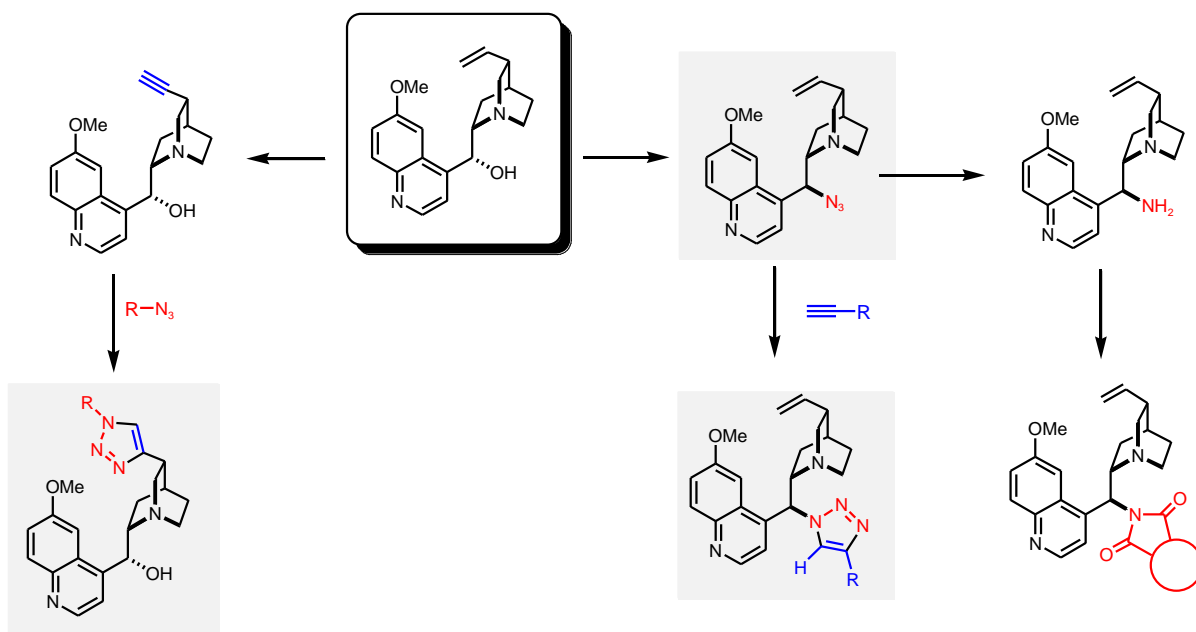


Karol Kacprzak

Nowe zastosowania alkaloidów kory chinowej do rozpoznania i różnicowania molekularnego

Spośród tysięcy produktów naturalnych oraz związków syntetycznych kilkadziesiąt zaledwie spowodowało rezonans przekraczający mury laboratoriów, wywołując szeroki oddźwięk społeczny, ekonomiczny i nierzadko polityczny. W tej uprzywilejowanej grupie substancji znajdują się alkaloidy kory drzewa chinowego, z których najpopularniejsze są chinina i chinidyna. Pierwotnie powodem popularności chininy było jej działanie precymalaryczne i etap ten trwał nieprzerwanie od XVII do lat czterdziestych XX wieku. Nieco później chinina oraz inne alkaloidy kory chinowej stały się cennymi związkami do rozdziałów mieszanin racemicznych, współcześnie natomiast one same oraz ich pochodne rozpoznane zostały jako „uprzywilejowane” katalizatory i ligandy w syntezie stereoselektywnej katalizując kilkadziesiąt typów reakcji min. addycji, cykloaddycji, utleniania i redukcji. Stosunko młody kierunek ich wykorzystania obejmuje konstrukcję systemów molekularnych różnicujących i separujących enancjomery np. stacjonarnych faz chiralnych do chromatografii. Ten wątek jest głównym tematem przedstawionego cyklu prac wykonanych przeze mnie w Zakładzie Stereochemii Organicznej Wydziału Chemii UAM oraz podczas stażu podoktorskiego (2005-2007) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wiedeńskiego w zespole Prof. Wolfganga Lindnera.

