

## ANALIZA SPEKTRALNA I FUNGISTATYCZNA NOWYCH POCHODNYCH N-BENZYLOCYTYZYNY

**ANNA K. PRZYBYŁ,<sup>a</sup> MACIEJ KUBICKI,<sup>a</sup> PATRYCJA W. KWAŚNIEWSKA,<sup>b</sup>  
GRZEGORZ COFTA<sup>b</sup>,** <sup>a</sup> Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul.  
Umultowska 89b, 61-614 Poznań, <sup>b</sup> Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska  
Polskiego 38/42, 60-637 Poznań.

**Abstrakt:** W celu analizy zależności pomiędzy właściwościami spektralnymi, a strukturą molekularną i aktywnością biologiczną, w tym fungistatyczną alkaloidów chinolizydynowych, otrzymano nowe pochodne bioaktywnej cytyzyny nitro i halogeno-*N*-benzylocytyzyny. Nowe związki zostały przebadane spektralnie: EI-MS, NMR, X-ray oraz poddane zostały testowi na działanie inhibicyjne przeciwko mikrogrzybom, powodującym zjawisko pleśnienia (*Aspergillus niger* van Tieghem). Okazało się, że spośród przebadanych nowych pochodnych tylko *N*-benzylocytyzyny z podstawnikami halogenowymi w pozycji meta i para wykazały działanie fungistatyczne.

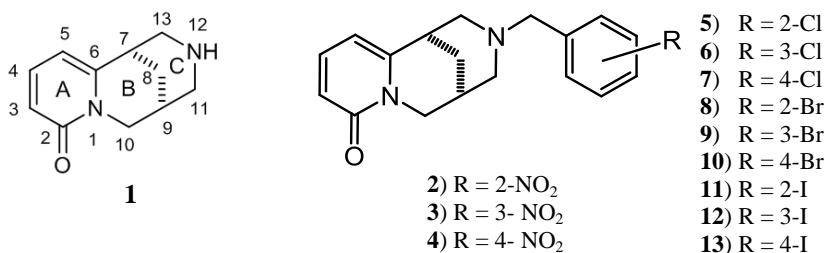
**Wprowadzenie:** Pochodne chinolizydynowe, w tym trój- i czterocykliczne nazywane również alkaloidami łubinowymi, budzą szerokie zainteresowanie ze względu na ich właściwości biologiczne i biochemiczne. Na podstawie licznych badań stwierdzono, że pełnią one szereg użytecznych funkcji biologicznych, a z doniesień literaturowych wynika, że odgrywają w roślinie rolę "broni chemicznej" przed patogenami i owadami. Ich stężenie zwykle jest większe w znaczących dla przetrwania i reprodukcji organach rośliny, a zawartość alkaloidów w tkance okrywającej wzrasta lokalnie w momencie zranienia.[1] Stąd też zdecydowaliśmy się na badanie pochodnych (-)cytyzyny jako potencjalnych naturalnych fungicydów w walce z mikrogrzybami, które rozwijają się na niemal wszystkich niezabezpieczonych materiałach organicznych i nieorganicznych. Atakują także materiał lignocelulozowy, jakim jest drewno. Ograniczenie rozwoju tych drobnoustrojów stanowi istotny problem nie tylko ze względów ekologicznych, ale również zdrowotnych. Infekcje grzybicze stanowią ciągłe i poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Mogą wywoływać między innymi u niego reakcje alergiczne, a także powodować przewlekłe choroby, poprzez wydzielane przez strzępki pleśni mykotoksyny.[2] Dominującymi sposobami zabezpieczania drewna przed biodegradacją jest stosowanie środków chemicznych, które niosą ze sobą ryzyko skażenia naturalnego środowiska. W pewnych stężeniach mogą być one toksyczne i przez to stanowią zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt.[3] Z uwagi na to, aktualnie poszukuje się alternatywy dla syntetycznych pestycydów, a rośliny stanowią doskonałe źródło biologicznie aktywnych produktów naturalnych o właściwościach grzybobójczych. Pozytywne wyniki hamowania wzrostu mikrogrzybów uzyskano dla potencjalnych fungicydów, do których można zaliczyć alkaloidy chinolizydynowe. Wcześniejsze badania pochodnych cytyzyny i sparteiny dowiodły, że posiadają one właściwości fungistatyczne względem grzybów *Chaetomium globosum* i *Trichoderma harzianum*. [4] Przeprowadzono w podobny sposób testy przesiewowe cytyzyny i jej pochodnych względem mikrogrzybów powodujących pleśnienie drewna jak: *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium cyclopium*, które przyniosły także korzystny rezultat.[5]

Przedstawiona praca jest częścią projektu mającego na celu analizę zależności pomiędzy właściwościami spektralnymi, a strukturą molekularną i rozkładem ładunku

elektronowego jak i aktywnością biologiczną, w tym fungistatyczną alkaloidów chinolizydynowych., w szczególności (-)-cytyzyny i jej pochodnych.

