

國立臺灣大學理學院化學研究所

碩士論文

Graduate of Chemistry

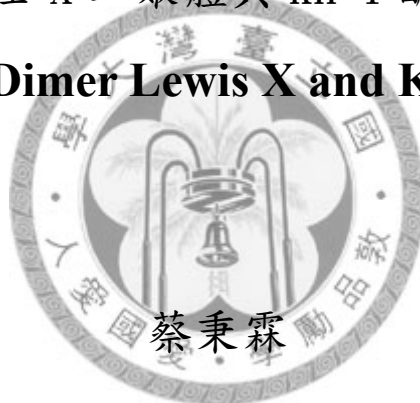
College of Science

National Taiwan University

Master Thesis

合成路易士 X 二聚體與 KH-1 醣抗原分子

Synthesis of Dimer Lewis X and KH-1 Antigens



Bin-Ling Tsai

指導教授：翁啟惠 博士

吳宗益 博士

Advisor: Chi-Huey Wong, Ph.D.

Chung-Yi Wu, Ph.D.

中華民國 九十八 年 一 月

January, 2009

謝誌

回首過去兩年半的碩班生活，心中的感觸五味雜陳。最初，找指導老師一直很不順利，當我正要放棄台大到別的學校時 翁老師給了我一個機會，讓我在設備一流的中研院基因體中心裡無後顧之憂地做研究，真的真的非常感謝 翁老師。另外，也很幸運能由 吳老師來指導我實驗上的問題，由於我的任性與”稍稍的”叛逆一般老師可能會把我趕出實驗室吧!?!不過 吳老師的包容與信任讓我在實驗上自由發揮，雖然過程中有時感到倦累不過玩得還滿開心的，也謝謝 任老師在實驗技巧上的指導。感謝 林俊宏老師與 鄭偉杰老師撥空參與學生的口試，在論文方面給予指教，也謝謝台大化學所的老師讓我獲得在化學上更深一層的知識。

今日，能順利畢業也謝謝六樓的青哥、鼎鈞學長、謝俊傑博士、駿儀學長與昆賢學長；還有一同是吳老師實驗室的成員—哲雄學長、正琪學姐、陳怡佳博士、韓政良博士、朱國慶博士、梁其輝博士、楊景順博士、孫宗賢博士、備椿、津璋、姮雁、尚軒、明秀、易嫻、郁翔、從安、彥霖、瑞祺、世皇和宏揚給我很多實驗技巧與經驗上的建議；也謝謝師母 淑真姊幫忙處理我們的帳務等事，還有充滿活力的學弟妹—勃佑、侑蓁與新進來的俊瑋、大頭丁和阿信。感謝 郁郁和 Lora 幫我們處理實驗室和會議上的問題，在口試前給我鼓勵與幫忙邀請口試委員等事。

感謝耿淑怡 老師、劉河順 老師、吳雪莉 老師、吳森雄 老師與邱瀟慧 老師，在我過去求學過程中在關鍵時刻拉了我一把，爾後才有機會一路順利唸完碩士學位。

最後，特別要感謝的是我的家人！謝謝您們用無限的包容與諒解來慢慢改變我過去的叛逆，在我疲憊或是失落時作為我最後的避風港，提供所需的資源來讓我學習，謝謝您們。

這篇論文雖然不臻完善，但包含我過去的努力。最後，謹以此篇論文獻給我最愛的家人與引發我對生命科學感到興趣的老師—吳森雄 老師。

中文摘要

醣類是組成細胞的四種基本成分之一，含量豐富且以多樣化形式存在於生物高分子中。癌細胞與正常細胞相比較下，在某些醣分子上的結構或量的層級上有不同表現。醣蛋白和醣脂質在醣化過程中，分子的不正常改變常會造成腫瘤的惡化。

路易士 X 二聚體與 KH-1 為大腸癌的細胞膜上顯著表現的兩種抗原分子，這兩種抗原分子大量的表現也與癌症的惡化前兆有關。所以路易士 X 二聚體與 KH-1 抗原分子可以用來發展疫苗或是用於醣晶片上作癌症的診斷。然而在鑑定和純化腫瘤細胞上的醣類抗原分子是非常困難，因此有機合成在醣生物學的研究上扮演重要的角色。在此篇論文中成功利用本實驗室所發展的一鍋化合成法來合成出三醣的路易士 X、六醣的路易士 X 二聚體與七醣 KH-1 腫瘤抗原分子的類似物。

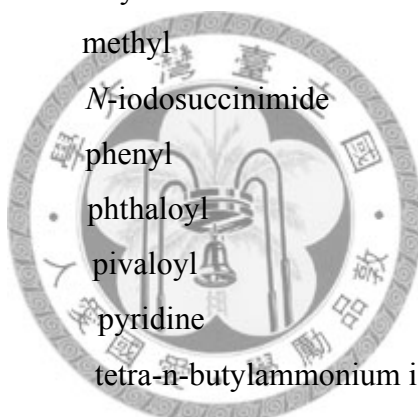
Abstract

Among four major classes of macro-biomolecules-nucleic acids, proteins, lipids, and carbohydrates-carbohydrates are the least studied and understood. Carbohydrates and their conjugates are abundantly expressed on the out-surfaces of prokaryotic and eukaryotic cells and involved in various biological event. Especially, the surface of cancer cells frequently display glycans at different levels or with fundamentally different structures in comparison with that of normal cells, including the progression of tumor cell metastasis.

Dimeric Lewis X and KH-1 are two tumor-associated antigens. These antigens are considered as the marker for malignancy and pre-malignancies involving colonic adenocarcinoma. Lewis X dimer and KH-1 tumor associated antigens can be used to develop carbohydrate-based anticancer vaccines and carbohydrate microarray in diagnosis. However, the structure identification and isolation of homogeneous carbohydrate-based tumor antigen is very difficult, organic synthesis play an important role in glycobiology research. Finally, one-pot strategy was successfully developed to synthesis Lewis X monomer, Lewis X dimer hexasaccharide and KH-1 heptasaccharide analogues.

縮寫表

Ac	acetyl
aq	aqueous
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
Cp	cyclopentadienyl
CSA	camphorsulfonic acid
DDQ	2,3,-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMDO	dimethyl dioxirane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
Et	ethyl
Me	methyl
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
Ph	phenyl
Phth	phthaloyl
Piv	pivaloyl
py	pyridine
TBAI	tetra- <i>n</i> -butylammonium iodide
Tf	trifluoromethanesulfonyl
TFA	trifluoroacetic acid
TFAA	trifluoroacetic anhydride
Tol	<i>p</i> -tolyl
Troc	2,2,2-trichloroethoxycarbonyl

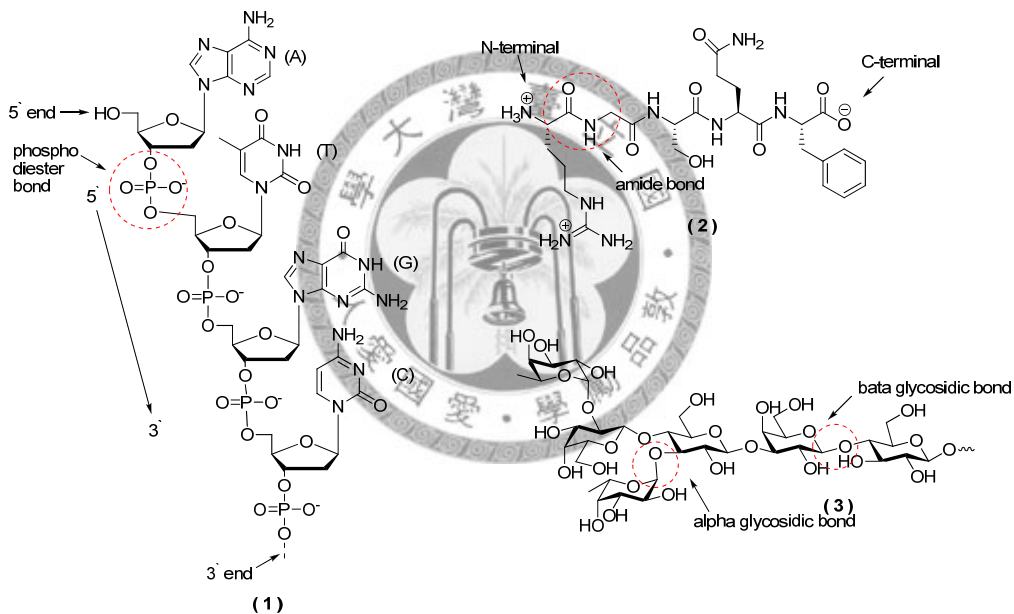


目錄

謝誌.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
縮寫表.....	iv
目錄.....	v
第一章 緒論.....	01
第一節 寡糖的化學合成.....	04
第二節 一鍋化合成法.....	07
第三節 腫瘤細胞表面醣分子抗原.....	13
第二章 路易士 X 二聚體與 KH-1 寡醣分子之化學合成回顧.....	17
第一節 路易士 X 二聚體寡糖合成回顧.....	17
第二節 KH-1 寡糖合成回顧.....	26
第三章 結果與討論.....	32
第一節 路易士 X 二聚體與 KH-1 之逆合成分析.....	32
第二節 路易士 X 二聚體與 KH-1 之合成流程.....	34
參考文獻.....	47
附錄 材料與實驗步驟.....	50

第一章 緒論

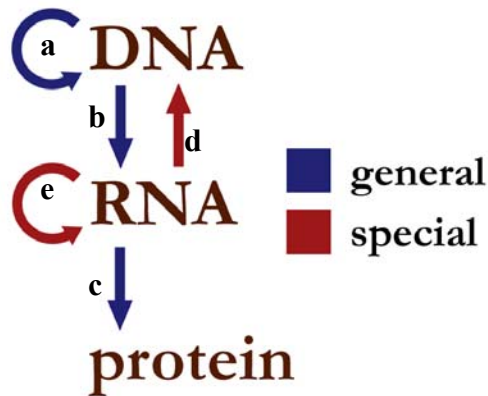
存在於生物體中的四大分子分別為一核酸(nucleic acid)，蛋白質(protein)，碳水化合物(carbohydrate)和脂類(lipid)。其中，碳水化合物相對於核酸和蛋白質這兩種生物分子有兩項重要的差異：(1)具有高度的支鏈性與(2)單體間有不同連接方式¹(圖一)。核酸(nucleic acid)與蛋白質(protein)都以線性連接的生物聚合物，在單體間的鍵結上沒有立體化學的問題。由於碳水化合物的高支鏈性與單體間鍵結的立體化學的不同，大大提升結構上的複雜度也增加研究上的困難。



(圖一) (1)去氧核糖核酸(DNA)結構 (2)胜肽結構 (3)寡糖結構

分子生物學的核心是由 佛朗西斯·克里克(Francis Harry Compton Crick) 在 1958 年提出的中心法則(Central dogma)² (圖二)，並在 1970 年發表於 Nature 期刊上的一文—分子生物學的中心法則(Central dogma of molecular biology)：分子生物學的中心法則旨在詳述說明連串訊息的逐字傳送，它指出遺傳訊息不能由蛋白質轉移到蛋白質或核酸之中。

(*The central dogma of molecular biology deals with the detailed residue-by-residue transfer of sequential information. It states that such information cannot be transferred from protein to either protein or nucleic acid.*) [目前也發現一些中心法則的例外]



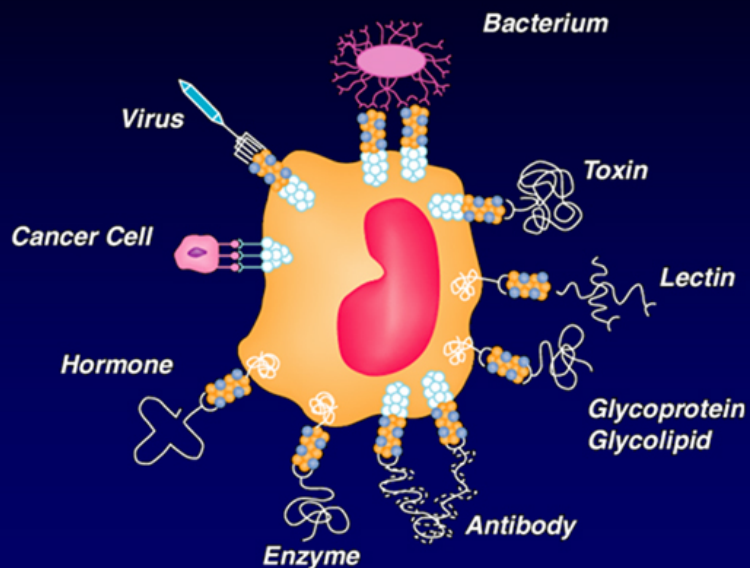
(圖二) 中心法則(central dogma)

- (a) DNA 複製成 DNA
- (b) DNA 轉錄成 RNA
- (c) RNA 轉譯成蛋白質
- (d) RNA 逆轉錄成 DNA
- (e) 未成熟的 RNA 剪切後成為成熟的 RNA

建立於轉錄(transcription)、轉譯(translation)及 DNA 複製(replication)這套模版(template)上的分子生物技術則提供了一套在研究核酸及蛋白質上強而有力的技術。

隨著人類基因體序列的解碼完成，後基因體時代正式宣告來臨。醣類的研究則在後基因體時代被視為重要的領域之一！醣類在生物體中的角色除了提供能量來源之外，慢慢也被了解到涉及要重辨識(recognition)的功能(圖三)例：抗原與抗體的辨認³、微生物與細胞表面的結合⁴；經後轉譯(post translation)醣化修飾的蛋白質影響其結構上的摺疊(folding)與壽命(lifetime)⁵；發炎反應⁶以及細胞分化與增生⁷等等。

Molecular Recognition Involves Cell-Surface Carbohydrates

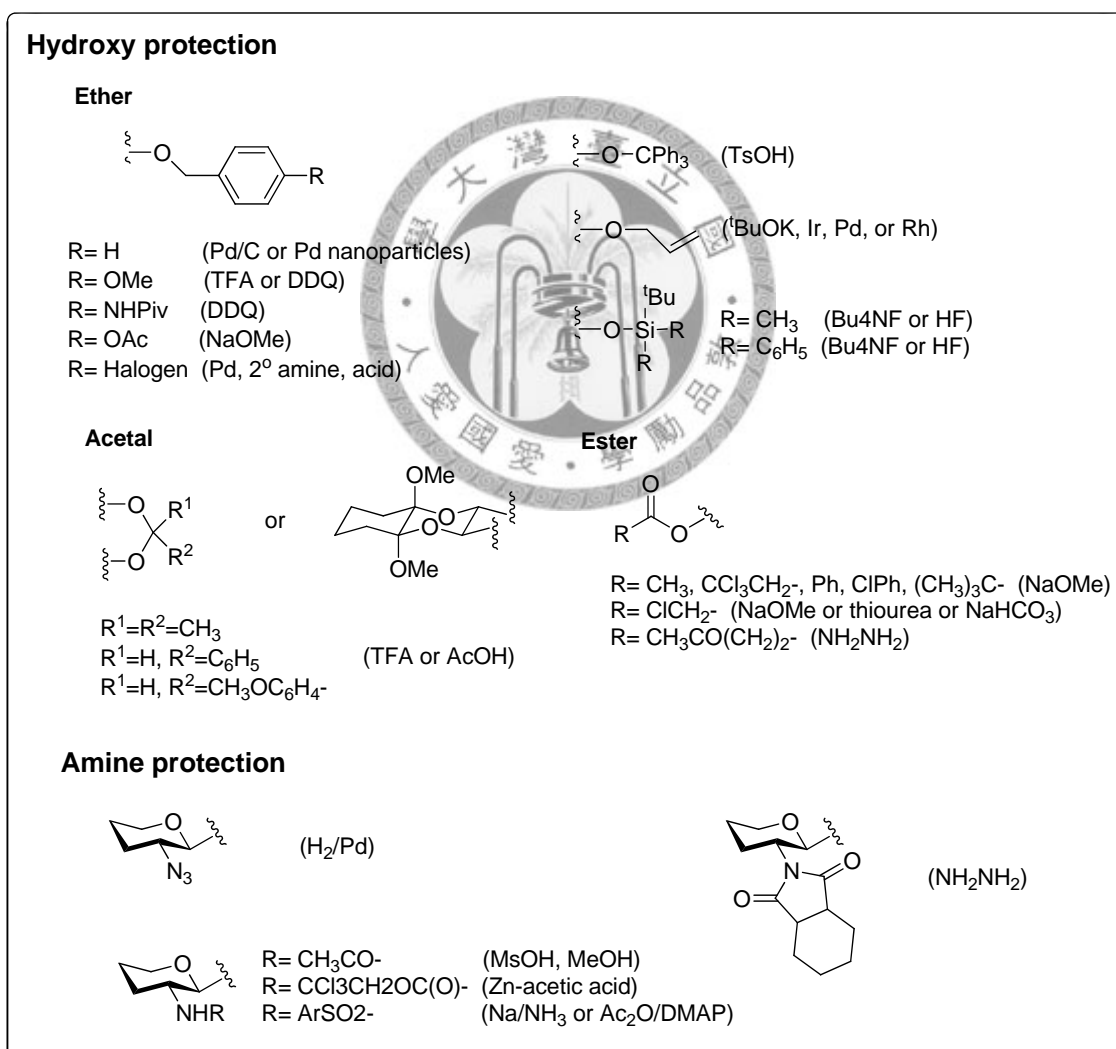


(圖三) 細胞表面上的醣分子涉及與細胞-細胞之間、細胞-微生物、與一些生物分子等之間的辨識作用。

然而，在生物體中構築多醣體的過程中，似乎缺少了一套完整且有利於了解最終生合成出多醣序列的相對密碼子。在研究具有高歧異度的醣類分子其生物活性功能的過程中，如何快速得到足夠量的同質性(homogeneous)多醣分子與醣分子解序技術是非常重要的問題！

第一節 寡糖的化學合成

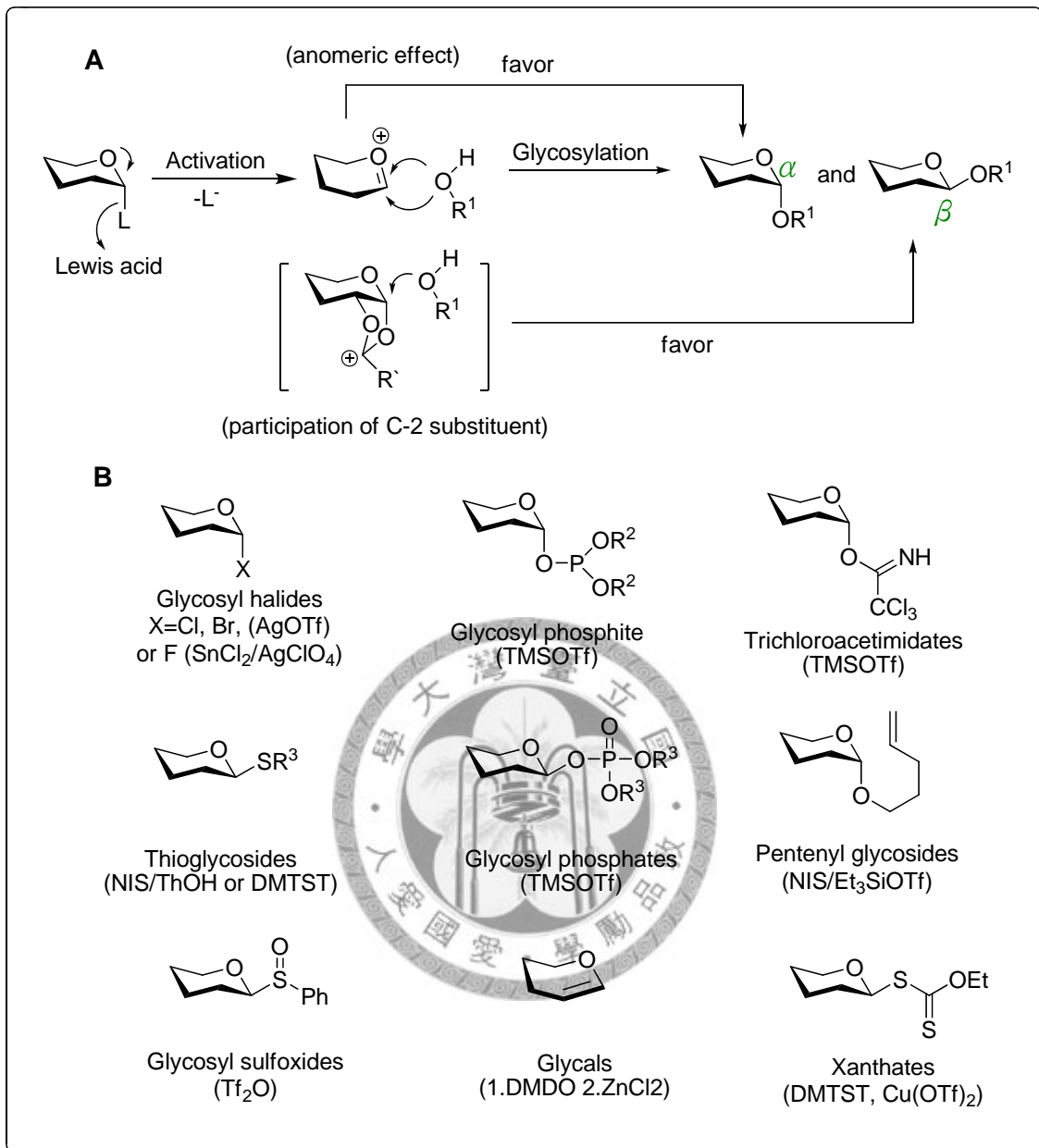
醣類的合成相較於核酸或蛋白質的合成困難許多，原因在於 (1)醣類分子常有支鏈結構，而非單純的線性結構，(2)單醣單元之間的連接方式有 α 或 β 鍵結，(3)合成的過程中需要不同的選擇性上保護與去保護的步驟(圖四)。其中值得注意的是，選擇不同種類的保護基對於醣化反應過程中的活性與立體選擇性會有所差異，例：推電子基的保護基會增加醣供與者(glycosyl donor)的活性，拉電子基的保護基則反之，二號碳上為酯類(ester group)或醯胺類(amide group)時，進行醣化反應時有鄰基參與效應(neighboring effect)⁸。



(圖四) 醣類合成過程中常見的保護基與去保護的試劑⁸

隨著有機合成反應的開發，目前已有數種化學方式可以成功合成出寡糖分子，其中大多數的方法是使用路易士酸(Lewis acid)去活化異位性(anomeric)碳原子上的離去基(leaving group)，然後與另一種糖上的氫氧基(hydroxy group)做置換反應(圖五)。在寡糖的合成中，糖苷鍵(glycoside bond)的立體位向控制(stereo-control, α or β)可以說是最重要的，目前最常見的控制糖苷鍵立體位向的方法的是： α -1,2-同向(cis)-動力向差異構物效應(kinetic anomeric effect) 與 β -1,2-反向(trans)-鄰基參與效應(neighboring effect)⁸ (圖五 A)。

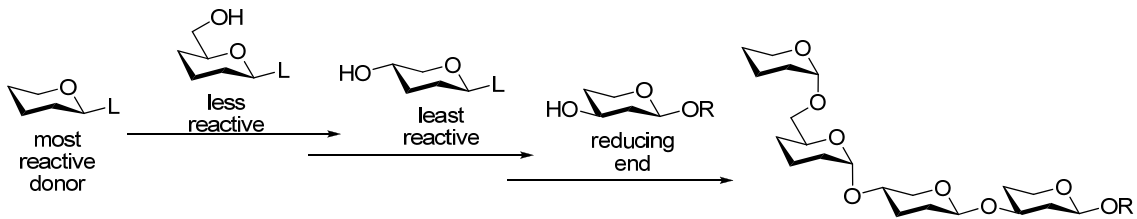
最早配糖體(glycoside)的合成紀錄是由 Michael, A 在 1879 年發表在 *Am. Chem. J.*⁹，不過後來第一個較被廣泛使用的方法是由 W. Koenigs 與 E. Knorr 在 1901 年發表在 *Ber.*¹⁰。現在被稱為 Koenigs-Knorr 糖化反應—利用 Glycosyl halide 與醇類在重金屬或是路易士酸的幫助下進行糖化反應。後來也陸續發展出一些糖化反應的方式，主要可以分成兩大類¹¹(圖五 B):(1) 含 Koenigs-Knorr 糖化反應在內的異位交換反應(anomeric exchange reactions)，例：glycosyl halide、glycosyl sulfoxides 和 thioglycoside 等 與 (2)含氧異位反應(anomeric oxygen retaining reactions)，例：trichloroacetimidate、glycosyl phosphite、glycosyl phosphate 和 pentenyl glycoside 等。在這兩大類之外還有由 Danishefsky 教授開發出來的 Glycal，經氧化試劑(例：DMDO)氧化得到 1,2 環氧化物(1,2-epoxy)後藉由路易士酸(例：ZnCl₂)催化下進行糖化反應。



(圖五) (A) 醴化作用的反應機構 (B) 常見的醴化試劑和與其使用的活化劑⁸

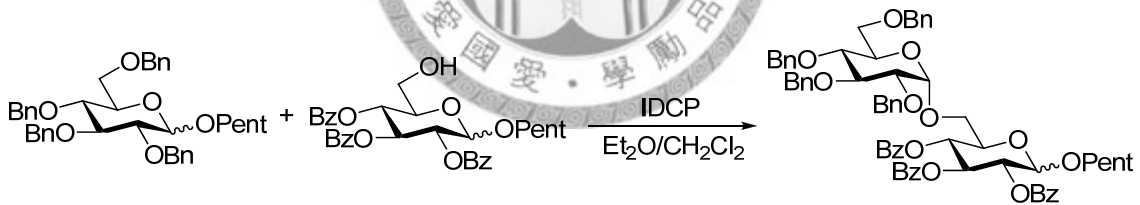
第二節 一鍋化合成法 (One-Pot Synthesis)

目前已經有數個研究團隊利用各自開發的一鍋化合成法來合成寡糖。原理上是在同一個反應瓶內，利用反應活性的不同或使用不同的活化劑來活化糖授予體後，依序連接起來得到目標產物(圖六)¹²。



