 viser strukturen til RNA(12) og DNA(13)

Glykokonjugat

Glykokonjugat er en generell betegnelse for en forbindelse hvor et karbohydrat er kovalent bundet til en annen stoffklasse, for eksempel peptider, proteiner og lipider. Et eksempel på et glykokonjugat (**14**) er illustrert i Figur 6.

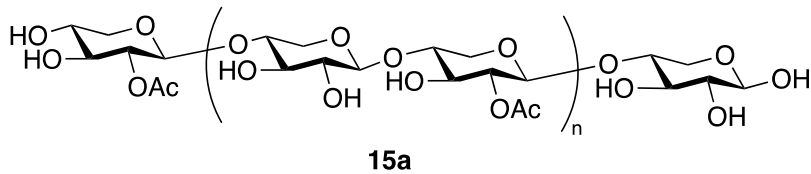


Figur 6 viser på glykokonjugatet **14** basert på glukose

Disse forbindelsene har viktige biologiske funksjoner.⁸ Glykolipider og glykoproteiner er vanlige glykokonjugater å finne på overflaten til celler. Dette kommer av at proteinbundet glykaner er viktige biologiske makromolekyler.^{2,4,9} Disse molekylene spiller blant annet en rolle i reseptoraktivering, kommunikasjon mellom cellene og mellom cellene og omgivelsene. I tillegg markerer glykokonjugater proteiner som skal transporteres eller destrueres. De er også viktige for å kunne gjenkjenne signalmolekyler (vekstfaktorer) eller signaler som tyder på virus- eller bakteriellinfeksjon.⁸

Xylan

Xylan (**15a**) er en type hemicellulose og er det tredje mest forekommende polysakkaridet på jorden etter cellulose og kitin. Xylan **15a** er et polysakkarid bygd opp av pentosen xylose. Glykosidbindingen som binder xyloseenhetene sammen er beta 1-4, se Figur 7.

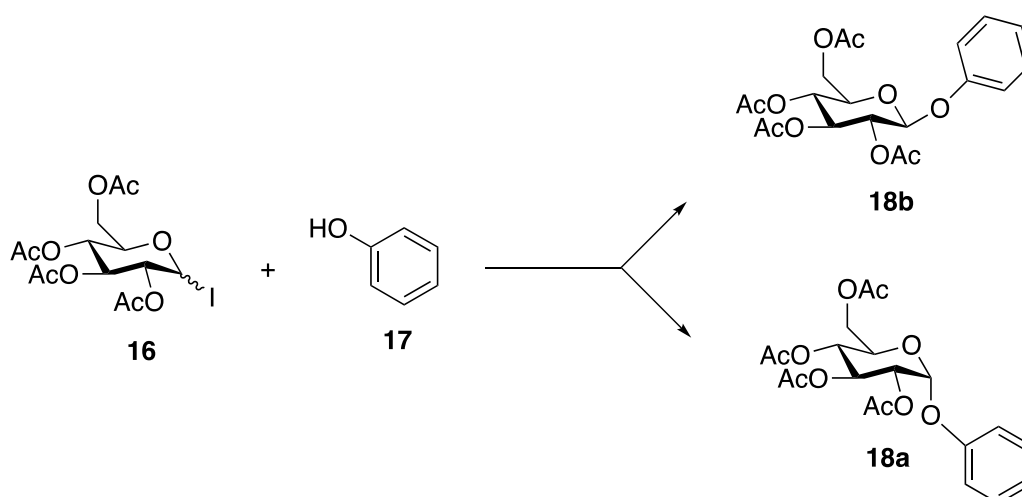


Figur 7 viser en forenklet struktur til xylan **15a**

Kjemisk bakgrunn

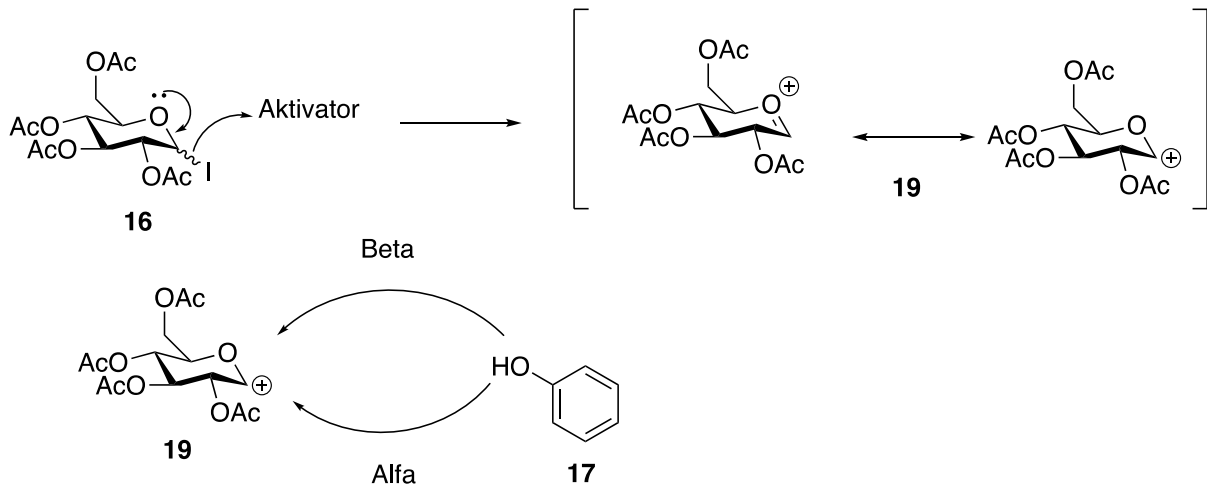
Karbohydratkjemi

Karbohydratkjemi omhandler syntesen, reaksjoner, og funksjonaliteten til karbohydrater. Et område som det gjøres mye arbeid på er arbeidet for å oppnå selektive reaksjoner. Denne interessen kommer av et ønske om å kunne gjennomføre stadig flere reaksjoner innenfor karbohydratkjemien uten å måtte beskytte enkelte hydroksylgrupper. Skjema 1 illustrerer et eksempel på glykosylering.



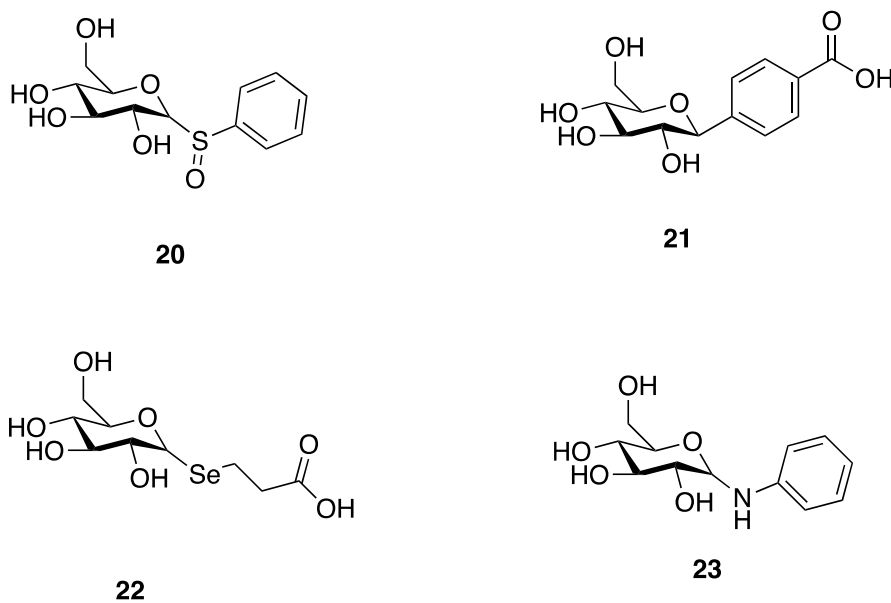
Skjema 1 viser et eksempel på en glykosyleringsreaksjon

Glykosyleringsreaksjon er sentral del av karbohydratkjemien. Glykosylering er en reaksjon hvor en glykosyldonor (**16**) og en glykosylakseptor (**17**) danner en glykosidbinding.¹⁰ Denne bindingen kan være på enten alfa- eller beta-form avhengig om det nukleofile angrepet skjer ovenfra (beta) eller nedenfra (alfa). Skjema 2 illustrerer denne mekanismen.



Skjema 2 illustrerer mekanismen i glykosyleringsreaksjoner

I tillegg til O-glykosider så finnes det også S-, C-, Se-, og N-glykosider.¹¹ Det som skiller disse glykosidene fra O-glykosider er at oksygenet i glykosidbindingen er byttet med et annet grunnstoff, for eksempel svovel. Eksempler på ulike glykosider er illustrert i Figur 8.

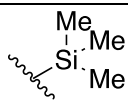
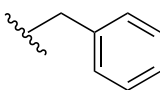
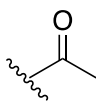
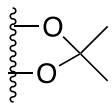


Figur 8 viser et eksempel på S-glykosid(20), C-glykosid(21), Se-glykosid(22), og N-glykosid(23)

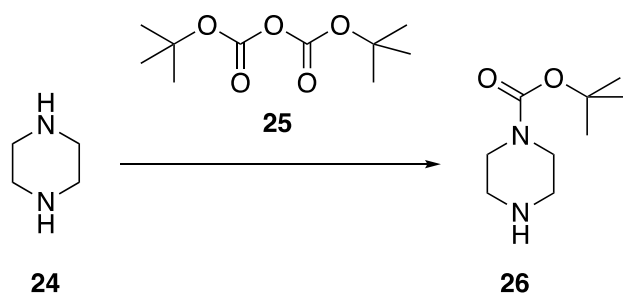
Beskyttelsesgrupper

I karbohydrat kjemien er beskyttelsesgrupper ganske vanlig. Dette kommer av at suktermolekylet inneholder mange like funksjonelle grupper (hydroksylgrupper). Den anomere OH-gruppen blir vanligvis beskyttet som et acetal. Siden de ulike hydroksylgruppene på karbohydrater har ganske lik reaktivitet, må ofte brukes beskyttelsesgrupper hvis reaksjonen skal foregå på en bestemt hydroksylgruppe. Vanlige beskyttelsesgrupper i karbohydratkjemien har vært estere, eter, og sykliske acetaler.¹² For de ulike kategoriene av beskyttelsesgruppene finnes det flere alternativer. For de ester-baserte gruppene er det vanligst med enten acetyl eller benzoyl, men også kloracetyl benyttes. Eter-baserte beskyttelsesgrupper kan enten være allylisk eter eller silyleter. For sykliske acetaler er det benzylid og isopropylid vanligst. Disse skiller seg fra de andre med at disse beskytter to hydroksylgrupper.¹²

Tabell 1 viser en oversikt over noen beskyttelsesgrupper som benyttes i karbohydratkjemien

Beskyttelsesgruppe	Introduksjonsbetingelser	Struktur	Avbeskytningsbetingelser
Trimetylsilyl (Me ₃ Si)	Trimetylsilylchlorid (TMSCl), imidazol		Tetrabutyl- amoniumflourid (TBAF)
Benzyl (Bn)	BnBr, NaH		Na/NH ₃ (l)
Acetyl (Ac)	Ac ₂ O, pyridin		CH ₃ ONa i MeOH
Isopropyliden	Dimetoksiopropan, H ⁺		AcOH

Også blant aminer blir beskyttelsesgrupper benyttet. En vanlig beskyttelsesgruppe hos aminer er *tert*-butyloksikarbonyl (Boc). Funksjonaliteten som dannes er et karbamat.

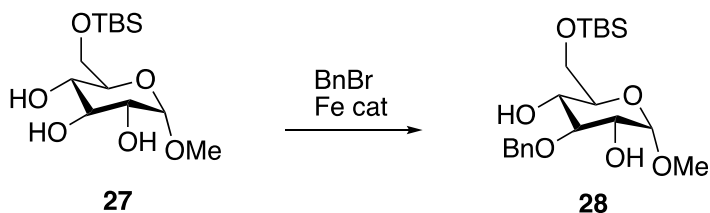


Skjema 3 viser hvordan et piperazin(24) beskyttes av tertbutyloksikarbonyl

Regioselektive reaksjoner

Historisk sett har det vært stort behov for beskyttelsesgrupper i karbohydratkjemien. Dette kommer av at karbohydrater inneholder hydroksylgrupper som har ganske lik reaktivitet. Behovet for beskyttelsesgrupper gjør en syntese mer ineffektiv siden det introduseres to ekstra trinn, ett trinn for å sette på beskyttelsesgruppen og ett for å fjerne den. Siden regioselektivitet historisk har vært et problem innen karbohydratkjemien jobbes det for å lage nye prosedyrer som skal løse dette problemet.¹³ Samtidig jobbes det også for at de nye metodene i tillegg til å være regioselektive også skal være bærekraftige. Dette innebærer utvikling av katalysatorer.¹³ Et eksempel på et resultat av dette arbeidet er katalysator-assistert regioselektiv alkylering.

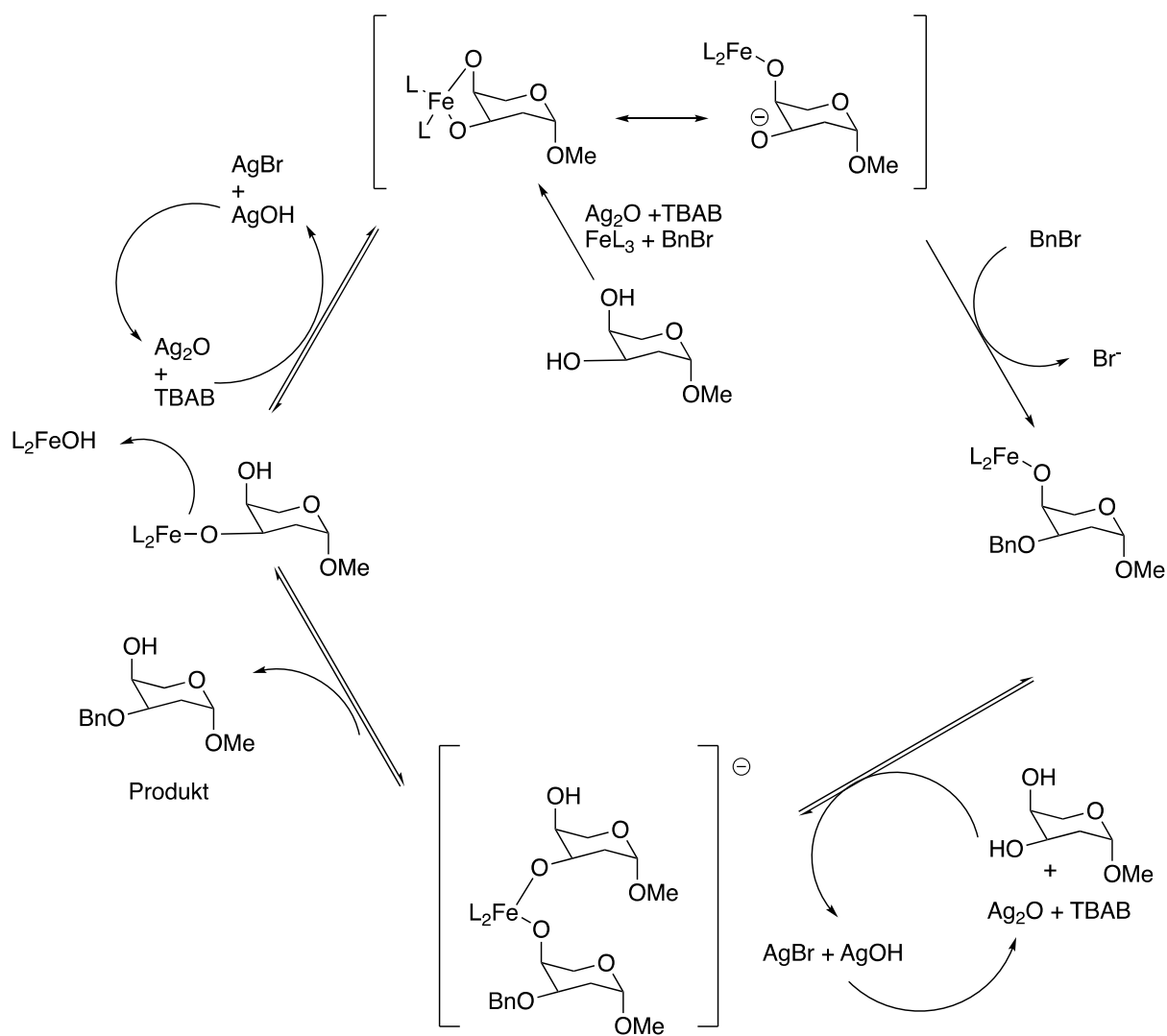
Regioselektiv alkylering er generelt sett viktig innenfor organisk syntese, og spesielt innenfor modifisering av karbohydrater.¹⁴ Ved å benytte seg av en katalysator vil det være mulig å få en alkylering til å skje ved en bestemt hydroksylgruppe på et karbohydrat. Til disse reaksjonene har en rekke metaller blitt benyttet. Blant annet har jern- og bor-baserte katalysatorer vist seg å være ganske selektive og gi gode reaksjonsutbytter.¹⁴ Skjema 4 illustrerer en C3 alkylering med en jern-basert katalysator



Skjema 4 viser selektiv C3 alkylering

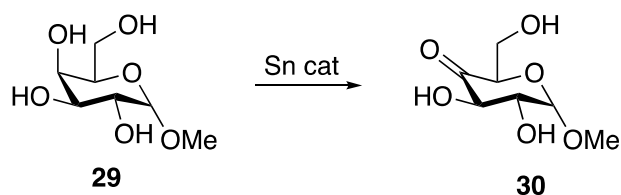
Bakgrunnen for forsøket var ønsket om å utvikle en bærekraftig og ikke-giftig katalysator. Tidligere forsøk hadde vist at organotinn potensielt kan være giftig og bør derfor unngås, og organobor hadde begrenset bruksområdet.¹⁴ En gruppe ledet av Ren fant ut at en organojern-forbindelsen $\text{Fe}(\text{dibm})_3$ (dibm, diisobutyrylmetan) fungerte godt som katalysator med Ag_2O og tetrabutylammoniumbromid (TBAB) som co-katalysatorer. Jern ble valgt siden jern har høy forekomst i naturen, rimelig pris og er ikke-giftig. Det at organojern-katalysatoren fungerte på en rekke ulike forbindelser gjorde at gruppen ledet av Ren mente deres katalysator kunne erstatte organotinn-katalysatorer. En liten ulempe som gruppen oppdaget, var at selv om jern er billig så gjelder ikke det dibm. Det resulterte i at gruppen utviklet en ny ligand, dipm (dipivaloylmetan). Prisen til dipm er 20% av prisen til dibm. Selv om den nye katalysatoren $\text{Fe}(\text{dipm})_3$ kostet mindre så var den katalytiske effekten omtrent lik.¹⁴

Mekanisme som forklarer hvordan katalysatorer fungerer er ikke klarlagt, men gruppen til Ren har kommet med et forslag til mekanisme. Den foreslåtte mekanismen er illustrert i Skjema 5.¹⁴



Skjema 5 viser den foreslåtte mekanismen til C3 selektiv alkylering

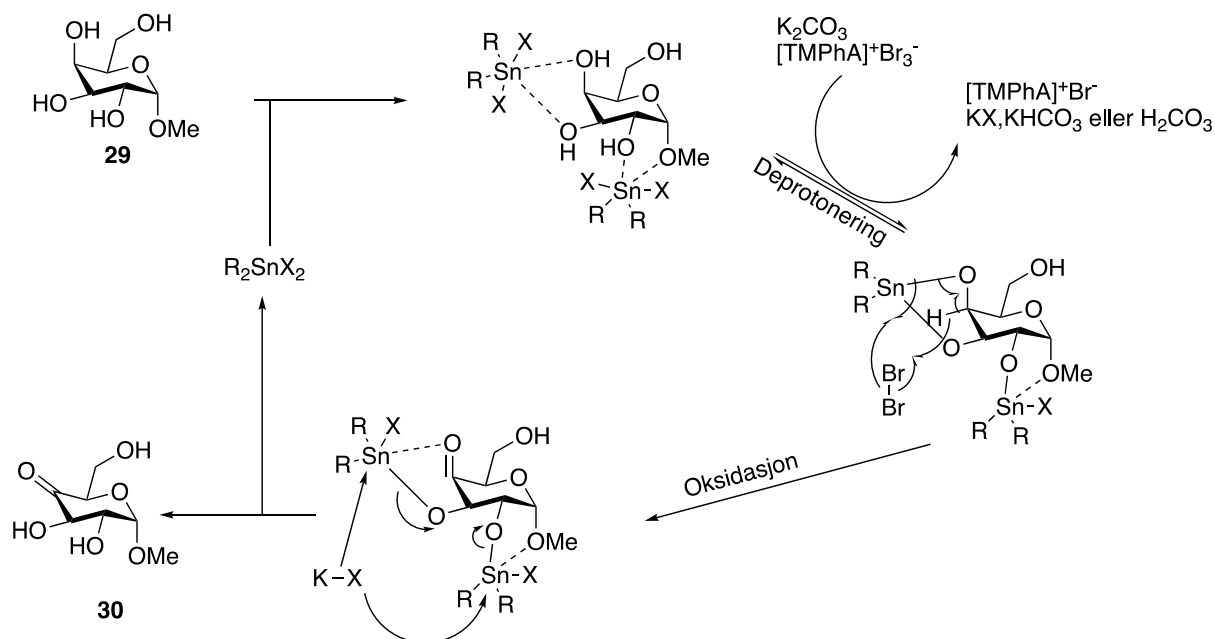
En annen regioselektiv reaksjon er katalytisk oksidasjon av C4-OH på D-galactopyranoser (se Skjema 6).¹⁵ Den skiller seg noe ut fra katalytisk oksidasjon av C3-OH i glycopyranoser ved bruk av Waymouth katalysatoren som er beskrevet under avsnittet om organometallisk kjemi.



Skjema 6 viser hvordan en organotin katalysator selektivt oksiderer den aksiale hydroksylgruppen i en 1,2 glykol

Metoden går ut på at en organotin-katalysator oksiderer den aksiale hydroksylgruppen for 1,2-glykoler. For galaktose gir dette en oksidasjon i C4-posisjonen. Den regioselektive

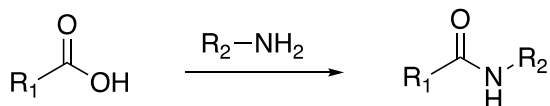
oksidasjonen skjer i nærvær av katalysatoren Oc_2SnCl_2 (dioktyl-tinndiklorid)¹, oksidanten trimetylfenylamin tribromid, og vannfri K_2CO_3 . Løsningsmiddelet var 4:1 tetrahydrofuran (THF) og metanol (MeOH). Det er ingen bekreftet mekanisme for oksidasjonen, men i Skjema 7 er det en foreslått mekanisme.



Skjema 7 viser en foreslått mekanisme for hvordan C4-OH i galaktose blir oksidert.

Amidsyntese

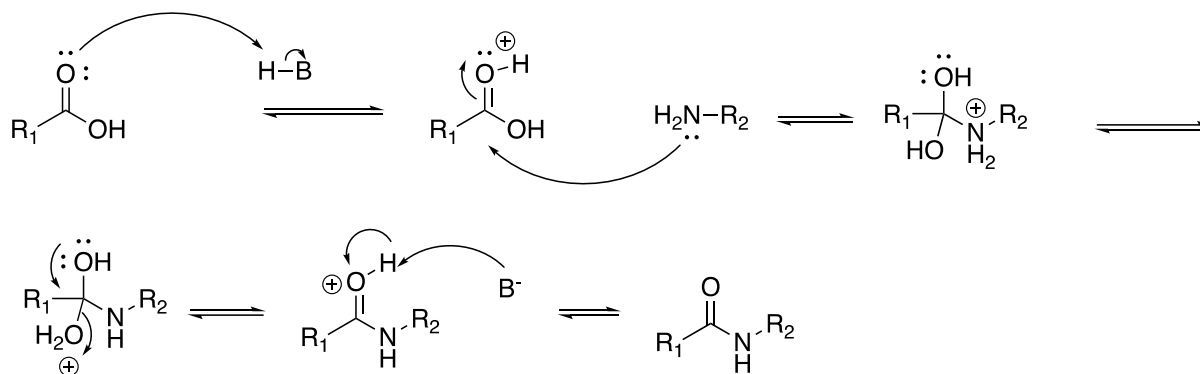
Amid er en forbindelse som dannes ved at en karboksylsyre eller et syrederivat reagerer med et amin. Bindingen kalles også for peptidbinding siden amidgruppen er sentral i oppbyggingen av peptider og proteiner. En generell amidsyntese er illustrert i Skjema 8.



Skjema 8 viser en generell fremstilling av amid dannelse

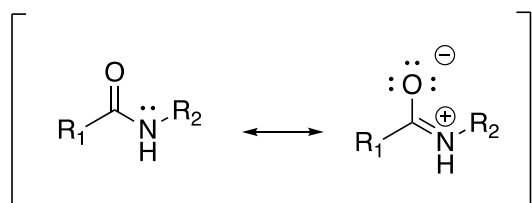
¹ Hva forkortelsen «Oc» står for sto det ingenting ting om i referansen. Mistanken om at Oc er forkortelsen til oktyl ble bekreftet ved å finne den molare massen til dioktyltinndiklorid var på 416g/mol og i eksperimentell-delen til referansen sto det at 4,2 mg(0,01mmol) katalysator ble benyttet. Ved rask omregning så gir dette en molarmasse på 420 g/mol som stemmer ganske godt med de 416 g/mol som ble funnet på <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/77080>, den 11.3-22 kl 15:00. forskjellen på 4 g/mol skyldes nok en avrunding i referansen

Reaksjonsmekanismen starter ved at syren blir aktivert av en katalytisk mengde H_3O^+ som dannes ved for eksempel å tilsette HCl i vann. Reaksjonsmekanismen er illustrert i Skjema 9.



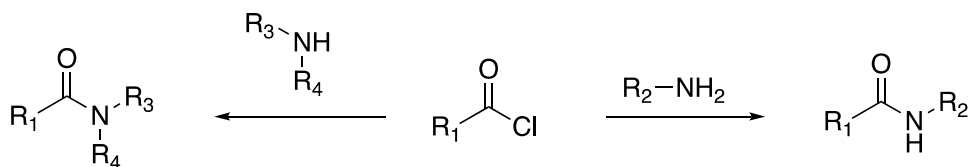
Skjema 9 viser reaksjonsmekanismen for en syrekatalysert amidsyntesen

Nitrogenet i amidbindingen har et ledig elektronpar som gir opphav til to ulike resonansformer (Figur 9). Resonansformene viser at elektronparet som var fritt hos aminet nå er delokalisert og dermed mye mindre tilgjengelig. De to resonanshybridene er med å forklare hvorfor bindingen er lite reaktiv og veldig stabil.



Figur 9 viser resonansformene som en amidbinding har

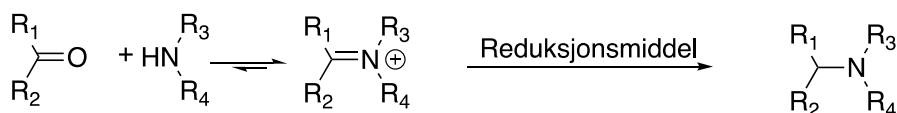
Amidsyntese der en karboksylsyre reagerer med et amin skjer kun ved svært høye temperaturer.¹⁶ Dette skyldes at aminet reagerer som en base med karboksylsyren og danner ammoniumsaltet. Dermed forsvinner de nukleofile egenskapene til aminet og de elektrophile egenskapene til karboksylsyren. En måte å aktivere syren på er å omgjøre den til en acylekvivalent.^{17, 18} Et annet alternativ er å bruke enten syreklorid eller syreanhydrid som er de mest reaktive syrederivatene.^{18, 19} Skjema 10 illustrerer amidsyntese ved bruk av et syreklorid.



Skjema 10 viser en generell amidsyntese

Reduktiv aminering

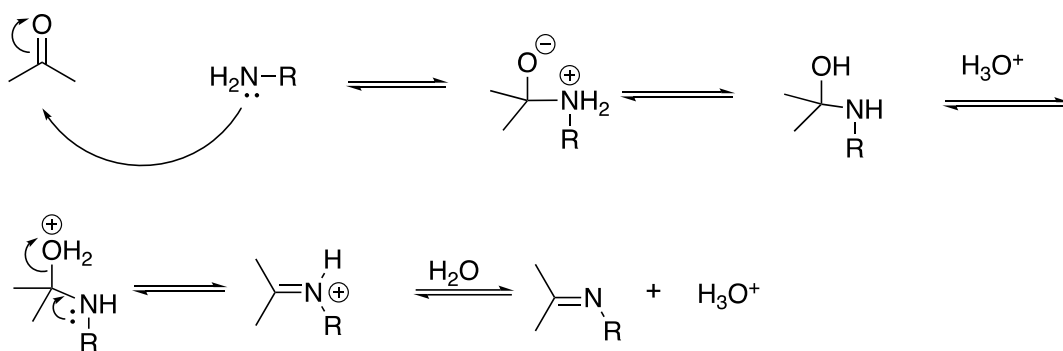
Reduktiv aminering er et begrep som brukes om reaksjoner mellom et amin og et aldehyd eller keton til et imin etterfulgt av en reduksjon til tilsvarende amin. Reduktiv aminering er en viktig biokjemisk reaksjon siden mange viktige byggesteiner for organismer inneholder aminer.²⁰



Skjema 11 viser reduktiv aminering av et generelt keton og sekundært amin

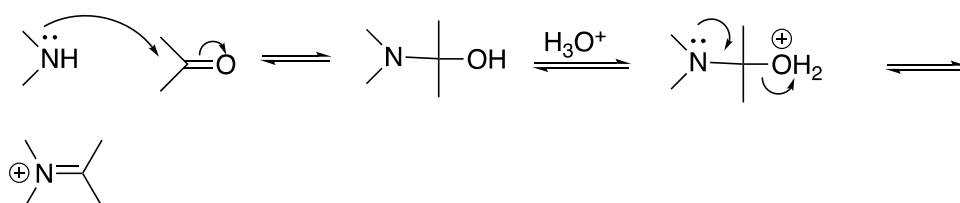
Skjema 11 viser hvordan reduktiv aminering danner en ny C-N binding ved at et amin reagerer med enten et aldehyd eller keton. Reaksjonen konverterer karbonylforbindelsen til et amin.²¹ Reduktiv aminering er vanligvis en «one pot» reaksjon. Det finnes to viktige reaksjoner for å danne et imin i reduktiv aminering. Den ene er reaksjon via Schiffs base reaksjon og den andre Mannich-reaksjonen (Skjema 12).

Schiff Base

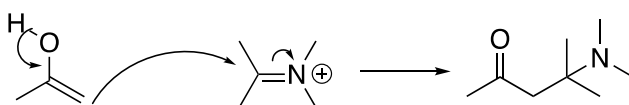


Mannich

Steg 1



Steg 2

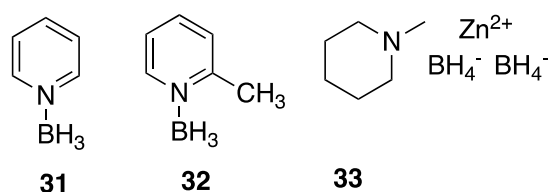


Skjema 12 viser reaksjonsmekanismen for syrekatalysert Schiffs base- og Mannich-reaksjon

Valget av reduksjonsmiddel er viktig siden det kun er iminet som skal reduseres, ikke aldehydet eller ketonet som kan sitte på sidegruppene.²¹ Det er noen reduksjonsmidler som kan danne uheldige biprodukter. For eksempel er NaBH_3CN en forbindelse som kan danne spormengder av giftige HCN , noe som ikke er heldig selv om det kun er snakk om spormengder.²¹ Det har blitt gjort forskning på hvordan reduktiv aminering kan gjøres billigere og mer miljøvennlig. Natriumborhydrid er billig og vannløselig forbindelse som kan brukes, men problemet med denne er at den ikke er selektiv på iminer.²² NaBH_4 er derfor ikke heldig å bruke hvis molekylet også inneholder karbonyl-grupper.²² NaBH_4 er ikke det eneste hydridet som har mangelfull selektivitet. Zinkborhydrid ($\text{Zn}(\text{BH}_4)_2$) og nikkelborid (Ni_2B) er også lite egnet for å redusere iminer som inneholder keton-, ester- eller amid-grupper.²³ Selektivitet kan også oppnås ved å benytte en kombinasjon av NaBH_4 og en egnet katalysator.^{22, 24} En annen mulighet er å benytte natriumtriacetoborhydrid ($\text{NaBH}(\text{AcO})_3$).²⁵ Denne utgaven reduserer iminer selektivt over karbonylforbindelser, men har sine ulemper. En av disse ulempene er at den ikke fungerer like godt i polare løsemidler som vann og

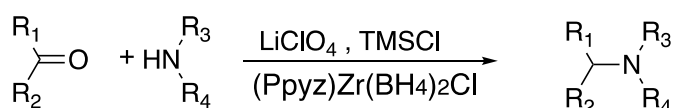
metanol.²¹ Der forsvinner den selektive reduksjonen av iminet. En annen ulempe er at forbindelsen er lite egnet til bruk i tilfeller hvor ketonet enten er aromatisk eller umettet.²⁵

Aminbaserte borhydrid er et godt alternativ til NaBH₃CN og NaBH₄. Piperidin-, pyridin-, og picolin-baserte reduksjonsmidler har vist seg å være selektive mot iminer uten behov for katalysator.



Figur 10 viser strukturen til boranpyridinkomplekset (**31**) (til venstre), alfa-picolinboran (**32**) (i midten), og *N*-metyl piperidin zinkborhydrid (**33**) (til høyre)

Allnezhad sin gruppe benyttet seg *N*-metyl piperidin zinkborhydrid (ZBNMPP) (**33**).²⁶ Det høyeste rapporterte reaksjonsutbyttet var på 93 %.²⁶ Heydari sin gruppe utviklet en metode som ved å bruke en Lewis-syre, litiumperklorat (LiClO₄), og en aktivator, trimetylsilylchlorid (TMSCl), og zirkoniumborhydrid-piperazinkompleks som reduksjonsmiddel oppnår gode utbytter opp mot 92 %.²³



Skjema 13 viser reduktiv aminering med zirkoniumborhydrid-piperazinkompleks som reduksjonsmiddel

En gruppe ledet av Sato undersøkte om pyridin-baserte reduksjonsmidler kunne være et alternativ til NaBH₃CN og NaBH₄. Av de pyridin-baserte reaksjonsmidlene så har pyridinboran (**31**) en del utfordringer knyttet til seg, blant annet at forbindelsen er ustabil i varme omgivelser.²¹ Denne ulempen gjør at det er vanskelig å få en 100% ren forbindelse siden destillasjon av en løsning av **31** fort gir dekomponering.²¹ Pyridin-boran **31** viste seg også å ikke ha lang holdbarhetstid, det er rapportert om at den kun er holdbar i 6 måneder.²¹ Fordelen med alfa-picolinboran (**32**) er at forbindelsen kan kjøpes i krystallinsk form og kan lagres over en lengre periode uten at forbindelsen dekomponerer.²¹

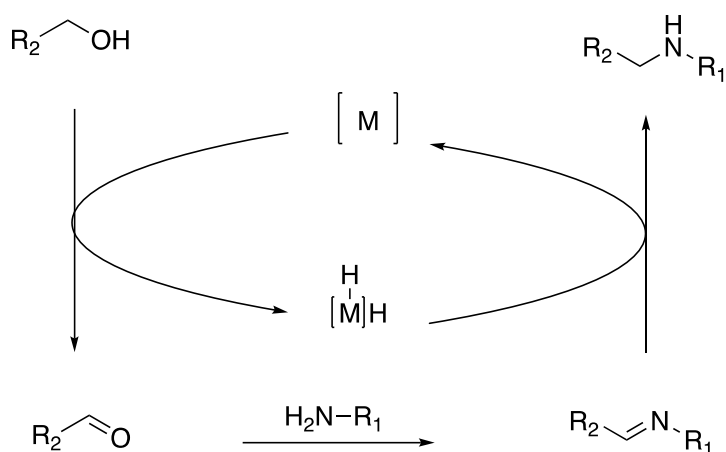
Innenfor reduktiv aminer som involverer oligosakkarider er det viktig at reduksjonsmiddelet ikke danner giftige biprodukter. Dette kommer av at proteinbundet glykaner er viktige biologiske makromolekyler.^{4,9} Oligosakkarider kan spille en rolle i å behandle sykdommer som kreft, AIDS og diabetes ved å være biomarkører. Til disse studiene trengs det ikke-giftige og imin-selektive reduksjonsmidler.^{4,9} NaBH_3CN ble tidligere brukt, men det har blitt gjennomført forsøk på å se om å se om $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ og **32** kan gi gode utbytter.

