

SYNTEZA I ANALIZA STRUKTURALNA 15-SELENSPARTEINY I PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI FUNGISTATYCZNYCH Z INNYMI POCHODNYMI SPARTEINY

P.W. KWAŚNIEWSKA^a, B. JASIEWICZ^b, U. RYCHLEWSKA^b, G. COFTA^a,
A.K. PRZYBYŁ^b, ^a Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego
38/42, 60-637 Poznań, ^b Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, ul.
Umultowska 89b, 61-614 Poznań

Abstrakt: W wyniku utlenienia sparteiny (**1**) otrzymano (-)15-oksosparteinę (**2**), którą w reakcji z odczynnikiem Woollinsa przekształcono w (-)15-selenosparteinę (**3**), związek o potencjalnej aktywności biologicznej. Produkt został scharakteryzowany za pomocą spektroskopii (IR, ESI-MS, NMR) oraz analizy RTG, a wyniki zostały porównane z obliczeniami molekularnymi. 15-Selenosparteina poddana została testowi na działanie inhibicyjne przeciwko mikrogrzybom powodującym zjawisko pleśnienia (*Aspergillus niger* van Tieghem) razem z innymi pochodnymi sparteiny.

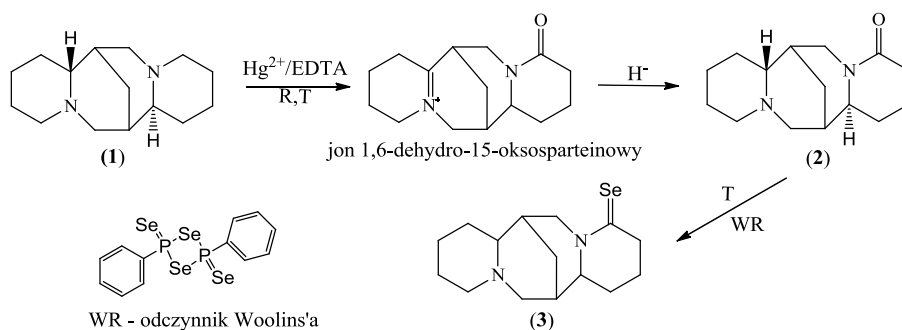
Wprowadzenie: Aktywność biologiczna związków selenoorganicznych cały czas wzbudza ciekawość, ze względu na znaczącą rolę jaką odgrywa sam pierwiastek w funkcjonowaniu organizmu. Selen w organizmie ludzkim spełnia zarówno ważną rolę strukturalną jak i enzymatyczną. Stanowi integralną część enzymu peroksydazy glutationowej, która bierze udział w systemie antyoksydacyjnym organizmu człowieka m.in. broni komórki przed uszkodzeniami, hamuje fazę inicjacji kancerogenezy oraz rozwój nowotworu, a także odpowiada za elastyczność tkanek opóźniając ich starzenie [1]. Podobnym zainteresowaniem ze względu na właściwości biologiczne i biochemiczne, cieszą się również alkaloidy chinolizydynowe. Do poznanych wcześniej cech farmakologicznych tych związków możemy zaliczyć m.in. działanie pobudzające mięśni gładkich, właściwości hipoglikemiczne, hipotensyjne oraz antyarytmiczne [2]. Na podstawie licznych badań stwierdzono, że pełnią one szereg użytecznych funkcji biologicznych, a z doniesień literaturowych wynika, że mogą odgrywać rolę "broni chemicznej" przed patogenami i owadami [3].

W czasach ekspansji ekotoksykologicznych wymagań względem ludzi oraz środowiska, poszukuje się alternatywy dla syntetycznych pestycydów, a rośliny stanowią doskonałe źródło biologicznie aktywnych produktów naturalnych o właściwościach grzybobójczych. Być może poprzez połączenie selenu z równie aktywną sparteiną otrzymamy cząsteczkę o nowych cennych właściwościach biologicznych.

Część eksperymentalna: Na drodze utlenienia wolnej zasady sparteiny (**1**) za pomocą wersenianu rtęci (II), otrzymany został nadchloran 15-oksosparteiny. Następnie została przygotowana wolna zasada 15-oksosparteiny (**2**), która ostatecznie w reakcji z odczynnikiem Woollinsa posłużyła do uzyskania produktu końcowego **3** (Rys.1). Pomiar ESI-MS wykonano na spektrometrze mas Waters/Micromass, analizę ¹³C i ¹H-NMR (CDCl₃) przeprowadzono na spektrometrze Varian Mercury 300 MHz. Pozostałe związki przedstawione w tej pracy otrzymane zostały wg. opisów literaturowych [4]. Parametry geometryczne 15-selenosparteiny (**3**) otrzymane metodami spektroskopowymi i za pomocą analizy X-ray, porównano z parametrami uzyskanymi za pomocą symulacji komputerowych. W tym celu, korzystając z pakietów programu

Gaussian 03W, wykonano odpowiednie obliczenia za pomocą metody DFT/B3LYP w bazie funkcyjnej 6-31G(d,p) [5].