**Część eksperymentalna:** (-)-Cytyzynę (**1**) wyizolowano z nasion złotokapu (*Laburnum anagyroides*).[6,7] W tej pracy omówione zostaną pochodne benzytowe (-)-cytyzyny, które zostały otrzymane zostały na drodze syntezy cytyzyny (**1**) z odpowiednimi pochodnymi nitro i halogeno-bromobenzylowymi pochodnymi z zastosowaniem promieniowania mikrofalowego (DMF; 120°C; 300W). Otrzymane związki analizowano za pomocą NMR, EI-MS, jak i poddając analizie rentgenograficznej. Pomiary widm masowych EI-MS wykonano na spektrometrze AMD Intectra GmbH (Harpsted, Germany) model 402. GC-MS analizy przeprowadzono na chromatografii GC CP3800 sprzężonym ze spektrometrem Varian 4000MS. Widma NMR zmierzono na aparacie Bruker ADVANCE II 600 MHz. Związki mierzone były w roztworach CDCl<sub>3</sub> (w odniesieniu do TMS). Do przeprowadzenia pomiarów X-ray użyto dyfraktometru Supernowa (z detektorem Atlas) oraz Excalibur E firmy Agilent oraz programu sterującego dyfraktometrem CrysAlisPro.

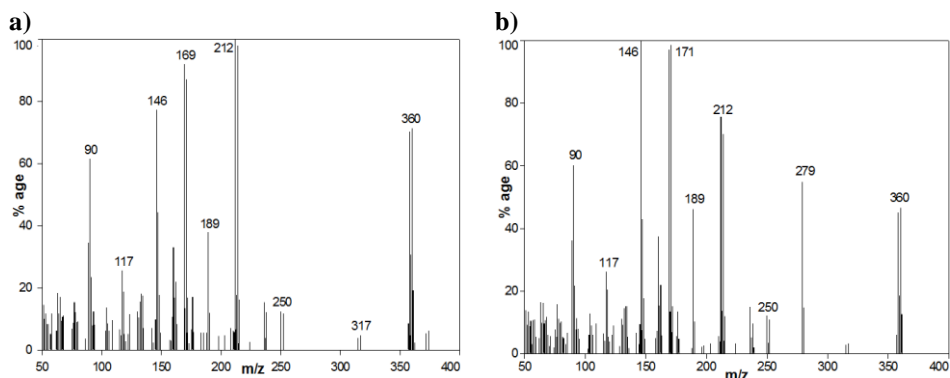
Do szybkiej identyfikacji potencjalnych fungicydów zastosowano metodę skringową bazującą na bioautografii-TLC, która łączy detekcję mikrobiologiczną z chromatografią cienkowarstwową. Badania prowadzono wobec zarodników mikrogrzyba (*Aspergillus niger* van Tieghem). Próbą jest handlowy środek grzybobójczy IPBC (3-jodo-2-propynylo-N-butylokarbaminian). Najefektywniejsze działanie grzybobójcze alkaloidów oznaczono przy 100% redukcji wzrostu grzybni (LD<sub>100</sub>).



**Rysunek 1.** Struktura (-)-cytyzyny (**1**) oraz *N*-benzytowych pochodnych (-)-cytyzyny (**2-13**)

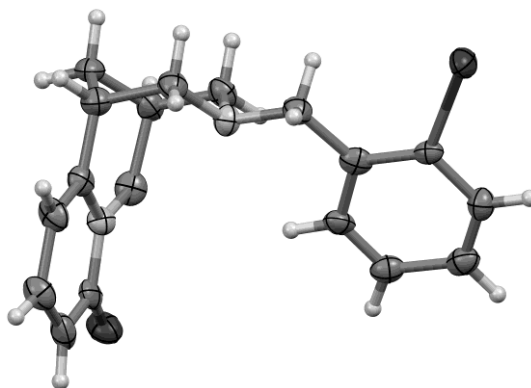
**Wyniki:** Przedstawiona praca jest częścią projektu mającego na celu rozszerzenia zasobów biblioteki pochodnych (-)-cytyzyny jako potencjalnych fungicydów. W tym celu, na drodze reakcji omawianego alkaloidu jako substratu z odpowiednim pochodnymi bromku benzyłu otrzymano halogenowe i nitrowe pochodne *N*-benzylocytyzyny, które zostały scharakteryzowane metodami spektralnymi. Analiza MS wykazała obecność odpowiednich jonów molekularnych M<sup>+</sup> dla poszczególnych związków, przy czym, szczegółowa analiza widm spektroskopii mas nitro (**2-4**) oraz halogeno-pochodnych *N*-benzylocytyzyny (**5-13**) wykazała zaskakujące różnice jonów fragmentarycznych, które pozwalają na rozróżnienie izomerów położeniowych tylko na podstawie samych widm EI-MS, a w szczególności jonu m/z=279 (C<sub>18</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>1<sup>+</sup>) powstałego na skutek oderwania jonu nitrowego (**2-4**) i halogenowego (**5-13**). Na przykładzie bromopochodnych **9** i **10** przedstawionych na Rys. 2. wyraźnie widać, że izomer *para* (**10**) charakteryzuje się intensywnym jonem o m/z=279 (58%), podczas gdy na widmie izomeru *meta* (**9**) nie jest on obserwowany (Rys.2). Natomiast, na widmie

izomeru *orto* (**8**) widoczny jest ten jon ale niższej intensywności w stosunku do izomeru *para* (tu 27%). Przeważnie jest to połowa intensywności jonu z izomeru *para*.



**Rysunek 2.** Widma EI-MS **a)** meta-bromo-*N*-benzocytyzyny (**9**), **b)** para-bromo-*N*-benzocytyzyny (**10**).

Otrzymane związki zostały również poddane analizie  $^{13}\text{C}$  i  $^1\text{H}$ -NMR. Wartości przesunięć chemicznych atomów węgla i protonów zostały zestawione z wartościami przesunięć chemicznych *N*-benzocytyzyny [6] i potwierdziły brak silnych oddziaływań podstawników, które mogłyby prowadzić do zmiany konformacji pierścienia C. A zatem nie obserwuje się zmian konformacji w roztworze i jest ona taka sama jak i w ciele stałym (Rys. 3)



**Rysunek 3.** Struktura pochodnej 2-jodo-*N*-benzocytyzyny w obrazie elipsoid drgań termicznych (50% prawdopodobieństwa).

**Badania biologiczne:** Celem badań było przeprowadzenie analiz przesiewowych na aktywność fungistatyczną pochodnych *N*-benzocytyzyny (**2-10**) względem mikrogrzybów testowych. Wyniki badań nad aktywnością grzybobójczą przedstawiono w Tabeli 1.

**Wnioski:** Dzięki testom skringowym możemy wyselekcjonować związki, których pochodne w przyszłości mogą posłużyć do wygenerowania nowych biocydów. Na podstawie powyższych rezultatów przeprowadzone zostaną dalsze badania na poziomie molekularnym, w celu zrozumienia wiązania się fungicydu z receptorem białkowym.

Umożliwią one w przewidzeniu struktury związku chemicznego oraz częściowo w wyborze molekuł, które charakteryzować się będą aktywnością fungistatyczną. Wykorzystując alkaloidy chinolizydynowe jako potencjalne fungicydy pochodzenia naturalnego, będziemy mogli zapewnić długotrwałe stosowanie drewna, nie szkodząc przy tym zdrowiu ludzi i zwierząt oraz środowisku naturalnemu.

**Tabela 1.** Średnie wartości wskaźników pokrycia próbek podczas inkubacji. 0- brak wzrostu grzybni na próbce (LD<sub>100</sub>); 1- wzrost strzępek grzybni bez zarodników; 2- wzrost strzępek grzybni z zarodnikami.

L.p	nazwa	24 h	2 dni	3 dni	4 dni	5 dni	7 dni
2	2-nitro-benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
3	3-nitro-benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
4	4-nitro-benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
5	2-chloro-benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
6	3-chloro-benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
7	4-chloro-benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
8	2- bromo -benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
9	3- bromo -benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
10	4-bromo-benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
11	2-jodo-N-benzylocytyzyna	1	2	-	-	-	-
12	3-jodo-benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
13	4-jodo-benzylocytyzyna	0	0	0	0	0	0
	Próba kontrolna	1	2	-	-	-	-

### Podziękowania:

Projekt finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju z Funduszy Norweskich (Norway Grants) w ramach Programu Badań Polsko-Norweskich: Pol-Nor/203119/32/2013), pt.: *"Superior bio-friendly systems for enhanced wood durability"*.

### Literatura:

- [1] M. Wink, *Planta Medica* 53 (1987) 509-514
- [2] A. Krajewski, P. Witomski, *Ochrona drewna surowca i materiału*, Warszawa (2005) 12-110
- [3] M.J. Abad, M. Ansuategui, P. Bermejo, *Arkivok* (2007) 7, 116
- [4] W. Wysocka, A. Przybył, G. Cofta, K. Lutomski, *Prace Komisji Technologii Drewna* 15 (1997) 101-107
- [5] G. Cofta, A.K. Przybył, S. Głogowski, E. Napierała, *Forestry and Wood Technology* 63 (2008) 137-140
- [6] A.K. Przybył, M. Kubicki, *J. Mol. Struct.* 985 (2011) 157-166.
- [7] E. Marriere, J. Rouden, V. Tadino, M.-C. Lasne, *Org. Lett.* 8 (2000) 1121-1124.