En gruppe ledet av Dalpatho rapporterte at utbyttene de fikk ved å bruke $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ var sammenlignbare med utbyttene de fikk med NaBH_3CN .⁹ En gruppe ledet av Ruhaak gjorde det samme forsøkene, men resultatene fra deres studium ga et svært ulikt resultat da de rapporterte om under 10 % utbytte. Det lave utbytte kan skyldes at de benyttet langt mindre $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ enn Dalpatho.⁴ I samme forsøk fant de ut at ved å bruke Sato²¹ sin prosedyre for picolinboran ga like gode utbytter som NaBH_3CN .⁴ Konklusjonen deres var derfor at Satos metode var godt egnet for reduktiv aminering av oligosakkarider.

Det finnes en syntesevei for reduktiv aminering som ikke benytter seg av boraner. Metoden baserer seg på at en alkohol blir oksidert til aldehyd av en katalysator som inneholder et innskuddsmetall. Katalysatoren vil så fungere som reduksjonsmiddel for iminet, se Skjema 14. Detaljene står under avsnittet organometallisk kjemi.

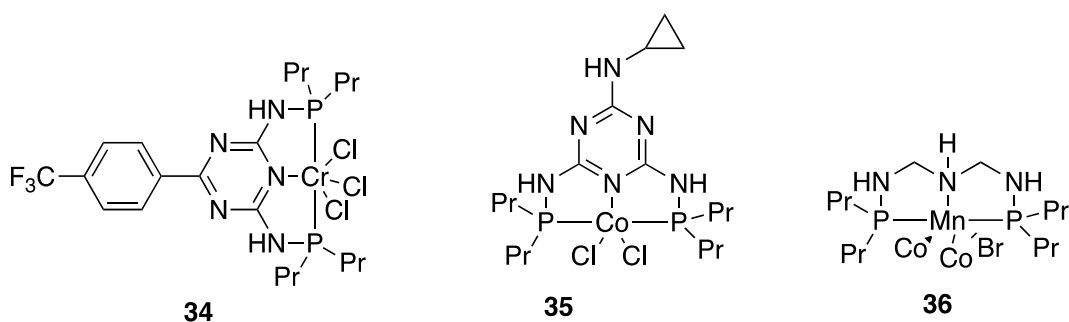
Organometallisk kjemi

Som nevnt tidligere kan innskuddsmetall-baserte forbindelser fungere som katalysator i reduktiv aminering. Metoden baserer seg på at alkohol blir oksidert til aldehyd før iminet dannes via Schiffs base reaksjon etterfulgt av en reduksjon av iminet, se Skjema 14.^{27, 28}



Skjema 14 viser en alternativ fremgangsmetode for reduktiv aminering ved hjelp av innskuddsmetall-basert organometallisk katalysator

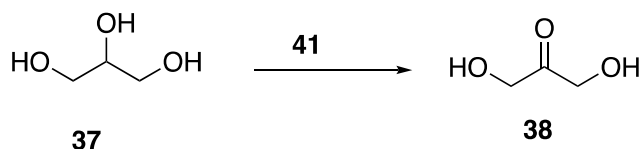
Mekanismen som blir benyttet kalles «hydrogen auto transfer» og «hydrogen borrowing mechanism».^{27, 29} Første trinn i syntesen er at katalysatoren oksiderer alkoholen ved å opptre som en dehydrogenase.²⁷ Dette resulterer i at et proton og et hydrid blir overført til katalysatoren som da blir til et metahydrid-mellomprodukt. Det neste trinn er at iminet dannes via en Schiff base reaksjon. Siste trinn er en reduksjon av iminet ved at katalysatoren opptrer som en hydrogenase. Hydrogeneringen resulterer i at katalysatoren blir gjenvunnet ved at protonet og hydridet blir overført fra metallet til iminet.²⁷ Dette fungerte for flere ulike innskuddsmetaller som jern, krom, kobolt, ruthenium, iridium, gull, molybden, palladium, nikkel og mangan, se Figur 11.^{25, 27-35} Enkelte innskuddsmetall var ikke direkte/indirekte bundet til en organisk forbindelse, eksempler på dette er gull og ruthenium.^{31, 32} Det finnes også metallorganiske/organometalliske ruthenium-katalysatorer.



Figur 11 viser noen innskuddsmetall-baserte katalysatorer som kan benyttes til reduktiv aminering med alkoholer som startmateriale

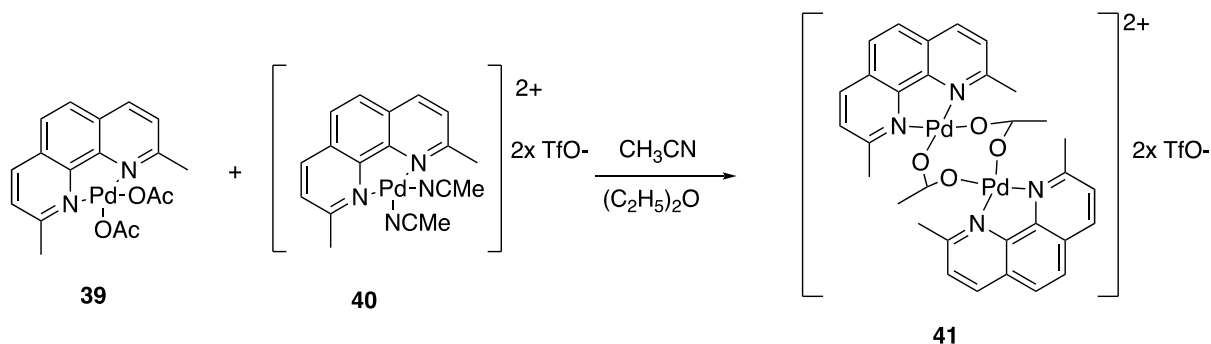
Regioselektiv oksidasjon

Innskuddsmetall-baserte katalysatorer kan også benyttes for å selektivt oksidere sekundære alkoholer med luft som terminal oksidant, se Skjema 15.^{36, 37} Siden omdannelsen av alkoholer til karbonylforbindelser er viktige har det blitt gjort arbeid med å utvikle gode katalytiske metoder.³⁸



Skjema 15 viser hvordan en organopalladium katalysator selektivt oksiderer sekundære alkoholer

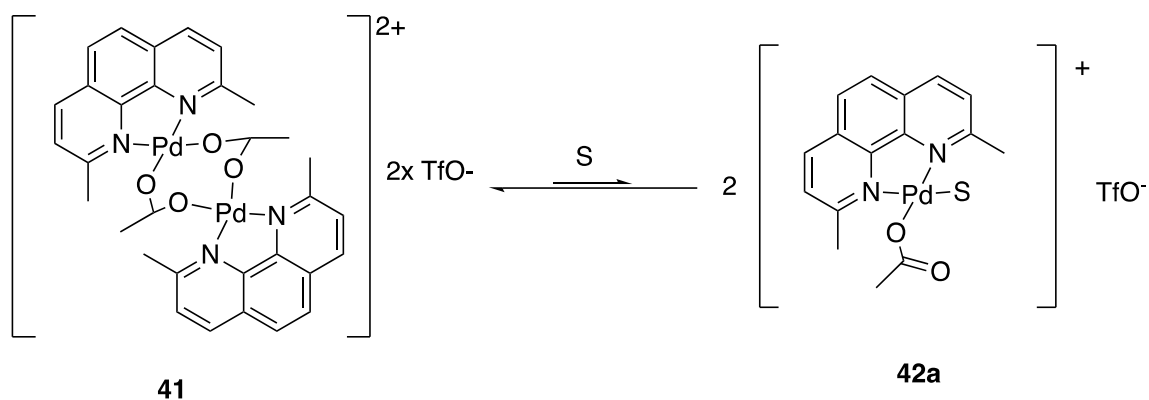
Tidligere forsøk hadde vist at Pd(II) med riktige ligander selektivt oksiderte alkoholer med luft som terminal oksidant.³⁸ På bakgrunn av dette arbeidet utviklet en gruppe ledet av Waymouth en palladium-basert katalysator som selektivt oksiderte alkoholer til ketoner.³⁶ Den opprinnelige planen var å utvikle en høyaktiv oksiderende katalysatorer som kunne benyttes i brenselceller. Resultatet av arbeidet ble en dimer basert på neocuprion-Pd(II) kompleks, se Skjema 16.



Skjema 16 viser Waymouth sin fremgangsmetode for å fremstille [(neocuprion)PdOAc]₂OTf₂(41)

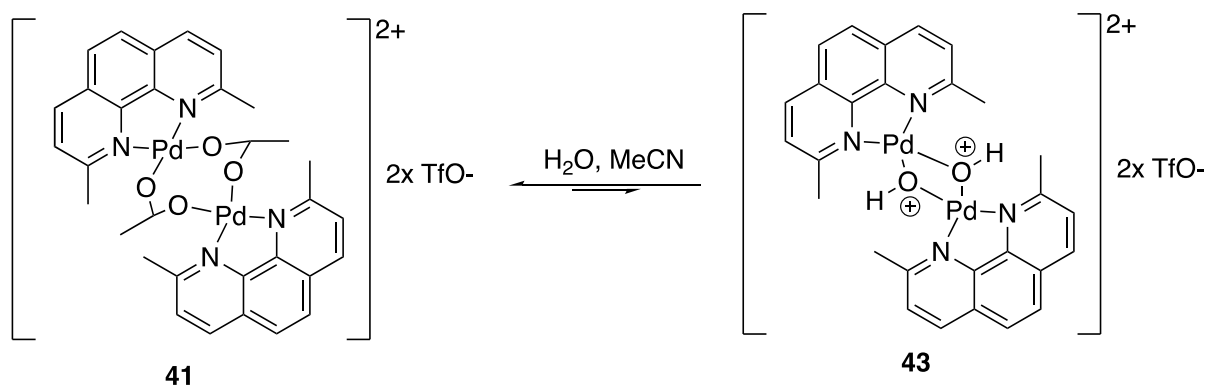
Denne katalysatoren kan forekomme enten som en dimer (**41**) eller monomer (**42a**).

Undersøkelser gjort ved ¹HNMR viste at **41** i CH₃CN-*d*₃ eller DMSO-*d*₆ vil danne en likevekt med monomeren³⁶. Likevekten er illustrert i Skjema 17.



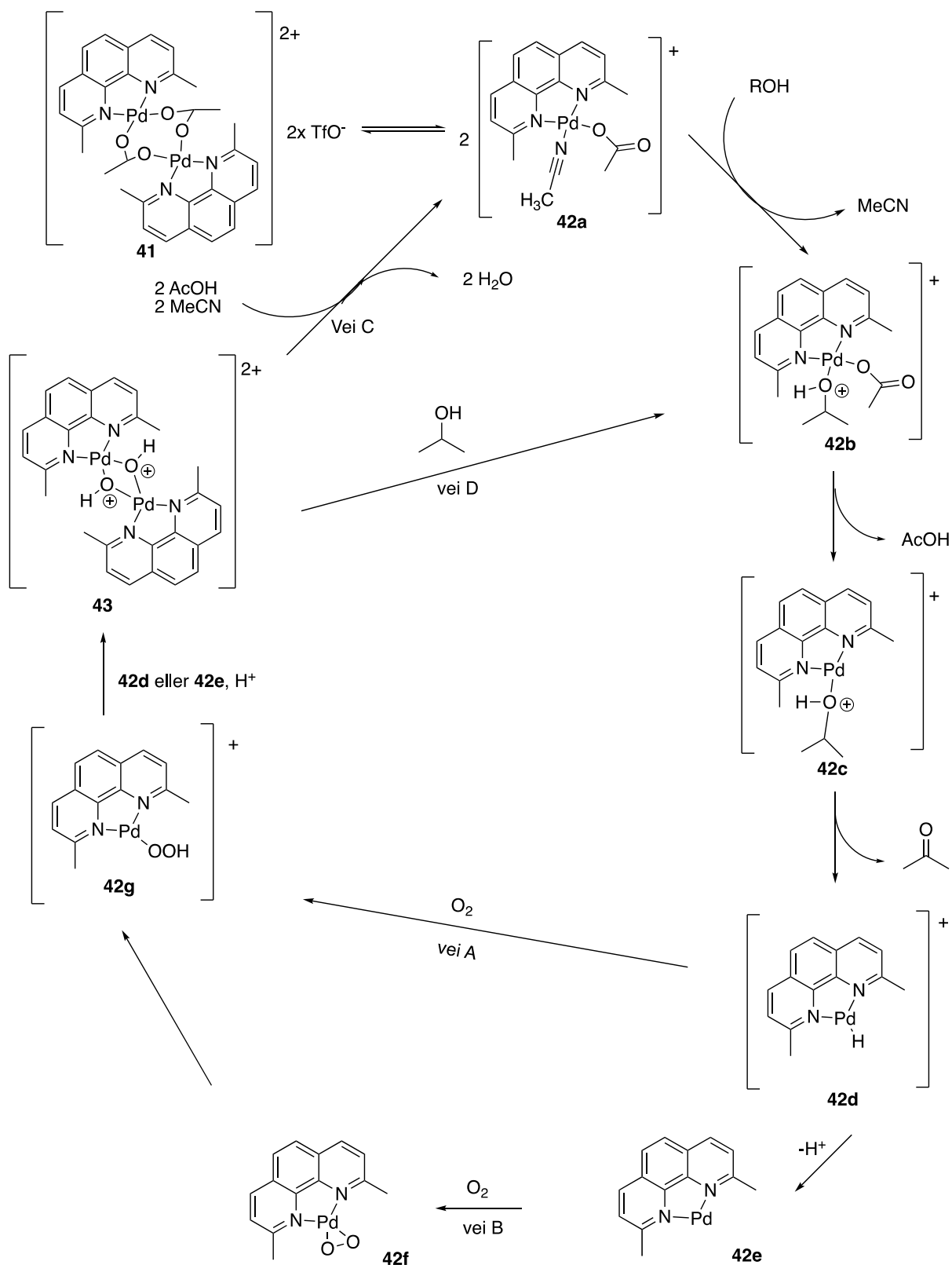
Skjema 17 viser likevekten mellom dimeren **41** og monomeren **42a**, *S* er enten $\text{CH}_3\text{CN-d}_3$ eller DMSO-d_6

Ved å tilsette vann til en acetonitrilløsning av dimeren ble det oppdaget en ny likevekt. Lignende likevekter har også blitt rapportert for andre l_2PdX_2 komplekser. Denne dimeren (**43**) hadde også oksidative egenskaper, selv om de var noe dårligere.³⁶ Likevekten mellom de to dimerene er illustrert i Skjema 18.



Skjema 18 viser likevekten mellom de to dimerene som selektivt oksiderer C3-OH

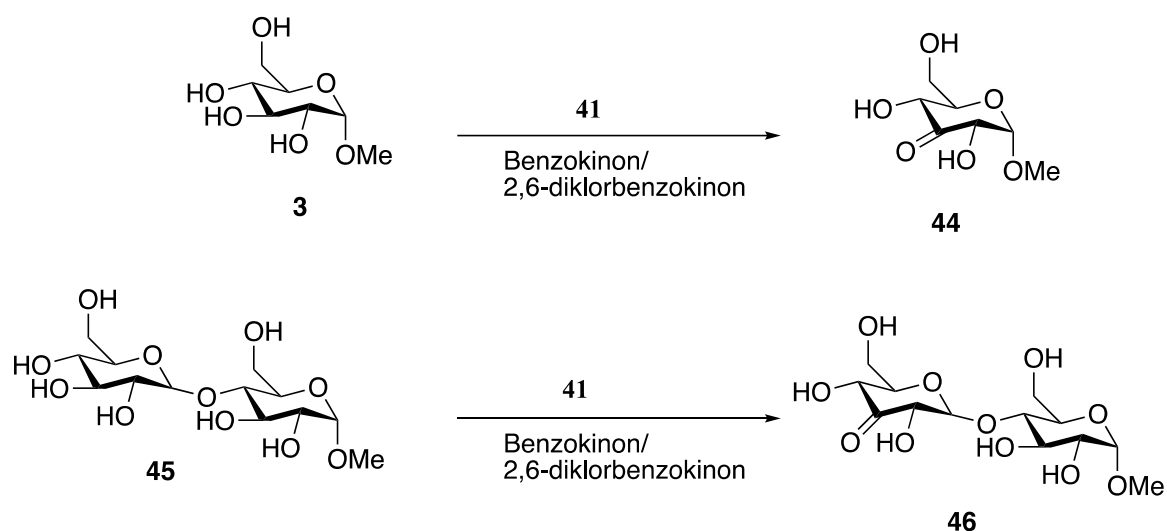
Det er ingen bekreftet mekanisme som forklarer hvordan **41** selektivt oksiderer sekundære alkoholer. Derimot er det 4 foreslåtte mekanismer.³⁶ De ulike forslagene til mekanisme er illustrert i Skjema 19.



Skjema 19 viser de foreslåtte mekanismene til $[(\text{neocuprion})_2\text{PdOAc}_2]^{2+}$ **41**

Senere publiserte Waymouth en artikkel om at palladiumkomplekset som gruppen hans hadde laget sammen med benzokinon eller luft som terminal oksidant oksiderte glyserol (**37**) til 1,3-

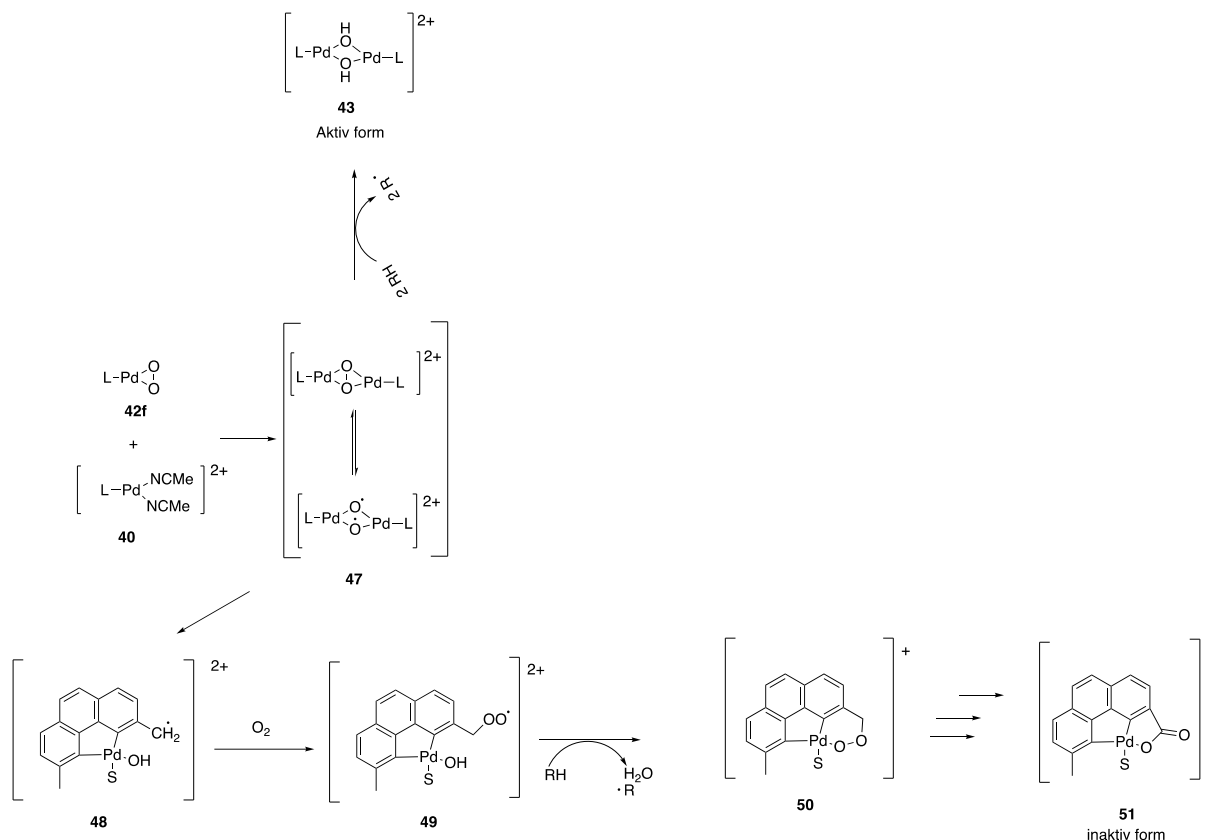
dihydroksylaceton (**38**), se Skjema 15. Katalysatoren **41** blir ofte kalt for Waymouth-katalysatoren. Palladiumkomplekset **41** har vist seg å være sentral i regiosektiv oksidasjon hos karbohydrater. En gruppe ledet av Minnaard fant ut at **41** selektivt oksidere C3-OH uten å måtte bruke beskyttelsesgrupper, noe som er heldig siden karbohydratkjemien ofte har bruk for beskyttelsesgrupper.³⁹ Inspirasjonen til å sjekke om **41** var selektiv i tilfeller hvor det var flere sekundære alkoholer kom av de gode resultatene til gruppen ledet av Waymoth.³⁹ Den selektive oksidasjonen av C3-OH fungerte på mono-, di-, og oligosakkarider.^{39,40} I forsøkene ble enten benzokinon eller 2,6-diklorbenzokinon brukt som terminal oksidant.



Skjema 20 viser hvordan **41** oksiderer selektiv C3-OH både hos mono- og disakkarider

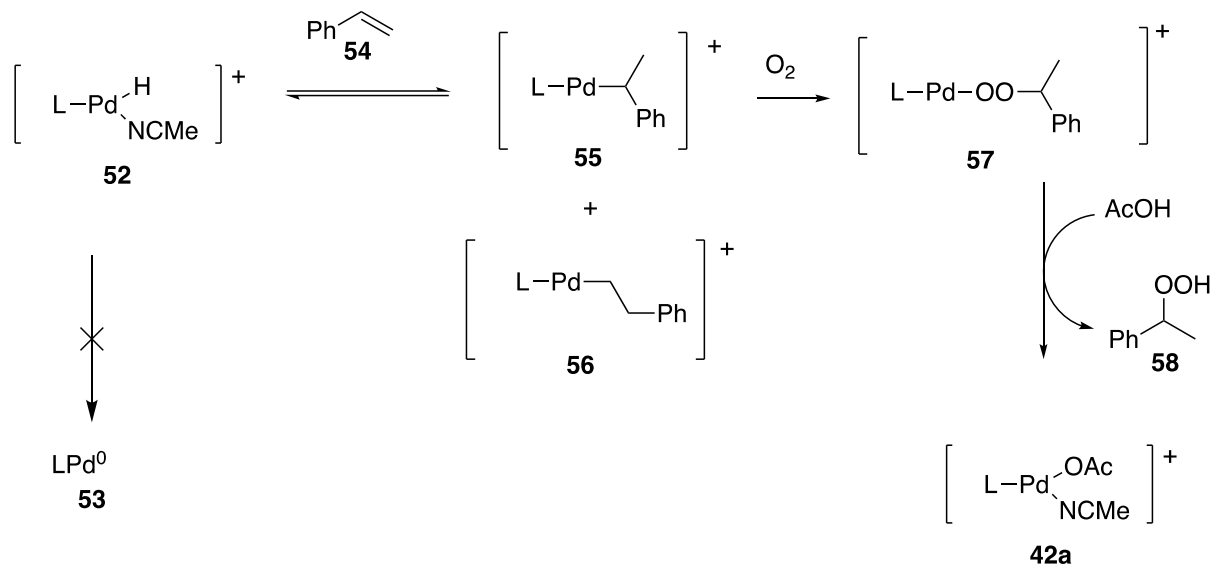
Reaksjonen kan foregå i flere løsemidler, blant annet 10:1 acetonitril:vann. Andre løsemidler som også fungerte godt, var dimetylsulfoksid (DMSO). Waymouth-katalysatoren har også vært viktig i syntesen av Billefermoner.⁴¹

Selv om **41** fungerer godt til å selektivt oksidere sekundære alkoholer og selektivt oksidere C3 hos karbohydrater så oppstår det uheldigvis en deaktivering i nærvær av luft, se Skjema 21. Deaktiveringen skjer ved H-atom fjerning (HAA) på ligandet neocuprion. Denne prosessen resulterer i at «turn over number» (TON), det vil si hvor mange syklere katalysatoren kan gjennomføre, minker. Derfor har det blitt gjort undersøkelser på hvordan HAA kan bremses/reduceres enten ved å modifisere ligandet eller ved å tilsette H-atomdonor.⁴²



Skjema 21 viser den foreslåtte mekanismen for deaktivering av Waymouth-katalysatoren. RH er H-atom donor

Som vist i Skjema 21 så starter prosessen som resulterer i deaktivering av katalysatoren ved HAA ved et benzylik hydrogen. Historisk så har fenoler blitt brukt som H-atom donorer, et eksempel på en slik forbindelse benzyhydroperoksid. En annen fremgangsmetode er å forhindre dannelsen av den deaktiverte formen svart palladium.⁴² Styren (**54**) er en forbindelse som har gode egenskaper for å øke TON, dette siden den forhindrer dannelsen av svart Pd og som også danner etylbenzyhydroperoksid (**58**). Den foreslåtte mekanismen for **54** sin evne til å øke TON er illustrert i Skjema 22.

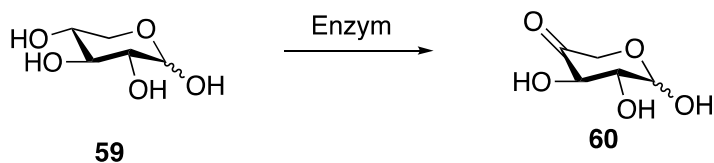


Skjema 22 viser den foreslåtte mekanismen for hvordan **54** øker TON

Det ble rapportert at det å tilsette **54** ga betydelig økning i TON og utbytte. I mange av tilfellene var det snakk om minst en dobling og opp mot en 10-dobling av TON. En annen forbindelse som også ble undersøkt var etylbenzen. Ved å tilsette etylbenzen som co-løsningsmiddel sammen med acetonitril ble TON doblet sammenlignet med ren acetonitril.⁴² De høyeste TON verdiene kom ved å tilsette styren i en løsning der etylbenzen var co-løsemiddel. De rapporterte TON-verdien var på 301 og 354.⁴² Eneste ulempen som ble rapportert var om forbindelsen som skulle oksideres var upolar siden det vil gjøre det vanskelig å separere forbindelsen fra **54** på en kolonne.

Enzymatisk oksidasjon

Alternativet til innskuddmetal-basert katalysator er enzymer. Enzymer er kjent for å være spesifikke og selektive i hvilke reaksjoner de katalyserer. Enzymatiske reaksjoner på karbohydrater blir sett på som viktige reaksjoner i fremtidens bioraffinerier.⁴³ Enzymatiske oksidasjoner gir gode startmaterialer for videre kjemiske reaksjoner.⁴⁴ Dannelsen av keton/aldehyd gir muligheten til reduktiv aminering og aldehyder kan i tillegg oksideres opp til karboksylsyre som gir nye muligheter for videre reaksjoner.⁴⁴ Disse reaksjonene kan benyttes for å danne et glykokonjugat.⁵ Disse reaksjonene er mulige siden enzymene kan selektere ut enkelte hydroksylgrupper i karbohydratet som de oksiderer. Et generelt eksempel på selektiv enzymatisk oksidasjon er illustrert i Skjema 23.

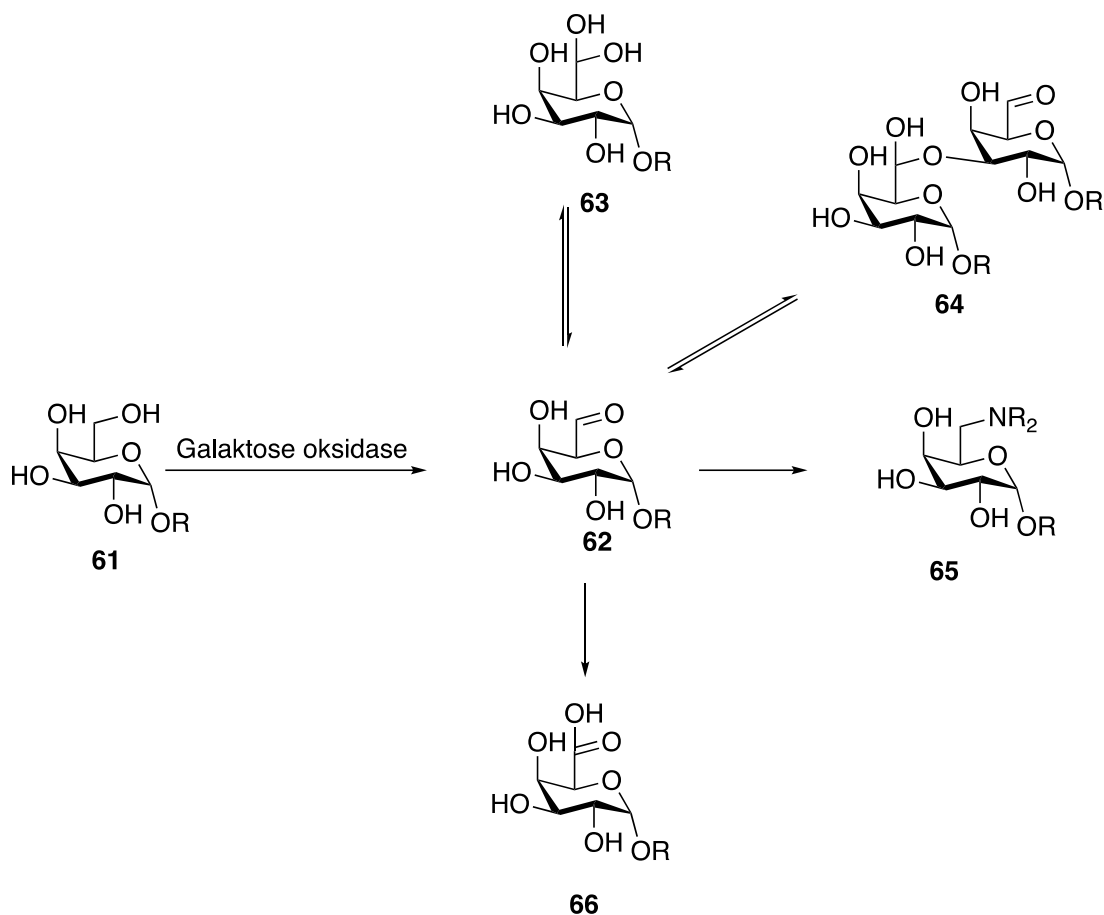


Skjema 23 viser et eksempel på en selektiv oksidasjon på et ubeskyttet karbohydrat

Selv om enzymer i utgangspunktet er selektive mot enkelte hydroksylgrupper så vil det finnes tilfeller hvor selektiviteten er redusert.^{45, 46} Pyranose 2-oksidasase (P2Ox) er i utgangspunktet skal være C2 selektiv, men dette avhenger av substratet.^{45, 47, 48} Enzymer som derimot er selektive på hvilke hydroksylgrupper de oksiderer er galaktose oksidasase, glukose oksidasase,⁴⁹ NAD-avhengig oksidasjon med enzymet NtdC.⁵⁰

Blant lengre kjeder av karbohydrater viser enzymatisk oksidasjon av hydroksylgruppene å være mer selektive mot enten C1,⁵¹ C4⁵ eller C6.⁵¹ Lyttisk polysakkarid monooksygenase (LPMOs) og cellobiose dehydrogenase (CDH) er enzymer som ofte blir brukt til oksidasjon av polysakkarider som for eksempel cellulose.⁵ CDH og enkelte LPMOs er C1 selektive og vil oksidere C1 til aldonsyre.⁴³ Andre LPMOs kan oksidere C4 i flere oligo/polysakkarider som cellulose, xyloglukan, xylan, og glykomannan.⁵ Oksidasjon på C4 resulterer i at glykosidbindinger i cellulose blir brutt.⁵¹

Som nevnt tidligere er galaktose oksidasase et enzym som selektivt oksiderer C6 hos galaktose. Dette gjelder også for polysakkarider som inneholder galaktose i den ikke-reduserende enden.⁴⁴ Den selektive C6 gir muligheter for videre modifisering som oksidasjon til karboksylsyre eller reduktiv aminering. En annen mulighet er hemiacetal/acetal dannelse.⁵² Disse modifikasjonene er illustrert i Skjema 24.



Skjema 24 viser noen kjemiske modifiseringer som kan gjøres etter å ha oksidert C6 på den terminale galaktoseenheten

Mikrobølgeoppvarming

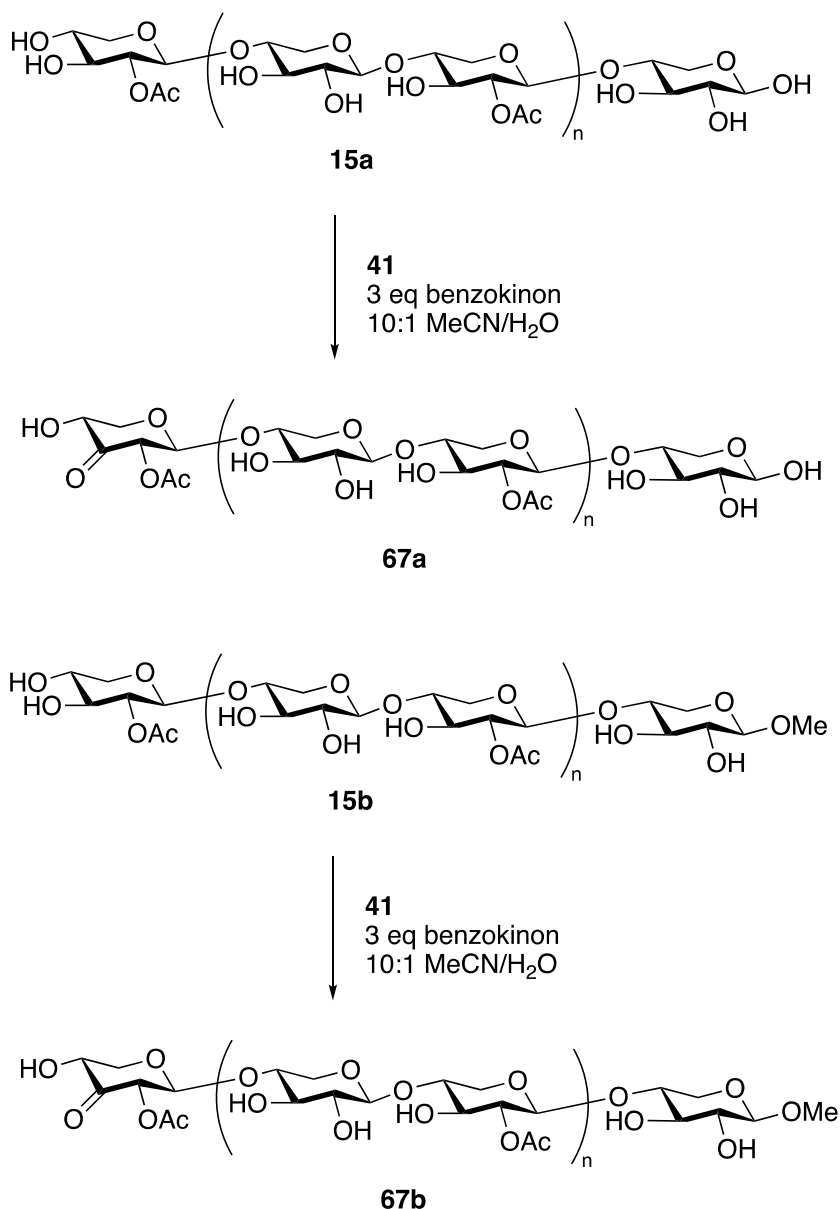
Tradisjonelt har oppvarming av kjemiske reaksjoner foregått ved å bruke varmemantel eller oljebad. Innenfor organisk syntese og medisinsk kjemi/farmasi har bruk av mikrobølge blitt et mer populært verktøy siden mikrobølgeoppvarming har sine fordeler ovenfor tradisjonell oppvarming.⁵³

En av de viktigste grunnene til at mikrobølgeoppvarming har blitt så populær er at den reduserer reaksjonstiden betydelig. Reaksjonstiden kan i enkelte reaksjoner reduseres fra flere dager til kun noen timer eller minutter.⁵³ Andre rapporterte fordeler er bedre utbytter og renere forbindelser. Disse fordelene kommer av at oppvarmingen skjer raskere og er mer effektiv sammenlignet med varmemantel/oljebad slik at bi- og sekundær-reaksjoner skjer i mindre grad. Dette gjør mikrobølgeoppvarming til et nyttig redskap i optimalisering av en reaksjon.