Wyniki: Powyższe badania miały na celu poszerzenie biblioteki pochodnych alkaloidów bis-chinolizydynowych. W wyniku reakcji wolnej zasady 15-oksosparteiny (**2**) ze znanym odczynnikiem Woollinsa karbonylowy atom tlenu przy atomie C-15 zastąpiony został atomem selenu. Produkt końcowy otrzymano z wydajnością 91%.



Rysunek 1. Schemat syntezy 15-selenosparteiny

Analiza ESI-MS wykazała obecność jonu molekularnego $[M^+]$ przy $m/z = 311$ o intensywności 40%, który występuje w postaci kilku sygnałów, pochodzących od jonów o tym samym składzie pierwiastkowym, ale zbudowanym z kilku izotopów selenu (^{74}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se i ^{82}Se). Sygnał przy $m/z = 335$ pochodzi od jonu $[M+\text{Na}+\text{H}]^{2+}$, natomiast jon fragmentacyjny $[M+2\text{H}]^{2+}$ widoczny przy $m/z = 236$ i intensywności 100% wywodzi się od jonu $[\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{N}_2]^{2+}$.

Na widmie w podczerwieni 15-selenosparteiny widoczne są sygnały pochodzące od drgań, przedstawionych w Tabeli 1. Wyraźnie widzimy brak sygnału pochodzącego od drgania rozciągającego $\text{C}=\text{O}$, obserwujemy pasmo od drgań $\text{C}=\text{Se}$.

Tabela 1. Drgania charakterystyczne dla 15-selenosparteiny (**3**)

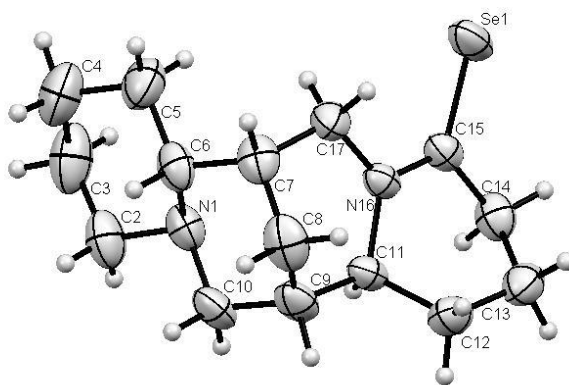
Wiązanie	Typ drgania	Częstości drgań i intensywność (cm^{-1})
N-H	rozciągające	3100 - 3000 bardzo silne
C-H	rozciągające	2950 – 2871 bardzo silne
C-H	zginające lub nożycowe	1523 – 1474 silne
C-H	kołyszące CH_2	1386 – 1360 średnie
C-N	rozciągające	1245–1186 silne
C=Se	rozciągające	1150 - 1175 średnie

15-Selenosparteina została również poddana analizie ^{13}C i ^1H -NMR. Wartości przesunięć chemicznych atomów węgla 15-selenosparteiny zostały zestawione z wartościami przesunięć chemicznych znanych wcześniej okso- i tiopochodnej sparteiny, a także porównane z wynikami obliczeń kwantowo-mechanicznych (Tabela 2).

Tabela 2. Zestawienie sygnałów ^{13}C -NMR 15-oksosparteiny [6], 15-tiosparteiny [7] i 15-selenosparteiny