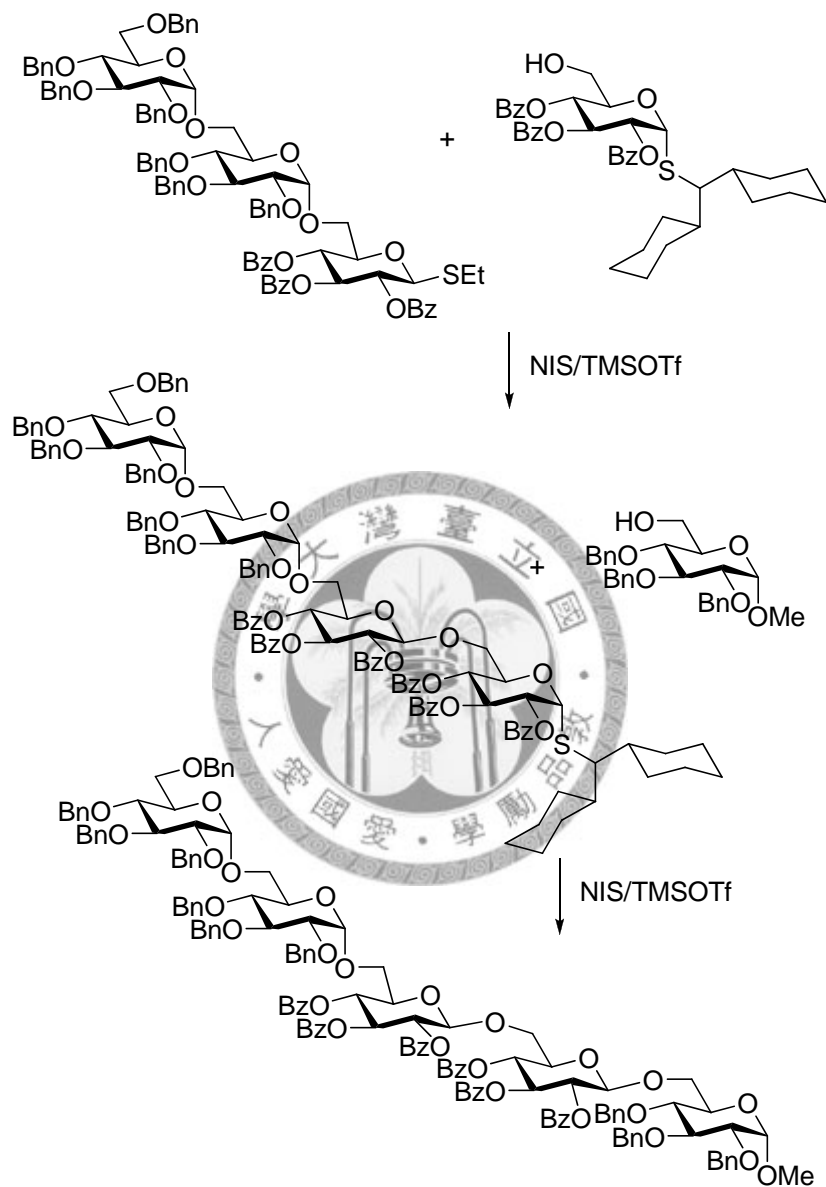
(圖六) 一鍋化合成寡糖的策略設計¹²

在 70 年代，最早由 Paulsen 發現到 glycosyl halides 上 C₂ 的氫氧基如果以醚類的形式保護起來活性會比以酯類的保護基形式來得高¹³，後來，Fraser-Reid 利用強勢-弱勢(armed-disarmed)形容在正戊烯糖授予體上 C₂ 的氫氧基以醚類(強勢)或酯類(弱勢)不同保護基造成活性上的差異¹⁴(圖七)。



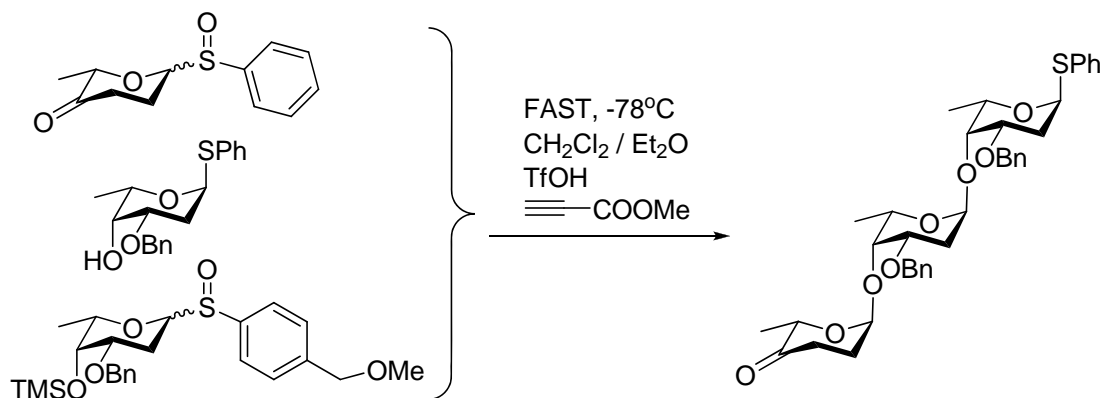
(圖七) Fraser-Reid 在合成雙糖上的強勢-弱勢策略¹⁴

在 Boons 的團隊發現，雖然糖授予者上 C₂ 的氫氧基保護基相同，但利用離去基立體障礙的不同使得活化劑要活化離去基時有不同的競爭關係，進而造成活性上的差異¹⁵ (圖八)。



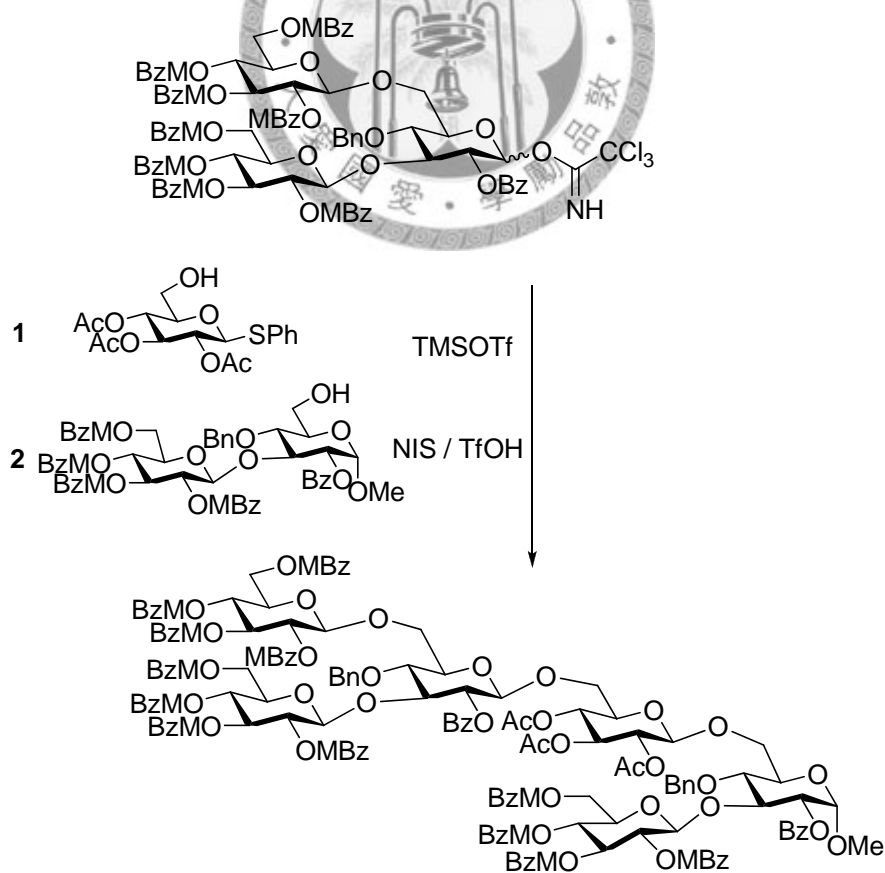
(圖八) 離去基的立體障礙造成反應性的不同 (Boons 團隊)¹⁵

第一個真正利用一鍋合成法進行糖化反應是在 1993 年，由 Kahne 等人利用苯基磺(phenyl sulfoxide)與硫苷糖(thioglycoside)授予體依序活化，進行一鍋化合成 ciclamicin 0 三糖分子¹⁶(圖九)。



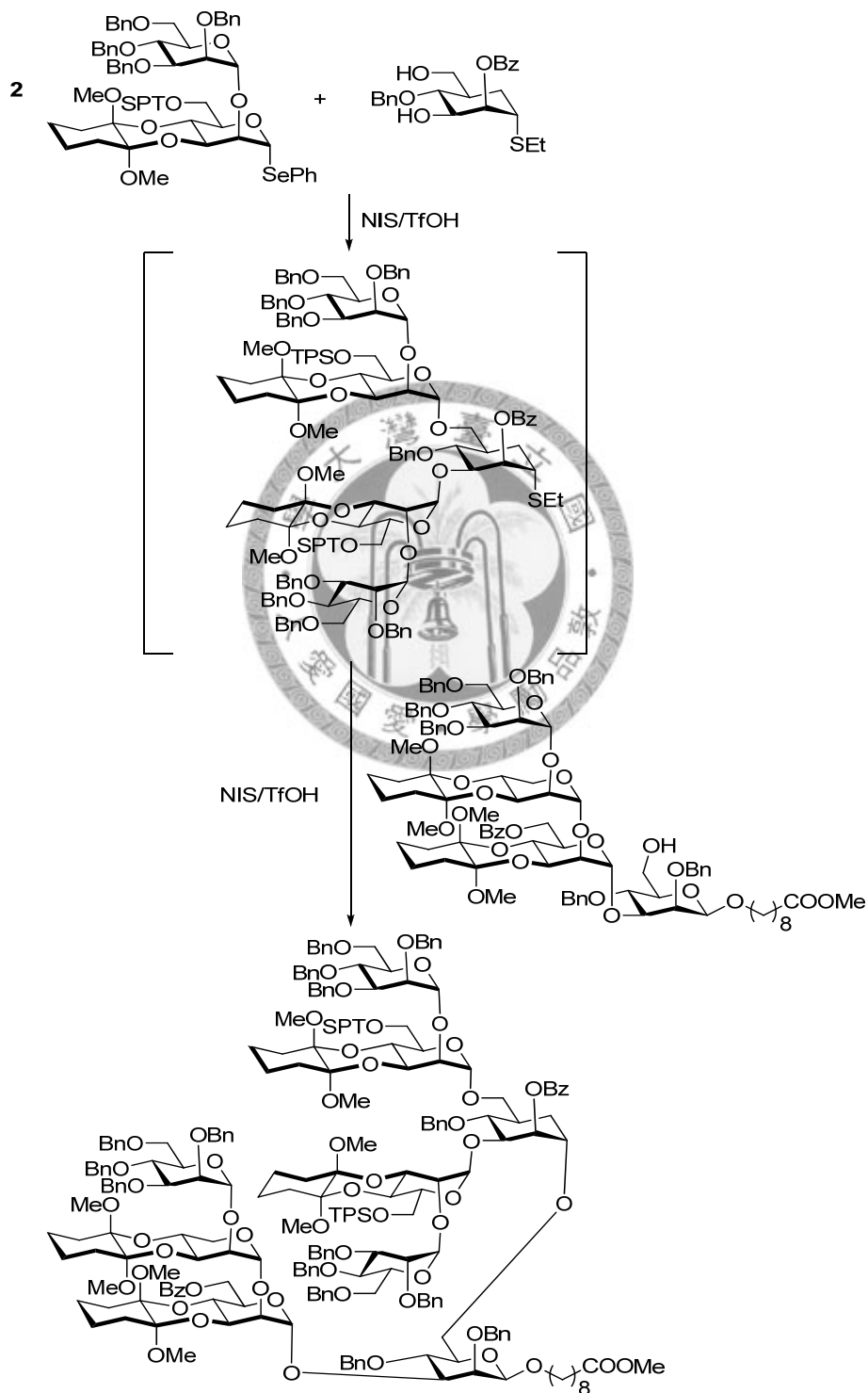
(圖九) Kahne 一鍋化合成 Ciclamicin 0 三糖分子¹⁶

Takahashi 等人則是選擇不同種類的糖授予體，利用不同的活化劑來進行選擇性的一鍋化糖化反應¹⁷(圖十)。



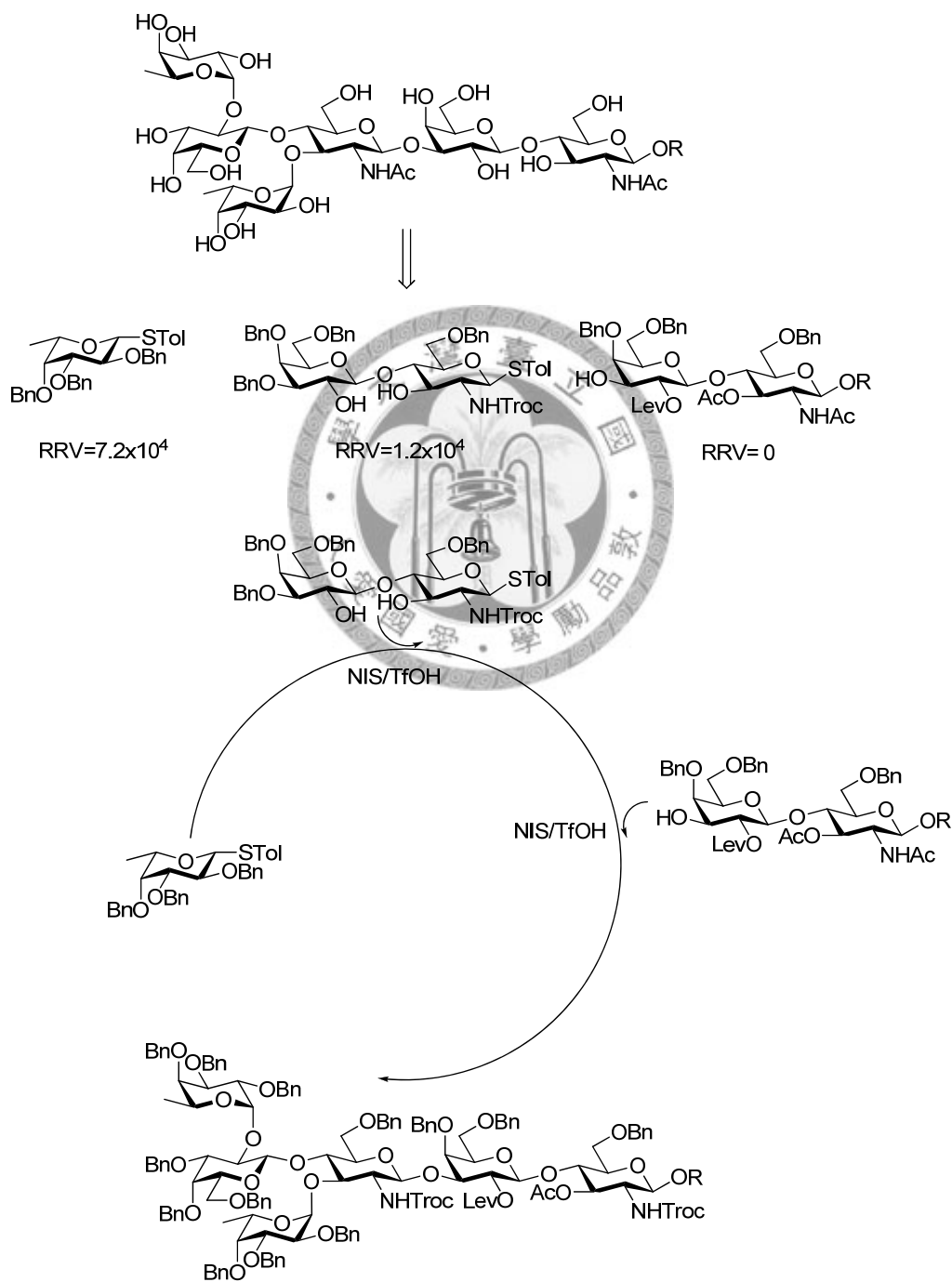
(圖十) Takahashi 的一鍋化合成法¹⁷

在 Ley 的團隊，首先利用 NMR 的技術定出醣授予體的相對活性數值 (relative reactivity values, RRV)¹⁸。另外，也利用硒苷糖(selenoglycosides)與硫苷糖(thioglycoside)在相同的活化劑中被活化的速度不同，進而利用在寡醣的一鍋化合物法¹⁹(圖十一)。



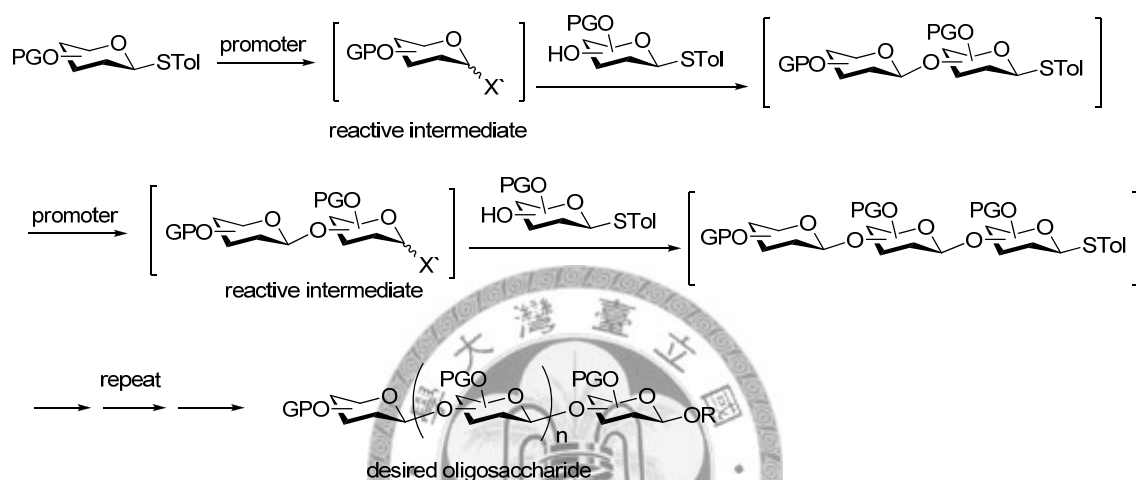
(圖十一) Ley 的一鍋化合物法

在 1999 年，翁的實驗室利用 HPLC 的方式定出硫苷糖(thioglycoside)的相對活性值，並將這些基本單元(building block)的活性值寫入麥金塔電腦程式中建立了一套資料庫。未來在著手合成寡醣時，將寡醣結構輸入電腦分析後依輸出建議的理想基本單元進行一鍋化反應，即可有機會得到目標產物^{12,20}(圖十三)。

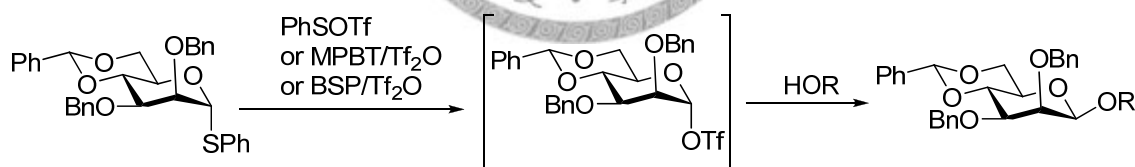


(圖十三) 翁的程序性的一鍋化合成法²⁰

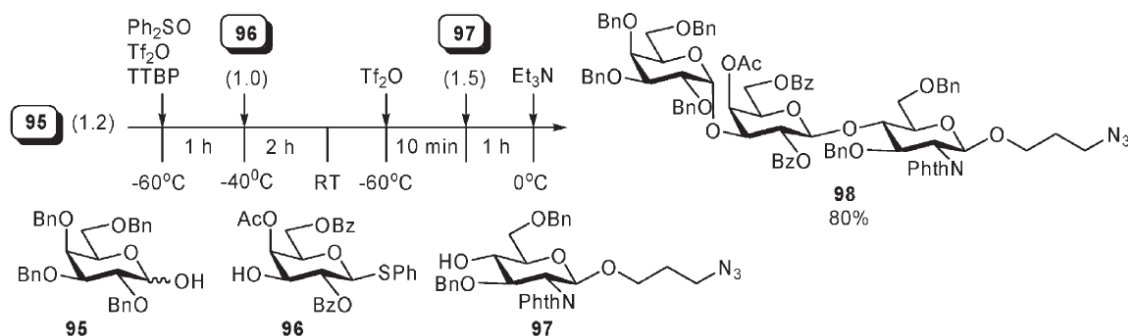
最後介紹的是反覆活化的一鍋化合成法(圖十四),此法建立於 Danishesfky 開發的 glycal 方法論²¹、Gin 的化學選擇性醱化反應²²與 Yamago²³ 等人的方法。最先作前活化(preactivation)硫苷糖的反應進行醱化反應的是 Crich²⁴ 進行甘露糖的 β -醱苷鍵生成反應(圖十五)。後來 Boom 和 Marel²⁵ 利用反覆活化的方式進行一鍋化合成法(圖十六)。



(圖十四) 反覆活化一鍋化合成法²⁶



(圖十五) Crich 實驗室發展出合成甘露糖- β -醱苷鍵的方法

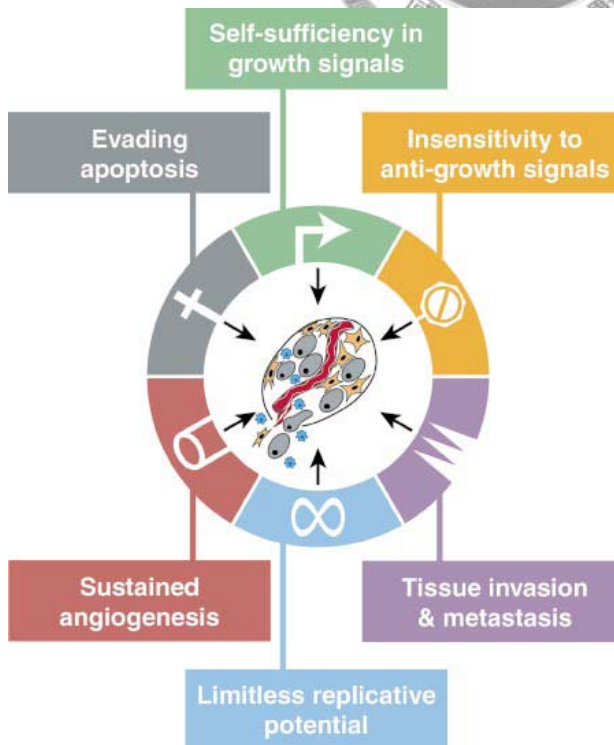


(圖十六) 反覆活化的一鍋化合成法

第三節 腫瘤細胞表面醣分子抗原

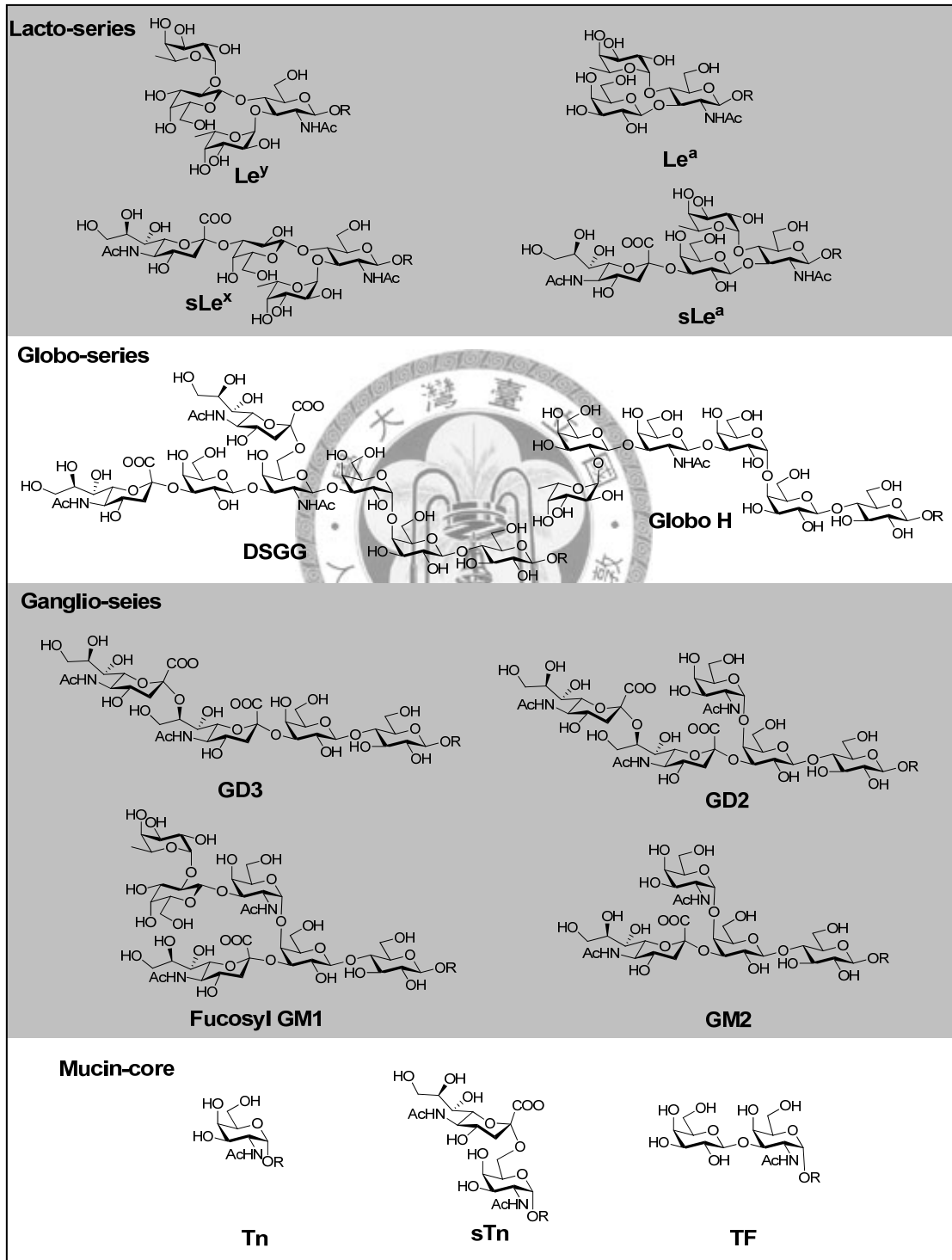
癌症(cancer)這令人聞風色變的疾病，已成為造成人類死亡的主要殺手之一。根據世界衛生組織(World Health Organization)統計，2007 年因癌症所造成死亡的人數有七百九十萬人，佔所有死亡人數的 13%。另外也預估，如果沒有出現有效的診斷和治療方法的話，到 2030 年時這一年全世界死於癌症的人數將會多達一千兩百萬人²⁷！

癌症(cancer)是由一些失去正常細胞增生(cell proliferation)和調節恆定狀態(homeostasis)的癌細胞(cancer cell)所引起的疾病。惡性腫瘤與正常細胞的生長表現上的差異，巨觀來看有六種基本細胞生理狀態上的不同²⁸(圖十七)：(1)自足的生長訊息(self-sufficiency in growth signals)、(2)對抑制生長訊息不敏感(insensitivity to antigrowth signals)、(3)避開細胞凋零(evasion of apoptosis)、(4)無限制的複製能力(limitless replicative potential)、(5)持續性的血管新生(sustained angiogenesis)和(6)侵犯與轉移到其他組織的能力(tissue invasion and metastasis)。



(圖十七)²⁸ 癌症所需的六種基本能力
自足的生長訊息、對抑制生長訊息不敏感、避開細胞凋零、無限的複製能力、持續性的血管新生 與侵犯轉移的能力，這些能力在癌症生成的不同時期過程中扮演重要的角色。

在 1696 年, Meezan 與其他科學家首次利用凝集素(lectin)觀察到正常與癌化的纖維母細胞(fibroblasts)之間膜上的醣蛋白有些許的不同, 也證實了在癌化的過程中出現了不正常的醣化現象²⁹。這些不正常的醣化現象包括了大量或減少表現在正常細胞上, 或是表現出不存在於正常細胞上的醣結構(圖十八)。



(圖十八) 癌症相關的碳水化合物抗原分子結構

過去，在研究這些不正常的醣化現象常是利用不同的凝集素去尋找正常與惡性組織上不同的醣結合物(glycoconjugate)。拜科技的進步，現今則是利用單株抗體(monoclonal antibodies)、分子探針(probe)與質譜(Mass spectrometry)、核磁共振(Nuclear magnetic resonance)光譜等技術來研究這些不正常的醣化現象。表一為我們常見到的一些已知以醣脂質或醣蛋白表現在不同癌症上的腫瘤相關的碳水化合物抗原(tumor associated carbohydrate antigens)^{30, 31}。

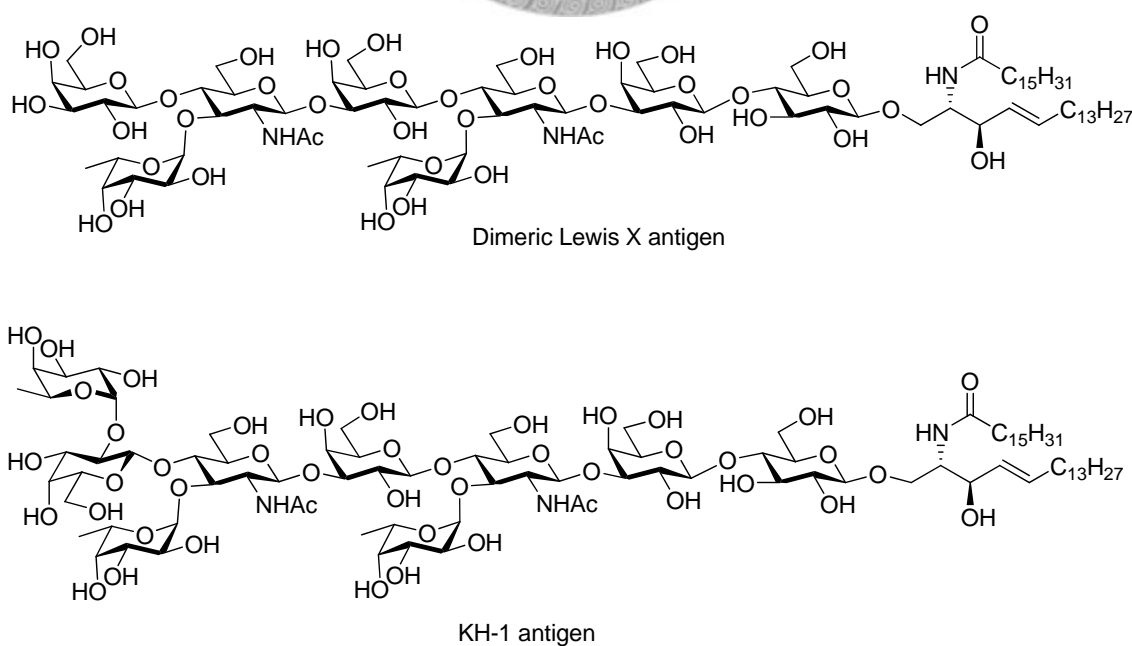
腫瘤	抗原
Melanoma	GM2, GD2, GD3
Neuroblastoma	GM2, GD2, GD3, PSA
Skin	GM2, GD2, GD3
Small cell Lung cancer	GM2, FucGM1, Globo H, PSA, sLe ^a , di-Le ^x , KH-1
breast	GM2, Globo H, TF, (s)Tn, PSA, sLe ^a
Prostate	GM2, (s)Tn, TF, Globo H, Le ^y
Ovary	GM2, Globo H, sTn, TF, Le ^y
Colon	GM2, Globo H, (s)Tn, TF, Le ^y , sLe ^a , di-Le ^x , KH-1
Stomach	GM2, Le ^y , (s)Le ^a
Pancreas	GM2, Globo H, sTn, Le ^y , sLe ^a , sLe ^x , PSA

表一 一些癌症細胞表面大量表現的碳水化合物抗原分子^{30, 31}

在 1986 年，由 Hakomori 教授等人利用抗體做免疫組織化學染色(immunohistological Staining, IHC)發現大腸癌與胃癌細胞表面大量表現出路易士 X 二聚體(di-Le^x)與 KH-1 的醣分子抗原³¹(圖十九)，因此許多科學家想利用此特徵作為生物標誌分子(biomarker)，進一步設計出治療疾病的標靶藥物。

過去的一些研究發現，腫瘤相關的醣抗原分子在誘導免疫反應方面不如脂多醣(lipopolysaccharide)強，因此如何搭配一些適當的佐劑來促進免疫反應與讓醣抗原分子成為好的抗原決定位(epitope)³²也是許多科學家正在著手解決的問題。此外，這些抗原分子在胚胎與正常細胞中少量表現，因此免疫細胞也是有可能會認為這是自體抗原分子而不會進行攻擊，因此如何打破免疫系統對於這些抗原分子的自體容忍性(self-tolerance)³³也需要進一步去思考。

在研究這些醣類的生物活性之前，重要的是如何得到足夠量的同質性(homogeneous)抗原分子，因此有機合成扮演重要的角色。由於路易士 X 二聚體與 KH-1 分子可運用於醣晶片與發展醣分子疫苗，因此具有合成的價值。接下來介紹過去合成的相關文獻與本篇論文利用一鍋化合成法來同時合成直鏈與支鏈型態的寡糖。



(圖十九) 路易士 X 二聚體與 KH-1 抗原分子結構

第二章 路易士 X 二聚體與 KH-1 寡糖分子之化學合成回顧

第一節 路易士 X 二聚體寡糖合成回顧

1988 年 Ogawa 教授首先完成路易士 X 二聚體全合成的工作，其採用的策略乃是以 imidates 的方式進行[3+2+3]逐步合成法來建構出八糖分子(圖二十)³⁴。在合成過程中，五糖化合物 6 與三糖化合物 7 進行糖化反應的過程中會產生副產物 8(10%)，且繁複步驟也影響總產率的高低，反應過程中也使用到一些重金屬其經濟效益似乎不高。

K. C. Nicolaou 團隊在 1990 年完成路易士 X 單體到三聚體系列的全合成工作，圖二十二為簡示他們進行路易二聚體的合成策略³⁵。其乃是利用氟苷糖(glycosyl fluoride)在路易士酸(Lewis acid)的活化下進行[3+2+3]的逐步糖化反應。其中化合物 4 與化合物 10 進行[3+2]糖化反應時，由於化合物 10 半乳糖(galactose)上 C₄ 的氫氧基立體障礙比 C₃ 的氫氧基大，因此會有特位選擇性(regioselective)在 C₃ 的氫氧基上進行反應。同理，在化合物 19 經選擇性去保護後得到化合物 20 再與化合物 4 進行糖化反應時經特位選擇性(regioselective)得到想要的 1→3 糖苷鍵，得到八糖的化合物 21。

Schmidt 實驗室在 1994 年利用他們自行開發出來 imidate 的方法來合成路易士 X 系列的分子，包含了路易士 X 單體(monomer)到四聚體(tetramer)分子，(圖二十一)³⁶為路易士 X 二聚體的合成步驟，他們使用的策略是[3+3+2]的逐步合成方式，建立起三糖的授予體化合物 8 與三糖的接受體化合物 6，接下來進行糖化反應得到化合物 9，然後將化合物 9 的還原端的矽保護機除去後轉變成糖授予體 imidate 的形式(化合物 10)，最後再與化合物 11 進行糖化反應得到化合物 12 的八糖分子。化合物 12 的還原端與非還原端可以藉由上保護與去保護的等反應進行衍生化。

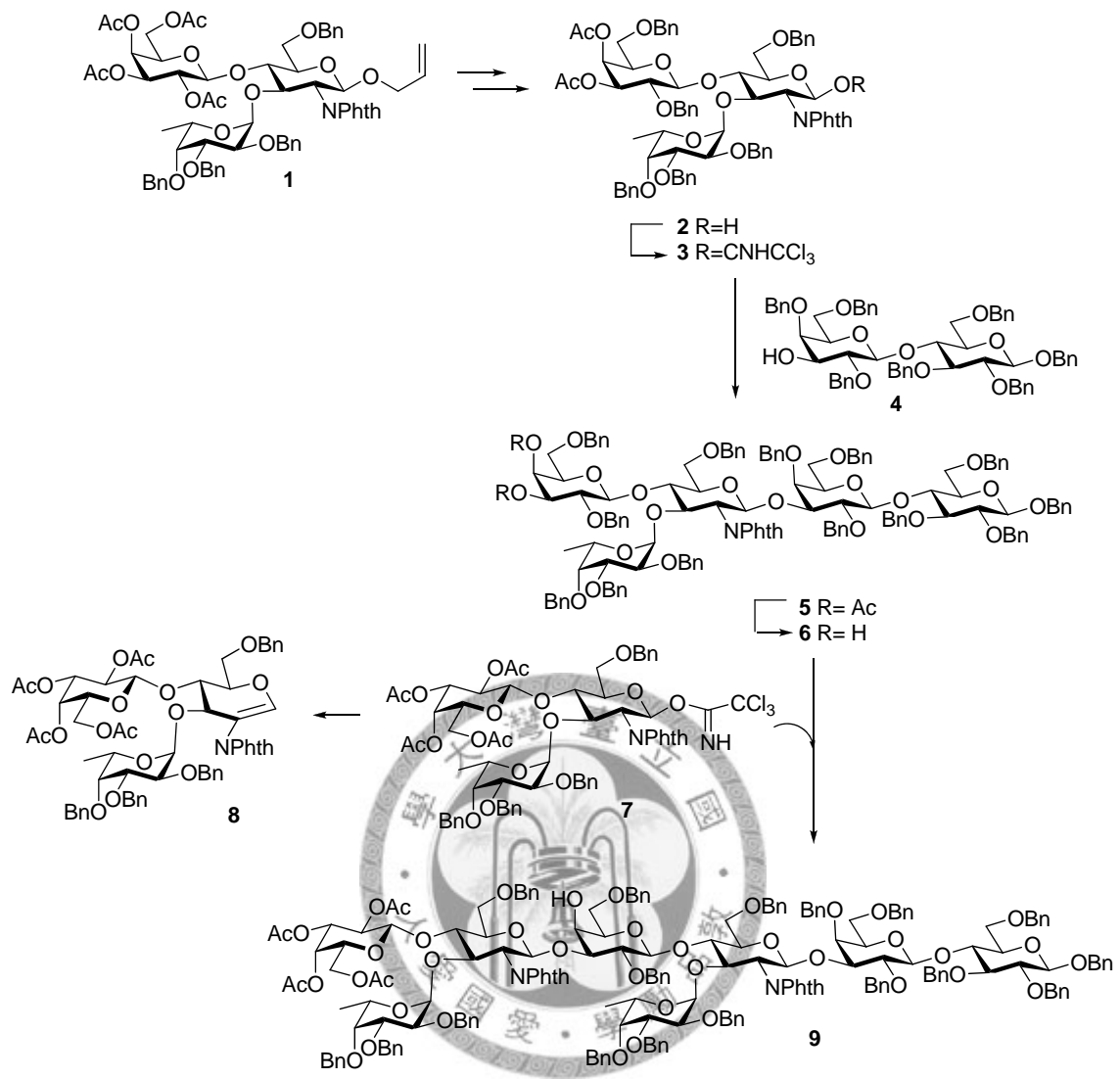
在 1999 年 Sinaj 團隊合成路易士 X 二聚體的策略是利用硫苷糖(thio-glycoside)進行[3+2+3]逐步合成法(圖二十三)³⁷。首先，利用已經構築好的化

化合物 2 與化合物 3 進行醱化反應，經特位選擇性(regioselective)生成所要的 1→3 醱苷鍵結，得到化合物 4。酯類經醇解後，在酸性條件下與二甲基苯縮醛(benzaldehyde dimethyl acetal)反應，選擇性保護在最外端半乳糖上的 C₄ 與 C₆ 上的氫氧基，得到化合物 5。在化合物 5 最外端的半乳糖上裸露出來的 C₂ 與 C₃ 上的氫氧基在反應活性上 C₃ 大於 C₂，因此化合物 5 與化合物 2 進行醱化反應時會選擇性與 C₃ 上的氫氧基反應，進而得到所要的八醱分子化合物 6。

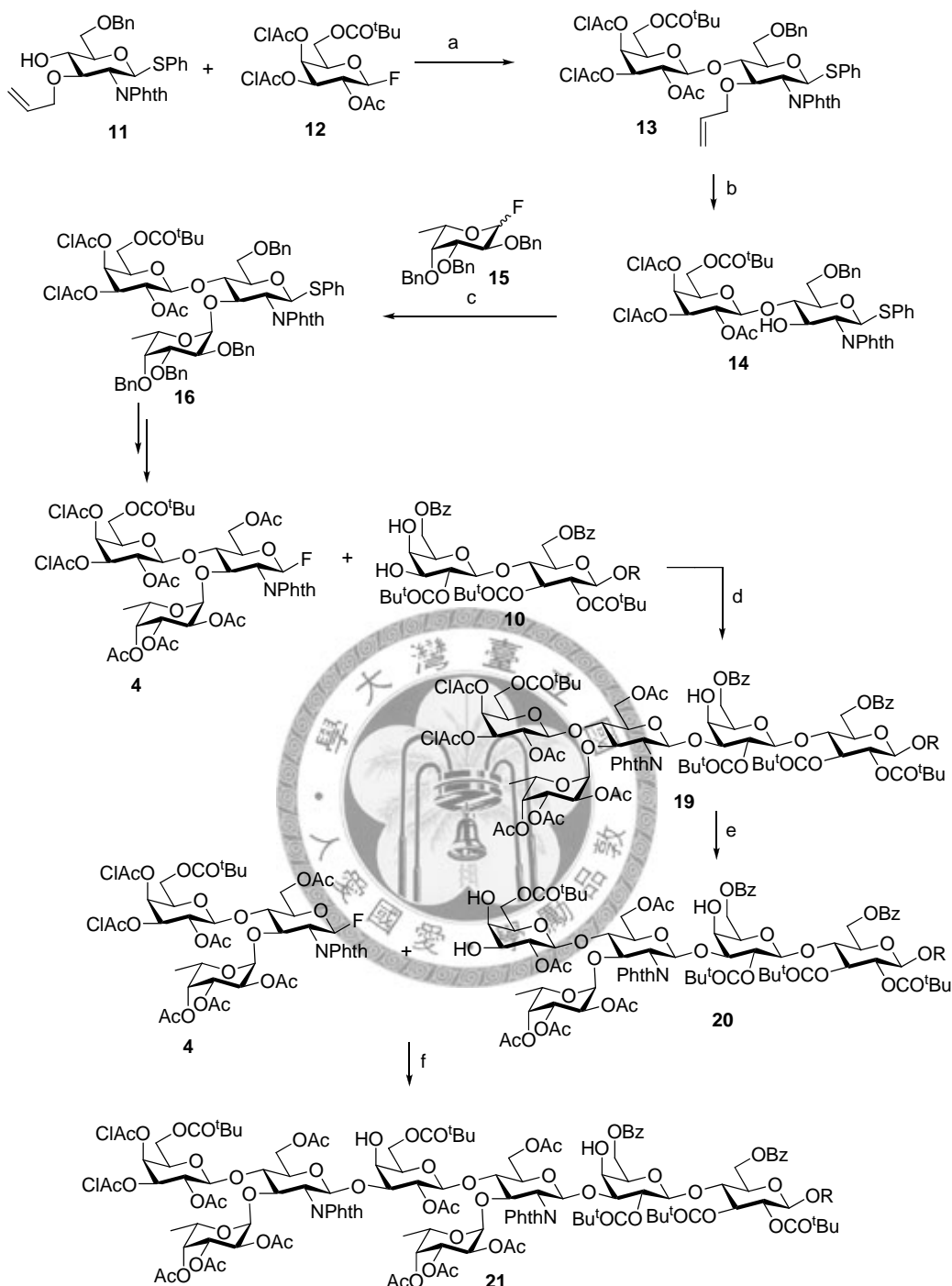
Boons 的團隊在 2000 年利用修飾過的環氧樹酯聚合物(Methoxypoly(ethylene glycol), MPEG)作類似固相醱化反應的支撐物。他們所採用的是[3+3] 逐步合成法的策略，先在可溶性的聚合支撐物上建構出三醱分子 8³⁸ (圖二十四)，接著從聚合物上切除下來，經一系列反應轉成三醱的醱授予體 (glycosyl donor) 化合物 12，再與在聚合物上的化合物 9 [3+3]的醱化反應，最後得到路易士二聚體的六醱分子。

Takahashi 在 2005 年利用他們實驗室的正交性(orthogonal)一鍋化反應，配合固相合成法進行自動化平行合成路易士 X 二聚體(圖二十五)³⁹。開始以化合物 3 與 6 進行選擇性活化與特位選擇性(regioselective)醱化反應得到化合物 8，接下來進行兩次的正交性(orthogonal)醱化反應得到四醱的醱授予體(glycosyl donor)化合物 2。第二次一鍋化反應中，化合物 2 與 3 再次進行選擇性活化與特位選擇性(regioselective)醱化反應得到化合物 10 後，最後再進行兩次正交性(orthogonal)醱化反應得到所要的寡醱分子化合物 1。

最近，在 2007 年由 黃與葉兩人的團隊利用反覆活化的方式進行一鍋化醱化反應。他們採用的策略是[3+3+2]的策略來得到路易士 X 二聚體分子⁴⁰(圖二十六)。他們也應用反覆性活化的一鍋化合成法和特位選擇性(regioselective)的方式來建構兩種三醱分子的醱授予體(glycosyl donor)化合物 5 與 6。在第二次的一鍋化合成反應裡再度使用特位選擇性的方式進行[3+3+2]直鏈的醱化反應，建構出路易士 X 二聚體分子。

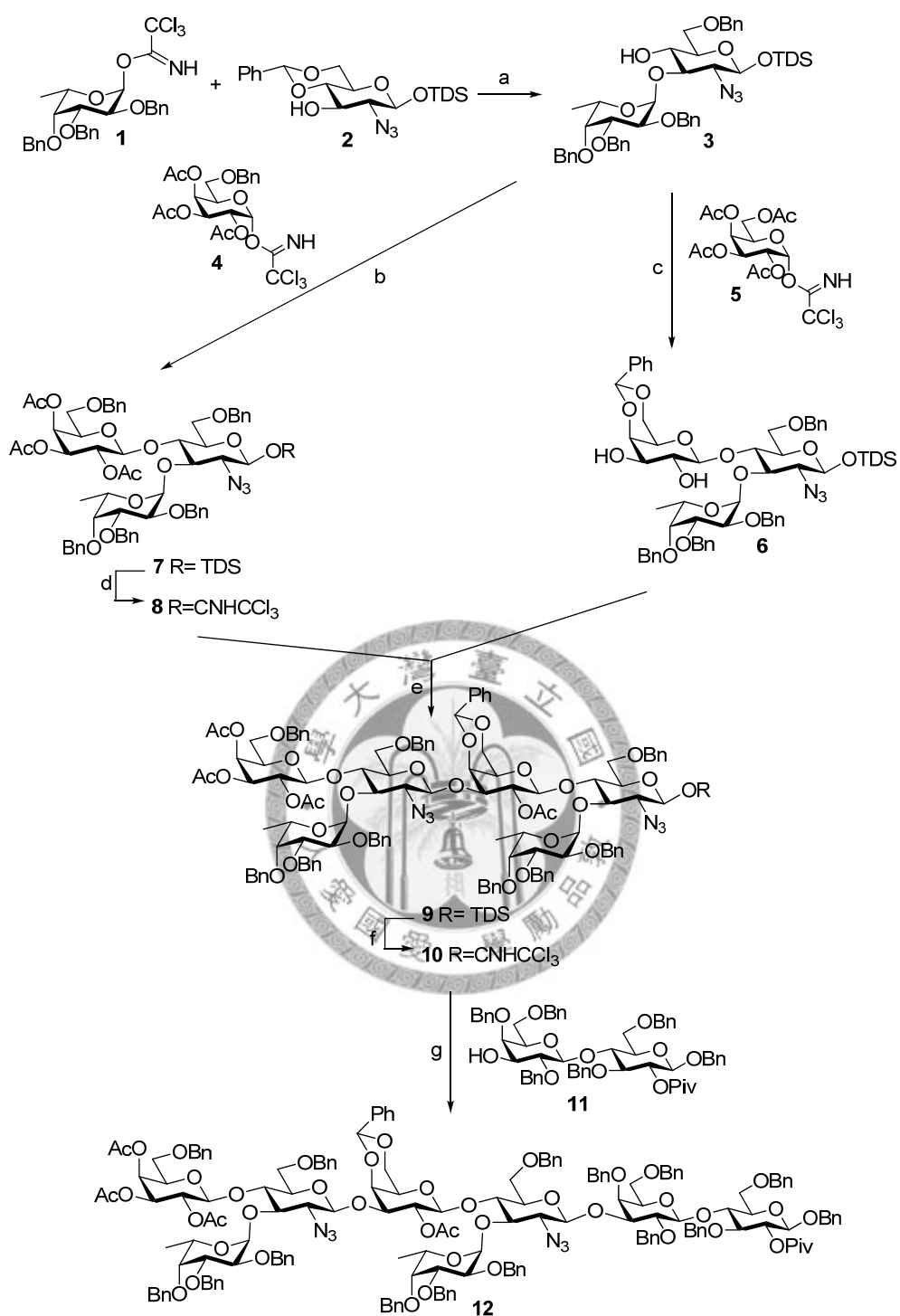


(圖二十) Ogawa 實驗室合成路易士二聚體的流程簡圖³⁴



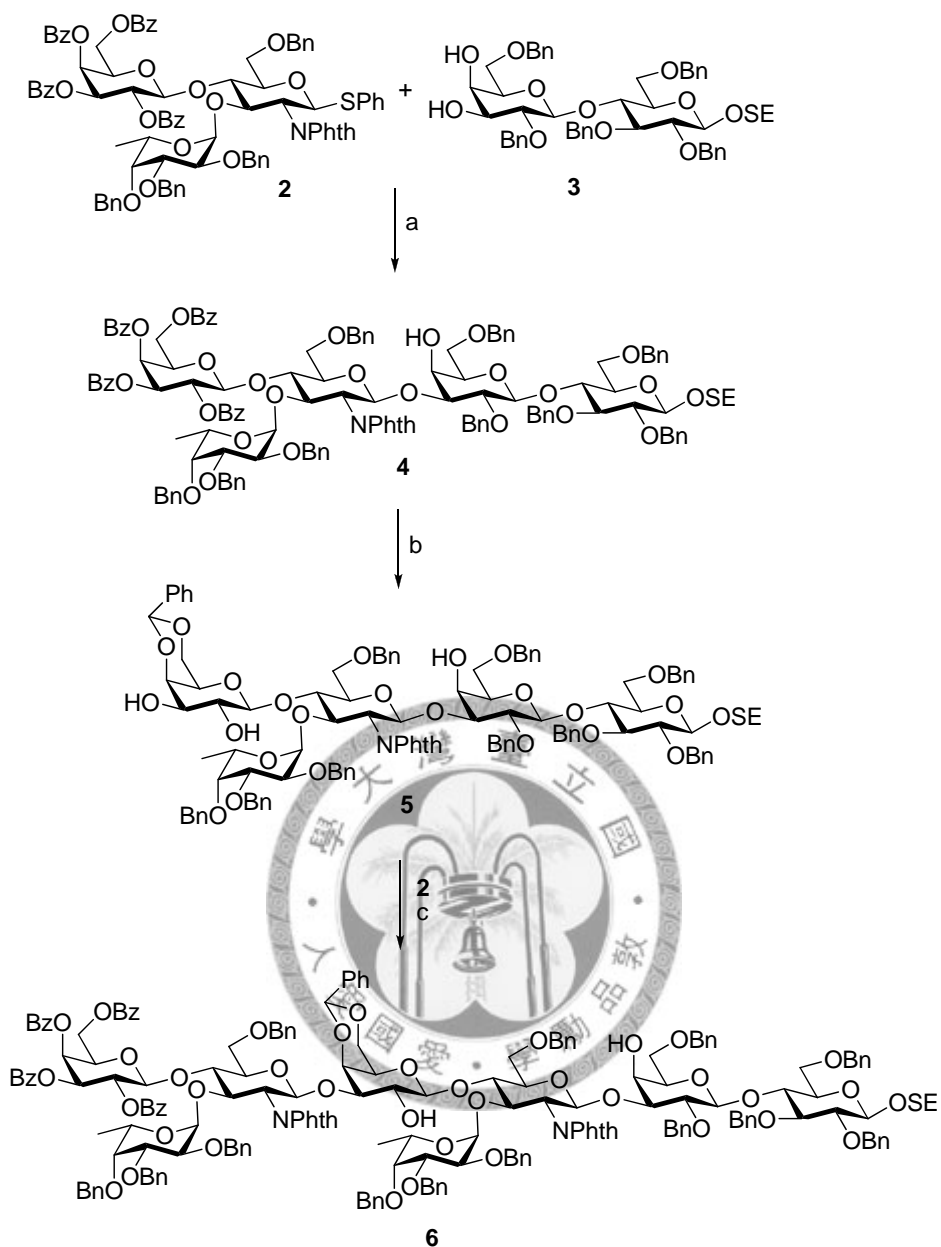
(圖二十二) K. C. Nicolaou 實驗室合成路易士 X 二聚體的流程簡圖³⁵

(a) AgClO_4 (2.5eq), SnCl_2 (2.5eq), 4-Å M.S., CH_2Cl_2 , 0°C (72%) (b) $\text{H}_2\text{Ru}(\text{PPh}_3)_4$, EtOH, 95°C , TsOH, MeOH (86%) (c) AgClO_4 (2.5eq), SnCl_2 (2.5eq), 4-Å M.S., Et_2O , -30°C (87%) (d) AgOTf (2eq), HfCp_2Cl_2 (2eq), 4-Å M.S., CH_2Cl_2 , -25°C (91%) (e) thiourea (5eq), 2,6-lutidine (5eq), MeOH: CH_2Cl_2 (1:1) (f) AgOTf (8eq), HfCp_2Cl_2 (8eq), 4-Å M.S., CH_2Cl_2 , 0°C (84%)



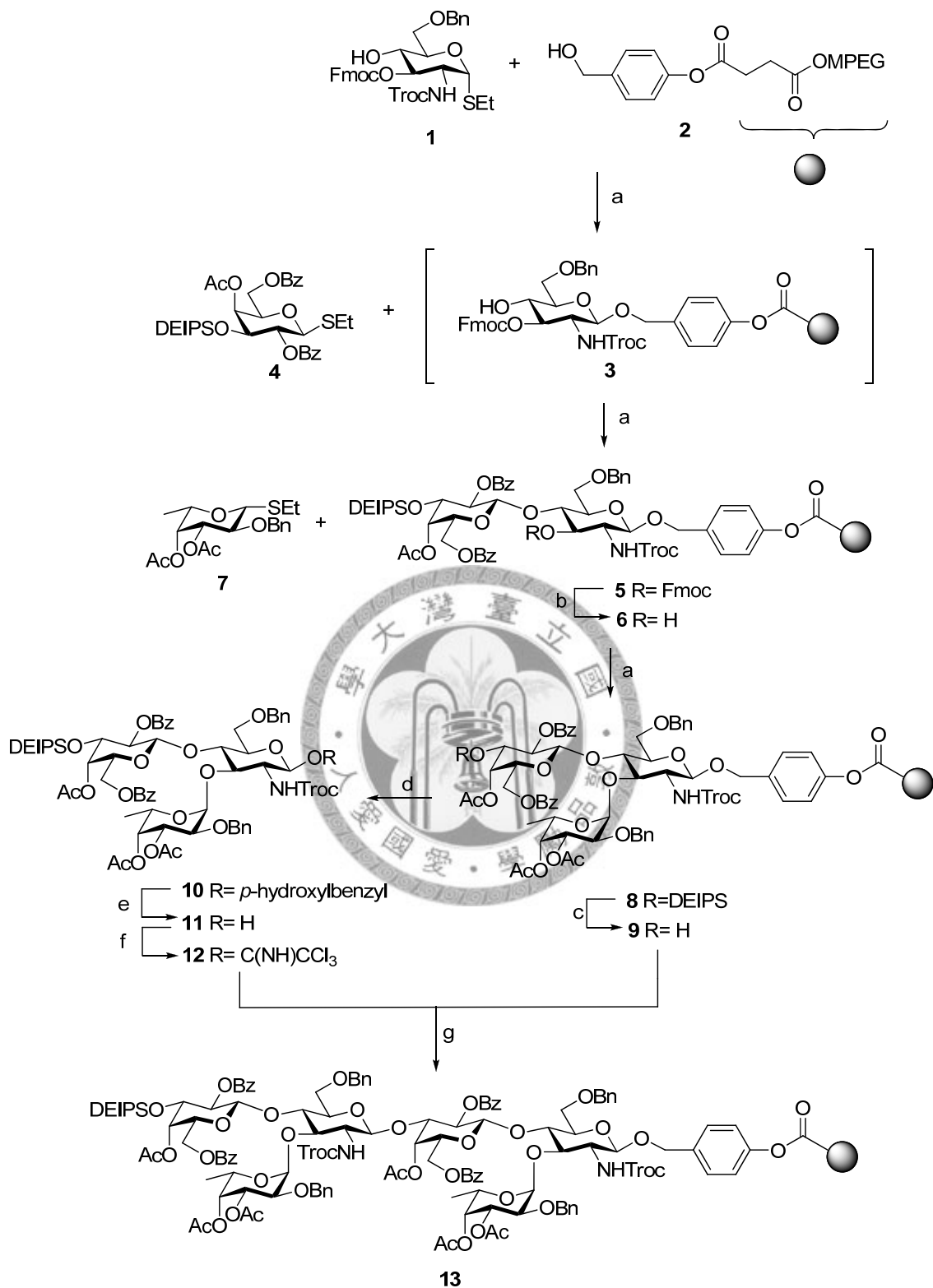
(圖二十一) Schmidt 實驗室合成路易士 X 二聚體的流程簡圖³⁶

(a) (i) TMSOTf (0.1eq), Et₂O (85%) (ii) NaCNBH₃, HCl (80%) (b) TMSOTf (0.1eq), Et₂O (89%) (c) (i) TMSOTf (0.1eq), Et₂O (85%) (ii) NaOMe, MeOH; PhCH(OMe)₂, *p*-TsOH (89%) (d) TBAF; CCl₃CN, DBU (e) TMSOTf (0.2eq), CH₃CN (80%) (f) TBAF; CCl₃CN, DBU (g) TMSOTf (0.2eq), CH₃CN (74%)



(圖二十三) Sinaj 團隊合成路易士 X 二聚體的流程簡圖³⁷

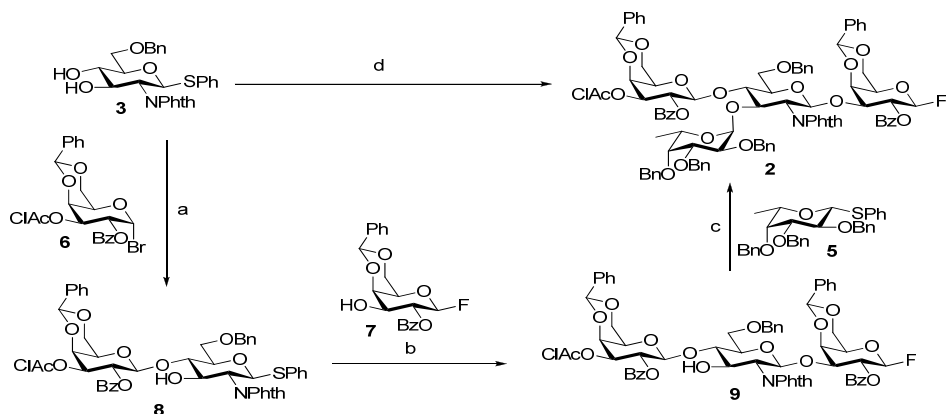
(a) NIS, TfOH, CH₂Cl₂, 4-Å M.S. (b) NaOMe, MeOH (c) NIS, TfOH, CH₂Cl₂, 4-Å M.S.



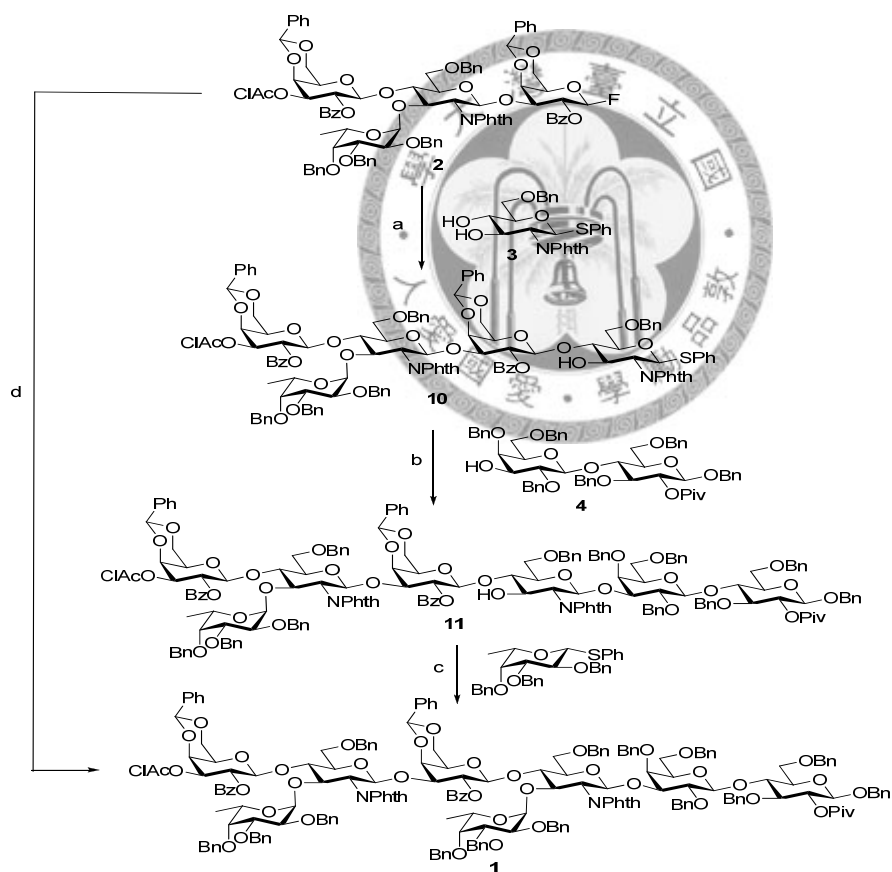
(圖二十四) Boon 團隊合成路易士 X 二聚體的流程簡圖³⁸

- (a) NIS, TMSOTf, 4-Å M.S., 0 °C, DCM (b) Et₃N, DCM (c) TBAF, AcOH, THF
 (d) H₂O₂, Et₃N, THF (e) DDQ, DCM, H₂O (f) CCl₃CN, DBU, DCM
 (g) TMSOTf, 3-Å M.S.

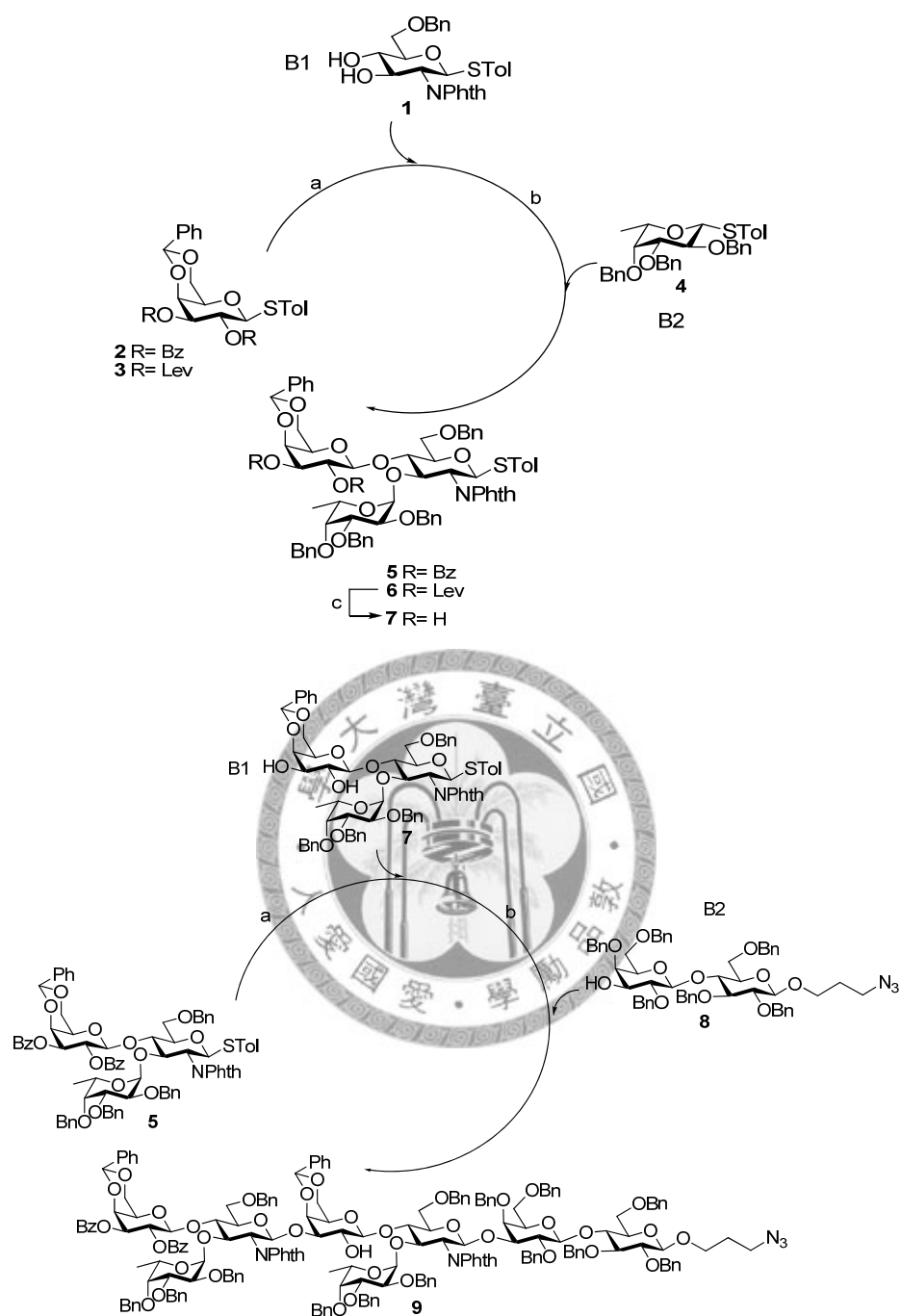
(圖二十五) Takahashi 團隊合成路易士 X 二聚體的流程簡圖³⁹



(a) **6**.(1.2 eq.), AgOTf(1.5 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -40 °C, 92% ; (b) **7**.(1.0 eq.), DMTST(1.5 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., 0°C, 85% ; (c) **5**.(2.0 eq.), DMTST(2.5 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., 0 °C, 96%



(a) **3**.(1.0 eq.), HfCp₂Cl₂/2AgOTf (2.0 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -40°C, 99% ; (b) **4**.(1.2 eq.), NIS(1.5eq), TfOH(0.1 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -0°C, 75% ; (c) **5**.(2.0 eq.), NIS(2.5 eq.), TfOH(0.1 eq.), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -0°C, 87%



(圖二十六) 黃興葉團隊合成路易士 X 二聚體的流程簡圖⁴⁰

(a) AgOTf (4 eq.), *p*-TolSCL, -78 °C, 10 min; then **B1**, TTBP, 20 min; (b) **B2**, *p*-TolSCL, TTBP, -78 °C - 0 °C in 45 min;

(1) compound **1** : **3** : **4** = 1.4 : 1.0 : 1.2 (eq.)

compound **1** : **2** : **4** = 1.1 : 1.0 : 1.1 (eq.)

(2) compound **5** : **7** : **8** = 1.1 : 1.0 : 0.7 (eq.)

第二節 KH-1 寡糖合成回顧

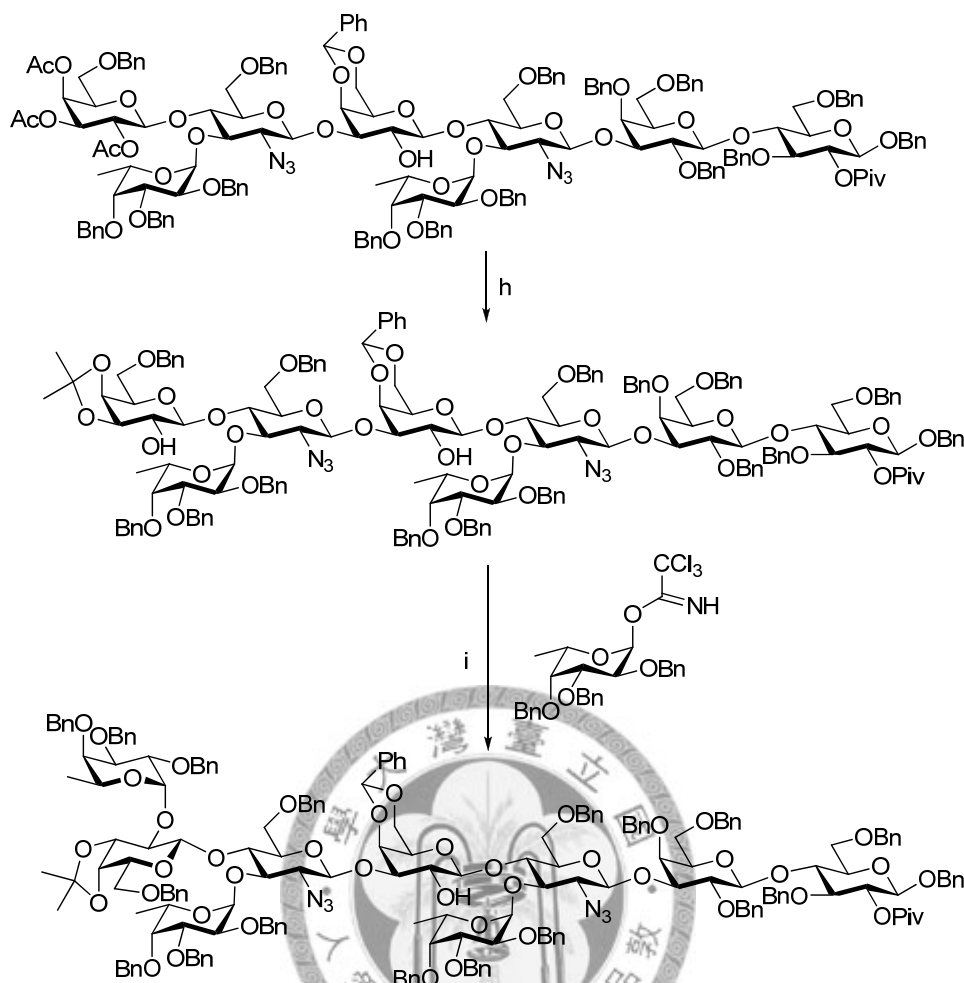
KH-1 寡糖分子的合成，最早是在 1997 年由 Schmidt 與 Danishefsky 的團隊各別發表於 *Tetrahedron Letters* 與 *Nature* 期刊上。

Schmidt 團隊的合成方法是利用他們所研發的 imidates 來合成 KH-1 分子(圖二十七)⁴¹，合成策略與前面敘述過的路易士 X 二聚體一樣，然後再經去保護與選擇性上保護的反應後，裸露出最外面非還原端半乳糖(galactose)上 C₂ 的氫氧基，然後在與岩藻糖(fucose)進行糖化反應得到 KH-1 的九糖分子。

Danishefsky 的團隊則是利用他們開發出來的 glycal 方式，來合成 KH-1 分子。他們有兩種合成途徑，第一種途徑是 1997 年發表在 *Nature* 期刊上的方法(圖二十八)⁴²，先將直鏈的六糖分子建構好後最後再一次接上三個岩藻糖單元(fucose unit)。第二種途徑是在 2005 年發表在 *J. Org. Chem.* 的方法(圖二十九)⁴³，採用的是[4+3]的合成策略，其利用此策略是因為可以另外合成出路易士 Y 四糖與六糖分子，進一步了解抗體對於 KH-1 中抗原結合決定位(epitope)的最小結構。

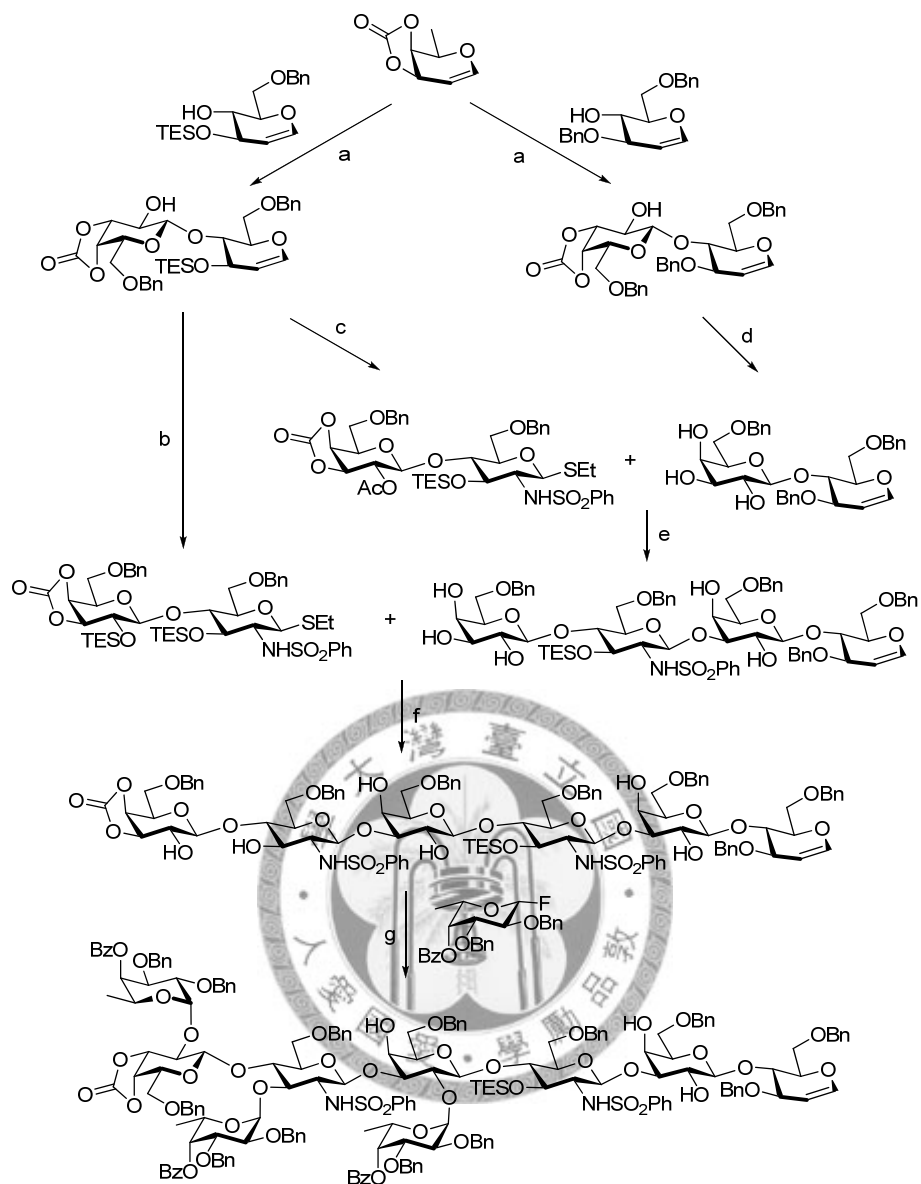
利用固相合成法來合成寡糖的先驅者之一的 Seeberger，在 2004 年也成功利用他們實驗室開發的固相合成策略成功的合成出 KH-1 分子(圖三十)⁴⁴。雖然在合成的過程中需要大量的單元分子(building blocks)和重複性的去保護，但在反應的過程中是由機器控制且只需一天的時間。雖然無法大量化的生產，但就實驗室應用在糖晶片上不同結構的寡糖資料庫所需的量而言是足夠的。

先前的研究發現，可以結合 KH-1 抗原分子的抗體都可以與路易士 Y 結構的四糖分子結合，因此利用目前已有的抗體無法有效的辨別 KH-1 與路易士 Y 分子的差異。為此，Boons 團隊在 2005 年利用 imidates 的方式來合成 KH-1 七糖分子的衍生物(圖三十)⁴⁵，進一步演化抗體的專一性，最後演化出的抗體對於 KH-1 抗原的結合能力為路易士 Y 抗原分子的二十倍。



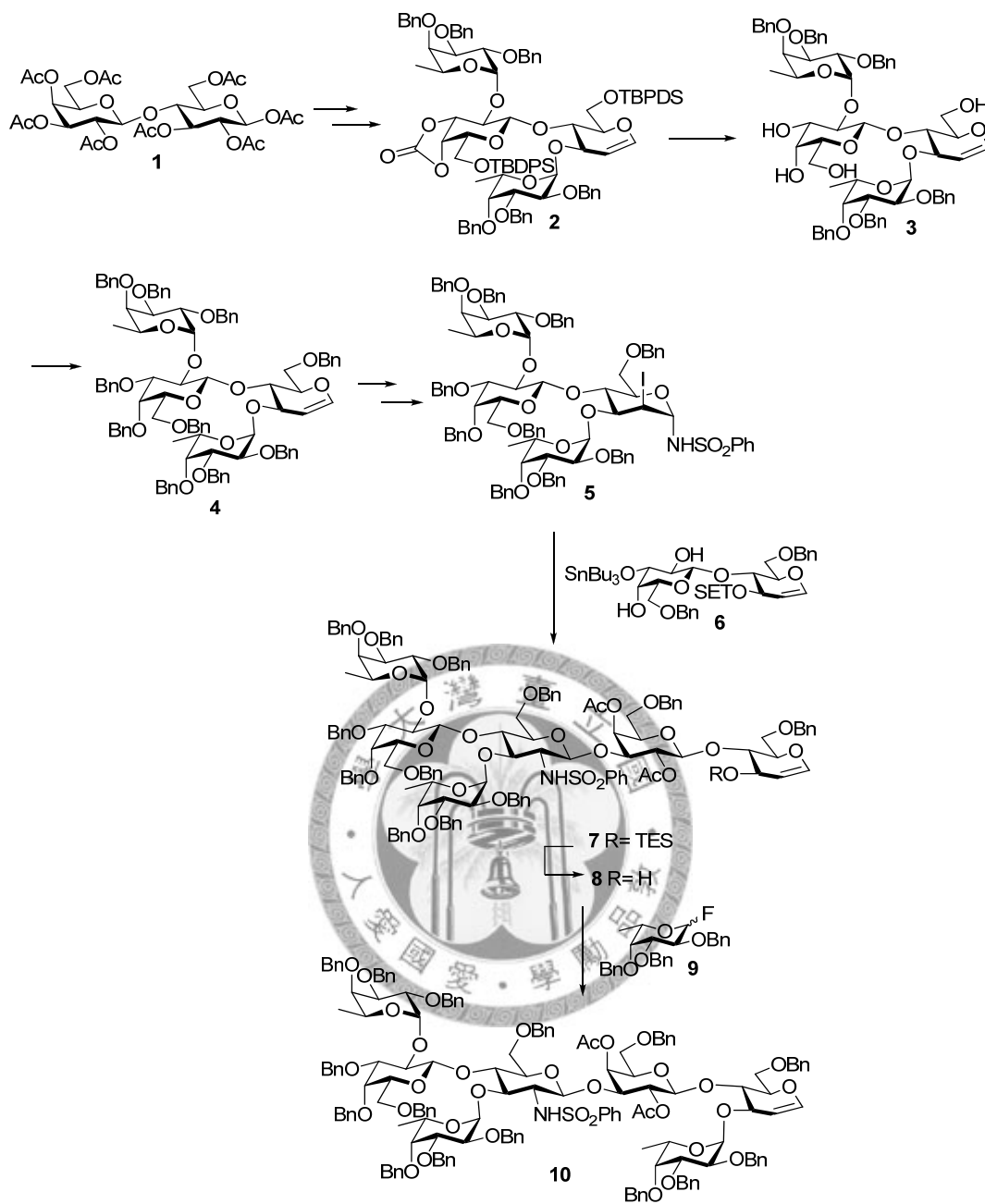
(圖二十七) Schmidt 實驗室合成 KH-1 分子的流程簡圖⁴¹

(h) (i) NaOAc, MeOH (qu) (ii) Acetone, *p*-TsOH (89%) (i) TMSOTf (94%)

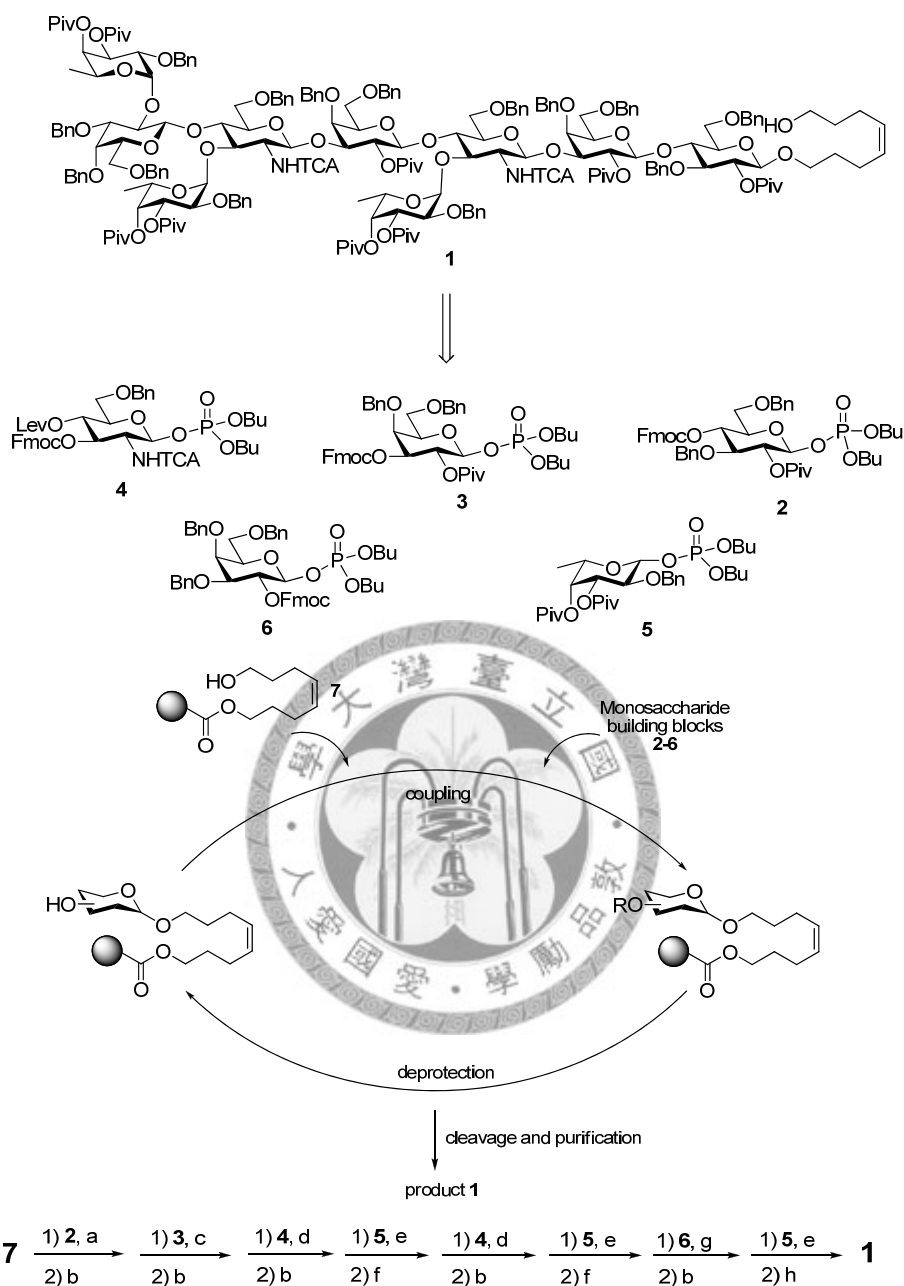


(圖二十八) Danishefsky 實驗室合成 KH-1 分子的流程簡圖 ⁴²

(a) (i) DMDO, CH₂Cl₂, (ii) ZnCl₂, THF (65%); (b) TESOTf, Et₃N, CH₂Cl₂ (92%)
(ii) I(coll)₂ClO₄, PhSO₂NH₂, 4-Å M.S. > 90% (iii) LHMDS, EtSH, DMF > 90%; (c)
Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂ (95%); (ii) I(coll)₂ClO₄, PhSO₂NH₂, 4-Å M.S. > 90%
(iii) LHMDS, EtSH, DMF (iv) Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂ (85%); (d) K₂CO₃,
MeOH (80%); (e) MeOTf, di-*t*-butylpyridine, Et₂O : CH₂Cl₂(2:1), 4-Å M.S. (55%),
(ii) K₂CO₃, MeOH (85%); (f) (i) MeOTf, di-*t*-butylpyridine, Et₂O : CH₂Cl₂(2:1),
4-Å M.S. (60%) (ii) Ac₂O, Py, DMAP, CH₂Cl₂ (95%) (iii) TBAF/AcOH (93%) (g)
Sn(OTf)₂, toluene:THF (10:1), 4-Å M.S. (60%).

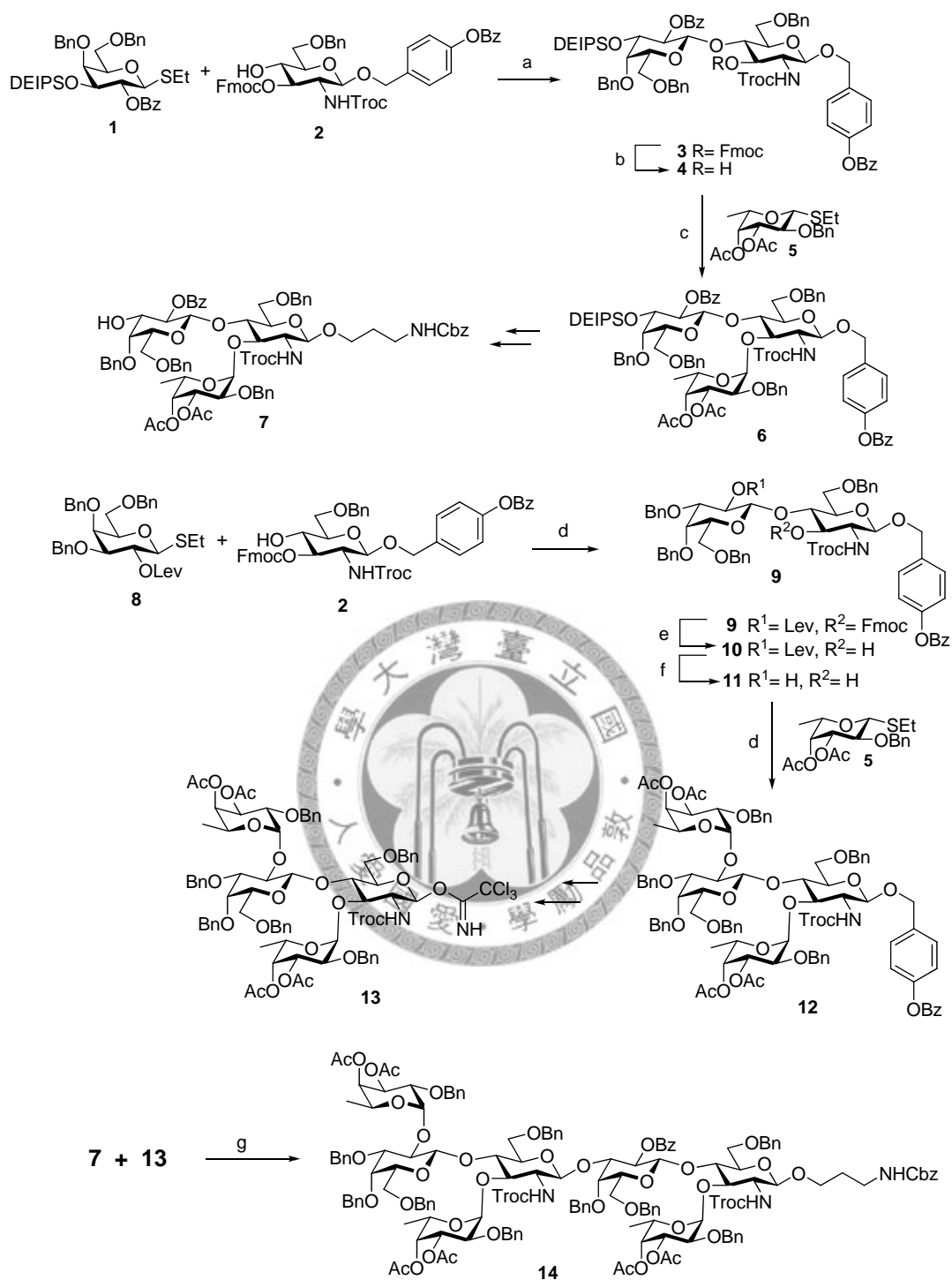


(圖二十九) Danishefsky 實驗室利用[4+3]策略合成 KH-1 分子的流程簡圖⁴³



(圖三十) Seeberger 實驗室利用固相合成 KH-1 分子的流程簡圖⁴⁴

(a) **2**. (5.0eq.), TMSOTf (5.0eq.), repeated 2 times for 15 min each; (b) 20% piperidine in DMF (2.2 mL), repeated 3 times for 10 min each; (c) **3**. (5.0eq.), TMSOTf (5.0eq.), repeated 3 times for 15 min each; (d) **4**. (3.5 eq.), TMSOTf (3.5eq.), repeated 3 times for 15 min each; (e) **5**. (5.0eq.), TMSOTf (5.0eq.), repeated 2 times for 15 min each; (f) 10% N₂H₄ in DMF (2.5 mL), repeated 5 times for 15 min each; (g) **6**. (5.0eq.), TMSOTf (5.0eq.), repeated 2 times for 15 min each; (h) NaOMe (10 eq.) in MeOH/CH₂Cl₂, repeated 4 times for 90 min each.



(圖三十一) Boons 實驗室合成 KH-1 分子的流程簡圖⁴⁵

- (a) *p*-benzoyl-benzyl alcohol, NIS, TESOTf, CH₂Cl₂, 0 °C (86%);
 (b) CH₂Cl₂/Et₃N (5:1) (95%); (c) NIS, TESOTf, CH₂Cl₂, 0 °C (74%); (d) NIS, TESOTf, CH₂Cl₂, 0 °C;
 (e) CH₂Cl₂/Et₃N (5:1) (95%); (f) N₂H₄-AcOH, MeOH, CH₂Cl₂ (87%); (g) NIS, TBSOTf, CH₂Cl₂, -30 °C (60%)

第三章 結果與討論

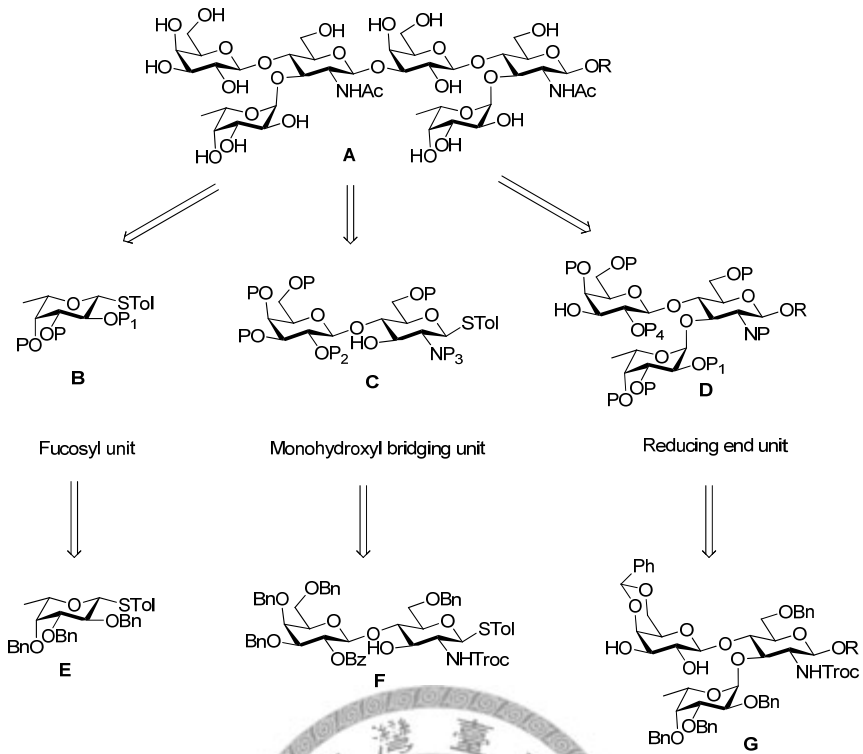
第一節 路易士 X 二聚體與 KH-1 之逆合成分析

本篇論文的目標為利用一鍋化合成法的策略來合成路易士 X 二聚體的六糖分子與 KH-1 的七糖分子，接下來先對此兩目標分子進行逆合成分析。

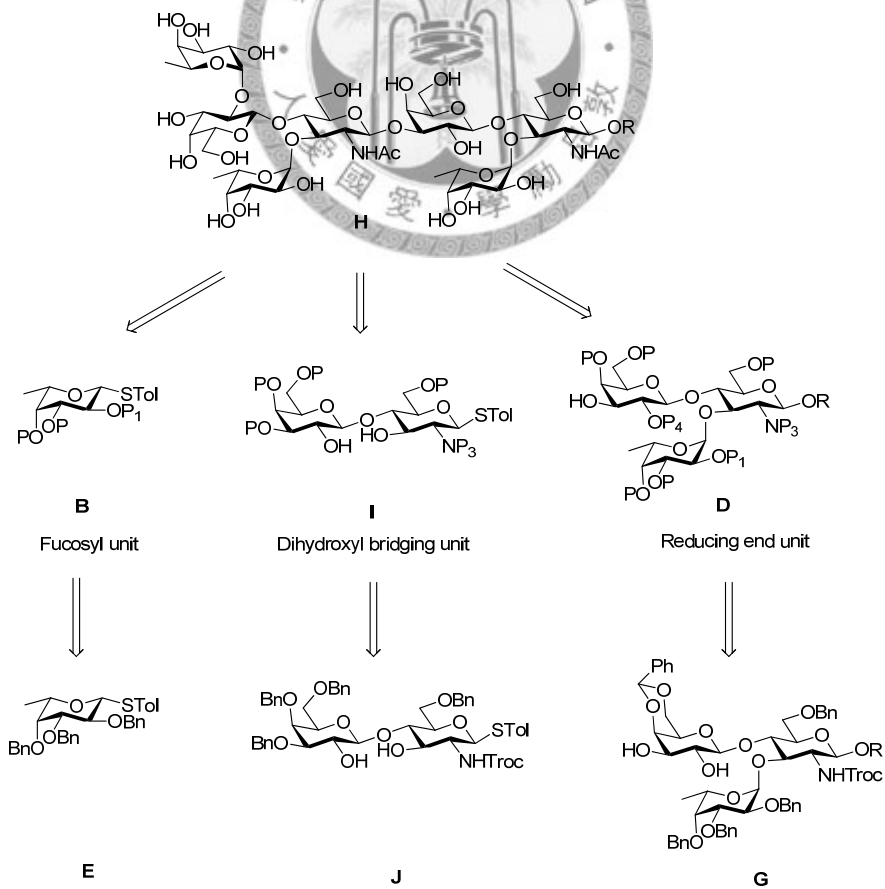
路易士 X 二聚體的六糖分子(圖三十二 A)，可分解成三個單元分子—岩藻糖單元(fucose unit) (B)、N-醯胺乳糖單元(N-lactosamine unit) (C)與還原端的三糖單元(reducing unit) (D)，利用此三個單元分子的反應活性差異，來進行一鍋化合成法，且還原端的三糖單元亦可由一鍋化合成法獲得。

在結構上 KH-1 與路易士 X 二聚體(圖三十三 H 與圖三十二 A)差別在於 KH-1 的非還原端上的半乳糖(galactose)C₂上的氫氧基比路易士 X 二聚體多一個 $\alpha,1\rightarrow2$ 鍵結的岩藻糖(fucose)，因此只要將 N-醯胺乳糖單元(C)修改成(I)則可以利用相同的合成方式合成出 KH-1 的七糖分子。

在生成糖苷鍵(glycosidic bond)立體位向(configuration)上的控制， α 位向是利用動力向差異構物效應(kinetic anomeric effect)來控制， β 位向則是利用鄰基參與效應(neighboring group participation effect)。因此，在岩藻糖上 C₂的氫氧基利用醚類的保護基，其他的糖類上 C₂的氫氧基或氨基個別利用酯類(ester)或胺酯(carbamate)的保護基來進行保護。在一些糖上不進行糖化反應的氫氧基，則利用長久性的保護基 [在此是利用苄基醚(benzyl ether)與縮醛(acetal)]，其他在不同反應階段會進行反應的氫氧基則選擇暫時性的保護基 [在此利用苯甲酯(benzoyl-)與 γ -酮戊酯(levulinoyl-)]，利用不同的去保護條件可以選擇性裸露出將進行糖化反應的氫氧基。最後，將進行一鍋化的合成單元則可設計成(E) (F) (G)與(J)。

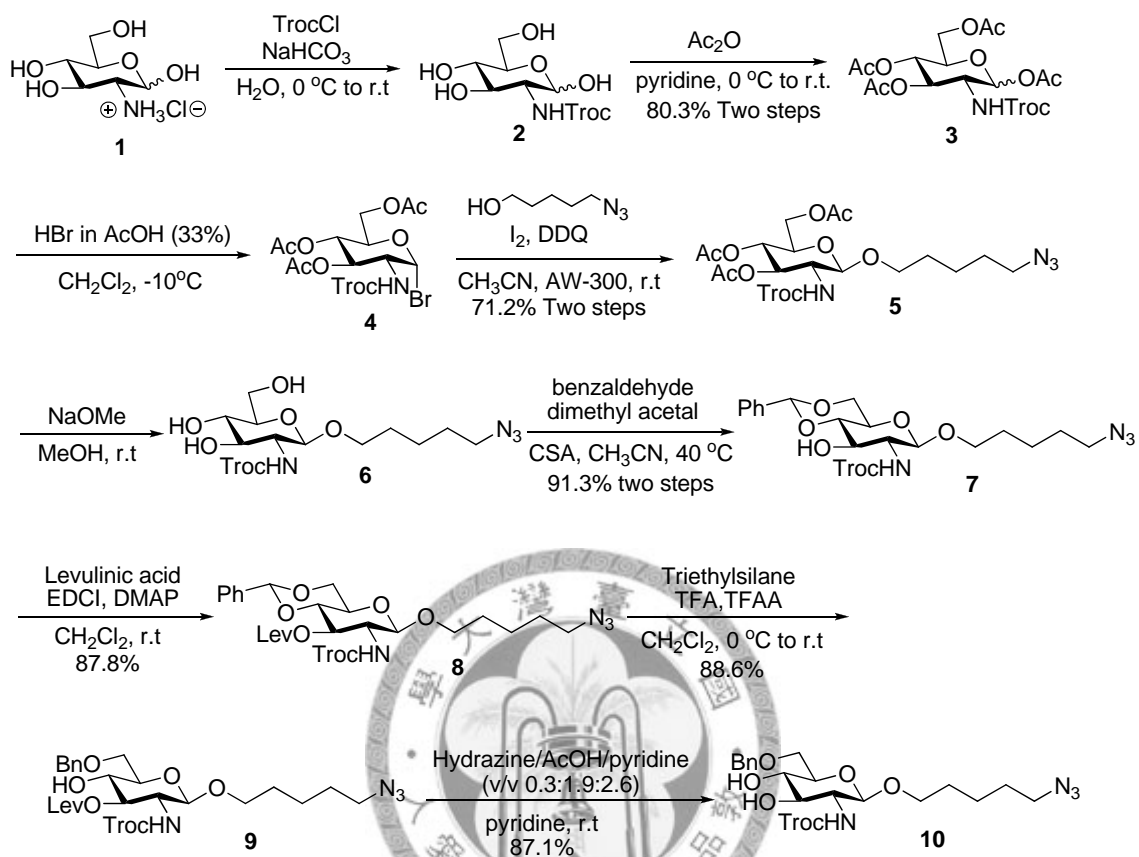


(圖三十二) 路易士 X 二聚體的逆合成分析



(圖三十三) KH-1 的逆合成分析

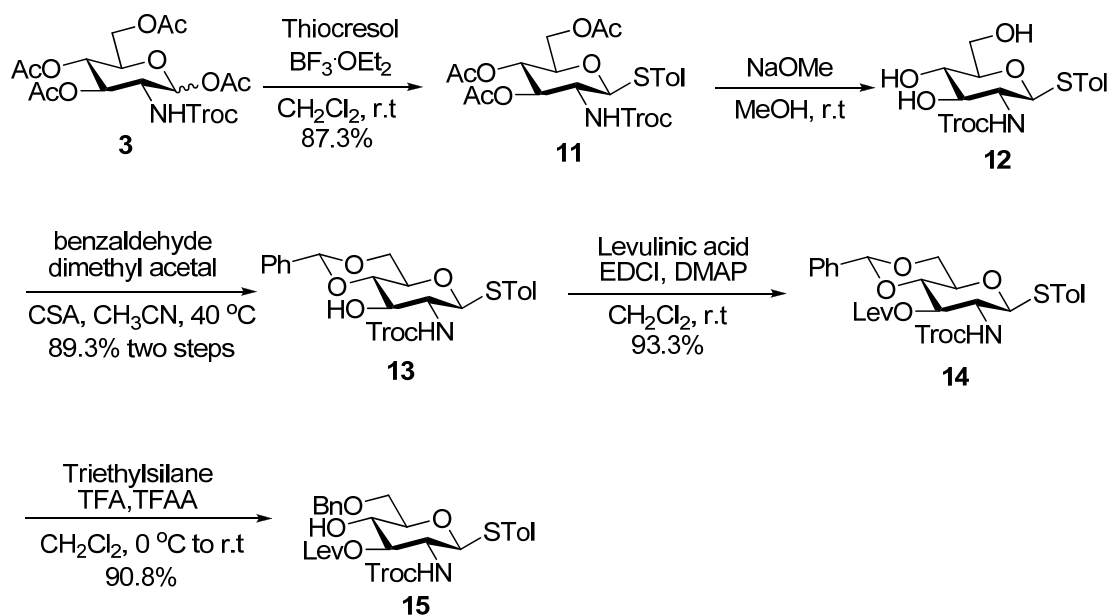
第二節 路易士 X 二聚體與 KH-1 之合成流程



(流程一) 葡萄糖醯胺單元分子的合成流程

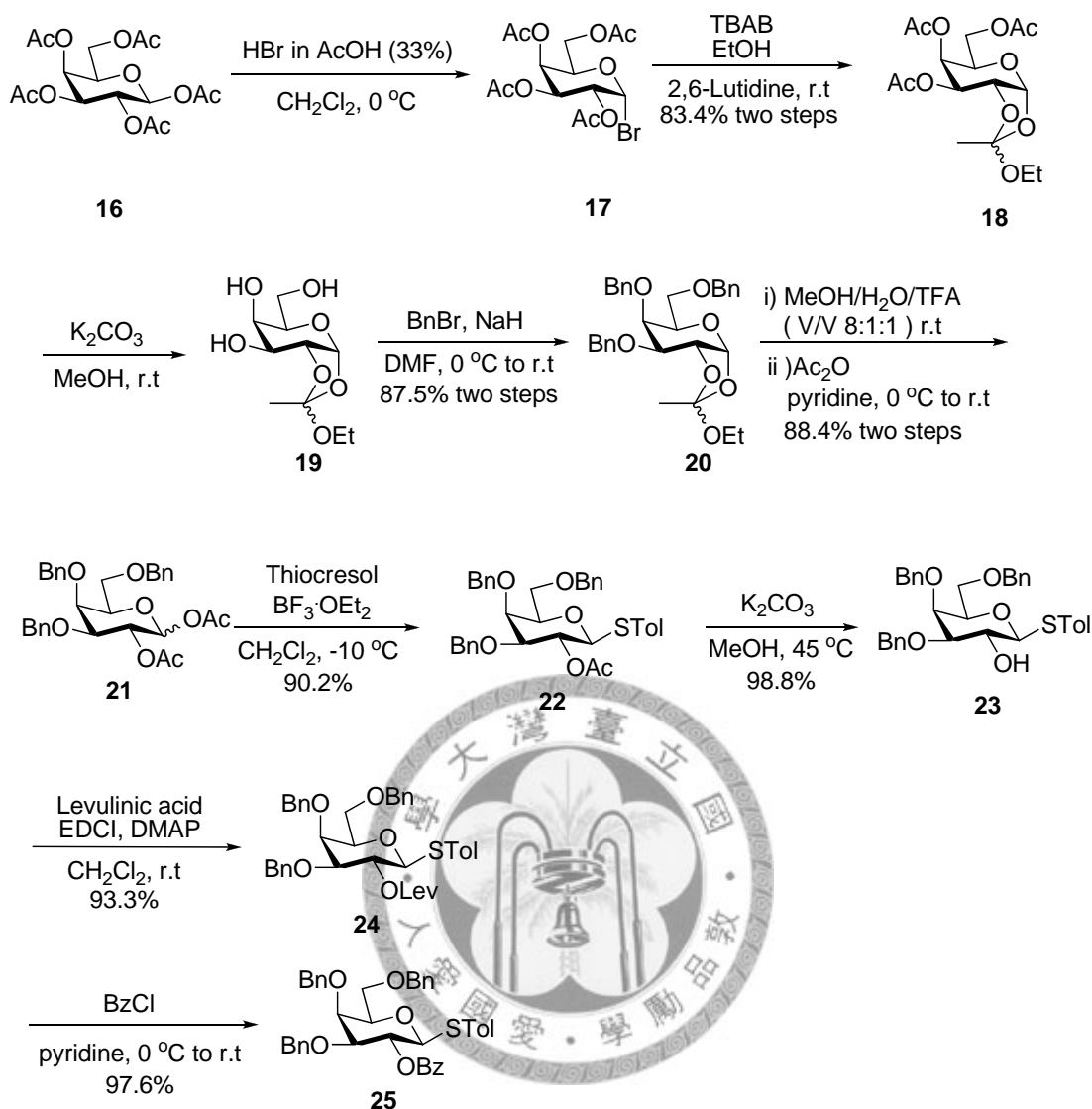
首先，以葡萄糖胺鹽酸鹽類(glucosamine hydroxchloride) **1** 作為反應的起始物，經碳酸氫鈉水溶液進行中和反應，然後在冰浴下加入氯甲酸-2,2,2-酸氯乙酯(2,2,2- trichloroethoxycarbonyl chloride) 劇烈攪拌反應後會有白色固體析出，將析出的白色固體過濾後用冰水將鹽類洗去，然後將白色固體抽乾得到化合物 **2**⁴⁶。化合物 **3**⁴⁶ 可由化合物 **2** 在吡啶(pyridine)作為溶劑下與醋酸酐(acetyl anhydride)進行乙醯化反應得到。化合物 **3** 在-10 °C 下與氫溴酸(hydrobromic acid)進行溴化，反應得到白色固體的化合物 **4**⁴⁶。接下來化合物 **4** 與 1-疊氮正戊醇(1-azido-pentanol)進行醯化反應，依標準步驟⁴⁷ 是將活化過的分子篩與化合物 **4** 和 1-疊氮正戊醇溶於乙腈(acetonitrile)中，先在室溫下攪拌 1 小時進行除水。不過發現化合物 **4** 在除水的過程中會分解掉，因此稍作步驟的

修改，將分子篩與 1-疊氮正戊醇溶於乙腈中除水，然後將經高真空抽乾的化合物 4 溶於無水乙腈中打入分子篩與 1-疊氮正戊醇的反應瓶中，立即加入碘 (iodine) 與二氯二氰基苯醌 (2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone, DDQ) 在室溫下進行醣化反應。很幸運的，在此方式下只得到醣苷鍵結為 β 位向的化合物 5 ($J_{1,2} = 8.04$ Hz) 產率為 71%。將化合物 5，在無水甲醇中經催化量的甲醇鈉 (sodium methoxide) 經醇解後可得到化合物 6。接著在酸性條件下，化合物 6 與二甲基苯縮醛 (benzaldehyde dimethyl acetal) 反應，以縮醛的形式選擇性保護 C₄ 與 C₆ 上的氫氧基，得到化合物 7。化合物 7 上裸露出的氫氧基，在 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亞胺鹽酸鹽 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDCI) 作為脫水劑與等當量的 2-二甲基氨基吡 (N,N-dimethylamino pyridine) 催化下和 γ -酮戊酸 (levulinic acid) 進行酯化反應，得到化合物 8。首先利用氰基硼氫化鈉 (Sodium cyanoborohydride) 在酸性條件下進行選擇性還原開環反應，不幸的，此還原劑會將 γ -酮戊酸上的酮基還原成醇基，然後進行分子內環化形成內酯 (lactone) 的形式離去，而無法獲得預期產物化合物 9。經過多種不同還原劑的測試，最後我們利用三乙基矽烷 (triethylsilane) 在酸性條件下可以成功還原縮醛進行選擇性開環反應而不會將酮基還原，因此順利得到化合物 9。化合物 9 在聯氨 (hydrazine) 的作用下選擇性將 γ -酮戊酯 (levulinoyl-) 去保護，得到還原端的化合物 10 - 葡萄糖醯胺單元分子。(流程一)



(流程二) 葡萄糖醯胺單元分子的合成流程⁴⁸

在製備葡萄糖醯胺單元分子的授予體化合物 **15**，利用上述的化合物 **3** 作為起始物，在路易斯酸—三氟化硼乙醚 (Boron trifluoride ethylether complex) 作用下與對-甲基苯硫酚(thiocresol)反應得到硫苷糖(thioglycoside)，經再結晶後得到 β 鍵結形式的化合物 **11**。化合物 **11** 經醇解反應、縮醛形式的選擇性保護 C_4 與 C_6 上的氫氧基，然後將 C_3 上的氫氧基進行酯化保護，得到化合物 **14**。化合物 **14**，在酸性條件下用三乙基矽烷(triethylsilane)做選擇性還原反應，得到 C_4 裸露型態的氫氧基與 C_6 上的氫氧基以苄基醚(benzyl ether)的形式保護的化合物 **15**。(流程二)

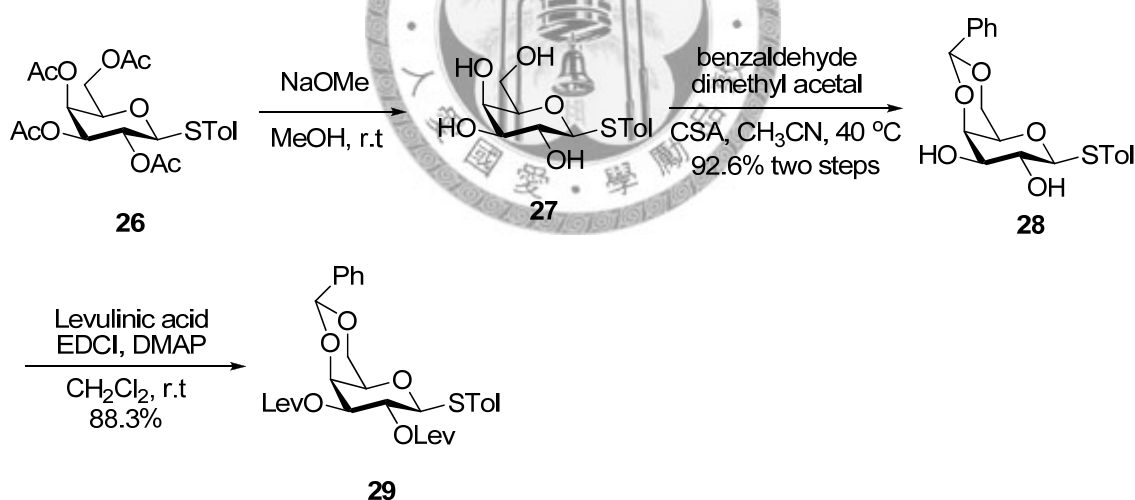


(流程三) 半乳糖單元分子合成流程^{12, 49}

以 β -全乙醯化半乳糖(β -D-galactose pentaacetate)化合物 **16** 作為起始物，在 0°C 下與氫溴酸(hydrobromic acid)進行溴化反應得到白色固體的化合物 **17**。接下來，將化合物 **17** 溶於 2,6-二甲基吡啶(2,6-lutidine)中加入無水乙醇與四級銨鹽在室溫下反應，得到原酸酯(orthoester)化合物 **18**。化合物 **18** 在碳酸鉀與甲醇中進行醇解反應，得到 C1 與 C2 以原酸酯(orthoester)型態保護起來的半乳糖(galactose)化合物 **19**，無須純化，接著以氫化鈉(sodium hydride)與化合物 **19** 之氫氧基上的質子(proton)進行酸鹼中和後加入溴化苄(benzyl bromide)進行 Williamson 醚合成反應，得到化合物 **20**。

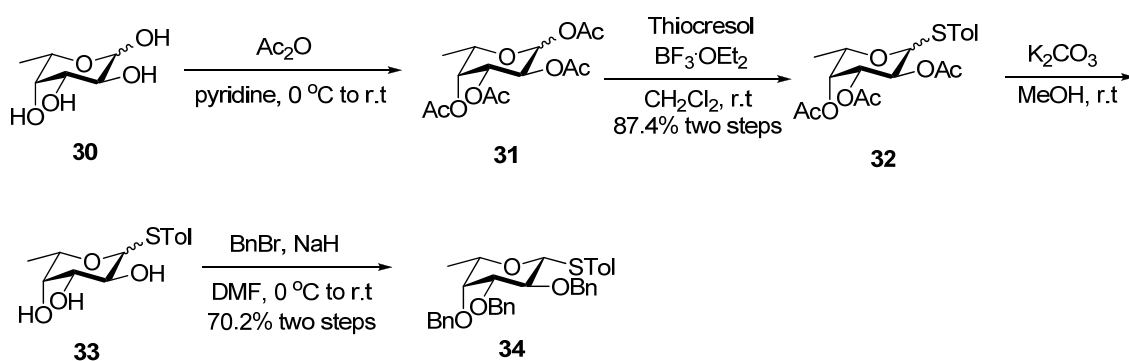
化合物 **20** 在強酸水溶液的條件下，將原酸酯(orthoester)型態的保護基去保護後，再與醋酸酐(acetyl anhydride)進行乙醯化反應得到化合物 **21**。接著將化合物 **21** 在路易斯酸－三氟化硼乙醚 (Boron trifluoride ethylether complex)－作用下與對-甲基苯硫酚(thiocresol)反應得到硫苷糖(thioglycoside)化合物 **22**，在此步驟的反應溫度控制很重要！一開始在 0 °C 的條件下作此反應，經 TLC 片追蹤反應時發現會產生許多副產物，後來利用丙酮(acetone)與冰塊將反應溫度降到 -10 °C 後再慢慢將三氟化硼乙醚(BE₃ · OEt₂)滴入後，經 TLC 片追蹤反應，可獲得極佳的反應效果，順利得到硫苷糖(thioglycoside)化合物 **22**。化合物 **22**，在碳酸鉀(Potassium carbonate)與甲醇下加熱至 45 °C 進行醇解反應，得到 C₂ 為裸露的氫氧基化合物 **23**。最後，化合物 **23** 分別與 γ -酮戊酸(levulinic acid) 和 苯甲酰氯(benzoyl chloride) 進行酯化反應，得到化合物 **24** 與化合物 **25**。

(流程三)



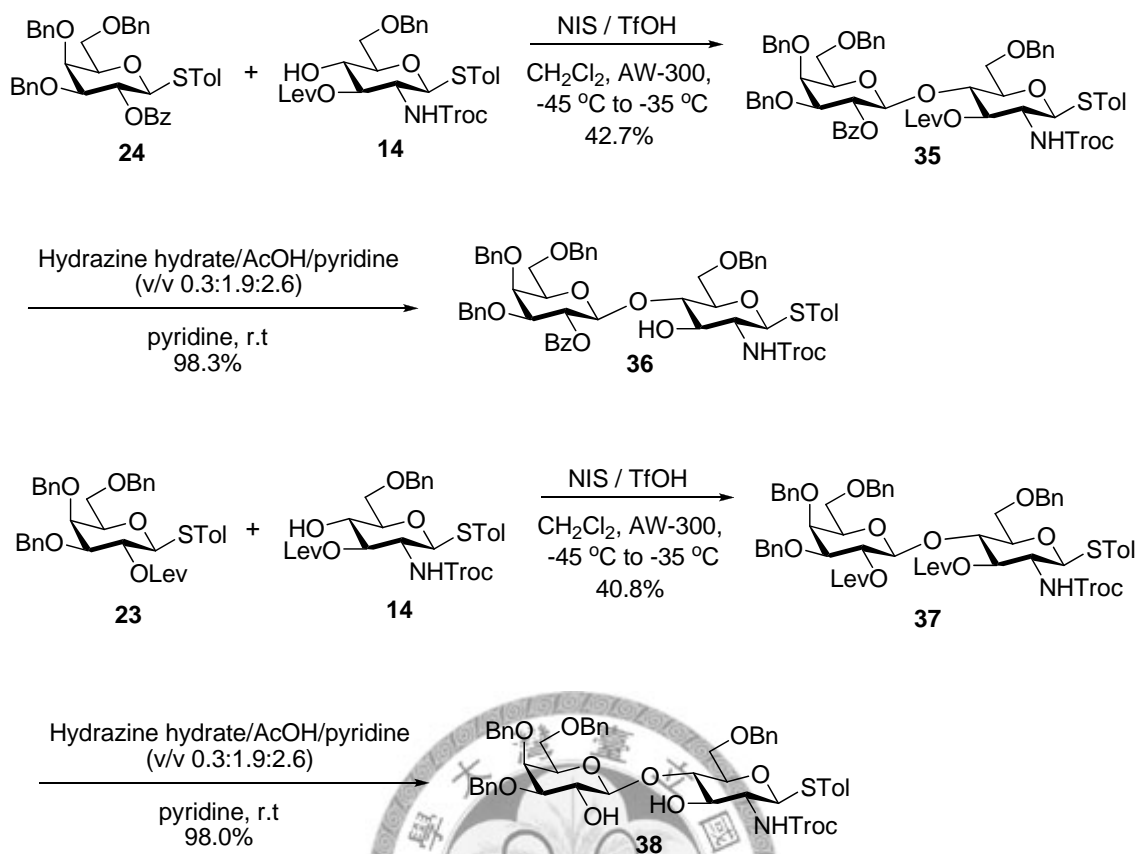
(流程四) 半乳糖單元分子合成流程⁴⁰

以全乙醯化的硫苷半乳糖化合物 **26**，經醇解後得到化合物 **27**，在酸性條件下與二甲基苯縮醛(benzaldehyde dimethyl acetal)反應，選擇性保護 C₄ 與 C₆ 上的氫氧基，得到化合物 **28**。最後，將 C₂ 與 C₃ 的氫氧基用 γ -酮戊酸(levulinic acid) 進行酯化反應保護起來，得到化合物 **29**。(流程四)



(流程五) 岩藻糖單元分子的合成流程¹²

以 L-岩藻糖(L-fucose)化合物 **30** 做為起始物，進行乙醯化反應得到化合物 **31**，然後在氟化硼乙醚($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$)作用下與對-甲基苯硫酚(thiocresol)反應得到 α 、 β -非對映體(diastereomer)的硫苷糖(thioglycoside)化合物 **32**。利用碳酸鉀與甲醇將化合物 **32** 進行醇解反應，得到化合物 **33**，再與溴化苄(benzyl bromide)進行醚化反應，最後經管柱層析純化後得到 β 形式的硫苷糖(β -thioglycoside)化合物 **34**。(流程五)



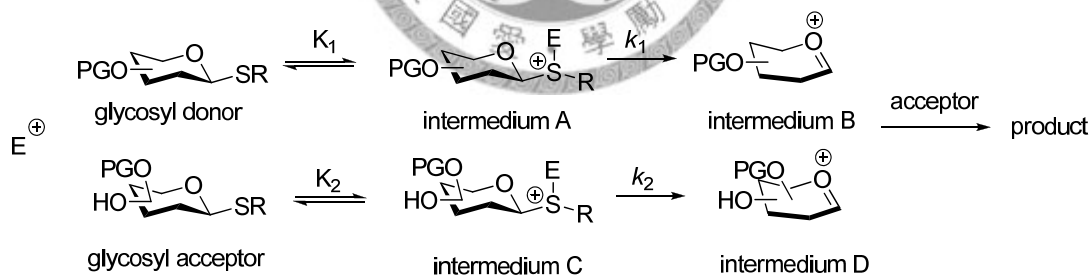
(流程六) N-醯胺乳糖單元(N-lactosamine unit)的合成流程

參考之前由 蒙國光與 翁啟惠教授，在 2002 年發表一鍋化合成路易士 Y 抗原分子的文獻中合成化合物 **37**⁴⁸與 **38**⁴⁸ 方法與條件，套用在之前製備好的化合物 **24** 與化合物 **14**，在 N-碘代琥珀酰亞胺(N-iodosuccinimide, NIS)與三氟甲磺酸(triflic acid, TfOH)的活化條件下進行糖化反應，得到化合物 **35**，經選擇性將 γ -酮戊酯去保護後得到化合物 **36** (流程六)。

不過糖化反應後得到的產率大概在 40%左右，與文獻上的產率相符。反應過程中利用 TLC 片追蹤此反應發現到糖授予體(glycosyl donor)與糖受體(glycosyl acceptor)兩者皆未反應完，因此也嘗試增加糖授予體(glycosyl donor)與 N-碘代琥珀酰亞胺(NIS)的當量數，得到的結果是增加 1 當量的糖授予體只提高約 1~2%的產率，而提高活化劑的當量數與溫度則發現產物會分解掉。

原因可能是化合物 **35** 與 **37** 的活性比化合物 **14**、**23** 與 **24** 還要高，本研究雖未去測量化合物 **35** 與 **37** 的相對反應活性值(RRV)，但據文獻報導化合物 **38** 的相對活性值比化合物 **14** 與 **23** 高出 43 倍。

於此反應中我們以在 TLC 片追蹤此反應的進行，發現到醣授予體(glycosyl donor)與醣受體(glycosyl acceptor)兩者之一都沒有反應完，然而增加活化劑的當量數會導致產率的降低，為此我們的解釋為 (圖三十四)¹²：因為活化劑的當量數只利用 1.1 當量，醣授予體(glycosyl donor)化合物 **23** 的活性比醣受體(glycosyl acceptor)化合物 **14** 高出 14 倍⁴⁸，因此在競爭活性劑上化合物 **23** 的反應速率比較快。但真正的反應速率決定步驟是鎢陽離子(sulonium cation)變成鎘陽離子(oxocarbenium cation)的不可逆反應，然後與醣受體反應後產生產物。因為活化劑與醣授予體等當量，因此活化完醣授予體後沒有多餘的活化劑去活化產物，這也是為什麼當增加活化劑會造成產率降低甚至於產物整個分解掉的可能原因。



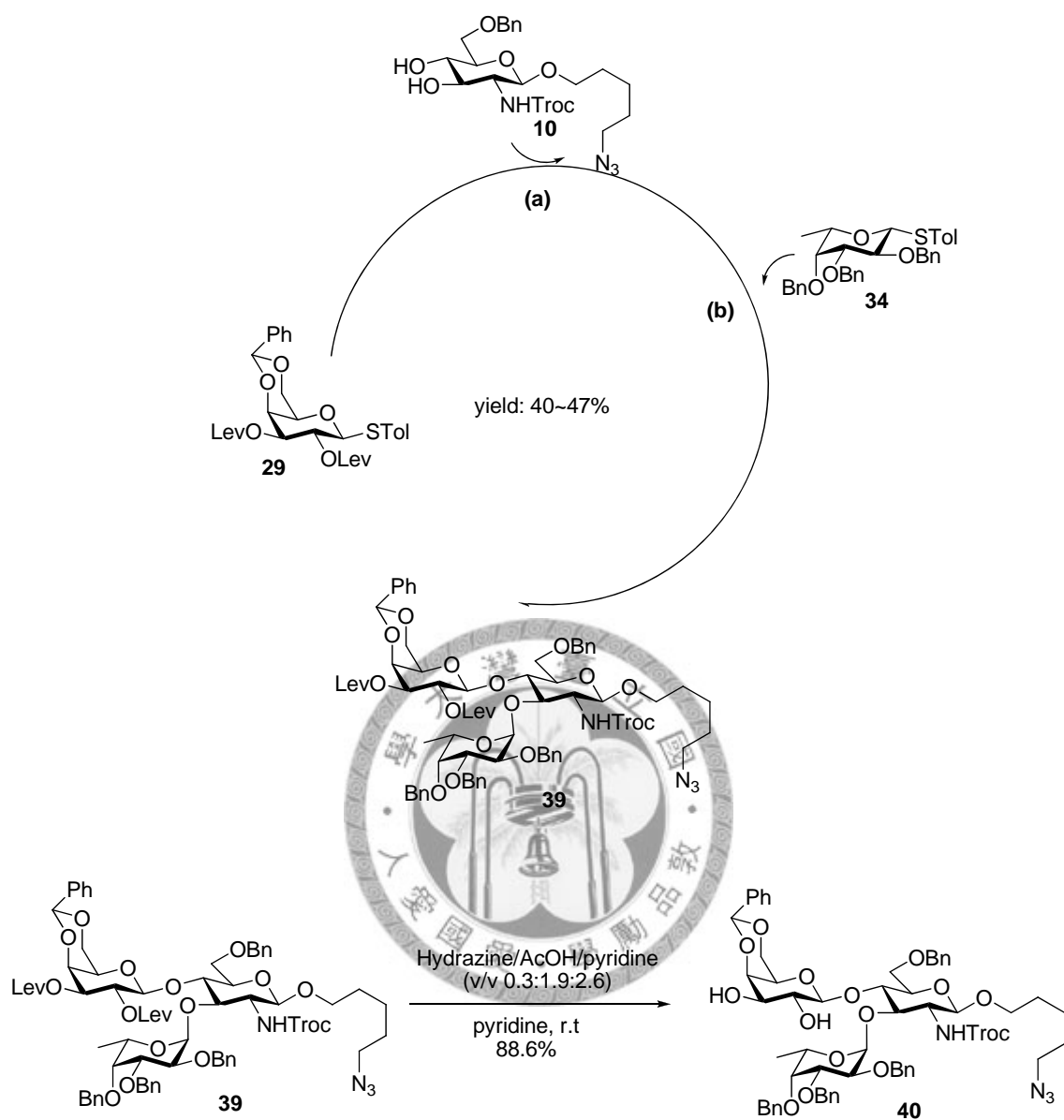
(圖三十四) 競爭反應圖

合成還原端的三糖分子化合物 **39**，是採用一鍋化(one-pot)與特位選擇性(regioselective)的策略來合成(流程七)。

首先，以先前製備好的 C₃、C₄ 為裸露氫氧基的化合物 **10** 做為糖受體(glycosyl acceptor)與糖授予體(glycosyl donor)化合物 **29** 和經活化的分子篩混合溶在反應瓶中攪拌除水，然後降溫至 -40 °C 後加入活化劑 N-碘代琥珀酰亞胺(N-iodosuccinimide, NIS) 與三氟甲磺酸 (triflic acid, TfOH) 作第一次糖化反應，經由 TLC 片追蹤反應的進行，當化合物 **29** 反應完後降溫至 -50 °C，加入岩藻糖授予體(fucosyl donor)，再加入活化劑 N-碘代琥珀酰亞胺(N-iodosuccinimide, NIS)與三氟甲磺酸(triflic acid, TfOH)進行第二次糖化反應，同樣以 TLC 片追蹤反應，反應結束後經管柱層析純化後得到化合物 **39**。

在進行第一次糖化反應的過程中，化合物 **29** 活化後可與化合物 **10** 上的 C₃ 與 C₄ 上的氫氧基進行糖化反應，經最後管柱層析純化後得到 β-1→4-鍵結或 β-1→3-鍵結的比例為 10 比 1。再進行第二次糖化反應時，由於雙糖受體(glycosyl acceptor)上 C₃ 與 C₄ 上的氫氧基立體障礙有所不同，所以岩藻糖授予體(fucosyl donor)只會接在雙糖上葡萄糖胺(N-protected glucosamine)部分上 C₃ 的氫氧基而不會接在 C₄ 的氫氧基，如此可以輕易的分離出預期的三糖產物 **39**。

最後，化合物 **39** 經核磁共振光譜(NMR)分析結果，得到 β 形式的半乳糖-(1→4)-葡萄糖胺鍵結(galactose-β-1, 4-glucosamine linkage)($J_{\text{gal } 1,2} = 8.22 \text{ Hz}$)；α 形式的岩藻糖-(1→3)-葡萄糖胺鍵結(fucose-α-1, 3-glucosamine linkage)($J_{\text{fuc } 1,2} = 2.88 \text{ Hz}$)。接著化合物 **39**，經選擇性將 γ-酮戊酯去保護後得到未來著手進行一鍋化合成路易士 X 二聚體與 KH-1 分子的還原端的化合物 **40**。



(流程七) 一鍋化合成路易士 X 單體

- (a) **10** (1.0eq), **29** (1.4eq), NIS(1.6eq) / TfOH (0.16eq), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -40 °C
 (b) **34** (1.2eq), NIS(1.2eq) / TfOH (0.12eq) , -50 °C

取得製備好的岩藻糖單元(fucose unit)化合物 **34**、N-醯胺乳糖單元(N-lactosamine unit)化合物 **36** 及 **38** 與還原端的三糖分子化合物 **40** 後，就可以開始進行一鍋化合成路易士 X 二聚體與 KH-1 反應(流程八與九)。在進行路易士 X 二聚體和 KH-1 一鍋化合成反應，我們採用的是[1+2+3]與[1×(2)+2+3]的策略來建構出六糖與七糖分子。

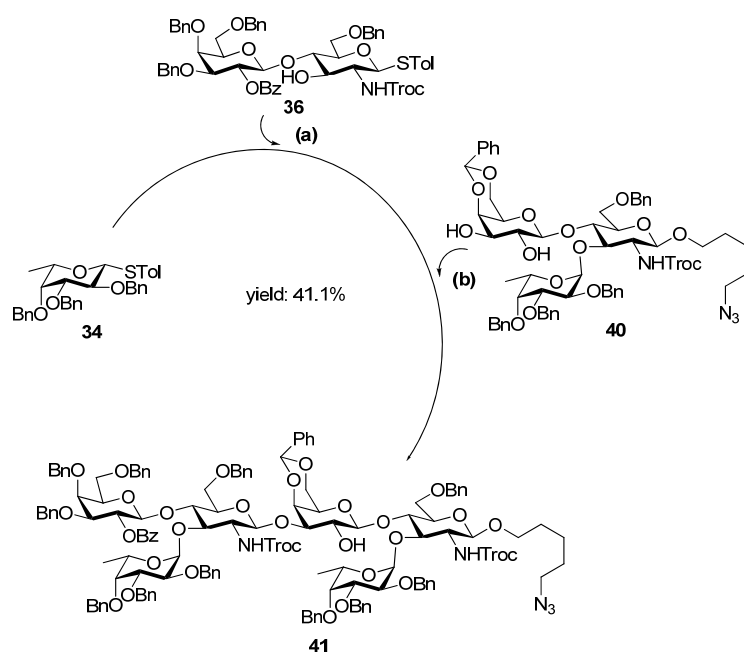
根據先前文獻的條件，在-78 °C 下進行化合物 **38** 與化合物 **34** 的糖化反應，不幸地，得到的大多都是岩藻糖單元(fucose unit)與活化劑 N-碘代琥珀酰亞胺(NIS)反應的副產物。若將溫度稍為提升後，預期所要的產物開始出現，不過其立體位向選擇性(stereoselective)不佳，產物雖然可以利用乙酸乙酯、正己烷與甲苯混合的沖提液經管柱層析純化後分離，然此對於後面進行一鍋化合成法後純化上會是很大的問題。不過，幸運的是當反應溫度提升到-45°C 時，兩個岩藻糖的立體位向都為 α 形式的鍵結，且沒有岩藻糖單元(fucose unit)與活化劑反應的副產物出現。另外，將此條件套用在化合物 **36** 與化合物 **34** 進行糖化反應時，由於此關鍵步驟的突破，將有利於接下來一鍋化合成策略的進行。但這項結果也與先前文獻上的論述不同—在低溫下可以減少岩藻糖單元與活化劑反應產生的副產物和立體位向上有較佳的選擇性。

找出適合的反應溫度條件後，我們開始著手一鍋化合成路易士 X 二聚體與 KH-1 分子的合成。一開始將岩藻糖單元(fucose unit)化合物 **34** 分別與 N-醯胺乳糖單元(N-lactosamine unit)化合物進行第一次糖化反應，經由 TLC 片追蹤現化合物 **34** 都活化反應後，加入還原端的三糖分子化合物 **40** 和活化劑 N-碘代琥珀酰亞胺(NIS)與三氟甲磺酸 (triflic acid, TfOH)，然後升溫至-25°C 進行第二次糖化反應，經 TLC 片追蹤反應，當化合物 **40** 反應完後結束反應，進一步進行管柱層析分離，各別得到路易士 X 二聚體六糖分子與 KH-1 七糖分子。

值得注意的是，在第二次醱化反應的過程中再度使用到特位選擇性(regio-selective)的反應！在還原端三醱分子化合物 **40** 的半乳糖(galactose)部分，由於 C₂ 的氫氧基在立體障礙上比 C₃ 的氫氧基大，因此進行醱化反應時會先選擇與立體障礙小的氫氧基進行醱苷鍵(glycosidic bond)生成反應，配合醱授予體(glycosyl donor)上 C₂ 的胺酯(carbamate)保護基經由鄰基參與效應(neighboring group participation effect)，最後順利得到 β -1,3-鍵結的產物分子。

利用一鍋化進行寡糖的合成，除了可以減少合成過程中保護基的操作次數且在純化的過程也達最少化，大大縮減整體所需的時間。在本次的研究，除了一鍋化合成法並搭配兩次的特位選擇性(regioselective)醱化反應更進一步精簡了保護基方面的操作次數。從利用一鍋化製備還原端三醱分子化合物 **40** 到進行第二次的一鍋化合成路易士 X 二聚體與 KH-1 分子，整個過程產率約 15~17%，成功得到所要的產物。至於，在建構 N-醱胺乳糖單元(N-lactosamine unit)化合物 **35** 和 **37** 的產率只有 40%左右。但化合物 **24** 與 **23** 和化合物 **9** 進行醱化反應得到 N-醱胺乳糖(N-lactosamine unit)單元的產率卻有 70%以上，因此如果將半乳糖單元分子(galactose building block)改成其他形式的離去基，進行正交性(orthogonal)醱化反應，或許有機會克服在合成 N-醱胺乳糖單元分子(N-lactosamine unit)化合物 **35** 和 **37** 產率不高的問題！

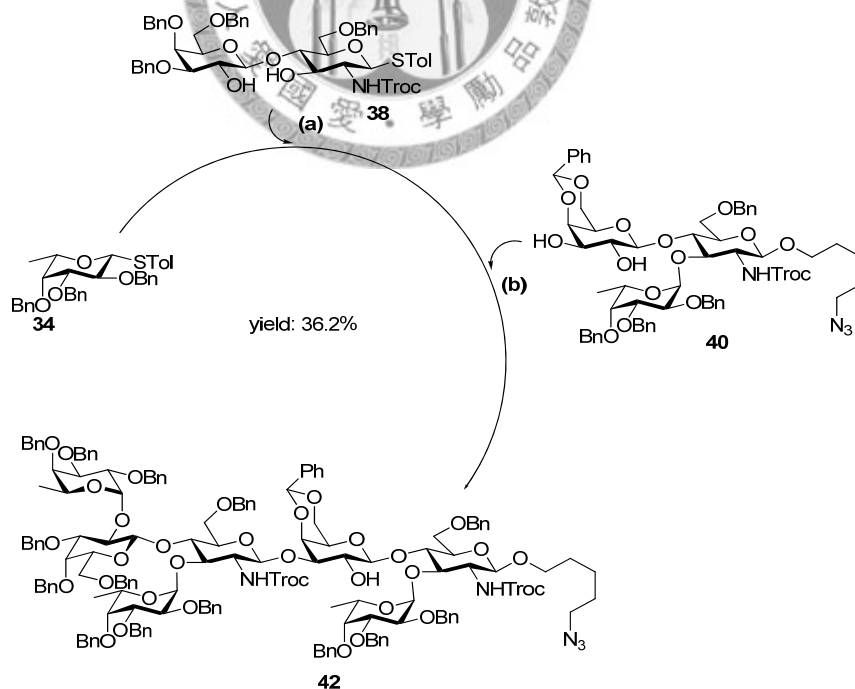
未來，將利用一鍋化合成法合成出來的路易士 X 二聚體、KH-1 和路易士 X 單體將保護基去除後，可以與其他合成出來的的腫瘤相關的醱抗原分子一起建立一套用來偵測癌症的醱晶片。



(流程八) 一鍋化合成路易士 X 二聚體

(a) **36** (1.0eq), **34** (1.1eq), NIS(1.1eq) / TfOH (0.11eq), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -45 °C

(b) **40** (0.8eq), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -25 °C



(流程九) 一鍋化合成 KH-1

(a) **38** (1.0eq), **34** (2.2eq), NIS(2.2eq) / TfOH (0.22eq), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -45 °C

(b) **40** (0.6eq), CH₂Cl₂, 4-Å M.S., -25 °C

參考資料

1. Dwek, R. A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683.
2. Crick, F. *Nature* **1970**, *227*, 561.
3. Rudd, P. M.; Elliott, T.; Cresswell, P.; Wilson, I. A.; Dwek, R. A. *Science* **2001**, *291*, 2370.
4. Comstock, L. E.; Kasper, D. L. *Cell* **2006**, *126*, 847.
5. Branza-Nichita, N.; Petrescu, A. J.; Negroiu, G.; Dwek, R. A.; Petrescu, S. M. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4697.
6. Bertozzi, C. R.; Dube, D. H. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2005**, *4*, 477.
7. Lau, K. S.; Partridge, E. A.; Grigorian, A.; Silvescu, C. I.; Reinhold, V. N.; Demetriou, M.; Dennis, J. W. *Cell* **2007**, *129*, 123.
8. Sear, P.; Wong, C.-H. *Science* **2001**, *291*, 2344.
9. Michael, A. *Am. Chem. J.* **1879**, *1*, 305.
10. Koenigs, W.; Knorr, E. *Ber.* **1901**, *34*, 957.
11. Vankar, Y. D.; Schmidt, R.R. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, *29*, 201.
12. Zhang, Z.; Ollmann, I. R.; Ye X.-S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C.-H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 734.
13. Paulsen, H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1982**, *21*, 155.
14. (a) Fraser-Reid, B.; Udodong, U.E.; Wu, Z.; Ottosson, H.; Merritt, J.R.; Rao, C. S.; Roberts, C. *Synlett* **1992**, 927. (b) Fraser-Reid, B.; Wu, Z.; Udodong, U. E.; Ottosson, H. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 6068.
15. Geurtsen, R.; Holmes, D. S.; Boons, G.-J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 8145.
16. Raghavan, S.; Kahne, D. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1580.
17. (a) Yamada, H.; Harada, T.; Miyazaki, H.; Takahashi, T. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3979. (b) Yamada, H.; Harada, T.; Takahashi, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7919

18. Douglas, N. L.; Ley, S. V.; Lucking, U.; Warriner, S. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 51.
19. Ley, S. V.; Priepke, H. W. M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 2292.
20. Mong, K.-T.; Wong, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 4087.
21. Danishesky, S. J.; McClure, K. F.; Randolph, J. T.; Ruggeri, R. R. B. *Science* **1993**, *260*, 1307.
22. Nguyen H. M.; Poole, J. L.; Gin, D. Y. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 414.
23. Yamago, S.; Yamada, T.; Hara, O.; Ito, H.; Mino, Y.; Yoshida, J. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 3867.
24. D. Crich; Sun, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 435.
25. Codée, J. D. C.; Litjens, R. E. J. N.; Den Heeten, R.; Overkleeft, H. S.; van Boom, J. H.; van den Marel, G. A. *Org. Lett.*, **2003**, *5*, 1519.
26. Huang, X.; Huang, L.; Wang, H.; Ye, X.-S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 5221.
27. WHO : <http://www.who.int/en/>
28. Hanahan, D; Weinberg, R. A. *Cell* **2000**, *100*, 57
29. Meezan, E.; Wu, H. C.; Black, P. H.; Robbins, P. W. *Biochemistry* **1969**, *8*, 2518.
30. (a)Zhang, S.; Cordon-Cardo, C.; Zhang, H. S.; Reuter, V. E.; Adluri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. *Int. J. Cancer.* **1997**, *73*, 42. (b) Zhang, S.; Zhang, H. S.; Cordon-Cardo, C.; Reuter, V. E.; Adluri, S.; Hamilton, W. B.; Lloyd, K. O.; Livingston, P. O. *Int. J. Cancer.* **1997**, *73*, 50.
31. Nudelman, E.; Levery, S. B.; Kaizu, T.; Hakomori, S.-I. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11247.
32. (a) Jurianz, K.; Ziegler, S.; Garcia-Schüler, H.; Kraus, S.; Bohana-Kashtan, O.; Fishelson, Z.; Kirschfink, M. *Mol. Immunol.* **1999**, *36*, 929. (b) Speiser, D. E.; Miranda, R.; Zakarian, A.; Backmann, M. F.; Faienza, K.-M.; Odermatt, B.;

- Hanahan, D.; Zinkernagel, R. M.; Ohashi, P. S. *J. Exp. Med.* **1997**, *186*, 645.
33. (a) Danishesky, S. J.; Allen, J. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 836. (b) Livingston, P. O. *Immunol. Rev.* **1995**, *145*, 147.
34. Sato, S.; Ito, Y.; Ogawa, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 5267.
35. Nicolaou, K. C.; Caulfield, T. J.; Kataoka, H.; Stylianides, N. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3693.
36. Toepfer, A.; Kinzy, W.; Schmidt, R. R. *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 449
37. Bregant, S.; Zhang, Y.; Mallet, J.-M.; Brodzki, A.; Sinaÿ, P. *Glycoconjugate J.* **1999**, *16*, 757.
38. Zhu, T.; Boons, G.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10223.
39. Tanaka, H.; Mataba, N.; Tsukamoto, H.; Takimoto, H.; Yamada, H.; Takahashi, T. *Synlett* **2005**, 824.
40. Miermont, A.; Zeng, Y.; Jing, Y.; Ye, X.-S.; Huang, X. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 8958.
41. Hummel, G.; Schmidt, R. R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1173.
42. Deshpande, P. P.; Danishesky, S. J. *Nature*, **1997**, *387*, 164
43. Spassova, M. K.; Bornmann, W. G.; Ragupathi, G.; Sukenick, G.; Livingston, P. O.; Danishesky, S. J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 3383.
44. Seeberger, P. H.; Love, K. R. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2004**, *43*, 602.
45. Buskas, T.; Li, Y.; Boons, G.-J. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5457.
46. Mitchell, S. A.; Pratt, M. R.; Hruba, V. J.; Polt, R. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2327.
47. Ravindranathan Kartha, K. P.; Aloui, M.; Field, R. A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 8807.
48. Mong, K.-K. T.; Wong, C.-H. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*, 4087.
49. Pouilly, P. D.; Chenede, A.; Mallet, J. M.; Sinaÿ, P. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1993**, *130*, 256.

材料與實驗步驟

一般實驗方法：

除特定反應外，所有反應均於乾燥的氬氣下操作，反應下所使用有機溶劑為購入無水試藥級的有機溶劑。利用薄膜層析(TLC)追蹤反應過程，以紫外燈($\lambda = 254$ nm)觀察具有 UV 吸收的化合物，並以 *p*-Anisadehyde 及 Cerium Molybdate 染色觀察。反應後的產物以萃取、結晶與管柱層析加以純化。

質子與碳核磁共振光譜($^1\text{H-NMR}$ & $^{13}\text{C-NMR}$)為 Bruker Advance 600 (600 MHz / 150 MHz) 共振光譜儀測定。化學位移(Chemical shift, δ)單位為 ppm，四甲基矽($(\text{CH}_3)_4\text{Si}$)，以氘氯仿(CDCl_3) 作為測定化合物的溶劑。吸收分裂方式(Splitting patterns) 表示如下：s 表單峰，d 表雙峰，q 表四峰，b 表寬峰，m 為混峰。偶合常數(Coupling constant) 以 J 表示，單位為 Hz。藉由高解析質譜儀(HRMS)–Bio TOF II 來偵測化合物分子質量。

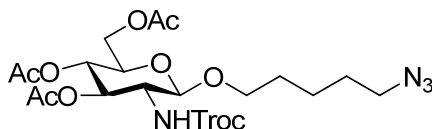


已知化合物文獻：

- 化合物 02-03⁴⁶ *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2327.
- 化合物 11-15⁴⁸、16-24⁴⁸ *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 4087.
- 化合物 26-29⁴⁰ *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 8958.
- 化合物 30-34、25¹² *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 734.

實驗步驟：

5-azidopentyl 3,4,6-*O*-triacetyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranose (5).



取 5-azidopentanol (2.1 g, 16.17 mmol) 與經活化後的分子篩混合溶於 CH₃CN (40 mL)，在室溫下攪拌 3 小時進行除水。取化合物 4 (7.0 g, 12.94 mmol) 經高真空系統抽乾後灌入氫氣，打入 CH₃CN (40 mL) 將化合物 4 溶解，加到經除水後的 5-azidoPentanol 反應瓶中，立即加入 Iodine (4.9 g, 19.41 mmol) 與 DDQ (4.4 g, 19.41 mmol) 在氫氣與室溫條件下進行醱化反應。十二小時後，經 TLC 片追蹤反應，當化合物 4 反應完後加入 Na₂S₂O₃ (aq.) 中止反應。用 celite 將分子篩與硫過濾除去後，取濾液部分以旋轉濃縮儀將有機層抽除，剩下水溶液部分加入大量 EA 進行萃取，取有機層然後以 MgSO₄ (s) 除水，然後以旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層析純化 (EA : Hexane = 1 : 1) 後得到透明油狀物產物 5 (5.4 g，產率: 71.2%)。

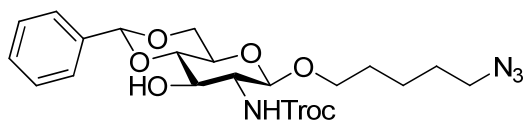
[建議事項：CH₃CN 最好先抽掉不然在萃取過程中會損失滿多的產物，且抽除 CH₃CN 前一定要先用 Na₂S₂O₃ (aq.) 中止反應，不然碘蒸氣(毒!)會一起被抽起來。萃取用的有機溶劑建議用 EA 而不要用 CH₂Cl₂，可以減少反應中的試劑溶於有機層中方便後面的純化步驟]

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 5.33(t, 1H, J = 9.9 Hz; H-3), 5.15 (d, 1H, J = 8.2 Hz; carbamate-NH), 5.09 (t, 1H, J = 9.6 Hz; H-4), 4.75 (dd, 2H, J = 11.9, 57.8 Hz; carbamate-CH₂), 4.66 (d, 1H, J = 8.04 Hz; H-1), 4.30 (dd, 1H, J = 4.74, 12.24 Hz; H-6), 4.17 (dd, 1H, J = 1.86, 12.2 Hz; H-6), 3.92 (dt, 1H, J = 6.3, 9.54 Hz; aglycon-CH₂), 3.72 (d, 1H, J = 7.7 Hz; H-5), 3.63 (dd, 1H, J = 8.7, 19.1 Hz; H-2), 3.50-3.24 (dt, 1H, J = 9.5, 6.6 Hz; aglycon-CH₂), 3.28-3.30 (t, 2H, J = 6.8 Hz; aglycon-CH₂), 2.11 (s, 6H; CH₃C=O), 2.05 (s, 6H; CH₃C=O \times 2), 1.58-1.67 (m, 4H; aglycon-CH₂), 1.41-1.50 (m, 2H; aglycon-CH₂) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 170.70, 170.64, 169.48, 153.97,

100.78, 95.46, 74.47, 71.84, 69.81, 68.69, 62.09, 56.38, 51.29, 28.97, 28.53, 23.15,
20.77, 20.66, 20.64

Bio TOF II M.S. : $C_{20}H_{29}C_{13}N_4O_{10}$; $[M+Na]^+$ m/z : calculated 613.0841 ; found
613.0819

**5-azidopentyl 4,6-O-benzylidene-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonyl-
amino)- β -D-glucopyranose (7).**



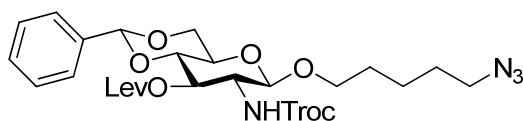
化合物 **5** 加入催化量的 NaOMe (s) 於無水的 MeOH 中進行醇解反應，經 TLC 片追蹤反應 (MeOH : CH₂Cl₂ = 1 : 9)，反應結束後用 IR-120 酸性樹脂中合反應後，將樹脂過後取濾液部分以旋轉濃縮儀抽乾，得到化合物 **6**，無需進一步純化即可往下進行反應。將化合物 **6** 溶於 CH₃CN (20 mL) 中加入 CSA 將溶液的酸鹼值調到 4，然後加入 benzaldehyde dimethyl acetal (2.1 mL, 13.8 mmol)，在 40 °C 下反應。經 TLC 片追蹤反應，當起始物 **6** 反應完後加入 Et₃N (1.0 mL) 中止反應後上旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層析純化 (EA : Hexane = 1 : 1) 後得到乳白色膠狀物的化合物 **7** (3.90 g，產率: 91.3%)。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) :

¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) :

Bio TOF II M.S. :

5-azidopentyl 4,6-*O*-benzylidene-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonyl-amino)-3-*O*-levulinoyl- β -D-glucopyranose (8).



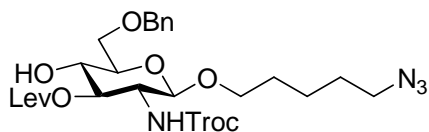
取化合物 7 (2.28 g, 4.1 mmol) 溶於 CH_2Cl_2 (10 mL) 中，加入 EDCI (1.57 g, 8.2 mmol) 與 levulinic acid (0.72 mL, 6.2 mmol) 混攪拌後，再加入 DMAP (1.00 g, 8.2 mmol) 後在氫氣與室溫下反應 12 小時。加入 CH_2Cl_2 (90 mL) 用水 (20 mL) 及 1N 的 $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 進行萃取，取有機層經 MgSO_4 除水後，以旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層希純化 (EA : Hexane = 1 : 1) 後得白色固體化合物 8 (2.34 g，產率: 87.8%)。

[建議事項：由於起始物和產物在 TLC 片上幾乎同一點，造成利用 TLC 片判別反應結束與否上的困難，因此利用過量的 DMAP 來促使反應完全]

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.33-7.47 (m, 5H; aromatic), 5.56 (d, 1H, $J = 9.1$ Hz; carbamate-NH), 5.50 (s, 1H; benzylidene), 5.39 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz; H-3), 4.76 (dd, 2H, $J = 12.1, 32.7$ Hz; carbamate- CH_2), 4.51 (d, 1H, $J = 8.28$ Hz; H-1), 4.29 (dd, 1H, $J = 4.9, 10.44$ Hz; H-6), 3.73-3.77 (m, 2H; aglycon- CH_2 , H-6), 3.645-3.69 (m, 2H; H-2, H-4), 3.52 (dt, 1H, $J = 5.0, 9.8$ Hz; H-5), 3.38 (dt, 1H, $J = 6.5, 9.36$ Hz; aglycon- CH_2), 3.26 (dt, 2H, $J = 1.68, 6.96$ Hz; aglycon- CH_2), 2.72-2.74 (m, 2H; lev- CH_2), 2.55-2.64 (m, 2H; lev- CH_2), 2.14 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$), 1.54-1.61 (m, 4H; aglycon- CH_2), 1.36-1.46 (m, 2H; aglycon- CH_2) ; ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 206.09, 172.84, 154.32, 128.95, 128.20, 126.04, 125.82, 123.89, 102.03, 101.14, 95.61, 78.76, 74.51, 71.46, 69.93, 68.50, 65.98, 56.80, 51.25, 37.87, 29.75, 29.01, 28.52, 27.92, 27.50

Bio TOF II M.S. : $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_9$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : calculated 673.1205 ; found 673.1169

5-azidopentyl 6-O-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)-3-O-levulinoyl- β -D-glucopyranose (9).

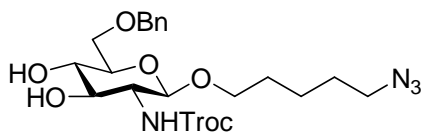


取化合物 **8** (2.34 g, 3.6 mmol) 溶於無水 CH_2Cl_2 (25 mL) 中，加入 Triethyl silane (3.5 mL, 22.0 mmol)，降溫至 0°C 下加入 TFA anhydride (0.4 mL, 2.82 mmol) 攪拌 5 分鐘後，慢慢將 TFA (1.08 mL, 14.1 mmol) 地入反應瓶中在 0°C 與氫氣下反應 1 小時後回到室溫繼續反應，經 TLC 片追蹤反應，化合物 **8** 反應完後加入 CH_2Cl_2 (75 mL) 與飽和的 NaHCO_3 (aq.) 中止反應，然後進行萃取。取有機層，加入 MgSO_4 除水後以旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層析 (EA : Hexane = 1 : 1 + 10% MeOH) 純化得到透明油狀物化合物 **9** (2.08 g，產率: 88.6%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.30-7.39 (m, 5H, aromatic), 5.15 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz; carbamate-NH), 5.12 (t, 1H, $J = 10.5$ Hz; H-3), 4.76 (dd, 2H, $J = 12.0, 27.0$ Hz; benzyl), 4.63 (dd, 2H, $J = 12.1, 19.68$ Hz; carbamate- CH_2), 4.55 (d, 1H, $J = 8.22$ Hz; H-1), 3.90-3.93 (m, 1H; aglycon- CH_2), 3.78-3.85 (m, 2H; H-6), 3.76 (dd, 1H, $J = 2.3, 9.1$ Hz; H-4), 3.64 (dd, 1H, $J = 9.5, 19.0$ Hz; H-2), 3.58 (dt, 1H, $J = 4.5, 9.2$ Hz; H-5), 3.54 (t, 2H, $J = 6.7$ Hz; aglycon- CH_2), 3.48-3.51 (m, 1H; aglycon- CH_2), 3.30 (b, 1H; OH), 1.59-1.65 (m, 4H; aglycon- CH_2), 1.47-1.54 (m, 2H; aglycon- CH_2); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 207.59, 173.32, 154.22, 137.79, 128.48, 128.37, 127.84, 127.74, 101.14, 95.59, 75.42, 74.49, 74.28, 73.73, 70.53, 69.96, 69.58, 55.88, 44.94, 38.43, 29.79, 28.78, 28.21, 23.33, 23.17

Bio TOF II M.S. : $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{Cl}_3\text{N}_4\text{O}_9$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : calculated 675.1362 ; found 675.1317

5-azidopentyl 6-O-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranose (10).

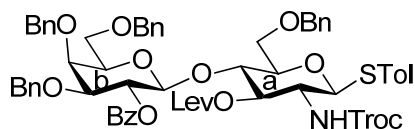


取化合物 **9** (1.95 g, 3.0 mmol)，溶於 pyridine (5mL) 中，加入配製於 pyridine 中的 $N_2H_4 \cdot HOAc$ (1M) (5 mL) 在室溫下反應 3 小時後，以旋轉濃縮儀抽乾後再利用 toluene 共沸抽乾(重複 3 次)。加入 EA 回溶後，用水與 1N 的 $HCl_{(aq)}$ 進行萃取，取有機層經 $MgSO_4$ 除水後上旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層析(EA : Hexane = 2 : 1) 純化得到白色固體化合物 **10** (1.45 g, 產率: 81.7%)。

1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) : δ 7.29-7.36 (m, 5H; aromatic), 5.40 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz; carbamate-NH), 4.76 (s, 2H, benzyl), 4.63 (dd, 2H, $J = 12.1, 27.4$ Hz; carbamate- CH_2), 4.50 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz; H-1), 3.90 (dt, 1H, $J = 6.4, 9.5$ Hz; aglycon- CH_2), 3.76-3.82 (m, 4H; H-3, H-6, OH), 3.59 (t, 1H, $J = 9.1$ Hz; H-4), 3.47-3.53 (m, 3H, aglycon- CH_2 , H-5), 3.37 (dd, 1H, $J = 7.3, 14.0$ Hz; 2-H), 3.28 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz; aglycon- CH_2 , OH), 1.57-1.62 (m, 4H; aglycon- CH_2), 1.40-1.44 (m, 2H; aglycon- CH_2) ; ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) : δ 154.99, 137.71, 128.53, 128.37, 127.92, 127.79, 100.60, 95.38, 74.70, 74.30, 74.06, 73.74, 72.59, 70.19, 69.49, 60.43, 58.12, 51.30, 29.71, 29.03, 28.55

Bio TOF II M.S. : $C_{21}H_{29}Cl_3N_4O_7$; $[M+Na]^+$ m/z : calculated 577.0994 ; found 577.0951

p-Tolyl 2-*O*-benzoyl-3,4,6-*O*-tribenzyl- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[3-*O*-levulinoyl-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)] - β -D-glucopyranoside (**35**).

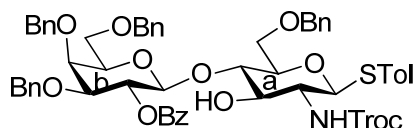


取化合物 **15** (647mg, 1 mmol) 及化合物 **25** (858mg, 1.3 mmol) 與經活化過的分子篩溶於 CH_2Cl_2 (25 mL) 中，在室溫與氫氣下攪拌 5 小時進行除水。將反應瓶降溫至 $-45\text{ }^\circ\text{C}$ 後，加入 NIS (293mg, 1.3 mmol) 攪拌 5 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (260 μL , 0.13 mmol) 反應然後升溫至 $-35\text{ }^\circ\text{C}$ ，經 TLC 片追蹤反應，反應約 1.5 小時後加入飽和 NaHCO_3 (aq.) 與 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (aq.) 中止反應。經 celite 將分子篩過濾後，取濾液部分用 CH_2Cl_2 與水進行萃取，取有機層部分加入 MgSO_4 除水後以旋轉濃縮儀抽乾，最後利用管柱層析層析 (EA : Hexane = 1 : 2) 純化得到白色固體化合物 **35** (505mg，產率: 42.7%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.00-7.94 (m, 25H; aromatic), 5.47 (dd, 1H, $J = 7.9, 10.0$ Hz; H_b -2), 5.20 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz; carbamate-NH), 5.04 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz; H_a -3), 4.97 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz; benzyl), 4.79 (dd, 2H, $J = 12.1, 73.8$ Hz; carbamate- CH_2), 4.51-4.57 (m, 6H; H_a -1, H_b -1, benzyl), 4.46 (d, 1H, $J = 12.5$ Hz; benzyl), 4.33 (d, 1H, $J = 11.9$ Hz; benzyl), 3.90 (t, 1H, $J = 9.2$ Hz; H_a -4), 4.02 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, H_b -4), 3.66-3.74 (m, 2H; H_a -2, H_b -6), 3.58-3.62 (m, 2H; H_a -6), 3.50-3.56 (m, 3H; H_b -3, H_b -5, H_b -6), 3.35 (bd, 1H, $J = 8.0$ Hz; H_a -5), 2.37-2.52 (m, 4H, lev- $\text{CH}_2 \times 2$), 2.29 (s, 3H; *p*-methyl), 2.00 (s, 3H; $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$) ; ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 206.59, 172.55, 164.87, 154.14, 138.59, 138.21, 138.03, 137.77, 137.61, 133.06, 129.89, 129.81, 129.60, 129.02, 128.87, 128.57, 128.40, 128.37, 128.33, 128.28, 128.07, 128.04, 127.98, 127.76, 127.72, 127.69, 127.59, 100.51, 95.57, 87.30, 79.80, 78.76, 74.64, 74.61, 73.94, 73.91, 73.57, 73.35, 73.29, 72.41, 72.21, 71.51, 67.96, 67.93, 55.09, 37.80, 29.68, 27.95, 21.11

Bio TOF II M.S. : C₆₂H₆₄C₁₃NO₁₄S ; [M+Na]⁺ m/z : calculated 1208.2995 ; found 1208.2830

p-Tolyl 2-*O*-benzoyl-3,4,6-*O*-tribenzyl-β-D-galactopyranosyl-(1→4)- 6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)] -β-D-glucopyranoside (**36**).

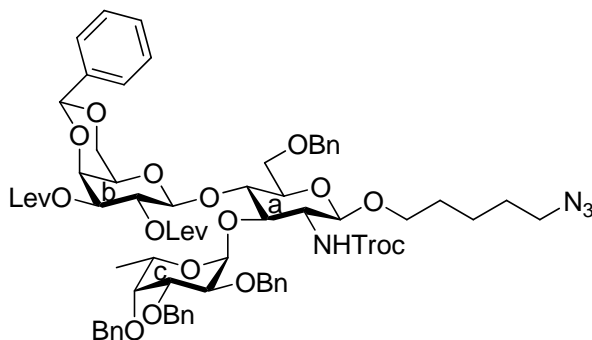


取化合物 **35** (355mg, 0.3mmol) 溶於 pyridine (1mL) 中，加入配製於 pyridine 中的 N₂H₄ · HOAc (1M) (1 mL) 在室溫下反應 3 小時後，上旋轉濃縮儀抽乾後再利用 toluene 共沸抽乾(重複 3 次)。加入 EA 回溶後，用水與 1N 的 HCl (aq.) 進行萃取，取有機層經 MgSO₄ 除水後上旋轉濃縮儀抽乾，經管柱層析(EA : Hexane = 1 : 2) 純化得到白色固體化合物 **36** (320mg, 產率:98.3%)。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 6.99-8.07 (m, 25H), 5.67 (dd, 1H, *J* = 8.2, 10.0 Hz), 5.17 (d, 1H, *J* = 7.44 Hz; carbamate-NH), 4.99 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 4.87 (d, 1H, *J* = 11.8 Hz), 4.62 (d, 2H, *J* = 11.8 Hz), 4.58 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz; H_b-1), 4.56 (d, 2H, *J* = 11.7, 129.2 Hz; carbamate-CH₂), 4.51 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz), 4.49 (d, 1H, *J* = 3.7 Hz), 4.12 (d, 1H, *J* = 11.9 Hz), 4.07 (d, 1H, *J* = 11.9 Hz), 3.96 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz), 3.81 (t, 1H, *J* = 9.2 Hz), 3.65-3.71 (m, 2H), 3.64 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 3.58 (t, 1H, *J* = 7.7 Hz), 3.51(t, 2H), 3.42-3.46 (b, 3H), 2.30 (s, 3H) ; ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 165.06, 154.08, 138.48, 138.00, 137.91, 137.37, 137.32, 133.39, 130.02, 129.73, 129.61, 129.07, 128.55, 128.46, 128.39, 128.22, 128.05, 127.93, 127.89, 127.80, 127.41, 127.38, 102.01, 95.62, 86.53, 81.68, 79.64, 77.76, 74.61, 74.56, 74.02, 73.74, 72.84, 72.03, 71.96, 71.63, 68.48, 68.44, 56.35, 21.14

Bio TOF II M.S. : C₅₇H₅₈C₁₃NO₁₂S ; [M+Na]⁺ m/z : calculated 1110.2665 ; found 1110.3108

5-Azidopentyl (4,6-*O*-benzylidene-2,3-di-*O*-levulinoyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranose (39).

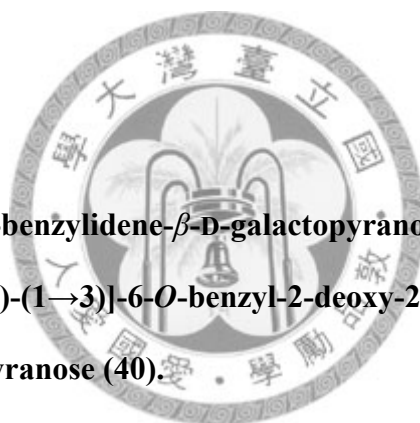


取化合物 **29** (239mg, 0.42 mmol) 及化合物 **10** (166mg, 0.3mmol) 與經活化的分子篩混合溶於 CH_2Cl_2 (3mL) 中，在氫氣與室溫下攪拌 3 小時後降溫至 -45°C ，加入 NIS (95mg, 0.42 mmol) 攪拌 5 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (84 μL , 0.042 mmol) 後升溫至 -40°C 反應。經 TLC 片追蹤反應，當化合物 **10** 反應完後降溫至 -50°C 後加入化合物 **34** (195mg, 0.36 mmol) 與 NIS (80mg, 0.36 mmol)，攪拌 3 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (70 μL , 0.035 mmol) 進行反應。經 TLC 片追蹤反應，當化合物 **34** 都活化完後加入飽和 NaHCO_3 (aq.) 與 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (aq.) 中止反應。經 celite 將分子篩過濾後，取濾液部分用 CH_2Cl_2 與水進行萃取，取有機層部分加入 MgSO_4 除水後以旋轉濃縮儀抽乾，最後利用管柱層析層析 (EA : Hexane = 1.5 : 1) 純化得到透明油狀物化合物 **35** (200mg，產率：47.0%)。

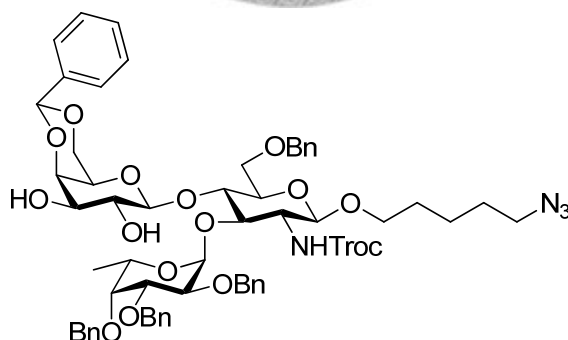
^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.15-7.58 (m, 25H), 5.56 (s, 1H; benzylidene), 5.30-5.35 (m, 2H; H_b -2, H_a -3), 5.05 (d, 1H; $J = 2.88$ Hz, H_c -1), 4.99 (d, 1H; $J = 7.86$ Hz, H_a -1), 4.66-4.71 (m, 3H), 4.77-4.84 (m, 4H), 4.64 (d, 1H; $J = 8.22$ Hz H_b -1), 4.53 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz), 4.46 (d, 1H, $J = 12.0$ Hz), 4.32 (d, 1H, $J = 11.6$ Hz), 4.17-4.22 (m, 3H), 3.99-4.04 (dt, 2H, $J = 8.6, 18.1$ Hz), 3.95-3.95 (m, 3H), 3.89-3.93 (dt, 1H, $J = 6.4, 9.5$ Hz; aglycon- CH_2), 3.82 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz), 3.51(d, 2H, $J = 11.2$ Hz), 3.43-3.48 (m, 2H), 3.27 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz; aglycon- CH_2), 3.22 (s, 1H), 3.11 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz; H_a -2),

2.98 (s, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H; lev-CH₂), 2.71-2.79 (m, 4H; lev-CH₂), 2.63-2.69 (m, 2H; lev-CH₂), 2.43-2.48 (m, 1H; lev-CH₂), 2.24 (s, 3H; CH₃C=O), 2.19 (s, 3H; CH₃C=O), 1.57-1.47 (m, 4H; aglycon-CH₂), 1.35-1.47 (m, 2H; aglycon-CH₂), 1.14 (d, 3H, *J* = 6.5 Hz; H_c-6); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 206.48, 206.33, 172.27, 171.03, 153.43, 139.55, 139.41, 138.66, 138.09, 134.67, 128.92, 128.54, 128.48, 128.36, 128.23, 128.17, 129.94, 127.89, 127.57, 99.69, 99.38, 98.10, 95.42, 79.27, 78.88, 75.94, 74.91, 74.42, 74.24, 74.14, 73.59, 73.45, 73.41, 71.91, 71.43, 69.62, 69.05, 68.75, 67.96, 66.33, 66.21, 59.85, 51.30, 37.81, 37.70, 29.91, 29.81, 29.80, 29.00, 28.60, 28.03, 27.65, 23.18

Bio TOF II M.S. : C₇₁H₈₃C₁₃N₄O₂₀ ; [M+Na]⁺ m/z : calculated 1441.4554 ; found 1441.4348



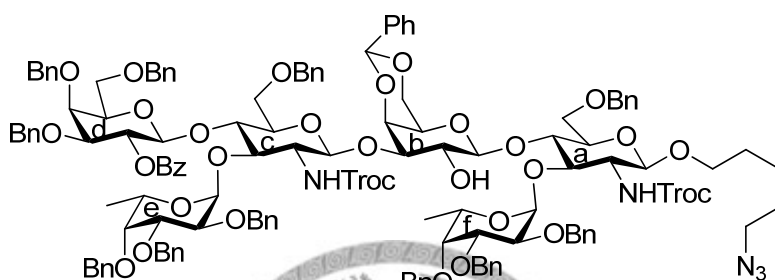
5-Azidopentyl (4,6-*O*-benzylidene-β-D-galactopyranosyl)-(1→4)-[(2,3,4-tri-*O*-benzyl-α-L-fucopyranosyl)-(1→3)]-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)-β-D-glucopyranose (40).



取化合物 **40** (150mg, 0.13 mmol), 溶於 pyridine (1mL) 中, 加入配製於 pyridine 中的 N₂H₄ · HOAc (1M) (0.5 mL) 在室溫下反應 3 小時後, 以旋轉濃縮儀抽乾後再利用 toluene 共沸抽乾(重複 3 次)。加入 EA 回溶後, 用水與 1N 的 HCl (aq.) 進行萃取, 取有機層經 MgSO₄ 除水後上旋轉濃縮儀抽乾, 經管柱層析(EA : Hexane = 2 : 1) 純化得到白色固體化合物 **40** (140mg, 產率:88.6%)。

^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) : δ 7.18-7.54 (m, 25H), 5.61 (s, 1H), 5.46 (b, 1H), 5.09 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz), 4.94 (d, 1H, $J = 6.8$ Hz), 4.85 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz), 4.70-4.79 (m, 6H), 4.60 (d, 1H, $J = 5.8$ Hz), 4.47 (t, 2H, $J = 12.1$ Hz), 4.40 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz), 4.30 (d, 1H, $J = 12.1$ Hz), 4.21 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz), 4.09 (d, 1H, $J = 3.8$ Hz), 3.93-4.07 (m, 6H), 3.85-3.88 (m, 1H), 3.83 (dd, 1H, $J = 1.9$ Hz), 3.72 (d, 1H, $J = 11.1$ Hz), 3.66 (dt, 1H, $J = 1.4, 8.0$ Hz), 3.52 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 3.43-3.49 (m, 2H), 3.35 (s, 1H), 3.27 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz; aglycon- CH_2), 3.12 (dd, 1H, $J = 8.3$ Hz), 3.03 (s, 1H), 2.80 (s, 1H), 2.52 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 1.57-1.63 (m, 4H, aglycon- CH_2), 1.35-1.46 (m, 2H; aglycon- CH_2), 1.03 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) : δ 153.52, 139.29, 139.18, 138.47, 138.20, 137.60, 129.04, 128.50, 128.43, 128.38, 128.30, 128.24, 127.99, 127.69, 127.59, 127.36, 127.29, 127.09, 125.76, 101.19, 100.12, 99.63, 98.14, 95.46, 76.04, 75.21, 74.96, 74.81, 74.57, 74.39, 74.29, 73.17, 72.80, 71.98, 71.61, 69.68, 69.31, 68.35, 66.58, 66.35, 59.62, 51.30, 29.00, 28.59, 23.18, 16.48
Bio TOF II M.S. : $\text{C}_{61}\text{H}_{71}\text{C}_3\text{N}_4\text{O}_{16}$; $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z : calculated 1245.3813 ; found 1445.3735

5-Azidopentyl (2-*O*-benzoyl-3,4,6-*O*-tribenzyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-
 [(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-
 chloroethoxycarbonylamino) - β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 3)-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-
 galactopyranosyl)- (1 \rightarrow 4)- [(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-6-*O*-
 benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-trichloroethoxycarbonylamino) - β -D-glucopyranoside
 (41).



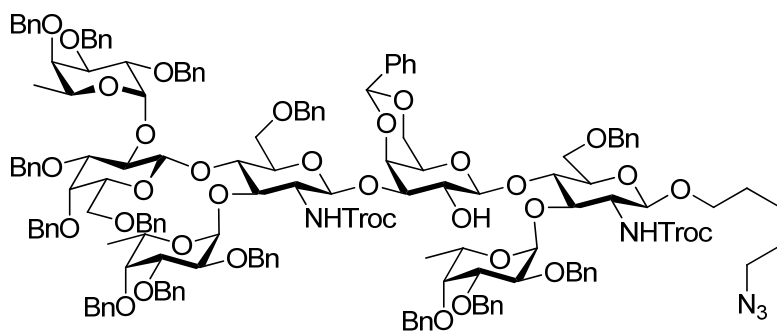
取化合物 **34** (47.5 mg, 0.088 mmol)及化合物 **36** (78.5mg, 0.08 mmol)與分子篩
 混合溶於 CH₂Cl₂ (1mL)中，在氬氣與室溫下攪拌 5 小時後降溫至 -45 °C，加入 NIS
 (20mg, 0.088 mmol)攪拌 5 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (18 μ L, 0.009 mmol)進
 行反應。經 TLC 片追蹤反應，當化合物 **34** 反應完後升溫至 -35 °C 後，加入化合物
40 (72mg, 0.064 mmol)與 NIS (15.6mg, 0.07 mmol)，攪拌 3 分鐘後打入 TfOH (0.5M
 in ether) (14 μ L, 0.007 mmol)進行反應。反應 1 小時後加入飽和 NaHCO₃ (aq.)與
 Na₂S₂O₃ (aq.)中止反應。經 celite 將分子篩過濾後，取濾液部分用 CH₂Cl₂ 與水進行
 萃取，取有機層部分加入 MgSO₄ 除水後以旋轉濃縮儀抽乾，最後利用管柱層析層
 析(EA : Hexane = 1 : 2)純化得到白色固體化合物 **41** (68.3mg，產率: 41.1%)。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.10-7.91 (m, 65H), 5.58 (b, 1H, carbamate-NH), 5.51
 (dd, 1H, $J = 8.3, 9.8$ Hz, H_{d-2}), 5.39 (s, 1H, benzylidene), 5.30 (b, 1H, carbamate-NH),
 5.06-5.10 (b, 2H, fuc H-1 $J = 2.8$ Hz, gluNHTroc-1), 5.02 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz, fuc H-1),
 4.91 (d, 2H, $J = 10.8$ Hz, gluNHTroc-1), 4.70-4.77 (m, 5H), 4.62-4.69 (m, 8H),
 4.57-4.60 (m, 4H, H_{d-1}, $J = 6.8$ Hz), 4.54 (d, 2H, $J = 11.04$ Hz), 4.61-4.51 (m, 3H),
 4.36-4.40 (m, 4H, H_{b-1}), 4.26 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 4.14-4.21 (m, 3H), 3.99-4.05 (m,

4H), 3.95 (dd, 2H, $J = 5.9, 9.4$ Hz), 3.85-3.91 (m, 5H), 3.63-3.82 (m, 8H), 3.53 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 3.49 (dd, 1H, $J = 2.7, 10.0$ Hz), 3.38-3.44 (m, 4H), 3.29 (d, $J = 1.26$ Hz), 3.19-3.23 (m, 6H), 3.07-3.13 (b, 1H), 1.53-1.57 (m, 4H), 1.33-1.38 (m, 2H), 1.23 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz), 0.91 (d, 3H, $J = 6.4$ Hz); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3): δ 164.92, 154.14, 153.61, 139.74, 139.65, 139.42, 139.13, 138.85, 138.73, 138.24, 138.07, 137.92, 137.82, 133.35, 130.05, 129.96, 129.12, 128.99, 128.90, 128.78, 128.71, 128.66, 128.62, 128.58, 128.55, 128.44, 128.37, 128.29, 128.19, 128.10, 128.02, 101.78, 100.81, 100.15, 99.97, 99.80, 98.31, 95.67, 95.35, 81.03, 80.32, 80.27, 79.50, 78.88, 78.64, 76.49, 76.25, 75.92, 75.75, 75.26, 75.06, 74.93, 74.64, 74.30, 74.14, 73.81, 73.70, 73.48, 73.33, 73.19, 73.11, 72.33, 72.20, 71.93, 71.67, 69.79, 69.70, 69.46, 68.45, 68.35, 68.00, 67.06, 66.61, 66.40, 60.08, 59.55, 51.51, 29.21, 28.79, 23.38, 16.56, 16.47



5-Azidopentyl 2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-(3,4,6-*O*-tribenzyl- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-[6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranosyl]-(1 \rightarrow 3)-(4,6-*O*-benzylidene- β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 4)-[(2,3,4-tri-*O*-benzyl- α -L-fucopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)]-6-*O*-benzyl-2-deoxy-2-(2,2,2-tri-chloroethoxycarbonylamino)- β -D-glucopyranoside (42).



取化合物 **34** (77 mg, 0.142 mmol)及化合物 **38** (63.7mg, 0.065 mmol)與分子篩混合溶於 CH₂Cl₂ (1mL)中，在氬氣與室溫下攪拌 5 小時後降溫至-45 °C，加入 NIS (32 mg, 0.142 mmol)攪拌 5 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (28 μL, 0.014 mmol)進行反應。經 TLC 片追蹤反應，當化合物 **34** 反應完後升溫至-35 °C 後，加入化合物 **40** (47.5 mg, 0.039 mmol)與 NIS (9mg, 0.04 mmol)，攪拌 3 分鐘後打入 TfOH (0.5M in ether) (8 μL, 0.004 mmol)進行反應。反應 1 小時後加入飽和 NaHCO₃ (aq.)與 Na₂S₂O₃ (aq.)中止反應。經 celite 將分子篩過濾後，取濾液部分用 CH₂Cl₂ 與水進行萃取，取有機層部分加入 MgSO₄除水後以旋轉濃縮儀抽乾，最後利用管柱層析層析(EA : Hexane = 1 : 2)純化得到白色固體化合物 **42** (41mg，產率: 36.2%)。

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) : δ 7.01-7.34 (m, 75H), 5.73 (b, 1H), 5.66 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 5.41 (s, 1H), 5.3 (d, 2H, *J* = 8.1 Hz), 5.04 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 5.00 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz), 4.92 (b, 1H), 4.90 (d, 1H, *J* = 11.3 Hz), 4.42-4.83 (m, 28H), 4.31-4.40 (m, 5H), 4.16-4.29 (m, 5H), 3.98-4.12 (m, 7H), 3.89-3.96 (m, 5H), 3.73-3.88 (m, 8H), 3.62-3.72 (m, 5H), 3.52-3.58 (m, 4H), 3.47 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 3.40-3.44 (m, 1H), 3.34-3.38 (m, 3H), 3.20-3.24 (m, 2H), 1.52-1.57 (m, 4H), 1.20-1.30 (m, 5H), 1.10 (d, 3H, *J* = 8.5 Hz), 0.96 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) : δ 154.15, 153.61, 139.74, 139.65, 139.40, 138.92, 138.88, 138.85, 138.72, 138.59, 138.35, 138.20, 137.87, 136.64, 134.68, 133.71, 133.26, 130.34, 129.97, 129.51, 128.22, 128.98, 128.76, 128.65, 128.63, 128.56, 128.50, 128.45, 128.38, 128.34, 128.25, 128.22, 128.17, 128.10, 127.91, 127.85, 127.79, 127.76, 127.70, 100.73, 100.92, 100.63, 100.50, 100.02, 99.75, 99.30, 99.06, 98.67, 98.38, 98.14, 95.68, 95.36, 81.21, 80.50, 79.94, 79.74, 79.51, 78.89, 78.40, 78.14, 77.44, 77.23, 77.02, 76.27, 76.06, 76.01, 75.97, 75.84, 75.64, 75.45, 75.12, 75.01, 74.99, 74.94, 74.75, 74.64, 74.49, 74.34, 73.91, 73.73, 73.68, 73.42, 73.32, 73.23, 73.12, 72.90, 72.74, 72.72, 72.20, 72.09, 71.68, 71.34, 69.77, 69.49, 68.87, 68.22, 68.12, 67.15, 67.05, 66.69, 66.42, 60.12, 59.95, 51.51, 29.24, 28.79, 23.40, 16.70, 16.51, 16.41