For at mikrobølgeoppvarming skal fungere er det viktig at enten løsemiddelet eller forbindelsene kan absorbere den elektromagnetiske stråling og omdanne strålingen til varme.⁵³ For at det skal kunne skapes varme må et elektrisk felt dannes. Dette kan gjøres på to måter. Den første metoden er dipolar polarisasjon. Denne metoden går ut på at dipoler i løsningen vil prøve å innrette seg etter et elektrisk felt som stadig skifter retning. Når det elektriske feltet skifter retning raskere enn det dipolene kan innrette seg oppstår det varme. Varmen kommer av friksjon og kollisjoner mellom molekylene.⁵³ Den andre metoden er ionisk konduksjon. Denne metoden går ut på at ladete partikler i løsningen vil bevege på seg i det elektriske feltet. Dette vil resultere i at de ladete partiklene kolliderer med andre atomer og molekyler i løsningen, som resulterer i at det genereres varme.

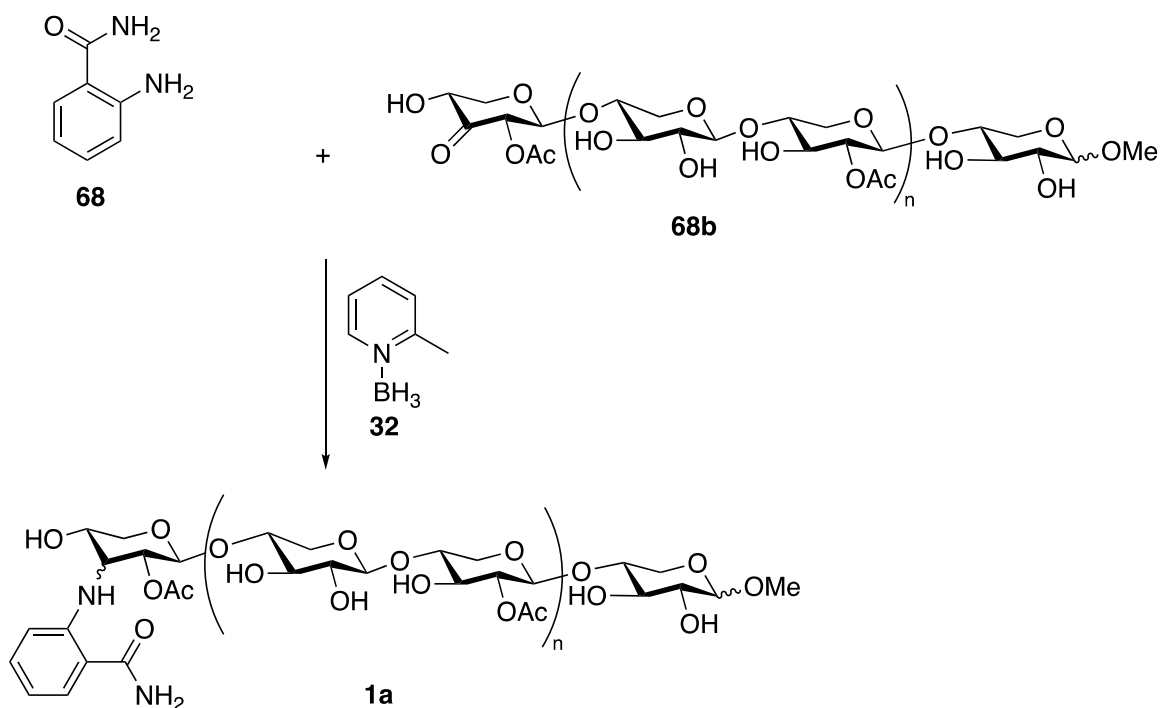
Syntesestrategi

For å komme fram til målmolekylet måtte acetylert xylan oksideres. Dette kunne enten gjøres enzymatisk eller ved å bruke Waymouth-katalysatoren **41**, se Skjema 17. Enzymatisk oksidasjon på C3 kunne vært mulig, men valget falt på Waymouth-katalysatoren. Bakgrunnen for valget var blant annet litteratur som beskriver C3 selektiv oksidasjon hos oligosakkarider ved å bruke **41** og flere tilgjengelige prosedyrer å velge mellom. Prosedyrevalget falt på å modifisere prosedyren til Niek og Minnaard.⁵⁴ Katalysatoren ble syntetisert etter Waymouth-gruppen sin fremgangsmetode.³⁶ Siden den acetylerede xylanet kom med ikke-beskyttet reduserende ende ble det undersøkt om dette ville påvirke oksidasjonen sammenlignet med å metylere reduserende ende, se Skjema 25. Metyleringen av acetylert xylan fulgte fremgangsmetoden til Fernandez-Herrera.⁵⁵ Acetylklorid ble også nevnt av Laine.⁵⁶



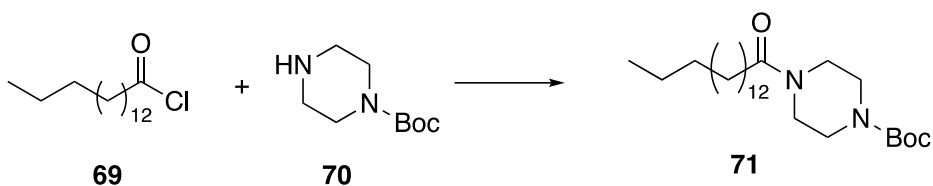
Skjema 25 viser de ulike reaksjonsbetingelsene som ble prøvd

Målmolekylet **1a** ble laget ved reduktiv aminering mellom oksidert xylan (**67b**) og 2 aminobenzamid (**68**). Den reduktive amineringen ble gjort etter prosedyren til Sato.²¹ Denne prosedyren ble valgt av flere grunner. Blant annet at det er et ikke-giftig imin-selektivt reduksjonsmiddel som ble benyttet. Andre grunner til hvorfor Satos prosedyre ble valgt er at picolinboran **32** har vist å fungere like godt som NaBH₃CN⁴ og gir muligheten for mer miljøvennlig syntese siden vann som løsemiddel og/eller løsemiddelfri syntese kan benyttes.²¹



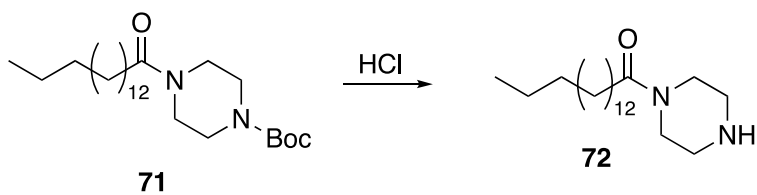
Skjema 26 viser dannelsen av mål-molekylet **1a**

Reaksjonen vist i Skjema 26 kan også generaliseres til at et annet amin også kan kobles på xylan. Aminet ble dannet etter prosedyren til Banno.⁵⁷ Første trinn i syntesen var å danne en amidbinding mellom palmitinsyre og piperazin. Dette ble gjort ved å reagere et syreklorid (**69**) med *N*-Boc piperazin (**70**). Denne fremgangsmetoden er illustrert i Skjema 27. Valget av syreklorid kom som følge av at syreklorider er mer reaktive enn fettsyrer. Siden piperazin er et syklisk amin med to like aminogrupper falt valget på å starte med *N*-Boc piperazin **70**. Grunnen til at det var ønskelig å beskytte den ene aminogruppen til piperazin var at det kun skulle kobles på én fettsyre til piperazin. Den andre aminogruppen skulle på et senere tidspunkt etter avbeskytting kobles til karbohydratet.



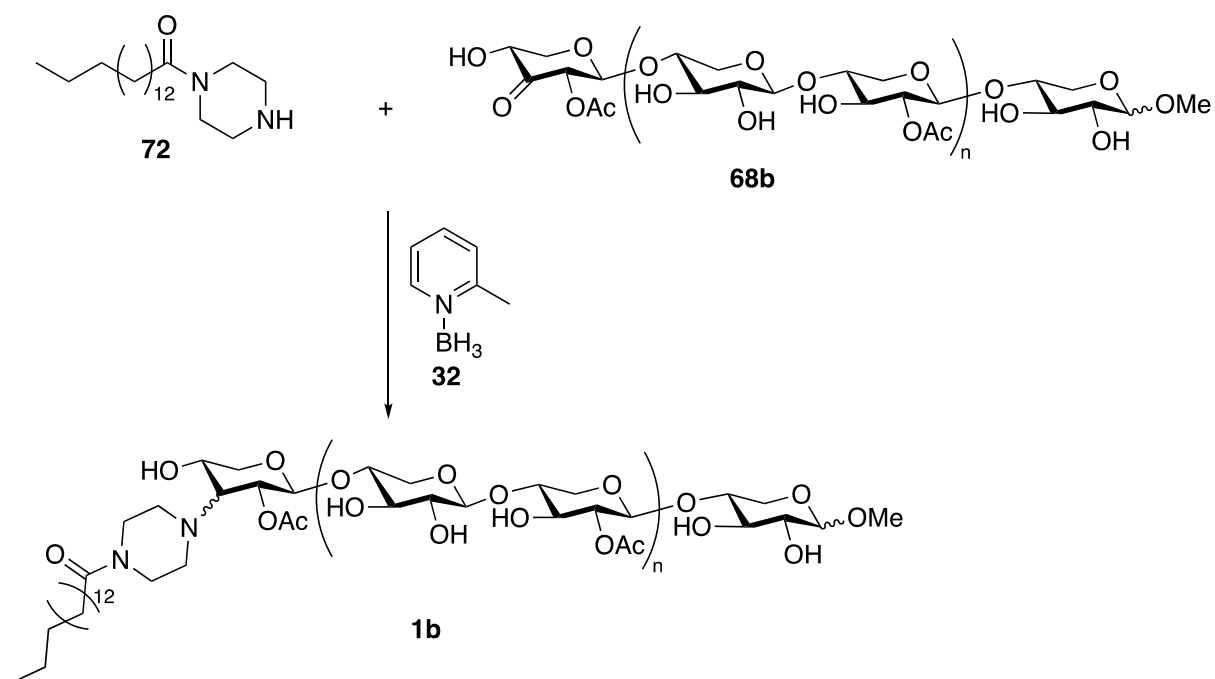
Skjema 27 viser amiddannelse etter Banno sin metode

Etter dannelsen av amidbinding mellom palmitinsyre **69** og *N*-Boc piperazin **70** skulle Boc-gruppen fjernes fra piperazin-enheten etter Bannos⁵⁷ fremgangsmetode, se Skjema 28. Alternativt til denne metoden er bruk av oksalyklorid.⁵⁸



Skjema 28 viser avbeskyttingsreaksjonen etter Bannos metode

Etter avbeskyttingen skulle aminet (**72**) kobles til karbohydratet via reduktiv aminering som fulgte Satos²¹ prosedyre. Fremgangsmetoden er illustrert i Skjema 29.

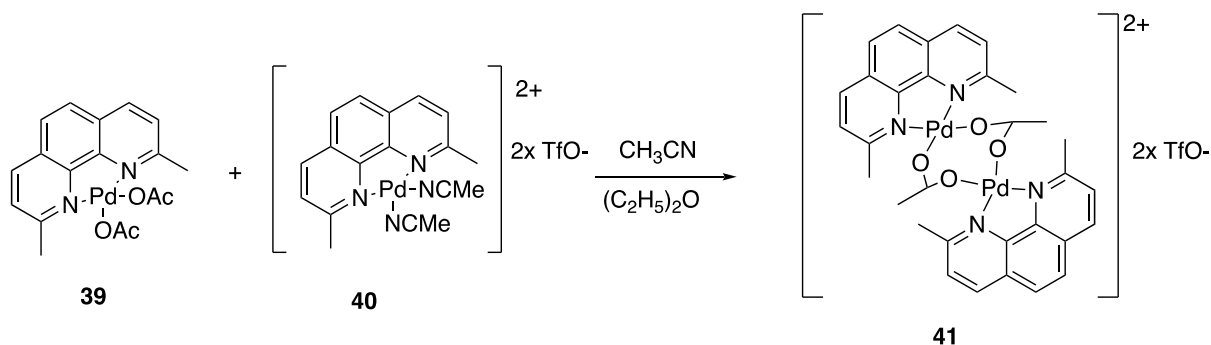


Skjema 29 viser dannelsen av målmolekylet **1b**

Resultater

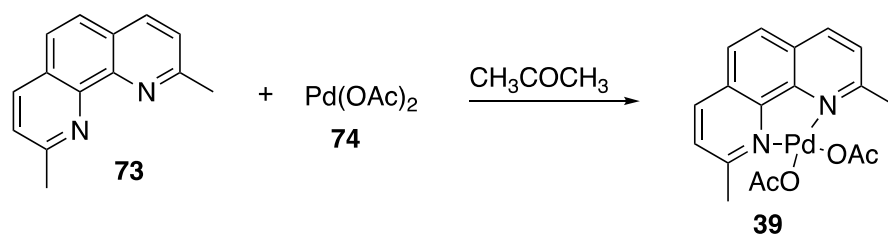
Syntese av palladiumkatalysator **41**

Før oksidasjonen på C3 på ikke-reduserende enden til xylan kunne skje måtte katalysatoren **41** lages. Syntesen av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)PdOAc]₂OTf₂ **41** fulgte prosedyren til Waymouth-gruppen, se Skjema 30.



Skjema 30 viser totalsyntesen av **41**

Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ **39**

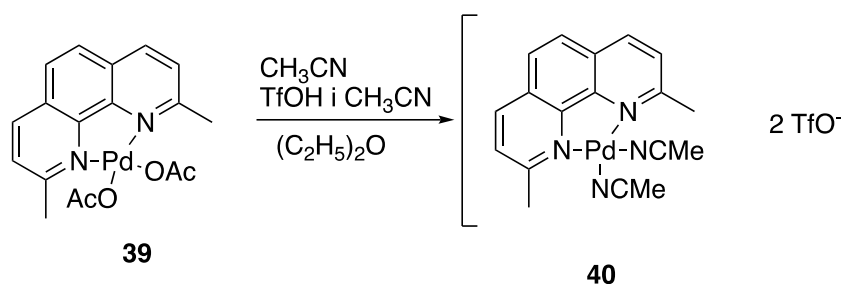


Skjema 31 viser syntesen av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ **39**

Syntesen av **39** ble utført etter prosedyren til Waymouth-gruppen.⁵⁹ Prosedyren gikk ut på å tilsette Neocuproin (**73**) og Palladium(II)acetat (**74**) i aceton. Reaksjonen ga et utbytte på 73%, noe lavere enn Waymouth-gruppens 77%.⁵⁹ De spektrale dataene stemte godt overens med tidligere data.⁶⁰

¹H NMR spekteret ga karakteristiske topper for metylgruppene og de aromatiske protonene. Metylprotonene kom ut ved 2.06 ppm (6H) og 2.98 ppm (6H). Aromatprotonene kom ut ved 7.5 ppm (2H), 7.85 ppm (2H), og 8.31 ppm (2H).

Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ **40**

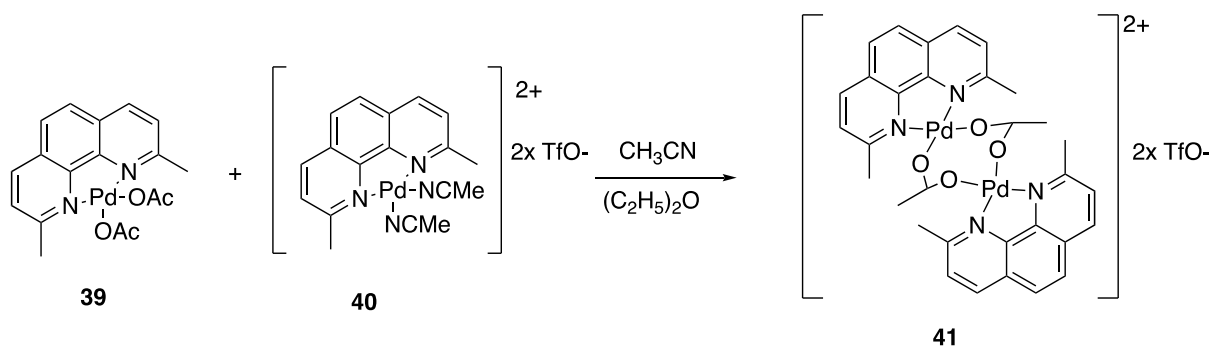


Skjema 32 viser syntesen av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ **40**

For å lage **40** ble **39** løst i acetonitrill og triflormetansulfonsyre etter prosedyren til Waymouth-gruppen.³⁶ Utbyttet etter tørking var på 83%, noe som var høyere enn de 31% som Waymouth-gruppen rapporterte. Det at utbyttet var såpass mye høyere enn det som Waymouth-gruppen oppga var overraskende. Hvorfor utbyttet ble så mye høyere er vanskelig å spekulere i siden det ikke ble gjort noen endringer i prosedyren. Spektrale data stemte godt overens med rapporterte data.

¹H NMR spekteret ga karakteristiske topper for metylgruppene og de aromatiske protonene. Metylprotonene kom ut ved 2.06 ppm (6H) og 2.98 ppm (6H). Aromatprotonene kom ut ved 7.92 ppm (2H), 8.19 ppm (2H), og 8.81 ppm (2H).

Syntese av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ **41**



Skjema 33 viser syntesen av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ **41**

Katalysatoren **41** ble laget ved at **39** og **40** ble løst i acetonitril etter prosedyren til Waymouth-gruppen.³⁶ Prosedyren som ble brukt var en dobling av prosedyren til Waymouth-gruppen. Årsaken til doblingen var et ønske om å produsere mer stoff for hver reaksjon. Dobblingen resulterte i stor variasjon i utbytte, alt fra ca 35 til 89% utbytte. Utbyttet på 89% kom overraskende siden det var 28%-poeng bedre enn 61% som Waymouth-gruppen rapporterte. Stabilt lå utbyttet på ca 50-60% noe som er litt lavere enn det Waymouth-gruppen rapporterte. De spektrale dataene stemte godt overens med rapporterte data.

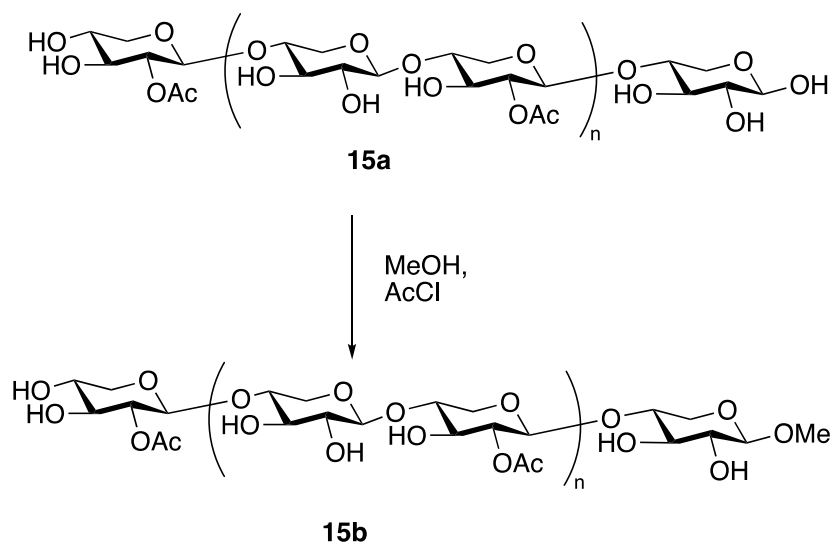
Siden katalysatoren enten kan være en dimer eller monomer så oppga Waymouth-gruppen de spektrale dataene for både dimeren og monomeren. Dimeren ble favorisert ved å lage en mettet løsning.

¹H NMR spekteret til dimeren ga karakteristiske topper for metylgruppene og de aromatiske protonene. Metylprotonene kom ut ved 2.22 ppm (6H) og 2.59 ppm (12H). Aromatprotonene kom ut ved 7.36 ppm (2H), 7.66 ppm (2H), og 8.24 ppm (2H).

¹H NMR spekteret til monomeren ga karakteristiske topper for metylgruppene og de aromatiske protonene. Metylprotonene kom ut ved 1.98 ppm (3H) og 2.8 ppm (6H). Aromatprotonene kom ut ved 7.71 ppm (2H), 8.01 ppm (2H), og 8.59 ppm (2H).

*Metylering av den reduserende enden til xylan **15a***

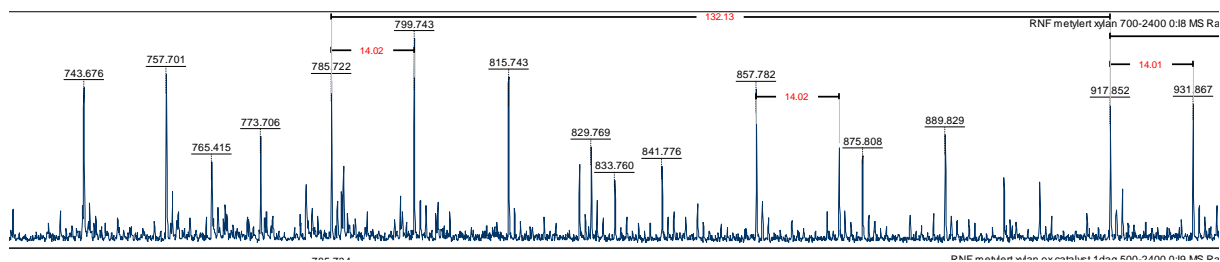
Metyleringen av den reduserende enden til xylan **15a** ble først forsøkt ved å bruke en «tommelfinger regel» som gikk ut på å løse xylan i et overskudd av metanol sammen med katalytisk mengde HCl. Grunnet bruk av vannholdig HCl gikk ikke metyleringen siden vannet bidro til å reversere acetal dannelsen. I stedet ble touluen-4-sulfonsyre monohydrat prøvd, men heller ikke denne gangen ble det dannet noe acetal. Derfor endte det med å følge en metylering-prosedyre til Fernandez-Herrera.⁵⁵ Denne fremgangsmetoden er illustrert i Skjema 34.



Skjema 34 viser metylering av reduserende enden til xylan **15a**

Overskuddet av metanol skulle fjernes med rotavapor, men etter ca 30 min på rotavapor med vannbad på 40 grader var det fortsatt metanol igjen i produktet. Så ble den satt til tørk i vakuum over natten. Reaksjonsutbytte ble vanskelig å beregne siden det viste seg at ikke all metanolen var fordampet bort selv etter en natt i vakuum.

For å kunne si noe om metyleringen hadde fungert eller ikke ble det tatt en ^1H NMR, ^{13}C NMR 1024 scans og en sjekk på MALDI-ToF. Siden RNF xylan er et oligosakkarid ble det vanskelig å tolke ^1H NMR spekteret siden det var for kompleks. Derfor ble det heller sett etter forskjeller mellom spekteret til RNF xylan og metylert RNF xylan. Et eksempel forskjellene mellom de to spekterne var at toppene mellom 6 og 7 ppm i spekteret i xylan ikke var til stede i spekteret til metylert xylan. På ^{13}C NMR ble metyleringen bekreftet med en topp med et kjemisk skift på 92-93 ppm. På MALDI-ToF ble metyleringen bekreftet med en topp på +14 fra m/z til en pentoseenhet. Pentoseenheter synes i MS-spekteret med en differanse på 132 m/z mellom to topper. På +14 toppen var noe høyere enn pentoseenhetstoppen, dette betyr at ca 60 % av xylanet ble metylert. På senere forsøk lå metyleringsgraden på 66-75%.



Figur 12 viser MS-spekteret til metylert xylan 15b

Optimalisering

Siden det var ønskelig å få en høyere grad av metylering ble det satt opp seks forsøk for å se om hvilke faktorer som gir best metylering. Faktorene som skulle testes var løsemiddel, HCl-kilde og reaksjonstid. To av reaksjonene skulle fremdeles gå over to timer, men en av reaksjonene skulle bruke HCl som katalysator mens den andre skulle danne vannfritt HCl via acetylklorid i metanol. Løsemiddelet til disse reaksjonene var 10% vann i metanol. To av reaksjonene som skulle utføres over 24 timer, skulle skje i 10% vann i metanol der den ene skulle bli tilsatt katalytisk mengde HCl mens den andre skulle bli tilsatt katalytisk mengde acetylklorid. Tilsvarende oppsett ble også gjennomført i ren metanol. Resultatet av forsøkene var at det så ut som at reaksjonene ikke ga noe produkt, noe som virket rart. Derfor ble en kontroll laget. Kontrollen var å metylere xylan med acetylklorid i metanol i 2 timer. Dette ga ca 60% metylering. Dette tydet på at noe gikk galt i de andre forsøkene under opparbeidelsen.

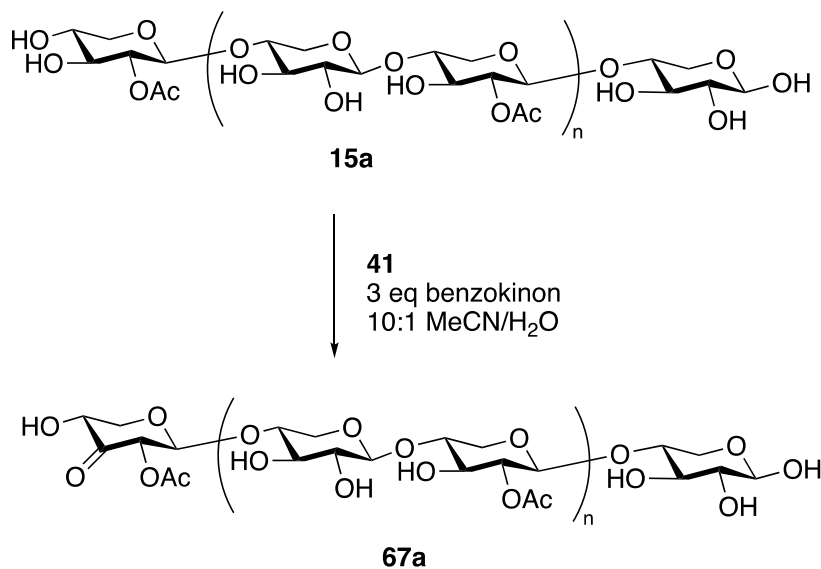
Videre forsøk på å se om det var mulig å få høyere grad av metylering ble gjort ved å benytte mikrobølgeoppvarming. Mikrobølgeoppvarmingen skjedde ved 60 ° og 80 ° C og det ble også testet om eddiksyre var bedre å benytte seg av som katalysator enn acetylklorid. Ut ifra analyse av MS-spekteret var det vanskelig å si noe om dette forsøket hadde gått bra eller ikke. Dette tyder nok en gang på at noe har gått galt under opparbeidelsen etter reaksjonen.

Oksidasjon av xylan

Oksidasjonen av C3 på ikke-reduserende enden til acetyllert xylan ble gjennomført ved å bruke Waymouth-katalysatoren. Denne oksidasjonen kunne gjennomføres på flere prosedyrer, som for eksempel prosedyren til Jäger,³⁹ Eisink,⁵⁴ Chung og Waymouth,⁶¹ eller bruke Waymouth-gruppens prosedyre som de brukte på å oksidere glyserol **37**.³⁷

Først ble det prøvd å bruke Eisinks prosedyre med kun DMSO fremfor 4:1dioksan/DMSO. Etter noen forsøk med DMSO ble det fort klart at det var utfordringer knyttet til DMSO. Problemet med DMSO var at det var vanskelig å få destillert bort løsemiddelet uten at stoffet ble ødelagt under destillasjonen. Derfor ble det konkludert med at det var nødvendig å bytte løsemiddel. Siden acetonitril og vann ble nevnt i flere metoder falt valget på 10:1 forhold mellom acetonitril og vann. Opprensingen av skjedde ved kullkolonne hvor det ble prøvd 4 ulike valg av elueringsmidler. 1. vann, 2. kun acetonitril, 3. 10:1 acetonitril og vann kun til å fortynne prøven og så ellers acetonitril, 4. konsekvent bruke 10:1 acetonitril/vann. Resultatet etter kullkolonne og rotavapor var tydelig. Av de 4 ulike elueringsmidlene som ble brukt var det liten tvil om at det å konsekvent bruke 10:1 acetonitril og vann var best. Denne metoden resulterte i at 83% av xylanet kom seg gjennom opprenningsprosedyren. De andre metodene ga betydelig dårligere utbytte. Metode 1 ga kun 32%, mens metode 2 og 3 ga hhv. 30% og 50%.

Oksidasjon av xylan med ikke-beskyttet reduserende ende



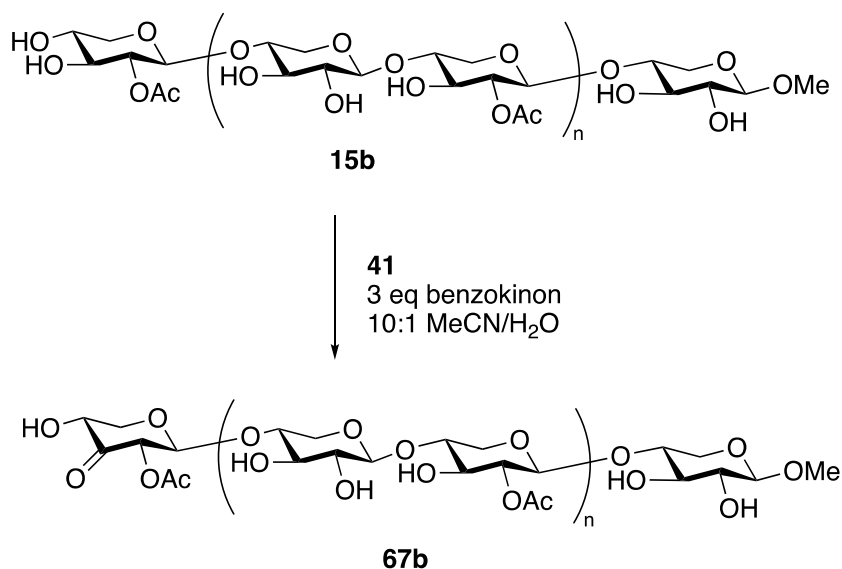
Skjema 35 viser oksidasjon av xylan **15a** ved bruk av Waymouth-katalysatoren **41**

Oksidasjon av **15a** ble oksidert og rensert etter den modifiserte prosedyren til Eisink.⁵⁴ For å kunne bekrefte at det faktisk hadde skjedd en oksidasjon ble MALDI-ToF benyttet. Grunnen til dette var at andre spektroskopiske metoder ikke ville kunne gi et like godt svar på om oksidasjonen hadde fungert eller ikke. I teorien ville også ¹³C NMR og IR være mulige

metoder for å bekrefte om oksidasjonen hadde gått eller ikke, men grunnet ulike årsaker vil at det i praksis vil bli vanskelig å benytte disse metodene. På IR vil det være noe forskjell på karbonylene i ketonet og esteren, men siden det er langt flere estergrupper i forbindelsen ville signalet til ketonet drukne i støylinjen. For ^{13}C NMR er problemet at metoden ikke er følsom nok og for at det skulle eventuelt vært mulig å få en tydelig topp måtte prøven da ha stått over helgen. Grunnen til den dårlige følsomheten kommer av at den ene karbonyltoppen vil drukne i støylinjen siden det er at toppen vil bli relativt liten i forhold til de andre toppene.

For å kunne si noe om oksidasjonen hadde skjedd, og hvor godt den hadde fungert, ble det i MALDI-ToF-spektrene lett etter signaler som var m/z -2 sammenlignet med m/z av en nativ pentoseenhet- dette tilsvarer tap av $2x\text{H}$. Massen til de ulike toppene vil variere med graden av acetylering, men enkelte masser som det ble sett etter var 521, 611, 653, 743 og 785. Dette er masser som representerer de ulike xyloseenhetene og med ulik grad av acetylering i RNF xylan. Det ble derfor lett etter topper med masseforskjell på 132 i MS-spekteret til disse massene. Massen 132 er interessant siden det er massen til en pentose (xylose)-enhet. Deretter ble det sett etter topper som var $-2 m/z$ sammenlignet med pentoseenhetene. Resultatet av å la oksidasjonen kun gå over natten med 15 mol% var at ca 20 % av xylanet hadde blitt oksidert. At oksidasjonsgraden etter én natt var på 20% resulterte i at reaksjonstiden ble økt til en uke, hvor små prøver ble tatt ut for å kunne følge med på utviklingen. I dette forsøket ble det benyttet 10 mol% siden det først etter forsøket ble oppdaget at feil mengde katalysator ble tilsatt. Bakgrunnen til at feil mengde ble tilsatt var at det ble sett på feil sted i notatene over hvilke mengder som tilsvarte bestemte mol%-er. Grunnet mye støy ble det vanskelig å tolke MS-spekteret, men det så ut som at etter en uke hadde 50% av xylanet blitt oksidert. Dette gjorde at det ble interessant å se hvordan metylering av reduserende ende ville påvirke graden av oksidasjon. Ved å beskytte reduserende ende ble det forventet bedre oksidasjonsgrad siden den innlysende konkurrerende reaksjonen ble hindret. Forventningen om bedre utbytte kom av at det nå ikke lenger kunne skje en bi- eller sekundærreaksjon ved den reduserende enden. Siden 10 mol% så ut til å virke ble det besluttet å fortsette med denne mengden katalysator.

Oksidasjon av xylan med metylert reduserende ende



Skjema 36 viser oksidasjonen av metylert xylan **15b**

Oksidasjonen av **15b** fulgte samme fremgangsmetode som oksidasjonen av **15a**. Grunnet det som så ut som oksidasjonsgrad på 50% med 10 mol% ble dette også benyttet her. En reaksjonsblanding ble satt på og sto en uke hvor det ved jevne mellomrom ble tatt ut prøver for å kunne følge med på utviklingen. For å kunne si noe om hvor godt oksidasjonen hadde fungert ble prøvene analysert på MALDI-ToF. Dette kommer av de samme grunnene som ble beskrevet i forbindelse med oksidasjonen av **15a**.

Etter en uke var resultatet overraskende nok at det ikke hadde skjedd noen oksidasjon. Det ble derfor satt på en ny runde, men også denne gangen ble det samme resultat. Dette resulterte i et forsøk hvor et referansemateriale som vil la seg oksidere ble testet sammen med xylan og metylert xylan og reaksjonene ble gjort med nylaget katalysator.