C	I 15- oxoSp	II 15- oxoSp	$\Delta\delta\text{C}$ (ppm)	I 15-sSp	II 15-sSp	$\Delta\delta\text{C}$ (ppm)	I 15- seSp	II 15- seSp	$\Delta\delta\text{C}$ (ppm)
2	56.2	47.8	-8.4	56.0	47.3	-8.7	55.9	46.3	-9.6
3	25.8	19.5	-6.3	25.5	18.0	-7.5	25.5	17.9	-7.6
4	24.6	18.5	-6.1	24.3	17.6	-7.6	24.3	16.7	-2.8
5	29.5	22.8	-6.7	29.5	22.0	-7.5	29.5	21.5	-8.0
6	65.8	56.5	-9.3	65.3	56.1	-9.2	65.2	55.6	-9.6
7	32.1	27.4	-4.7	32.5	26.9	-5.6	32.6	26.5	-6.1
8	27.3	21.5	-5.8	27.3	20.7	-6.6	27.4	19.7	-7.7
9	36.5	31.5	-5.0	36.7	31.8	-4.9	36.6	31.9	-4.7
10	61.5	53.5	-8.0	61.2	52.4	-8.8	62.2	51.9	-10.9
11	58.6	51.9	-6.7	61.1	53.1	-8.0	60.9	53.6	-7.3
12	32.1	26.4	-5.7	31.3	25.8	-5.5	31.1	25.3	-5.8
13	20.0	15.9	-4.1	18.3	14.0	-4.3	18.4	13.4	-5.0
14	32.7	25.8	-6.9	42.2	27.9	-14.3	45.9	33.3	-12.6
15	170.6	149.8	-20.8	200.1	179.7	-20.4	202.7	189.7	-13.0
17	40.2	32.7	-7.5	49.9	34.8	-15.1	54.7	39.3	-15.4

I – dane spektroskopowe, II – dane teoretyczne



Rysunek 1. Struktura krystalograficzna 15-selenosparteiny

Badania biologiczne: Celem badań było przeprowadzenie analiz przesiewowych na aktywność fungistatyczną pochodnych sparteiny w tym (-)-15-selenosparteiny (**3**). Porównano następujące związki: (-)-sparteinę (**1**), (\pm)-sparteinę (**1a**), (+)-sparteinę (**1b**), (-)-15-oksosparteinę (**2**), (-)-15-selenosparteinę (**3**), 15-tiosparteinę (**4**), (-)-lupaninę

(5), (±)-lupaninę (5a), oraz (+)-lupaninę (5b). Wyniki badań nad aktywnością grzybobójczą alkaloidów bis-chinolizydynowych i ich pochodnych względem mikrogrzybów testowych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Średnie wartości wskaźników pokrycia próbek podczas inkubacji

L.p	24h	48h	72h	7 dni	L.p	24h	48h	72h	7 dni
1	0	2	2	2	4	0	2	2	2
1a	0	0	0	0	5	0	2	2	2
1b	0	2	2	2	5a	0	1	2	2
2	0	2	2	2	5b	0	2	2	2
3	0	0	0	0	k	1	2	2	2

0-brak wzrostu grzybni na próbce (LD₁₀₀), 1- wzrost strzępek grzybni bez zarodników, 2- wzrost strzępek grzybni z zarodnikami, k – próba kontrolna

Wnioski: Wnikliwa analiza widm magnetycznego rezonansu jądrowego potwierdza konformacyjne podobieństwo 15-selenosparteiny do 15-okso- i 15-tiosparteiny. 15-Selenosparteina (3) zbudowana jest z pełno krzesłowego układu *trans*-chinolizydyny oraz pierścieni C/D, gdzie pierścień C przyjmuje konformację sofy, a pierścień D konformację łodziową. Program Gaussian 03W wygenerował strukturę cząsteczki 15-selenosparteiny o najniższej energii całkowitej, która występuje w konformacji *trans*-chinolizydyny krzesło/krzesło/sofa/łódź.

Wszystkie wybrane w teście przesiewowym alkaloidy bis-chinolizydynowe, wykazały działanie inhibicyjne przeciwko mikrogrzybom powodującym zjawisko pleśnienia (*Aspergillus niger* van Tieghem). Dzięki testom skringowym możemy wyselekcjonować związki, których pochodne w przyszłości mogą posłużyć do wygenerowania nowych środków ochrony drewna pochodzenia naturalnego, aby zapewnić długotrwałe stosowanie tego materiału, nie szkodząc przy tym zdrowiu ludzi oraz środowisku naturalnemu.

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.: Bio-przyjazne środki ochrony drewna zwiększające jego trwałość.

Literatura:

1. M.P. Rayman, Lancet 356 (2000) 233-241.
2. M. Wink, Alkaloids: biochemistry, ecology and medicinal applications, Ed. Plenum Press. 11, New York (1998) 265.
3. M. Wink, Planta Medica 53 (1987) 509-514.
4. A.K. Przybył, M. Kubicki, Tetrahedron 67 (2011) 7787-7793.
5. M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, i inni. *Gaussian 03, Revision D.01*, Gaussian, Inc., Wallingford CT, (2004)
6. B. Jasiewicz, Molecules 13 (2008) 3-10.
7. T. Borowiak, G. Dutkiewicz, W. Wysocka, R. Kolanos, J. Mol. Struct. 647 (2003) 287-294.