Przedstawiona seria prac nad alkaloidami chinowca podejmuje zagadnienia ich wykorzystania w procesach rozpoznania chiralnego, zwłaszcza o potencjale praktycznym tj. konstrukcji chiralnych faz stacjonarnych, układów sensorycznych oraz niedawno rozpoczętego wątku - katalizy asymetrycznej. Istotną częścią prac prowadzącą do wymienionych celów (ale o szerszym znaczeniu) było także opracowanie nowych i praktycznych metod przekształceń alkaloidów chinowca. W tym kontekście szczególnie interesowały mnie możliwości modyfikacji oraz funkcjonalizacji alkaloidów w pozycji 9 oraz przekształcenia grupy winylowej. Zasadniczym narzędziem syntezy uczyniłem katalityczną 1,3-dipolarną cykloaddycję Huisgena czyli tzw. chemię klik (*click chemistry*) ale w niektórych pracach wykorzystałem także 9-aminoalkaloidy chinowca oraz otrzymywane z nich aromatyczne bis-imidy. Wymienione związki i ich syntetyczne pokrewieństwo ilustruje Schemat 1.

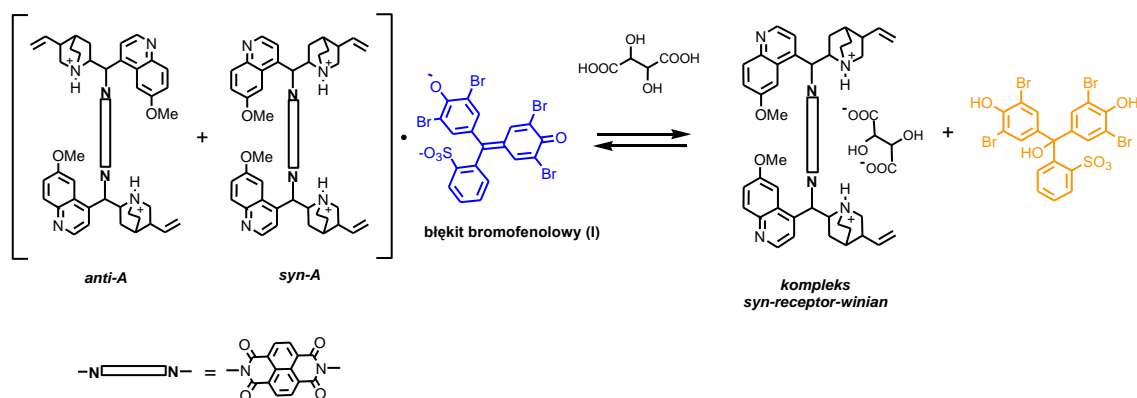


Schemat 1. Chemia alkaloidów chinowca będąca przedmiotem habilitacji (zaciemniono nowe pochodne alkaloidów).

Enancjoróżnicujący sensor kwasu winowego.

Duże znaczenie we współczesnej analityce mają układy receptorowe, których sygnał analityczny może być rejestrowany za pomocą prostych i łatwo dostępnych metod spektroskopowych takich jak spektroskopia UV-VIS czy CD oraz spektrofluorymetria. Wśród nich nowe metody oznaczeń kolorymetrycznych bazują na wypieraniu barwnika z kompleksu [receptor-barwnik] poprzez silniej wiążaną cząsteczkę oznaczanego gościa (tzw. *indicator displacement assay*).

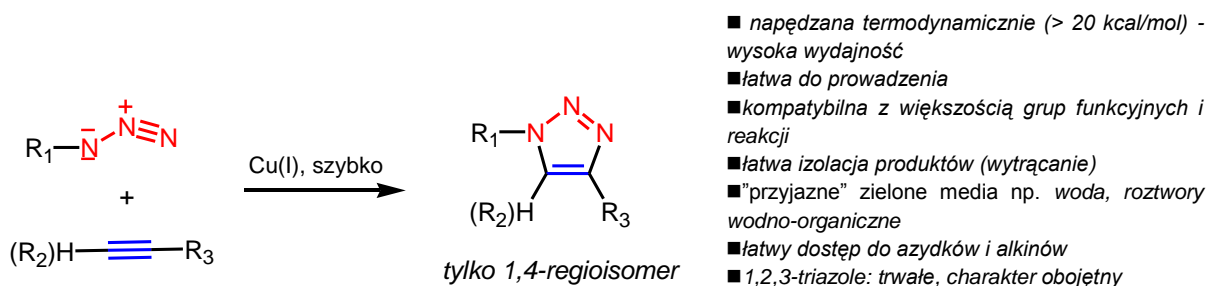
Bazując na wcześniejszych pracach z naszego zespołu opracowałem układ receptorowy, zdolny nie tylko efektywnie różnicować mono- i dikwasy karboksylowe ale przede wszystkim rozróżniać enancjomery kwasów winowych z wysoką selektywnością. Układ sensoryczny złożony z 1,4,5,8-naftalenotetrakarboksydiimidu podstawionego fragmentem epichinidyny oraz błękitu bromofenolowego (1:1) rozpoznaje efektywnie kwasy α -hydroksydikarboksylowe, przy czym największe powinowactwo wykazuje w stosunku do naturalnego kwasu (*R,R*)-winowego ($K_a = 8.300$, enancjomer (*S,S*) $K_a = 5500$) (Schemat 2), dla którego limit detekcji wynosi tylko 0.019 mg/ml. Inne kwasy wykazują niższą niż kwasy winowe selektywność wiązania co stwarza możliwość jego oznaczania. Różnicowanie enancjomerów przy użyciu tej metodologii było dotąd rzadko spotykane a osiągnięta enancjoselektywność jedną z wyższych opisanych w literaturze. W pracy zademonstrowałem także wstępne badania pod kątem zastosowania tej metodyki w oznaczaniu kwasu winowego w napojach.



Schemat 2. Działanie sensora barwnikowego różnicującego enancjomery kwasu winowego;

Modyfikacje alkaloidów za pomocą chemii klik

W roku 2001 Meldal i Sharpless równocześnie opracowali katalizowaną jonami Cu(I) wariant 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, która szybko została rozpoznana jako cenne narzędzie łatwej modyfikacji związków organicznych. W reakcji tej bierze udział azydek oraz najczęściej terminalny alkin, które tworzą pięcioczłonowy pierścień 1,2,3-triazolu. Wobec katalitycznej ilości jonów miedzi (I) reakcja jest szybka oraz regioselektywna dając wyłącznie 1,4-podstawiony regioizomer triazolu (Schemat 3). Szczegóły koncepcji chemii klik, katalitycznej 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena oraz jej zastosowania przedstawiłem polskimi czytelnikom w pracy przeglądowej we *Wiadomościach Chemicznych*.



Schemat 3. 1,3-Dipolarna cykloaddycja Huisgena jako wzorcowa reakcja chemii klik.

Do roku 2004 pojawiła się jedna praca, w której modyfikowano cząsteczkę 10,11-didehydroalkaloidu za pomocą reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji. W tym też czasie rozpocząłem prace nad wykorzystaniem tej reakcji w chemii alkaloidów chinowca. Związki te są szczególnie dobrze predysponowane do tego typu modyfikacji ponieważ wymagane grupy funkcyjne tj. azydkową oraz acetylenową można łatwo zainstalować w pozycji 9 a także przekształcić grupę winylową w terminalną acetylenową. W związku z tym jako podstawowe substraty do dalszych przekształceń wybrałem 10,11-didehydroalkaloidy mające zamiast grupy winylowej grupę acetylenową oraz 9-azydo-(9-deoksy)alkaloidy z podstawnikiem azydkowym ułożonym w miejscu grupy hydroksylowej.

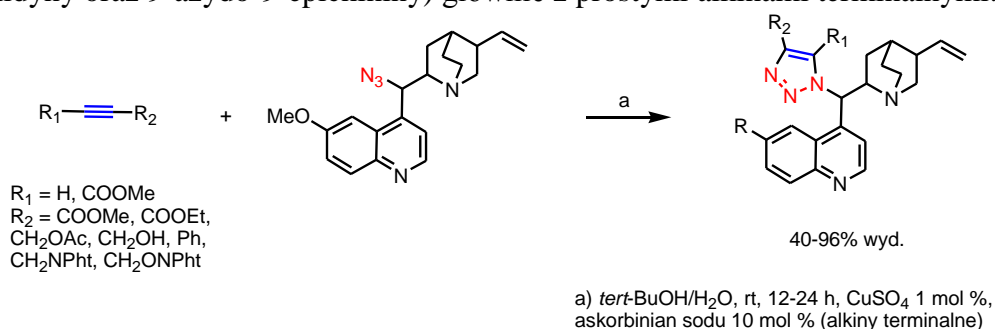
10,11-Didehydroalkaloidy były co prawda fragmentarycznie opisane w dawnej literaturze (bez analizy spektroskopowej) a także współcześnie przez Hoffmanna, który opublikował metodę ich syntezy oraz przekształceń. Niemniej w toku badań i analizy

chromatograficznej produktów okazało się, że przedstawiona procedura jest niepowtarzalna i mało wydajna. W związku z tym opracowałem nową metodę syntezy oraz analityki wszystkich czterech głównych 10,11-didehydroalkaloidów chinowca kierując się przede wszystkim jej powtarzalnością, prostotą oraz możliwościami zwiększenia skali. Reakcja syntezy bazuje na addycji bromu do grupy winylowej alkaloidu i dwóch następujących po sobie reakcjach eliminacji HBr. Warto dodać, że moja procedura nie wymaga oczyszczania chromatograficznego produktów, nie wykorzystuje CCl_4 jako rozpuszczalnika do bromowania (zastosowałem mniej problematyczny dichlorometan) i realizowana jest rutynowo nawet w kilkudziesięciogramowej skali z typowymi wydajnościami 50-60% (z naturalnych alkaloidów) oraz czystością przekraczającą 95%.

Z kolei 9-azydo-(9-deoksy)alkaloidy chinowca nie były dotychczas opisane, stanowiły jedynie nie izolowany produkt pośredni w użytecznej procedurze syntezy 9-amino-epialkaloidów bazującej na inwersji Mitsunobu z użyciem kwasu azotowodorowego jako nukleofila i następującej *in situ* redukcji azydków do amin. Przeprowadzone przeze mnie badania pokazały, że inwersja Mitsunobu może być wykorzystana do syntez azydków, jednak znacząco dogodniejszą drogą ich pozyskiwania w dużej skali jest opracowana przeze mnie dwuetapowa procedura obejmująca substytucję nukleofilową 9-O-mesylianów alkaloidów za pomocą azydku sodu. Wykorzystując opracowaną metodykę otrzymałem cztery 9-azydoalkaloidy o konfiguracji naturalnej i *epi* na C-9, wychodząc z chininy i chinidyny z wydajnościami 60-95% oraz oznaczyłem preferencje konformacyjne za pomocą spektroskopii ^1H NMR oraz modelowania molekularnego.

Badanie cykloaddycji klik

Dysponując 9-azydoalkaloidami jak również 10,11-didehydroalkaloidami mogłem przystąpić do następnego fragmentu badań dotyczącego dalszej modyfikacji tych pochodnych na drodze 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (chemia klik). Badania „rozpoznawcze” w tym zakresie rozpocząłem od otrzymania biblioteki prostych pochodnych 1,2,3-triazolowych alkaloidów w drodze reakcji trzech różnych 9-azydoalkaloidów (9-azydochinidyny, 9-azydo-9-epichinidyny oraz 9-azydo-9-epichininy) głównie z prostymi alkinami terminalnymi.



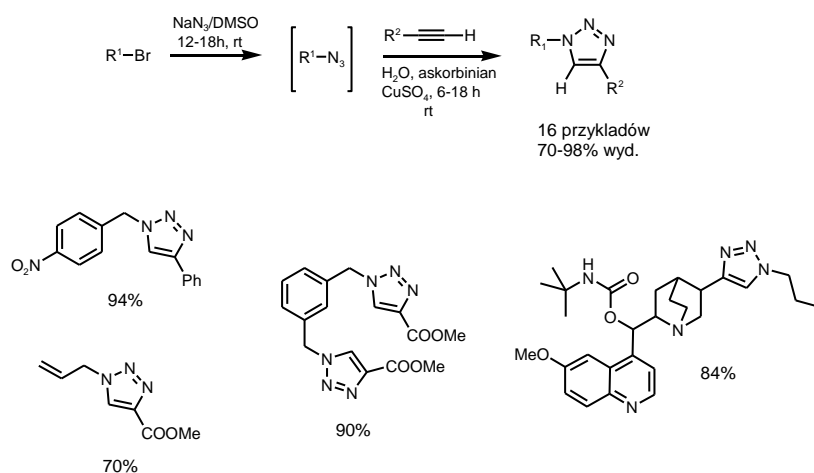
Schemat 4. Synteza pochodnych 1,2,3-triazolowych z 9-azydo-9-(deoksy)alkaloidów chinowca.

Skorzystałem z metodyki opublikowanej przez Sharplessa (Cu(I) generowany *in situ* poprzez redukcję CuSO₄ askorbinianem sodu). W kolejnych pracach reakcję tę wykorzystałem do otrzymania szeregu innych, bardziej złożonych pochodnych alkaloidów zawierających fragment 1,2,3-triazolowy. Z kolei 10,11-didehydroalkaloidy wykorzystane

zostały do syntez klik-koniugatów z 3'- oraz 5'-azydotymidyną, z których niektóre wykazują właściwości przeciwrakowe *in vitro* oraz silną fluorescencję.

Struktura pochodnych 1,2,3-triazolowych została oznaczona dla niektórych krystalicznych koniugatów za pomocą dyfrakcji promieniowania rentgenowskiego oraz modelowania molekularnego. Jest ona bardzo zachowawcza i związki te zachowują konformację macierzystych alkaloidów odpowiedniego szeregu konfiguracyjnego. I tak, preferowaną konformacją koniugatów triazol-alkaloid o konfiguracji naturalnej jest konformacja zamknięta (choć bariera energetyczna między konformacją otwartą nie jest wysoka). Analogiczne koniugaty zawierające alkaloid o konfiguracji 9-*epi* preferują wyłącznie konformację otwartą zarówno *syn* i *anti*.

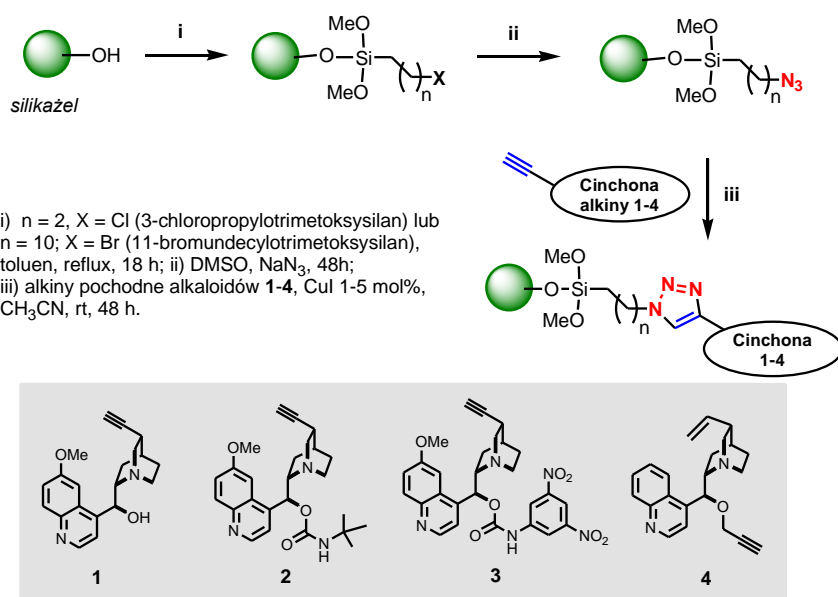
Rozszerzeniem prac dotyczących syntetycznej chemii klik było opracowanie procedury syntezy 1,2,3-triazoli, w której potencjalnie niebezpieczny azydek generowany jest *in situ* z ogólnie dostępnych halogenków alkilowych i benzyłowych a następnie bez izolacji przekształcany w odpowiedni 1,2,3-triazol przy zachowaniu łatwości wykonania reakcji i bezpieczeństwa. Zaproponowana przeze mnie procedura do azydowania halogenków (ulegających substytucji nukleofilowej) wykorzystuje azydek sodu rozpuszczony w DMSO. W czasie 12-18 godzin w temperaturze pokojowej obserwuje się praktycznie ilościową konwersję halogenków do azydków, które po dodaniu wody, alkinu oraz katalitycznej ilości CuSO_4 i askorbinianu, można przekształcić *in situ* w odpowiednie 1,2,3-triazole z wysoką wydajnością. Warto wspomnieć, że w tych warunkach, po zakończeniu reakcji cykloaddycji większość triazoli wytrąca się po dodaniu wody i mogą być one izolowane przez zwykłe sączenie. Reakcja ta jest ogólna dla halogenków alkilowych i benzyłowych a użyteczność tej metody została także zademonstrowana w chemii alkaloidów chinowca (Schemat 5).



Schemat 5. Synteza 1,2,3-triazoli z halogenków alkilowych i benzyłowych

Opracowanie nowej metody immobilizacji alkaloidów do podłoża (Schemat 6)

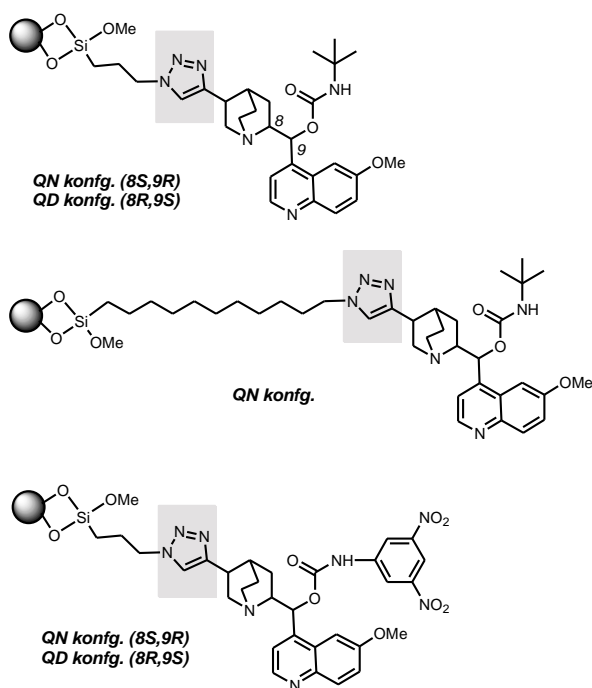
10,11-Didehydroalkaloidy są dobrymi kandydatami do immobilizacji alkaloidów chinowca i ich pochodnych z wykorzystaniem zalet chemii klik (pozbawionej ograniczeń immobilizacji za pomocą rodnikowej addycji tioli do grupy winylowej alkaloidu). Nowa metodyka wykazuje szereg zalet (Schemat 6) oraz charakteryzuje się prostotą wykonania.



Schemat 6. Immobilizacja alkaloidów metodą chemii klik

Otrzymanie nowych faz chiralnych do chromatografii cieczowej zawierających łącznik triazolowy

Opracowana procedura immobilizacji klik została następnie wykorzystana do otrzymania chiralnych faz stacjonarnych bazujących na selektorach pochodnych alkaloidów kory chinowca. Nowe fazy stacjonarne, które otrzymałem i badałem zebrane są na Schemacie 7. Fazy te zawierały jako selektory *tert*-butylokarbaminan chininy oraz chinidyny w ilości ~200 $\mu\text{mol/g}$ silikazelu oraz dwa rodzaje łańcucha węglowego z trzema i jedenastoma atomami węgla. Fazy te zostały szczegółowo porównane z fazami zawierający identyczny selektor lecz związanymi z podłożem za pomocą łącznika tioeterowego.



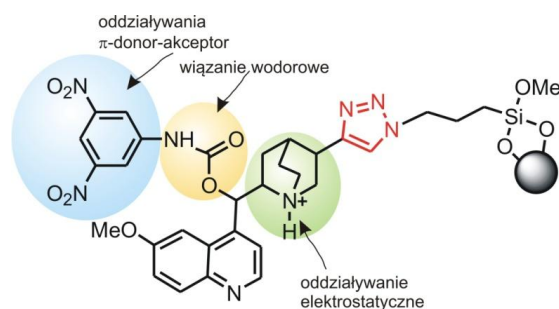
Schemat 7. Wybrane przykłady nowych chiralnych faz stacjonarnych otrzymanych metodą immobilizacji klik.

Do porównania właściwości faz stacjonarnych wybrałem zestaw 20 racemicznych kwasów organicznych reprezentujących różne klasy związków (aminokwasy, hydroksykwasy etc.) oraz trzy typowe dla faz jonowymiennych układy chromatograficzne, a mianowicie polarno-organiczny (MeOH:AcOH:NH₄OAc 98:2:0.5 v/v/m i ACN, 10 mM TEA, 160 mM AcOH) oraz faz odwróconych (MeOH, NH₄OAc aq, 0.025 mM, 80:20, pH_a 5.85). Badania porównawcze wykazały, że nowy typ łącznika nie ingeruje w procesy rozpoznania chiralnego i w większości przypadków efektywność rozdzielów pozostaje zbliżona. Ponadto efektywność rozdzielów pozostaje podobna niezależnie od długości łańcucha węglowego między podłożem a chiralnym selektorem oraz, że stosując *tert*-butylokarbaminin chininy bądź chinidyny zachowany zostaje pseudoenancjomeryczny charakter różnicowania analitów (tzn. że zastosowanie pseudoenancjomerycznego selektora odwraca kolejność elucji enancjomerów analitów).

Uzupełnieniem badań nad nowym rodzajem immobilizacji i łącznika było określenie jego adsorpcji niespecyficzej (odpowiada za oddziaływania niepożądane i niedyskryminujące enancjomery, wydłużające retencję związku w kolumnie). Pomiar pokazały, że faza zawierająca reszty 3-azydopropylowe (grupy te znajdują się w wypełnieniach kolumn także po immobilizacji liganda) wykazuje niewielką adsorpcję niespecyficzną, zwłaszcza w najpopularniejszych układach polarno-organicznych. Natomiast pochodna faza (otrzymana przez immobilizację 1-pentynu) zawierająca łącznik 1,2,3-triazolowy wykazuje średnio 80% redukcję adsorpcji niespecyficzej fazy wyjściowej. Stanowi to wynik bardzo dobry z punktu widzenia zastosowań chromatograficznych, wskazując, że łącznik 1,2,3-triazolowy przy swojej trwałości chemicznej jest także inertny w zakresie adsorpcji niespecyficzej. Warto dodać, że są to dotychczas jedyne tego rodzaju badania łącznika triazolowego, który staje się coraz bardziej popularny w chromatografii.

Kontynuując szczegółowe badania nowych faz w odniesieniu do innych racemicznych kwasów okazało się, że nowe fazy z łącznikiem 1,2,3-triazolowym w przeciwieństwie do faz immobilizowanych za pomocą tioeterów wykazują większą selektywność dla kwasu migdałowego i jego pochodnych, umożliwiając ich efektywny rozdział na enancjomery.

Rozszerzeniem badań było otrzymanie fazy zawierającej jako selektor 3,5-dinitrofenylokarbamoilochininę immobilizowaną na krzemionce za pomocą łącznika 1,2,3-triazolowego. Fragment 3,5-dinitrofenylowy w cząsteczce selektora jest silnym ugrupowaniem π -akceptorowym toteż taka hybrydowa faza może wykazywać większe powinowactwo do substratów π -donorowych, rozszerzając w ten sposób spektrum zastosowań faz opartych o alkaloidy chinowca. Warto zaznaczyć, że selektor ten nie może być immobilizowany na drodze klasycznej z uwagi na niekompatybilność chemiczną grupy nitrowej i tiolowej (obserwuje się szereg produktów ubocznych). Immobilizacja klik w tym przypadku rozwiązuje problem a otrzymana faza w zgodzie z przyjętymi założeniami istotnie wykazuje zwiększoną selektywność wobec zbadanych dwóch klas analitów o znaczeniu przemysłowym i farmakologicznym – kwasów aryloksykarboksylowych (herbicydy) oraz profenów (niesteroidowe leki przeciwzapalne) (Schemat 8).

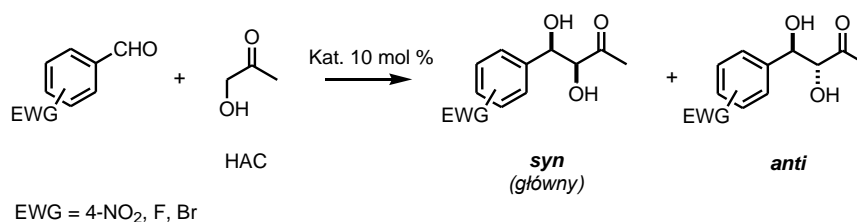


Schemat 8.

Asymetryczna reakcja aldolowa katalizowana winianami 9-epi-9-aminoalkaloidów

Niedawnym rozszerzeniem badań wykorzystujących pochodne alkaloidów jest katalityczna synteza asymetryczna. W tym zakresie interesują mnie zwłaszcza stereoselektywne przekształcenia substratów pozyskiwanych ze źródeł odnawialnych takich jak acetol (hydroksyaceton). Acetol może być wykorzystany jako donor w bezpośredniej reakcji aldolowej dając w zależności od katalizatora i warunków reakcji dwa typy produktów – „liniowy” (para enancjomerów) i „rozgałęziony” (dwie pary enancjomerów *syn* i *anti*). Przyczynkiem do eksploracji reakcji aldolowej acetolu stała się niedawno opublikowana praca Młynarskiego, który pokazał, że zastosowanie rodzimych alkaloidów do bezpośredniej reakcji aldolowej daje produkty z niewysoką wydajnością oraz indukcją asymetryczną. Założyłem, że zastosowanie pierwszorzędowych amin pochodnych alkaloidów może dać lepsze wyniki z uwagi na możliwy mechanizm enaminowy aktywacji związków karbonylowych. Z drugiej strony okazało się, że 9-amino-9-deoksyalkaloidy chinowca jako organokatalizatory reakcji aldolowej i pokrewnych są stosunkowo mało zbadane.

Przeprowadzone badania rozpoznawcze reakcji aldolowej hydroksyacetonu z aktywowanymi aldehydami aromatycznymi przy użyciu różnych 9-aminoalkaloidów i warunków reakcji pozwoliły zidentyfikować najaktywniejsze katalizatory, którymi są (*R,R*)-diwiniany lub ditrifluorooctany 9-amino-9-deoksyalkaloidów chinowca. Sól kwasu winowego okazała się dogodniejsza od trifluorooctanu ponieważ może być łatwo otrzymywana i przechowywana (nie bez znaczenia była także „wartość dodana” procedury wynikająca z użycia taniego, bezpiecznego i naturalnego kwasu winowego). Produktem reakcji aldolowej są wyłącznie „rozgałęzione” *syn*-aldole, który powstają ilościowo, z indukcją asymetryczną dochodzącą do 90% ee i przeciętną diastereoselektywnością do 1:8.7 dla *syn* (Schemat 9).



Schemat 9. Reakcja aldolowa hydroksyacetonu katalizowana winianami 9-amino-9-(detoksy)alkaloidów chinowca.

Dodatkowymi zaletami prezentowanej metodologii jest fakt, że w reakcji nie stosuje się dodatkowego rozpuszczalnika (jest nim aceton), problematycznych reagentów oraz, że izolacja produktów nie wymaga stosowania chromatografii kolumnowej ponieważ w jej miejsce można z powodzeniem zastosować ekstrakcję. Dodatkowo użycie katalizatorów pochodnych cynchoniny lub chininy daje dostęp do obu enancjomerów aldoli, których konfiguracja absolutna została określona na podstawie pomiarów dyfrakcji rentgenowskiej. Nieperfekcyjna wysokość indukcji asymetrycznej oraz diastereoselektywność reakcji może być łatwo podwyższona poprzez jednokrotną i powtarzalną krystalizację aldoli z mieszaniny octan etylu-heksan. W ten sposób można otrzymać czyste *syn*-aldole (50:1 *syn/anti*) charakteryzujące się 99% nadmiarem enancjomerycznym z dobrą wydajnością 35-60% (z aldehydu). Reakcje te mogą być dogodnie prowadzone w dużej skali i stanowią atrakcyjną drogę syntezy takich *syn*-aldoli.

Najważniejsze osiągnięcia pracy

1. opracowanie efektywnego sensora barwnikowego różnicującego enancjomery kwasu winowego.
2. opracowanie nowej metody immobilizacji alkaloidów chinowca (i innych alkinów) na żelach krzemionkowych bazującej na reakcji klik.
3. Otrzymanie nowych faz chiralnych oraz wyjaśnienie właściwości łącznika 1,2,3-triazolowego w zastosowaniach chromatograficznych.
4. Rozwój preparatywnej chemii alkaloidów za pomocą reakcji klik.