Test av katalysatoren sin holdbarhet

Det ble gjort to forsøk på oksidasjon, men uten resultat. Det ble da gjort forsøk på å se om det var xylan som var vanskelig å oksidere eller om det i tidligere forsøk har blitt brukt katalysator som hadde stått for lenge. Disse forsøkene ble gjort på noe mindre skala og med mer løsemiddel tilsatt. I tillegg ble X3 brukt som kontroll siden denne forbindelsen har vist

seg å være enkel å oksidere. Konsentrasjonen i de opprinnelige forsøkene var på 100 mg/ml, mens de i disse testene lå på 10 mg/ml. Ellers ble det fremdeles brukt 3 ekvivalenter benzokinon og 10 mol% katalysator. Resultatet var at det ikke hadde skjedd noen oksidasjon, verken på referansematerialet eller xylan hadde blitt oksidert. Derfor ble det antatt at problemet var at det ikke var tilsatt nok katalysator og ikke holdbarheten til **41**.

Test av mengde tilsatt katalysator

Det ble det bestemt å prøve å doble mengden katalysator til 20 mol% og at katalysatoren skulle tilsettes i to ganger 10 mol% ved 2 timers mellomrom. Ellers ble fremgangsmetoden som ble brukt i forsøket om katalysatorens holdbarhet også benyttet her. Resultatet fra dette forsøket viste at det hadde skjedd en oksidasjon hos xylan. Dette tyder på at problemene i de tidligere forsøkene kan ha vært at det ble tilsatt for lite katalysator eller at forbindelser som forlenger katalysatorens levetid burde vært tilsatt. Oksidasjonsgraden var på ca 55%.

Tilsetting av etylbenzen og styren 54

Siden litteratur tydet på at både etylbenzen og syren har egenskaper som forlenger katalysatorens sin levetid ble dette prøvd. Forsøket gikk ut på at det ble satt på 4 reaksjoner samtidig, én kontroll, én med kun etylbenzen, én med kun syren og én med både etylbenzen og styren. Etter undersøkelsene ved bruk av MALDI-ToF var det ikke lett å konkludere hvor godt forsøkene hadde gått/forløpt. Dette kom nok av at ureagert styren og/eller etylbenzen var i prøven og dermed gjorde at det ikke var mulig å få et godt spekter.

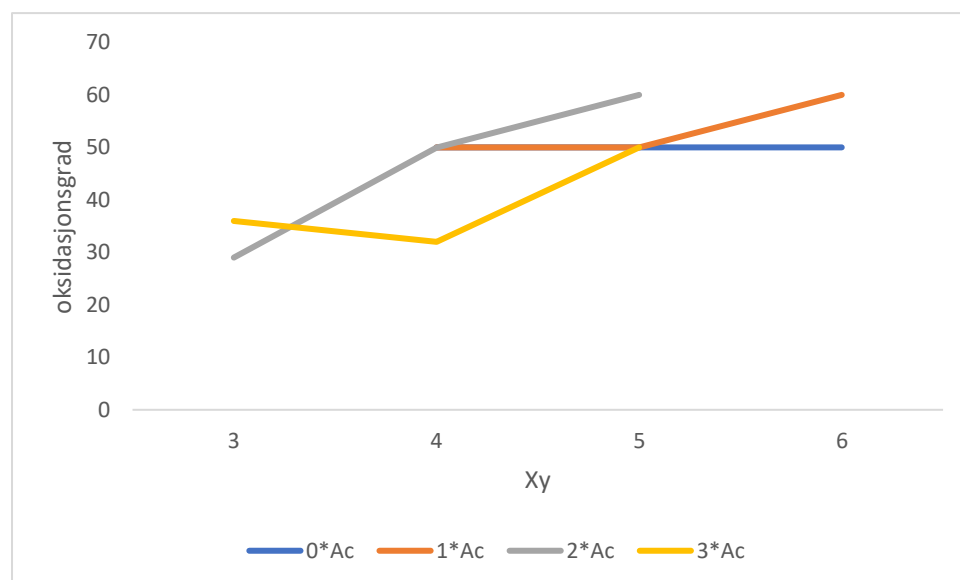
Mikrobølgeoppvarming

Mikrobølgeoppvarmingen skjedde ved enten 60 eller 100 grader celsius og lengden på oppvarmingen var på enten 30 minutter eller to timer. Resultatet var at i tre av de fire forsøkene hadde fungert og at to timer på 100 grader ga best oksidasjon. Oksidasjonsgraden var på ca 29-60% avhengig av hvilken xyloseenhet (Xy) som ble sett på (Tabell 2, Figur 13). Etter å ha sett på MS-spekteret etter undersøkelse på MADLI-ToF etter oksidasjon i to timer på 100 grader i mikrobølgeovnen så det ut som at det kanskje kunne ha skjedd mer enn én oksidasjon. Mistanken om at det kunne ha skjedd flere oksidasjoner kom av at det så ut som at det kunne være noen signaler i MS-spekteret med m/z -4 og -6 sammenlignet med signalene

til xylan. Derfor ble det gjennomført en 2AB-merking (dannelse av målmolekylet **1a**) og forsøk på å oksidere xylan på 100 grader i kun én time. 2AB (2-aminobenzamid) **68** merking er en reduktiv aminering mellom **68** og et aldehyd/keton.

Tabell 2 viser oksidasjonsgraden ved ulike Xy og antall Ac

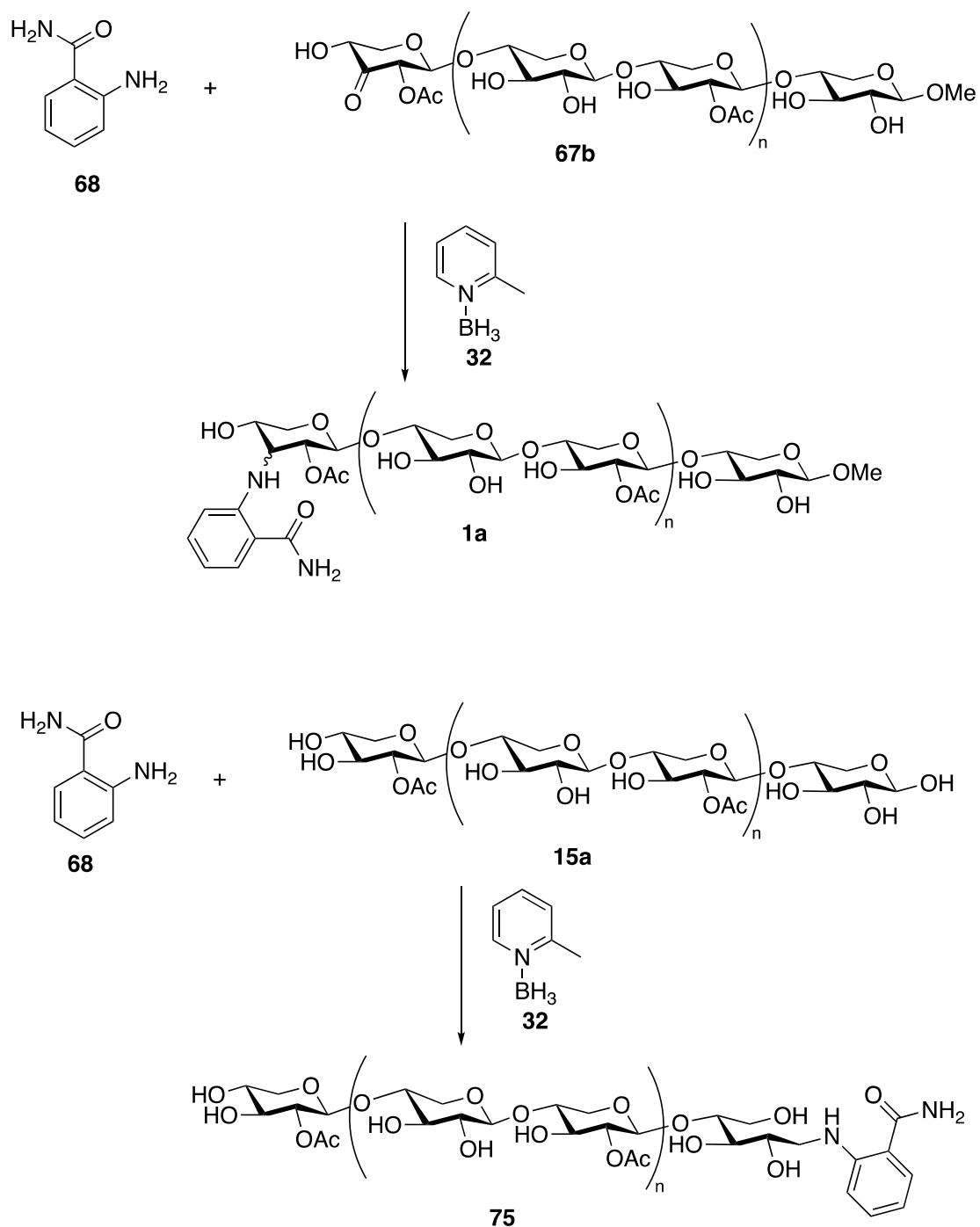
N*Ac/Xy	Xy3	Xy 4	Xy5	Xy6
0*Ac		50	50	50
1*Ac		50	50	60
2*Ac	29	50	60	
3*Ac	36	32	50	



Figur 13 grafisk fremstilling av dataene i Tabell 2

I Figur 13 så er det noe overlapp på Xy 4 og 5, dette kommer av at xylan med 0-2 Ac har 50 % oksidasjon på disse enhetene.

2AB (2-aminobenzamid (**68**))-merking, dannelse av målmolekylet **1a**



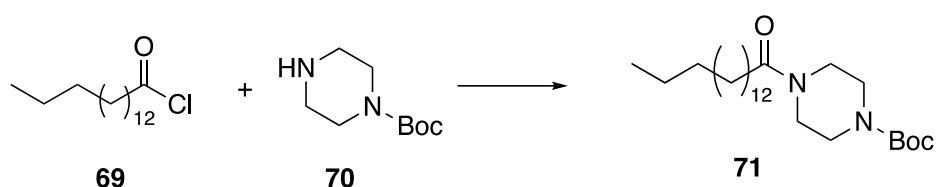
Skjema 37 viser reduktiv aminering av oksidert metylert xylan **67b** og RNF xylan **15a**

Dannelsen av målmolekylet **1a** skjedde ved reduktiv aminering etter prosedyren til Sato. MS-spekteret til forsøket som oksiderte metylert xylan **15b** i to timer på 100 grader så ut til å kunne ha flere oksidasjoner på ikke-reduserende enden. Dette gjorde det interessant å undersøke om målmolekylet **1a** ville ha flere **68** koblet til seg enn den ene som var planlagt.

Både mikrobølgeovn og tradisjonell oppvarming ble benyttet for å se hvilket alternativ som virket best. Det ble også gjennomført 2 AB-merking av RNF xylan **15a** for å ha en kontrollprøve. Ut ifra MS-spektrene (Figur 15) som ble tatt så det ut til å ha skjedd 2AB-merking på alle prøvene, dette bekrefter at det har skjedd en oksidasjon på ikke-reduserende enden til xylan og dannelsen av **1a**. Det som det dessverre ikke var mulig å si noe om var om mikrobølgeovnen hadde resultert i flere oksidasjoner på ikke-reduserende enden.

Syntese av 1-(palmitinoyl) piperazin **72**

Syntese av tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat **71**

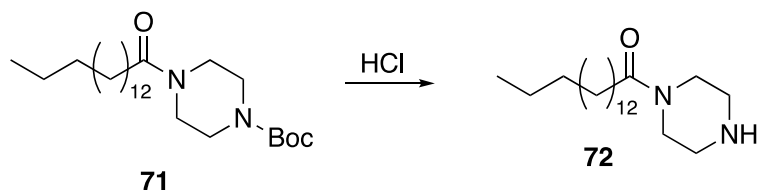


Skjema 38 viser amidsyntesen mellom palmitinsyreklorid **69** og 1-Boc piperazin **70**

Dannelsen av amidbindingen ble utført etter prosedyren til Banno.⁵⁷ Prosedyren gikk ut på at *N*-Boc piperazin **69** ble reagert med et syreklorid i THF. I dette forsøket var syrekloridet palmitinsyreklorid **70**. Etter endt reaksjon var utbyttet på 89%, noe høyere enn det Banno sin gruppe rapporterte (83%).⁵⁷ Det mistenkes at det reelle utbytte er noe lavere siden det kan virke som at det sitter noe heksan rester i krystallene etter tilsetning av heksan, til tross for avdamping på rotavapor. Etter endt reaksjon og opprensing ble det tatt ¹H NMR for å se om reaksjonen var vellykket eller ikke. De spektrale dataene stemte overens med hva som var forventet.

¹H NMR spekteret ga karakteristiske topper for Boc-gruppen, fettsyren, og piperazinen. Protonene i *tert*-butyl-gruppen på Boc-gruppen kom ut som en singlet ved 1.47 ppm (9H). Toppene til fettsyren kom ut som en triplett ved 0.90 ppm (3H), ved 1.2-1.3 ppm (26H) var det en multipllett. En triplett kom ved 1.5 ppm (2H). Toppene til piperazin kom ut ved 3.35 og 3.59 ppm (m, 8H).

Avbeskytning av tert-butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat **71**

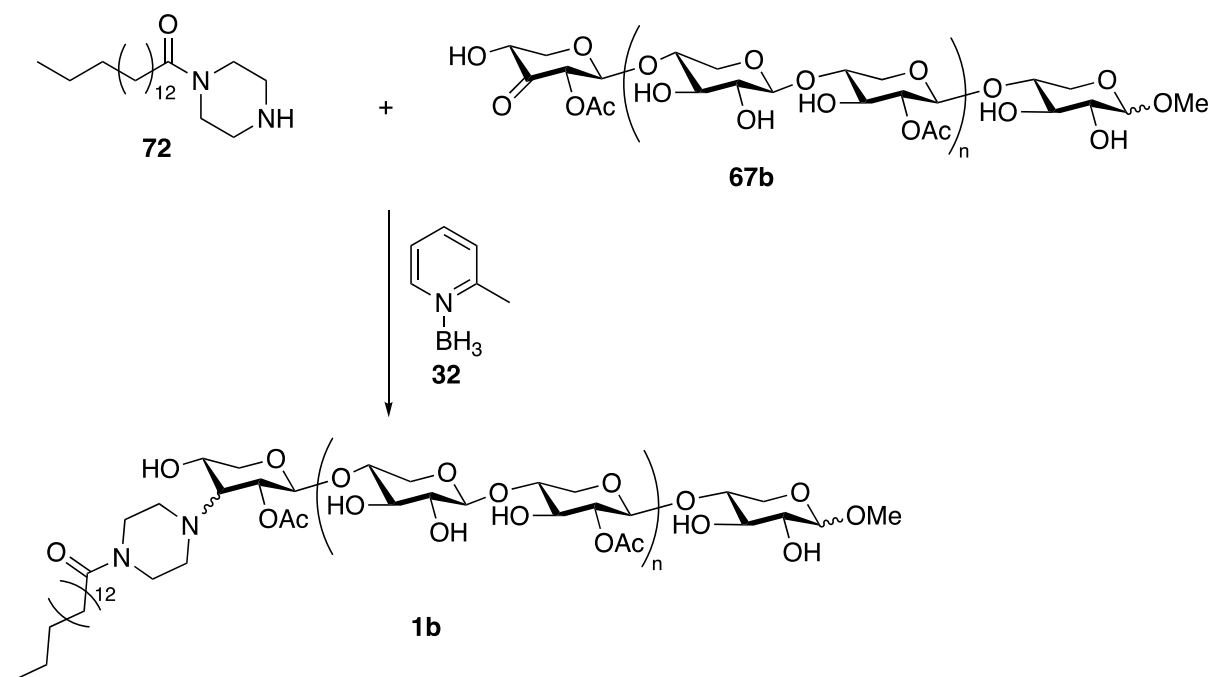


Skjema 39 viser dannelsen av 1(palmitinoyl) piperazin **72** ved fjerning av Boc-gruppen

Dannelsen av **72** skjedde ved å fjerne Boc-gruppen. Dette ble gjort etter fremgangsmetoden til Banno med unntak av at det ble brukt dobbelt så mye løsemiddel for å sikre at alt stoffet ble løst. Utfordringen med å velge denne metoden var å få danne 4 M HCl i etylacetat. Dette problemet ble løst ved å lage vannfri HCl ved å tilsette metanol til acetylklorid og deretter tilsette etylacetat slik at sluttvolumet ble 20 ml. Etter opprensing kom utbyttet på 48%, noe som er vesentlig lavere enn 83% som Banno rapporterte.⁵⁷ Utbyttet er kunstig lavt siden det på et tidspunkt ble tilsatt litt for mye løsemiddel slik at unødvendig mye stoff løste seg. Denne oppsamlede væsken ble dampet inn på nytt. Deretter ble det bestemt å lagre dette stoffet fremfor å filtrere på nytt.

De spektrale dataene stemte godt overens med det som var forventet. ¹H NMR spekteret ga karakteristiske topper fettsyren og piperazinen. Singletten rundt 1,4 ppm med 9 protoner (protonene på Boc-gruppen) var borte, noe som bekrefter at reaksjonen var vellykket. Ellers så kom fettsyre-protonene ut ved 0.88 ppm (t,3H), 1.2-1.36 ppm (24H), 1.45 ppm (2H) og 2.25 ppm (2H). Piperazin-protonene kom ut ved 3-3.1 ppm (4H) og 3.65 ppm (4H). Protonet til det frie aminet kom ut ved 1.4 ppm (1H).

Dannelse av målmolekylet (**1b**)



Skjema 40 viser dannelsen av målmolekylet **1b**

Dannelsen av målmolekylet **1b** skjedde ved reduktiv aminering etter prosedyren til Sato. Siden det i litteraturen ble rapportert om reaksjonstider på opp mot fem dager ble det bestemt å se hvordan mikrobølgeoppvarming ville fungere sammenlignet med å la reaksjonen gå i fem dager.

To timer mikrobølgeoppvarming på 90 og 120 grader, hvor det skummet over

Målmolekylet **1b** ble dannet ved reduktiv aminering mellom oksidert xylan **67b** og aminet **72** etter prosedyren til Sato. Etter opprensing ble prøven dampet inn på rotavapor og utbyttet ble beregnet til å være ca 15 %. Dette var vesentlig lavere enn forventet siden Sato rapporterte om utbytte opp mot 95%.²¹ Forsøkene til Sato var gjort på enklere molekyler noe som kan forklare noe av forskjellen i utbytte. Dette virker tvilsomt siden Ruhaak rapporterte utbytte av 2AB-merking av oligosakkarider på dårligst 98%.⁴ Siden det ble en voldsom skumdannelse når Na₂CO₃ ble tilsatt og skummet over, antas det at mye stoff gikk tap i skummet. Denne mistanken ble bekreftet i senere forsøk hvor det ikke skummet over.

5 dager i romtemperatur

Målmolekylet **1b** ble dannet ved reduktiv aminering mellom oksidert xylan **67b** og aminet **72** etter prosedyren til Sato. Etter opprensing ble prøven dampet inn på rotavapor og utbyttet ble beregnet til å være ca 50 %. Selv om dette var mye bedre enn forsøkene som skummet over, så var det fremdeles noe lavere enn forventet siden Sato rapporterte om utbytte opp mot 95%²¹ og 2AB-merking av oligosakkarider ga kvantitative utbytter.⁴ I dette forsøket skummet det ikke over og det antas derfor at grunnen til at utbyttet endte på 50% skyldes at det er behov for flere ekstraksjoner for å kunne få over mer produkt til den organiske fasen.

Mikrobølgeoppvarming på 90 og 120 grader

For å forbedre utbyttet på 50% ble mikrobølgeforsøkene gjentatt. Dette resulterte i en vesentlig økning i utbytte sammenlignet med tidligere forsøk. I det ene forsøket skummet over nok en gang, men ved å øke antall ekstraksjoner gikk utbyttet likevel klart opp. For ved å doble antall ekstraksjoner økte utbyttet i forsøk hvor det skummet over fra 15 til 39%. I forsøket som ikke skummet over gikk utbyttet fra 50 til 65%, noe som også er en klar forbedring. Selv om dette var mye bedre enn tidligere forsøk, så var det fremdeles noe lavere enn forventet siden Sato rapporterte om utbytte opp mot 95%.²¹ Dette tyder på at det ennå er faktorer å forbedre.

For å bekrefte at målmolekylet ble dannet ble det tatt ¹H NMR 400 MHz og ¹³C NMR på 100 MHz. De spektrale dataene tydet på at det hadde skjedd noe siden det var noen forskyvninger i kjemisk skift og flere topper sammenlignet med spekteret til **72**. Fettsyreprotonene kom ved 0.88 ppm (t, 3H), 1.2-1.36 ppm (m, 24H), 1.45 ppm (m, 2H) og 2.25 ppm (2H). Piperazinprotonene kom ut ved 3 ppm (4H) og 3.3 ppm (4H). Toppene ved ca 2 ppm er toppene til protonene som er bundet til acetylgruppene som er koblet til xylan. De resterende toppene er det vanskeligere å si noe om. ¹³C NMR toppen på 60 ppm tyder at C-N bindingen mellom **71** og **67b** har blitt dannet. 1.4 ppm (s, 1H) tyder på at noe ureagert amin ikke ble fjernet da prøven ble rensset, dette kom av at det ikke ble brukt kolonne (silikagel). Kolonne ble valgt bort siden det ble sett på som en viss risiko for at mye av stoffet kunne forsvinne på kolonnen. Quartetten ved ca 4 ppm og tripletten som overlapper med med fettsyreprotonene i toppen ved 1.16-1.26 ppm tyder på rester av etylacetat i prøven.

Diskusjon

Syntesen av katalysatoren gikk ganske godt med utbytter som var ca like gode eller bedre enn det som tidligere hadde blitt rapportert. Syntesen av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ **39** og (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ **40** resulterte i utbytter som stabilt lå over 70 %, mens syntesen av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ **41** hadde veldig stor variasjon i utbytte. I tillegg til den store variasjonen i utbyttet kom det et forsøk med 89% utbytte, noe som kom overraskende på siden dette var 28%-poeng høyere enn det som Waymouth gruppen fikk. Det ble først antatt at noe av vekten måtte skyldes forurensing, noe som ¹H NMR spekteret avkreftet og vekt fra forurensinger kunne utelukkes. Den store variasjonen i utbyttet skyldes mest sannsynlig at den opprinnelige prosedyren ble utført på dobbel skala. Ved utføre en prosedyre på dobbel skala så kommer det veldig mange faktorer som vil kunne gi stor variasjonen sammenlignet med utbytte fra den opprinnelige prosedyren. Den varierende mengden stoff som dannes i vært forsøk er utfordrende siden dette gjør det vanskelig å forutse hvor mange forsøk som må gjennomføres for å få nok katalysator til å kunne oksidere en bestemt mengde xylan. Den originale prosedyren til Waymoth-gruppen ga utbytte på 0,0589g, noe som er lavere enn de laveste mengdene som kom av å gjennomføre syntesen på dobbel skala. Dette gjør å skalere ned til original prosedyre ikke er noen løsning. Det kan derfor være nødvendig å se om det er mulig å optimalisere prosedyren eller finne en alternativ prosedyre som fungerer på stor nok skala.

De tidligere forsøkene på metylering fungerte ikke, noe som ikke var overraskende. Dette kom av at noe vann var til stede i form av katalysatoren konsentrert (37%) HCl eller touluen-4-sulfonsyre monohydrat. Ved å benytte seg av acetylklorid som katalysator gikk det mye bedre. Acetylklorid danner vannfri HCl ved å reagere med metanol og danne esteren metylacetat. Graden av metylering gikk fra 0% til ca 60% før forsøk på optimalisering. Ut ifra MS-spektrene fra oksidasjonsforsøkene med metylert xylan så det ut som at graden av metylering kunne være opp mot 100%.

I forsøkene for optimalisering ble det testet hvordan ulik HCl-kilde, løsemiddel og økt reaksjonstid påvirket graden av metylering. Derfor ble det satt opp to paralleller til forsøkene som skulle teste reaksjonstid, den ene parallellen foregikk i ren metanol og den andre i 10% vann i metanol. I forsøkene om økt reaksjonstid ble både ulik HCl-kilde og løsemiddel testet.

Det ble spekulert i at en liten modifisering på løsemiddelet ville kunne gi bedre grad av metylering. Dette kom av en antagelse om at ikke all xylandet ble løst i ren metanol og dermed ikke kunne metyleres. Selv om det på bakgrunn av tidligere forsøk var noe skepsis til å prøve 10% vann i metanol så ble dette prøvd. Ideen om at 10% vann i metanol kunne gi bedre løselighet kom av at xylan ble mer løselig i acetonitrill når løsningen inneholdt 10% vann. Selv om tidligere forsøk med 37% HCl ikke hadde fungert, ble det foreslått å forsøke på nytt for å gi resultater som kunne sammenlignes med de forsøkene som brukte acetylklorid. På bakgrunn av de tidligere forsøkene var det derfor ikke overraskende at forsøkene som det ble benyttet 10% vann i metanol eller 37% HCl som katalysator ikke fungerte. Vann er et produkt som dannes når acetal-likevekten går mot acetaldannelse, derfor var det forventet at ved å ha vann til stede i reaksjonen ville hemme metyleringen.

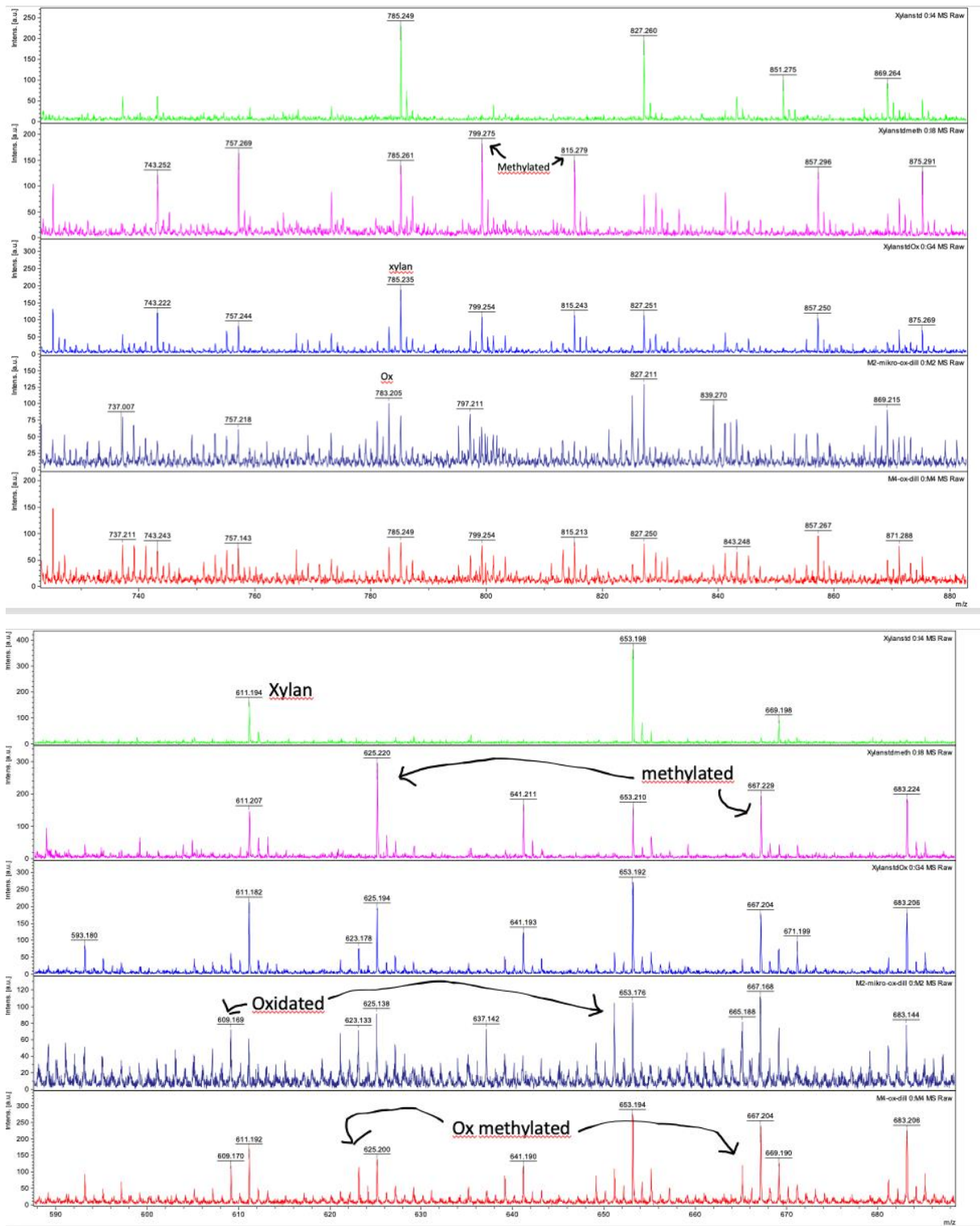
Det som var overraskende, var at de forsøkene med økt reaksjonstid og som foregikk i 100% metanol og med acetylklorid ikke så ut til å fungere ifølge undersøkelser på MALDI-ToF. Dette kan skyldes flere ting som for eksempel at det konsentrasjonen av de prøvene som ble merket på «MALDI-target plate» var for lav eller for høy, eller at rester av metylacetat var nok til å begrense signalet til den metylerte xylandet. En annen mulighet er at det kan ha skjedd noe under opparbeiding etter selve reaksjonen. Det som var forventet var at lenger reaksjonstid ville gi høyere grad av metylering som følge av mer tid til å få reagert alt stoffet på.

De negative resultatene av optimaliseringsforsøkene resulterte i at videre optimaliseringsforsøk ble lagt på is en periode. Først da mikrobølgeoppvarming ble brukt i forbindelse med oksidasjon av metylert xylan kom ideen om å teste hvordan mikrobølgeoppvarming ville påvirke graden av metylering. I likhet med optimaliseringsforsøkene så ble det ikke noe godt MS-spekter å tolke. Dette skyldes nok de samme årsakene på hvorfor tidligere forsøk ikke ga noe godt spekter. Derfor bør det vurderes om det er mulig å benytte andre teknikker for å kunne bekrefte om og hvor godt reaksjonen har gått. En mulighet er å benytte seg av NMR, men dette krever en utvidet opplæring på instrumentet. Den utvidete opplæringen er nødvendig siden standard innstillingene må endres og samtidig trengs det utvidet kunnskap i analyseprogrammet som benyttes. Dette er ikke heldig siden en masteroppgave foregår over en svært begrenset periode og derfor ble dette alternativet ikke vurdert. Siden det dukket opp ukjente problemer i analysen av

optimaliseringsforsøkene ble det videre arbeidet lagt på is siden det var andre reaksjoner knyttet til oppgaven som ble prioritert.

Tabell 3 viser noen utvalgte verdier og hva disse verdiene tyder på

m/z	Forbindelse
521	Xylan (Xy3Ac2)
535	Metylert xylan
609	Oksidert xylan
611	Xylan(Xy4Ac)
623	Oksidert metylert xylan
625	Metylert xylan
653	Xylan (Xy4Ac2)
665	Oksidert metylert xylan
667	Metylert xylan
783	Oksidert xylan
785	Xylan (Xy5Ac2)
797	Oksidert metylert xylan
799	Metylert xylan



Figur 14 viser MS-spekteret til ulike utgaver av xylan. 2 timer mikrooks (mørkblå), RNF xylan (grønn), metylert xylan (rosa), oksidert xylan (rød og blå), mikrobølgeoksidasjon (mørkblå)

Siden andre spektrometriske metoder er lite egnet til å kunne gi noe godt svar på om oksidasjonen hadde vært suksessfull eller ikke ble MS benyttet. I Tabell 3 er det en oversikt over hvilke verdier som det ble sett etter for å kunne si noe om oksidasjonen hadde godt eller

ikke. To utklipp av spektrene er vist i Figur 14. Noen verdier som er verdt å merke seg er 521, 653 og 785, dette er verdier som har differanser på 132. Dette er topper som tyder på repeterende pentose (xylose)-enheter. Siden RNF xylan er acetylerert vil en topp med masse på +42 m/z for hver acetylering i forhold til de repeterende pentoseenhet-toppene, for eksempel 611, være en xylan-topp med en mindre acetyl-gruppe enn 653 toppen. Selve oksidasjonen blir bekreftet av topper som har masse -2 relativt til toppene som tyder på xylan og metylert xylan. For eksempel så vil 783 tyde på oksidert xylan mens 797 tyder på oksidert metylert xylan. En tommelfingerregel er at hvis toppene 783 og 785 er ca 1:1 så kan det antas en oksidasjonsgrad på ca 50 %.

Resultatene av forsøkene tydet på at metylering av den reduserende enden ga en bedre oksidasjonsgrad sammenlignet med ikke-metylert reduserende ende. Oksidasjonsgraden var opp mot 60% i forsøkene med beskyttet reduserende ende mot ikke-beskyttet reduserende ende sine 50%. Dette tyder på at en konkurrerende reaksjon skjer ved reduserende enden på ikke-metylert xylan. Det var tydelig at en rekke utfordringer måtte overkommes for å oppnå akseptable resultater. Blant de mer alvorlige utfordringene er at det kreves en del mol% av katalysatoren for at oksidasjonen skal kunne gå. Dette skyldes nok at katalysatoren ikke er særlig robust og blir derfor tidlig deaktivert. Deaktivering av katalysatoren var overraskende siden dette ikke ble nevnt som et problem i noen av prosedyrene som rapporterte om god grad av oksidasjon med mol% <10. Behovet for høyere mol% enn det som ble oppgitt i enkelte prosedyrer kan skyldes at disse prosedyrene oksiderte mindre karbohydrater (mono- og disakkarider). Dette behovet ble ikke oppdaget før forsøk som skulle teste om det var katalysatorens holdbarhet som var problemet. Først etter forsøk med 10 mol% med katalysator som var under en uke gammel kom ideen om at problemene med de tidligere forsøkene måtte skyldes at det var for lite katalysator tilsatt, noe som stemmer med det tidligste forsøket som brukte 15 mol%. Dette var ganske irriterende siden denne feilen hadde kostet mye tid som heller kunne vært brukt på optimalisering. Det positive som kom ut av denne feilen var oppdagelsen av hvor lite robust katalysatoren er.

Dette resulterte i at etylbenzen og styren ble prøvd siden disse forbindelsene har dokumenterte egenskaper som gir høyere «turn over number» (TON). Siden det er tenkt at mål molekylet potensielt skal kunne brukes i for eksempel fôrpellets til dyr er disse forbindelsene uheldige å bruke. Både etylbenzen og styren er giftige forbindelser. Av ukjente årsaker ble det dessverre, som med mikrobølgeoppvarmet metylering av xylan, ikke noen MS-spektre som kunne si

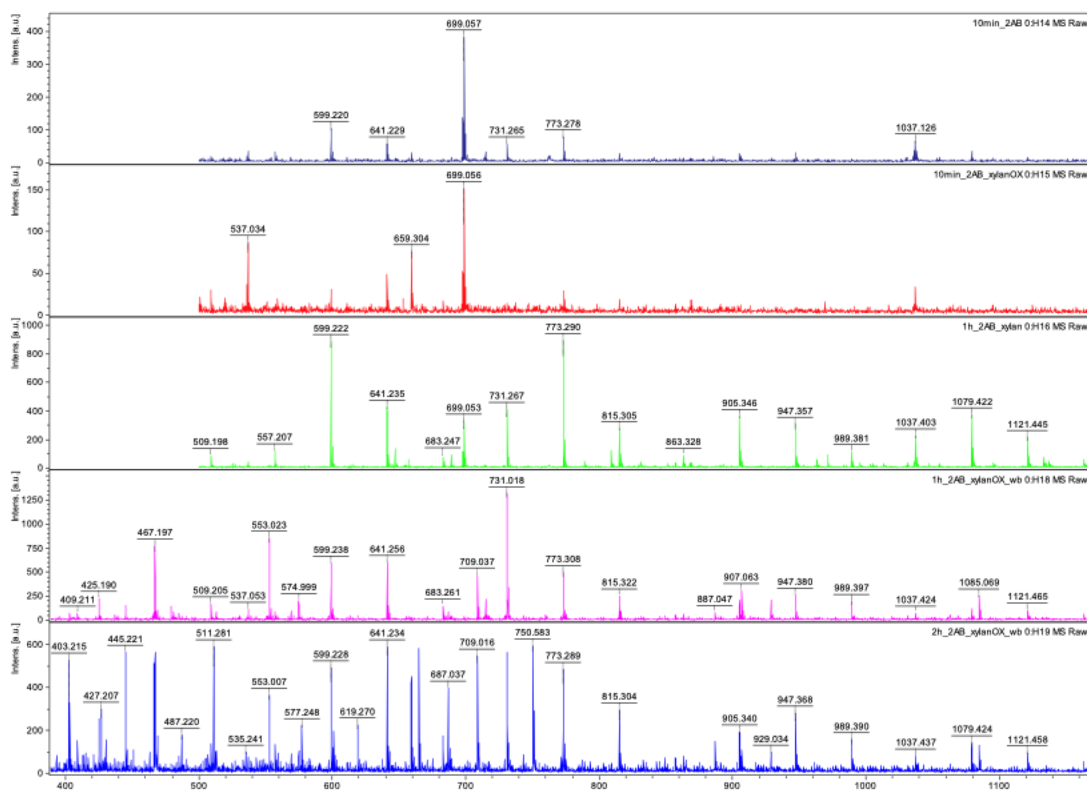
noe om hvor godt forsøkene hadde gått. Dette kan kanskje skyldes at rester av etylbenzen/styren ble igjen etter opprensingen og dermed kan ha vært nok til at det ikke ble noen gode spektre. Det kan derfor være verdt å prøve om en ekstraksjon med heksan vil fjerne restene av styren og etylbenzen.

Mikrobølgeoppvarming ble testet for å se om dette ville resultere i godt utbytte.

Mikrobølgeoppvarming ble sett på som en måte å overkomme to av problemene som var knyttet til oksidasjonsreaksjonene. Disse problemene var deaktivering og lang reaksjonstid. Spenningen lå i om mikrobølgeoppvarmingen ville gjøre at reaksjonen skjedde så raskt at katalysatoren ikke rakk å bli deaktivert og hvor stor reduksjon av reaksjonstiden ville bli. Det lå også en viss spenning om graden av oksidasjon ville være høyere sammenlignet med tradisjonell reaksjon i en uke. De første resultatene av mikrobølgeoppvarmingen var at reaksjonstiden kunne reduseres fra 5-7 dager til kun to timer på 100 grader. Om dette er de mest optimale betingelsene er ikke sikkert siden det på grunn av mangel på tid ble valgt å gå videre i arbeidet med målmolekylet. Et problem som mikrobølgeoppvarming medførte sammenlignet med tradisjonell reaksjon, var en sterk begrensning i mengde stoff som kunne lages samtidig. Siden de største prøverørene kun var på 30 ml og derfor kun kunne romme ca 15 ml, ble det kun mulig å oksidere inntil 150 mg xylan per kjøring i mikrobølgeovnen. På den andre siden vil det være mulig å gjennomføre mange to-timers reaksjoner på relativt kort tid.

Tabell 4 viser noen av verdiene som bekrefter 2AB-merking

<i>m/z</i> som viser 2AB-merket oksidert xylan
599
641
731
773
905
1037



Figur 15 viser MS-spektra til ulike 2AB-merkings forsøk. 10min_mikro_2AB-xylan(mørkeblå), 10min_mikro_2AB-xylanOX(rød), 1time_mikro_2AB-xylan(grønn), 1time_vannbad_xylanOX(rosa), 2time_vannbad_xylanOX(blå)

For å kunne si noe om forsøkene hadde fungert og mål molekylet **1a** ble dannet ble prøvene undersøkt på MALDI-ToF. Der ble det sett etter topper med masse på ca +120-121 relativt til oksidert xylan. Toppene 641 og 773 tyder på at reaksjonen gikk, noe som bekrefter at oksidasjonen har gått og mål molekylet **1a** ble dannet. Det var ingen topper i MS-spekteret som tyder på ureagert xylan, ureagert xylan ville hatt topper med m/z på for eksempel 521, 653 og 785. I forsøkene med oksidert xylan ville toppene for ureagert oksidert xylan hatt $m/z - 2$ sammenlignet med toppene til ureagert xylan. Det er også usikkert om resultatene kan brukes til å bekrefte/avkrefte om det har skjedd flere oksidasjoner på ikke-reduserende enden av xylan, men mye tyder på at det kun har skjedd en oksidasjon. Dette kommer av at det ikke er noen topper med $m/z +120$ sammenlignet med toppene som tyder på 2AB-merking.

Syntesen av amidet ved bruk av syreklorid og *N*-Boc piperazin gikk uten store problemer og ga rent stoff ifølge de spektrale dataene. Det å starte med syreklorid istedenfor syre har sine fordeler, blant annet at syreklorid er mer reaktivt. I tillegg ville det å benytte seg av syre resultert i et ekstra syntesetrinn, noe som ville resultert i større tap av stoff. Utbytte var noe bedre enn det som var oppgitt i litteraturen kan skyldes at heksan ble igjen i krystallene etter omkrystallisering.

Fjerning av Boc-gruppen ga noen utfordringer ved å følge prosedyren til Banno. Blant annet så måtte det lages 4M vannfri HCl. Dette sørget for at det gikk tid på å finne ulike alternativer som ville resultere i 4M HCl som var løselig i etylacetat. Det første alternativet som ble prøvd var å se om 37% HCl(aq) lot seg løse i etylacetat, noe som resulterte i to separate faser. Dette kom ikke som noen overraskelse siden dette kun ble prøvd for å få det 100% bekreftet at HCl ikke løser seg i etylacetat. De to gjenværende alternativene var da enten å danne HCl-gass ved å tilsette svovelsyre til NaCl og så overføre gassen til en kolbe med etylacetat eller å danne vannfri HCl via acetylchlorid. Valget falt på å benytte seg av acetylchlorid siden dette var den enkleste metoden å danne 4 M vannfri HCl. Den vannfrie HCl-en ble dannet ved å tilsette metanol til acetylchloriden og la den stå i ca 30 min for å være sikker på at alt stoffet hadde reagert. Når det var gjort gikk de neste trinne smertefritt og etter rotavaporen så var det dannet et hvit fast stoff. Det neste trinnet i prosedyren var noe mer utfordrende siden det faste stoffet skulle filtreres og vaskes med etylacetat, den samme væsken som var løsemiddelet i reaksjonen. Det at prosedyren sier at en væske som løser stoffet fullstendig opp skal benyttes til å vaske stoffet virket absurd. Siden det ikke var en alternativ væske i prosedyren, ble det benyttet etylacetat til vaskingen. Dette resulterte i et utbytte på 48%, noe som er nesten 40 %-poeng dårligere enn utbytte som ble oppgitt i prosedyren. Det dårlige utbyttet skyldes at det på et tidspunkt ble tilsatt for mye etylacetat slik at mye av stoffet løste seg opp og gikk gjennom filteret. Siden dette på forhånd ble ansett som en høyst reel mulighet ble all etylacetaten samlet opp og dampet inn på nytt på rotavapor. Etter at løsemiddelet var borte ble det konkludert i at det som allerede var rensert var mer enn nok til de videre forsøkene. Derfor ble det gjenværende stoffet ikke rensert slik at det reelle utbyttet kunne beregnes.

Dannelsen av målmolekylet **1b** ble testet ved ulike betingelser for å se hvilke betingelser som fungerte. Det ble også tydelig at metylering av xylan hadde vært en god ide uavhengig om metyleringen av den reduserende enden hadde gitt bedre oksidasjonsgrad eller ikke. Dette kom av at ved å beskytte den reduserende enden så ville kun det ønskede produktet bli dannet. Hvis den reduserende enden hadde vært ubeskyttet ville det vært en risiko for at den reduktive amineringen ville skjedd der eller både på reduserende enden og karbonylgruppen på ikke-reduserende enden. Det ble testet hvordan mikrobølgeoppvarming ville kunne gi en tilsvarende lik reduksjon i reaksjonstid sammenlignet med å la reaksjonen foregå ved romtemperatur som det var i forsøkene med oksidasjon av xylan. Dette ble gjort siden det ved

enkelte reaksjoner ble rapportert om lang reaksjonstid på opp imot 5 dager.

Mikrobølgeoppvarming har i tidligere forsøk vist seg å fungere godt til å redusere reaksjonstiden betydelig og gi gode utbytter. Dette gjaldt oksidasjon av xylan hvor reaksjonstiden kunne reduseres fra en uke til 1-2 timer på 100 grader. Opprensingen i prosedyren til Sato ga en liten overraskelse som resulterte i tap av utbytte. Det at det ikke var noen advarsel om skumdannelse ved tilsetning av Na_2CO_3 kostet fort veldig mye stoff siden det kun ble 15 mg (15%) produkt i forsøket på to timer mikrobølgeoppvarming på 90 grader. Utbyttet var lavere enn hva som var forventet siden det er rapportert om utbytter på godt over 90% også ved reaksjoner som involverer oligosakkarider. Dette tyder på at skummet kan ha sørget for et stort tap av stoff.

En mistanke som dukket opp etter at forsøket på to timer mikrobølgeoppvarming på 120 grader også ga utbytte på ca 15% var at det var vannfasen som stoffet lå i. Mistanken dukket opp siden det i dette forsøket ikke skummet like mye over og at reaksjonen i litteraturen foregikk i DMSO, et løsemiddel som lar seg løse i vann. Denne mistanken ble lagt død da det i forsøket som hadde foregått i romtemperatur kom et utbytte på ca 50%. Siden det ikke skummet over i dette forsøket kan det antas at problemet er at ikke alt av produktet kommer over i den organiske fasen etter to ekstraksjoner. Dette kan kanskje komme av at den polare delen av molekylet (xylan) blir for dominerende når det kommer til hvilken type løsemiddel som målmolekylet **1b** løser seg best i. For å få mer av målmolekylet over i den organiske fasen ble det besluttet å øke antall ekstraksjoner fra to til fire. Dette resulterte i en signifikant økning i utbytte selv i det ene forsøket som dessverre skummet over. De to ekstra ekstraksjonene resulterte i at utbyttet i reaksjonen hvor det skummet over gikk fra 15 til 39%. I forsøket som ikke skummet over så gikk utbyttet fra 50 til 65%. Dette tyder på at en økning i antall ekstraksjoner gir bedre utbyttet.

En annen mulig forklaring på at utbyttet fremdeles var langt under det som er rapportert i litteraturen er at det ikke all xylanet som ble tilsatt var oksidert. Dette kommer av at det kun blir en antagelse om hvor mye av xylanet som er oksidert basert på en tommelfingerregel. Tommelfingerregelen går ut på at hvis toppen til oksidert xylan har ca lik intensitet som toppen til xylan kan det antas at graden av oksidasjon er på ca 50%. Ut ifra MS-spektrene på det oksiderte xylanet som ble brukt så kunne graden av oksidasjon variere fra ca 50 til 60% avhengig om stoffet hadde stått i romtemperatur i 7 dager eller 2 timer på 100 grader i

mikrobølgeovn. Det reelle utbyttet vil derfor kunne være noe høyere enn hva som ble oppgitt siden xylanet som ble tilsatt hadde en oksidasjonsgrad på ca 50-60%.

Konklusjon og videre arbeid

Syntesen av katalysatoren resulterte i varierende grad av suksess. Der hvor de to første trinnene ga utbytte stabilt over 70% så ga det siste trinnet noen utfordringer. Utbyttet i det siste trinnet varierte fra 35-89%, noe som skyldes en fordobling av den opprinnelige prosedyren gir varierende utbytte. Det varierende utbyttet gjør det vanskelig å få til en reaksjon på stor skala siden mengden katalysator ikke holder til å oksidere mer enn ca 400 mg xylan forutsatt bruk av 20 mol%. Det bør derfor undersøkes om det er mulig å få lagd katalysatoren med stabilt utbytte på minst 61%. Hvis dette skulle vise seg å fungere vil dette gi muligheten til å prøve fordobling på de andre trinnene i syntesen. Alt dette vil gjøre metoden bedre siden det er tidkrevende å gjennomføre alle trinnene i syntesen.

Til det videre arbeidet bør det vurderes å benytte seg av mikrobølgeoppvarming i syntesen av katalysatoren. Det første syntesetrinnet vil det nok ikke være noe poeng å bruke mikrobølgeoppvarmingen siden det ikke er noen ioniske forbindelser til stede. Derimot så vil de to siste trinnene av syntesen være mulig å gjennomføre ved mikrobølgeoppvarming. Disse reaksjonene inneholder ioniske forbindelser som kan absorbere EM-stråling. Grunnen til at disse reaksjonene kan prøves i mikrobølgeoppvarming er at volumene før tilsetning av eter kan passe til prøveglassene benyttes i mikrobølgeforsøk, det vil si ca 15 ml. Dette betyr at i det siste trinnet må det tilsettes 5 ml mindre enn det som skal tilsettes ved fordobling, men den potensielle gevinsten gjør at det kan være verdt forsøket. Ved å effektivt tilføre noe varme til molekylene vil det kanskje være nok til at det blir dannet mer og renere stoff. Det er flere grunner til hvorfor mikrobølgeoppvarmingen ikke skal benyttes til utfelling av det faste stoffet. Blant annet siden eter vil sørge for at det blir en stor begrensning på temperatur siden eter er en flyktig forbindelse. En annen viktig grunn er at det vil bli lagd ganske lite stoff per prøveglass om utfellingsdelen også skulle foregått i mikrobølgeovnen.

Alternativt til katalysator er enzymer. Dette bør vurderes siden enzymatisk oksidasjon også vil gi en selektiv oksidasjon av et karbohydrat. Bakgrunnen til at dette bør vurderes er at det er bevist at galaktoseoksidase fungerer godt på polysakkarider som har en galaktoseenhet på ikke-reduserende enden. Hvis det finnes et oligo- eller polysakkarid med galaktoseenhet på ikke-reduserende enden og det er mulig å få til en reaksjon i betingelser som

galaktoseoksidase tåler bør dette sterkt vurderes. Dette vil potensielt kunne gi store besparelser på tid siden det da ikke vil være nødvendig å bruke dager på å lage katalysatorer.

Oksidasjonen av xylan hadde sine utfordringer, men når de ble løst gikk reaksjonen ganske bra og ga nok produkt slik at mål molekylet kunne bli dannet. En ting som det kan konkluderes med er at det betydningen av å metyl-beskytte den reduserende enden gir noe høyere oksidasjonsgrad enn for ikke-beskyttet. Siden økningen var på opptil 20% (10%-poeng) er det udiskutabelt at det å beskytte reduserende enden gir god effekt. Det videre arbeidet bør fokusere på hvordan oksidasjonen kan bli enda bedre, blant annet ved å se på mulighetene for bruk av lavere mol% enn de 20 som ble brukt i denne oppgaven. En annen ting som det bør sees på videre på er bruken av etylbenzen og syren sine egenskaper når det kommer til å forhindre deaktivering av katalysatoren. Basert på litteraturen vil disse to forbindelsene kunne bidra til lavere forbruk av katalysator. Det bør også gjøres videre forsøk på å lete etter mer optimale oksidasjonsbetingelser på mikrobølgeovnen.

Syntesen av aminet gikk relativt smertefritt siden det ble benyttet et syreklorid fremfor syre. Prosedyren til Banno ga et godt utgangspunkt for en god syntesevei for å danne aminet. Det eneste minuset med metoden er løsemiddel som ble benyttet til filtreringen. Det bør derfor vurderes om en alternativ metode for å fjerne Boc-gruppen bør benyttes eller gjøre undersøkelser på om det kan benyttes et annet løsemiddel til filtreringen.

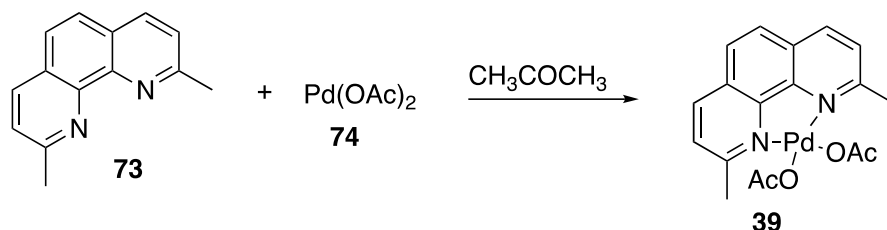
Den reduktive amineringen fungerte for begge aminene. Det kan derfor konkluderes i at enda flere aminer bør kunne kobles til xylan etter metoden som er beskrevet i denne oppgaven. Det kan også konkluderes med at metylering av den reduserende enden er avgjørende for å danne **1a** og **1b**. Hvis den reduserende enden ikke beskyttes så er det risiko for å få en blanding av flere ulike produkter. Det bør derfor vurderes om noe av det videre arbeidet bør gå til å få en høyere grad av metylering enn det som ble oppnådd i denne oppgaven. Selv om metoden til Sato fungerte, så ga varierende suksess basert på utbyttet. Dette skyldes nok at metoden til Sato opprinnelig ikke ble brukt til karbohydrater og at det skummet over i en del forsøk da det ble tilsatt Na_2CO_3 . Når det kommer til det videre arbeidet på den reduktive amineringen bør det undersøkes om det kan gjøres noen endringer i metoden til Sato for å se om dette vil gi enda bedre utbytte. For eksempel bør det testes om det trengs mer enn fire ekstraksjoner med etylacetat. Det bør også vurderes om et annet organisk løsemiddel som er noe mer polart kan

gi bedre utbytte ved at mer av produktet kommer over i den organiske fasen. Det bør også vurderes å se om det er mulig å optimalisere mikrobølgeoppvarmingen.

Ekspérimentelt

Syntese av palladumkatalysatoren **41**

Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ **39**

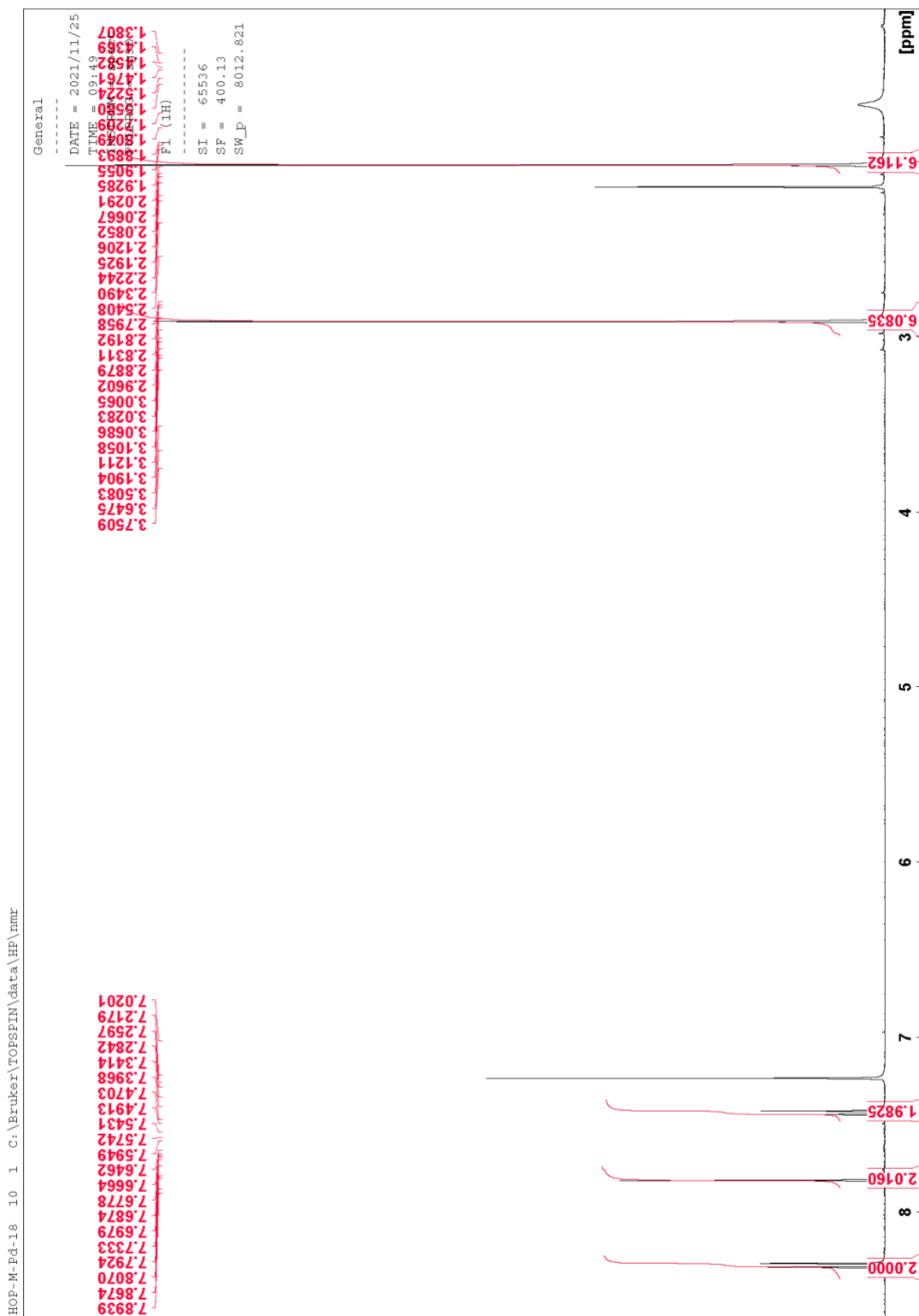


Skjema 41 viser syntesen av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)₂ **39**

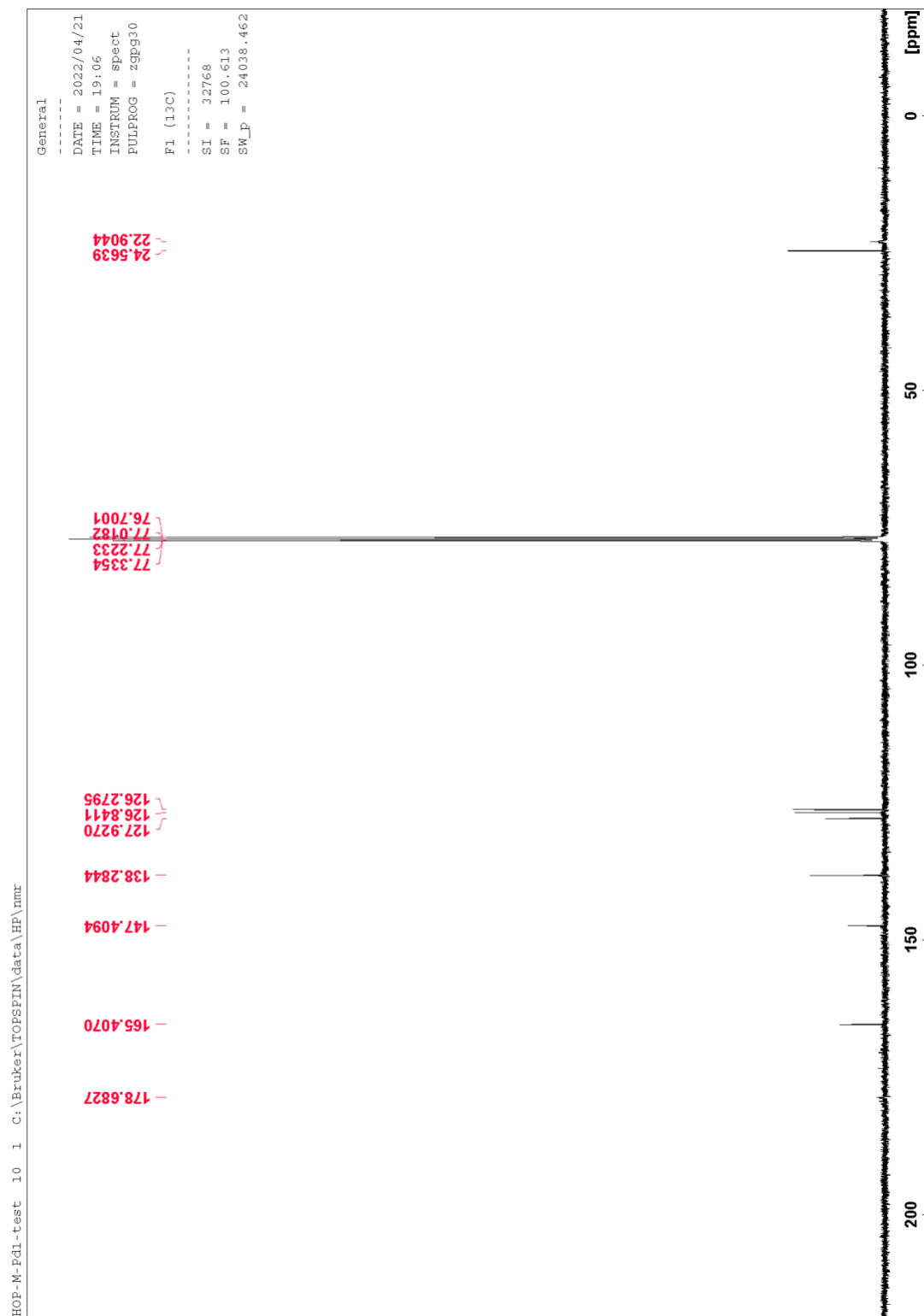
I en 100 ml rundkolbe ble **73** (0.639g, 3.07 mmol) og **74** (0.679, 3.02 mmol) løst i 55 ml aceton. Denne løsningen ble så rørt over natten ved romtemperatur. Etter en natt med røringen hadde det blitt dannet gult bunnfall som ble isolert med sentrifugering. For å sikre god opprensing ble det benyttet 4-6 sentrifugerør av plast. Etter 10 minutter på 4000 rpm ble supernatanten dekantert og det gule bunnfallet ble vasket 2 ganger med aceton etterfulgt med sentrifugering etter hver vask. Til slutt ble det bunnfallet tørket over natten i vakuum. Utbytte 0.966g, 74%.

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): 2.06 ppm (s, 6H), 2.98 ppm (s, 6H), 7.5 ppm (d, 8.36 Hz, 2H), 7.85 ppm (s, 2H), 8.31 ppm (d, 8.32 Hz, 2H).

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): 23, 24.56, 126.3, 126.84, 127.9, 138.3, 147.3, 165.4, 175.7 ppm

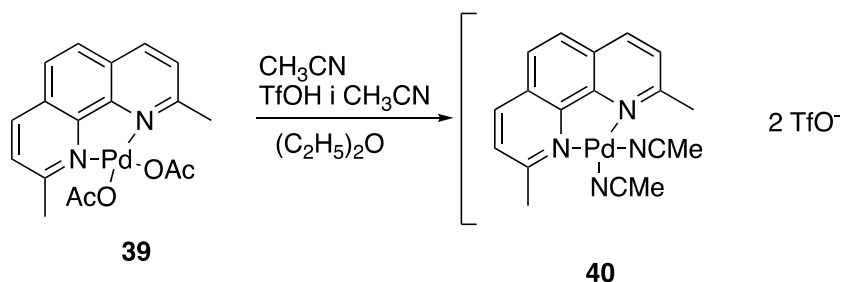


Figur 16 viser ^1H NMR spekteret til (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ **39**



Figur 17 viser ^{13}C NMR spekteret til (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ **39**

Syntese av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ **40**

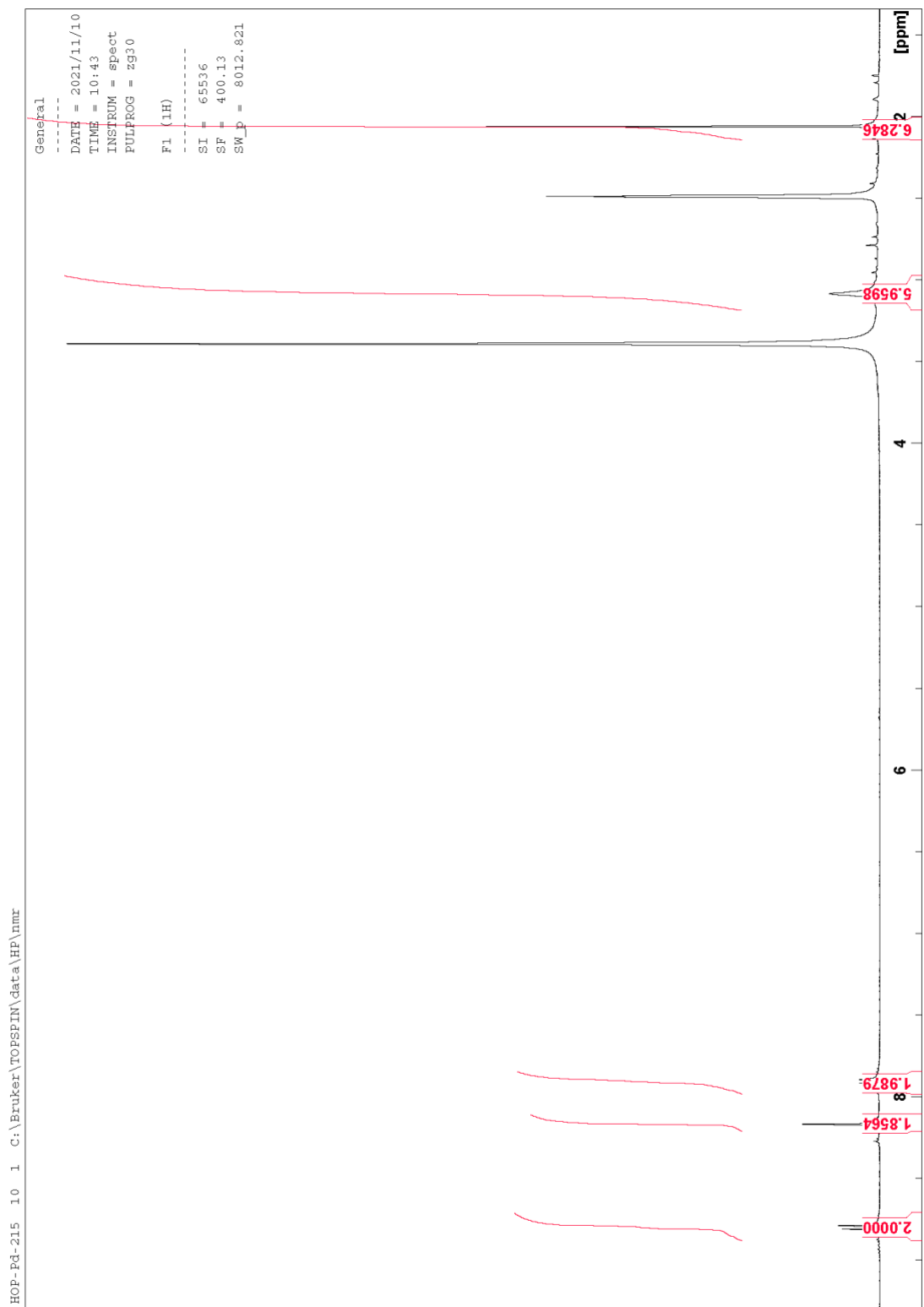


Skjema 42 viser syntesen av (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(MeCN)₂OTf₂ **40**

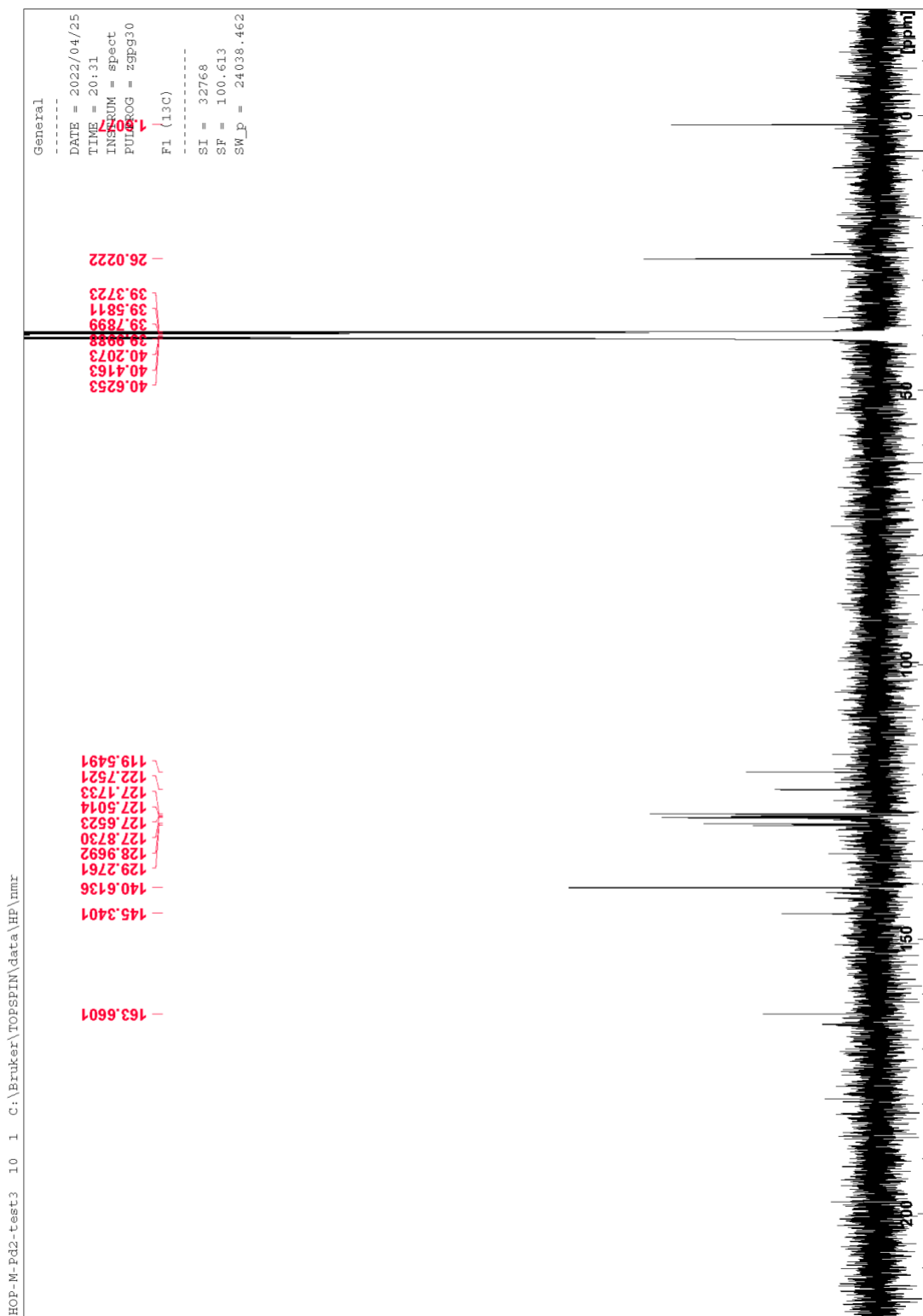
I en 25 ml rundkolbe ble en løsning av **39** (0,2405g, 0.557 mmol) i 1 ml acetonitril tilsatt en løsning av trifluoretansulfonsyre i acetonitril (0.33M, 3.8 ml, 2.5 ekvivalenter). Etter 10 minutter røring ble det tilsatt 10 ml dietyleter som resulterte i utfelling av et gult bunnfall. Bunnfallet ble isolert ved sentrifugering. Blandingen ble overført til sentrifugerør av glass og ble sentrifugert i 15 min på 4000 rpm. Opprensingen av bunnfallet var å løse bunnfallet i acetonitril for så å bli felt ut igjen ved å tilsette dietyleter. Dette ble gjort 2 ganger med sentrifugering etter hver vask. Supernatanten fra første sentrifugering ble tilsatt en løsning av trifluoretansulfonsyre i acetonitril (0.33M, 1.0 ml, 2.5 ekvivalenter) og så rørt i 2 minutter før 2 ml dietyleter ble tilsatt. Dette ble gjort for å felle ut ytterligere mengde bunnfall. Dette bunnfallet fulgte samme prosedyre for opprensing som det opprinnelige bunnfallet. Til slutt ble alt bunnfallet samlet i samme sentrifugerør og så ble det tørket over i natten i vakuum. Utbytte = 0,305g, 79%

¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): 2.06 ppm (s, 6H), 2.98 ppm (s, 6H), 7.92 ppm (d, 8.28 Hz, 2H), 8.19 ppm (s, 2H), 8.81 ppm (d, 8.36 Hz, 2H).

¹³C NMR (100MHz, DMSO-*d*₆): 1.6, 26, 119.5, 122.75, 127.17, 127.5, 127.65, 127.87, 129, 129.27 140, 145, 163.66 ppm

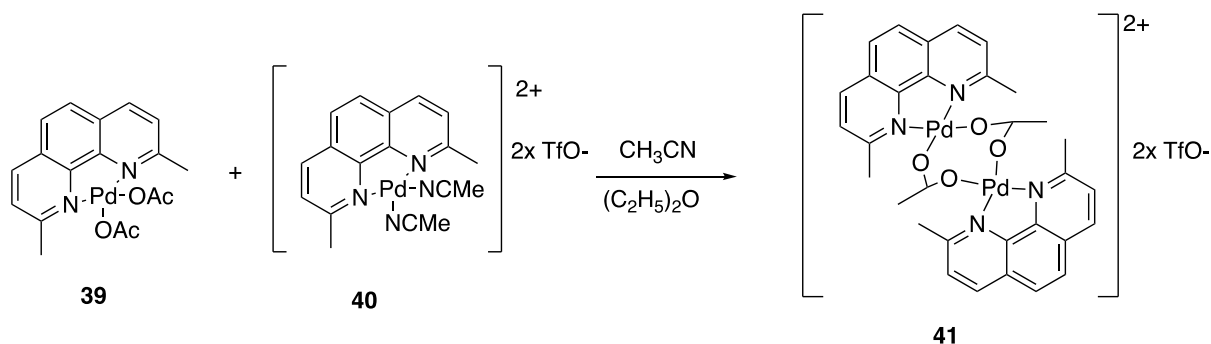


Figur 18 viser ^1H NMR spekteret til $(2,9\text{-dimetyl-}1,10\text{-fenantrolin})\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{OTf}_2$ **40**



Figur 19 viser ^{13}C NMR spekteret til (2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin) $\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{OTf}_2$ 40

Syntese av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ **41**



Skjema 43 viser syntesen av [(2,9-dimetyl-1,10-fenantrolin)Pd(OAc)]₂OTf₂ **41**

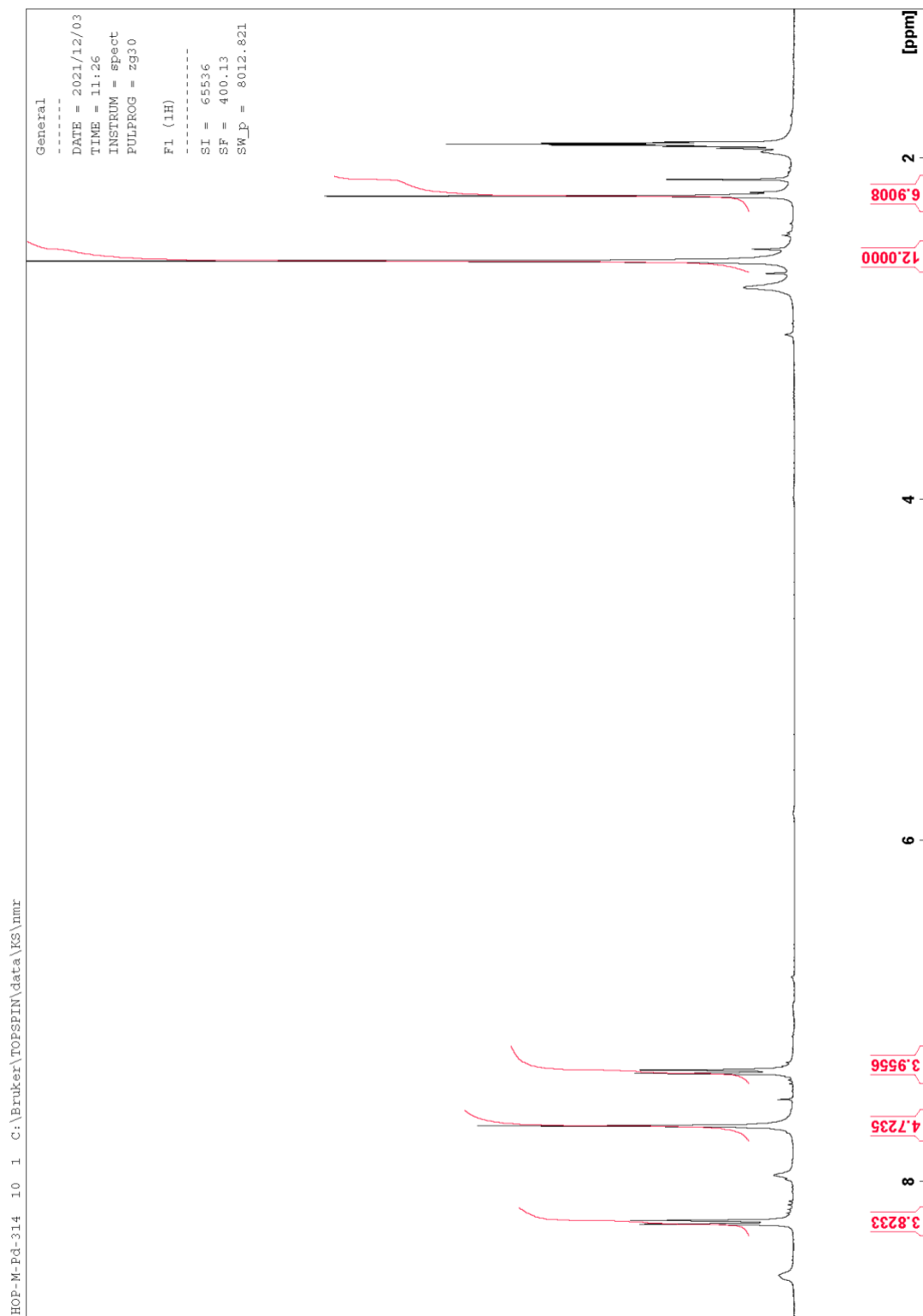
I en 100 ml rundkolbe ble **39** (0.0810 g, 0.188 mmol) og **40** (0.1233g, 0.177 mmol) løst i 20 ml acetonitril. Etter 20 minutter røring ble 50 ml dietyleter tilsatt for å felle ut det faste stoffet. For å være sikker på at alt stoffet ble felt ut ble løsningen rørt i 5 minutter etter at dietyleter ble tilsatt. For å isolere det faste stoffet ble løsningen overført til sentrifugerør av glass og sentrifugert i 10 minutter på 4000 rpm. Etter sentrifugeringen ble supernatanten dekantert og det faste stoffet ble vasket 2 ganger med dietyleter med sentrifugering etter hver vask. Til slutt ble det faste stoffet tørket over natten i vakuum. Utbytte = 0,1140g, 69%.

¹H NMR (400MHz, CD₃CN), mettet for å favorisere dimer: 2.22 ppm (s, 6H) og 2.59 ppm (s, 12H), 7.36 ppm (d, 8.36 Hz, 4H), 7.66 ppm (s, 4H), og 8.24 ppm (d, 8.36 Hz, 4H).

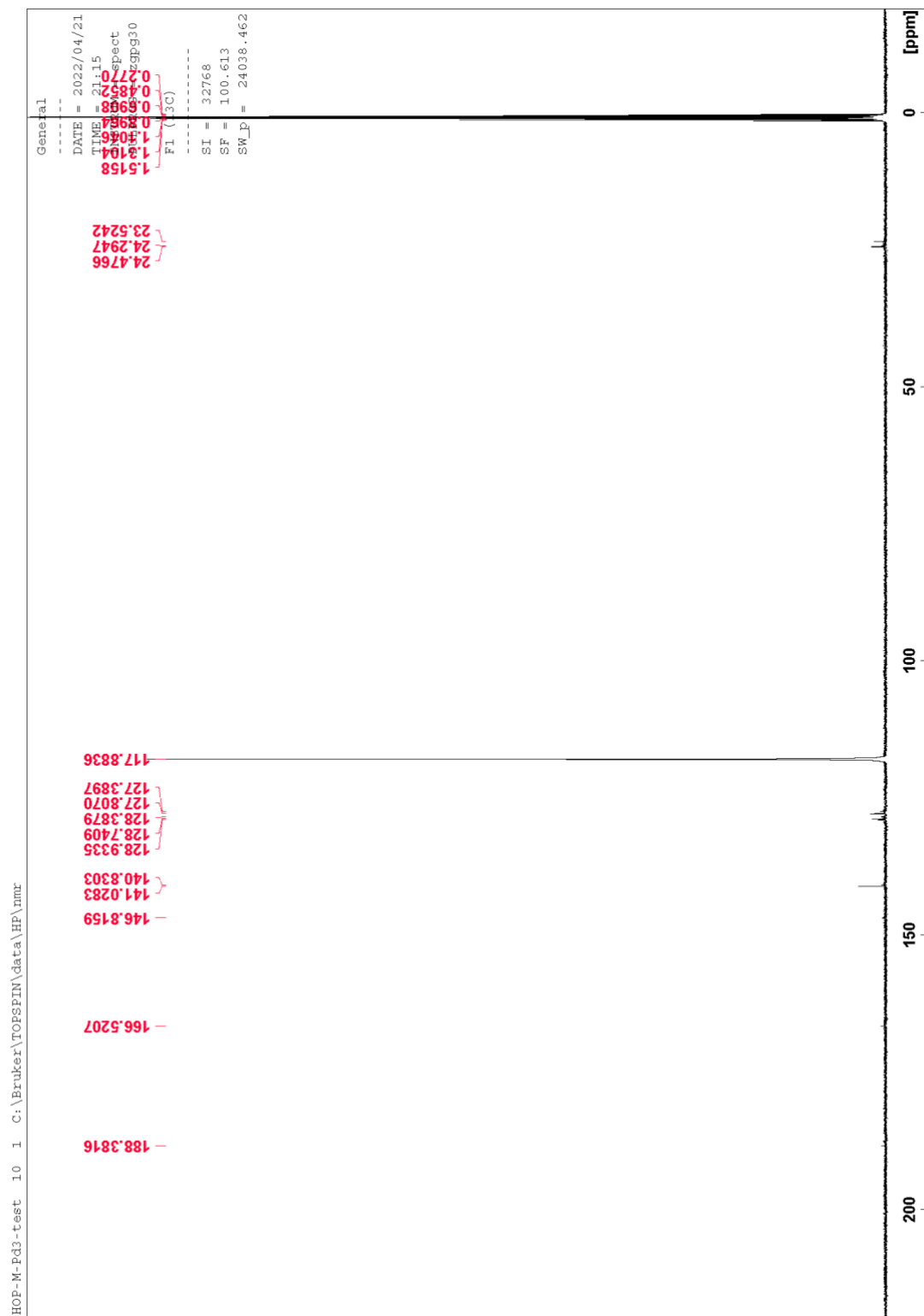
¹H NMR (400MHz, CD₃CN), monomer: 1.98 ppm (s, 3H), 2.8 ppm (s, 6H), 7.71 ppm (d, 8.36 Hz, 2H), 8.01 ppm (s, 2H), og 8.59 ppm (d, 8.36 Hz, 2H).

¹³C NMR (100MHz, CD₃CN): 23.5, 24.47, 127.8, 128.4, 128.9, 141, 146.8, 166.5 og 188.4 ppm.²

² Det er flere toppen i ¹³C NMR spekteret enn det som ble beskrevet. Dette kommer nok av flere av de toppene med relativ lik kjemisk shift kommer som følge av en overlapp siden det ble ca 2500 scans for å få dannet dette spekteret.

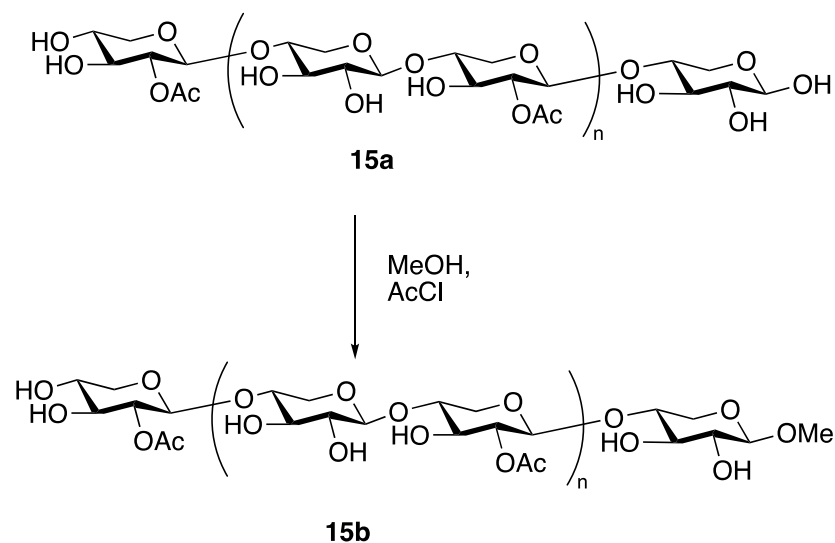


Figur 20 viser ^1H NMR spekteret til $[(2,9\text{-dimetyl-}1,10\text{-fenantrolin})\text{Pd}(\text{OAc})_2]\text{OTf}_2$ **41**



Figur 21 vise ^{13}C NMR spekteret til $[(2,9\text{-dimetyl-}1,10\text{-fenantrolin})\text{Pd}(\text{OAc})_2]\text{OTf}_2$ **41**

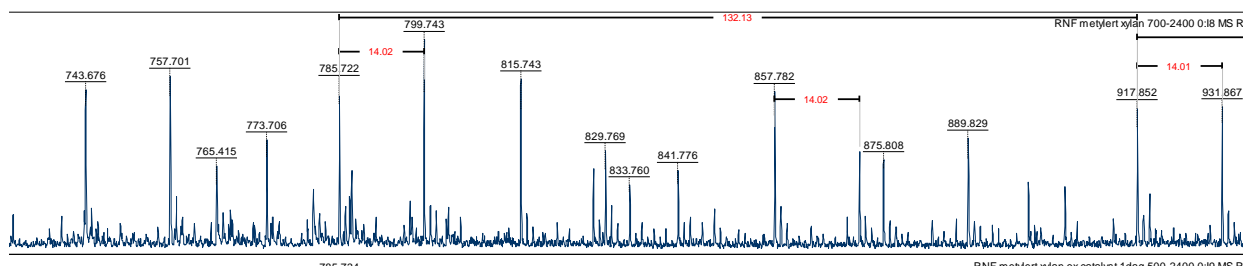
Metylering av reduserende enden til Xylan 15a



Skjema 44 viser metylering av reduserende enden til xylan 15a

2,12 g **15a** ble løst i 50 ml metanol før katalytisk mengde (0,36 ml) acetylklorid ble tilsatt dråpevis. Acetylklorid og metanol dannet metylacetat og vannfri HCl, der HCl er den reelle katalysatoren. Denne blandingen sto i 2 timer under røring ved romtemperatur. reaksjonen ble stoppet ved å tilsette trietylamin(0,7ml). Siden ikke all metanolen ble dampet bort ble det vanskelig å beregne det reelle utbyttet. Grad av metylering 66-75%

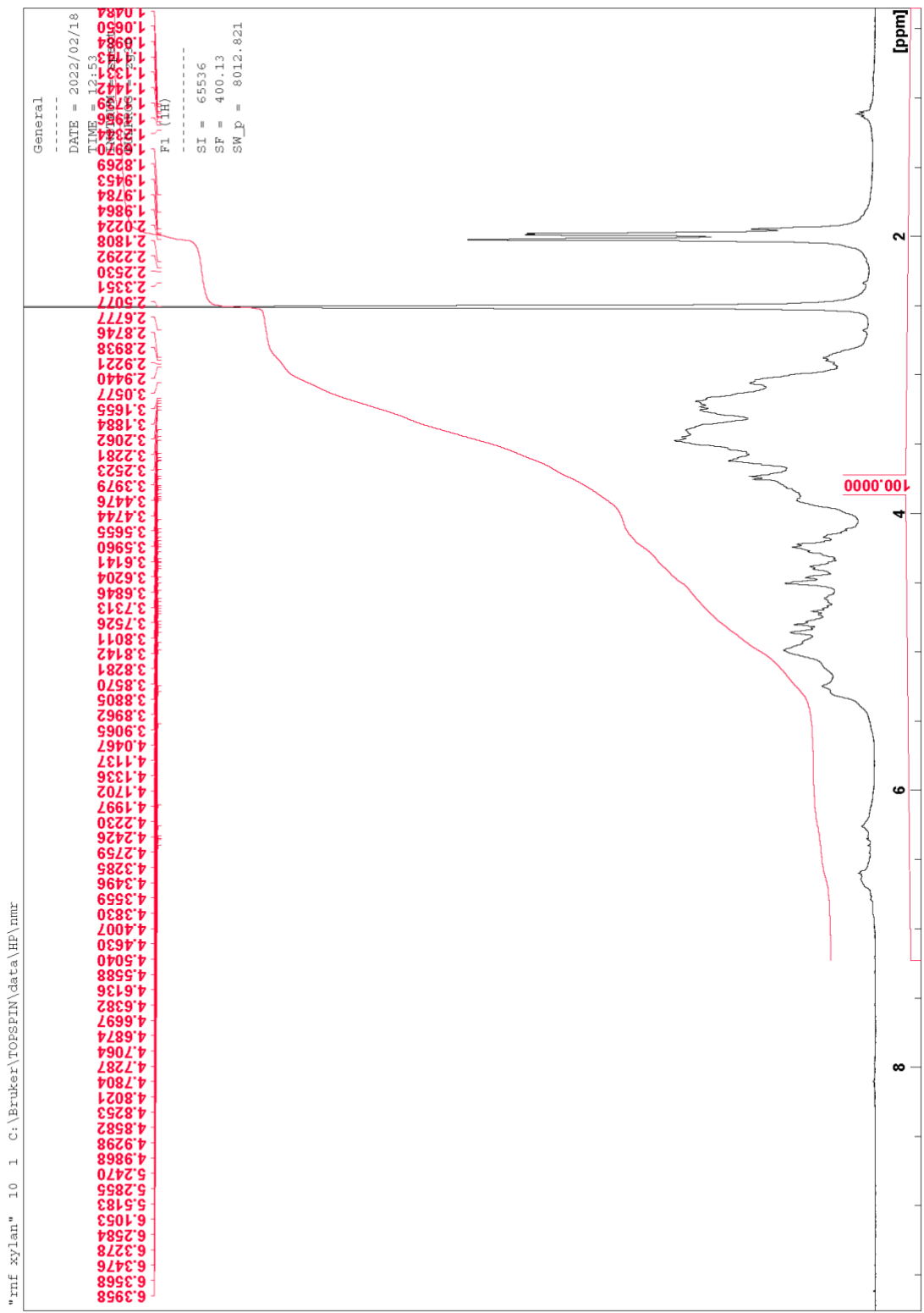
^{13}C NMR toppen på 92-93 ppm, ingen topper mellom 6 og 7 ppm i ^1H NMR, og +14 topp fra pentosenhetstopper bekrefter at metyleringen ble bekreftet.



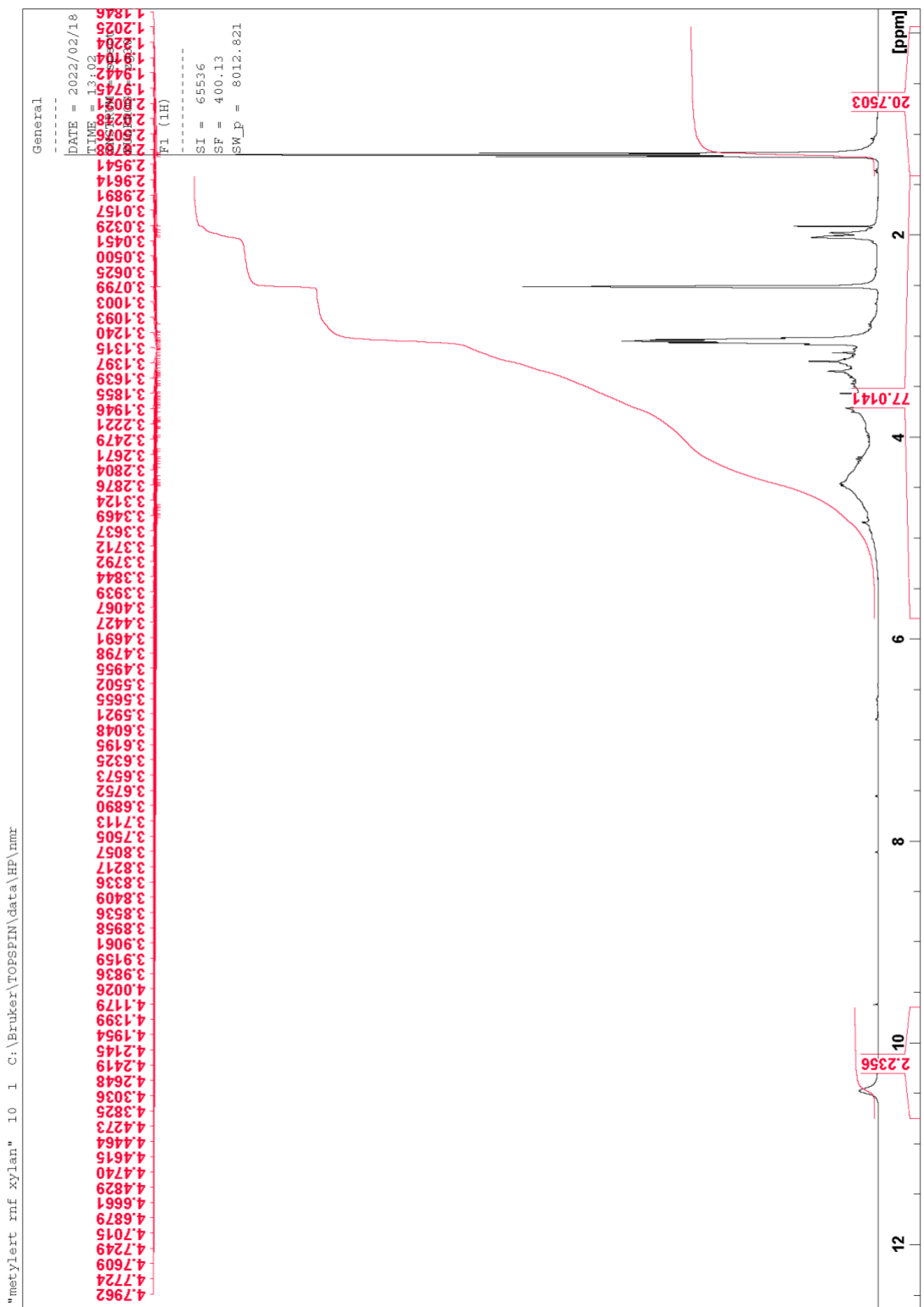
Figur 22 viser MS-spekteret til metylert xylan 15b

I ^1H NMR-spekterne til xylan og metylert xylan ble det ikke forsøkt å integrere de ulike toppene siden dette ikke ble ansett som nyttig informasjon. Grunnen til dette er at det kun er mangel på de to toppene mellom 6-7 ppm som bekrefter at reaksjonen har gått. Ellers er det

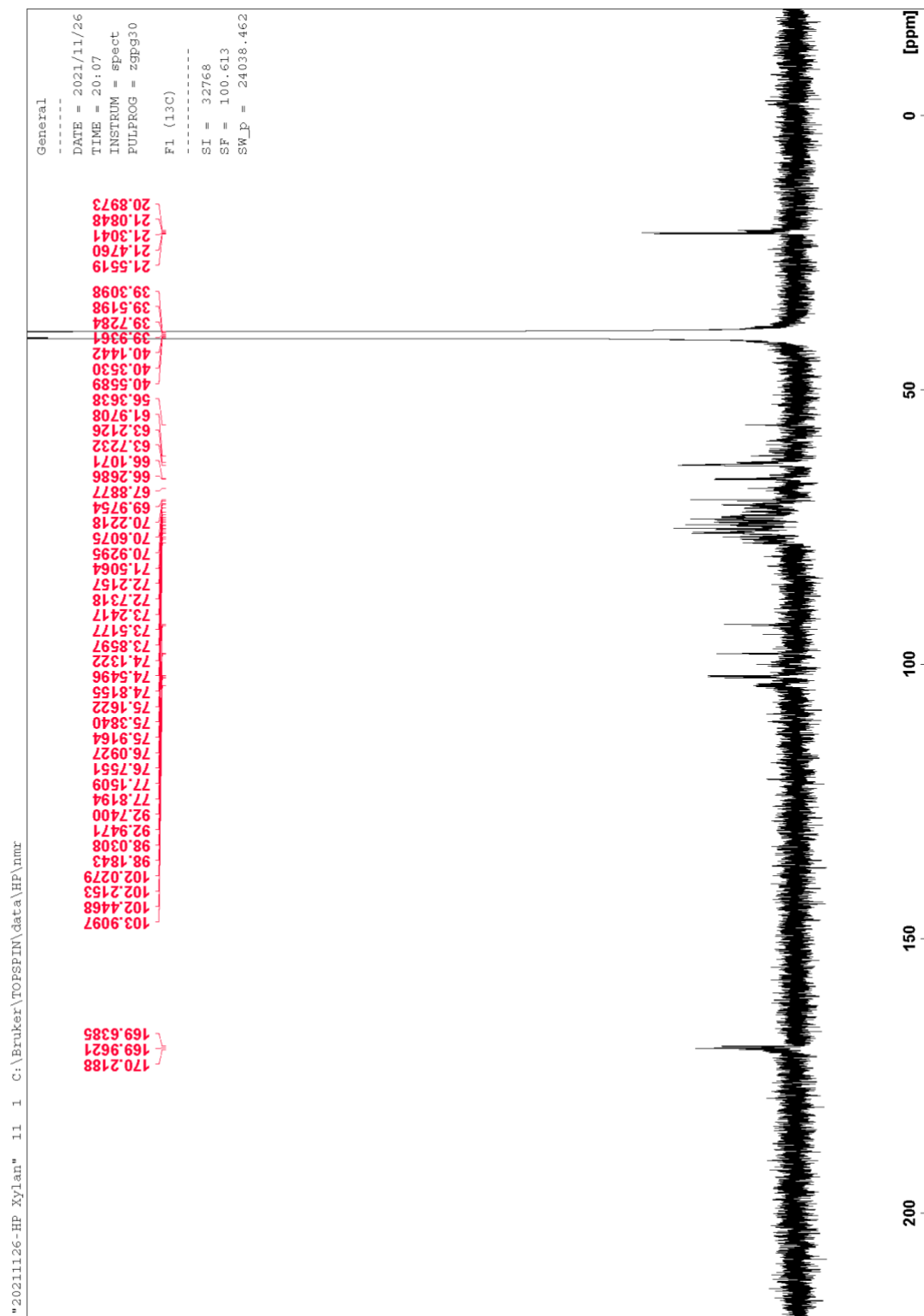
ikke mer å si enn at de resterende toppene ligger innenfor de kjemiske skift som er forventet for karbohydrater.



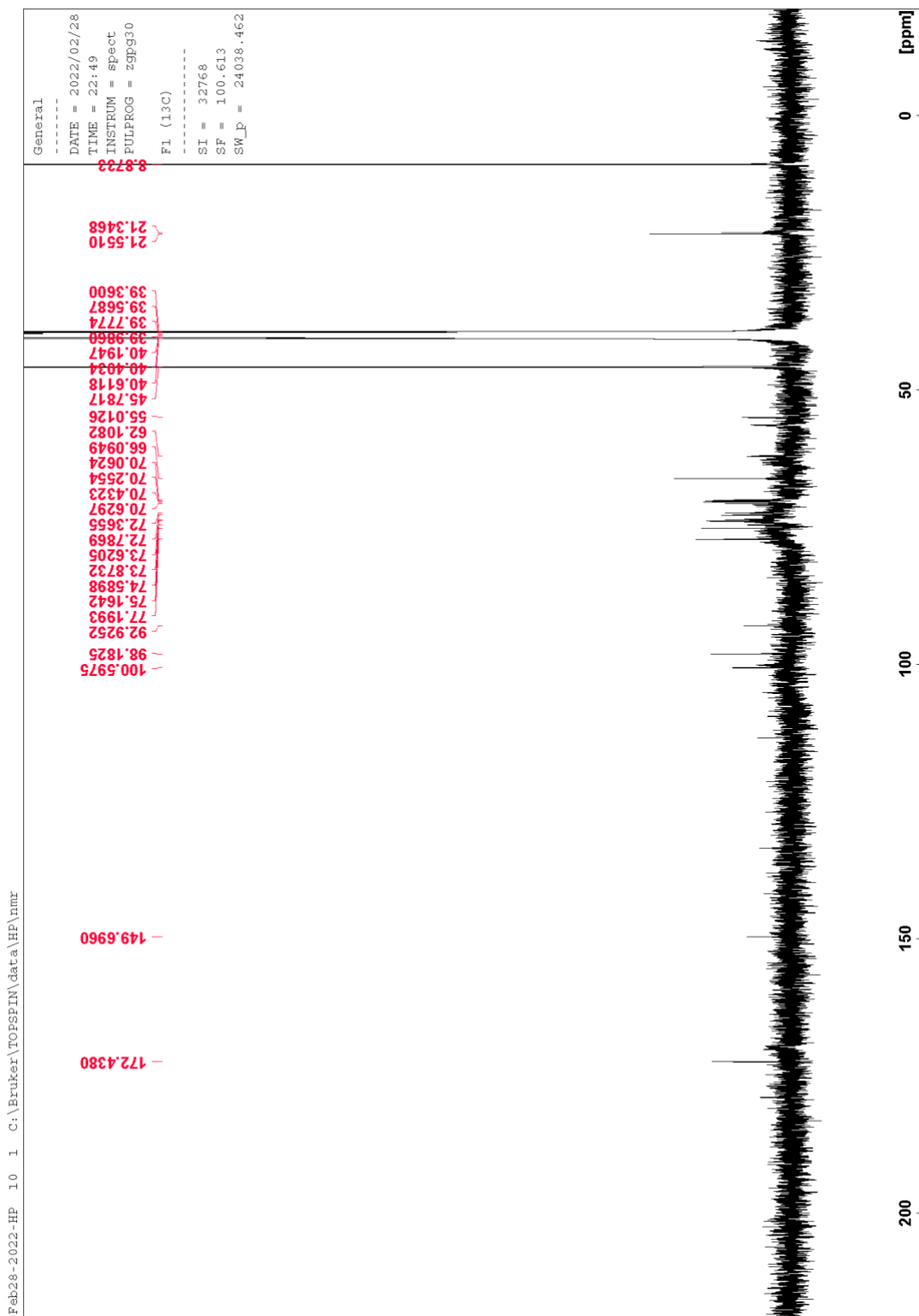
Figur 23 viser ¹H NMR spekteret til RNF xylan 15a



Figur 24 viser ^1H NMR spekteret til methylert RNF xylan **15b**



Figur 25 viser ^{13}C NMR til RNF xylan 15a



Figur 26 viser ^{13}C NMR spekteret til metylert RNF xylan **15b**

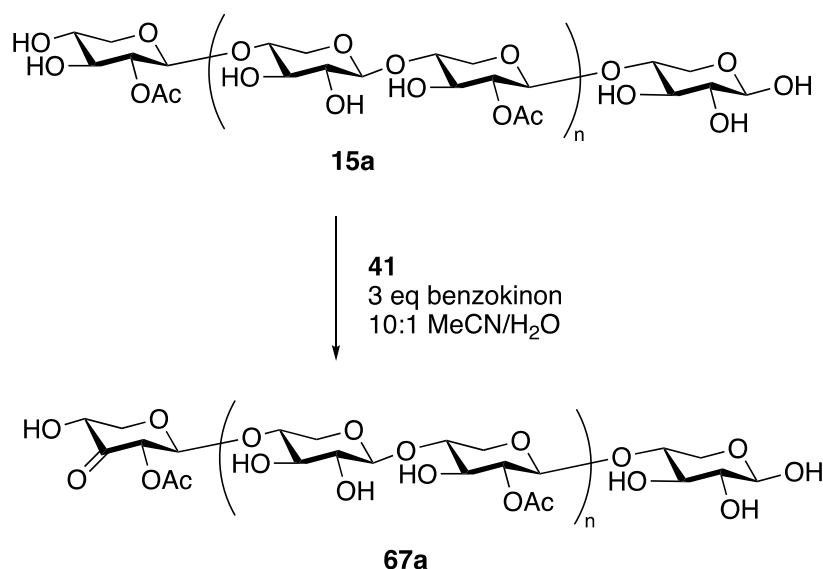
Metylering ved bruk av mikrobølgeoppvarming

100 mg **15a** (0.0897 mmol) ble løst i 10 ml metanol. Da alt var løst, ble det tilsatt katalytisk mengde acetylklorid/eddiksyre (5 dråper). Deretter ble løsningen satt på mikrobølgeovnen og varmet i 30 min på 60/80 grader celsius.

Optimaliseringsforsøk som ikke fungerte

200 mg **15a** (0.179 mmol) ble løst i ca 20 ml metnaol eller 10% vann i metanol. Deretter ble katalytisk mengde acetylklorid/ HCl tilsatt. Denne blandingen sto så i romtemperatur i 2 timer eller overnatten. Reaksjonen ble stoppet ved å tilsette 1 ml trietylamin. Løsemiddelet ble dampet bort på rotavapor før prøven sto i vakuum over natten.

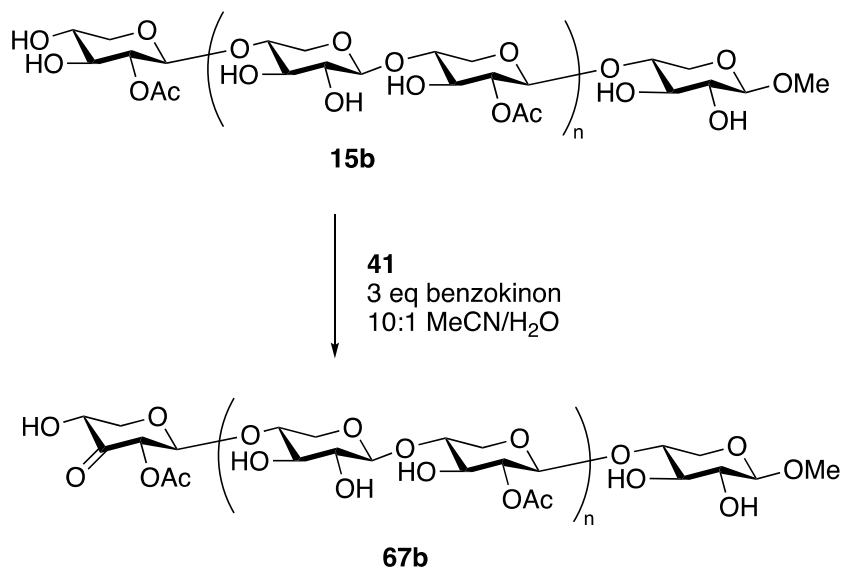
Oksidasjon av Xylan med ikke-beskyttet reduserende ende **15a**



Skjema 45 viser oksidasjon av **15a**

500 mg **15a** (0.4545 mmol) ble løst i 5 ml acetonitril/vann (10:1). Etter at **15a** hadde løst seg ble 147 mg benzokinon (1,36 mmol, 3 eq), og 64 mg **41** (0,072 mmol, 15 mol%) tilsatt løsningen. Denne løsningen sto så i en uke hvor små prøver ble tatt ut for å se hvordan oksidasjonsgraden utviklet seg over tid. Ca 50% oksidasjon etter en uke.

Oksidasjon av Xylan med metylert reduserende ende **15b**



Skjema 46 viser oksidasjon av **15b**

Forsøk som ikke fungerte

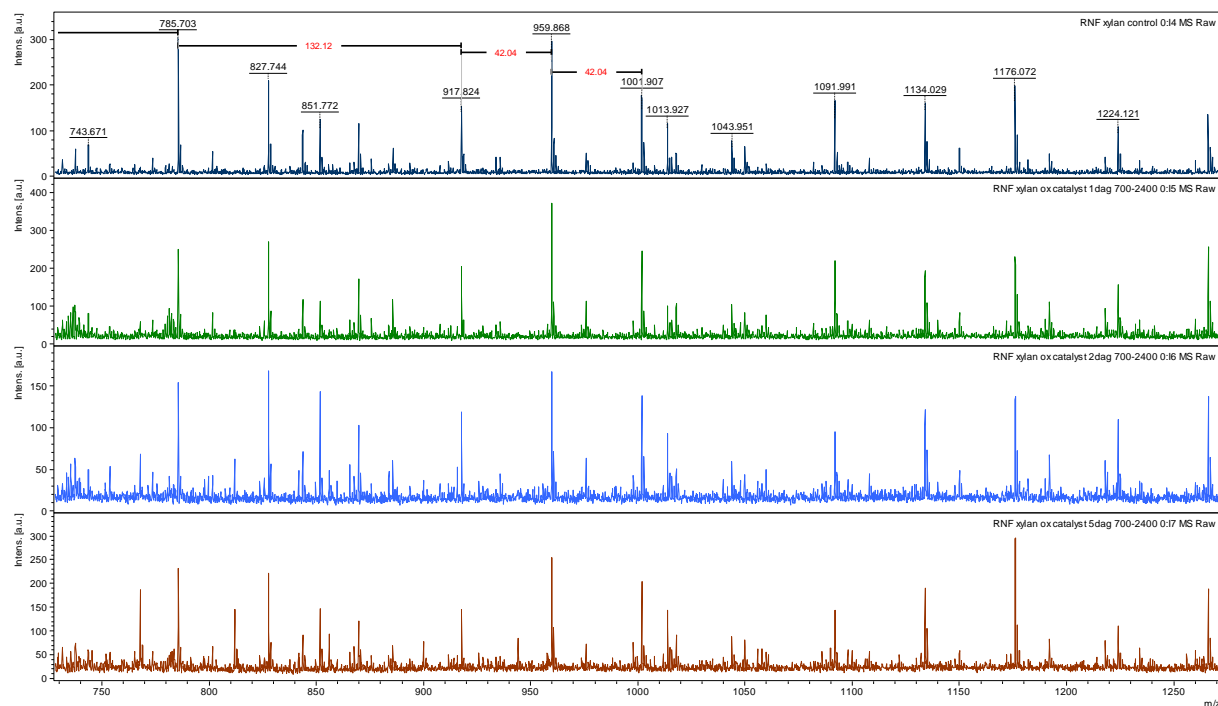
500 mg **15b** (0.45 mmol) ble løst i 5 ml acetonitril/vann (10:1). Etter at xylanet hadde løst seg ble 147 mg benzokinon (1,36 mmol, 3 eq), og 46 mg **41** (0,048 mmol, 10 mol%) tilsatt løsningen. Denne løsningen sto så i en uke hvor små prøver ble tatt ut for å se hvordan oksidasjonsgraden utviklet seg over tid.

Forsøk som fungerte

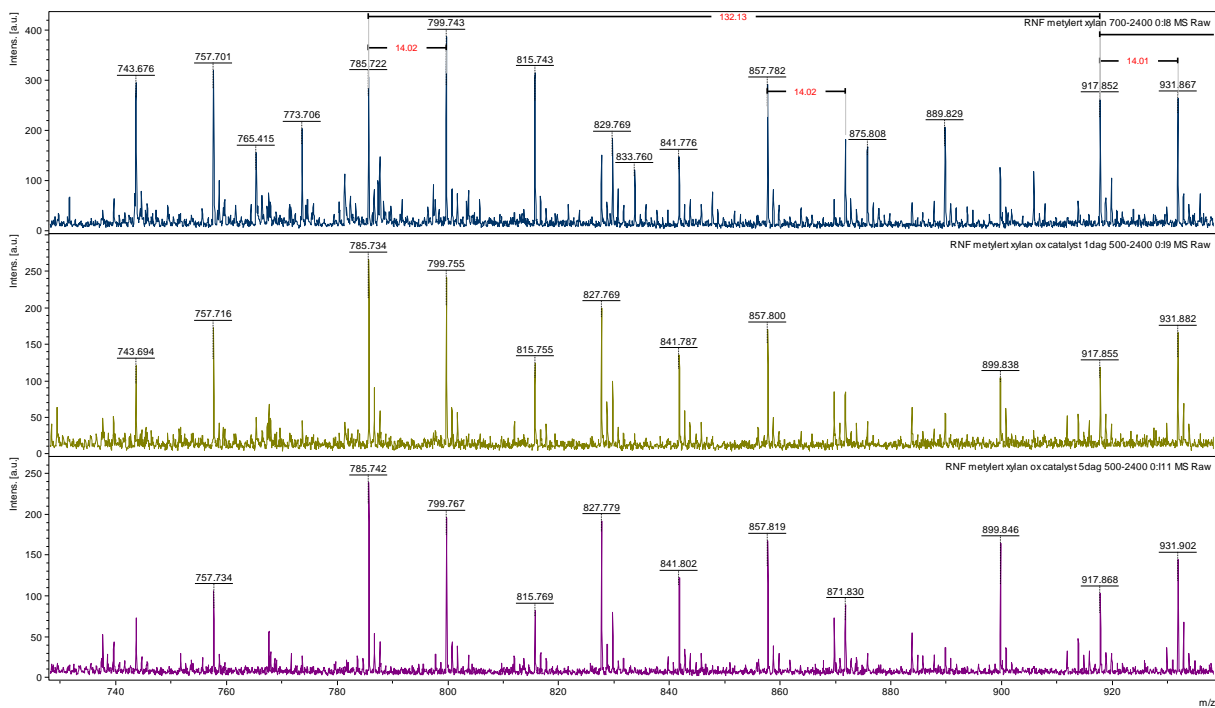
500 mg **15b** (0.45 mmol) ble løst i 5 ml acetonitril/vann (10:1). Etter at xylanet hadde løst seg ble 147 mg benzokinon (1,36 mmol, 3 eq), og 92 mg **41** (0,096 mmol, 20 mol%) tilsatt løsningen. Katalysatoren ble tilsatt i to omganger på 10 mol% med to timers mellomrom. Denne løsningen sto så i en uke hvor små prøver ble tatt ut for å se hvordan oksidasjonsgraden utviklet seg over tid.

Test av katalysatoren

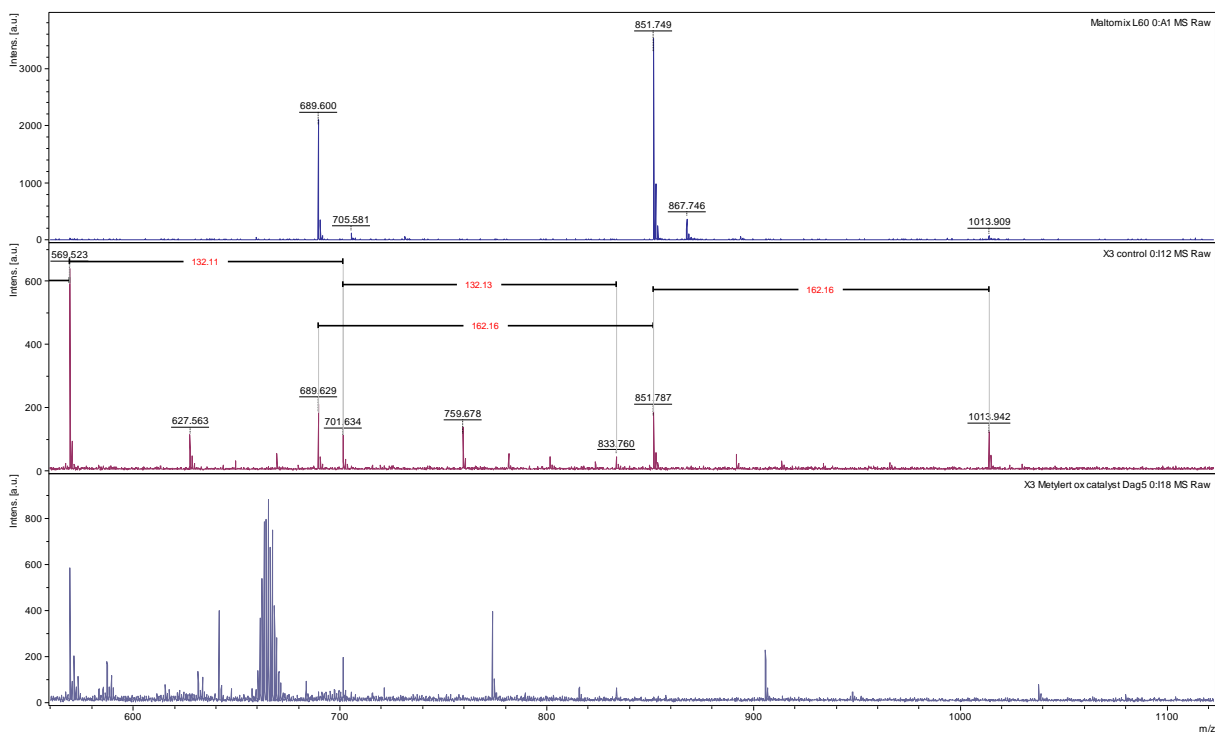
100 mg av **15a** (0.09 mmol) og **15b** (0.0897 mmol) ble løst i 10 ml acetonitril og vann. Etter at xylandet var løst ble det tilsatt 30 mg (0.27 mmol, 3 eq) benzokinon og ca 10 mg **41** (10 mol%). Denne løsningen sto så under konstant røring i en uke hvor det ble tatt ut prøver på dag 1, 2, og 5. Tilsvarende prosedyre ble også testet på 50 mg X3 og 50 mg metylert X3.



Figur 27 viser MS-spekteret av forsøk på oksidasjon av xylian med 10 mol% katalysator



Figur 28 viser MS-spekteret av forsøk på oksidasjon av metylert xylan med 10 mol% katalysator

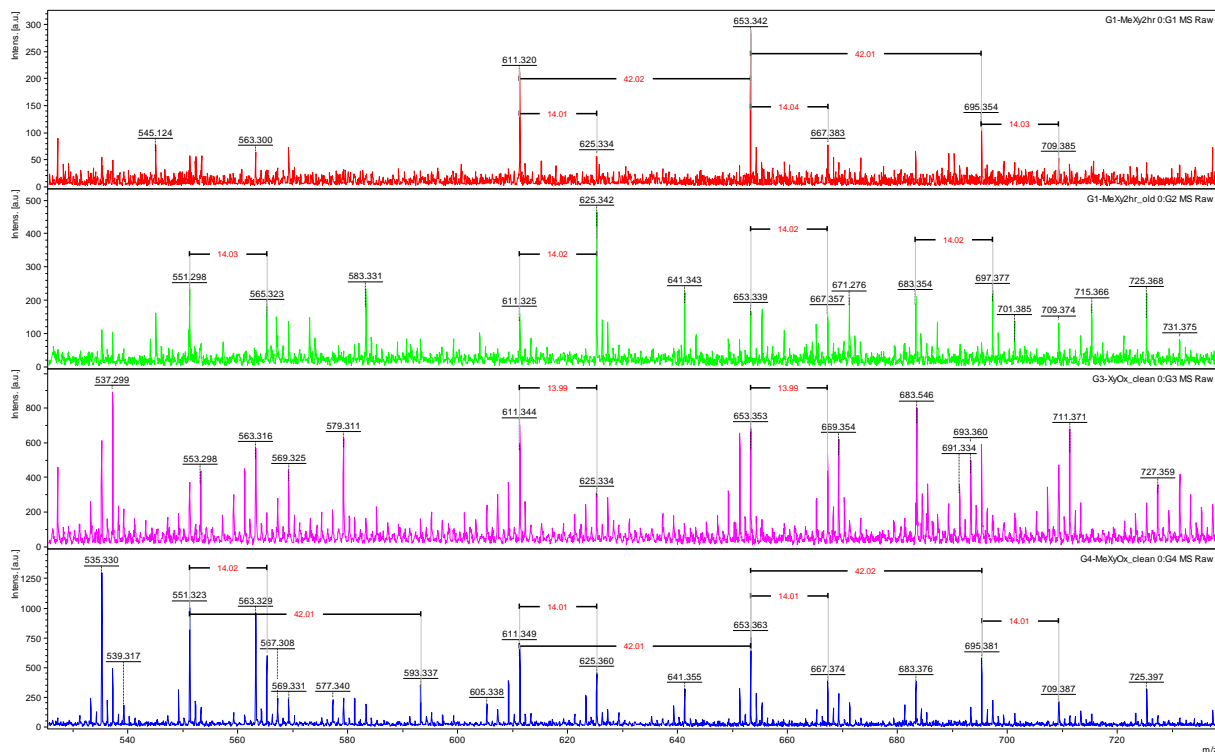


Figur 29 viser MS-spekteret til forsøket på å oksidere X# og metylert X3

Test av mengde tilsatt katalysator

100 mg av **15a** (0.09 mmol) og **15b** (0.0897 mmol) ble løst i 10 ml acetonitril og vann. Etter at xylanet var løst ble det tilsatt 30 mg (0.27 mmol, 3 eq) benzokinon og ca 20 mg **41** (20

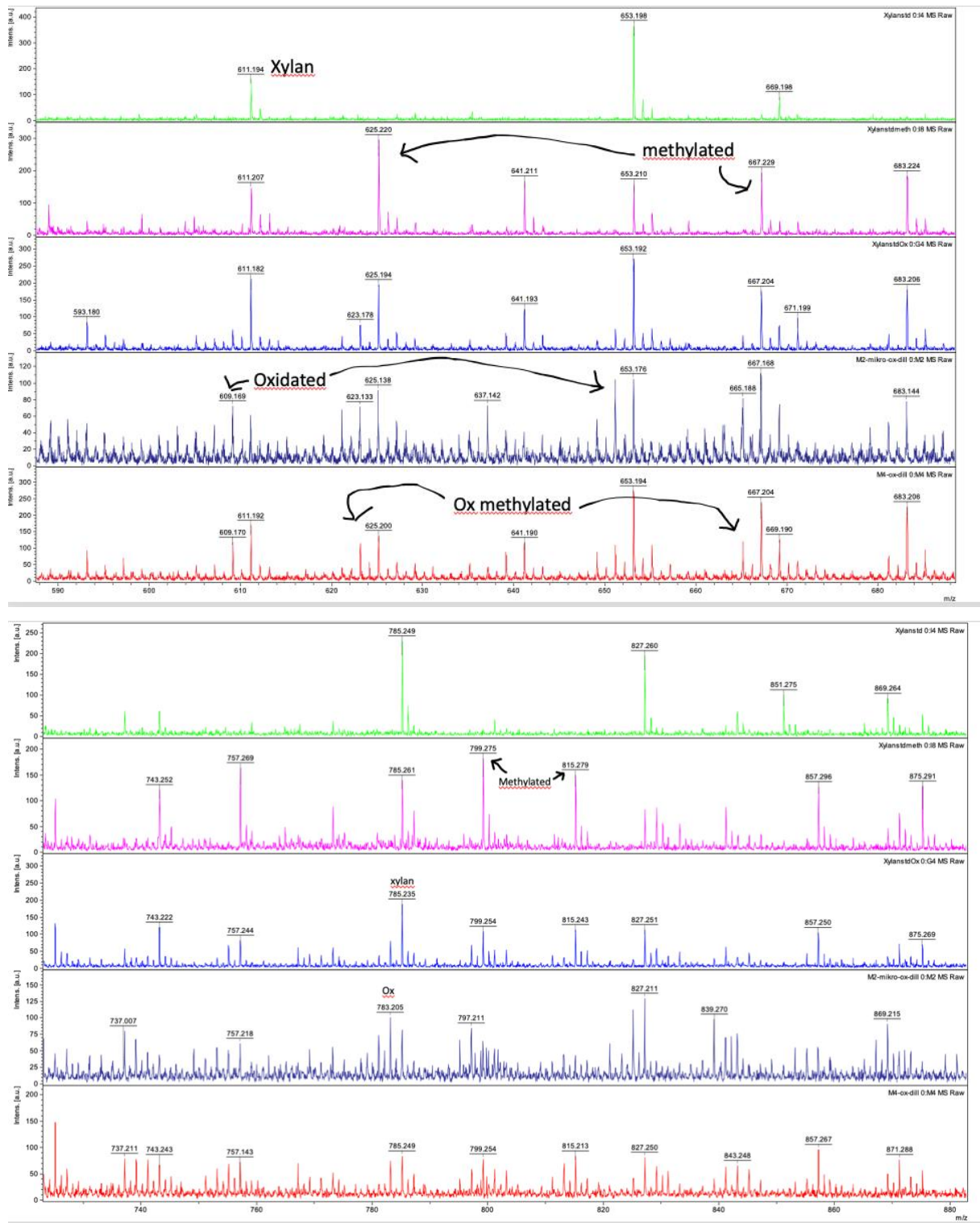
mol%). Katalysatoren ble tilsatt i 2 omganger på 10 mol% med 2 timers mellomrom. Denne løsningen sto så under konstant røring i en uke hvor det ble tatt ut prøver på dag 1, 2, og 5. Tilsvarende prosedyre ble også testet på 50 mg X3 og 50 mg metylert X3.



Figur 30 viser MS-spekteret til oksidasjonen av xylan og metylert xylan

Mikrobølgeoppvarming

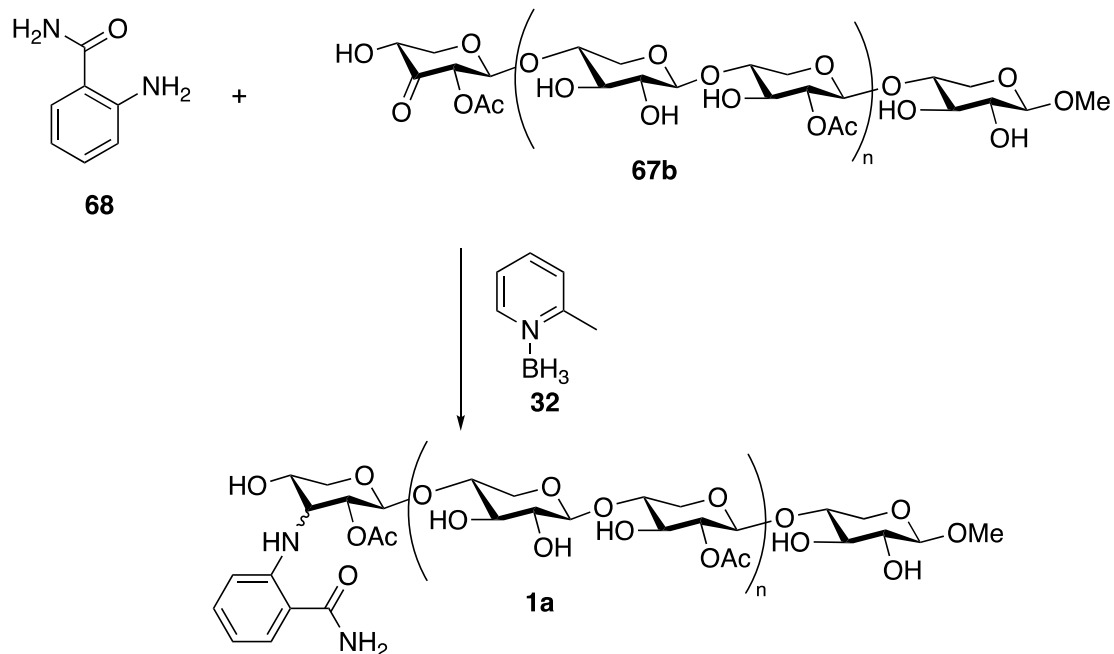
100 mg **15b** (0.0897 mmol) ble løst i 10 ml acetonitril og vann. Etter at xylanet var løst ble det tilsatt 30 mg (0.27 mmol, 3 eq) benzokinon og ca 20 mg **41** (20 mol%). Siden prøverøret prøven ble tilsatt i måtte lukkes før den kunne settes på mikrobølgeovnen ble all katalysatoren tilsatt samtidig. Etter at alt var tilsatt, ble prøven satt på mikrobølgeoppvarming i 30 min eller 2 timer på 60 eller 100 grader celsius.



Figur 31 viser MS-spekterne til mikrobølgeforsøkerne

2AB (2-aminobenzamid (68))-merking

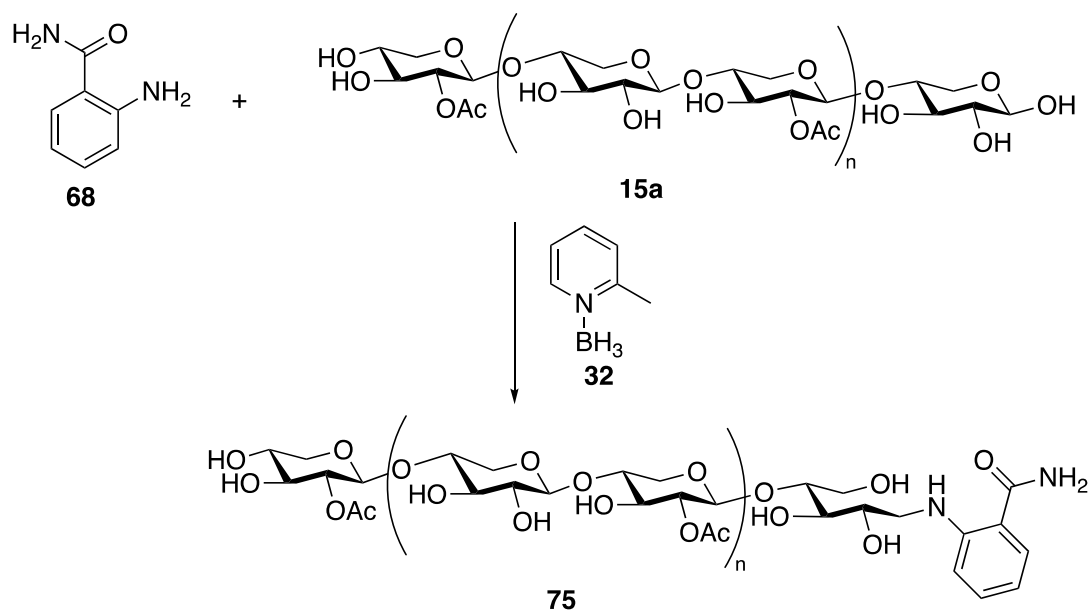
Dannelse av målmolekylet **1a**



Skjema 47 viser dannelsen av målmolekylet **1a**

50 mg **67b**, 25 mg **68**, og 20 mg **32** ble løst i 4 ml løsning bestående av 2 ml vann, 1,4 ml metnol og 0,6 ml eddiksyre. Denne løsningen ble varmet i mikrobølgeovn på 60 grader i 10 min eller en time. Deretter ble vannfasen ekstrahert med to ganger 10 ml etylacetat der begge fasene ble spart på for sikkerhets skyld. Begge fasene ble så analysert på MALDI-TOF.

2AB-merking av 15a

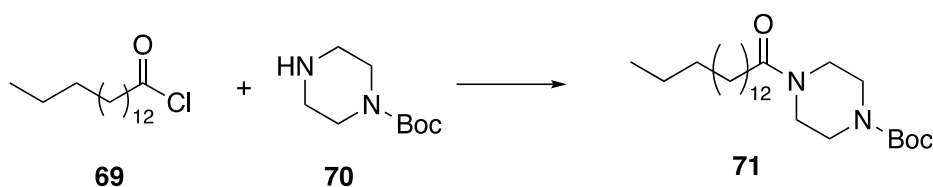


Skjema 48 viser 2AB-merking av **15a**

50 mg **15a**, 25 mg **68**, og 20 mg **32** ble løst i 4 ml løsning bestående av 2 ml vann, 1,4 ml metnol og 0,6 ml eddiksyre. Denne løsningen ble varmet i mikrobølgeovn på 60 grader i 10 min eller en time. Deretter ble vannfasen ekstrahert med to ganger 10 ml etylacetat der begge fasene ble spart på for sikkerhets skyld. Begge fasene ble så analysert på MALDI-TOF.

Syntese av 1-(palmitinoyl) piperazin **72**

Syntese av tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat **71**



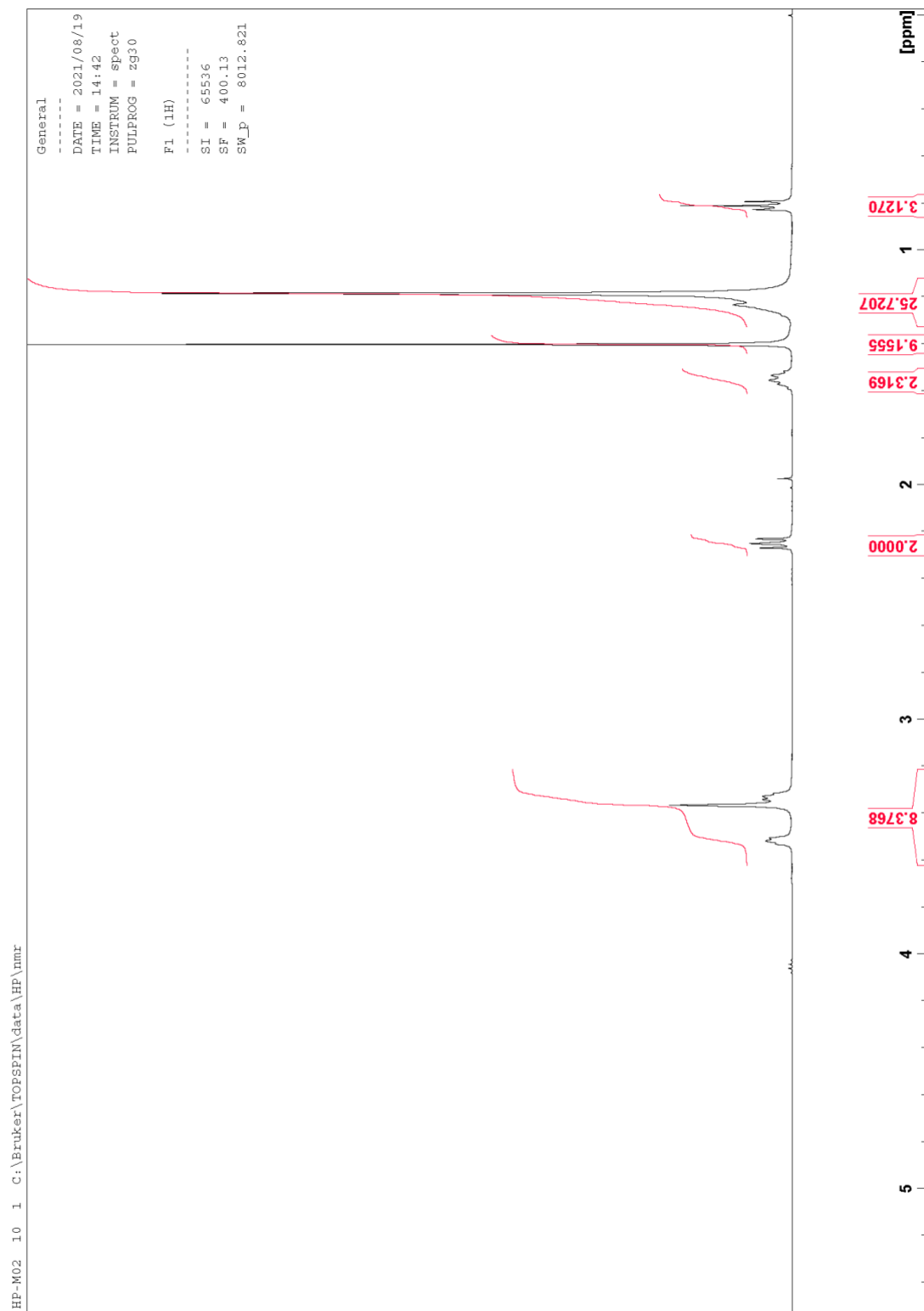
Skjema 49 viser amidsyntesen mellom **69** og **70**

1-boc-piperazin **69** (4.91g, 26 mmol) ble løst i 50 ml THF. Deretter ble trietylamin (4.2 ml) og palmitinsyreklorid **70** (7.33g, 26 mmol) tilsatt. Løsningen ble så rørt i 2 timer ved romtemperatur. Løsningen ble så tilsatt ionefritt vann før den ble ekstrahert 3 ganger med 50

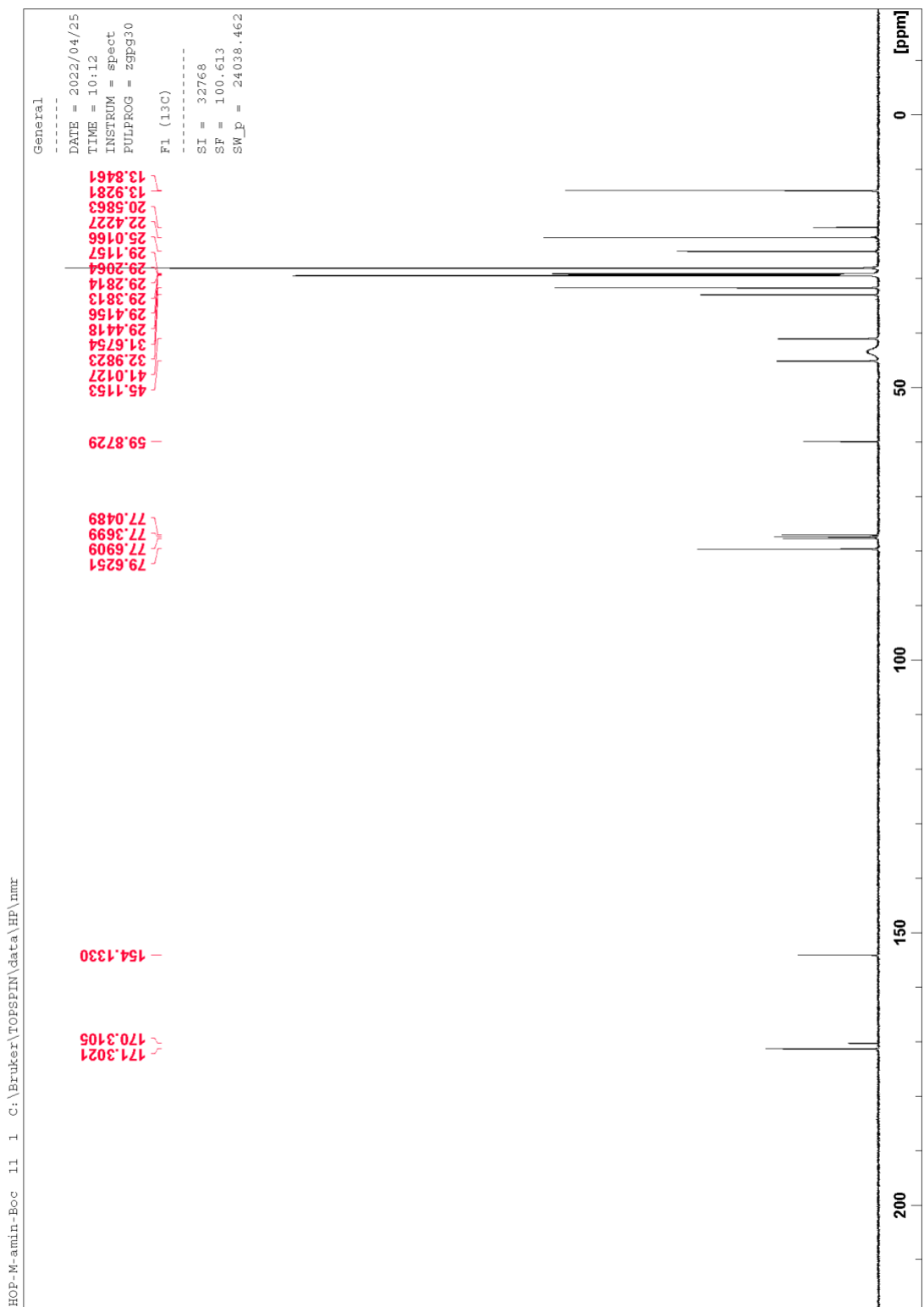
ml etylacetat (AcOEt). Videre ble den organiske fasen vasket 2 ganger med 50 ml 1M HCl og en gang med 50 ml brine (mettet NaCl-løsning). Til slutt ble løsemiddelet dampet bort på rotavapor. Utbytte = 10,12g, 89%

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): 0.81 ppm (t, 6.8 Hz, 3H), 1.2-1.3 ppm (m, 26H), 1.47 ppm (s, 9H), 1.5 ppm (m, 2H), 3.35 (t, 5.1 Hz, 4H) og 3.59 ppm (t, 4.98 Hz, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): 13.8, 13.9, 20.6, 22.4, 25, 29.11, 29.2, 29.3, 29.38, 29.4, 29.44, 31.67, 33, 41, 45, 59.9, 79.6, 154, 171 ppm

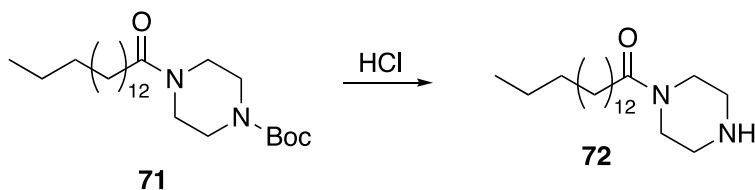


Figur 32 viser ^1H NMR spekteret til tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat 71



Figur 33 viser ^{13}C NMR spekteret til tert butyl 4-(palmitinoyl)piperazin-1-karboksylat **71**

Avbeskyttelse av tert butyl 4-(palmitinoyl) piperazin-1-karboksylat **71**

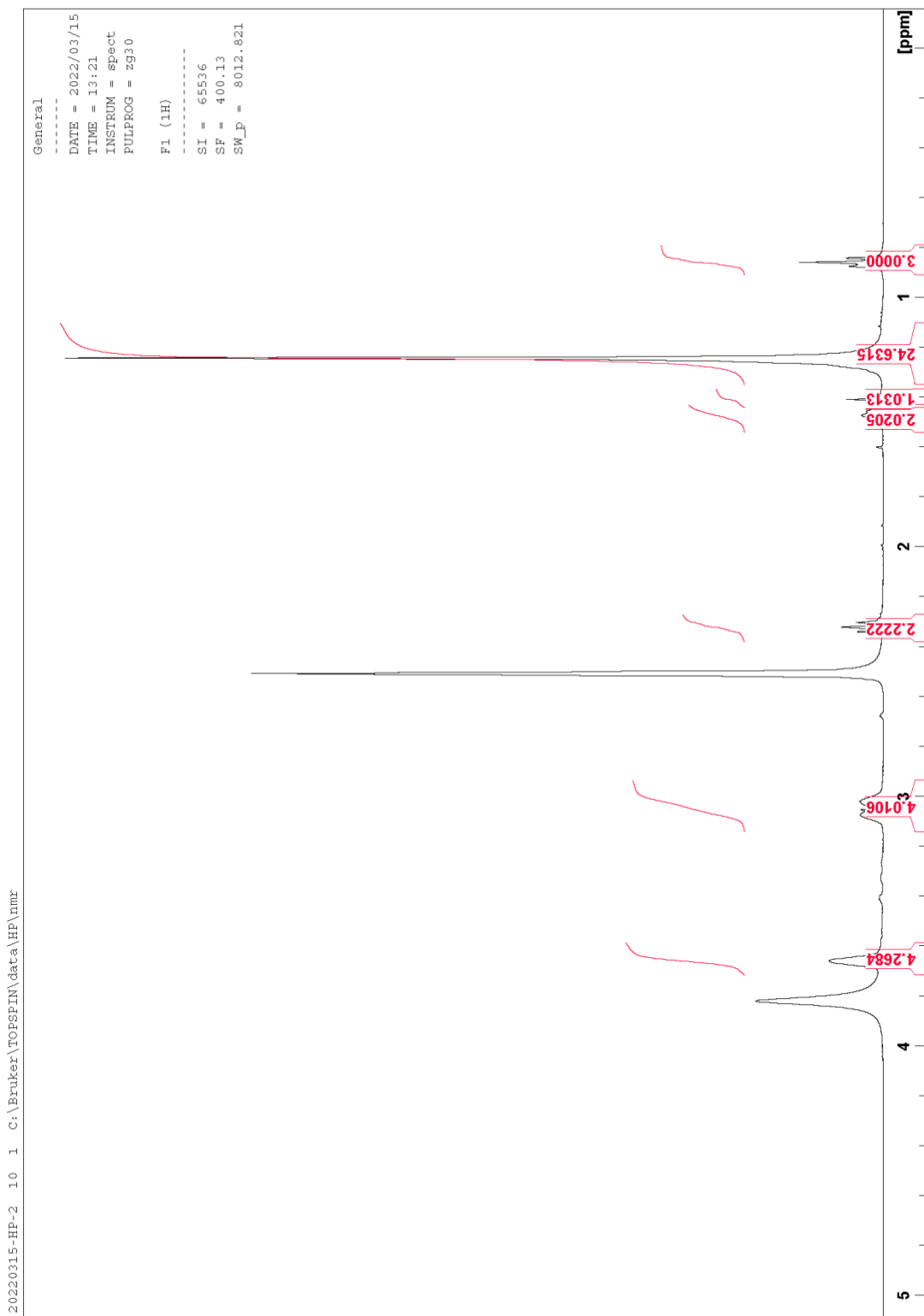


Skjema 50 viser dannelsen av 1(palmitinoyl) piperazin **72** ved fjerning av Boc-gruppen

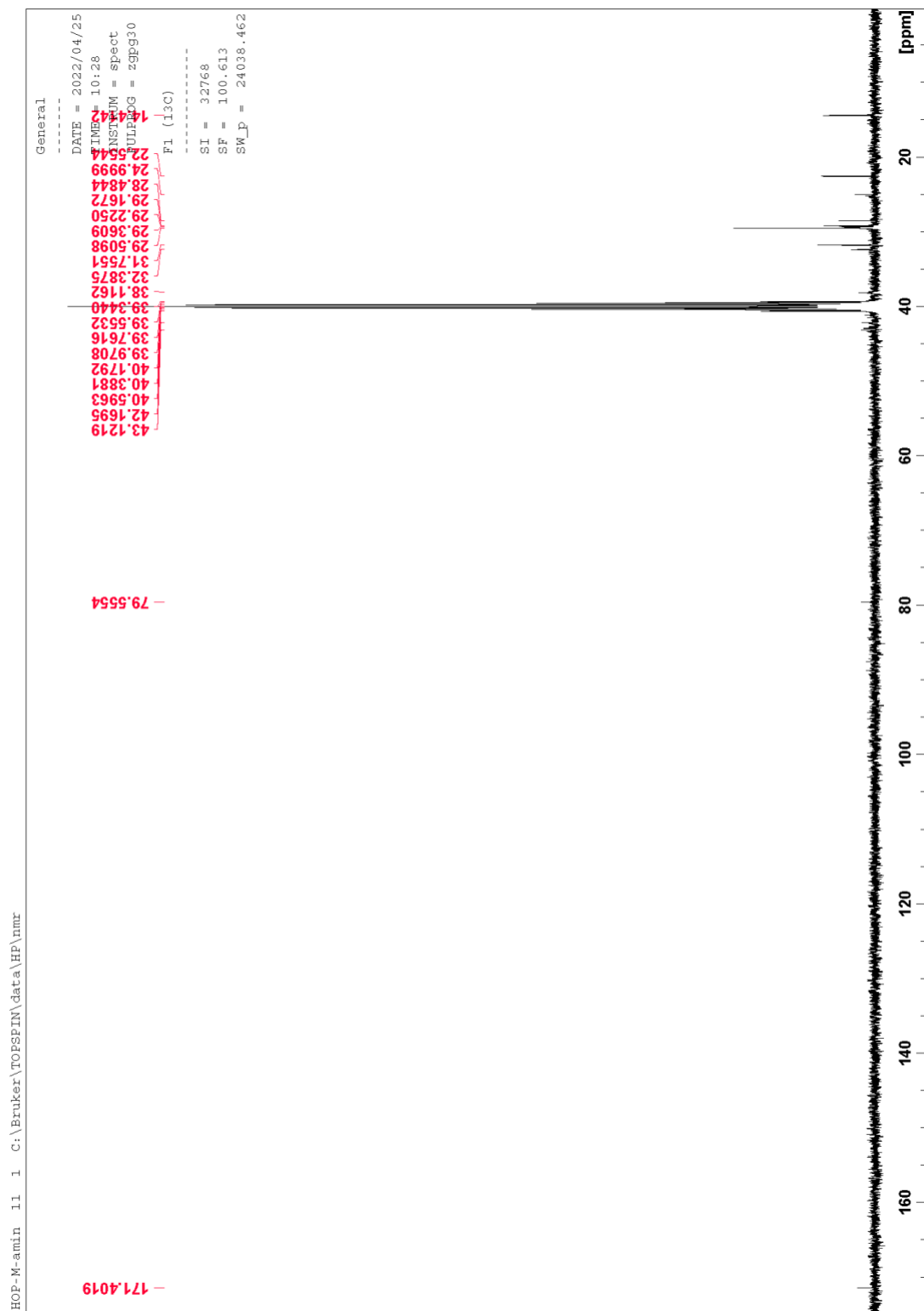
6,8g **71** (16 mmol) ble løst i 10 ml etylacetat og 10 ml metylacetat som inneholdt 4M HCl. Metylacetaten ble dannet for å lage vannfri HCl via acetylklorid og metanol. Denne løsning sto over natten i romtemperatur. Deretter ble løsemiddelet dampet bort på rotavapor ble det faste stoffet samlet ved filtrering og vasket med etylacetat. Utbytte var på 48%.

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): 0.86 ppm (t, 6.48 Hz,3H), 1.2-1.36 ppm (m, 24H), 1.4 ppm (s,1H), 1.45 ppm (m,2H), 2.25 ppm (t, 7.3 Hz,2H), 3-3.1 ppm (m,4H), 3.65 ppm (m,4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, DMSO- d_6): 14.4, 22.55, 25, 28.5m 29.17, 29.23, 29.5, 31.76, 32.4, 38.11, 42.17, 43.12, 79.56, 171.4 ppm

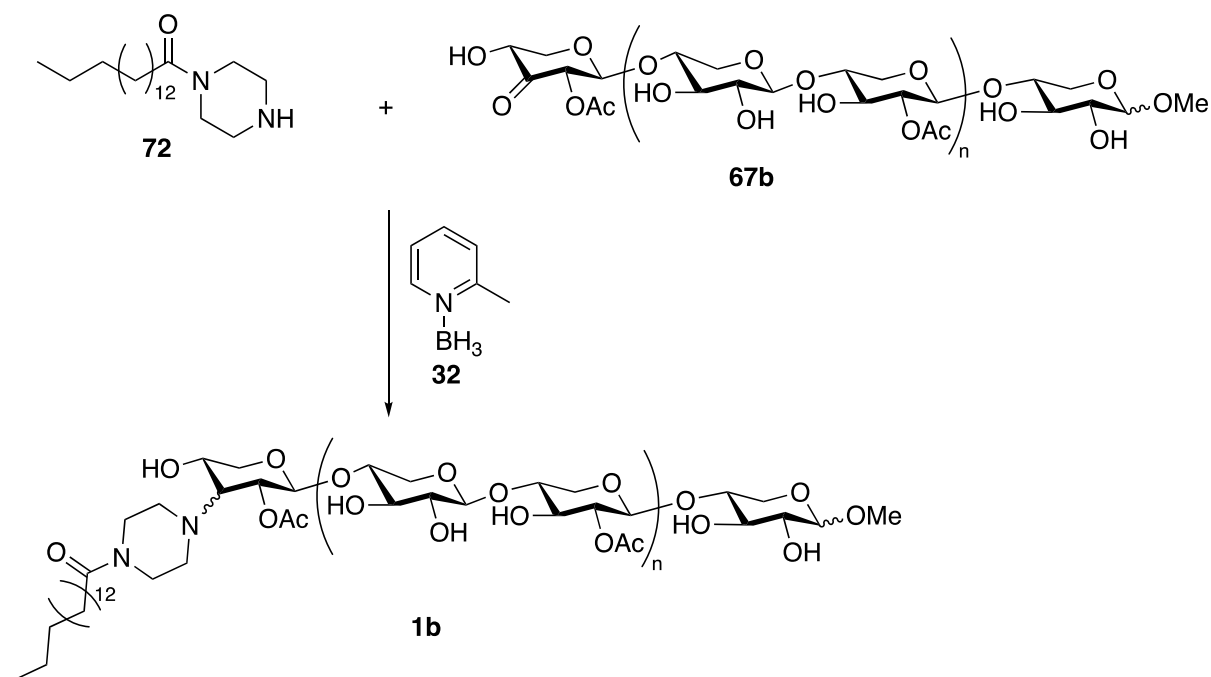


Figur 34 viser ^1H NMR spekteret til 1-palmitoylpiperazin **72**



Figur 35 viser ^{13}C NMR spekteret til 1-palmitoylpiperazin 72

Dannelse av målmolekylet **1b**



Skjema 51 viser dannelsen av målmolekylet **1b**

Mikrobølgeoppvarming to ekstraksjoner, skummet over

80 mg **67b** (0,072mmol) , 25 mg **72** (0,0772mmol) og 20 mg **72** (0,187mmol) ble løst i 7,5 ml 10:1 MeOH/AcOH. Reaksjonen sto to timer i mikrobølgeovn på 90 grader. Etter dette ble metanolen dampet bort på rotavapor før det ble tilsatt 10 ml HCl. Denne løsningen sto i 30 minutter før 10 ml vann og ca 2,5 g Na₂CO₃. **NB tilsetningen av Na₂CO₃ bør skje i en 250ml erlenmeyerkolbe for å være sikker på at det ikke skummer over.** Vannfasen ble så vasket med to ganger 30 ml etylacetat. Den organiske fasen ble samlet opp og vasket med 15 ml saltlake og så tørket ved å tilsette Na₂SO₄. Utbytte var 15 mg (15%). Dette skyldes at det skummet over.

Mikrobølgeoppvarming fire ekstraksjoner, skummet over

100 mg **67b** (0,072mmol) , 30 mg **72** (0,0772mmol) og 20 mg **72** (0,187mmol) ble løst i 11 ml 10:1 MeOH/AcOH og rørt i 2 timer på 90/120 grader i mikrobølgeovn. Etter at løsningen var ferdig i mikrobølgeoven ble metanolen dampet bort på rotavapor før 10ml 10% HCl ble tilsatt. Denne løsningen sto i 30 minutter før 10 ml vann og ca 2,5 g Na₂CO₃. **NB tilsetningen**

av Na_2CO_3 bør skje i en 250ml erlenmeyerkolbe for å være sikker på at det ikke skummer over. Vannfasen ble så vasket med fire ganger 30 ml etylacetat. Den organiske fasen ble samlet opp og vasket med 15 ml saltlake og så tørket ved å tilsette Na_2SO_4 . Utbytte var 50 mg (39%).

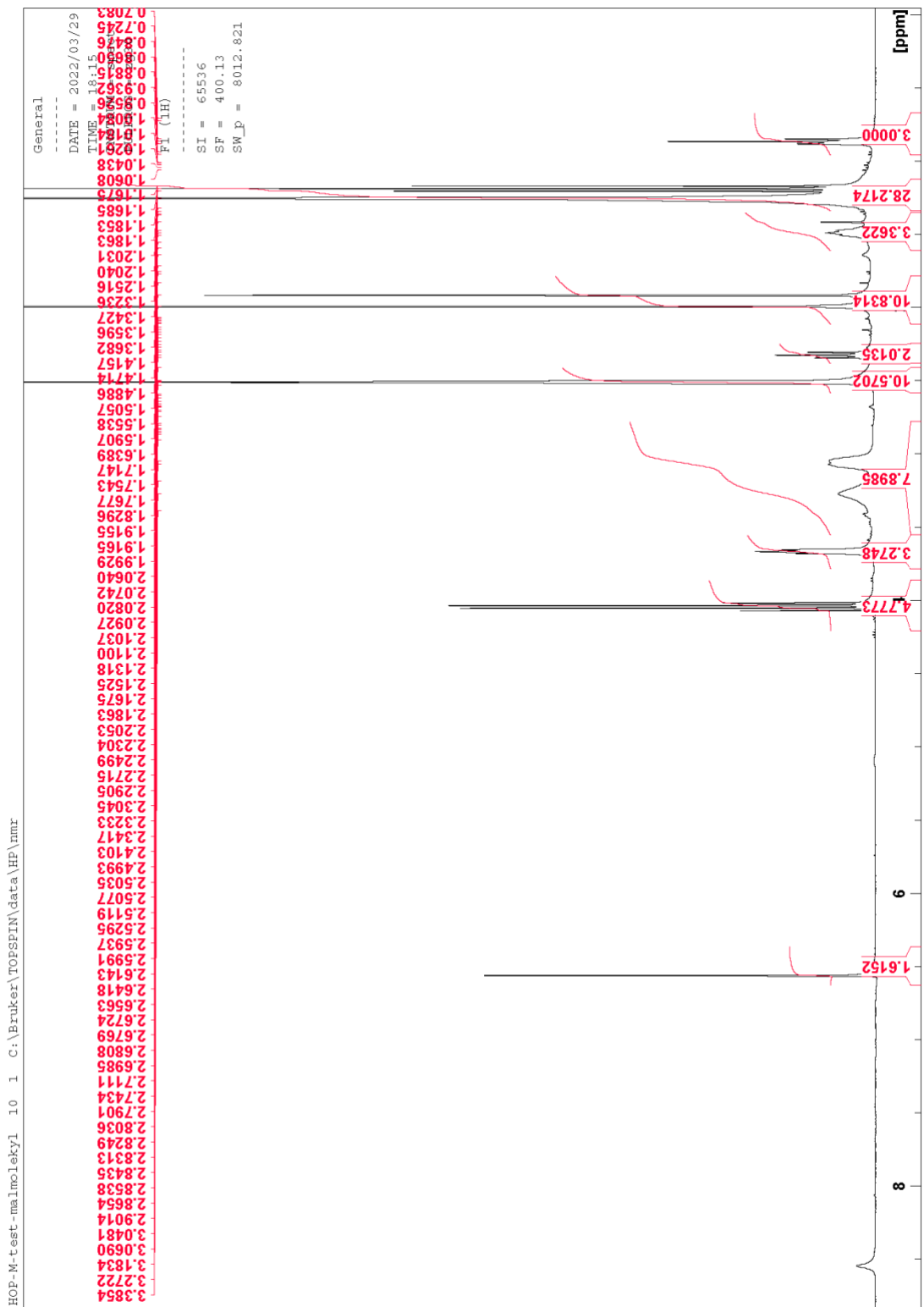
Mikrobølgeoppvarming fire ekstraksjoner

100 mg **67b** (0,072mmol) , 30 mg **72** (0,0772mmol) og 20 mg **72** (0,187mmol) ble løst i 11 ml 10:1 MeOH/AcOH og rørt i 2 timer på 90/120 grader i mikrobølgeovn. Etter at løsningen var ferdig i mikrobølgeovnen ble metanolen dampet bort på rotavapor før 10ml 10% HCl ble tilsatt. Denne løsningen sto i 30 minutter før 10 ml vann og ca 2,5 g Na_2CO_3 . **NB tilsetningen av Na_2CO_3 bør skje i en 250ml erlenmeyerkolbe for å være sikker på at det ikke skummer over.** Vannfasen ble så vasket med fire ganger 30 ml etylacetat. Den organiske fasen ble samlet opp og vasket med 15 ml saltlake og så tørket ved å tilsette Na_2SO_4 . Utbytte var 84 mg (65%).

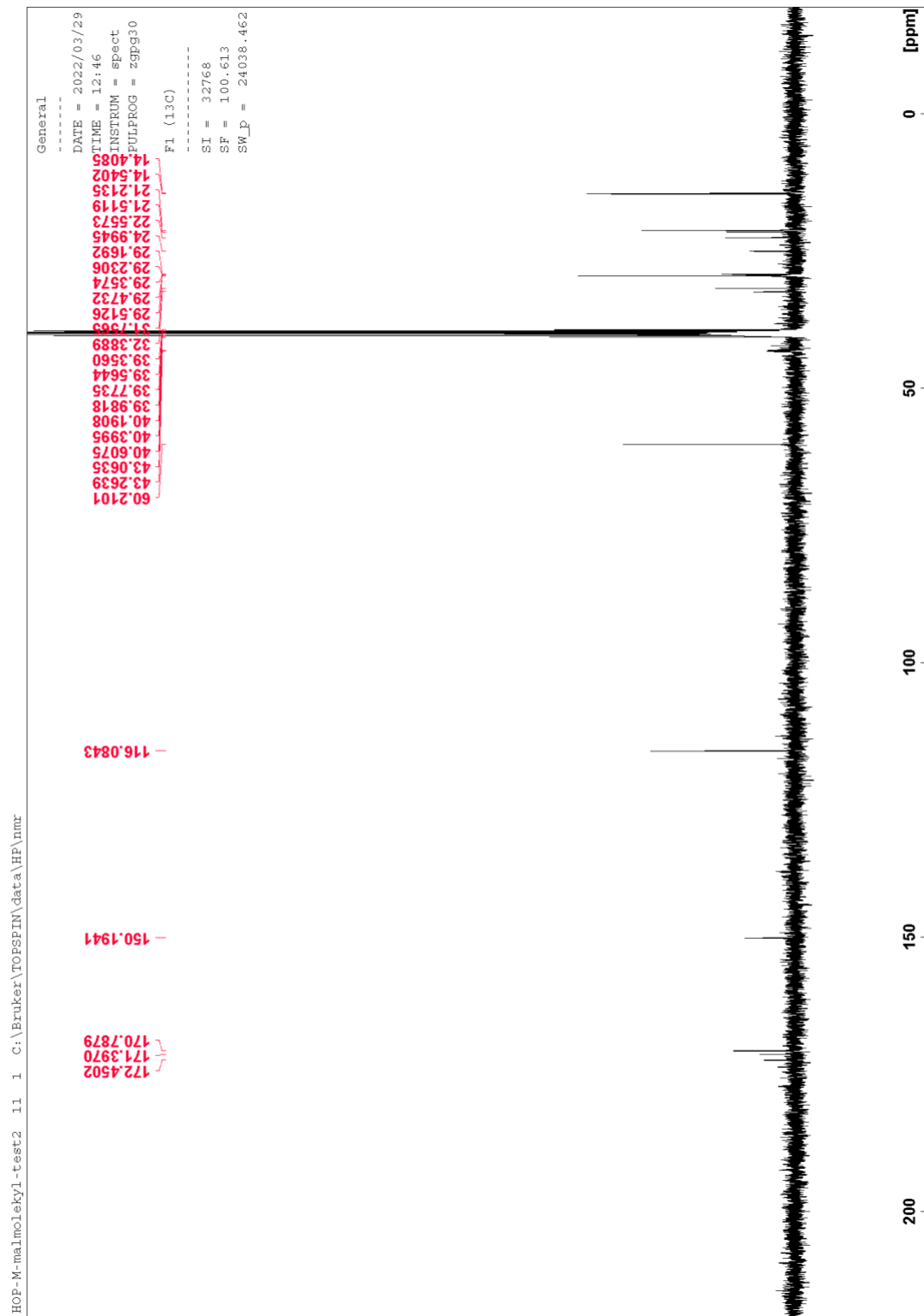
Romtemperatur

80 mg **67b** (0,072mmol) , 25 mg **72** (0,0772mmol) og 20 mg **72** (0,187mmol) ble løst i 7,5 ml 10:1 MeOH/AcOH. Reaksjonen sto fem dager i romtemperatur. Etter dette ble metanolen dampet bort på rotavapor før det ble tilsatt 10 ml HCl. Denne løsningen sto i 30 minutter før 10 ml vann og ca 2,5 g Na_2CO_3 . **NB tilsetningen av Na_2CO_3 bør skje i en 250ml erlenmeyerkolbe for å være sikker på at det ikke skummer over.** Vannfasen ble så vasket med to ganger 30 ml etylacetat. Den organiske fasen ble samlet opp og vasket med 15 ml saltlake og så tørket ved å tilsette Na_2SO_4 . Utbytte var 50 mg (50%).

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO- d_6): 0.86 ppm (t, 6.78 Hz, 3H), 1.2-1.36 ppm (m, 26H), 1.45 (m, 2H), 1.98 (ds, 10H), 2.25 ppm (t, 2H), 3-3.1 ppm (m, 4H), 3.65 ppm (m, 4H).



Figur 36 viser ^3H NMR til målmolekylet **1b**



Figur 37 viser ¹³C NMR til målmolekylet **1b**

Referanseliste

1. Calvin, M., Hydrocarbons from plants: analytical methods and observations. *Naturwissenschaften* **1980**, *67* (11), 525-33.
2. Cheng, S.; Wantuch, P. L.; Kizer, M. E.; Middleton, D. R.; Wang, R.; DiBello, M.; Li, M.; Wang, X.; Li, X.; Ramachandiran, V.; Avci, F. Y.; Zhang, F.; Zhang, X.; Linhardt, R. J., Glycoconjugate synthesis using chemoselective ligation. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17* (10), 2646-2650.
3. Micoli, F.; Del Bino, L.; Alfini, R.; Carboni, F.; Romano, M. R.; Adamo, R., Glycoconjugate vaccines: current approaches towards faster vaccine design. *Expert Rev. Vaccines* **2019**, *18* (9), 881-895.
4. Ruhaak, L. R.; Steenvoorden, E.; Koeleman, C. A. M.; Deelder, A. M.; Wuhrer, M., 2-Picoline-borane: A non-toxic reducing agent for oligosaccharide labeling by reductive amination. *Proteomics* **2010**, *10* (12), 2330-2336.
5. Westereng, B.; Kracun, S. K.; Leivers, S.; Arntzen, M. O.; Aachmann, F. L.; Eijnsink, V. G. H., Synthesis of glycoconjugates utilizing the regioselectivity of a lytic polysaccharide monoxygenase. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 13197.
6. Dewick, P. M., Secondary Metabolism: The Building Block and Construction Mechanisms. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, 2009; pp 7-38.
7. Dewick, P. M., Carbohydrates. In *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc.: Chichester, 2009; pp 485-508.
8. Cox, D. L. N. a. M. M., Carbohydrates and glycobiology. In *Lehninger Principles of Biochemistry: International edition, 7th edition*, W.H. Freeman & Co Ltd: New York, 2017; pp 241-278.
9. Dalpathado, D. S.; Jiang, H.; Kater, M. A.; Desaire, H., Reductive amination of carbohydrates using NaBH(OAc)₃. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381* (6), 1130-1137.
10. Baynes, M. L. a. J. W., Glycation. In *Encyclopedia of Biological Chemistry (Second ed.)*, 2 ed.; Lane, W. L. a. M., Ed. Academic Press: San Diego, 2013; pp 405-411.
11. Department of Chemistry, Q. M. U. o. L. Nomenclature of Carbohydrates (Recommendations 1996). <https://iupac.qmul.ac.uk/2carb/33.html> (accessed 5.november).
12. Fügedi, D. E. L. a. P., Protective Group Strategies. In *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press: Boca Raton, Florida, 2006.
13. Lee, D.; Williamson, C. L.; Chan, L.; Taylor, M. S., Regioselective, Borinic Acid-Catalyzed Monoacylation, Sulfonylation and Alkylation of Diols and Carbohydrates: Expansion of Substrate Scope and Mechanistic Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (19), 8260-8267.
14. Ren, B.; Yan, N.; Gan, L., Regioselective alkylation of carbohydrates and diols: a cheaper iron catalyst, new applications and mechanism. *RSC Adv.* **2017**, *7* (73), 46257-46262.

15. Muramatsu, W., Catalytic and Regioselective Oxidation of Carbohydrates To Synthesize Keto-Sugars under Mild Conditions. *Org. Lett.* **2014**, *16* (18), 4846-4849.
16. Valeur, E.; Bradley, M., Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606-631.
17. Johansson, S. J. R.; Johannessen, T.; Ellefsen, C. F.; Ristun, M. S.; Antonsen, S.; Hansen, T. V.; Stenstroem, Y.; Nolsoe, J. M. J., A Convenient Protocol for the Synthesis of Fatty Acid Amides. *Synlett* **2019**, *30* (2), 213-217.
18. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V., Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827-10852.
19. Elsharif, A. M.; Abubshait, S. A.; Abdulazeez, I.; Abubshait, H. A., Synthesis of a new class of corrosion inhibitors derived from natural fatty acid: 13-Docosenoic acid amide derivatives for oil and gas industry. *Arabian J. Chem.* **2020**, *13* (5), 5363-5376.
20. Tripathi, R. P.; Verma, S. S.; Pandey, J.; Tiwari, V. K., Recent development on catalytic reductive amination and applications. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12* (13), 1093-1115.
21. Sato, S.; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Kikugawa, Y., One-pot reductive amination of aldehydes and ketones with α -picoline-borane in methanol, in water, and in neat conditions. *Tetrahedron* **2004**, *60* (36), 7899-7906.
22. Airoldi, V.; Piccolo, O.; Roda, G.; Appiani, R.; Bavo, F.; Tassini, R.; Paganelli, S.; Arnoldi, S.; Pallavicini, M.; Bolchi, C., Efficient One-Pot Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Aquivion-Fe as a Recyclable Catalyst and Sodium Borohydride. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, *2020* (2), 162-168.
23. Heydari, A.; Khaksar, S.; Esfandyari, M.; Tajbakhsh, M., A novel one-pot reductive amination of aldehydes and ketones with lithium perchlorate and zirconium borohydride-piperazine complexes. *Tetrahedron* **2007**, *63* (16), 3363-3366.
24. Ziyadi, H.; Heydari, A., Core-Shell α -Fe₂O₃@SiO₂ Nanofibers: A Magnetic Recyclable Catalyst for One-Pot Reductive Amination of Carbonyl Compound. *Catal. Lett.* **2014**, *144* (12), 2210-2215.
25. Abdel-Magid, A. F.; Carson, K. G.; Harris, B. D.; Maryanoff, C. A.; Shah, R. D., Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures. *J. Org. Chem.* **1996**, *61* (11), 3849-3862.
26. Alinezhad, H.; Tajbakhsh, M.; Zamani, R., One-pot reductive amination of aldehydes and ketones using N-methylpiperidine zinc borohydride (ZBNMPP) as a new reducing agent. *Synlett* **2006**, (3), 431-434.
27. Kallmeier, F.; Fertig, R.; Irrgang, T.; Kempe, R., Chromium-Catalyzed Alkylation of Amines by Alcohols. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2020**, *59* (29), 11789-11793.
28. Yan, T.; Feringa, B. L.; Barta, K., Benzylamines via Iron-Catalyzed Direct Amination of Benzyl Alcohols. *ACS Catal.* **2016**, *6* (1), 381-388.
29. Zhang, G.; Yin, Z.; Zheng, S., Cobalt-Catalyzed N-Alkylation of Amines with Alcohols. *Org. Lett.* **2016**, *18* (2), 300-303.
30. Enyong, A. B.; Moasser, B., Ruthenium-Catalyzed N-Alkylation of Amines with Alcohols under Mild Conditions Using the Borrowing Hydrogen Methodology. *J. Org. Chem.* **2014**, *79* (16), 7553-7563.

31. Risi, C.; Calamante, M.; Cini, E.; Faltoni, V.; Petricci, E.; Rosati, F.; Taddei, M., In water alkylation of amines with alcohols through a borrowing hydrogen process catalysed by ruthenium nanoparticles. *Green Chem.* **2020**, *22* (2), 327-331.
32. Zotova, N.; Roberts, F. J.; Kelsall, G. H.; Jessiman, A. S.; Hellgardt, K.; Hii, K. K., Catalysis in flow: Au-catalyzed alkylation of amines by alcohols. *Green Chem.* **2012**, *14* (1), 226-232.
33. Wu, D.; Bu, Q.; Guo, C.; Dai, B.; Liu, N., Cooperative catalysis of molybdenum with organocatalysts for distribution of products between amines and imines. *Mol. Catal.* **2021**, *503*, 111415.
34. Li, C.; Wan, K.-f.; Guo, F.-y.; Wu, Q.-h.; Yuan, M.-l.; Li, R.-x.; Fu, H.-y.; Zheng, X.-l.; Chen, H., Iridium-Catalyzed Alkylation of Amine and Nitrobenzene with Alcohol to Tertiary Amine under Base- and Solvent-Free Conditions. *J. Org. Chem.* **2019**, *84* (4), 2158-2168.
35. Dang, T. T.; Ramalingam, B.; Shan, S. P.; Seayad, A. M., An Efficient Palladium-Catalyzed N-Alkylation of Amines Using Primary and Secondary Alcohols. *ACS Catal.* **2013**, *3* (11), 2536-2540.
36. Conley, N. R.; Labios, L. A.; Pearson, D. M.; McCrory, C. C. L.; Waymouth, R. M., Aerobic alcohol oxidation with cationic palladium complexes: insights into catalyst design and decomposition. *Organometallics* **2007**, *26* (23), 5447-5453.
37. Painter, R. M.; Pearson, D. M.; Waymouth, R. M., Selective Catalytic Oxidation of Glycerol to Dihydroxyacetone. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49* (49), 9456-9459, S9456/1-S9456/8.
38. Stahl, S. S., Palladium oxidase catalysis. Selective oxidation of organic chemicals by direct dioxygen-coupled turnover. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43* (26), 3400-3420.
39. Jaeger, M.; Hartmann, M.; de Vries, J. G.; Minnaard, A. J., Catalytic Regioselective Oxidation of Glycosides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52* (30), 7809-7812.
40. Eisink, N. N. H. M.; Witte, M. D.; Minnaard, A. J., Regioselective Carbohydrate Oxidations: A Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Study on Selectivity, Rate, and Side-Product Formation. *ACS Catal.* **2017**, *7* (2), 1438-1445.
41. Wu, Z.; Jager, M.; Buter, J.; Minnaard, A. J., A protecting group-free synthesis of the Colorado potato beetle pheromone. *Beilstein J Org Chem* **2013**, *9*, 2374-7.
42. Ho, W. C.; Chung, K.; Ingram, A. J.; Waymouth, R. M., Pd-Catalyzed Aerobic Oxidation Reactions: Strategies To Increase Catalyst Lifetimes. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140* (2), 748-757.
43. Isaksen, T.; Westereng, B.; Aachmann, F. L.; Agger, J. W.; Kracher, D.; Kittl, R.; Ludwig, R.; Haltrich, D.; Eijsink, V. G. H.; Horn, S. J., A C4-oxidizing lytic polysaccharide monooxygenase cleaving both cellulose and cello-oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289* (5), 2632-2642.
44. Parikka, K.; Leppanen, A.-S.; Pitkanen, L.; Reunanen, M.; Willfor, S.; Tenkanen, M., Oxidation of Polysaccharides by Galactose Oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (1), 262-271.

45. Hallberg, B. M.; Leitner, C.; Haltrich, D.; Divne, C., Crystal structure of the 270 kDa homotetrameric lignin-degrading enzyme pyranose 2-oxidase. *J Mol Biol* **2004**, *341* (3), 781-96.
46. Tan, T. C.; Spadiut, O.; Wongnate, T.; Sucharitakul, J.; Krondorfer, I.; Sygmund, C.; Haltrich, D.; Chaiyen, P.; Peterbauer, C. K.; Divne, C., The 1.6 Å crystal structure of pyranose dehydrogenase from *Agaricus meleagris* rationalizes substrate specificity and reveals a flavin intermediate. *PLoS One* **2013**, *8* (1), e53567.
47. Kujawa, M.; Ebner, H.; Leitner, C.; Hallberg, B. M.; Prongjit, M.; Sucharitakul, J.; Ludwig, R.; Rudsander, U.; Peterbauer, C.; Chaiyen, P.; Haltrich, D.; Divne, C., Structural Basis for Substrate Binding and Regioselective Oxidation of Monosaccharides at C3 by Pyranose 2-Oxidase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (46), 35104-35115.
48. Maria, G.; Ene, M. D.; Jipa, I., Modeling enzymatic oxidation of D-glucose with pyranose 2-oxidase in the presence of catalase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74* (3-4), 209-218.
49. Savino, S.; Fraaije, M. W., The vast repertoire of carbohydrate oxidases: An overview. *Biotechnol. Adv.* **2021**, *51*, 107634.
50. Vetter, N. D.; Palmer, D. R. J., Substrate Substitution in Kanosamine Biosynthesis Using Phosphonates and Phosphite Rescue. *Biochemistry* **2021**, *60* (24), 1926-1932.
51. Chen, J.; Guo, X.; Zhu, M.; Chen, C.; Li, D., Polysaccharide monooxygenase-catalyzed oxidation of cellulose to glucuronic acid-containing cello-oligosaccharides. *Biotechnol Biofuels* **2019**, *12*, 42.
52. Parikka, K.; Master, E.; Tenkanen, M., Oxidation with galactose oxidase: Multifunctional enzymatic catalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *120*, 47-59.
53. Kappe, C. O.; Dallinger, D., The impact of microwave synthesis on drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5* (1), 51-63.
54. Eisink, N. N. H. M.; Lohse, J.; Witte, M. D.; Minnaard, A. J., Regioselective oxidation of unprotected 1,4-linked glucans. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (21), 4859-4864.
55. Fernandez-Herrera, M. A.; Mohan, S.; Lopez-Munoz, H.; Hernandez-Vazquez, J. M. V.; Perez-Cervantes, E.; Escobar-Sanchez, M. L.; Sanchez-Sanchez, L.; Regla, I.; Pinto, B. M.; Sandoval-Ramirez, J., Synthesis of the steroidal glycoside (25R)-3 β ,16 β -diacetoxy-12,22-dioxo-5 α -cholestan-26-yl β -D-glucopyranoside and its anticancer properties on cervicouterine HeLa, CaSki, and ViBo cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45* (11), 4827-4837.
56. Laine, C.; Tamminen, T.; Vikkula, A.; Vuorinen, T., Methylation analysis as a tool for structural analysis of wood polysaccharides. *Holzforschung* **2002**, *56* (6), 607-614.
57. Banno, Y.; Sasaki, S.; Kamata, M.; Kunitomo, J.; Miyamoto, Y.; Abe, H.; Taya, N.; Oi, S.; Watanabe, M.; Urushibara, T.; Hazama, M.; Niwa, S.-i.; Miyamoto, S.; Horinouchi, A.; Kuroshima, K.-i.; Amano, N.; Matsumoto, S.-i.; Matsunaga, S., Design and synthesis of a novel series of orally active, selective somatostatin receptor 2 agonists for the treatment of type 2 diabetes. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25* (21), 5995-6006.

58. George, N.; Ofori, S.; Parkin, S.; Awuah, S. G., Mild deprotection of the N-tert-butyloxycarbonyl (N-Boc) group using oxalyl chloride. *RSC Adv.* **2020**, *10* (40), 24017-24026.
59. Pearson, D. M.; Conley, N. R.; Waymouth, R. M., Palladium-catalyzed carbonylation of diols to cyclic carbonates. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353* (16), 3007-3013.
60. ten Brink, G.-j.; Arends, I. W. C. E.; Hoogenraad, M.; Verspui, G.; Sheldon, R. A., Catalytic conversions in water. Part 23: Steric effects and increased substrate scope in the palladium-neocuproine catalyzed aerobic oxidation of alcohols in aqueous solvents. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345* (12), 1341-1352.
61. Chung, K.; Waymouth, R. M., Selective Catalytic Oxidation of Unprotected Carbohydrates. *ACS Catal.* **2016**, *6* (7), 4653-4659.



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway