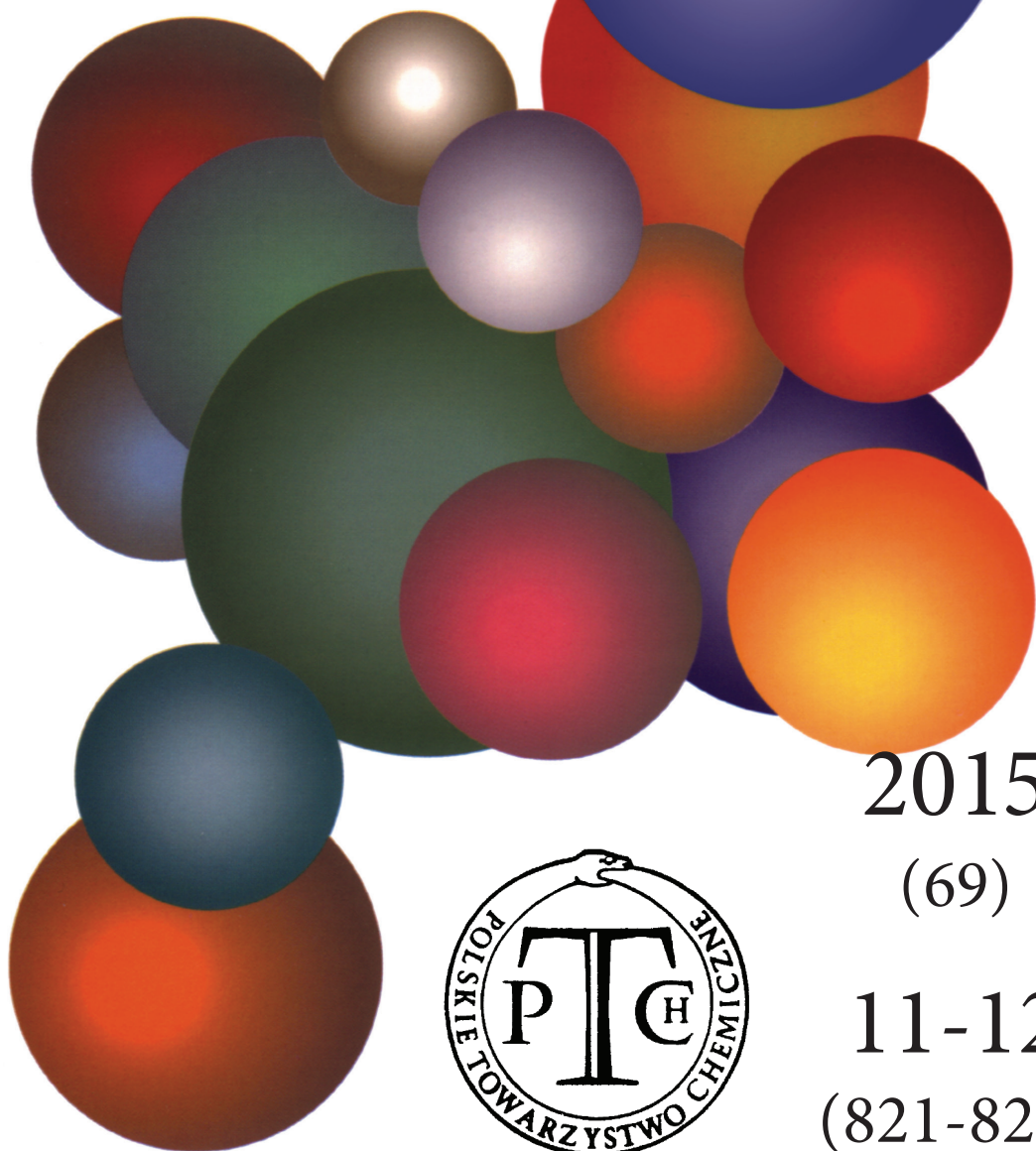


WIADOMOŚCI *chemiczne*

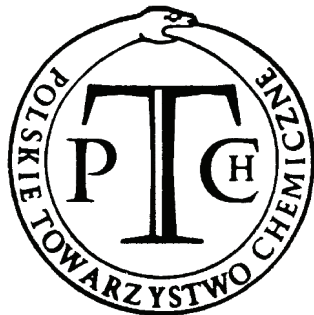


2015

(69)

11-12

(821-822)



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez MNiSW

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, IRENA BARANOWSKA, ANDRZEJ BARAŃSKI,
JERZY BŁAŻEJOWSKI, ANATOL KOJŁO, TADEUSZ M. KRYGOWSKI, ANDRZEJ KUTNER,
PIOTR PANETH (PRZEWODNICZĄCY), K. MICHAŁ PIETRUSIEWICZ, DARIUSZ POGOCKI,
MAREK POTRZEBOWSKI, GRZEGORZ SCHROEDER, ANDRZEJ SOKAŁSKI, ARTUR P. TERZYK

KOMITET REDAKCYJNY

JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, LUDWIK KOMOROWSKI, MIROŚLAW SOROKA,
MARIA SUSZYŃSKA, SŁAWOMIR SZAFERT, ANDRZEJ TROCHIMCZUK

REDAKTOR NACZELNY

ZDZISŁAW LATAJKA

SEKRETARZ REDAKCJI

BEATA ŚWIĄTEK-TRAN

BARBARA LATKO (FINANSE)

KAZIMIERA LUKJAN (KOLPORTAŻ)

Korespondencję należy kierować pod adresem:
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 71 375 73 89, tel./fax: 71 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.pl

INTERNET

<http://www.wchuwr.pl/wiadchem.htm> (English abstracts)
<http://www.dbc.wroc.pl> (pełne teksty publikacji od roku 2006)

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2015

pISSN 0043-5104

eISSN 2300-0295

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w listopad-grudzień 2015

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel. 22 517 78 12, fax 22 517 78 11, e-mail: k2@druk-k2.pl

**SYNTEZA MODYFIKOWANYCH
OLIGONUKLEOTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH
STEREOZDEFINIOWANE INTERNUKLEOTYDOWE
WIĄZANIA TIOFOSFORANOWE**

**SYNTHESIS OF MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES
CONTAINING STEREODEFINED INTERNUCLEOTIDE
PHOSPHOROTHIOATE BONDS**

**Ewa Radzikowska^{*1}, Renata Kaczmarek¹,
Janina Baraniak²**

¹ *Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,
Zakład Chemii Bioorganicznej
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź*

² *Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska,
Akademia im. Jana Długosza
al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa
^{*}e-mail: eradziko@cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych oznaczeń i symboli

Wstęp

1. Właściwości biologiczne i fizykochemiczne oligonukleozydotiofosforanów; 2. Zastosowanie technik chromatograficznych do otrzymywania diastereomerycznie czystych oligonukleozydotiofosforanów; 3. Wykorzystanie diastereomerycznie czystych dimerycznych bloków budulcowych; 4. Enzymatyczna synteza oligonukleozydotiofosforanów; 5. Stereokontrolowana synteza oligonukleozydotiofosforanów; 5.1. Stereoselektywna synteza w oparciu o chiralność reszty cukrowej; 5.2. Stereospecyficzna synteza z wykorzystaniem otrzymanych na drodze chromatograficznego rozdzielania diastereomerycznie czystych monomerów; 5.3. Stereoselektywna synteza monomerów i ich zastosowanie do syntezy stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Ewa Radzikowska ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2007 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2014 roku. Jej obszar zainteresowań naukowych obejmuje syntezę modyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, jest współautorką 8 publikacji.

Dr Renata Kaczmarek ukończyła studia na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej (1995). Jest asystentem w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi, gdzie pracuje od 1996 roku. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2006 roku; jest współautorką 23 publikacji. Główny obszar działalności naukowej: synteza fosforylowanych i tiofosforylowanych pochodnych aminokwasów, peptydów i amidów, synteza modyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu.

Dr hab. Janina Baraniak po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej rozpoczęła pracę w CBMM PAN w Łodzi, gdzie w 1986 roku uzyskała stopień naukowy doktora [staż naukowy w Zespole Prof. P. Frey'a (Department of Biochemistry, Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, USA)] a w 2005 roku stopień doktora habilitowanego. Głównym przedmiotem zainteresowań naukowych jest chemia modyfikowanych nukleozydów i oligonukleotydów, a w szczególności synteza związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jak i istotnym znaczeniu poznawczym nakierowanym na badania mechanistyczne procesów biochemicznych. Jest współautorką 66 publikacji, opiekunem dwóch prac doktorskich. Obecnie pracuje w Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

ABSTRACT

Synthetic oligonucleotides constitute an important class of compounds which can exhibit biological activity. As potential drugs they could be employed in antisense strategy by acting on the pathogenic mRNA, causing inactivation of the target molecules during the translation process [1]. Ideal antisense agent (ASO) should be resistant to exo and/or endonucleases, exhibit a suitable pharmacological and pharmacokinetic profile and exhibits high binding affinity towards the target mRNA. To improve some properties of the ASO plethora of the chemical modifications introduced within the nucleobase, sugar unit and internucleotide linkage are investigated [3]. Among them, phosphorothioate oligonucleotides (PS-oligo), created by replacing one of the nonbridging oxygen atoms with a sulfur atom, are the major representatives of DNA analogs. PS-oligo display several attractive features like nuclease resistance, activation of RNase H, and good pharmacokinetic properties [1].

Replacement of one of two nonbridging oxygens at phosphorus by sulfur induces asymmetry at the phosphorus atom. Hence, the synthesized oligo(nucleoside phosphorothioate) is a mixture of 2^n diastereomers (where n is the number of internucleotide phosphorothioate functions). Therefore the actual biological activity of the P-chiral oligonucleotide analogues, (e.g., interactions with proteins or nucleic acids) may depend on stereochemical factors [7]. One has to keep in mind that the phosphoramidite [5] and *H*-phosphonate [32] methodologies (commonly used to prepare PS-oligo) are nonstereospecific and give a mixture of $2n$ diastereomers. Thus, various methods have been elaborated to synthesize these P-chiral oligonucleotide analogs in a stereocontrolled manner [15, 17], among them the oxathia-phospholane method developed by Stec et al. [18], the method utilizing nucleoside 3'-*O*-(3-*N*-acyl)oxazaphospholidine derivatives as monomer units [19], and the method based on a stereoselective synthesis of nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers [21, 22] are the most significant.

Keywords: oligo(deoxy)ribonucleoside phosphorothioates, antisense oligonucleotides, synthesis of modified oligonucleotide, stereospecific synthesis

Słowa kluczowe: oligonukleozydotiofosforany, oligonukleotydy antysensowe, synteza modyfikowanych oligonukleotydów, synteza stereospecyficzna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności
All	– grupa allilowa
ASO	– oligonukleotyd antysensowy
Bz	– grupa benzoilowa
CPG	– szkło o kontrolowanej wielkości porów
CMPT	– trifluorometanosulfonian <i>N</i> -(cyjanometylo)-pirolidyny
CMV	– cytomegalowirus
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DEAD	– azodikarboksylan dietylowy
DMT _r	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa [bis(4-metoksy-fenyl)fenylometyl]
DTD	– disiarczkek <i>N,N'</i> -dimetylotiuramu
FDA	– Amerykańska Agencja do Spraw Leków i Żywności
Fm	– grupa 9-fluorenylometylowa
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
LCA-CPG	– ang. <i>long chain alkylamine controlled pore glass</i>
MMTr	– grupa 4-monometoksytrytylowa
mRNA	– matrycowy/informacyjny kwas rybonukleinowy
NEPCI	– 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-1,3,2-dioksafosforin
PivCl	– chlorek piwaloilu
TBAF	– fluorek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TBDMS	– grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa
TBDPS	– grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa
THF	– tetrahydrofuran
TMG	– <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloguanidyna

WSTĘP

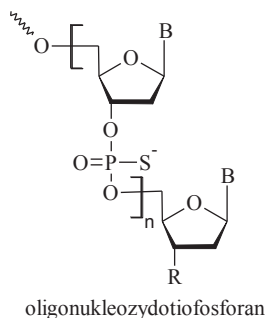
Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu oraz rozwój nowych technik badawczych sprawił, że pod koniec XX wieku w procesie poszukiwania nowych leków nastąpił istotny przełom. Wcześniejsza strategia była oparta na fizjologii choroby, czyli wykorzystywała widoczne symptomy choroby i była skoncentrowana na poszukiwaniu związków niskocząsteczkowych zazwyczaj oddziaływujących bezpośrednio z białkiem odpowiedzialnym za powstanie określonej choroby. Stąd też tradycyjne farmaceutyki usuwają skutki, a nie przyczyny choroby.

Nowe podejście oparte na tzw. molekularnym mechanizmie choroby ma za zadanie tworzyć leki, które będą zapobiegały przyczynom choroby poprzez precyzyjne oddziaływanie ze źródłem procesów chorobotwórczych.

W nurt tych badań wpisuje się między innymi tzw. strategia antysensowa wykorzystująca syntetyczne oligonukleotydy komplementarne do sekwencji mRNA docelowego genu i wiążące się do niego poprzez sekwencyjnie specyficzny proces hybrydyzacji za pomocą wiązań typu Watsona-Cricka [1]. Rezultatem tego zjawiska jest hydroliza bądź uszkodzenie docelowego mRNA, a zatem inhibicja ekspresji określonego genu czyli zahamowanie syntezy białka. Stosowane w tej strategii oligonukleotydy nazywane są oligonukleotydami antysensowymi (ang. antisense oligonucleotides, ASO).

Aby ASO mogły być stosowane jako leki muszą po dotarciu do docelowych komórek występować przez pewien określony czas w takim stężeniu, aby były zdolne wywoływać oczekiwany efekt terapeutyczny. Stąd też koniecznym jest, aby ASO były odporne na degradację enzymatyczną wobec wewnątrzkomórkowych nukleaz. Natywne cząsteczki ASO, tak jak i naturalne oligonukleotydy fosforanowe, są jednakże szybko degradowane przez nukleazy obecne *in vivo*. Dodatkowo, inne czynniki takie jak np. słaba rozpuszczalność w płynach ustrojowych czy mała przepuszczalność przez błony biologiczne sprawiły, że stosowanie naturalnych fosfodiesterowych ASO było bardzo ograniczone [2]. Stąd też aby oligonukleotydy antysensowe mogły wykazywać pożądaną efektywność terapeutyczną, wprowadzono liczne modyfikacje chemiczne mające na celu polepszenie własności biologicznych i fizykochemicznych tych biomolekuł [3].

Spośród licznej grupy oligonukleotydów modyfikowanych w obrębie wiązania internukleotydogo na szczególną uwagę zasługują analogi, w których jeden z niemoistkowych atomów tlenu w tym wiązaniu zastąpiony został atomem siarki. Otrzymane w ten sposób ASO nazywane są oligonukleozydotiofosforanami (Rys. 1).



Rysunek 1. Struktura chemiczna oligonukleozydotiofosforanów
Figure 1. Chemical structure of phosphorothioate oligonucleotides (PS-oligos)

Oligonukleozydotiofosforany posiadają wiele zalet w porównaniu do odpowiednich niemodyfikowanych oligonukleotydów, a najważniejszą z nich jest zwiększona odporność na działanie wewnątrzkomórkowych nukleaz. Równie istotną cechą tych związków jest ich dogodny profil farmakokinetyczny (tj. przebieg zmian stężenia/ilości leku i jego metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i wydalinach) [3].

1. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE I FIZYKOCHEMICZNE OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Prace dotyczące syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydów zostały zapoczątkowane pod koniec lat 60. minionego wieku, kiedy to tiofosforanowe analogi dinukleotydów były wykorzystywane jako substraty w badaniach nad aktywnością niektórych nukleaz [4]. Dopiero opracowana przez Caruthersa w latach 80. XX wieku amidofosforynowa metoda syntezy oligonukleotydów na stałym podłożu [5] stała się dogodną metodą syntezy oligonukleozydotiofosforanów [6].

Zastąpienie jednego z niemostkowych atomów tlenu w wiązaniu internukleotydom atomem siarki indukuje powstawanie centrum chiralności na atomie fosforu. Jednakże w przypadku związków chiralnych własności poszczególnych enancjomerów bądź diastereomerów są zróżnicowane. Toteż rozważając aktywność biologiczną oligonukleozydotiofosforanów należy uwzględnić chiralność atomu fosforu w każdym wiązaniu tiofosforanowym [7]. Oznacza to, że tiofosforanowy oligonukleotyd jest mieszaniną 2^n diastereoizomerów, gdzie n jest liczbą wiązań internukleotydom. Rozdział poszczególnych izomerów za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej jest możliwy tylko w przypadku bardzo krótkich oligonukleotydów: tri-, tetra- i pentamerów.

Wspólną cechą stosowanych powszechnie metod syntezy oligonukleozydotiofosforanów jest ich niestereokontrolowany charakter. Ten ogólny problem związany z chiralnością tych związków mógł być rozwiązany jedynie na drodze stereokontrolowanej syntezy.

Przez wiele lat stereokontrolowana chemiczna synteza tiofosforanowych pochodnych oligonukleotydów stanowiła prawdziwe wyzwanie dla chemików zajmujących się tym obszarem badań. Początkowe prace ograniczały się do poszukiwania stereoselektywnych metod [8], a w późniejszym etapie koncentrowały się na opracowaniu stereospecyficznych syntez [7].

2. ZASTOSOWANIE TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH DO OTRZYMYWANIA DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

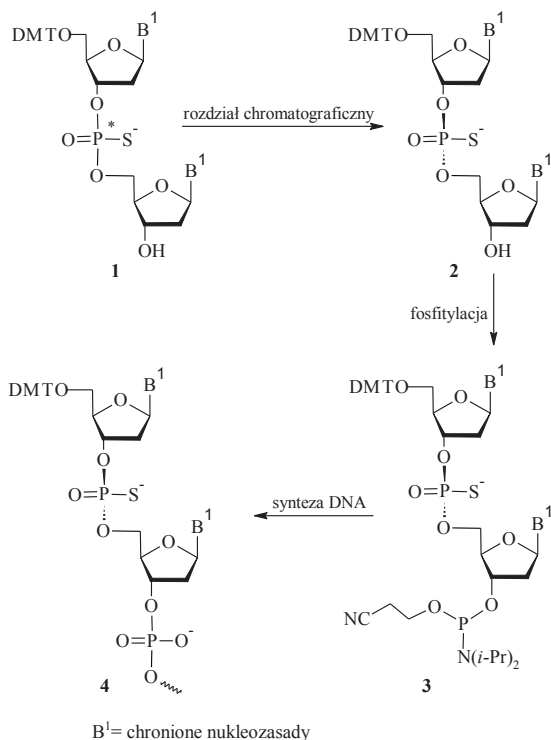
W początkowym etapie badań nad P-chiralnymi oligonukleozydotiofosforanami kluczową rolę w otrzymywaniu ich w diastereomerycznie czystej postaci odgrywały metody oparte na technice rozdziału chromatograficznego. Aż do wczesnych lat 70. minionego wieku rozdzielone na tej drodze P-chiralne dinukleozydotiofosforany (*R_p* vs *S_p*) wykorzystywane były w badaniach dotyczących ich stabilności hydrolitycznej wobec nukleaz jak również do określenia ich powinowactwa względem jedno- lub dwuniciowego RNA i DNA [9].

Klasyczny rozdział chromatograficzny stosowano również do otrzymywania dłuższych fragmentów oligonukleotydów, w których wprowadzona była jedynie pojedyncza modyfikacja tiofosforanowa, dzięki czemu badano wpływ takich modyfikacji na trwałość odpowiednich dupleksów i trypleksów [10].

Zaletą metody opartej o rozdział chromatograficzny jest możliwość otrzymania poszczególnych izomerów o bardzo dużej czystości. Niestety sam proces rozdziału bywa kłopotliwy i jest zależny od struktury związku (długość, sekwencja zasad, pozycja centrum P-chiralnego). Im oligomer dłuższy, a sekwencja bardziej urozmaicona, tym rozdział trudniejszy. [11]. Jeszcze większy problem stanowi rozdział związków w których występuje większa ilość centrów P-chiralności. Biorąc pod uwagę fakt, że poszczególne diastereomery posiadają bardzo zbliżone cechy (w tym czasy retencji) ich rozdział metodami chromatograficznymi jest właściwie niemożliwy. Nawet stosując zaawansowane techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) rozdział ten ogranicza się do bardzo krótkich oligonukleotydów: tri-, tetra- i pentamerów [12].

3. WYKORZYSTANIE DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH DIMERYCZNYCH BŁOKÓW BUDULCOWYCH

Dinukleozydotiofosforany z centrum chiralności na atomie fosforu **1** (Schemat 1) rozdzielone na poszczególne *R_p* i *S_p* izomery **2** z wykorzystaniem chromatografii typu „flash” zostały przekształcone w odpowiednie 3'-amidofosforyny **3**, które następnie posłużyły jako dimeryczne bloki budulcowe **4** w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej metodą amidofosforynową [13].



Schemat 1. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów **4** z wykorzystaniem diastereomerycznie czystych dimerycznych bloków budulcowych **3**

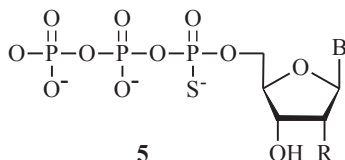
Scheme 1. Synthesis of stereoregular PS-oligos **4** using diastereopure dimer building blocks **3**

W ten sposób można było otrzymywać oligomery zawierające wiele P-chiralnych centrów w określonych pozycjach oligonukleotydu, związków niemożliwych do otrzymania na drodze rozdzielania chromatograficznego skomplikowanych mieszanin diastereomerycznych.

Zaletą opisanego podejścia było to, że w dalszym etapie syntezy nie było konieczne stosowanie stereokontrolowanej metody. Jednakże, aby za pomocą tej metody zsyntezować określony oligonukleotyd zawierający cztery podstawowe zasady azotowe potrzebne były aż 32 dimery (4 kanoniczne heterozasady odpowiednio na 5' i 3'-końcu oraz dwa P-diastereomery) i ich rozdzielanie chromatograficzne na poszczególne izomery nie zawsze było możliwe. Ponadto efektywność procesu kondensacji dimerycznych bloków budulcowych jest znacząco niższa niż w przypadku standardowo stosowanych monomerów amidofosforynowych oraz niemożliwym jest otrzymanie na tej drodze oligonukleotydów zawierających następujące po sobie kolejne P-chiralne centra tiofosforanowe.

4. ENZYMATYCZNA SYNTEZA OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Równolegle do badań dotyczących opracowania chemicznych metod syntezy P-chiralnych oligonukleozydotiofosforanów trwały prace wykorzystujące do tego celu reakcje enzymatyczne. Jako substraty do syntezy tychże związków na drodze enzymatycznej stosowano odpowiednie α -tio-modyfikowane analogi naturalnych 5'-trifosforanów (5; Rys. 2) [14], które włączane były do łańcucha oligonukleotydu z wykorzystaniem takich enzymów jak polimeraza DNA I z *E. coli*. Reakcje prowadzone były w obecności odcinka starterowego (ang. *primer*) i odpowiedniej matrycy.



Rysunek 2. Struktura chemiczna α -P-tio-nukleozydo-5'-trifosforanów
Figure 2. Chemical structure of α -P-thio-nucleoside 5'-triphosphates

W odróżnieniu od metody bazującej na rozdziale chromatograficznym wykorzystanie metody enzymatycznej umożliwiło otrzymanie diastereomerycznie czystych oligonukleotydów zawierających w swojej strukturze następujących po sobie kilka internukleotydowych wiązań tiofosforanowych o długości powyżej 5 zasad.

Jednakże enzymatyczna synteza oligonukleozydotiofosforanów posiada również ograniczenia wynikające ze stereospecyficzności stosowanych enzymów, gdyż jedynie Sp-izomer NTPP α Ss jest ich substratem. Stąd też można było otrzymać tylko tiofosforany o konfiguracji R na atomie fosforu (proces tworzenia wiązania internukleotydowego zachodzi w tym przypadku z inwersją konfiguracji). Ponadto nie możliwym było otrzymanie na tej drodze oligomerów modyfikowanych w określonych pozycjach łańcucha ze względu na to, że określony α -P-tio-trifosforan zostawał wprowadzony w każde miejsce, w którym występowała dana nukleozasada. Dodatkowo pożądanym oligomerem połączony był z „primerem” wiązaniem kowalencyjnym.

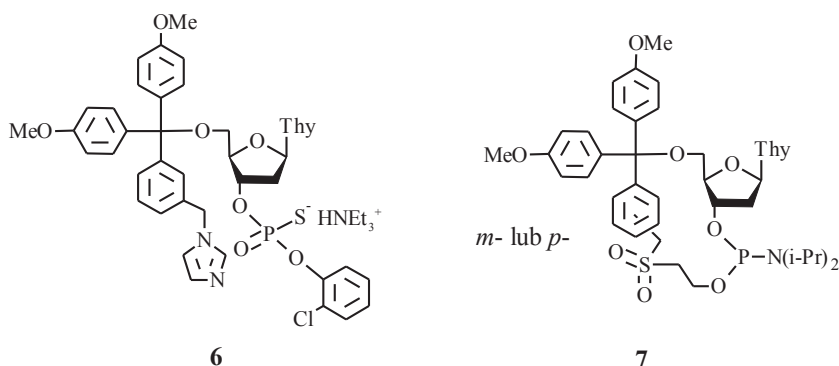
5. STEREOKONTROLOWANA SYNTEZA OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

5.1. STEREOSELEKTYWNA SYNTEZA W OPARCIU O CHIRALNOŚĆ RESZTY CUKROWEJ

Jedno z najwcześniej realizowanych podejść do stereoselektywnej syntezy P-chiralnych analogów oligonukleotydów opierało się na wykorzystaniu chiralności reszty cukrowej tj. rybozy bądź deoksyrybozy, których obecność indukuje stereoselektywność reakcji syntezy odpowiednich analogów. Faktem jest, że nawet prowa-

dzona na „niestereoselektywnej” drodze (np. metodą amidofosforynową) synteza dinukleozydotiofosforanów nie daje mieszaniny izomerów Sp:Rp w stosunku 50:50, ale w zależności od warunków prowadzenia reakcji stosunek ten waha się w przedziale 63:37 do 43:57 [12a]. Stąd też, prowadzone były liczne badania mające na celu zwiększenie obserwowanej stereoselektywności reakcji tak, aby możliwa była synteza stereoregularnych analogów oligonukleotydów.

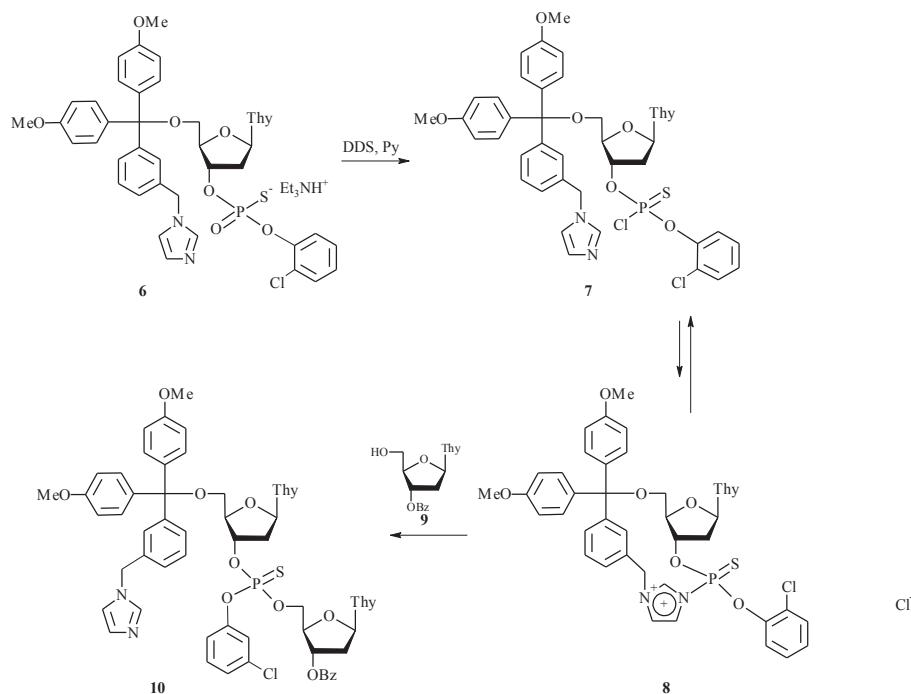
Interesujące podejście do stereoselektywnej syntezy oligonukleozydotiofosforanów zaprezentował Sekine i współpracownicy [15]. Zaprojektowali oni monomery w których, stosowana standardowo do ochrony funkcji 5'-hydroksylowej, grupa dimetoksytrytylowa modyfikowana była poprzez wprowadzenie podstawnika imidazolowego (związek **6**) bądź grupa ta była połączona poprzez łącznik z amidofosforynowym atomem fosforu na 3'-końcu nukleozydu (**7**; Rys. 3). Takie usztywnienie struktury miało w zamyśle autorów wymusić przebieg reakcji w kierunku tworzenia jedynie jednego z P-diastereomerów.



Rysunek 3. Struktura chemiczna monomerów **6** i **7** wykorzystywanych w stereoselektywnej syntezie dinukleozydotiofosforanów

Figure 3. Structure of monomers **6** and **7** used for stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioates

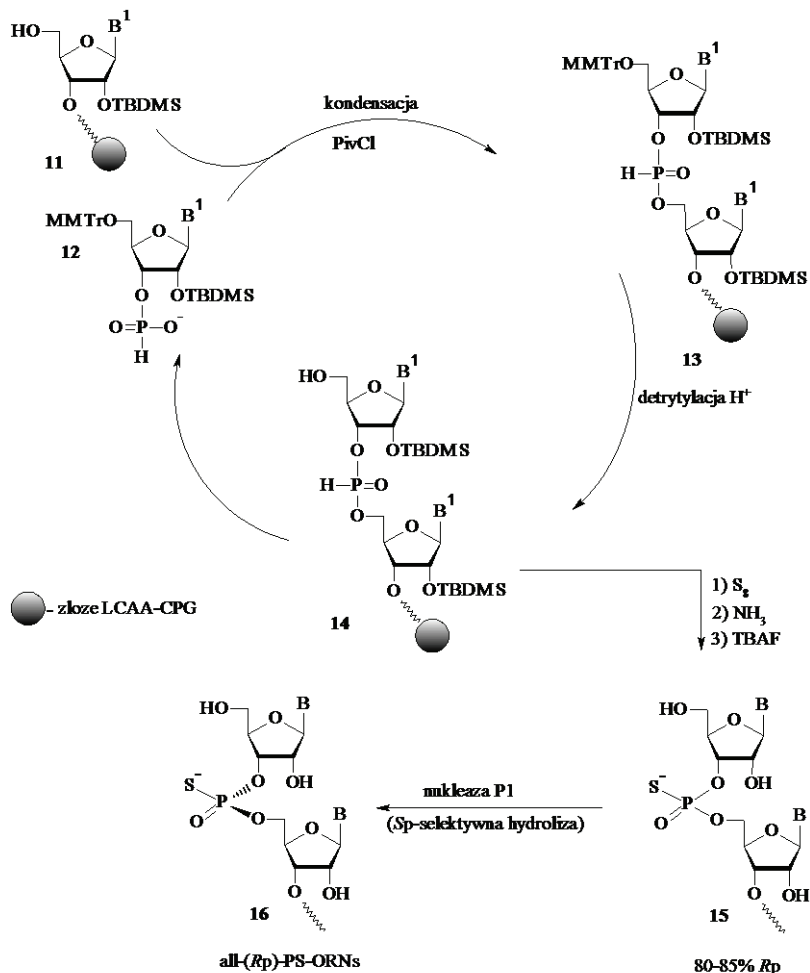
Stosując jako substraty monomer **6** oraz 3'-O-benzoilowaną tymidynę (**9**) autorzy otrzymali metodą triestrową pożądane diastereoizomery dinukleozydotiofosforanu **10** w stosunku Rp:Sp równym 18:82 (Schemat 2). Jako aktywator w tym przypadku użyta została pochodna sulfonylowa (tzw. DDS).

Schemat 2. Stereoselektywna synteza dinukleozydotiofosforanu **10** metodą triestrowąScheme 2. Stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioate **10** via phosphotriester method

Obserwowana stereoselektywność procesu wynikała najprawdopodobniej z obecności reszty imidazolowej pełniącej funkcję wewnątrzcząsteczkowej grupy katalitycznej. Natomiast w przypadku użycia jako monomeru związku **7** dinukleozydotiofosforan **10** otrzymano ze stereoselektywnością wahającą się w granicach od 50:50 do 86:14 w zależności od zastosowanego linkera jak i użytego aktywatora jakimi były pochodne 1-*H*-tetrazolu, imidazolu lub triazolu. Niestety mimo wielu prób optymalizacji warunków syntezy dla obu typów monomerów nie udało się autorom uzyskać całkowitej stereoselektywności reakcji.

Chiralność rybozy była również wykorzystana w celu zwiększenia stereoselektywności syntezy oligonukleozydotiofosforanów w przypadku stosowania metody *H*-fosfonianowej. Efekt ten uzyskiwano poprzez zastosowanie dużego podstawnika w pozycji 2'-rybozy, co tym samym stanowiło ograniczenie zastosowania takiego podejścia dla pochodnych 2'-deoksyrybozy.

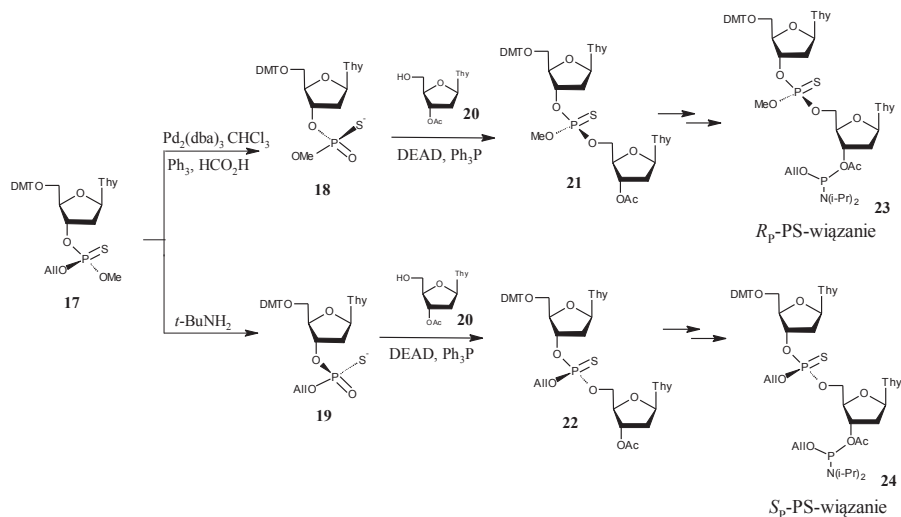
Przykładem ilustrującym powyższą strategię jest pochodząca z laboratorium Stromberga synteza diastereomerycznie czystego oligorybonukleozydotiofosforanu **16** o konfiguracji all-*(Rp)* przy zastosowaniu *H*-fosfonianowych monomerów **12** chronionych na funkcji 2'-hydroksylowej grupą tert-butyldimetylosililową [16]. Związki **12** kondensowane były z 5'-hydroksylową funkcją zawieszoną na złożu nukleozydu **11** wobec chlorku piwaloilu jako odczynnika kondensującego (Schemat 3).

Schemat 3. Synteza oligonukleozydotiofosforanu **16** metodą *H*-fosfonianowąScheme 3. Synthesis oligonucleotide phosphorothioate **16** via the *H*-phosphonate method

Otrzymano w ten sposób w pierwszym etapie po usunięciu z 5'-końca grupy monometoksytrytylowej (MMTr) odpowiednie dinukleozydo-*H*-fosfoniany **14** ze stereoselektywnością rzędu 80–85% dla *P*-epimeru o konfiguracji *S*. Związki te następnie utleniono za pomocą elementarnej siarki do odpowiednich tiofosforanów **15**. Z racji tej, że proces usiarczania *H*-fosfonianowych diestrów **14** przebiega z retencją konfiguracji (zgodnie z regułą Cahna-Ingolda-Preloga spośród czterech podstawników przyłączonych do atomu fosforu atom S jest starszy niż atom H) to oligonukleozydotiofosforany **15** były wzbogacone w izomer *R_p*.

W ostatnim etapie syntezy oligomery **15** poddawane były trawieniu enzymatycznemu za pomocą nukleazy P1 (specyficzna dla izomerów *Sp*) dzięki czemu jako ostateczny produkt uzyskiwany był diastereomerycznie czysty oligonukleozydotiofosforan **16** o konfiguracji *R_p*.

Wadą opisanych powyżej podejść jest to, że pozwalają one na syntezę tylko jednego z P-epimerów oligonukleozydotiofosforanów. W tym świetle niezwykle interesujący przykład syntezy dinukleozydotiofosforanów jako diastereoizomerycznie czystych bloków budulcowych, stanowi praca Hayakawy i współpracowników [17]. Autorzy opracowali syntezę triestrowego tiofosforanowego monomeru **17**, który w zależności od zastosowanych warunków deprotekcji jednej z grup (grupa allilowa vs metylowa) był prekursorem odpowiedniego diestru o konfiguracji Rp lub Sp (Schemat 4). Usunięcie grupy allilowej z ugrupowania tiofosforanowego prowadziło do odpowiedniego diestru **18** podczas gdy usunięcie grupy metylowej dawało diester **19**, które to związki utworzyły się w postaci czystych P-epimerów. Następnie kondensacje tych związków z 3'-O-acetylotymidyną (**20**) w warunkach reakcji Mitsunobu (DEAD, Ph₃P), prowadziły do oczekiwanych triestrowych pochodnych **21** i **22**. W kolejnym etapie związki te w reakcji fosfitylacji były przekształcane w odpowiednie 3'-amidofosforyny **23** i **24**, a następnie włączane do łańcucha oligonukleotydu.



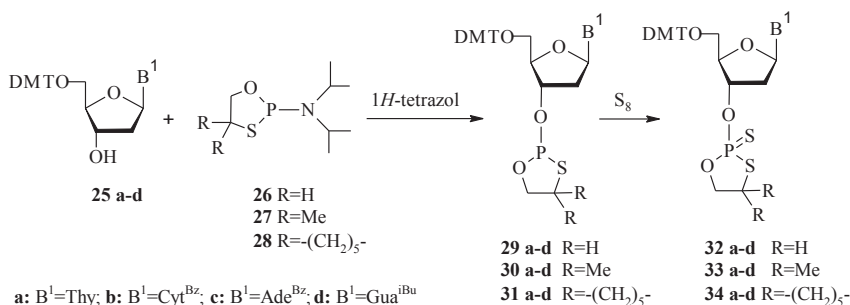
Schemat 4. Synteza diastereoizomerycznie czystych bloków budulcowych **23** i **24**

Scheme 4. Synthesis of diastereomeric pure dimer building blocks (**23**, **24**) via common intermediate **17**

5.2. STEROSPECYFICZNA SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM OTRZYMANÝCH NA DRODZE CHROMATOGRAFICZNEGO ROZDZIAŁU DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH MONOMERÓW

Prawdziwy przełom w dziedzinie stereokontrolowanej syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydu stanowiła opracowana w zespole Steca oksatiafosforanowa metoda syntezy oligonukleozydotiofosforanów o określonej i z góry założonej konfiguracji absolutnej na atomie fosforu w obrębie wiązań internukleotydydowych [18].

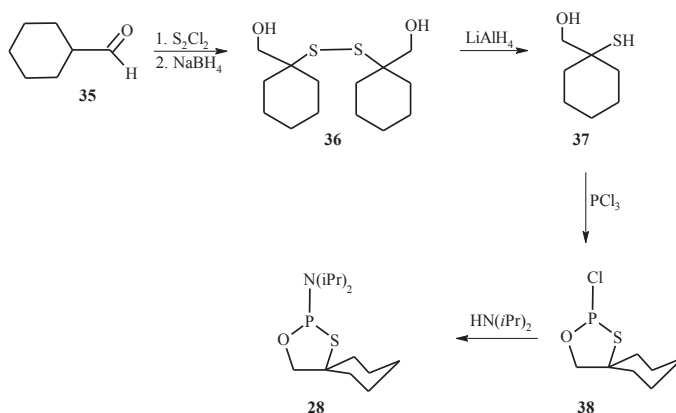
Istotę tej metody stanowiło użycie diastereomerycznie czystych odpowiednio chronionych 5'-O-DMT-nukleozydo-3'-O-(2-tiono-1,3,2-oksatiafosfolanów), niepodstawionych (**32**) lub dipodstawionych w pozycji 4 w pierścieniu oksatiafosfolanowym (**33-34**). Były one otrzymane w reakcji 5'-O-DMT-nukleozydów **25** z 2-*N,N*-diizopropylamino-1,3,2-oksatiafosfolanem (**26-28**) w obecności 1*H*-tetrazolu (Schemat 5) z następczym utlenieniem *in situ*, za pomocą elementarnej siarki, tworzących się w pierwszym etapie trójkoordynacyjnych związków fosforu **29-31**. Zsyntezowane oksatiafosfolanowe pochodne **32-34** były rozdzielone na *Rp*- i *Sp*-izomery techniką chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Efektywność tego rozdziału była uzależniona od rodzaju podstawnika obecnego w ugrupowaniu 2-tiono-1,3,2-oksatiafosfolanowym.



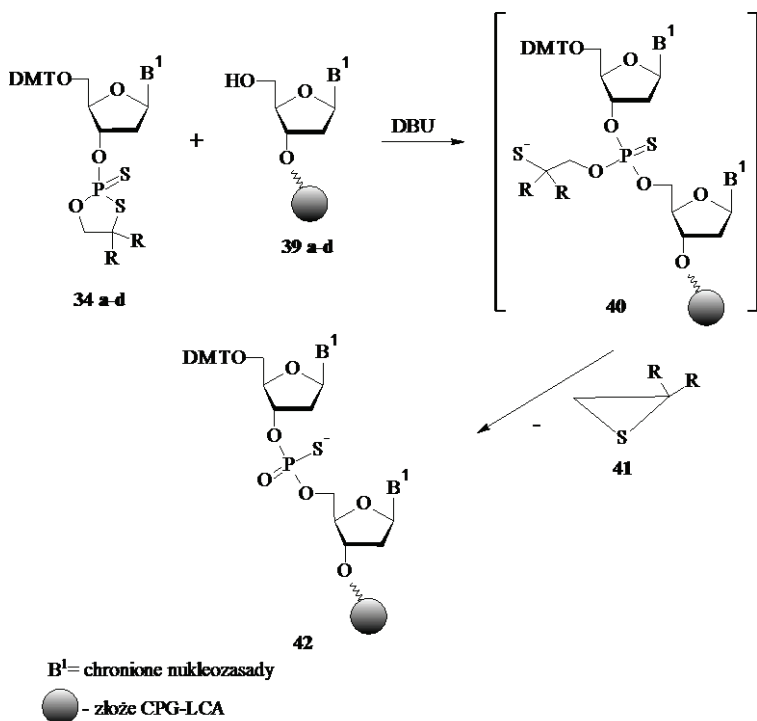
Schemat 5. Synteza oksatiafosfolanowych monomerów **32-34**

Scheme 5. Synthesis of oxathiaphospholane monomers **32-34**

Ostatecznie stosowano pochodne 4,4-pentametylenowe **34** (związki typu „spiro”), chociaż niedostępny handlowo odpowiedni merkptoalkohol **37** potrzebny do syntezy odczynnika **28** był otrzymywany w kilkuetapowej syntezie (Schemat 6). Do syntezy tego odczynnika użyto cykloheksanokarboksyaldehyd (**35**), którego reakcja w pierwszej kolejności z dichlorkiem disiarki a następnie redukcja za pomocą NaBH₄ prowadziła do 1,1'-ditio-bis(1,1-pentametylenoetan-2-olu) (**36**). W kolejnym etapie związek **36** pod działaniem tetrahydroglinianu litu przekształcony został w 1-merkpto-1,1-pentametylenoetan-2-ol (**37**), który wobec PCl₃ oraz następczej reakcji z diizopropylaminą dawał oczekiwany „spiro”-4,4-pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolan **28**.

Schemat 6. Synteza 2-*N,N*-diizopropylamino-„spiro”-4,4-pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolanu (28)Scheme 6. Synthesis of 2-*N,N*-diisopropylamino-“spiro”-4,4-pentamethylene-1,3,2-oxathiafospholane (28)

Diastereoizomerycznie czyste monomery oksatiafosfolanowe **34** były poddawane w roztworze acetonitrylu reakcji z 5'-hydroksylową grupą nukleozydu **39** (bądź oligonukleotydem) wobec silnie zasadowego aktywatora jakim jest 1,8-diaza-bicyklo[5.4.0]-undek-7-en (DBU) (Schemat 7). W pierwszym etapie reakcji zaktywowany przez DBU 5'-hydroksylowy atom tlenu atakuje oksatiafosfolanowy atom fosforu powodując otwarcie pięcioczłonowego pierścienia z utworzeniem nietrwałego związku pośredniego **40** o strukturze triestru 2-merkaptoetylowego. Przebiegająca następnie w warunkach reakcji spontaniczna eliminacja episiarczku **41** prowadziła do utworzenia dinukleotydu **42** z wiązaniem internukleotydomowym o charakterze diestru tiofosforanowego. Otwarcie pierścienia oksatiafosfolanowego okazało się być procesem chemoselektywnym i stereospecyficznym (retencja konfiguracji), którego siłę napędową stanowiło naprężenie pierścienia 1,3,2-oksatiafosfolanowego. Natomiast różnice w energii dysocjacji endocyklicznych wiązań P-O i P-S decydują o chemoselektywności reakcji.

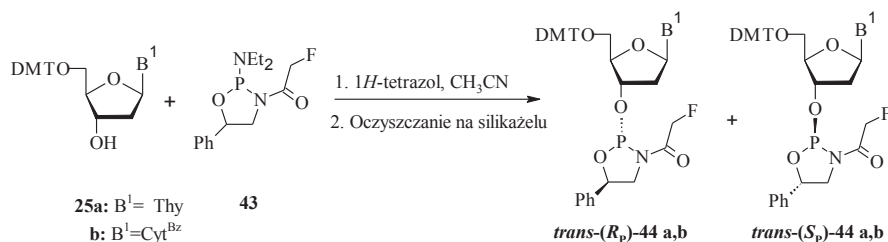


Schemat 7. Stereokontrolowana synteza oligonukleozydotiofosforanów na fazie stałej metodą oksatiafosfolanową

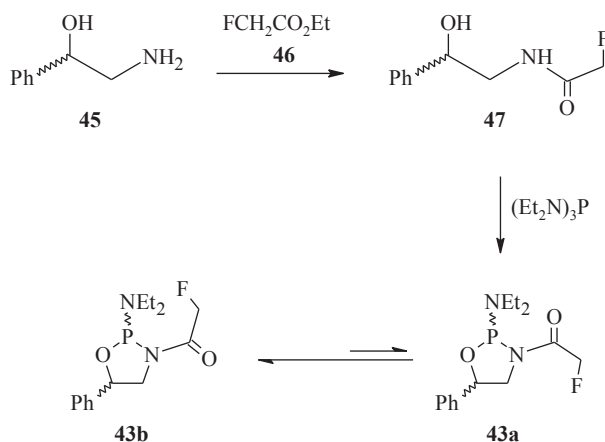
Scheme 7. Stereocontrolled synthesis of phosphorothioate oligonucleotides on solid phase by oxathiaphospholane method

Powtórzenie powyższego cyklu reakcji z następczym odblokowaniem i odcięciem oligonukleotydu 42 od złoża za pomocą wodnego roztworu amoniaku pozwalało otrzymywać z bardzo dobrymi wydajnościami oligonukleotydotiofosforany zawierające w swoim szkielecie wiązania internukleotydydowe wyłącznie o konfiguracji absolutnej atomu fosforu Sp lub Rp.

W zaproponowanej znacznie później przez Beaucage'a [19] i współpracowników syntezie stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów wykorzystano jako monomery nukleozydo-3'-O-(3-N-acylo-1,3,2-oksazafosfolidynowe) pochodne 44, które posiadały chiralny P-III atom fosforu (Schemat 8). Monomery 44 powstawały w reakcji odpowiednio chronionych nukleozydów 25 z 2-(dietylamino)-3-N-acylookszafosfolidynową pochodną 43. Związki 44 były w kolejnym etapie rozdzielane na P-diastereomery techniką chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Jednakże wydajność, z jaką wyizolowano poszczególne izomery była niska (20–26%) ze względu na ich niestabilność w procesie chromatograficznego rozdzielania.

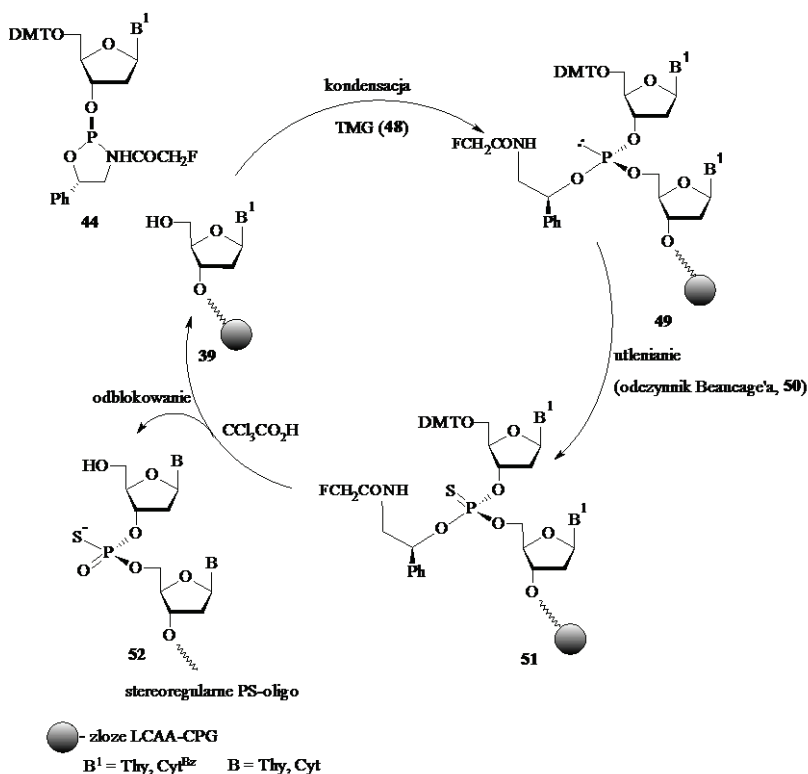
Schemat 8. Synteza nukleozydo-3'-O-(3-N-acylo-1,3,2-oksazafosolidynowych) monomerów **44**Scheme 8. Synthesis of nucleoside 3'-O-(3-N-acyl)oxazaphospholidine monomers **44**

Zastosowana oksazafosolidynowa pochodna **43** otrzymana była z (\pm)-2-amino-1-fenyletanolu (**45**) w dwuetapowej syntezie. W pierwszym etapie związek **45** został przekształcony wobec fluoroocetanu etylowego (**46**) w odpowiedni amidoalkohol **47** (Schemat 9).

Schemat 9. Synteza związku **43**Scheme 9. Synthesis of compound **43**

Następnie reakcja związku **47** z tris(dietyloamino)fosfiną prowadziła do cyklicznego *N*-acyloamidofosforynu **43** [w formie dwóch rotamerów (**43a** i **43b**)].

Monomery **44** w stereospecyficzny sposób reagowały wobec *N,N,N',N'*-tetrametyloguanidyny (TMG, **48**) z 5'-hydroksylową grupą nukleozydu **39** związanego ze stałym podłożem. Otrzymany w ten sposób fosforyny (1,1-diokso-3*H*-1,2-benzoditiol-3-on, **50**) do odpowiedniego dinukleozydotiofosforanu **51** (Schemat 10).



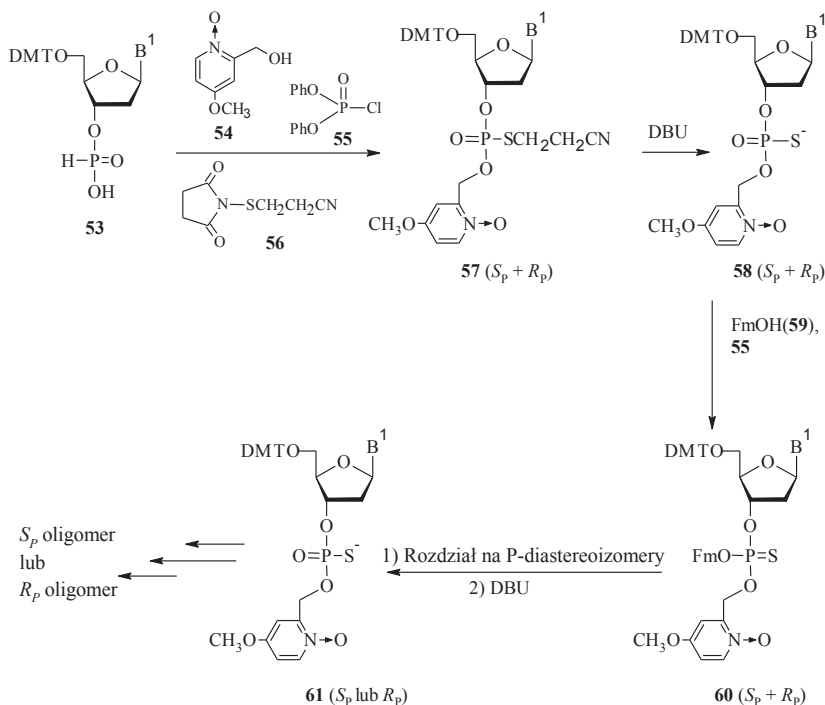
Schemat 10. Synteza oligonuklezydofosforanów na fazie stałej z wykorzystaniem monomerów 52
 Scheme 10. Solid phase synthesis of PS-oligos using monomers 52

Finalny produkt **52** został otrzymany poprzez usunięcie grup ochronnych z zasad azotowych oraz z wiązania internukleotydu odpowiednio za pomocą wodnego roztworu amoniaku i kwasu octowego. Stosując opisaną metodologię Beaucage i współpracownicy otrzymali na nośniku stałym między innymi 11-merowy homotymidylanowy tiofosforan o konfiguracji R_p na wszystkich atomach fosforu [all R_p -d[(Tps)₁₀T].

Pośród innych metod syntezy oligonuklezydofosforanów wykorzystujących otrzymane na drodze chromatograficznego rozdzielania diastereomerycznie czyste monomery na uwagę zasługują prace zapoczątkowane przez Efimova dotyczące wykorzystania monomerów zawierających ugrupowanie 4-metoksy-1-oksydo-2-pikolinowe jako nukleofilowy katalizator w tworzeniu internukleotydujących wiązań tiofosforanowych [20].

Efimov opisał automatyzowaną syntezę P-chiralnych tiofosforanowych analogów zarówno DNA jak i RNA, gdzie kluczowymi związkami były „pikolilowe” monomery **61** (Schemat 11) otrzymane w kilku etapowej syntezie, w której substratem był 3'-*H*-fosfonian nukleozydu **53** [21]. W pierwszym został on przekształcony w triester **57** pod działaniem 1-tlenku 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**) wobec chlo-

rofosforanu difenyłu (**55**) jako odczynnika kondensującego i *N*-(2-cyanoetylomerkpto)imidu kwasu bursztynowego (**56**). Następnie grupa β -cyanoetylowa usuwana była z atomu siarki za pomocą DBU, a otrzymany tiofosforan **58** kondensowany był z 9-fluorenylometanolem (**59**, FmOH).



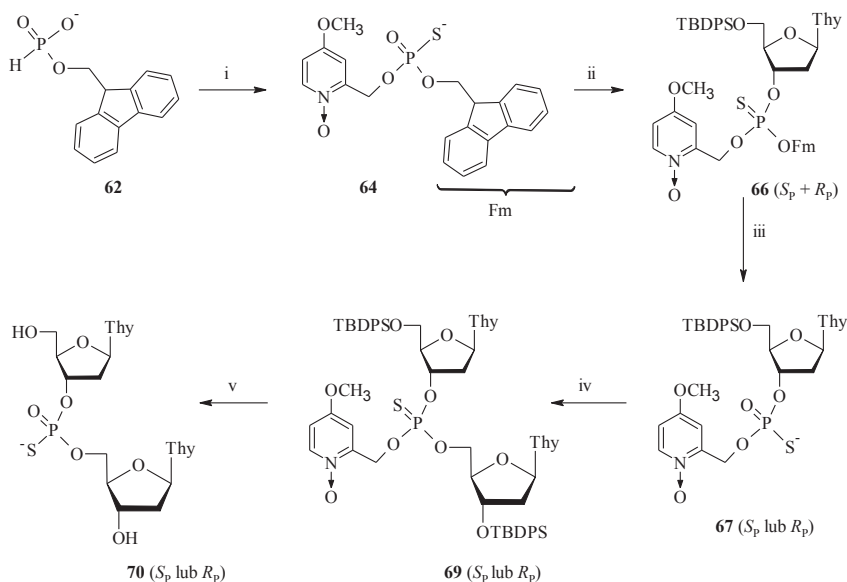
Fm= 9-fluorenylmetyl; B¹= chronione nukleozasady

Schemat 11. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów z wykorzystaniem *O*-nukleofilowej katalizy wewnątrzcząsteczkowej

Scheme 11. Synthesis of stereoregular phosphorothioate oligonucleotides using *O*-nucleophilic intramolecular catalysis

Powstały w ten sposób triester **60** był rozdzielony chromatograficznie na *P*-diastereoizomery, po czym reszta 9-fluorenylometylowa została usunięta pod działaniem DBU. Otrzymane w ten sposób *P*-chiralne monomery **61** wykorzystane zostały do syntezy na fazie stałej stereozdefiniowanych oligonukleozydotiofosforanów.

Ugrupowanie „pikolinowe” jako nukleofilowy katalizator w tworzeniu internukleotydu wiązania tiofosforanowych zostało również wykorzystane przez Stawińskiego w syntezie *P*-diastereomerycznych ditymidyl-(3'-5')tiofosforanów (**70**) [22]. Kluczowym związkiem pośrednim w tym przypadku był odpowiedni triester **66** (Schemat 12) powstający w reakcji tiofosforylacji 5'-*O*-*tert*-butylo-difenylosililotymidyny (**65**) za pomocą 4-metoksy-1-oksydo-2-pikolilo-(9-fluorenylometylo)-tiofosforanu (**64**) wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-1,3,2-dioksafosforinanu (**63**, NEPCl).



i: 1) 1-tlenek 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**), NEP-Cl (**63**), Py; 2) H₂O; 3) S₈; ii: 5'-TBDPS-T (**65**), **63**, Py; iii: 1) rozdział na P-diastereoizomery; 2) *t*-BuNH₂, Py; iv: 3'-TBDPS-T (**68**), **63**, Py; v: 1) TEA-PhS; 2) F⁻

Schemat 12. Stereospecyficzna synteza ditymidyl-(3'-5')tiofosforanów (**70**) z wykorzystaniem nukleofilowej katalizy wewnątrzcząsteczkowej

Scheme 12. Stereospecific synthesis of dithymidyl-(3'-5') phosphorothioates (**70**) based on intramolecular nucleophile catalysis

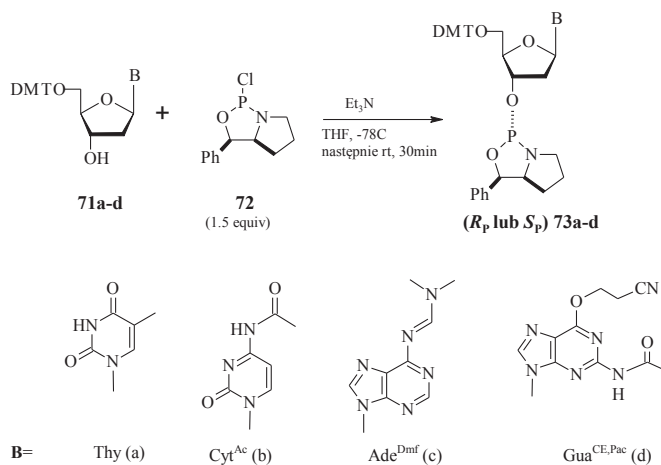
Zastosowany odczynnik **64** został otrzymany poprzez działanie na 9-fluorenylometylofosfonian (**62**) 1-tlenkiem 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**), z następczym usiarczeniem tworzącego się fosforynu za pomocą elementarnej siarki. Wprowadzenie dużego podstawnika 9-fluorenylometylowego w strukturę związku **66** pozwoliło na stosunkowo łatwe rozdzielanie go na P-diastereoizomery metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. W kolejnym etapie wspomniana grupa usuwana była za pomocą *tert*-butyloaminy, a uzyskane na tej drodze, poszczególne P-diastereoizomery **67** kondensowane były z 3'-*O*-*tert*-butylodifenylosililotyminy (**68**) w obecności NEPCl (**63**) jako odczynnika kondensującego. Powyższa reakcja zachodziła ilościowo, a co najważniejsze w sposób całkowicie stereospecyficzny.

Grupy ochronne w otrzymanych związkach **69** były usuwane w pierwszym etapie za pomocą układu trójetyloaminatiofenol (reszta „pikoliłowa”), a następnie pod działaniem anionu fluorkowego (grupy *tert*-butylo-difenylosililowe). Uzyskane tiofosforany **70** zostały następnie poddane trawieniu enzymatycznemu dzięki czemu przypisano im odpowiednią konfigurację na atomie fosforu (*R_p* lub *S_p*).

5.3. STEREOSELEKTYWNA SYNTEZA MONOMERÓW I ICH ZASTOSOWANIE DO SYNTEZY STEREOREGULARNYCH OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Wadą zarówno metody oksatiafosfolanowej jak i metody opartej na wykorzystaniu cyklicznych *N*-acetyloamidofosforynów 2'-deoksyrybonukleozydów **44** jest konieczność chromatograficznego rozdzielenia odpowiednich monomerów na poszczególne *P*-epimery. Dodatkowo w obu podejściach kondensacja z kolejnym nukleozydem zachodzi wobec silnej zasady (DBU, TMG). Stąd też były podejmowane próby otrzymania w stereoselektywny sposób monomerów, które byłyby wykorzystane do syntezy *P*-chiralnych oligonukleozydotiofosforanów [23].

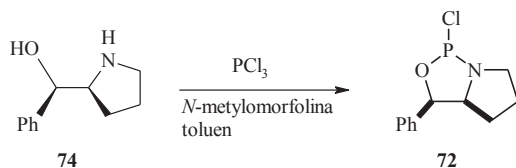
Ostatecznie problem ten został rozwiązany przez Wadę [24], który opracował strategię syntezy stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów opartą na oksazafosfolidynowych pochodnych nukleozydów oryginalnie zaproponowanych przez Agrawala [23c]. Istotą metody Wady są diastereoizomerycznie czyste bicykliczne monomery 1,3,2-oksazafosfolidynowe **73** (Schemat 13) otrzymane w sposób stereoselektywny w reakcji odpowiednio blokowanych nukleozydów **71** z odczynnikiem fosfitylującym **72** wobec trietyloaminy.



Schemat 13. Synteza bicyklicznych monomerów 1,3,2-oksazafosfolidynowych **73**

Scheme 13. Synthesis of bicyclic 1,3,2-oxazaphospholidine monomers **73**

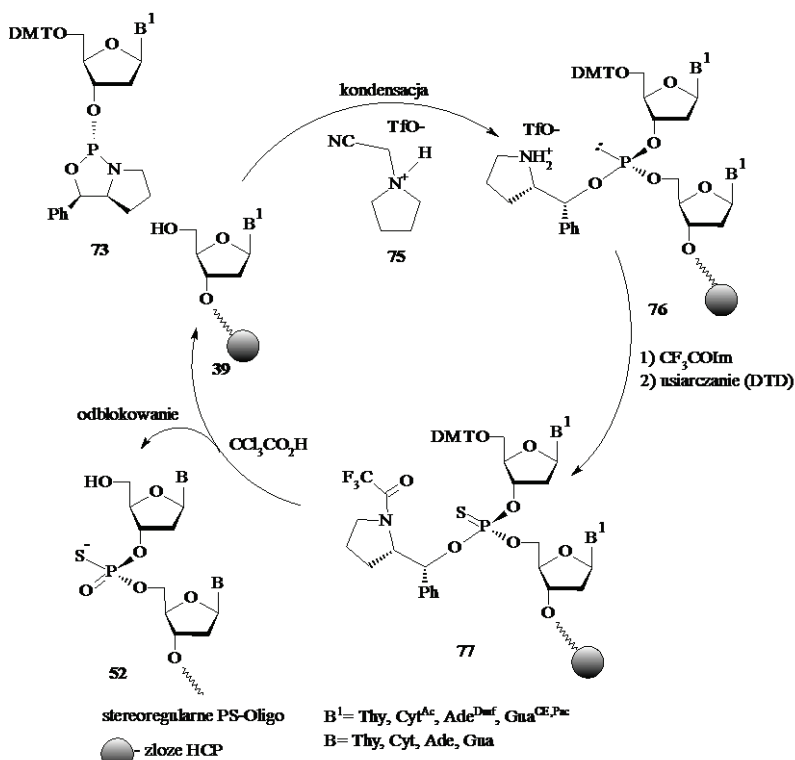
Zastosowany w syntezie odczynnik fosfitylujący, [4*S*, 5*R*]-2-chloro-1,3,2-oksazafosfolidyna **72**, otrzymany został w reakcji enancjomerycznie czystego aminoalkoholu **74**, będącego pochodną *L*-proliny, z trichlorkiem fosforu (PCl₃) wobec *N*-metylomorfoliny (Schemat 14) [25].



Schemat 14. Synteza odczynnika fosfitylującego 72

Scheme 14. Synthesis of phosphitylating reagent 72

Aktywacja związków **73** polegała na protonowaniu atomu azotu za pomocą trifluorometanosulfonianu *N*-(cyjanometylo)pirolidynowego (CMPT, **75**). Diastereoselektywność kondensacji **73** z 5'-hydroksylową grupą drugiego nukleozydu związanego ze stałym podłożem (**39**) wynosiła 99:1 (Schemat 15).



Schemat 15. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów metodą oksazafosolidynową

Scheme 15. Synthetic cycle for stereoregulated PS-oligos by the oxazaphospholidine method

Prześciowo utworzony fosforyn **76** był utleniony za pomocą disiarczku *N,N'*-dimetylotiuramu (DTD) do tiofosforanu **77**. Usunięcie grupy dimetoksytrytylowej z funkcji 5'-hydroksylowej w **77** oraz powtórzenie powyższego cyklu *n*-razy pozwalało na otrzymanie stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów (**52**) o długości od 8 do 12 nukleotydu. Oligonukleotydy odblokowywane były i odcinane od złoża za pomocą wodnego roztworu amoniaku.

PODSUMOWANIE

Jakkolwiek wśród różnorodnych analogów oligonukleotydów modyfikowanych w ugrupowaniu fosforanowym oligonukleozydotiofosforany należą do najwcześniej opisanych w literaturze chemicznej oraz najlepiej poznanych związków tej klasy, to metody otrzymywania związków zawierających stereozdefiniowane internukleotydowe wiązania tiofosforanowe zostały zaproponowane znacznie później.

Stąd też w 1998 roku został zarejestrowany przez FDA (Amerykańską Agencję do Spraw Leków i Żywności) w postaci mieszaniny diastereoizomerów pierwszy lek antysensowy pod nazwą handlową Vitravene. Pod względem chemicznym jest on 21-merowym oligonukleotydem tiofosforanowym stosowanym w leczeniu zapalenia siatkówki wywołanego wirusem cytomegalii (CMV) u pacjentów z Zespołem Nabytego Upośledzenia Odporności (AIDS) [26]. Vitravene podawany jest poprzez bezpośrednią iniekcję do oka.

Wiele oligonukleozydotiofosforanów jest obecnie na różnych etapach badań klinicznych [27]. W 2013 roku FDA dopuściło do leczenia hipercholesterolemii Mipromersen (nazwa handlowa Kynamro) [28]. Pod względem budowy chemicznej jest to oligonukleozydotiofosforan w którym centralny fragment zbudowany jest z jednostek deoksyrybonukleotydowych natomiast na obu końcach wstępują rybonukleotydy, w których funkcja 2'-hydroksylowa chroniona jest grupą metylową (2'-O-Me).

Pomimo zaznaczonych powyżej przykładów terapeutyczne zastosowanie tiofosforanowych analogów kwasów nukleinowych w medycynie niesie za sobą również istotne ograniczenia, a nawet zagrożenia. Należy pamiętać, że główną wadą oligonukleozydotiofosforanów jest ich zdolność do wiązania się z pewnymi białkami, w szczególności takimi, które mogą oddziaływać z polianionami [29]. Do tej grupy należą na przykład białka wiążące heparynę. Mechanizm tego typu niespecyficznego interakcji nie jest jeszcze w pełni poznany, chociaż wiadomo, że skutkiem tych oddziaływań może być zwiększona toksyczność oligonukleozydotiofosforanów w komórkach. Ponadto, istotny problem stanowi również trwałość tychże związków w organizmie człowieka. W rzeczywistości jedynie diastereomer Sp jest odporny na działanie wewnątrzkomórkowych nukleaz [30]. Jak wskazują liczne badania diastereomer Rp, tak jak naturalne oligonukleotydy, jest wrażliwy na działanie tych enzymów. Z drugiej jednak strony tiofosforany typu Sp wywierają destabilizujący efekt na strukturę tworzonych przez nie dupleksów, jak również kompleksów oligonukleotyd/mRNA, czego odzwierciedleniem jest spadek ich temperatury mięknięcia w porównaniu do dupleksów utworzonych przez niemodyfikowane oligonukleotydy.

Niemniej jednak istniejąca obecnie możliwość syntezy stereozdefiniowanych oligonukleozydotiofosforanów ma szczególne znaczenie w kontekście ich terapeutycznego wykorzystania. Kiedy tworzą one podwójne helisy z komplementarnymi oligonukleotydami, podstawniki na chiralnych atomach fosforu są skierowane do wewnątrz lub na zewnątrz dużej bruzdy helisy w zależności od konfiguracji abso-

lutnej na każdym atomie fosforu. W rezultacie na własności takich dupleksów (np. termiczną stabilność) ma wpływ konfiguracja na atomach fosforu. Stąd też efekt terapeutyczny może być uzależniony od stereochemii wiązania internukleotydo-owego [31].

Niewątpliwie stereoregularne P-chiralne analogi naturalnych oligonukleotydów na pewno będą znajdowały coraz szersze zastosowanie zarówno w medycynie (terapię antysensowe) jak i w biologii molekularnej jako tzw. sondy molekularne pozwalające na selektywne związanie i wykrycie określonych substancji.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y.C. Zhang, M.M. Taylor, W.K. Samson, M.I. Phillips, *Methods in Molecular Medicine, Antisense Therapeutics*, 2nd ed. (Edited by: I. Phillips © Humana Press Inc., Totowa, NJ), 2005, **106**, 11.
- [2] L. Vidal, S. Blagden, G. Attard, J. de Bono, *Eur. J. Cancer*, 2005, **41**, 2812.
- [3] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, 2003, **270**, 1628.
- [4] a) F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 1157; b) F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 3495.
- [5] M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3185.
- [6] W. J. Stec, G. Zon, W. Egon, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6077.
- [7] W.J. Stec, A. Wilk, *Angew. Chem. Int. Ed. English*, 1994, **33**, 709.
- [8] a) E. Ohtsuka, M. Shiraishi, M. Ikehara, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 5271; b) Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.M.-. Cui, R. Kawai, H. Kodama, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 3834.
- [9] a) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978, **75**, 4798; b) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *Biochemistry*, 1979, **18**, 592.
- [10] K.K. Chacko, K. Lindner, W. Saenger, P.S. Miller, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 2801.
- [11] J.K. Frederiksen, J.A. Piccirilli, *Methods Enzymol.*, 2009, **468**, 289.
- [12] a) A. Wilk, W.J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 530; b) Y. Tamura, H. Miyoshi, T. Yokota, K. Makino, A. Murakami, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 269.
- [13] R. Cosstick, F. Eckstein, *Biochemistry*, 1985, **24**, 3630.
- [14] a) H. Matzura, F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.*, 1968, **3**, 448; b) F. Eckstein, V.W. Armstrong, H. Sternbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, **73**, 2987; c) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 6889.
- [15] a) T. Wada, N. Kobayashi, T. Mori, M. Sekine, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 351; b) K. Seio, K. Kumura, J.-C. Bologna, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3849.
- [16] H. Almer, J. Stawinski, R. Stromberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1459.
- [17] Y. Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.-M. Cui, R. Kawai, H. Kodama, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 3834.
- [18] a) W.J. Stec, A. Grajkowski, B. Karwowski, A. Kobyłańska, M. Koziolkiewicz, K. Misiura, A. Okruszek, A. Wilk, P. Guga, M. Boczkowska, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12019; b) W.J. Stec, B. Karwowski, M. Boczkowska, P. Guga, M. Koziolkiewicz, M. Sochacki, M.W. Wiczorek, J. Błaszczyk, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7156.
- [19] A. Wilk, A. Grajkowski, L.R. Phillips, S.L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2149.
- [20] V.A. Efimov, A.A. Buryakova, S.V. Reverdatto, O.G. Chakhmakhcheva, Yu. A., Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 8369.
- [21] V.A. Efimov, N.S. Molchanova, O.G. Chakhmakhcheva, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2007, **26**, 1087.

- [22] H. Almer, T. Szabo, J. Stawinski, *Chem. Commun.*, 2004, 290.
- [23] a) Y. Lu, G. Just, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 4521; b) R.P. Iyer, D. Yu, N.-H. Ho, W. Tan, S. Agrawal, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 1051; c) R.P. Iyer, M.-J. Guo, D. Yu, S. Agrawal, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2491.
- [24] a) N. Oka, T. Wada, K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8307.
- [25] N. Oka, M. Yamamoto, T. Sato, T. Wada, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16031.
- [26] M.D. De Smert, C.J. Meenken, G.J., van den Horn, *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 1999, **7**, 189.
- [27] H.L. Lightfoot, J. Hall, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 10585.
- [28] Dane zaczerpnięte ze strony internetowej: www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm337195.htm.
- [29] D.A. Brown, S.H. Kang, S.M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M.I. Nerenberg, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 26801.
- [30] N. Dias, C.A. Stein, *Mol. Cancer Ther.*, 2002, **1**, 347.
- [31] H. Jahns, M. Roos, J. Imig, F. Baumann, Y. Wang, R. Gilmour, J. Hall, *Nature Comm.*, **6**, 2015, Article nr: 6317, doi:10.1038/ncomms7317
- [32] (a) B.C. Froehler, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 5575; (b) B.C. Froehler, [w:] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogues*, S. Agrawal (Red.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1993, str. 63.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 września 2015

SYNTEZY OLIWACYNY
SYNTHESIS OF OLIVACINE

Beata Tylińska¹, Aleksandra Redzicka²

¹ *Katedra i Zakład Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Borowska 211a, 50-556 Wrocław
e-mail: beata.tylinska@umed.wroc.pl*

² *Katedra i Zakład Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław
e-mail: aleksandra.redzicka@umed.wroc.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Kondensacja 1-benzenosulfonylo-2-litoindolu z 4-formylopi-rydyną
2. Kondensacja indolu z ketalem
3. Synteza z indolu
4. Synteza z 1-(*tert*-butoksy)karbonyloindolu
5. Synteza z 1*H*-indolo-2-karboksylanu etylu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr inż. Beata Tylińska ukończyła Wydział Chemii na Politechnice Wrocławskiej. Obecnie jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Chemii Organicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Stopień doktora nauk farmaceutycznych uzyskała w 2008 roku. Obecnie zajmuje się syntezą nowych pochodnych pirydo[4,3-*b*] karbazolu.

Dr Aleksandra Redzicka ukończyła Wydział Chemii na Uniwersytecie Wrocławskim. Obecnie jest adiunktem w Katedrze i Zakładzie Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Zajmuje się syntezą związków o potencjalnej aktywności przeciwbólowej, przeciwnowotworowej i przeciwbakteryjnej.

ABSTRACT

Olivacine (1,5-methyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*]carbazole) is an isomer of ellipticine (5,11-dimethyl-6*H*-pyrido[4,3-*b*] carbazole). Both of these heterocyclic compounds are carbazole derivatives, which exhibit broad spectrum of biological activity [1], especially as antineoplastic agents [2–9]. These four-ring heterocycles can be isolated from natural sources [10–16], or prepared synthetically. Chemical literature described more than 20 method of synthesis of olivacine [2, 17–34]. In this paper we described five selected syntheses of this alkaloid. In the first one this compound can be obtained during a multistep synthesis starting from 1-benzenesulfonyl-2-lithioindole [35]. A shorter method to get olivacine was the condensation of indole with an ethylene ketal [35]. Third synthesis starts from obtaining benzenosulfonyloindol from indole [37]. Another way starts from the synthesis of 1-(*tert*-butoxy)carbo-nyloindol [38]. Fifth method to get olivacine is the synthesis from the 1*H*-indole-2-carboxylate [39].

Keywords: synthesis, olivacine, pyrido[4,3-*b*]carbazole

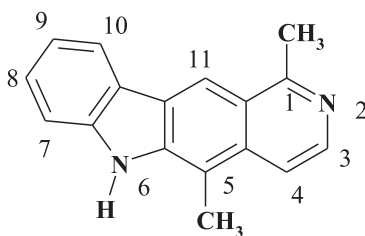
Słowa kluczowe: synteza, oliwacyna, pirydo[4,3-*b*]karbazol

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Boc	– (<i>tert</i> -butoksy)karbonylo (ang. (<i>tert</i> - <i>butoxy</i>) <i>carbonyl</i>)
Cbz	– (benzyloksy)karbonylo (ang. (<i>benzyloxy</i>) <i>carbonyl</i>)
Et ₃ B	– trietylo boran (ang. <i>triethylborane</i>)
TMG	– 1,1,3,3-tetrametyloguanidyna (ang. <i>1,1,3,3-tetramethylguanidine</i>)
IBX	– kwas 2-jodoksybenzoesowy (ang. <i>2-iodoxybenzoic acid</i>)
EG	– glikol etylenowy (ang. <i>ethylene glycol</i>)
LDA	– diizopropyloamidek litu (ang. <i>lithium diisopropylamide</i>)
HMPA	– heksametylofosforoamid (ang. <i>hexamethylphosphoramide</i>)

WPROWADZENIE

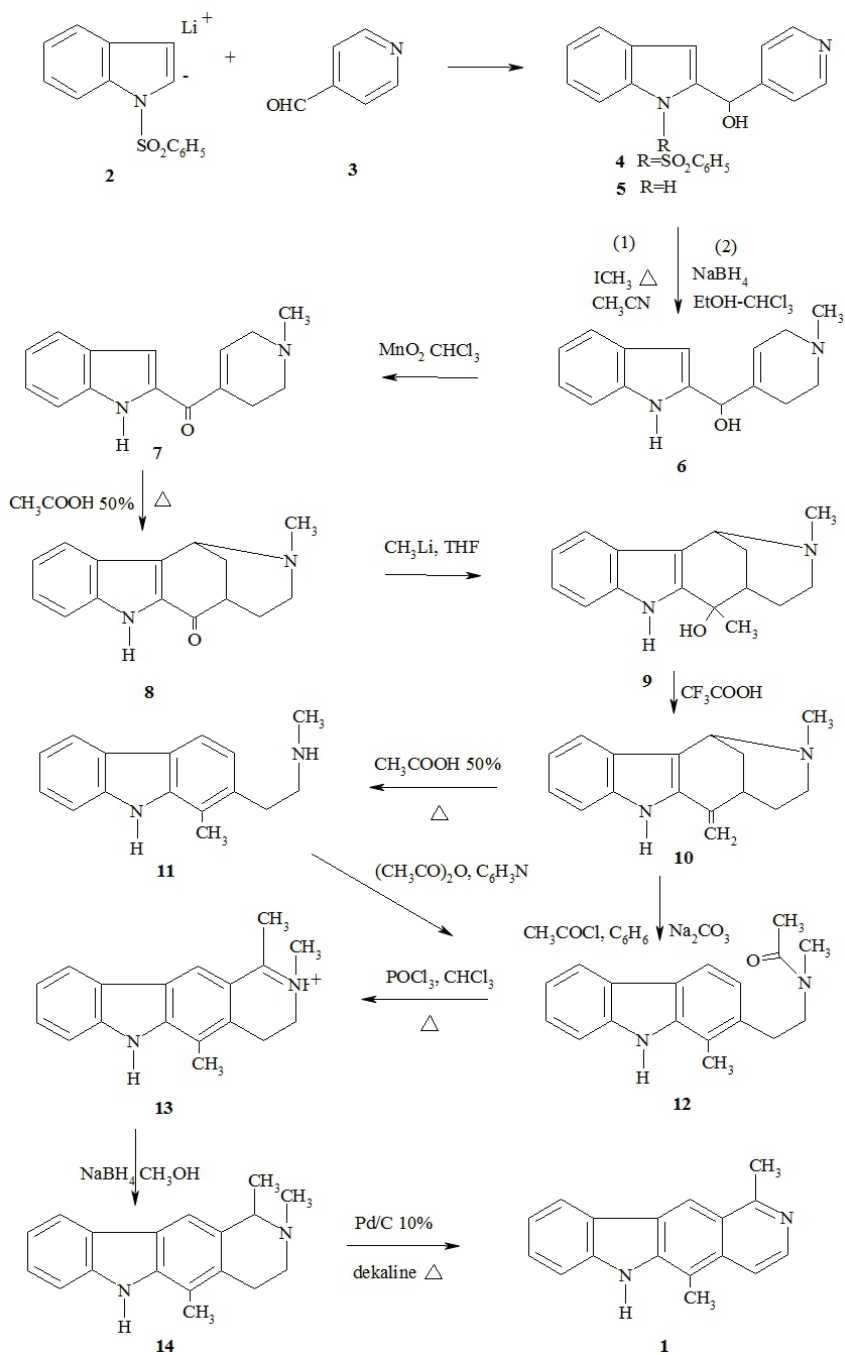
Oliwacyna **1** (1,5-dimetylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]-karbazol) jest pochodną karbazolu wykazującego szerokie spektrum działania biologicznego [1]. Kiedy 1966 roku wykryto właściwości przeciwnowotworowe [2–6] tego alkaloidu wzrosło zainteresowanie syntezą pochodnych tego związku. Po raz pierwszy oliwacynę **1** opisał Schmutz w 1958 roku, który wyizolował ją z kory i łodygi *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg., rośliny z rodziny *Apocynaceae* [10]. Później alkaloid ten otrzymano również z *Aspidosperma longepetiolatum* Kulm. [11] *Aspidosperma australe* Müll. Arg. [12] oraz *Tabernaemontana psychotrifolia* [13]. Strukturę związku określili Marini-Bettolo i Schmutz w 1959 roku [40], a potwierdził ją Ondetti [41]. Pierwszą syntezę oliwacyny **1** opisano w 1960 roku [17]. Kolejni badacze próbowali innych metod syntezy tego związku [2, 18–34]. W większości opisanych w literaturze metod syntezy oliwacyny, substratem wyjściowym do reakcji był indol bądź jego pochodne. Naukowcy modyfikowali sposoby otrzymywania tego alkaloidu w celu uproszczenia jego syntezy bądź zwiększenia wydajności związku finalnego.

**1**

- jasno żółte igły

- t. t. 317–325°C

W niniejszej pracy opisano pięć metod syntezy oliwacyny **1** wykazującej aktywność biologiczną. Przedstawione szlaki otrzymania indolowego alkaloidu nie zostały wcześniej ujęte w przeglądowych artykułach czy rozdziałach książek opisujących syntezy pirydokarbazoli.



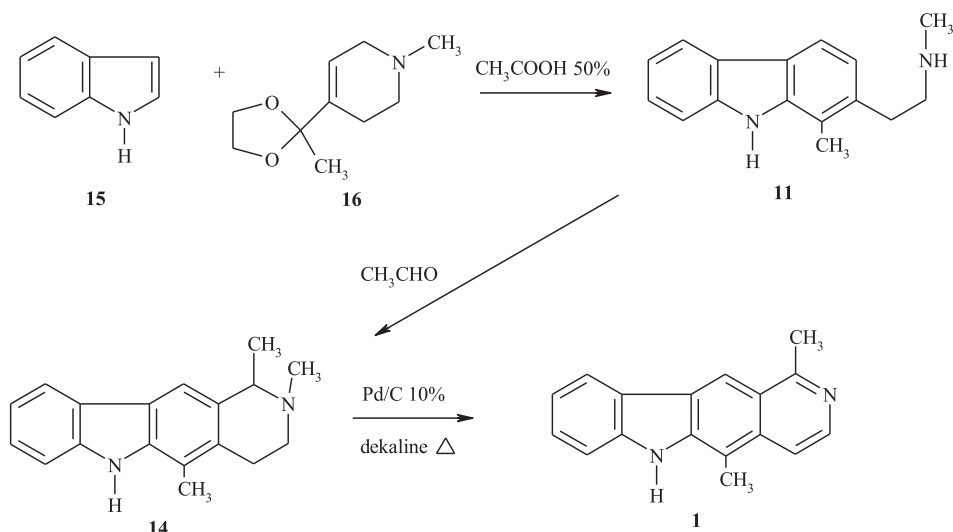
Schemat 1
Scheme 1

1. KONDENSACJA 1-BENZENOSULFONYLO-2-LITOINDOLU Z 4-FORMYLOPIRYDYNĄ

W 1981 roku Besselièvre i Husson [35] opisali syntezę oliwacyiny **1** (Schemat 1) rozpoczynając od kondensacji 1-benzenosulfonylo-2-litoindolu **2** z 4-formylopirydyną **3** w THF (wyd. 62%). Otrzymaną pochodną indolu **4** rozpuszczono w roztworze etanolu i 10N wodorotlenku sodu. Po 2 godzinach reakcji powstały indolo-2-yl-4-pirydokarbinol **5** (z wyd. 57%) poddano reakcji z borowodorkiem sodu. Otrzymany alkohol **6** utleniono MnO_2 , a następnie powstały indolo-2-yl-1,2,5,6-tetrahydro-1-metylo-4-pirydylo keton **7** poddano cyklizacji do związku **8**. Besselièvre przeprowadził powyższe etapy syntezy opierając się na publikacji Joule [36]. Powstałą pochodną indolu **8** poddano redukcji do alkoholu **9** stosując CH_3Li w THF. Odwodnienie związku **9** za pomocą CF_3COOH doprowadziło do otrzymania pochodnej **10**. Karbazol **11** powstał (z wyd. 90 %) podczas mieszania związku **10** w 50% kwasie octowym przez 24 godziny, który następnie poddano acylowaniu w mieszaninie bezwodnika kwasu octowego i pirydyny (w stosunku objętościowym 1:1) i otrzymano amid **12** (wyd. 95%). Tą samą pochodną otrzymano na drodze reakcji związku **10** z chlorkiem kwasu octowego w benzenie (z wyd. 95%). Związek **12** następnie poddano cyklizacji, otrzymując sól amoniową **13**. Redukcja przy użyciu NaBH_4 w temperaturze pokojowej doprowadziła do powstania guatambuiny **14** (z wyd. 72%). Finalną oliwacynę **1** otrzymano poddając aromatyzacji (\pm) guatambuinę (1,2,5-trimetylo-2,3,4,6-tetrahydro-1*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazol) **14** 10% palladem na węgłu w dekalinie (z wyd. 24%).

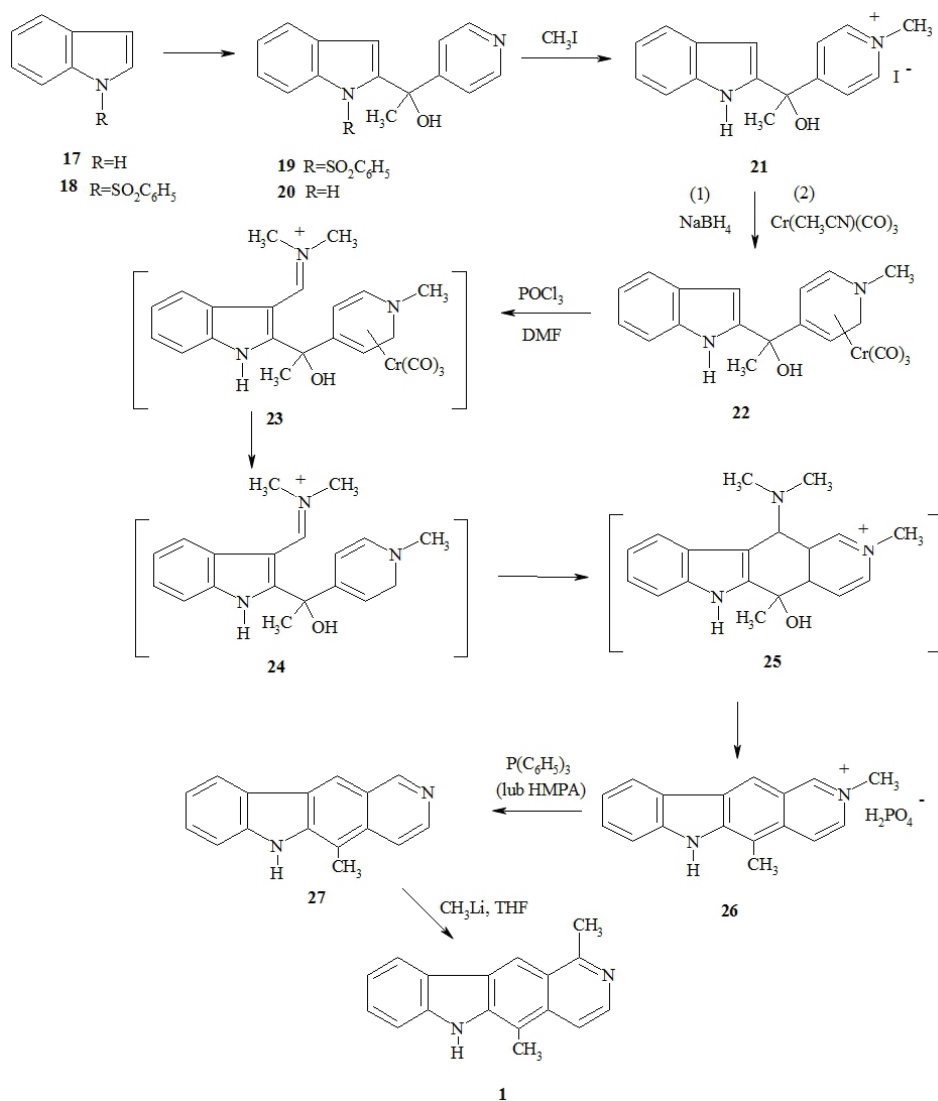
2. KONDENSACJA INDOLU Z KETALEM

W tej samej publikacji z 1981 roku [35] R. Besselièvre i H-P. Husson przedstawili trzyetapową syntezę oliwacyiny **1** (Schemat 2). Rozpoczęli od reakcji indolu **15** z ketalem **16** i otrzymali aminę **11** (wyd. 74%), którą rozpuścili w metanolu i dodali 10N HCl oraz aldehyd octowy. Powstałą (\pm) guatambuinę (wyd. 33%) aromatyzowali 10% Pd/C w dekalinie ostatecznie otrzymując oliwacynę **1** (wyd. 24%).



3. SYNTEZA Z INDOLU

Kutney i in. zaproponował syntezę oliwacyny **1** (Schemat 3) rozpoczynając od otrzymania benzenosulfonyloindolu **18** z indolu **17**. Związek **18** został poddany reakcji z 4-acetylopirydyną w atmosferze wodoru w temperaturze 0°C. Uzyskany alkohol **19** (z wyd. 65%) dodano do 2M metanolowego roztworu wodorotlenku sodu i otrzymano indolo-2-yl-1-(4-pirydylo)-etanol **20** (wyd. 72%), który po reakcji z CH_3I przekształcono w pochodną **21** (wyd. 89%). Pirydyniowa sól **21** została poddana reakcji z NaBH_4 w eterze, a następnie utworzono kompleks **22** (wyd. 56%) stosując $\text{Cr}(\text{CH}_3\text{CN})_3(\text{CO})_3$, który po reakcji z odczynnikiem Vilsmeier'a (powstałego z DMF i POCl_3) dał związek **26**. Pochodną **26** poddano demetylacji fosforem trimetylu w DMF (lub HMPA) i otrzymano 5-metylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazol **27** (wyd. 54%), który po reakcji z metylololitem w THF dał oliwacynę **1** (wyd. 54%) [37].

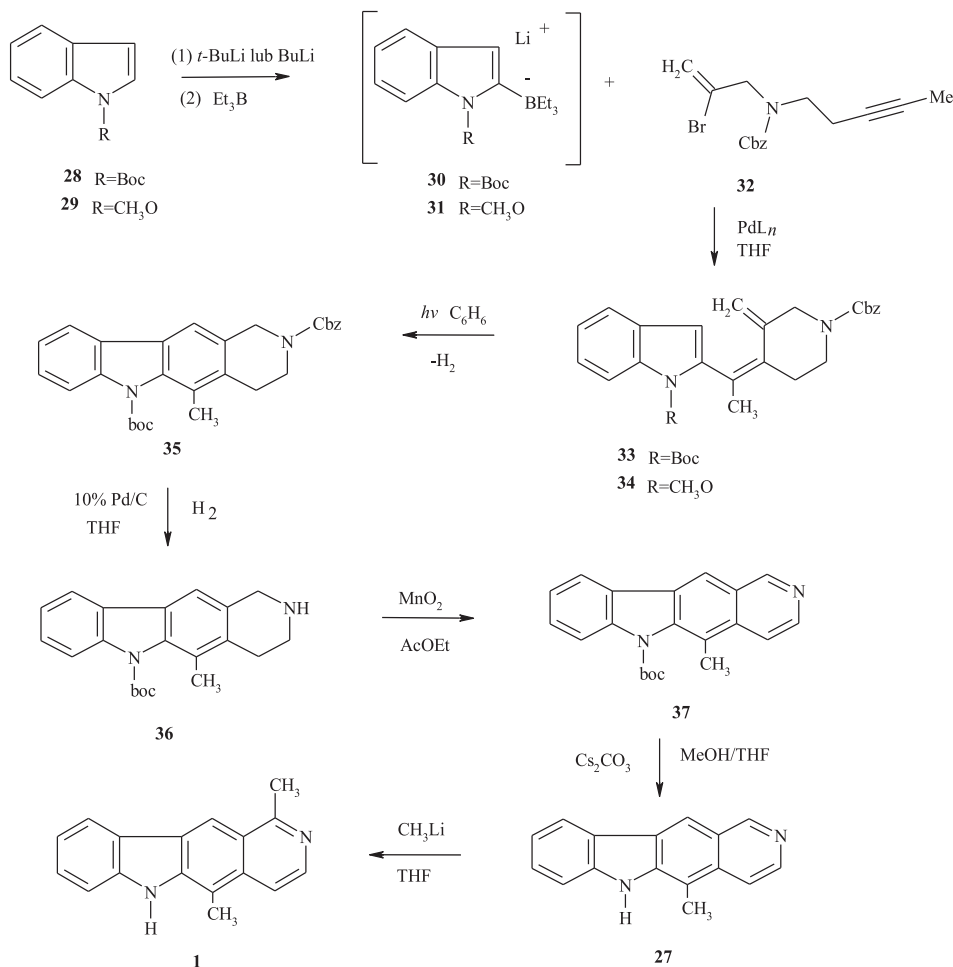


Schemat 3
Scheme 3

4. SYNTEZA Z 1-(*TERT*-BUTOKSY)KARBONYLOINDOLU

Kolejną syntezę oliwacyny **1** opisali Isikura i in. w 2008 r. [38] (Schemat 4). Syntezę rozpoczął od otrzymania 1-[(*tert*-butoksy)karbonylo]-1*H*-indolo-2-ylboranu **30** (lub 1-metoksy-1*H*-indolo-2-ylboranu **31**) [32], który poddany reakcji z bromopochodną **32** prowadził do pochodnej **33** (lub **34**). Następnie w wyniku fotochemicznej reakcji w benzenie uzyskano karbazolową pochodną **35**, z której

została usunięta grupa benzyloksykarbonylowa za pomocą 10% Pd/C i otrzymano aminę **36** (wyd. 90%). Związek ten aromatyzowano stosując MnO_2 w octanie etylu i uzyskano pochodną pirydokarbazolu **37** (wyd. 60 %). Po usunięciu grupy (tert-butoksy)karbonylowej otrzymano 5-metylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazol **27** (wyd. 55%). W reakcji metylowania metylolitem opisaną przez Kutney'a [37] ze związku **27** otrzymano oliwacynę **1** (wyd. 54%).

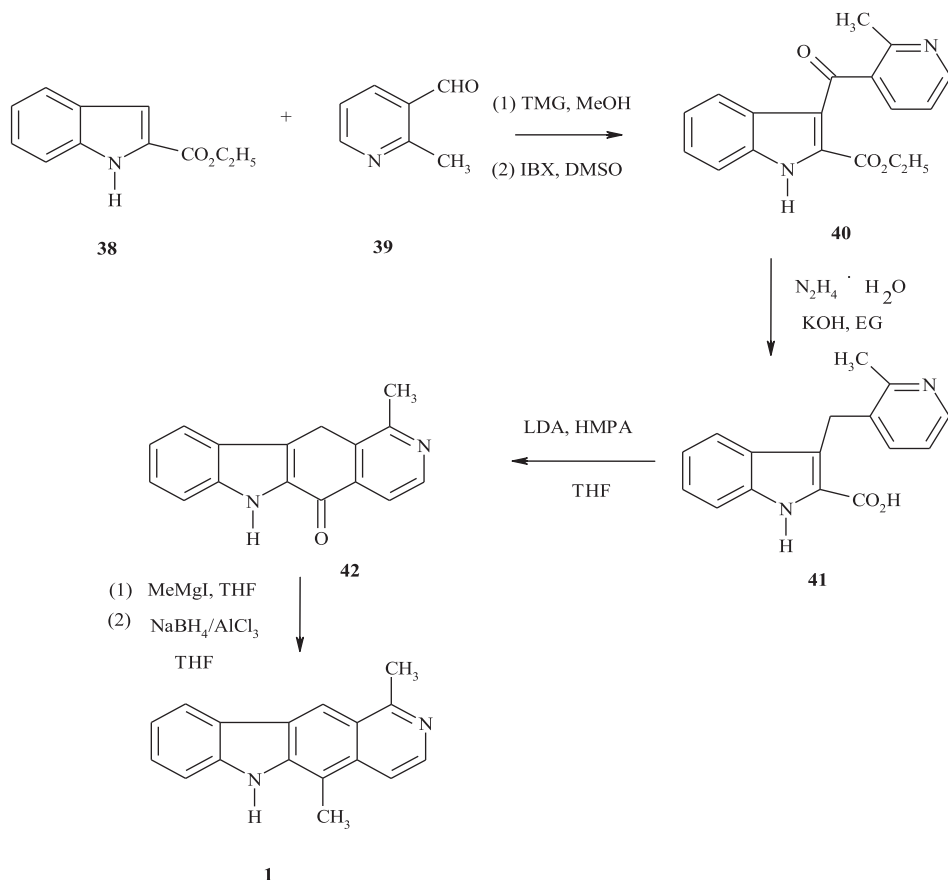


Schemat 4
Scheme 4

5. SYNTEZA Z 1*H*-INDOLO-2-KARBOKSYLANU ETYLU

Najnowszą metodę syntezy 1,5-metylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]karbazolu **1** opisali Ramkumar i Nagarajan (Schemat 5) [39]. Przeprowadzili oni reakcję 1*H*-indolo-

-2-karboksyланu etylu **38** z aldehydem pirydo-2-metylo-3-karboksyłowym **39** uzyskując keton **40** (wyd. 84%), który poddany redukcji Wolfa-Kishner'a doprowadził do otrzymania związku **41** (wyd. 89%). Następnie powstały **41** został ochłodzony do temperatury -78°C i zadany mieszaniną LDA/HMPA. Otrzymana pochodna **42** (wyd. 36%) została poddana reakcji z CH_3MgI w THF, a następnie redukcji $\text{NaBH}_4/\text{AlCl}_3$ (3:1). Oliwacynę **1** uzyskano z wydajnością 58%.



Schemat 5

Scheme 5

PODSUMOWANIE

Oliwacyna (1,5-dimetylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]-karbazol) jest izomerem eliptycyny (5,11-dimetylo-6*H*-pirydo[4,3-*b*]-karbazol). Te heterocykliczne związki są pochodnymi karbazoli, które wykazują szeroką aktywność biologiczną [1]. Obydwa alkaloidy posiadają właściwości przeciwnowotworowe [2–9]. Omawiane, cztero-

pierścieniowe związki heterocykliczne można otrzymać poprzez wyizolowanie ich z naturalnych substancji [10–16] lub na drodze syntetycznej. W literaturze opisanych jest około 20 szlaków syntetycznych oliwacyny [2, 17–34]. W niniejszej pracy przedstawiono pięć reprezentacyjnych syntez tego alkaloidu. W pierwszej opisanej syntezie związek ten otrzymano rozpoczynając wieloetapową syntezę od kondensacji 1-benzenosulfonylo-2-litoinдолu z 4-formylopirydyną [35]. Krótszą metodą otrzymania oliwacyny było rozpoczęcie od kondensacji indolu z ketalem [35]. Kolejną syntezę zapoczątkowało otrzymanie benzenosulfonyloindolu z indolu [37]. Innym sposobem jest synteza z 1-(*tert*-butoksy)karbonyloindolu [38]. Najnowszą metodą otrzymania oliwacyny była synteza z 1*H*-indolo-2-karboksylanu etylu [39] opisana w 2014 roku. Zainteresowanie tym alkaloidem i jego pochodnymi to nadal bardzo interesujący temat wynikający głównie z aktywności biologicznej oliwacyny.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANIE

- [1] B.Ch. Nandy, A.K. Gupta, A. Mittal, V. Vyas, *IJMASR*, 2014, **1**(1), 25.
- [2] C.W. Mosher, O.P. Crews, E.M. Acton, L. Goodman, *J. Med. Chem.*, 1966, **9**, 237.
- [3] H.P. Husso, R. Besselièvre, P. Potier, J.B. Le pecq, C. Paolletti, *Eur. Pat. Appl. EP*, 1981, 42438.
- [4] M. Maftouh, R. Besselièvre, B. Monsarrat, P. Lesca, B. Meunier, P. Husson, C. Paoletti, *J. Med. Chem.* 1985, **20**, 708.
- [5] G.W. Gribble, *The Alkaloids*, A. Brossi (Red.), Academic Press, New York 1990, str. 239.
- [6] K.L. Dalton, S. Demerac, B.C. Elmes, J.W. Loder, M.J. Swan, T. Teitei, *Aust. J. Chem.*, 1967, **20**, 2715.
- [7] C.N. Garbett, D.C. Graves, *Curr. Med. Chem.- Anti.-Cancer Agents*, 2004, **4**, 149.
- [8] M. Stiborová, J. Poljakowa, E. Martinková, L. Borek-Dohalská, T. Eckschlager, R. Kizek, E. Frei, *Interdiscip. Toxicol.*, 2011, **4**(2), 98.
- [9] L.K. Dalton, S. Demerac, B.C. Elmes, J.W. Loder, J.M. Swan, T. Teitei, *Aust. J. Chem.*, 1967, **20**, 2715.
- [10] J. Schmutz, F. Hunzicker, *Pharm. Acta Helv.*, 1958, **33**, 341.
- [11] G.B. Marini-Bettolo, P. Carvalho-Ferreira, *Rend. Ist Sup. Sanit.*, 1960, **23**, 68.
- [12] M.A. Ondetti, V. Deulofeu, *Tetrahedron Lett.*, 1959, **7**, 1.
- [13] M.C. Gorman, N. Neuss, N.J. Cone, J.A. Deyroup, *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**, 1142.
- [14] S. Goodwin, A.F. Smith, E.C. Horning, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 1903.
- [15] J.P. Cosson, M. Schmid, *Phytochemistry*, 1970, **9**, 1353.
- [16] C. Kan-Fan, B.C. Das, P. Potier, M. Schmid, *Phytochemistry*, 1970, **9**, 1351.
- [17] J. Schmutz, H. Wittwer, *Helv. Chem. Acta*, 1960, **43**, 793.
- [18] E. Wenkert, K.G. Dave, *J. Am. Chem. Soc.*, 1962, **84**, 94.
- [19] R. Besselièvre, H.P. Husson, *Tetrahedron Lett.*, 1976, **22**, 1873.
- [20] J. Bergman, R. Carlsson, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **19**, 24055.
- [21] J.P. Kutney, M. Noda, N.G. Lewis, B. Monteiro, D. Mostowicz, B.R. Worth, *Heterocycles*, 1981, **16**, 1469.
- [22] T. Naito, N. Iida, I. Ninomiya, *J. Chem. Soc. Chem. Com.*, 1981, **2**, 44.
- [23] Y. Murakami, Y. Yokoyama, N. Okuyama, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 2189.
- [24] Y. Murakami, Y. Yokoyama, N. Okuyama, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **24**, 2189.
- [25] I. Hogan, P.D. Jenkins, M. Sainsbury, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 6505.

- [26] I. Hogan, P.D. Jenkins, M. Sainsbury, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 2943.
- [27] Y. Yokoyama, N. Okuyama, S. Iwadate, T. Momoi, Y. Murakami, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1990, **1**, 1319.
- [28] S. Hibino, E. Sugino, *J. Heterocycl. Chem.*, 1990, **27**, 1751.
- [29] Y. Yokoyama, N. Okuyama, S. Iwadate, T. Momoi, Y. Murakami, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1990, **1**, 1319.
- [30] J.E. Bäckvall, N.A. Plobeck, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4528.
- [31] R.J. Hall; J. Marchant; A.M.F. Oliveira-Campos, M.J.R.P. Queiroz, P.V.R. Shannon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1992, **1**, 3439.
- [32] M. Ishikura, Y. Matsuzaki, I. Agata, N. Katagiri, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 13929.
- [33] N.S. Narasimhan, M. Gokhale, *J. Indian. Sci.*, 2001, **81**, 135.
- [34] Y. Miki, Y. Tsuzaki, H. Hibino, Y. Aoki, *Synlett.*, 2004, **12**, 2206.
- [35] R. Besselièvre, H.P. Husson, *Tetrahedron*, 1981, **37**, (Suppl. 1), 241.
- [36] A. Jackson, N.D.V. Wilson, A.J. Gaskell and J.A. Joule, *J. Chem. Soc. C.*, 1969, 2738.
- [37] J.P. Kutney, M. Noda, N.G. Lewis, B. Monteiro, D. Mostowicz, B. Wotrnh, *Can. J. Chem.*, 1982, **60**, 2426.
- [38] M. Ishikura, N. Takahashi, K. Yamada, T. Abe, R. Yanada, *Helvetica Chimica Acta*, 2008, **91**, 1828.
- [39] N. Ramkumar, R. Nagarajan, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 736.
- [40] G.B. Marini-Bettolo, J. Schmurz, *Helv. Chem. Acta*, 1959, **42**, 2146.
- [41] M.A. Ondetti, V. Deulofeu, *Tetrahedron*, 1961, **15**, 1-4, 160.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 listopada 2015

**NATURALNE I SYNTETYCZNE ANALOGI
STRUKTURALNE JONONÓW**

**NATURAL AND SYNTHETIC STRUCTURAL
ANALOGS OF IONONES**

**Małgorzata Grabarczyk*, Katarzyna Wińska,
Wanda Mączka**

*Katedra Chemii, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław
e-mail: magrab@onet.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Naturalne pochodne jononów i ich aktywność biologiczna
2. Aktywność allelopatyczna
3. Aktywność ichtiotoksyczna
4. Bioluminescencja
5. Glikozydowe i sulfonowe pochodne jononów
6. Syntetyczne pochodne jononów
7. Wykorzystanie biotransformacji do otrzymywania pochodnych jononów

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Małgorzata Grabarczyk w roku 1989 ukończyła chemię na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Od 1995 roku pracuje w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W 2003 roku obroniła pracę doktorską w dziedzinie chemii organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. W 2015 roku uzyskała stopień doktora habilitowanego. Specjalność – synteza organiczna, biotransformacje.

Dr inż. Katarzyna Wińska w roku 1999 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Tytuł doktora nauk chemicznych uzyskała w 2008 roku. W 2011 roku otrzymała wyróżnienie w konkursie „Wynalazczyni 2011” organizowanym przez Naczelną Organizację Techniczną, Urząd Patentowy RP, Stowarzyszenie Polskich Wynalazców i Racjonalizatorów oraz redakcję „Przeglądu Technicznego”. Obecnie jest adiunktem w Katedrze Chemii na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Specjalność – chemia związków zapachowych, biokataliza.

Dr inż. Wanda Mączka w roku 1999 ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej. Stopień doktora nauk biologicznych, specjalność – biotechnologia uzyskała w 2003 roku. Jest adiunktem w Katedrze Chemii na wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Specjalność – biokataliza, aktywność biologiczna związków organicznych.

ABSTRACT

Both plants and animals in the process of evolution gained the ability to produce compounds that affect their existence in the wild. These compounds may affect the organisms producing them, and may also be used by completely different individuals. Among huge number of molecules characterized by extremely essential features are, among others, ionones and their derivatives. Ionones are ketones composed of 13 carbon atoms. They are found in many essential oils being the products of degradation of carotenoids. Both they and their structural analogues can play various biological functions such as being deterrent to other individuals or, conversely, attractant. Compounds found in plants, containing like ionone carbon skeleton, and having in their structure additional hydroxyl groups or epoxide ring (4)–(23) often exhibit allelopathic activity [1–15] (Fig. 2–5). Marine animals may in turn use them as ichtyotoxic compounds (27) and (28) [19] (Fig. 7). A compound called luciferin *Latia* (29) is responsible for the bioluminescent properties of marine snail [20] (Fig. 8). Plants used for centuries in traditional folk medicine of different countries are a source of glycoside derived α - and β -ionone (37)–(55) [22–31] (Fig. 11–14). These compounds may also be used in modern medicine, inter alia, in the regulation of neurodegenerative diseases or for the treatment of osteoporosis. Because of the potential biological properties of structural analogs of ionones they are also obtained by chemical synthesis (56)–(69) [32–39] (Fig. 15–18) or biotransformation (70)–(89) [40–47] (Fig. 19–25), and then subjected to careful examination of their biological activities. By applying these methods we can also obtain a molecules whose acquisition from natural sources is unprofitable. We have received such derivatives which have no counterpart in nature.

Słowa kluczowe: pochodne jononów, aktywność biologiczna

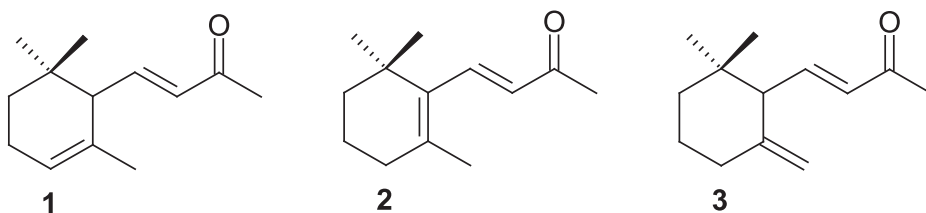
Keywords: ionone derivatives, biological activity

WPROWADZENIE

Organizmy żywe żyjące na Ziemi w ciągu milionów lat rozwoju wykształciły w sobie zdolność do wytwarzania różnorodnych związków chemicznych, spośród których na szczególną uwagę zasługują jonony i ich analogi strukturalne. Jonony występują w olejkach eterycznych różnych roślin, m.in. w olejku różanym. Ze względu na ich interesujący zapach są one często wykorzystywane w przemyśle kosmetycznym. Analogi strukturalne jononów zazwyczaj nie posiadają już pięknego zapachu, ale za to wykazują szereg innych interesujących właściwości. Wiele pochodnych jononów wyizolowanych z różnych roślin charakteryzuje się znacznym wpływem na otaczające te rośliny środowisko naturalne. Charakteryzuje je np. aktywność allelopatyczna lub ichtiotoksyczna. Jednakże analogi strukturalne jononów nie muszą być konieczne otrzymywane ze źródeł naturalnych. W poszukiwaniu nowych leków zsyntezowano szereg pochodnych jononów, z których niektóre mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w terapii rozmaitych schorzeń. Analogi strukturalne jononów posiadające w swojej cząsteczce dodatkowe grupy hydroksylowe można również otrzymywać na drodze biotransformacji. Taka modyfikacja często zwiększa aktywność biologiczną związków w stosunku do ich prekursorów.

1. NATURALNE POCHODNE JONONÓW I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

Jonony to cykliczne nienasycone ketony, należące do grupy związków terpenoidowych. Ich głównymi przedstawicielami są naturalnie występujące izomery – α -jonon (1) i β -jonon (2) oraz γ -jonon (3), który otrzymany został jedynie na drodze syntezy chemicznej (Rys. 1).



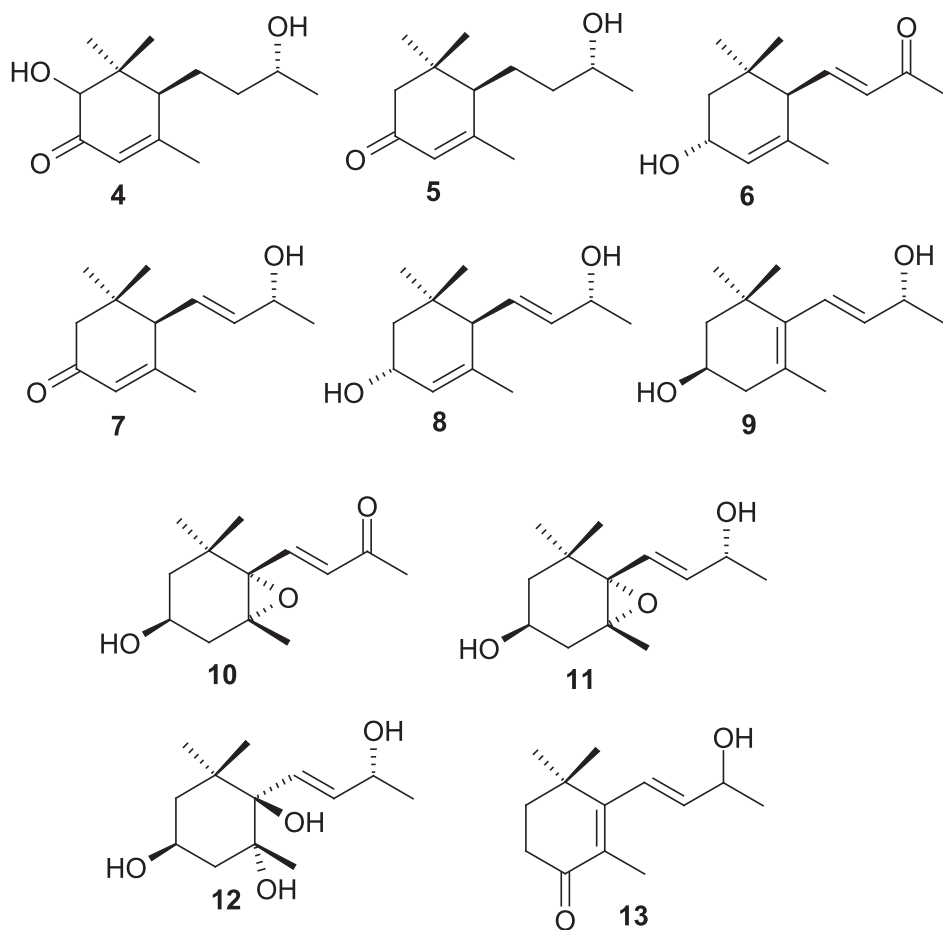
Rysunek 1. Struktury jononów
Figure 1. Structures of ionones

1.1. AKTYWNOŚĆ ALLELOPATYCZNA

Szereg związków, będących analogami strukturalnymi zarówno α -jononu jak i β -jononu wyizolowano z metanolowego ekstraktu z liści krzewu *Cestrum parqui*. Były to: 2,9-dihydroksy-4-megastigmen-3-on (4), 9-hydroksy-4-megastigmen-3-on (5), 3-hydroksy-4,7-megastigmadien-9-on (6), 9-hydroksy-4,7-megastigmadien-3-on (7), 3,9-dihydroksy-4,7-megastigmadien (8), 3,9-dihydroksy-5,7-megastigmadien (9), 5,6-epoksy-3-hydroksy-7-megastigmen-9-on (10), 5,6-epoksy-3,9-dihydroksy-7-megastigmen (11), 3,5,6,9-tetrahydroksy-7-megastigmen (12), 9-hydroksy-5,7-megastigmadien-4-on (13). Krzew *Cestrum parqui* występuje głównie w rejonie Morza Śródziemnego, charakteryzuje się dużą ekspansywnością, ponadto jest on bardzo toksyczny dla zwierząt gospodarskich. Ta ostatnia właściwość skłoniła badaczy do identyfikacji występujących w niej związków, a następnie przetestowania ich wpływu na kiełkowanie oraz długość korzeni i pędów sałaty (*Lactuca sativa* L.) Do testów stosowano wodne roztwory o stężeniu 10^{-4} – 10^{-7} M. Stwierdzono, że związki (4) i (6) hamowały kiełkowanie nasion, przy czym ten drugi w dużo większym stopniu. Związki (4), (6), (8), (9) i (10) ograniczały wzrost korzeni, najsilniejszy efekt zaobserwowano dla związku (8). Hamowany był również wzrost pędów, najsilniejszy przy zastosowaniu związków (6), (7), (9), w mniejszym zaś stopniu – (5), (8), (10). Co ciekawe związek (5) przy stężeniach 10^{-4} , 10^{-5} i 10^{-6} wpływał hamująco, zaś przy stężeniu 10^{-7} indukująco na wzrost pędów [1]. Okazało się ponadto, że niektóre związki znalezione w liściach krzewu *Cestrum parqui* zostały już wcześniej zidentyfikowane w innych roślinach. Pochodne (5) i (8) – w tytoniu szlachetnym (*Nicotiana tabacum*) [2, 3], (5) – w *Vilburnum dilatatum* [4], (9) – w tytoniu *Burley* [5]. Związek (10) został również wcześniej znaleziony w *Athyrium yokoscense* i przetestowano wówczas jego wpływ na kiełkowanie nasion sałaty. Testy wykazały, że 100% zahamowanie kiełkowania nasion obserwuje się przy stężeniu tego związku wynoszącym 10 ppm [6]. Z kolei związki (10) i (11) zidentyfikowano jako składniki wodnego roztworu z liści rukiewnika wschodniego (*Bunias orientalis*). Stwierdzono, że m. in. związki te są odpowiedzialne za hamowanie wzrostu nasion maruny bezwonnej (*Matricaria inodora* L.), sałaty siewnej (*Lactuca sativa* L.) oraz jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) [7] (Rys. 2).

Związki (6) oraz (7) znaleziono również w roślinie wulpia mysi ogon (*Vulpia myuros* L.). Stwierdzono, że związki te hamują wzrost korzeni i pędów rzeżuchy (*Lepidium sativum* L.), sałaty siewnej (*Lactuca sativa* L.), lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.), tymotki łąkowej (*Phleum pratense* L.), palusznika krwawego (*Digitaria sanguinalis*) oraz życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* Lam.). Obie substancje hamowały wzrost korzeni i pędów rzeżuchy przy stężeniach większych niż 0,3 μ M. Stężenia wymagane dla 50% zahamowania wzrostu korzeni i pędów rzeżuchy, sałaty, lucerny, tymotki i palusznika i życicy wynosiły 2,1–34,5 μ M dla związku (6) i 2,7–19,7 μ M dla związku (7). Oznacza to, że substancje te wykazują działanie allelopatyczne chroniąc wulpię mysi ogon poprzez hamowanie wzrostu

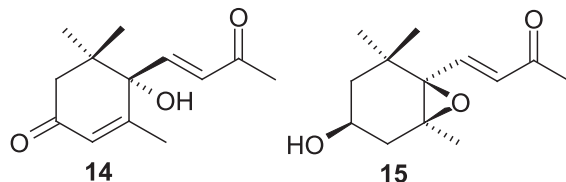
sąsiednich roślin [8]. Związek (6) wyizolowano także z olejków eterycznych kudzu (*Pueraria lobata* Ohwi) [9] oraz z liści *Chamaecyparis formosensis* Matsum [10] (Rys. 2).



Rysunek 2. Pochodne jononów wyizolowane z *Cestrum parqui*
Figure 2. Ionone derivatives isolated from *Cestrum parqui*

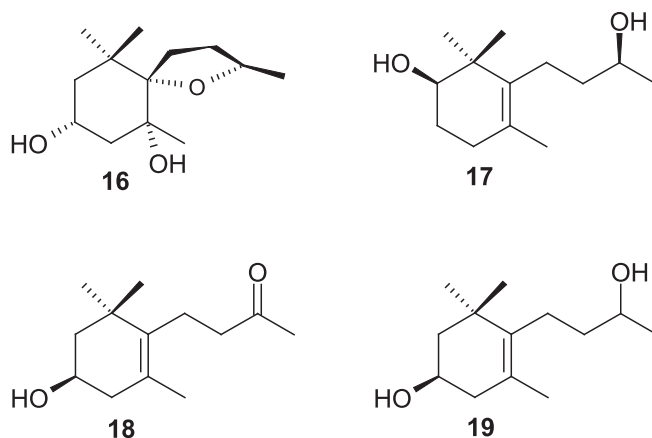
Kolejne dwa związki (+)-dehydrowomifoliol (14) i annujonon D (15) znaleziono w liściach słonecznika cv. Peredovick. Związki te zostały przetestowane pod kątem ich aktywności allelopatycznej pod kątem wpływu na kiełkowanie oraz wzrost korzeni i pędów sałaty siewnej (*Lactuca sativa*), rzeżuchy (*Lepidium sativum*), cebuli zwyczajnej (*Allium cepa*) oraz jęczmienia zwyczajnego (*Horedum vulgare*). Związek (14) wykazywał wyraźny wpływ hamujący na kiełkowanie nasion *Lactuca sativa* wynoszący średnio 45% przy stężeniu 10^{-4} – 10^{-6} M. Związek (15) stymulował wzrost korzeni *Allium cepa* w zakresie od 67% dla stężenia 10^{-5} M do 34% dla stężenia 10^{-9} M. Obydwa związki wykazywały wpływ stymulujący wzrost

korzeni i pędów *Horedum vulgare* (średnio 35%) [11]. Związek (14) znaleziono również w liściach *Croton tiglium* L. [12] (Rys. 3).



Rysunek 3. Pochodne jononów wyizolowane ze słonecznika cv. Peredovick
Figure 3. Ionone derivatives isolated from sunflower cv. Peredovick

Związki będące pochodnymi jononów znaleziono również w liściach dębu indyjskiego (*Tectona grandis* L.), rosnącego w lasach południowo-wschodniej Azji. Ze względu na duże zapotrzebowanie na drewno tekowe otrzymywane z tego drzewa w połowie XIX rozpoczęto jego uprawę na dużą skalę, wykorzystując do tego celu również pola uprawne. Okazało się, że drzewa tekowe wpływają pozytywnie na te uprawy, zwiększając ich wydajność i równocześnie minimalizują zachwaszczenie. Z liści *Tectona grandis* wyizolowano tektojonol A (16), tektojonol B (17), 3-hydroxymegastigm-5-en-9-on (18) wyizolowany wcześniej z *Chamaecyparis formosensis* Matsum. oraz 3-hydroxymegastigm-5-en-9-ol (19). Związki te wykazywały wpływ hamujący na wzrost korzeni i pędów sałaty, pomidora zwyczajnego (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i cebuli. Wartości IC_{50} dla tych związków wynoszą odpowiednio: 0,41 mM (17), 1,37 mM (18) oraz 13,17 mM (19). Fitotoksyczność związku (19) względem sałaty i pomidorów jest porównywalna z działaniem handlowego herbicydu o nazwie Logran[®]. Wynika z tego, że związek ten może być odpowiedzialny za działanie allelopacyjne wykazywane przez dąb indyjski [13] (Rys. 4).

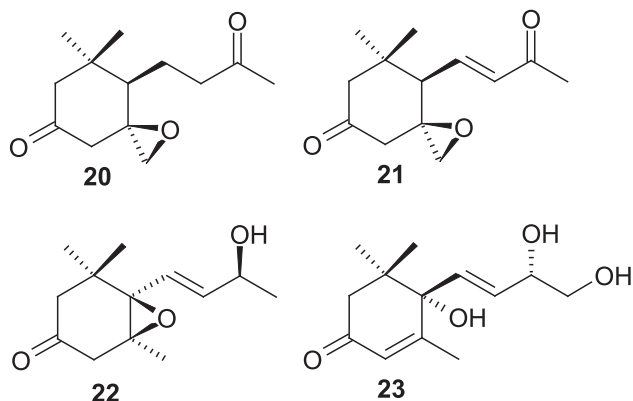


Rysunek 4. Pochodne α - i β -jononu wyizolowane z liści dębu indyjskiego *Tectona grandis*
Figure 4. Ionone derivatives isolated from indian oak *Tectona grandis* leaves

9-Hydroksy-4,7-megastigmadien-3-on (7), annujonon A (20), annujonon B (21) i annujonon C (22) wyizolowano ze słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.). Związki te zostały przebadane pod kątem ich aktywności allelopacyjnej. Sprawdzone ich wpływ na wzrost korzeni i pędów sałaty, rzeżuchy, cebuli oraz jęczmienia. Związek (21) w największym stopniu stymulował wzrost korzeni roślin dwuliściennych *Lactuca sativa* i *Lepidium sativum* już przy niskich stężeniach wynoszących 10^{-8} M (47%) oraz 10^{-9} M (32%). Co ciekawe w przypadku gatunków jednoliściennych zaobserwowano różne działanie w zależności od gatunku. Kielkowanie cebuli hamowały odpowiednio związki: (7) 10^{-4} M (38%), (20) 10^{-4} M (47%), natomiast wzrost korzeni stymulowały odpowiednio: (7) 10^{-4} M (63%), 10^{-8} M (54%), (20) 10^{-4} M (42%), 10^{-5} M (48%), 10^{-6} M (49%). W przypadku jęczmienia zaobserwowano jedynie działanie stymulujące wzrost korzeni i pędów. W stosunku do tej rośliny związek (22) stymulował wzrost korzeni, średnio o 35% (10^{-5} M) i 40% (10^{-9} M).

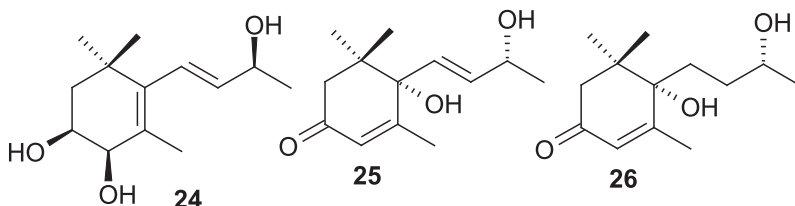
Powyższe wyniki sugerowały, że związki (7) i (20)–(22) są prawdopodobnie znacznie zaangażowane w allelopacyjne działanie odmian słonecznika wobec gatunków jednoliściennych. W związku z tym, można stwierdzić, że związki (7) i (20) mogą znaleźć zastosowanie jako potencjalne naturalne herbicydy [14] (Rys. 5).

Związek (7) i 6,9,10-trihydroksy-4,7-megastigmadien-3-on (23) o działaniu allelopacyjnym wyizolowano z ogórka (*Cucumis sativus* L. cv. Phung Tuong). Pochodna (6) hamowała wzrost rzeżuchy (*Lepidium sativum* L.) i chwastnicy jednostronnej (*Echinochloa crus-galli* L. Beauv) w stężeniu odpowiednio 0,3 i 1,0 μ M. Pochodna (23) hamowała wzrost rzeżuchy i chwastnicy jednostronnej w stężeniach odpowiednio 1,0 i 3,0 μ M. Stężenia wymagane dla 50% zahamowania wzrostu korzeni i pędów badanych roślin wynosiły 2,4–29,3 μ M dla (7) i 8,1–52,2 μ M dla (23). Autorzy zasugerowali więc, że rośliny ogórkowe mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jako biologiczne czynniki zwalczania chwastów w środowisku rolniczym [15] (Rys. 5).



Rysunek 5. Pochodne jononów wyizolowane z *Helianthus annuus* L. i *Cucumis sativus* L.
Figure 5. Ionone derivatives isolated from *Helianthus annuus* L. i *Cucumis sativus* L.

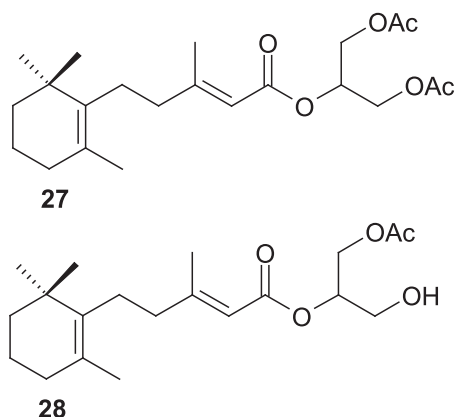
Kolejne pochodne jononów 3,4,9-trihydroksy-5,7-megastigmadien (**24**) i blumenol A (**25**) oraz wspomniane wcześniej związki (**7**) i (**11**) wyizolowano z *Brassica fruticulosa* Cirillo, rośliny kapustnej rozpowszechnionej w rejonie Morza Śródziemnego [16]. Blumenol A (**25**) i blumenol B (**26**) znaleziono z kolei w liściach *Heliotropium angiospermum* Vahl [17]. Związek (**25**) został również wyizolowany z *Rauvolfia womitoria* Afzel., *Croton sparsiflorus* oraz *Podocarpus blumei* [18] a także z liści *Croton tiglium* [9] (Rys. 6).



Rysunek 6. Pochodne jononów wyizolowane z *Brassica fruticulosa* oraz *Heliotropium angiospermum*
 Figure 6. Ionone derivatives isolated from *Brassica fruticulosa* and *Heliotropium angiospermum*

1.2. AKTYWNOŚĆ ICHTIOTOKSYCZNA

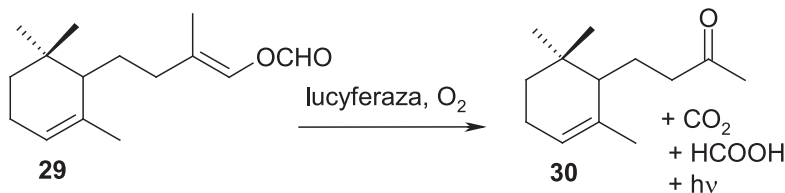
Dwa związki będące pochodnymi β -jononu tanjolid A (**27**) i tanjolid B (**28**) wyizolowano z organizmów mięczaków morskich *Sclerodoris tanya*, występujących w strefie przybrzeżnej południowej Kalifornii. Obecność tych związków wykryto głównie w płaszczu grzbietowym mięczaków. Wiadomo, że gdy mięczak zostanie w jakikolwiek sposób zaatakowany natychmiast wydziela śluz w okolicy miejsca ataku, broniąc się przed napastnikiem. Śluz ten zawiera w sobie skoncentrowany tanjolid B (**28**). W związku z tym przeprowadzono badania na dwóch gatunkach ryb drapieżnych *Gibbonsia elegans* i *Paraclinus integrippinis*, żywiących się mięczakami, występującymi w tym samym rejonie co *Sclerodoris tanya*. Okazało się, że obydwa tanjolidy (**27**) i (**28**) charakteryzuje ichtiotoksyczność względem tych dwóch gatunków ryb, już w ilości 1 mg. Ponieważ zawartość związku (**28**) w organizmach mięczaków *S. tanya* sięga około 3 mg, oznacza to, że ochronę przed rybami drapieżnymi można uzyskać bez używania środków chemicznych, wykorzystując do tego celu mięczaki. Przeprowadzone badania sugerują, że za aktywność tych związków odpowiada głównie łańcuch boczny, zaś fragment terpenowy odpowiada za jej transport. Jednocześnie związki te nie mają wpływu na inne ryby, żyjące w tych samych wodach [19] (Rys. 7).



Rysunek 7. Pochodne β -jononu wyizolowane z mięczaków morskich *Sclerodoris tanya*
 Figure 7. β -Ionone derivatives isolated from sea mollusc *Sclerodoris tanya*

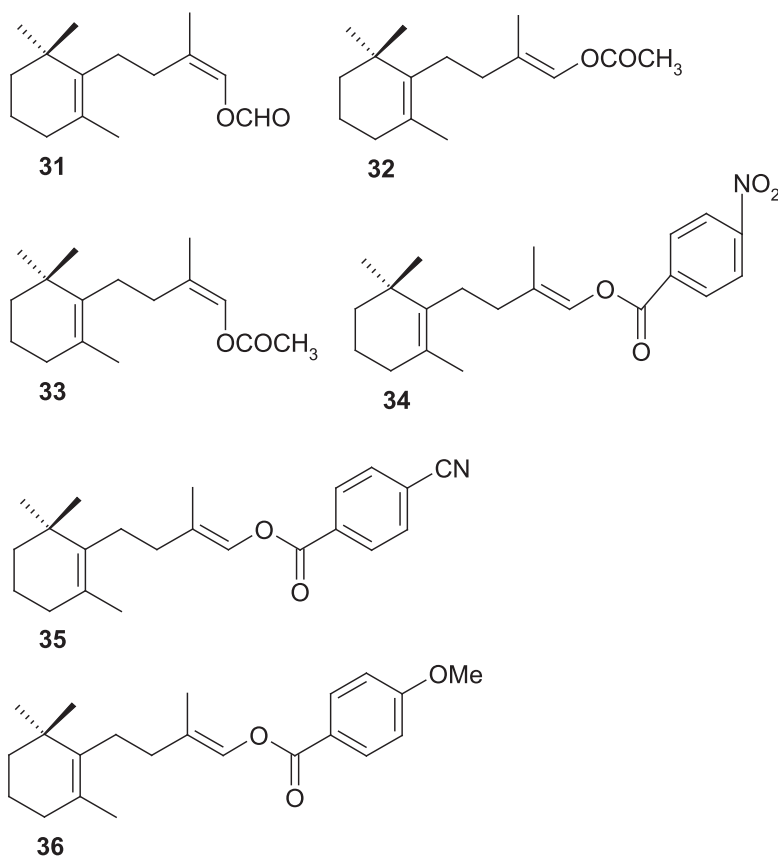
1.3. BIOLUMINESCENCJA

Bardzo interesujące wykorzystanie pochodnych β -jononu zaobserwowano w przypadku ślimaka (*Latia neritoides*), występującego w czystych strumieniach Wyspy Północnej Nowej Zelandii. Ślimak ten jest jedynym przedstawicielem zwierząt żyjących w słodkich wodach wykorzystujących bioluminescencję. Za luminescencję odpowiada związek lucyferyna *Latii* (**29**), który w wyniku utlenienia ulega przekształceniu do ketonu (**30**) (Rys. 8).



Rysunek 8. Reakcja bioluminescencji wykorzystywana przez ślimaka *Latia neritoides*
 Figure 8. The bioluminescence reaction used by the worm *Latia neritoides*

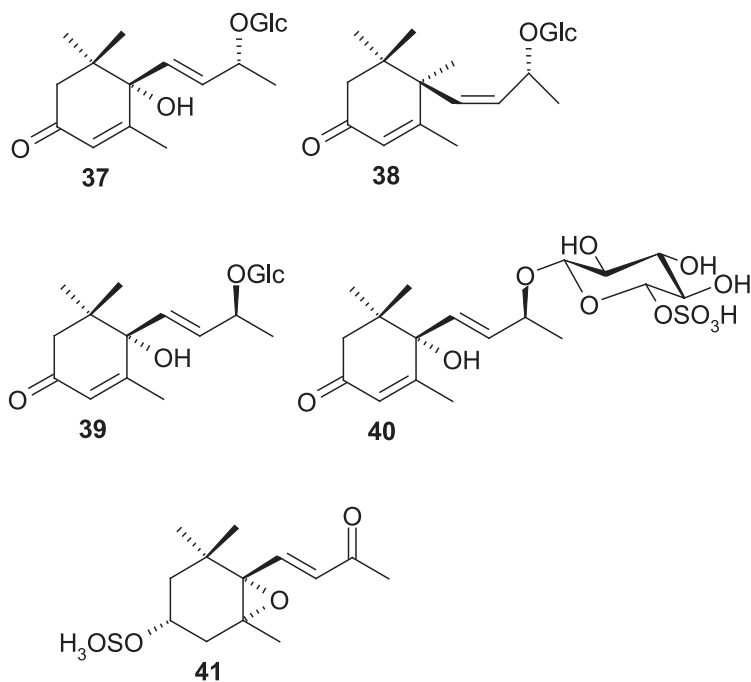
W celu sprawdzenia mechanizmu reakcji zsyntezowano zarówno lucyferynę *Latii* jak i szereg jej analogów strukturalnych. W warunkach laboratoryjnych przetestowano luminescencję związku wyjściowego, określając jej poziom jako 100%. Z otrzymanych analogów zdolność do luminescencji wykazywały jedynie związki (**31**) (60%) (**32**) (44%) oraz (**33**) (66%). Stwierdzono, że za efekt luminescencyjny odpowiada enol tworzący się podczas reakcji utlenienia, jakkolwiek ważna jest również obecność podstawionego pierścienia cykloheksenowego [20]. Podczas dalszych badań otrzymano kolejne pochodne lucyferyny, z których trzy najlepsze charakteryzowały się dużo niższym poziomem bioluminescencji niż lucyferyna: (**34**) (4,2%), (**35**) (3,2%) oraz (**36**) (2,9%) [21] (Rys. 9).



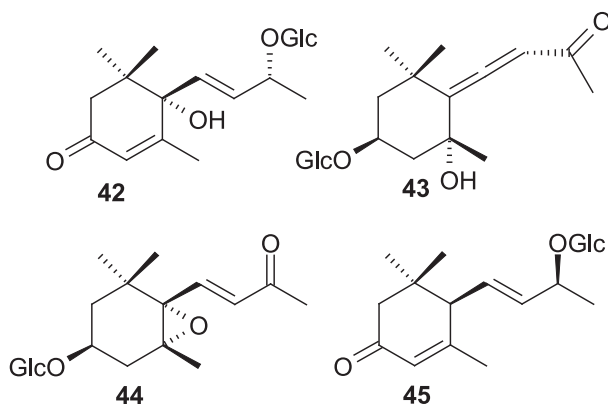
Rysunek 9. Lucyferyna występująca w *Latia neritoides* i jej analogi strukturalne
 Figure 9. Luciferin present in *Latia neritoides* and its structural analogues

2. GLIKOZYDOWE I SULFONOWE POCHODNE JONONÓW

Pochodne jononów zawierające w swojej strukturze reszty cukrowe lub sulfonowe w większości izolowane z roślin znanych z właściwości leczniczych i wykorzystywanych w związku z tym w miejscowej medycynie ludowej. Rozeozyd (37) wyizolowano z korzeni smotrawy okazałej (*Telekia speciosa*) należącej do rodziny astrowatych [22]. Glikozyd ten odkryto również w nadziemnych częściach rosnącej w Egipcie rośliny *Cleome brachycarpa* [23]. Znalaziono go również w korze korzeni azjatyckiej rośliny *Ulmus davidiana* var. *japonica* wraz z jego izomerem *cis* (38) [24]. Analog związku (37) korchojonozyd C (39) oraz jego sulfonową pochodną (40) znaleziono w nadziemnych częściach mlecza (*Sonchus erzinicanicus*) [25]. Inną sulfonową pochodną β -jononu (41) wyizolowano z mangrowca (*Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. F.), występującego na zachodnich wybrzeżach Afryki [26] (Rys. 10).

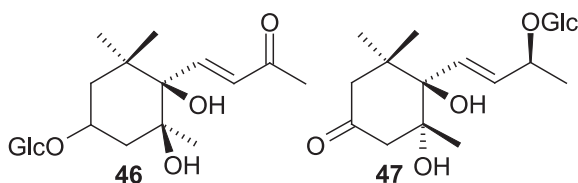
Rysunek 10. Glikozydowe i sulfonowe pochodne α - i β -jononuFigure 10. Glycoside and sulfonide derivatives of α - and β -ionone

Kilka innych pochodnych glikozydowych jononów wyizolowano z nadziemnych części *Salsola komarovii*. Były to: wspomniany wcześniej związek (37), β -D-glukopiranozyd blumenylu A (42), stafylionozyd D (43), ikaryzyd B2 (44), β -D-glukopiranozyd 3-oxo- α -ionolu (45). Związek (37) wywołuje zwiększenie wydzielania czynnika wzrostu nerwów (NGF). NGF jest neuropeptydem wykorzystywanym przez organizm przede wszystkim do regulacji wzrostu, proliferacji i przeżycia neuronów. Czynnikiem ten ma również wpływ na przetrwanie komórek beta trzustki oraz regulację układu odpornościowego. Związek (37) może więc znaleźć potencjalne zastosowanie jako środek neuroochronny w regulacji chorób neurodegeneracyjnych [27] (Rys. 11).



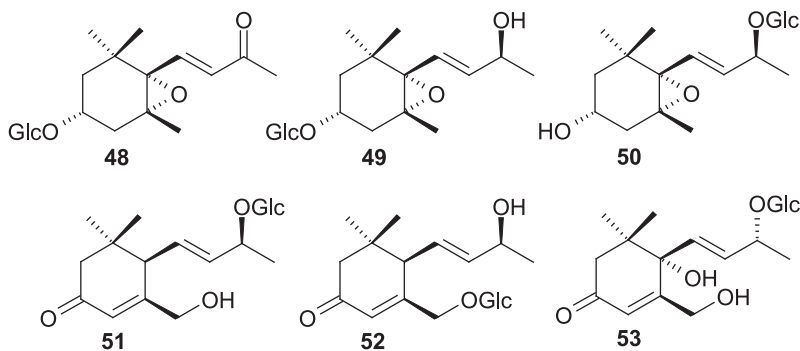
Rysunek 11. Glikozydowe pochodne α - i β -jononu wyizolowane z *Salsola komarovii*
 Figure 11. Glycoside derivatives of α - and β -ionone isolated from *Salsola komarovii*

Kolejne glikozydy pizumionozyd (46) i jinksiankaozyd B (47) wyizolowane zostały z *Chloranthus japonicus* Sieb., rośliny z rodziny zieleńcowych, używanej w Chinach w tradycyjnej medycynie ludowej [28] (Rys. 12).



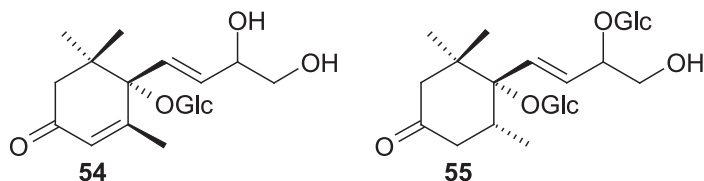
Rysunek 12. Glikozydowe pochodne β -jononu wyizolowane z *Chloranthus japonicus* Sieb.
 Figure 12. Glycoside derivatives of β -ionone isolated from *Chloranthus japonicus* Sieb.

W alkoholowym ekstrakcie z liści drzewa *Euodia meliaeifolia* (Hance) Benth. rosnącego na Okinawie znaleziono euodionozyd A (48), euodionozyd B (49), euodionozyd C (50), euodionozyd F (51), euodionozyd G (52), spinozyd A (53) [29] (Rys. 13).



Rysunek 13. Glikozydowe pochodne α - i β -jononu wyizolowane z *Euodia meliaeifolia*
 Figure 13. Glycoside derivatives of α - and β -ionone isolated from *Euodia meliaeifolia*

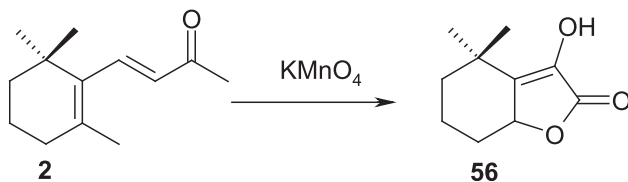
Z łądyg cissusa *Cissus quadrangularis* L. – rośliny powszechnie stosowanej w medycynie ludowej Indii w leczeniu osteoporozy, wyizolowano dwa kolejne glikozydy: 6,9,10-trihydroksy-4,7-megastigmadien-3-on (**54**) oraz 6,9,10-trihydroksy-7-megastigman-3-on (**55**) [30, 31] (Rys. 14).



Rysunek 14. Glikozydowe pochodne α - i β -jononu wyizolowane z *Cissus quadrangularis*
Figure 14. Glycoside derivatives of α - and β -ionone isolated from *Cissus quadrangularis*

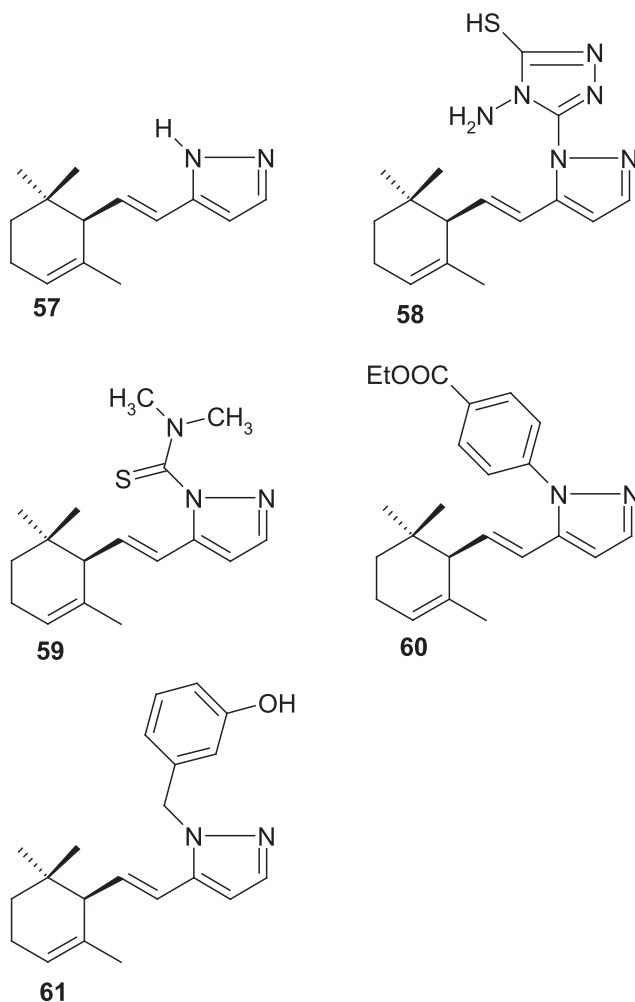
3. SYNTETYCZNE POCHODNE JONONÓW

Ze względu na interesujące właściwości pochodnych jononów od dawna poszukuje się innych analogów strukturalnych tych związków, ale nie posiadających swych odpowiedników w naturze. W tym celu stosuje się metody syntezy chemicznej bądź też mniej szkodliwe dla środowiska metody biotechnologiczne. Metody te pozwalają na otrzymywanie związków, których przyroda jeszcze nie zdążyła wymyślić. Bardzo interesującym przykładem jest otrzymywanie hydroksyjonolaktonu (**56**) w wyniku utleniania β -jononu przy użyciu KMnO_4 , przy czym wydajność tej reakcji wynosi 10% [32] (Rys. 15).



Rysunek 15. Otrzymywanie hydroksyjonolaktonu z β -jononu
Figure 15. Preparation of hydroxyionolactone from β -ionone

Związki izolowane z surowców naturalnych są zazwyczaj czystymi enancjomerami. Z tego powodu badacze poszukują metod pozwalających na otrzymywanie na drodze chemicznej związków charakteryzujących się wysoką czystością optyczną. W tym miejscu należy wspomnieć o metodzie zaprezentowanej przez Kikuchi i wsp. dotyczącej otrzymywania czystych enancjomerycznie pochodnych jononów. W wyniku 12 etapowej syntezy z wydajnością 8,5% otrzymano (+)-3-hydroksy-4,7-megastigmadien-9-on (**6**), (+)-9-hydroksy-4,7-megastigmadien-9-on (**7**) oraz (+)-3,9-dihydroksy-4,7-megastigmadien (**8**) [33].

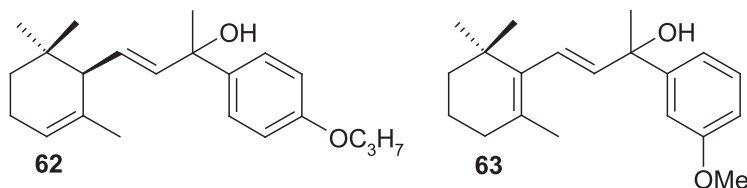


Rysunek 16. Otrzymywanie aminowych pochodnych α -jononu
Figure 16. Preparation of amine derivatives from α -ionone

Prężny rynek farmaceutyczny wymusza tworzenie coraz to nowych leków, nie tylko tych pochodzenia naturalnego. Również wśród tej grupy związków możemy znaleźć syntetyczne pochodne jononów o właściwościach przeciwzapalnych. Otrzymano je α -jononu, który poddano reakcji Vilsmeiera uzyskując produkt pośredni, a następnie reakcji cyklizacji z użyciem różnych pochodnych aminowych co pozwoliło na otrzymanie m.in. związków (57) (z wydajnością 89%) i (58) (z wydajnością 65%). Związki te wykazały się dużą aktywnością przeciwzapalną, co oznacza, że mogą one znaleźć zastosowanie jako leki prototypowe w łuszczycy i innych dermatozach neutrofilowych [34]. Ten sam produkt pośredni został wykorzystany jako substrat do syntezy kolejnych pochodnych α -jononu (59), (60), (61)

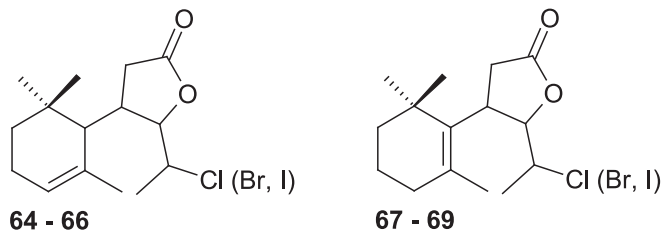
wykazujących zdolność do hamowania wzrostu komórek linii ludzkiej białaczki promielocytowej HL-60 oraz indukowania ich apoptozy. Związki te otrzymano z wydajnością odpowiednio 55%, 92% i 87% [35]. Pochodne (**59**)–(**61**) przetestowane zostały również pod kątem aktywności antyproliferacyjnej wobec linii komórkowych gruczolakoraka jajnika A2780, raka płuc A549 oraz białaczki mysiej P388. Niestety związki te okazały się być mało aktywne wobec testowanych linii komórkowych [36] (Rys. 16).

Z kolei otrzymane w wyniku reakcji α - i β -jononu z odpowiednimi związkami Grignarda pochodne (**62**) i (**63**) mogą znaleźć zastosowanie jako środki neuroprotektyjne w niedokrwieniu mózgu. Wydajności tych reakcji wynoszą odpowiednio 85% i 87% [37]. (Rys. 17).



Rysunek 17. Otrzymywanie aromatycznych pochodnych α - i β -jononu
Figure 17. Preparation of aromatic derivatives from α - and β -ionone

Jonony znalazły również zastosowanie jako substraty do syntezy chlorowcolaktonów. W wyniku kilkuetapowej reakcji z α - oraz β -jononu otrzymano odpowiednie chloro- (**64**) i (**67**) z wydajnością 14%, bromo- (**65**) i (**68**) z wydajnością 15% oraz jodolaktony (**65**) i (**69**) z wydajnością 11%. Związki te przetestowano pod kątem ich aktywności antybakteryjnej i antygrzybiczej. Laktony otrzymane z α -jononu wykazywały się aktywnością względem szczepów bakterii: *Micrococcus flavus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*. Z kolei pochodne otrzymane z β -jononu hamowały wzrost szczepów bakterii *Bacillus subtilis* – związek (**67**) oraz grzybów *Aspergillus niger* – związek (**68**) [38, 39] (Rys. 18).

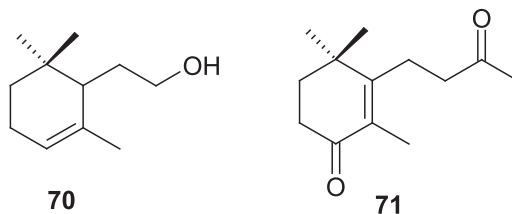


Rysunek 18. Otrzymywanie chlorowcolaktonów z α - i β -jononu
Figure 18. Preparation of halolactones from α - and β -ionone

4. WYKORZYSTANIE BIOTRANSFORMACJI DO OTRZYMYWANIA POCHODNYCH JONONÓW

Różne pochodne α - i β -jononu można również otrzymać podczas biotransformacji prowadzonych przy użyciu zarówno szczepów drożdży, grzybów strzępkowych, jak i całych organizmów żywych.

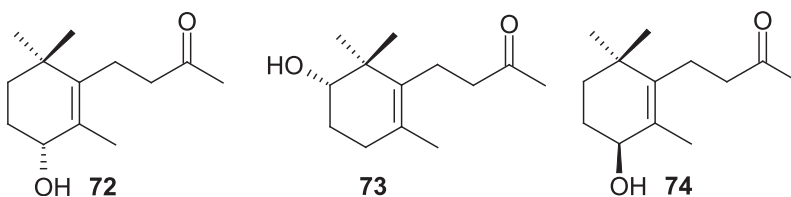
W wyniku zastosowania do transformacji α - i β -jononu szczepu drożdży *Trichosporum cutaneum* CCT 1903 otrzymano odpowiednio α -homo-cyklogeraniol (**70**) oraz 4-oxo-7,8-dihydro- β -jonon (**71**), obydwa z wydajnością 5% [40] (Rys. 19).



Rysunek 19. Związki otrzymywane w wyniku biotransformacji α - i β -jononu szczepem drożdży *Trichosporum cutaneum*

Figure 19. The compounds obtained during biotransformation of α - and β -ionone by yeast *Trichosporum cutaneum* strain

Wykorzystanie szczepu *Aspergillus niger* JTS 191 do biotransformacji β -jononu pozwoliło na otrzymanie szeregu pochodnych, wśród których głównymi produktami były (*R*)-4-hydrokso- β -jonon (**72**) oraz (*S*)-2-hydrokso- β -jonon (**73**) z wydajnościami odpowiednio 24% i 18% [41]. Związek (**72**) otrzymano również wykorzystując szczep *Escherichia coli* zawierający zmutowaną monooksygenazę zależną od cytochromu P450_{BM-3} [42]. Enancjomer związku (**72**) czyli (*S*)-4-hydrokso- β -jonon (**74**) z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 89% otrzymano z w wyniku poddania mieszaniny racemicznej obu alkoholi transestryfikacji katalizowanej przez lipazę PPL, pochodzącej z trzustki świni [43] (Rys. 20).

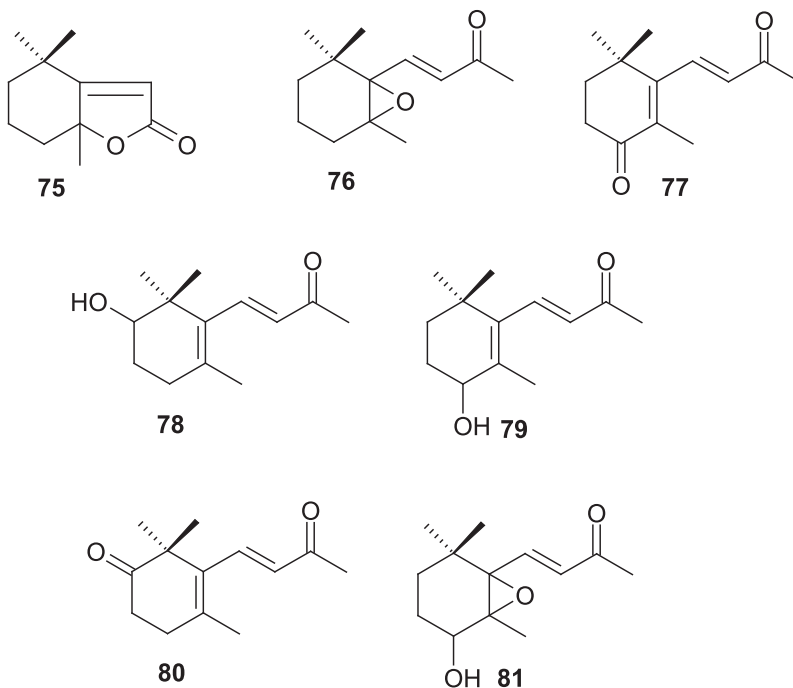


Rysunek 20. Otrzymywanie hydroksylowych pochodnych β -jononu

Figure 20. Preparation of hydroxy derivatives from β -ionone

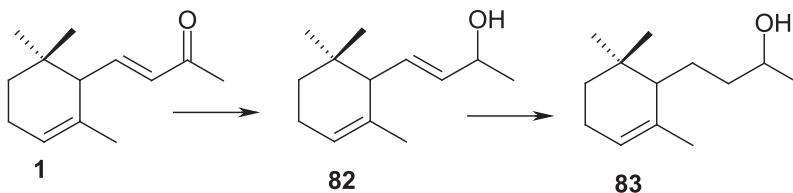
Z kolei dzięki wykorzystaniu szczepu *Aspergillus niger* IFO 8541 immobilizowanego w alginianie i zastosowaniu dwufazowego układu rozpuszczalników otrzymano kilka różnych pochodnych, w tym: dihydroaktinidiolid (**75**), 5,6-epoxy-

β -ionone (**76**), 4-okso- β -jonon (**77**), 2-hydrokso- β -jonon (**78**), 4-hydrokso- β -jonon (**79**), 2-okso- β -jonon (**80**), 4-hydrokso-5,6-epoksy- β -jonon (**81**) [44] (Rys. 21).



Rysunek 21. Zastosowanie szczepu *Aspergillus niger* do otrzymywania pochodnych β -jononu
Figure 21. The use of *Aspergillus niger* strain to obtain derivatives of β -ionone

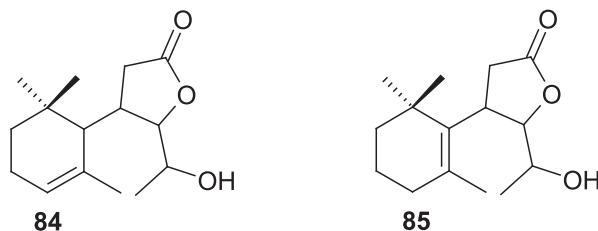
Z kolei zastosowanie jako bioreagenta szczepu *Glomerella cingulata* do transformacji α -jononu pozwoliło na otrzymanie w pierwszym etapie α -jonolu (**82**) (63%), a w kolejnym dihydro- α -jonolu (**83**) (26%) [45] (Rys. 22).



Rysunek 22. Związki otrzymane w wyniku biotransformacji α -jononu szczepem *Glomerella cingulata*
Figure 22. The compounds obtained during biotransformation of α -ionone by *Glomerella cingulata* strain

Wspomniane wcześniej chlorowcolaktyny (**64**)–(**69**) otrzymane z α - i β -jononu zostały wykorzystane jako substraty do biotransformacji przy użyciu kilku szczepów grzybów strzępkowych, głównie z rodzaju *Fusarium*. W ich wyniku otrzymano odpowiednie hydroksylaktyny (**84**) i (**85**). Najlepszym biokatalizatorem okazał się szczep *F. culmorum*, który pozwolił na otrzymanie hydroksylaktynu (**84**) z wydaj-

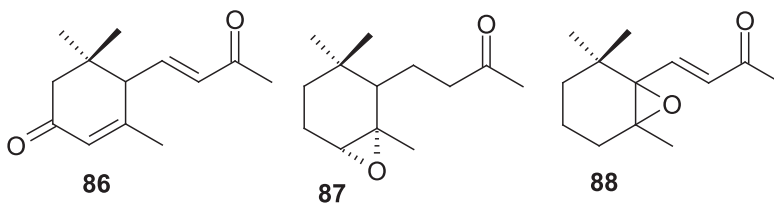
nością 24% i z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 62% oraz hydroksylaktonu (**85**) z wydajnością 38% i z nadmiarem enancjomerycznym wynoszącym 30% [38, 39] (Rys. 23).



Rysunek 23. Związki otrzymane w wyniku biotransformacji α - i β -jononu grzybami strzępkowymi z rodzaju *Fusarium*

Figure 23. The compounds obtained by biotransformation of α - and β -ionone by filamentous fungi *Fusarium*

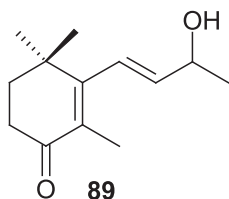
Do biotransformacji jononów wykorzystano również kulturę kalusa pozyskanego z liści *Caragana chamlagu*. W przypadku α -jononu otrzymano mieszaninę racemiczną 3-oksyo- α -jononu (**86**) z wydajnością 50%, 3 α -hydroxy- α -jonon (**6**) (16%) oraz 4,5-epoxy- α -jonon (**87**) (20%). W wyniku dodania do kultury kalusa 1-aminobenzotriazolu, będącego inhibitorem cytochromu P-450 α -jonon był transformowany do tych samych trzech produktów z wydajnością odpowiednio 33%, 25% oraz 15%. Z kolei β -jonon był przekształcaný przez kulturę kalusa do 5,6-epoxy- β -jononu (**88**) z wydajnością 87% [46] (Rys. 24).



Rysunek 24. Związki otrzymane w wyniku biotransformacji α - i β -jononu tkanką kalusa z liści *Caragana chamlagu*

Figure 24. The compounds obtained by biotransformation of α - and β -ionone by callus tissue from the leaves of *Caragana chamlagu*

Interesującym przykładem jest zastosowanie larw chrząszczy *Allomyrina dichotoma* do biotransformacji β -jononu. Podczas transformacji zaobserwowano, że zarówno grupa karbonylowa jak i wiązanie podwójne w łańcuchu bocznym uległo redukcji, zaś węgiel znajdujący się w pozycji allilowej uległ utlenieniu dając jako produkt mieszaninę racemiczną 4-oxo-7,8-dihydro- β -jonolu z wydajnością 20% (**89**) [47] (Rys. 25).



Rysunek 25. Związek otrzymany w wyniku zastosowania do biotransformacji β -jononu larw chrząszczy *Allomyrina dichotoma*

Figure 25. The compounds obtained by biotransformation of β -ionone by using beetle larvae *Allomyrina dichotoma*

UWAGI KOŃCOWE

Pochodne jononów izolowane z roślin lub zwierząt charakteryzują się zazwyczaj interesującymi właściwościami biologicznymi. Ze względu na możliwość ich zastosowania w różnorodnych dziedzinach przemysłu niezwykle istotny staje się fakt ich opłacalnego otrzymywania. Metody pozyskiwania ze źródeł naturalnych mają jedną zasadniczą wadę – zazwyczaj są bardzo pracochłonne i kosztowne. Należy również pamiętać, że każdego roku wymiera coraz więcej gatunków roślin i zwierząt, co tym samym ogranicza nam możliwość pozyskiwania na szeroką skalę interesujących nas cząsteczek. Dlatego do otrzymywania większych ilości związków wykorzystuje się mało ekologiczną metodę syntezy chemicznej. W trosce o naturalne środowisko coraz częściej wybiera się metody biotechnologiczne, które stają się lepszą alternatywą. W przypadku jononów najczęściej łączone są metody syntezy chemicznej z biotransformacjami. W ten sposób dzięki wykorzystaniu mikroorganizmów otrzymujemy szereg pochodnych hydroksylowych, których synteza byłaby albo niemożliwa, albo bardzo kosztowna. Tak otrzymane hydroksypochodne są zazwyczaj bardziej aktywne biologiczne niż ich prekursorzy.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] B. D'Abrosca, M. DellaGreca, A. Fiorentino, P. Monaco, P. Oriano, F. Temussi, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 497.
- [2] A.J. Aasen, B. Kimland, C.R. Enzell, *Acta Chem. Scand.*, 1971, **25**, 1481.
- [3] D. Behr, I. Wahlberg, T. Nishida, C.R. Enzell, *Acta Chem. Scand. B*, 1978, **32**, 391.
- [4] K. Machida, M. Kikuchi, *Phytochemistry*, 1996, **41**, 1333.
- [5] T. Fujimori, R. Kasuga, H. Kaneko, M. Noguchi, *Agr. Biol. Chem.*, 1975, **39**, 913.
- [6] M. Kurokawa, T. Hirose, Y. Sugata, M. Tokumasu, Y. Hiraga, T. Suga, *Nat. Prod. Lett.*, 1998, **12**, 35.
- [7] H. Dietz, P. Winterhalte, *Phytochemistry*, 1996, **42**, 1005.
- [8] H. Kato-Noguchi, M. Yamamoto, K. Tamura, T. Teruya, K. Suenaga, Y. Fujii, *Plant Growth Regul.*, 2010, **60**, 127.
- [9] S. Shibata, A. Katsuyama, M. Noguchi, *Agric. Biol. Chem.*, 1978, **42**, 195.
- [10] T.C. Lin, J.M. Fang, Y.S. Cheng, *Phytochemistry*, 1999, **51**, 793.

- [11] F.A. Macias, R.M. Oliva, R.M. Varela, A. Torres, J.M.G. Molinillo, *Phytochemistry*, 1999, **52**, 613.
- [12] W. Bu, Y.N. Shi, Y.M. Yan, Q. Lu, G.M. Liu, Y. Li, Y.X. Cheng, *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2011, **1**, 134.
- [13] F.A. Macias, R. Lacret, R.M. Varela, C. Nogureiras, J.M.G. Molinillo, *Phytochemistry*, 2008, **69**, 2708.
- [14] F.A. Macias, R.M. Varela, A. Torres, R.M. Oliva, J.M.G. Molinillo, *Phytochemistry*, 1998, **48**, 631.
- [15] H. Kato-Noguchi, H.L. Thi, T. Teruya, K. Suenaga, *Sci. Hort.*, 2011, **129**, 894.
- [16] F. Cutillo, M. Dellagrecia, L. Previtiera, A. Zarrelli, *Nat. Prod. Res.*, 2005, **19**, 99.
- [17] G. Erosa-Rejón, L.M. Peña-Rodríguez, O. Sterner, *J. Mex. Chem. Soc.*, 2009, **53**, 44.
- [18] A.J. Aasen, B. Kimland, C.R. Enzell, *Acta Chem. Scand.*, 1973, **27**, 2107.
- [19] P.J. Krug, K.G. Boyd, D.J. Faulkner, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 11063.
- [20] S. Kojima, S. Maki, T. Hirano, Y. Ohmiya, H. Niwa, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 4409.
- [21] M. Nakamura, M. Masaki, S. Maki, R. Matsui, M. Hieda, M. Mamino, T. Hirano, Y. Ohmiya, H. Niwa, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 2203.
- [22] A. Stojakowska, J. Malarz, W. Kisiel, *Acta Soc. Bot. Pol.*, 2011, **80**, 253.
- [23] M.S. Afifi, *IJPSR*, 2014, **5**, 4008.
- [24] M.S. Zheng, J.H. Yang, Y. Li, X. Li, H.W. Chang, J.K. Son, *Biomol. Ther.*, 2010, **18**, 321.
- [25] U. Ozgen, H. Sevindik, C. Kazaz, D. Yigit, A. Kandemir, H. Secen, I. Calis, *Molecules*, 2010, **15**, 2593.
- [26] D.Q. Xue, J.D. Wang, Y.W. Guo, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2008, **10**, 319.
- [27] H.K. Cho, W.S. Suh, K.H. Kim, S.Y. Kim, K.R. Lee, *Nat. Prod. Sci.*, 2014, **20**, 95.
- [28] H. Kuang, Y. Xia, B. Yang, Q. Wang, S. Lu, *Chem. Biodivers.*, 2008, **5**, 1736.
- [29] M. Yamamoto, T. Akita, Y. Koyama, E. Sueyoshi, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, A. Takashima, M. Aramoto, Y. Takeda, *Phytochemistry*, 2008, **69**, 1586.
- [30] A.S. Rao, A. Satyanarayana, D.R. Reddy, I.A. Khan, *IJPBR*, 2013, **4**, 52.
- [31] B.K. Potu, M.S. Rao, G.K. Nampurath, M.R. Chamallamudi, K. Prasad, S.R. Nayak, P.K. Dharmavarapu, V. Kedage, K.M.R. Bhat, *Upsala J. Med. Sci.*, 2009, **114**, 140.
- [32] S.P. Kamat, A.M.D. Souza, S.K. Pahnkar, M.B. Bhadbhade, R.G. Gonnade, *Indian J. Chem.*, 2007, **46B**, 1038.
- [33] D. Kikuchi, M. Yoshida, K. Shishido, *Tetrahedron Lett.*, 2012, **53**, 145.
- [34] A. Balbi, M. Anzaldi, M. Mazzei, M. Miele, M. Bertolotto, L. Ottonello, F. Dallegri, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 5152.
- [35] M. Anzaldi, C. Macciò, M. Mazzei, M. Bertolotto, L. Ottonello, F. Dallegri, A. Balbi, *Chem. Biodivers.*, 2009, **6**, 1674.
- [36] A. Balbi, M. Anzaldi, C. Macciò, C. Aiello, M. Mazzei, R. Gangemi, P. Castagnola, M. Miele, C. Rosano, M. Viale, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 5293.
- [37] A.K. Srivastava, P. Dohare, M. Ray, G. Panda, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 1964.
- [38] M. Grabarczyk, W. Mączka, K. Wińska, B. Żarowska, M. Anioł, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2014, **102**, 195.
- [39] M. Grabarczyk, B. Żarowska, G. Maciejewska, K. Dancewicz, B. Gabryś, K. Wińska, W. Mączka, M. Anioł (*Tetrahedron*, doi: 10.1016/j.tet.2015.12.005).
- [40] L. Pinheiro, A.J. Marsaioli, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2007, **44**, 78.
- [41] Y. Mikami, Y. Fukunaga, M. Arita, T. Kisaki, *Appl. Environ. Microb.*, 1981, **41**, 610.
- [42] D. Zehentgruber, V. B. Urlacher, S. Lütz, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2012, **84**, 62.
- [43] G.P. More, S.V. Bhat, *Tetrahedron Lett.*, 2013, **54**, 4148.
- [44] F. Grivel, C. Larroche, *Biochem. Eng. J.*, 2001, **7**, 27.
- [45] M. Miyazawa, K. Shimizu, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2012, **74**, 6.
- [46] H. Sakamaki, K.I. Itoh, W. Chai, Y. Hayashida, S. Kitanaka, C.A. Horiuchi, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2004, **27**, 177.

- [47] K. Uwai, Y. Okuyama, H. Nakano, K. Furukawa, E. Hiroshima, H. Azuma, M. Watanabe, T. Matsumoto, M. Tokiwa, M. Takeshita, *Biocatal. and Agric. Biotechnol.*, 2014, **3**, 129.

Praca wpłynęła do Redakcji 20 października 2015

OSTATNIE POSTĘPY W SYNTEZIE ALKALOIDÓW TROPANOWYCH I POCHODNYCH TROPANU

RECENT ADVANCES IN THE SYNTHESIS OF TROPANE ALKALOIDS AND OTHER TROPANE DERIVATIVES

Katarzyna Sidorowicz*, **Krzysztof Kropiwnicki**,
Ryszard Łażny

*Institut Chemii, Uniwersytet w Białymstoku,
ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok
e-mail: k-sidorowicz@wp.pl

Abstract

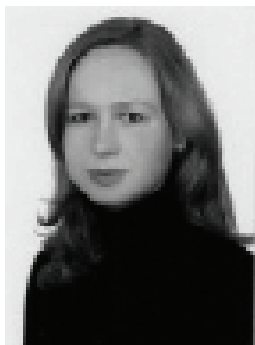
Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Pierwsze historyczne syntezy układu tropanu
2. Syntezy alkaloidów tropanowych i ich pochodnych opublikowane w latach 2000–2015
 - 2.1. Syntezy kokainy
 - 2.2. Metody otrzymywania ferruginy i ferrugininy
 - 2.3. Synteza alkaloidu (–)-Bao Gong Teng A
 - 2.4. Synteza alkaloidu (+)-fisoperuwiny [*physoperuvine*]
 - 2.5. Synteza alkaloidów: (+)-perwilleiny [*pervilleine*] B, (+)-parwilleiny [*parvilleine*] C, (+)-merredisyne [*merredisine*] oraz (+)-waleroidyny [*valeroidine*]
 - 2.6. Synteza alkaloidu parwineostemoniny [*parvineostemonine*]
 - 2.7. Synteza substancji aktywnej leku na chorobę układu oddechowego
 - 2.8. Synteza hederaciny [*hederacine*] A i hederaciny [*hederacine*] B
 - 2.9. Synteza innych pochodnych alkaloidów tropanowych

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Mgr Katarzyna Sidorowicz jest absolwentką Uniwersytetu w Białymstoku. Jej praca dyplomowa dotyczyła syntezy i zastosowania chiralnych pochodnych piperazy i piroolidyny. Obecnie pracuje na stanowisku asystenta w Instytucie Chemii Uniwersytetu w Białymstoku i prowadzi badania strukturalne pochodnych i analogów tropanu.



Mgr Krzysztof Kropiwnicki jest absolwentem Uniwersytetu w Białymstoku. W 2010 roku rozpoczął studia na kierunku Chemia na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku. Tytuł magistra uzyskał w 2015 rok. Praca magisterska dotyczyła metod syntezy alkaloidów i analogów tropanowych.



Prof. dr hab. Ryszard Łażny jest absolwentem Filii Uniwersytetu Warszawskiego w Białymstoku. Ukończył studia doktoranckie i uzyskał stopień doktora w University of Saskatchewan w Kanadzie. Odbił staże naukowe w Kanadzie i w Niemczech w Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule, RWTH-Aachen. Stopień doktora habilitowanego uzyskał w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie. W roku 2014 odebrał tytuł profesora nauk chemicznych. Obecnie pracuje w Instytucie Chemii Uniwersytetu w Białymstoku. Jego główne zainteresowania naukowe to: synteza i zastosowania

w syntezie organicznej związków azotu (pochodnych tropanu i granatanu, chiralnych amin, hydrazonów, triazenów), związków enancjomerycznie czystych, stereochemia oraz metodologia syntezy organicznej na fazie stałej.

ABSTRACT

Tropane alkaloids are a long-known class of compounds possessing an 8-azabicyclo[3.2.1]octane skeleton. Many tropane alkaloids possess biological activity (anticholinergic, anti-Parkinsonian, hypotensive), and as such had a significant influence on medicine and played a notable role in the development of organic chemistry [1]. The most known representatives of biologically active tropane alkaloids are: cocaine, atropine, scopolamine, ecgonine, and Bao Gong Teng A. A number of natural tropane alkaloids are chiral compounds, whose preparation in optically active forms is still a big challenge [2]. The biological activity of enantiomers often differs depending on their configurations.

Alkaloids are a subject of an intensive research: scopus database contains nearly 200 thousand publications with the word „alkaloid”, and almost 4,500 publications with the phrase „tropane alkaloids” (about half of them have appeared in the last ten years). About 55 papers are devoted to stereoselective synthesis of tropane derivatives in 2000-2015. About half of this concerns stereoselective methods.

The organic synthesis of alkaloids has a long history and numerous synthetic approaches to the tropane skeleton have been developed, from the classical synthesis of tropinone by Willstätter at the beginning of the XX century, to more recent developments dealing with asymmetric deprotonation of tropinone with chiral lithium amide bases for the enantioselective synthesis of a range of tropanes [3, 4]. Owing to extensiveness of the field, the current review presents the most interesting, from a synthetic point of view, approaches to tropane derivatives and tropane analogues.

Most of the methods of synthesis are long (often several steps), time- and resource-intensive, and often required elaborate and hardly available starting materials. But there are also notable exceptions, based on the asymmetric deprotonation approach; e.g., from the syntheses of cocaine described in this article, the most efficient one was reported by Lee in 2000 [5]. The concise synthesis (6 steps) gave the unnatural enantiomer of cocaine starting from commercially available tropinone in 78% overall yield. This approach allows to obtain both enantiomers and racemate, by changing type of one reactant only. However, most strategies provide only one enantiomer or racemic mixture of an alkaloid. As can be seen, despite of advances in chemical science, there is no general way to synthesize majority of the representatives of this group of structurally related compounds.

Keywords: synthesis, tropane alkaloids, tropane derivatives, stereoselective synthesis
Słowa kluczowe: synteza, alkaloidy tropanowe, pochodne tropanów, synteza stereoselektywna

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACE-Cl	- chloromrówczan α -chloroetylu
AIBN	- azobis(izobutyronitryl)
CAN	- azotan(V) cerowo(IV)-amonowy
DBU	- 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DEAD	- azodikarboksylan dietylowy
DIBAL	- wodorek diizobutyloglinowy
DMAP	- 4-(dimetyloamino)pirydyna
DMDO	- dimetylodioksiran
DME	- 1,2-dimetoksyetan
DMP	- utleniacz Dessa-Martina
DMS	- siarczek dimetylu
DPPA	- azydek difenylofosforylowy
DTBMP	- 2,6-di- <i>tert</i> -butylo-4-metylopirydyna
HMDS	- heksametylodisilazan Li- litu, Na- sodu, K- potasu
IBX	- kwas 2-jodoksybenzoesowy
MIBK	- keton metylo-izobutylowy
Ms	- grupa mesylova, grupa metanosulfonowa
NMO	- <i>N</i> -tlenek- <i>N</i> -metylomorfoliny
phth	- grupa ftalowa
PPTS	- <i>p</i> -toluenosulfonian pirydyniowy
RCM	- metateza zamknięcia pierścienia (ang. <i>Ring Closing Metathesis</i>)
TBAF	- fluorek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TBDMS	- grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa (TBS)
Tf	- grupa triflatowa, grupa trifluorometanosulfonowa
ThxBH ₂	- 1,1,2-trimetylopropyloboran
TIPS	- grupa triizopropylosililowa
TMS	- grupa trimetylosililowa
<i>p</i> -tolyl	- grupa 4-metylofenylowa
TPAP	- rutenian(VII) tetrapropyloamoniowy
Troc	- grupa 2,2,2-trichloroetoksykarbonylowa
Ts	- grupa tosylowa, grupa toluenosulfonowa

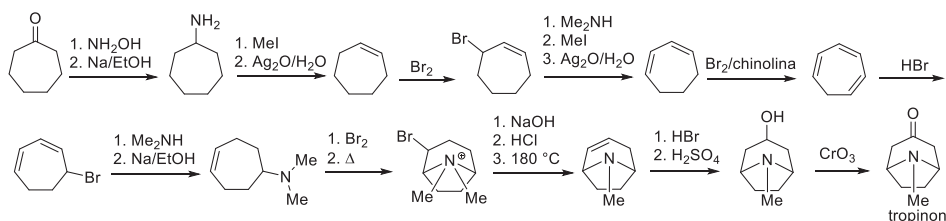
WSTĘP

Jedną z ważniejszych grup związków naturalnych o uznanej aktywności biologicznej stanowią pochodne tropanu, w tym naturalne alkaloidy tropanu [1, 6], których znanymi przedstawicielami, wykazującymi aktywność biologiczną są, m.in. kokaina, atropina, skopolamina, ekgonina i Bao Gong Teng A. Znaczna część znanych alkaloidów tropanowych to związki chiralne, których otrzymywanie w formie optycznie czynnej było i jest aktualnym wyzwaniem [2]. Obecny przegląd laboratoryjnych metod syntezy pochodnych i analogów tropanu obejmuje głównie reprezentatywne osiągnięcia opublikowane w ostatnich 15 latach.

1. PIERWSZE HISTORYCZNE SYNTEZY UKŁADU TROPANU

Alkaloidy tropanowe od ponad 100 lat wywierają wpływ na rozwój nie tylko chemii organicznej, ale także medycyny [1]. Uczonych od zawsze fascynowała budowa naturalnych związków chemicznych oraz ich synteza w laboratorium, która w wielu przypadkach, nawet dziś pozostaje wyzwaniem dla ludzkiej kreatywności. Od dawna poszukiwano nowych sposobów na syntezę pochodnych tropanowych, które mogą posiadać ciekawe właściwości, ale stanowią także wyzwanie syntetyczne. Historycznie reprezentatywnymi celami syntetycznymi są tropinon i kokaina.

Richard Willstätter jako pierwszy wykonał syntezę układu tropanowego na początku XX wieku (Schemat 1).



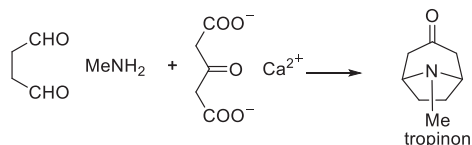
Schemat 1. Historyczna synteza tropinonu wg Willstättera

Scheme 1. Historical synthesis of tropinone carried out by Willstätter

Dokonał tego w kilkunastu etapach, wychodząc z cykloheptanonu i osiągnął wydajność 0,75% [7, 8]. Wykonanie tak długiej i skomplikowanej syntezy w tamtych czasach było prawdziwym dziełem sztuki chemicznej oraz pokazem wytrwałości naukowca.

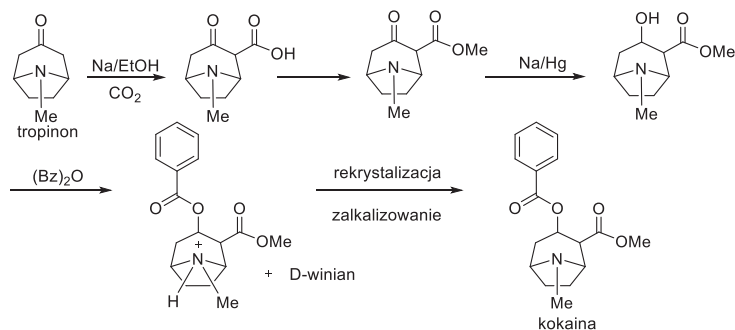
W 1917 roku Robert Robinson opublikował syntezę tropinonu, którą przeprowadził, wykorzystując podwójną reakcję Mannicha i stosunkowo proste substraty (Schemat 2) [9–11]. Uzyskał 17%-ową wydajność – ponad dwudziestokrotnie więcej niż Willstätter w swej syntezie. Po zoptymalizowaniu warunków wydajność syntezy Robinsona wzrosła do ponad 90% [12]. Reakcję tę uznaje się za klasyczny przykład

syntezy totalnej, jest ona imponująca pod względem prostoty, efektywności i zgodności z dzisiejszymi wymogami zielonej chemii.



Schemat 2. Historyczna jednoetapowa synteza tropinonu przeprowadzona przez Robinsona
Scheme 2. Historical one-step synthesis carried out by Robinson

Alkaloid o złej sławie – kokaina została odkryta w połowie XIX wieku w dwóch gatunkach krzewu koka, a po raz pierwszy została wyekstrahowana z rośliny przez Alberta Niemann'a w 1860 roku [1]. W Niemczech chlorowodorek kokainy zaczęto stosować w medycynie w 1884 roku jako składnik środków przeciwbólowych, znieczulających, a także stymulujących ośrodkowy układ nerwowy. Dzięki tym właściwościom kokaina stała się substancją szeroko stosowaną w Europie w różnych lekach, do czasu poznania jej działania uzależniającego. Uznaje się, że Richard Willstätter jako pierwszy zbadał strukturę kokainy i wychodząc z tropinonu opracował warunki syntezy totalnej tego alkaloidu w 1923 roku (Schemat 3) [13]. Synteza ta była dużym osiągnięciem naukowym i przyczyniła się do rozwoju chemii produktów naturalnych.



Schemat 3. Pierwsza synteza kokainy
Scheme 3. The first synthesis of cocaine

W latach 90. XX wieku, jako efektywną strategię syntezy enancjoselektywnej podstawionych tropanów zastosowano asymetryczne deprotonowanie tropinonu i jego analogów. Majewski i Łążny wykazali skuteczność tego podejścia poprzez syntezę kilku alkaloidów [3, 4, 14].

2. SYNTEZY ALKALOIDÓW TROPANOWYCH I ICH POCHODNYCH OPUBLIKOWANE W LATACH 2000–2015

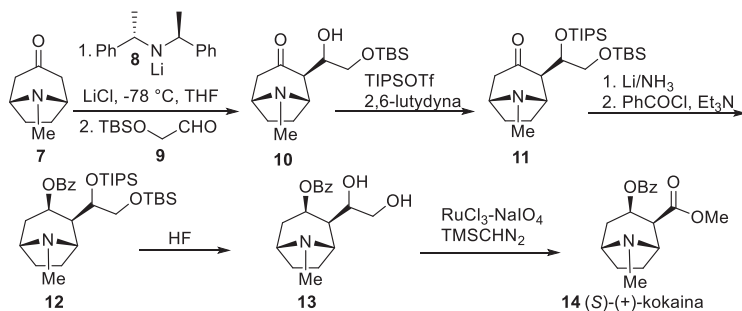
Zakres literaturowy dotyczący alkaloidów tropanowych jest bardzo szeroki. Opublikowano dotychczas około 4,5 tysiąca artykułów (wg bazy Scopus) ze słowami kluczowymi „tropane alkaloids” (alkaloidy tropanowe), wśród których dwie trzecie ukazały się już w XXI wieku. Świadczy to o znacznym zainteresowaniu tą tematyką. W niniejszej pracy zaprezentowano najciekawsze, z syntetycznego punktu widzenia, podejścia do otrzymywania tych alkaloidów.

2.1. SYNTEZY KOKAINY

Na przełomie XIX i XX wieków dość poważnym problemem stało się nadużywanie kokainy, w związku z czym w roku 1914 zabroniono jej sprzedaży, z wyjątkiem niewielkich ilości zapisywanych przez lekarzy w celach leczniczych. W okresie międzywojennym przyjmowanie kokainy stało się modne w kręgach artystów, intelektualistów i pisarzy.

W naszych czasach nadużywanie kokainy nadal pozostaje poważnym problemem społecznym. W związku z czym, uwagę zwrócono na związki będące antagonistami i częściowymi agonistami kokainy, które mogłyby być stosowane w leczeniu uzależnień [5].

Ze względów prawnych rzadko opracowywano syntezy naturalnego enancjomeru (–)-kokainy. W 2000 roku Lee i in. opublikowali metodę enancjoselektywnej i wydajnej syntezy nienaturalnego enancjomeru (S)-(+)-kokainy, która jest nieuzależniająco formą kokainy oraz jej szybko metabolizowanym, częściowym agonistą [5]. Jako substrat wykorzystano znany i handlowo dostępny tropinon (7), który enancjoselektywnie deprotonowano enancjomerycznie czystym amidkiem litu **8** w obecności chlorku litu (Schemat 4) wg metodologii opisaną przez Majewskiego i Łażnego [4, 15]. Do powstałego enolanu dodano aldehyd **9**, otrzymując aldol **10** o konfiguracji na węglu C2 charakterystycznej dla kokainy, który po zabezpieczeniu grupy OH zredukowano diastereoselektywnie do alkoholu za pomocą litu w cieplem amoniaku.



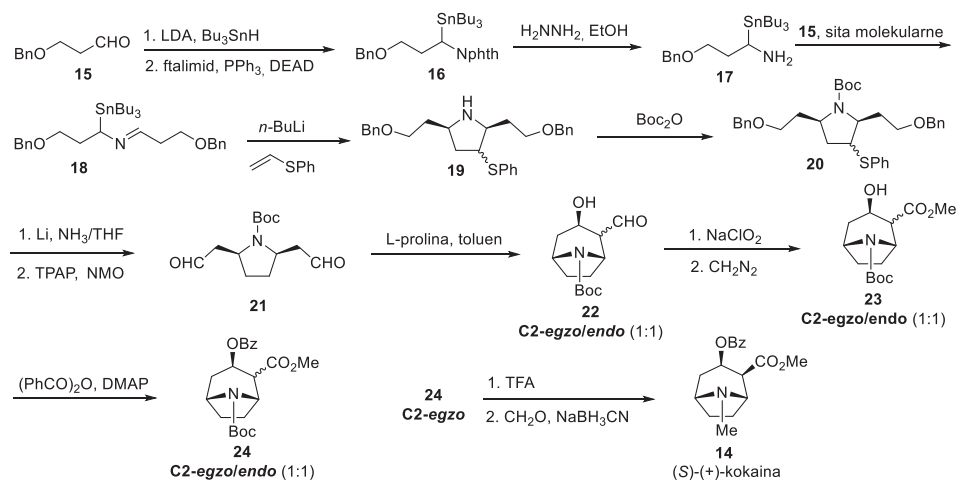
Schemat 4. Enancjoselektywna synteza (S)-(+)-kokainy przeprowadzona przez Lee i in.

Scheme 4. Enantioselective synthesis of (S)-(+)-cocaine carried out by Lee et al.

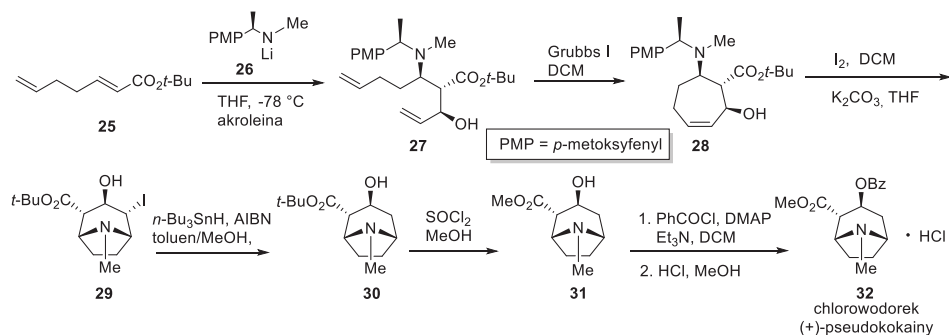
Powstały alkohol o pożądaną konfiguracją poddano estryfikacji chlorkiem benzoilu, a zamaskowane grupy hydroksylowe w esterze **12** uwolniono fluorowodorem. Tak uzyskany diol **13** w jednym etapie utleniono do kwasu karboksylowego przy pomocy RuO₄ i zestryfikowano za pomocą trimetylosililodiazometanu, otrzymując (S)-(+)-kokainę (**14**) z ogólną wydajnością wynoszącą 78% i ok. 90%-owym nadmiarem enancjomerycznym.

Opracowana przez zespół Lee metoda syntezy może być wykorzystywana nie tylko do otrzymywania enancjomerycznie czystych analogów kokainy i innych ważnych pod względem medycznym alkaloidów, ale również może być ogólnie użyteczna w syntezie asymetrycznej.

Cztery lata później, w 2004 roku, zespół Mansa zaprezentował inny sposób syntezy (S)-(+)-kokainy (**14**) (Schemat 5) [16]. Jednym z kluczowych etapów była cykloadycja [3+2] winylowego tioeteru z litowanym układem azaalilowym połączona z dalszą wewnątrzcząsteczkową organokatalityczną reakcją aldolową prowadzącą w efekcie do desymetryzacji **21**. (S)-(+)-Kokainę otrzymano w 14-etapowej syntezie z całkowitą wydajnością wynoszącą 6,5% oraz 86%-owym nadmiarem enancjomerycznym.



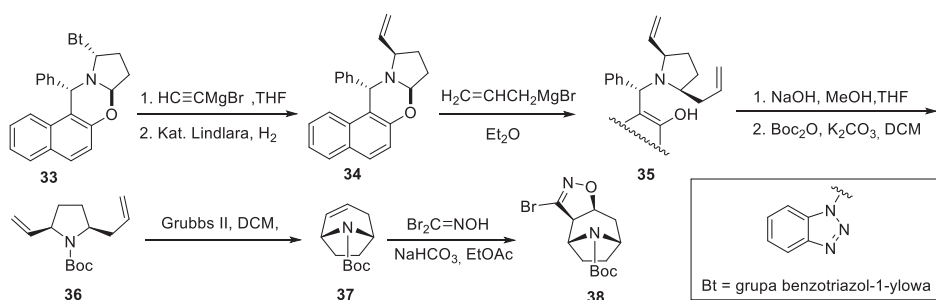
Zespół Brocka przeprowadził stosunkowo krótką i wydajną syntezę asymetryczną (+)-pseudokokainy (Schemat 6), stosując reakcję jodoaminacyjnego zamknięcia pierścienia (ang. *ring-closing iodoamination*) [17]. Jako substratu użyto nienasyconego estru **25**, który w reakcji z chiralnym amidkiem litu **26**, a następnie akroleiną przekształcono w β -aminoester **27**. Na drodze metatezy, otrzymano karbocykl **28**. Działanie jodu spowodowało jodoaminowanie z zamknięciem pierścienia pomiędzy atomem azotu i atomem węgla C4 wraz z odejściem grupy α -metylo-*p*-metoksybenzylowej. Otrzymaną jodopochodną **29** poddano rodnikowej wymianie jodu na wodór. Dwa ostatnie etapy syntezy polegały na estryfikacji estru metylowego **31** chlorkiem benzoilu i utworzeniu chlorowodoru. Całkowita wydajność syntezy wyniosła 31% (dr > 99:1).



Enancjoselektywnej syntezy (*S*)-(+)-kokainy, a także jej analogów podstawionych na węglu C1 podjął się również zespół Davisa w 2010 roku, wykorzystując zablokowaną oksosulfiniminę jako materiał wyjściowy. Wydajność 9-etapowej syntezy wyniosła 25% [18].

Cheng i in. w 2011 roku opracowali metodę syntezy naturalnej (-)-kokainy (**42**), substancji hamującej wychwyt zwrotny dopaminy oraz noradrenaliny i prowadzącej do uzależnień, a także nienaturalnej (-)-ferrugininy (**46**), która jest silnym agonistą acetylocholinergicznym receptorów nikotynowych [19]. Zespół Chenga otrzymał z dobrymi wydajnościami powyższe związki, które ze względu na strukturę chemiczną i właściwości biologiczne są pożądanymi celami syntezy totalnej.

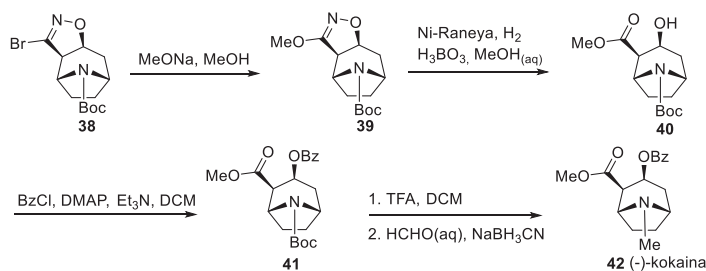
Pierwsza część syntezy obu tych związków jest identyczna i została przedstawiona na Schemacie 7.



Schemat 7. Otrzymywanie związku pośredniego w syntezach (-)-kokainy i (-)-ferrugininy wg Chenga

Scheme 7. Preparation intermediate for the synthesis of (-)-cocaine and (-)-ferruginine according to Cheng

Końcowe transformacje prowadzące do otrzymania (-)-kokainy (**42**) zostały zaprezentowane na Schemacie 8. Wydajność całkowita wg autorów wynosi 55%, wychodząc ze związku **33**.



Schemat 8. Synteza (-)-kokainy wykonana przez zespół Chenga

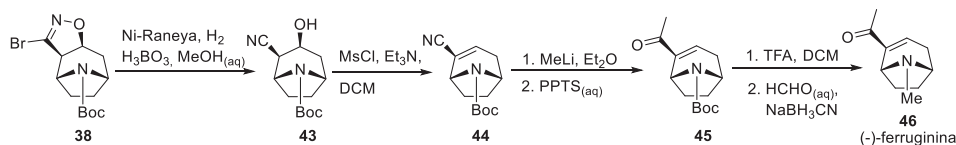
Scheme 8. Synthesis of (-)-cocaine carried out by Cheng et al.

Śród powyższych metod syntezy izomerów kokainy najkrótszą, najbardziej wydajną, a także najbardziej ekonomiczną zaprezentował Lee w 2000 roku. Trzy pozostałe podejścia były dłuższe i bardziej skomplikowane, a przez to mniej wydajne oraz bardziej kosztowne.

2.2. METODY OTRZYMYWANIA FERRUGINY I FERRUGININY

Ferruginina (*ferruginine*) oraz ferrugina (*ferrugine*) są alkaloidami wyizolowanymi z Brown Silky Oak (*Darlingia darlingiana*) i Rose Silky Oak (*Darlingia ferruginea*). Związki te są silnymi agonistami receptorów nikotynowych, a ferrugininę opisano jako czynnik przeciwko chorobie Parkinsona oraz Alzheimerera [20].

Związek **38**, który został wykorzystany jako substrat do syntezy (-)-kokainy (**42**), zastosowano również do syntezy (-)-ferrugininy (**46**) (Schemat 9) [19]. Związek ten poddano wodorowaniu w obecności kwasu borowego i niklu Raneya z utworzeniem β -hydroksynitrylu **43**. Reakcja z chlorkiem mesyłu oraz trietyloaminą spowodowała usunięcie grupy hydroksylowej. Następnie zmetylowano grupę nitrylową metylolem i poddano ją hydrolizie katalizowanej *p*-toluenosulfonianem pirydyniowym (PPTS). Ostatni etap, wymiana grupy Boc na grupę metylową był identyczny jak w syntezie kokainy. Końcowy produkt **46** otrzymano w 9 etapach z całkowitą wydajnością 46% (wychodząc ze związku **33**).

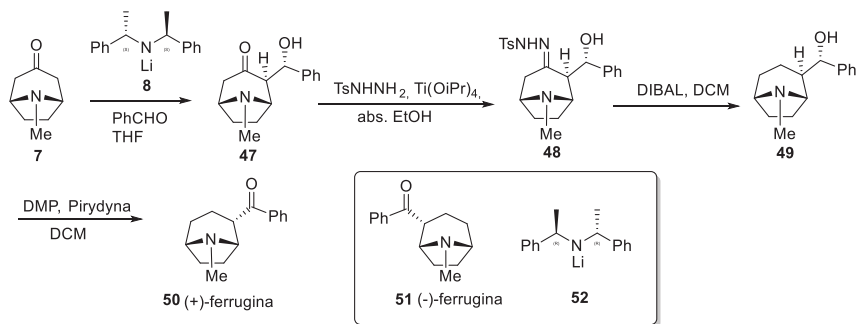


Schemat 9. Synteza (-)-ferrugininy wykonana przez zespół Chenga

Scheme 9. Synthesis of (-)-ferruginine carried out by Cheng

W 2012 roku Armando Córdova ze współpracownikami opublikował pierwszą organokatalityczną asymetryczną syntezę totalną ferrugininy, która obejmowała 6 etapów, a wydajność całkowita wyniosła 19% [21]. Ta sama metodologia daje także możliwość otrzymania metyloekgoniny, kokainy i jej pochodnych podstawionych na węglu C1 [21].

Zespół Łażnego opracował metodę syntezy ferruginy w formie racemicznej oraz w obu formach enancjomerycznych (Schemat 10) [22, 23] opartą o strategię deprotonowania tropinonu.



Schemat 10. Synteza ferruginy przeprowadzona przez badaczy z Uniwersytetu w Białymstoku
 Scheme 10. Synthesis of ferrugine carried out by researchers from the University of Białystok

Substrat **7** poddano deprotonowaniu amidkiem litu (LDA, **8** lub **52** w celu otrzymania odpowiednio: racematu, (+)- lub (-)-ferruginy), a następnie reakcji z benzaldehydem. Powstały aldol **47** przekształcano w tosylohydrazon **48** przy użyciu izopropanolanu tytanu w bezwodnym etanolu. Redukcja hydrazonu pozwoliła na otrzymanie związku **49**, który na drodze utleniania przekształcony został w alkaloid: (+)-ferruginę (**50**) (wydajność całkowita 18%, ee $\geq 99\%$), (-)-ferruginę (**51**) (wydajność całkowita 18%, ee $\geq 99\%$) lub ich równomolową mieszaninę (wydajność całkowita 35%, tylko izomer *endo*).

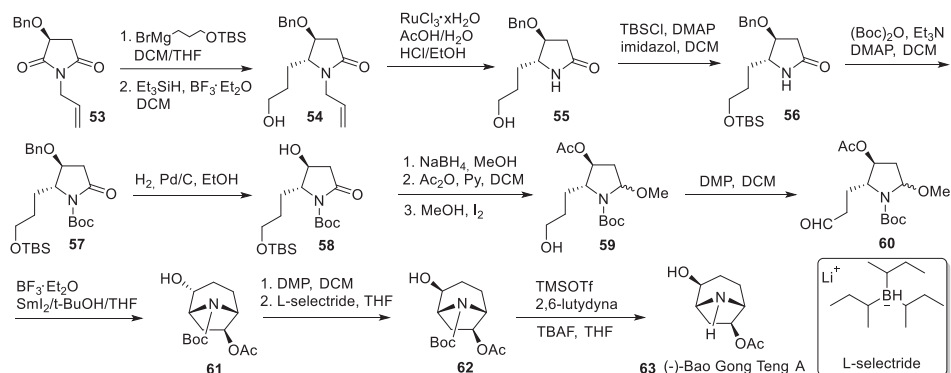
Syntezy ferruginy dokonali również Grainger i współpracownicy w 7 etapach z całkowitą wydajnością 21% [24]. Kluczowym etapem otrzymywania ferruginy była eliminacja Czugajewa podstawionych ditiokarbaminianem laktamów z utworzeniem α,β - i/lub β,γ -nienasyconych amidów (w zależności od struktury substratu), które po reakcji z fenylolitem i zasadowej izomeryzacji dały pożądany alkaloid.

2.3. SYNTEZA ALKALOIDU (-)-BAO GONG TENG A

Lin wraz ze współpracownikami opracował nową metodę otrzymywania polihydroksylowanego szkieletu tropanu [25]. Zaprezentował ją na przykładzie enancjoselektywnej syntezy alkaloidu (-)-Bao Gong Teng A (**63**) (Schemat 11) wyizolowanego z chińskiej rośliny baogongteng (*Erycibe obtusifolia*), od której wziął swoją nazwę. Związek ten jest wykorzystywany w leczeniu jaskry, wykazuje także działanie obniżające ciśnienie krwi.

Kluczowym etapem syntezy była wewnątrzcząsteczkowa reakcja prowadząca do powstania bicyklicznego szkieletu tropanowego **61**, w wyniku której otrzymano mieszaninę diastereoizomerów **61** i **62** z wydajnościami odpowiednio 56% i 5% (Schemat 11). Niestety, dominującym okazał się izomer o niepożądanym, tj. odwrotnej w stosunku do produktu naturalnego, konfiguracji grupy hydroksylowej na atomie węgla C5. Zmianę konfiguracji umożliwiło utlenianie grupy hydroksylowej odczynnikami Dessa-Martina, a następnie stereoselektywna redukcja tri-*sec*-butylo-

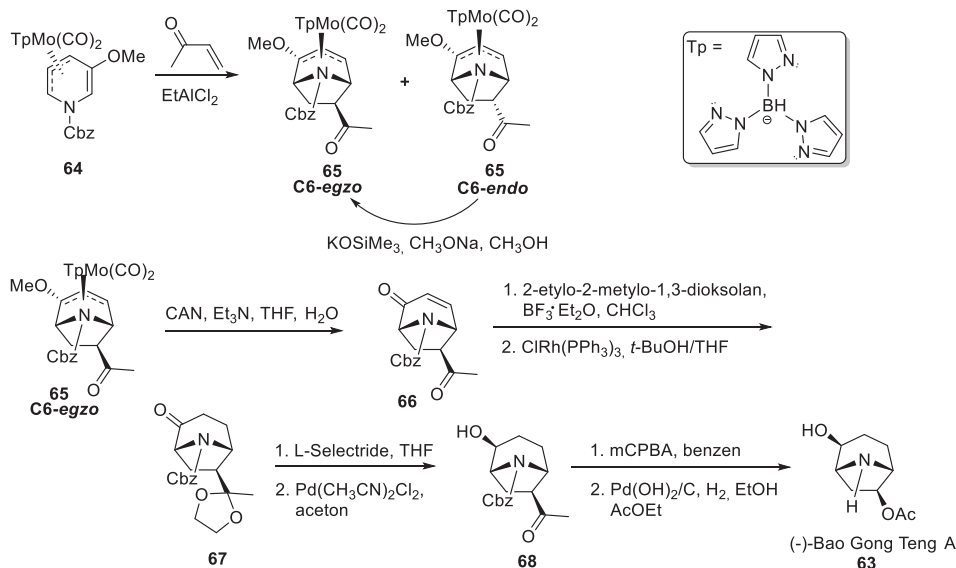
borowodorkiem litu (*L-selectride*). W końcowym etapie usunięto grupę ochronną Boc triflatem trimetylosililu, uzyskując alkaloid (-)-Bao Gong Teng A (**63**) z ogólną wydajnością 7,6%.



Schemat 11. Synteza alkaloidu (-)-Bao Gong Teng A wykonana przez zespół Lin

Scheme 11. Synthesis of (-)-Bao Gong Teng A carried out by Lin et al.

Zhang i Liebeskind zsyntezowali alkaloid (-)-Bao Gong Teng A (**63**), wychodząc z kompleksu metaloorganicznego **64** (Schemat 12) [26], którego reakcja z ketonem metylo-winylowym (cykloadycja [5+2]) prowadziła bezpośrednio do utworzenia szkieletu tropanowego **65** (*egzo/endo* 10:1).



Schemat 12. Synteza alkaloidu (-)-Bao Gong Teng A wykonana przez Zhanga i Liebeskinda

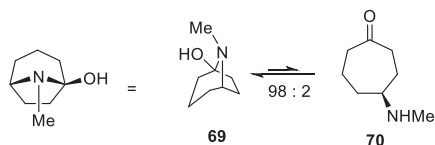
Scheme 12. Synthesis of (-)-Bao Gong Teng A carried out by Zhang and Liebeskind

Ta kluczowa transformacja dawała również niepożądaną izomer *endo*, który poddano zasadowej epimeryzacji do izomeru *egzo*, o konfiguracji odpowiadającej stereochemicznej budowie (–)-Bao Gong Teng A. Kolejnymi etapami były: utlenianie azotanem cerowo-amonowym, zabezpieczenie grupy karbonylowej w związku **66** acetalem oraz uwodornienie wiązania C=C na katalizatorze Wilkinsona. Działaniem wodoru *L-Selectride* zredukowano diastereoselektywnie grupę karbonylową w pierścieniu, a następnie odbezpieczono karbonyl. Otrzymany alkohol **68** poddano reakcji utleniania Baeyera-Villigera, a w końcowym etapie usunięto grupę benzyloksykarbonylową, otrzymując alkaloid (–)-Bao Gong Teng A (**63**) z całkowitą wydajnością 35%, wychodząc ze związku **64**.

Z dwóch zaprezentowanych powyżej metod otrzymywania alkaloidu (–)-Bao Gong Teng A znacznie krótsza i kilkakrotnie bardziej wydajna okazała się synteza Liebieskinda.

2.4. SYNTEZA ALKALOIDU (+)-FISOPERUWINY [*PHYSOPERUVINE*]

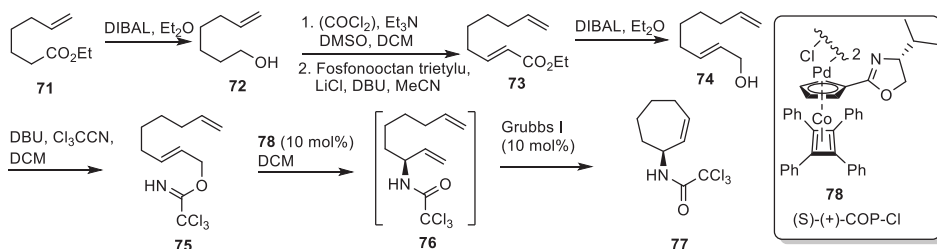
Zaed i in. opracowali nowe podejście do syntezy (+)-fisoperuwiny (Schemat 13), alkaloidu wyizolowanego z *Physalis peruviana* (miechunki jadalnej, inaczej peruwiańskiej) [27, 28], który występuje w dwóch formach tautomerycznych: bicyklicznej **69** (pochodna tropanu) oraz monocyklicznej ((*S*)-4-metyloaminocykloheptanon) (**70**) ze znaczną przewagą struktury tropanu.



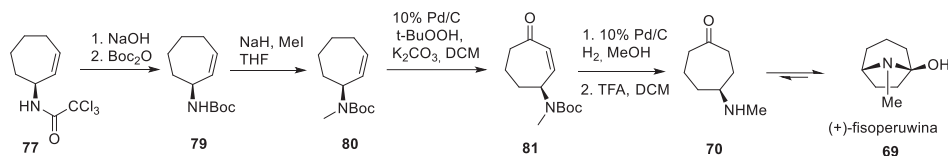
Schemat 13. Tautomeryczne formy alkaloidu (+)-fisoperuwiny [(+)-*physoperuvine*]

Scheme 13. Tautomeric forms of (+)-*physoperuvine*

Decydującym etapem syntezy był tandem reakcji – przegrupowanie Overmana do trichloroacetamidu **76** przy pomocy dostępnego handlowo chiralnego katalizatora **78** i reakcji metatezy z zamknięciem pierścienia (Schemat 14). Otrzymany (*S*)-*N*-cykloheptenylotrichloroacetamid (ee = 84%, **77**) poddano hydrolizie, powstałą aminę zabezpieczono (Boc), otrzymując produkt **79** (Schemat 15). *N*-metylowanie, utlenienie w pozycji allilowej i uwodornienie wiązania podwójnego oraz usunięcie grupy Boc doprowadziło (w sumie po 11 etapach, wydajność całkowita ok. 10%) do produktu **70**, który spontanicznie izomeryzuje do (+)-fisoperuwiny. Alkaloid ten dostępny jest też z tropinonu drogą opisaną przez Majewskiego i Łąznego w obu formach enancjomerycznych, w pięciu etapach (m.in. deprotonowanie i reakcja Whartona), z całkowitą wydajnością 33% [3, 14].



Schemat 14. Synteza kluczowego związku pośredniego na drodze syntezy alkaloidu (+)-fisoperuwiny
 Scheme 14. Synthesis of key intermediate for synthesis of physoperuvine

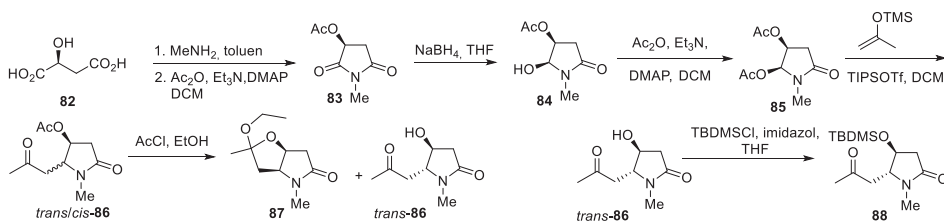


Schemat 15. Druga część syntezy (+)-fisoperuwiny zaprezentowana przez zespół Zaeda
 Scheme 15. The second part of synthesis of (+)-physoperuvine presented by Zaed

2.5. SYNTEZA ALKALOIDÓW: (+)-PERWILLEINY [PERVILLEINE] B, (+)-PARWILLEINY [PARVILLEINE] C, (+)-MERREDISYNY [MERREDISINE] ORAZ (+)-WALEROIDYNY [VALEROIDINE]

Bazując na doświadczeniu zdobytym podczas syntezy alkaloidu (-)-Bao Gong Teng A, Huang i in. podjęli próbę otrzymania kolejnego alkaloidu – (+)-perwilleiny B (**91**) (Schemat 16 i 17) [29]. Alkaloid ten został wyizolowany z *Erythroxylum pervillei* rosnącej na południowym Madagaskarze. Uważa się, że może on być inhibitorem białka MDR (ang. *multidrug resistance*) obecnego w ścianach komórkowych, które chroni komórkę przed przedostawaniem się toksyn do jej wnętrza. Inhibicja tego białka może pozytywnie wpłynąć na skuteczność antybiotyków oraz leków przeciwnowotworowych.

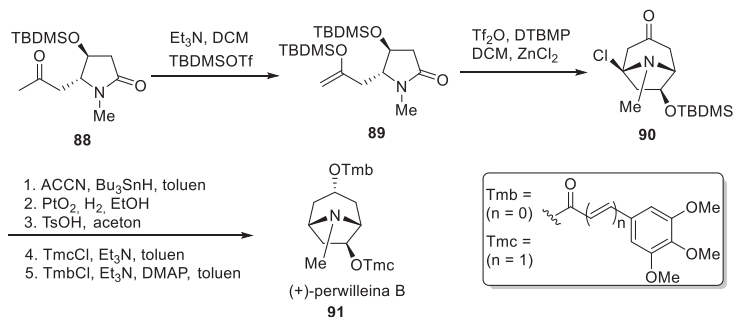
Pierwszym etapem syntezy (+)-perwilleiny B była reakcja kwasu (S)-jabłkowego (**82**) z metyloaminą, dająca hydroksyimid, który następnie zestryfikowano bezwodnikiem octowym, otrzymując **83** (Schemat 16).



Schemat 16. Otrzymywanie ketolaktamu **88** – kluczowego związku pośredniego do syntezy alkaloidu (+)-perwilleiny B

Scheme 16. Preparation of ketolactame **88** – key intermediate for synthesis of pervilleine B

Chemo- i stereoselektywna redukcja jednej grupy karbonylowej imidu dała hydroksylaktam **84**. Acetylowa pochodna **85** w wyniku podstawienia eterem siliowym acetonu utworzyła związek **86** (mieszankę diastereoizomerów), który po etanolizacji tworzył wewnątrzcząsteczkowy acetal tylko z izomerem *cis*, dając **87**. Pozwoliło to na wydzielenie z mieszaniny pożądanego izomeru *trans*-**86**. Grupę hydroksylową w oczyszczonym diastereoizomerze *trans*-**86** zabezpieczono eterem siliowym, otrzymując laktam **88**. W kolejnym etapie (Schemat 17) utworzono siliowy eter enolu **89**, który w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji dał bicykliczny układ tropanu **90**.

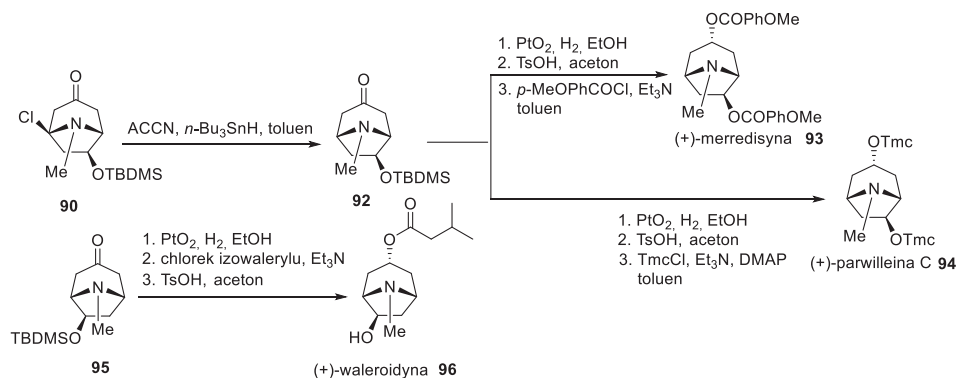


Schemat 17. Synteza alkaloidu (+)-perwilleiny B wg Huang i in.

Scheme 17. Synthesis of (+)-pervilleine B according to Huang et al.

Wolnorodnikowe dehalogenowanie i manipulacja grup funkcyjnych pozwoliły na uzyskanie nienaturalnego alkaloidu (+)-perwilleiny (**91**) z całkowitą wydajnością ok. 13%.

Ci sami autorzy w innej publikacji [30] zaprezentowali możliwość zastosowania powyższej metody do syntezy innych alkaloidów tropanowych (Schemat 18): (+)-merredisyne (**93**, wydajność 66% wychodząc z **90**), (+)-parwilleiny C (**94**, wydajność 72% wychodząc z **90**), oraz (+)-waleroidyny (**96**, wydajność 40% wychodząc z **95**), dla których materiałem wyjściowym był kwas (*R*)-jabłkowy (**82**) (Schemat 16 i 17). Zabezpieczony 6-hydroksytropinon, kluczowy związek pośredni w syntezach alkaloidów tego typu, dostępny jest także w obu formach enancjomerycznych prostszą drogą – przez enancjoselektywne deprotonowania tropinonu i transpozycje 1,4 karbonyłu tropinonu [3, 14].

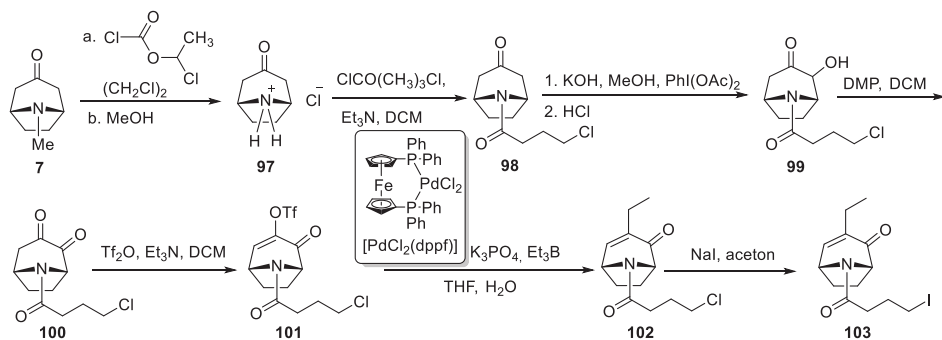


Schemat 18. Finalne przekształcenia prowadzące do alkaloidów (93), (94), (96)

Scheme 18. The final transformations towards alkaloids (93), (94), (96)

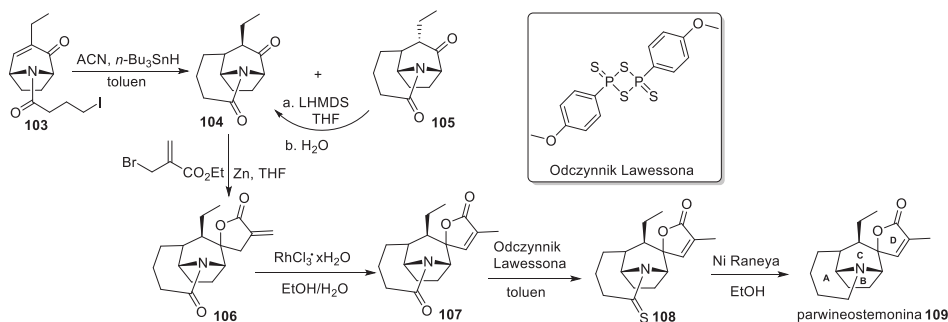
2.6. SYNTEZA ALKALOIDU PARWINEOSTEMONINY [PARWINEOSTEMONINE]

W 2003 roku z rośliny o nazwie gatunkowej *Stemona parviflora* zaliczanej do rodziny *Stemonaceae* wyizolowano alkaloid parwineostemoninę (*parvineostemonine*, **109**), którego molekula zawiera układ tropanu. Korzenie i kłącza roślin tej rodziny są używane w ludowej medycynie wschodniej Azji w leczeniu przypadłości układu oddechowego, a także jako naturalny insektycyd. Te cechy w połączeniu z ciekawą budową sprawiają, iż alkaloid ten jest interesującym celem do syntezy totalnej. Pierwszą taką syntezę przeprowadził zespół Chena w 2012 roku (Schemat 19 i 20) w 11 etapach, uzyskując całkowitą wydajność 9,1% [31]. Jako materiału wyjściowego użyto tropinonu (**7**), którego azabicyklo[3.2.1]oktanowy szkielet stanowi element struktury (pierścienie B i C) docelowego alkaloidu. Kluczową transformacją było utworzenie trzeciego pierścienia (A) w wyniku rodnikowej cyklizacji z użyciem wodoru tributyllocyny oraz 1,1'-azobis(cykloheksanokarbonitrylu) (ACN) jako inicjatora (Schemat 20). W reakcji powstały dwa epimery, jeden z nich – epimer **105** w celu zwiększenia wydajności przekształcono w pożądaną izomer **104**. Czwarty pierścień (D) powstał w reakcji związku **104** ze sproszkowanym cynkiem i (2-bromometylo)akrylanem etylu. Powstały lakton **106** poddano izomeryzacji do **107** i przy pomocy odczynnika Lawessona przekształcono w tioamid **108**, który usunięto za pomocą redukcji, otrzymując ostatecznie docelowy alkaloid **109** z ogólną wydajnością 9,1%.



Schemat 19. Pierwsza część syntezy parvineostemoniny

Scheme 19. The first part of synthesis of parvineostemonine



Schemat 20. Finalna część syntezy parvineostemoniny

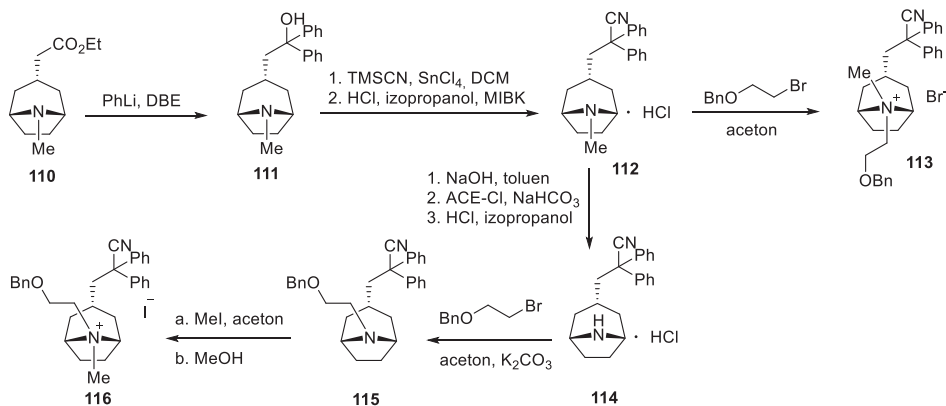
Scheme 20. The final part of synthesis of parvineostemonine

2.7. SYNTEZA SUBSTANCJI AKTYWNEJ LEKU NA CHOROBY UKŁADU ODDECHOWEGO

Układ tropanu występuje nie tylko w związkach chemicznych pochodzenia naturalnego, ale także może być elementem struktury syntetycznych związków wykazujących działanie biologiczne, w tym agrochemikaliów lub substancji aktywnych leków. Przykładem może być substancja **116**, która jest długo działającym, selektywnym i odwracalnym antagonistą receptorów muskarynowych. W firmie GlaxoSmithKline (GSK) trwają badania nad nią, jako potencjalnym lekiem w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc – POChP (ang. *Chronic obstructive pulmonary disease*, COPD). Choroba ta jest jedną z pięciu najczęstszych przyczyn zgonów na świecie, charakteryzuje się postępującym i nieodwracalnym zwężeniem (obturacyją) światła oskrzeli i ograniczeniem przepływu powietrza przez drogi oddechowe [32].

Zespół Roberta Breama z GSK opracował dwie metody syntezy tego potencjalnego leku (Schemat 21 i 22) [33]. Pierwszą ścieżkę syntezy (Schemat 21) rozpoczęto od reakcji estru **110** z fenylolitem. Otrzymany alkohol **111** przekształcono w nityl, który oczyszczono w postaci chlorowodoru **112**. Próba utworzenia docelowego

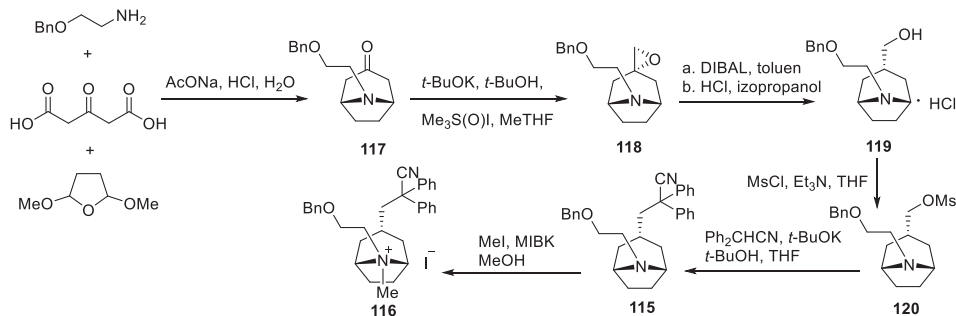
związku **116** przez *N*-alkilowanie **112** nie powiodła się na skutek tworzenia niewłaściwego izomeru **113**. Demetylowanie azotu w związku **112**, a następnie kolejne alkilowania pozwoliły na otrzymanie pożądanego izomeru czwartorzędowej soli amoniowej (**116**) z całkowitą wydajnością 36% (dr > 99.5:0.5).



Schemat 21. Pierwsza droga do substancji aktywnej leku **116**

Scheme 21. The first road to the active substance of drug **116**

Pierwszy etap drugiej metody syntezy potencjalnego leku **116** polegał na otrzymaniu pochodnej nortropinonu **117** sposobem opracowanym przez Robinsona na początku XX wieku (Schemat 22). W kolejnym kroku otrzymano epoksyd **118**, działając odczynnikiem Coreya-Czajkowskiego (jodek trimetylosulfoksoniowy). Otwarcie pierścienia oksiranowego nastąpiło przez redukcję wodorkiem diizobutyloglinowym, a utworzony alkohol wyizolowano z mieszaniny jako chlorowodorek **119**. Docelowy związek **116** otrzymano w reakcji czwartorzędowania pochodnej tropanu **115**, dr 22:1 (wydajność całkowita syntezy na schemacie 22 wynosi 38%).



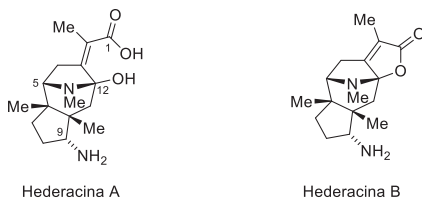
Schemat 22. Drugi sposób otrzymywania substancji aktywnej leku **116**

Scheme 22. The second method of preparation of the active pharmaceutical ingredient **116**

Obie przedstawione powyżej syntezy były projektowane w taki sposób, aby było możliwe przeniesienie ich na skalę przemysłową.

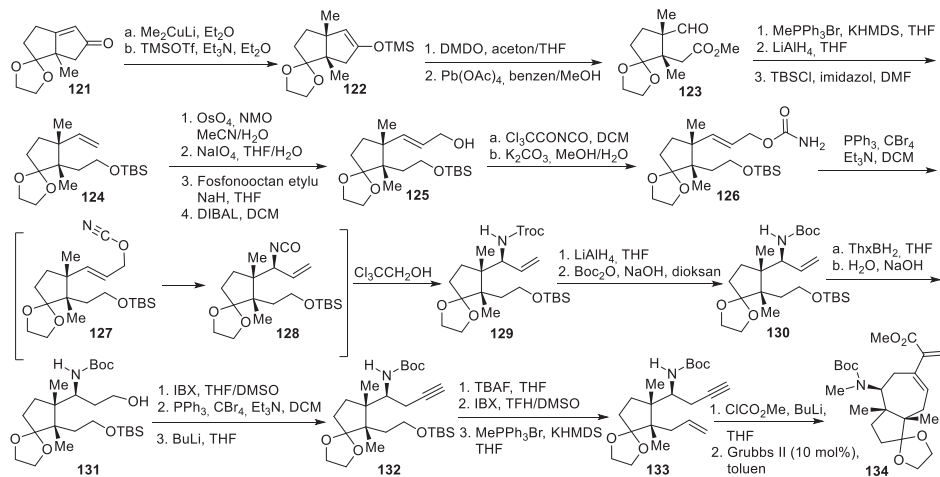
2.8. SYNTEZA HEDERACINY [HEDERACINE] A I HEDERACINY [HEDERACINE] B

Zespół Yamashity podjął próbę syntezy dwóch alkaloidów tropanowych: hederaciny (*hederacine*) A i B (Rys. 1) [34, 35]. Głównym elementem strukturalnym tych związków jest szkielet tropanu – 8-metylo-8-azabicyclo[3.2.1]oktanu połączony z pierścieniem cyklopentanu. Odkryto, że alkaloidy te wyizolowane z Bluszczku kurdybanku (*Glechoma hederacea*) wykazują cytotoksyczne działanie względem komórek nowotworowych jelita grubego. Ich unikalne właściwości i aktywność biologiczna zadecydowały o podjęciu próby syntezy totalnej tych substancji.



Rysunek 1. Struktura hederaciny (*hederacine*) A i hederaciny (*hederacine*) B
 Figure 1. The structure of hederacine A and hederacine B

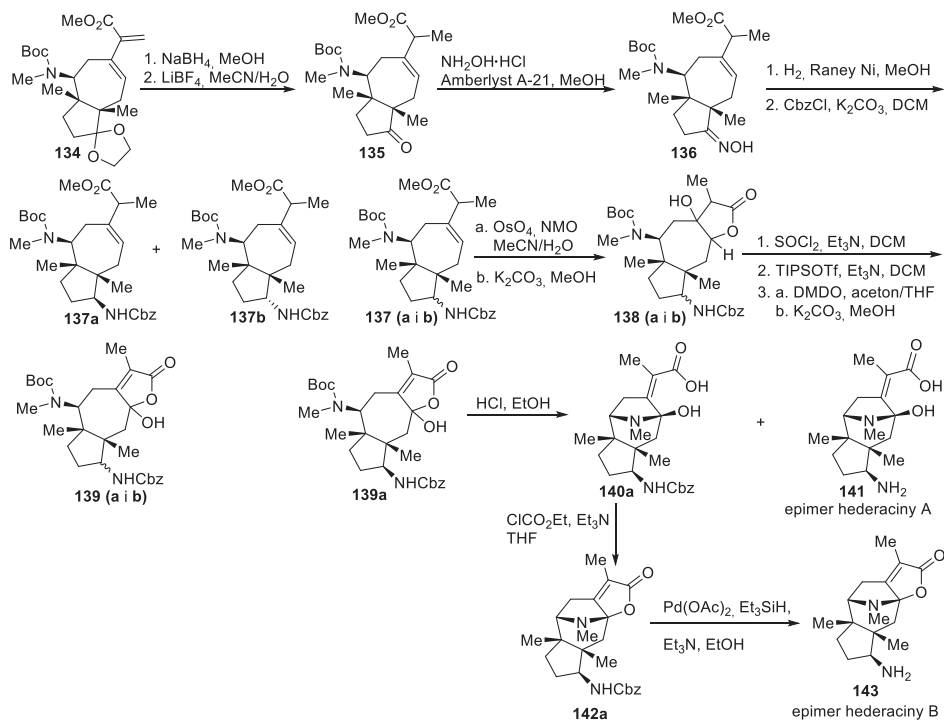
Na Schemacie 23 została przedstawiona synteza 1,3-dienokarboksylanu **134**, kluczowego związku pośredniego na drodze otrzymywania epimerów hederaciny A i B.



Schemat 23. Otrzymywanie związku pośredniego do syntezy epimerów hederaciny A i B
 Scheme 23. Preparation of the intermediate for synthesis of epimers of hederacine A and B

Pierwszym krokiem drugiej części syntezy (Schemat 24) była redukcja wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym związku **134** oraz usunięcie dioksolanowej grupy ochronnej. Uzyskany keton **135** przekształcono w oksym **136**, który po redukcji i zabezpieczeniu powstałej aminy był mieszaniną epimerów **137a** i **137b**. W wyniku utleniania *N*-tlenkiem *N*-metylomorfoliny (NMO) i tetraatlenkiem osmu

wiązania podwójne obu związków uległy dihydroksylacji z utworzeniem laktonu **138** (izomer a i b). Następnie dehydratacja oraz ponowne hydroksylowanie w pozycji g pozwoliły otrzymać dwa izomery związku **139**. Jako związku modelowego do tworzenia hemiaminalu (tworzącego pierścień tropanu) użyto izomeru **139a**, który pod wpływem kwasu utworzył epimer alkaloidu hederacyny A **141** (przeciwna konfiguracja na atomie węgla C9) z wydajnością 20% (wychodząc ze związku **139a**), a także związek **140a**, z którego w wyniku dalszych przekształceń otrzymano epimer hederacyny B (**143**) z wydajnością 55% (wychodząc ze związku **139a**).



Schemat 24. Otrzymywanie epimerów alkaloidów hederacyny A i B

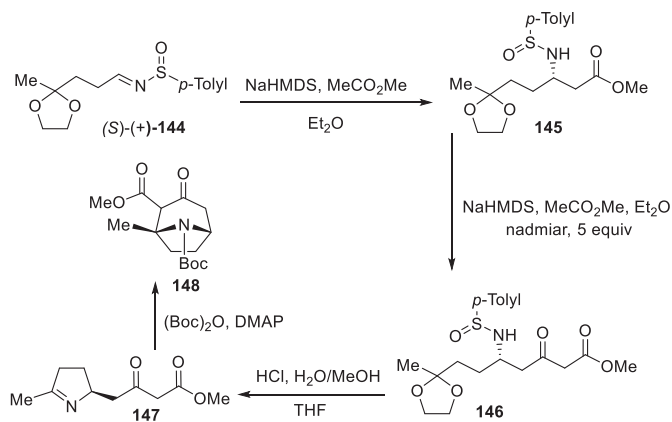
Scheme 24. Preparation of epimers of hederacine A and B

2.9. SYNTEZA INNYCH POCHODNYCH I ANALOGÓW ALKALOIDÓW TROPANOWYCH

Davis i in. zaprezentowali metody syntez podstawionych pochodnych tropinonu, wychodząc z acetalu *N*-sulfinylo- β -imino ketonów (Schemat 25, 26, 27) i stosując wewnątrzcząsteczkową cyklizację Mannicha [36, 37].

Syntezę pochodnej tropinonu **148** z zablokowaną grupą aminową rozpoczęto od reakcji addycji sodowego enolanu octanu metylu do *N*-sulfinyloiminy **144**, uzyskując mieszaninę β -aminoestru **145** i pożądanego produktu reakcji **146**, którą ponownie traktowano nadmiarem enolanu, otrzymując β -ketoester **146** z wydaj-

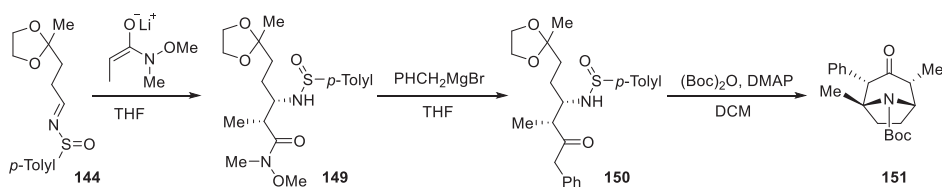
nością 80% (Schemat 25). Hydroliza umożliwiła uzyskanie pochodnej 1-piroliny **147**, która pod wpływem bezwodnika Boc ulegała cyklizacji, tworząc pochodną tropinonu **148** (wydajność całkowita 48%) w postaci mieszaniny epimerów różniących się konfiguracją na atomie węgla C2 w stosunku 70:30 (dominuje izomer z grupą karbometoksylową w pozycji aksjalnej).



Schemat 25. Synteza pochodnej tropinonu **148** przedstawiona przez zespół Davisa

Scheme 25. Synthesis of tropione derivative **148** presented by Davis et al.

Używając tego samego materiału wyjściowego **144**, można również otrzymywać inne podstawione pochodne tropinonu (np. **151**) (Schemat 26).



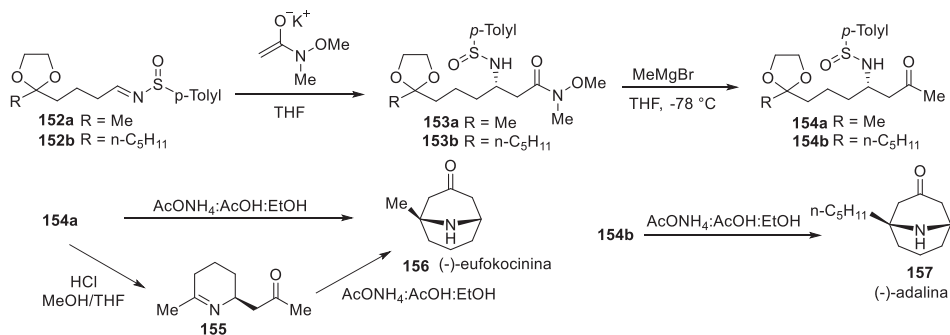
Schemat 26. Synteza pochodnej tropinonu **151** przedstawiona przez zespół Davisa

Scheme 26. Synthesis of tropinone derivative presented by Davis et al.

Wykorzystanie homologów **144** (związki **152a-b**) umożliwiło także syntezę pochodnych granatanonu (9-metylo-9-azabicyklo[3.3.1]nonan-3-onu) [36], co zostało przedstawione na Schemacie 27. Pochodne granatanonu – adalina (**157**) i eufokocinina (*euphoccocinine*) (**156**) zostały wyizolowane odpowiednio z biedronki dwukropki (*Adalia bipunctata*) i *Euphorbia atoto*, od których pochodzą także ich nazwy. Oba alkaloidy wykazują działanie odstrasżające mrówki i pająki, dzięki czemu są obiecującymi składnikami aktywnymi repelentów.

Reakcja związku **152** z potasowym enolanem *N*-metoksy-*N*-metyloacetamidu prowadziła do powstania odpowiednich amidów Weinreba **153**. Działanie nadmiaru bromku metylomagnezowego umożliwiło otrzymanie ketonów metylowych **154a-b**. Uzyskanie alkaloidów: adaliny (**157**, wydajność całkowita 57%) oraz nienatural-

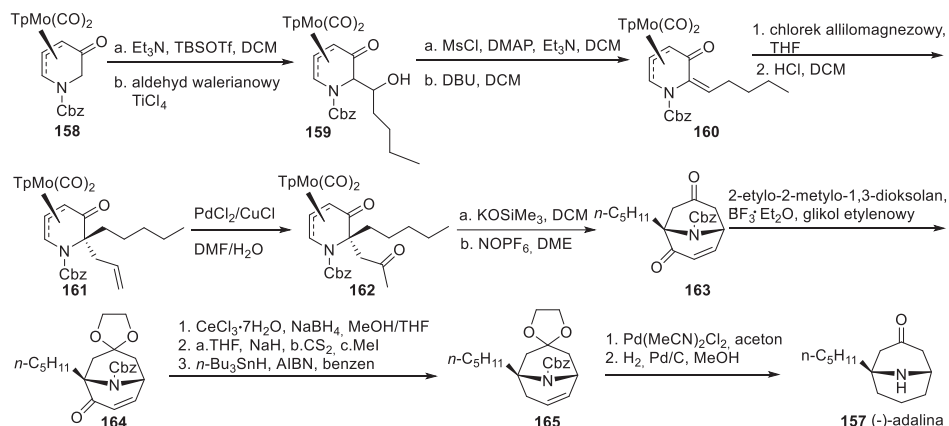
nego izomeru eufokociny (**156**, wydajność całkowita 62%) możliwe było poprzez cyklizację Mannicha. Drugi z wymienionych alkaloidów **156** można otrzymać także z pochodnej tetrahydropirydyny **155** – produktu hydrolizy **154a**.



Schemat 27. Synteza alkaloidów – (-)-eufokociny i (-)-adaliny, pochodnych granatanonu (analogu tropinonu) opracowana przez Davisa

Scheme 27. Synthesis of alkaloids: (-)-euphoccocinin and (-)-adaline, granatanone derivatives, developed by Davis

Zespół Liebeskinda także zsyntezował alkaloid adalinę (**157**) [38], wychodząc z podobnego związku organometalicznego **158**, jak w przypadku alkaloidu Bao Gong Teng A (Schemat 28). Pierwszym etapem była reakcja aldolowa Mukaiyamy. Wygenerowany *in situ* eter siliolowy przereagował z aldehydem walerianowym, a z otrzymanego aldolu **159** wyeliminowano grupę hydroksylową, otrzymując enon **160**, który poddano reakcji z chlorkiem allilomagnezowym. Powstały alkohol uległ przegrupowaniu semipinakolinowemu do **161**. Kolejnym krokiem było utlenienie związku **161** w reakcji Wackera. Zastosowany w kolejnym etapie trimetylokrzemian potasu indukował powstanie szkieletu granatanonu **163** (homologu tropinonu), a działanie NOPF₆ spowodowało eliminację atomu molibdenu z jego ligandami. Grupa karbonylowa przy atomie węgla C3 została zabezpieczona w postaci acetalu i tak otrzymany związek **164** poddano redukcji Luche'a i eliminacji powstałej grupy hydroksylowej (rodnikowa redukcja ksantogeanianu). Wodoroliza pozwoliła na jednoczesne usunięcie grupy ochronnej Cbz oraz redukcję wiązania podwójnego. Naturalny enancjomer adaliny otrzymano z wydajnością całkowitą 12%.

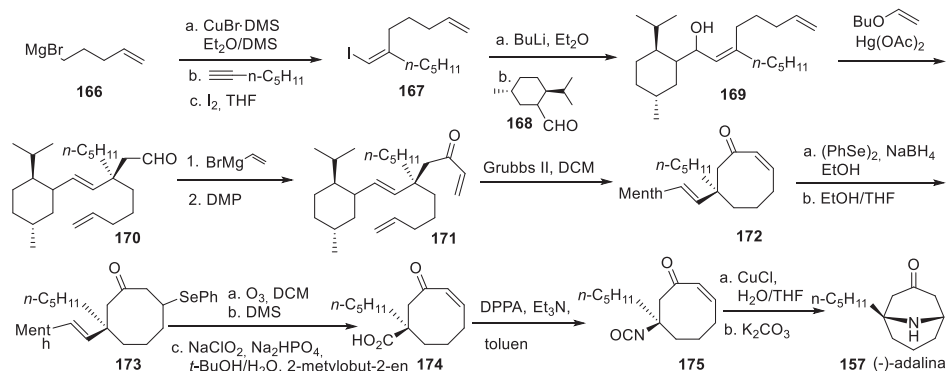


Schemat 28. Synteza adaliny ze związku metaloorganicznego wg Liebeskinda

Scheme 28. Synthesis of adaline from organometallic compound according to Liebeskind

Arbour i in. przedstawili inną metodę syntezy (-)-adaliny (**157**), wykorzystującą pochodną mentolu **168** jako chiralny pomocnik oraz metatetyczne zamknięcie pierścienia i przegrupowanie sigmatropowe [3,3] jako kluczowe reakcje (Schemat 29) [39].

Syntezę alkaloidu adaliny (**157**) rozpoczęto od reakcji bromku pent-4-enylomagnezowego (**166**) z kompleksem bromku miedzi(I) i siarczku dimetylu (Schemat 29).



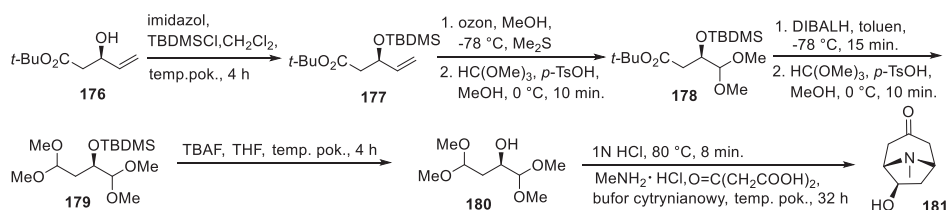
Schemat 29. Synteza (-)-adaliny przeprowadzona przez Arboura i in.

Scheme 29. Synthesis of (-)-adalin carried out by Arbour et al.

Działając na powstały związek miedziorganiczny hept-1-ynem, a później jodem w THF, uzyskano jodek winylu **167**. Reakcja **169** z butylolitem, a następnie z chiralnym aldehydem **168** doprowadziła do alkoholu allilowego **169**. Reakcja z eterem butylowo-winylovym spowodowała przejściowe powstanie eteru winylowego, który dalej ulegał przegrupowaniu sigmatropowemu [3,3] do aldehydu **170**. Addycja związku Grignarda oraz utlenianie powstałego alkoholu dało α,β -nienasycony

keton **171**, który ulegał metatetycznemu zamknięciu ośmioczłonowego pierścienia do **172**. Zabezpieczenie enonu fenylselenkiem pozwoliło na selektywną ozonolizę wiązania podwójnego w łańcuchu bocznym. Dalsze reakcje, m.in. utlenianie chlorynem sodu (utlenianie Lindgrena lub Pinnicka) powstałego z ozonolizy alkoholu pozwoliły na otrzymanie kwasu **174**. W wyniku przegrupowania Curtiusa powstał izocyjanian **175**, który poddano hydrolizie, otrzymując (-)-adalinę (**157**) z całkowitą wydajnością 6%.

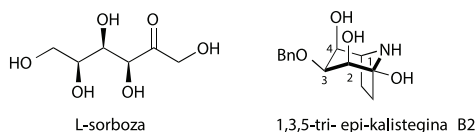
W 2005 roku zespół Polliniego przedstawił 8-etapową syntezę czystego optycznie 6- β -hydroksytropinonu (**181**) (wydajność całkowita 28%) (Schemat 30) [40]. Nowe podejście do otrzymywania hydroksylowanych tropanów wykorzystujące optycznie czynny materiał wyjściowy **176** (otrzymany z enzymatycznego rozdziału kinetycznego) i reakcję Mannicha pozwala na otrzymywanie szkieletów zawierających podstawniki tlenowe (m.in. przy atomach węgla C-3, C-6, C-7), które dość często występuje w związkach naturalnych.



Schemat 30. Synteza 6- β -hydroksytropinonu przeprowadzona przez zespół Polliniego

Scheme 30. Synthesis of 6- β -hydroxytropane carried out by Pollini et al.

W 2008 roku opublikowano syntezę totalną benzylovej pochodnej 1,3,5-tri-*epi*-kalisteginy B₂ – polihydroksylowej pochodnej zawierającej szkielet tropanu – wychodzącą z prostego cukru L-sorbozy (Rys. 2). Droga syntezy obejmowała stereoselektywne alkilowanie nitronu połączone z reakcją metatetycznego zamknięcia pierścienia, co pozwoliło na otrzymanie tricyklicznego związku pośredniego, który z łatwością przekształcono w pożądaný produkt [41].

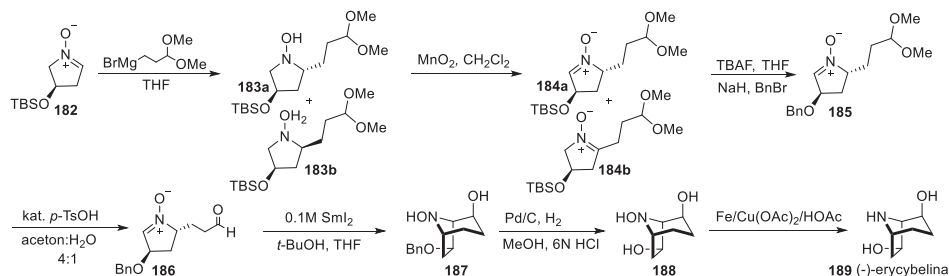


Rysunek 2. Struktura L-sorbozy i 1,3,5-tri-*epi*-kalisteginy B2

Figure 2. The structure of L-sorbose and 1,3,5-tri-*epi*-calystegine B2

W 2011 roku zespół Chu-Yi Yu opublikował syntezę (-)-erycibeliny (*erycibeline*) (**189**), alkaloidu dihydroksynortropanowego wyizolowanego z rośliny *Erycibe elliptilimba* (Schemat 31) [42]. Jako substrat wykorzystano cykliczny nitron **182**, a kluczowym etapem syntezy była indukowana jodkiem samaru(II) reakcja

wewnątrzcząsteczkowego redukcyjnego sprzężenia cyklicznego nitronu z aldehydem. Całkowita wydajność tej 7-etapowej syntezy wyniosła 40%.



Schemat 31. Synteza (-)-erycibeliny przeprowadzona przez zespół Chu-Yi Yu

Scheme 31. Synthesis of (-)-erycibelline carried out by Chu-Yi Yu et al.

PODSUMOWANIE

Alkaloidy są obiektem intensywnych badań – baza Scopus zawiera prawie 200 tys. publikacji, w których występuje słowo „alkaloid”, w latach 1981–2008 ponad 1 tys. rocznie, a od 2009 roku ponad 10 tys. publikacji rocznie. Wyszukując „*tropane alkaloids*” znajdujemy prawie 4,5 tys. publikacji, spośród których ponad połowa ukazała się w ostatnich dziesięciu latach. Część z tych publikacji dotyczy syntezy związków ważnych z praktycznego punktu widzenia. Wśród zaprezentowanych tu ostatnio opublikowanych metod otrzymania podstawionych tropanów i analogów tropanów mało jest syntez prostych i efektywnych. Jako materiałów wyjściowych używano często związków trudno dostępnych o złożonej strukturze. Zazwyczaj syntezy te, jako całość, są mało wydajne, długie (niejednokrotnie kilkanaście etapów), czo- i kosztochłonne. Są także wyjątki wykorzystujące bardziej efektywne podejście oparte na asymetrycznym deprotonowaniu: Lee otrzymał nienaturalną kokainę w stosunkowo krótkiej (5 etapowej) syntezie z dobrą wydajnością wynoszącą 78%. Takie podejście pozwala otrzymać oba enancjomery i racemat, zmieniając jedynie rodzaj reagenta deprotonującego. Większość strategii jednak pozwala uzyskać tylko jeden enancjomer alkaloidu lub mieszaninę racemiczną. Widać, że mimo postępów nie wypracowano nadal jednej ogólnej drogi syntezy większości przedstawicieli tej grupy strukturalnie spokrewnionych związków.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] A.J. Humphrey, D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.*, 2001, **18**, 494.
- [2] G.P. Pollini, S. Benetti, C. De Risi, V. Zanirato, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 2434.
- [3] M. Majewski, R. Łazny, *Synlett*, 1996, 785.
- [4] M. Majewski, R. Łazny, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 5825.
- [5] J.C. Lee, K. Lee, J.K. Cha, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 4773.

- [6] G.A. Cordell, M.L. Quinn-Beattie, N.R. Farnsworth, *Phyther. Res.*, 2001, **15**, 183.
- [7] R. Willstätter, *Annalen.*, 1903, **317**, 204.
- [8] R. Willstätter, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1901, **317**, 307.
- [9] F.F. Blicke, *Organic reactions*, John Wiley and Sons, New York, 1942.
- [10] J.W. Medley, M. Movassaghi, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 10775.
- [11] R. Robinson, *J. Chem. Soc., Trans.*, 1917, **111**, 762.
- [12] C. Schopf, *Angew. Chem.*, 1937, **50**, 779.
- [13] R. Willstätter, W. Müller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1898, **31**, 2655.
- [14] M. Majewski, R. Lazny, A. Ulaczyk, *Can. J. Chem.*, 1997, **75**, 754.
- [15] M. Majewski, R. Lazny, P. Nowak, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 5465.
- [16] D.M. Mans, W.H. Pearson, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 3305.
- [17] E.A. Brock, S.G. Davies, J.A. Lee, P.M. Roberts, J.E. Thomson, *Org. Lett.*, 2012, **14**, 4278.
- [18] F.A. Davis, N. Theddu, R. Edupuganti, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 4118.
- [19] G. Cheng, X. Wang, R. Zhu, C. Shao, J. Xu, Y. Hu, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 2694.
- [20] W.S. Caldwell, H.M.L. Davies, P.M. Lippiello, U.S. Patent 5,227,385, 1993.
- [21] A. Córdova, S. Lin, A. Tseggai, *Adv. Synth. Catal.*, 2012, **354**, 1363.
- [22] R. Lazny, M. Sienkiewicz, T. Olenski, Z. Urbanczyk-Lipkowska, P. Kalicki, *Tetrahedron*, **68**, 8236.
- [23] M. Sienkiewicz, U. Wilkaniec, R. Lazny, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 7196.
- [24] S. Ahmed, L.A. Baker, R.S. Grainger, P. Innocenti, C.E. Quevedo, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 8116.
- [25] G.J. Lin, X. Zheng, P.Q. Huang, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 1545.
- [26] Y. Zhang, L.S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 465.
- [27] K. Agata, J. Kusiak, B. Stępień, K. Bergier, E. Kuźniak, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2010, **64**, 665.
- [28] A.M. Zaed, M.D. Swift, A. Sutherland, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2678.
- [29] S.-Y. Huang, Z. Chang, S.-C. Tuo, L.-H. Gao, A.-E. Wang, P.-Q. Huang, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 7088.
- [30] Z.Y. Mao, S.Y. Huang, L.H. Gao, A.E. Wang, P.Q. Huang, *Sci. China Chem.*, 2014, **57**, 252.
- [31] Z.-H. Chen, J.-M. Tian, Z.-M. Chen, Y.-Q. Tu, *Chem. Asian J.*, 2012, **7**, 2199.
- [32] A.D. Lopez, K. Shibuya, C. Rao, C.D. Mathers, A.L. Hansell, L.S. Held, V. Schmid, S. Buist, *Eur. Respir. J.*, 2006, **27**, 397.
- [33] R.N. Bream, D. Hayes, D.G. Hulcoop, A.J. Whiteman, *Org. Process. Res. Dev.*, 2013, **17**, 641.
- [34] T. Yamashita, M. Yamashita, S. Aoyagi, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 4266.
- [35] M. Yamashita, T. Yamashita, S. Aoyagi, *Org. Lett.*, 2011, **13**, 2204.
- [36] F.A. Davis, R. Edupuganti, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 848.
- [37] F.A. Davis, N. Theddu, P.M. Gaspari, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 1647.
- [38] T.C. Coombs, Y. Zhang, E.C. Garnier-Amblard, L.S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 876.
- [39] M. Arbour, S. Roy, C. Godbout, C. Spino, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 3806.
- [40] G.P. Pollini, C. De Risi, F. Lumento, P. Marchetti, V. Zanirato, *Synlett*, 2005, 164.
- [41] D.L. Re, F. Franco, F. Sánchez-Cantalejo, J.A. Tamayo, *Eur. J. Org. Chem.*, 2009, 1984.
- [42] Z.-L. Zhang, S. Nakagawa, A. Kato, Y.-M. Jia, X.-G. Hu, C.-Y. Yu, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 7713.

GLIKOZYDY NASERCOWE – NOWE TRENDY W CHEMII MEDYCZNEJ SAPONIN I SAPOGENIN

CARDIAC GLYCOSIDES – NEW TRENDS IN MEDICINAL CHEMISTRY OF SAPONINS AND THEIR GENINS

Grzegorz Grynkiewicz^{*1}, Wiesław Szeja²

¹ *Instytut Farmaceutyczny*
ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa
**e-mail: g.grynkiewicz@ifarm.eu*

² *Wydział Chemii Politechniki Śląskiej*
ul. Krzywoustego 8, 44-100 Gliwice

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Krótki rys historyczny
2. Pompa sodowa; ligandy i inhibitory
3. Antyproliferacyjny potencjał CG i nowe wskazania terapeutyczne
4. Źródła substancji aktywnych CG
5. Perspektywy resyntezy i glikorandomizacji CG

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

Grzegorz Grynkiewicz jest absolwentem Wydziału Chemii UW (1962); stopień doktora za dysertację na temat alkaloidów *Lycopodium* (Promotor: J.W. Rodewald, 1968) uzyskał na tym samym wydziale. Od 1969 pracownik naukowy IChO PAN, gdzie otrzymał stopień doktora habilitowanego nauk chemicznych (1979). Otrzymał tytuł profesora nauk chemicznych w 1992 r. Odbił staże naukowe w University College London (UK); Southern Illinois University, Carbondale IL; University of California, Berkeley CA; University of Houston, Houston TX; Texas University MD Anderson Cancer Center, Houston TX (USA); oraz Queen's University Kingston ONT (CAN). Od 1984 pracuje w Instytucie Farmaceutycznym w Warszawie. Zainteresowania zawodowe: chemia związków naturalnych, synteza chemiczna, chemia medyczna i farmaceutyczna, systemy zapewnienia jakości w badaniach nad lekiem, historia badań naukowych i wynalazków technicznych. Czynnny członek towarzystw naukowych: PTChem., PTFarm., Towarzystwo Naukowe Warszawskie, Stowarzyszenie Polskich Wynalazców i Racjonalizatorów. Ważniejsze wyróżnienia indywidualne – Odznaczenie Premiera RP „Zasłużony dla wynalazczości” (2004); Nagroda Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (2006); Medal „Merite d'Invention” Międzynarodowej Wystawy Wynalazków w Brukseli (2009); Medal PTChem., im. Stanisława Kostaneckiego (2014).

Prof. dr hab. inż. Wiesław Szeja od 1966 roku jest zatrudniony na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Obecnie pracuje na stanowisku profesora zwyczajnego w Katedrze Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii. Odbił kilkumiesięczne staże jako profesor wizytujący (CNRS w Grenoble, Francja i Texas University MD Anderson Cancer Center, Houston Teksas, USA). Jego obecne zainteresowania naukowe obejmują m.in. badania nad nowymi metodami otrzymywania glikozydów, funkcjonalizacji związków naturalnych o udokumentowanej aktywności biologicznej, projektowanie i otrzymywanie glikokoniuatów pochodnych związków naturalnych, inhibitorów białek odgrywających kluczową rolę w procesach proliferacji komórek nowotworowych.

ABSTRACT

Plant secondary metabolites – ubiquitous low molecular weight chemicals which are not essentials for the host existence and reproduction but serve many auxiliary functions, are frequently occurring as glycosides, for which particularly abundant examples exist in antibiotic, saponins and flavonoid categories. Cardiac glycosides (CG), originally isolated from *Digitalis* plants, also known as cardiotonic steroids, have particularly extensive record of ethnopharmacological and medicinal use. Although their application in treatment of dropsy is documented since 1875, long time has elapsed before their chemical structure were determined and mechanisms of their toxicity and cardiotonic action were recognized as inhibition of Na⁺ / K⁺ ATP-ase pump. Contemporary molecular pharmacology has revealed that cardiac glycosides are endogenous compounds in variety of animals, where they function as toxins or hormones. Besides, numerous recent studies confirmed anticancer activity of CGs at very low concentrations. These findings have been possible due to advances in ultrasensitive analytical techniques and also due to progress in organic synthesis, particularly total enantioselective syntheses of carbohydrates, which secured availability of individual CG and their analogs for medicinal chemistry studies.

Keywords: cardiac glycosides; digitoxin; digitoxose synthesis

Słowa kluczowe: glikozydy nasercowe; digitoksyna; synteza digitoksozy

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

API	- substancja aktywna leku (ang. <i>active pharmaceutical ingredient</i>)
ASP	- ATP-aza sodowo – potasowa; pompa sodowa (adenozynotryfosfataza zależna od jonów sodowych i potasowych)
ATP	- adenosynotryfosforan
CG	- glikozydy nasercowe (ang. <i>cardiac glycosides; cardio-tonic glycosides</i>)
SAR	- zależność aktywności biologicznej od struktury (ang. <i>structure-activity relationship</i>)
SERCA	- pompa wapniowa; ATP-aza retikulum sarkoplazmatycznego

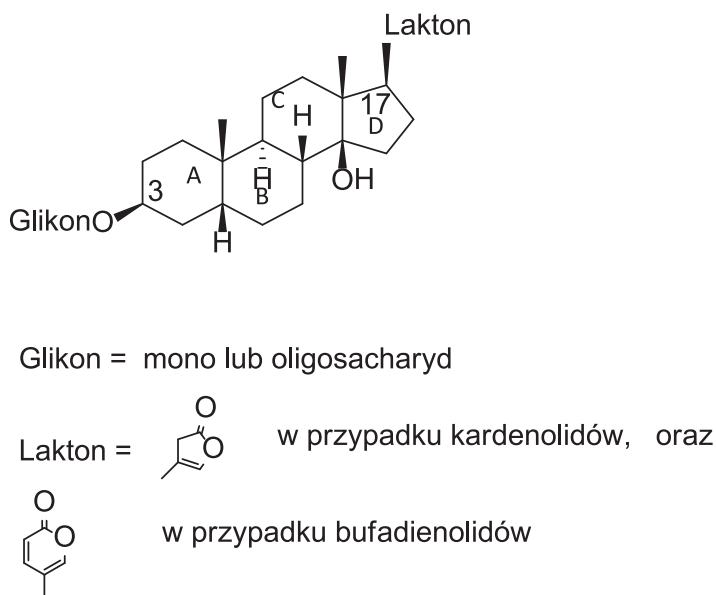
WPROWADZENIE

Określenie „leki” w odniesieniu do substancji pochodzenia naturalnego jest pojęciem niejednoznacznym, w którym treści pochodzące z tradycji etnomedycznych łączą się z wiadomościami zaczerpniętymi ze współczesnych nauk o życiu. Dość powszechna jest tendencja do ignorowania faktu, że ze względów formalnych wszelkie definicje i relacje pojęć w tym zakresie muszą uwzględniać aktualny stan prawa farmaceutycznego. Współczesne tendencje rozwoju wiedzy i techniki nie sprzyjają utrzymaniu tradycyjnego, dychotomicznego podziału na „leki naturalne” i „leki syntetyczne”. Zdecydowana większość znanych leków ma związki strukturalne z substancjami pochodzenia naturalnego, a ponadto znaczna ich część wywodzi swe struktury z inspiracji modelowymi procesami biochemicznymi. Problemy metodyczne i techniczne nieuchronnej transformacji tradycyjnych leków pochodzenia naturalnego w substancje API o rygorystycznie określonych strukturach i właściwościach wygodnie jest śledzić na przykładzie glikozydów metabolitów wtórnych, takich jak glikozydy nasercowe, gdzie odwieczny problem zależności aktywności biologicznej od struktury (SAR) w odniesieniu do natywnej cząsteczki i jej rozłącznych fragmentów: glikonu i aglikonu ciągle stanowi gorący temat w projektowaniu nowych leków.

1. KRÓTKI RYS HISTORYCZNY

Udokumentowane dzieje glikozydów nasercowych, jako leku są znacznie dłuższe niż historia nowoczesnej chemii farmaceutycznej i medycznej oparta na stosowaniu substancji spełniających określone kryteria czystości chemicznej. Dość powszechnie za wydarzenia początkujące okres rozwoju chemii związków naturalnych w zastosowaniach medycznych uznaje się datowane na 1811–7 wydzielenie morfiny z opium i odkrycie kolejnych alkaloidów [1]. Lekarz z Birmingham, William Withering, stosujący z powodzeniem wyciągi z liści naporstnicy purpurowej (Foxglove, *Digitalis purpurea* L) w stanach zagrażających życiu opuchlin i obrzęków (ang. dropsy; obecnie klasyfikowane jako konsekwencje niewydolności mięśnia sercowego) już od 1775 roku, ogłosił 10 lat później fundamentalną monografię [2], która miała radykalny wpływ na ówczesną praktykę medyczną oraz pozostała do dziś klasycznym tekstem w dziedzinie medycyny i farmacji. Chociaż liście i nasiona naporstnicy (*Digitalis purpurea* L; angielska nazwa – *foxglove*) szybko stały się jednym z podstawowych surowców farmaceutycznych, izolacja substancji aktywnych okazała się zadaniem znacznie przekraczającym ówczesne możliwości technik separacyjnych i analitycznych. W 1835 roku francuskie *Societe de Pharmacie* wyznaczyło nagrodę (500 franków) za wyodrębnienie aktywnych składników z surowca roślinnego, a w pięć lat później wyznaczoną sumę podwojono. Substancje o akceptowalnej czystości chemicznej i krystalicznym charakterze pojawiły się w laboratoriach pod koniec XIX stulecia: digitoksyna (Nativelle, 1869; Schmiedeberg 1875); ouabaina

(Arnaud, 1888); strofantyna (Fraser, 1890), a poprawne struktury i ich wzajemne korelacje poznano dopiero w latach 30. XX wieku: konwalotoksyna (Karrer, 1929); digoksyna (Smith, 1930); scilareny (Stoll, Ruzicka, Reichstein, 1930–1940) [1–5]. Gromadzoną stopniowo wiedzę o budowie CG udało się podsumować drogą korelacji chemicznych, w grupach związków naturalnych należących do kategorii steroidów i sacharydów, jeszcze przed upowszechnieniem współczesnych narzędzi badawczych, takich jak rentgenografia, inne spektralne metody badań strukturalnych i chromatograficzne metody separacji, głównie dzięki temu, że w badaniach nad CG posługiwano się intensywnie metodami immunochemicznymi. Powszechne stosowanie przeciwciał digoksyny, digitoksyny i ouabainy pozwoliło osiągnąć znaczne postępy w badaniach farmakologicznych CG mimo bardzo skromnych środków służących do identyfikacji struktury [6, 7].



Rysunek 1. Ogólny wzór strukturalny glikozydów nasercowych (CG)
Figure 1. General formula of the cardiac glycosides

W grupie naturalnych glikozydów roślinnych formalnie kwalifikujących się do kategorii saponin steroidowych, wyodrębniono ze względu na tradycyjne zastosowanie medyczne, dwie grupy różniące się charakterem podstawnika laktonowego aglikonu (niezbędnego dla aktywności kardiotonicznej) w pozycji 17 beta pierścienia D tetracyklicznego układu steroidowego: kardenolidy z pierścieniem pięcioczołowym i bufadienolidy z sześcioczołowym. Podstawnik sacharydowy (glikon) umieszczony w pozycji 3 pierścienia A może zawierać od 1 do 4 reszt monosacharydowych, spośród takich cukrów jak: D-glukoza, L-ramnoza, L-fukoza, D-digitaloza, D-digitoksoza, L-oleandroza, L-tewetoza, etc. Dalsze charakterystyczne cechy strukturalne CG, obok obecności nienasyconego pierścienia lakto-

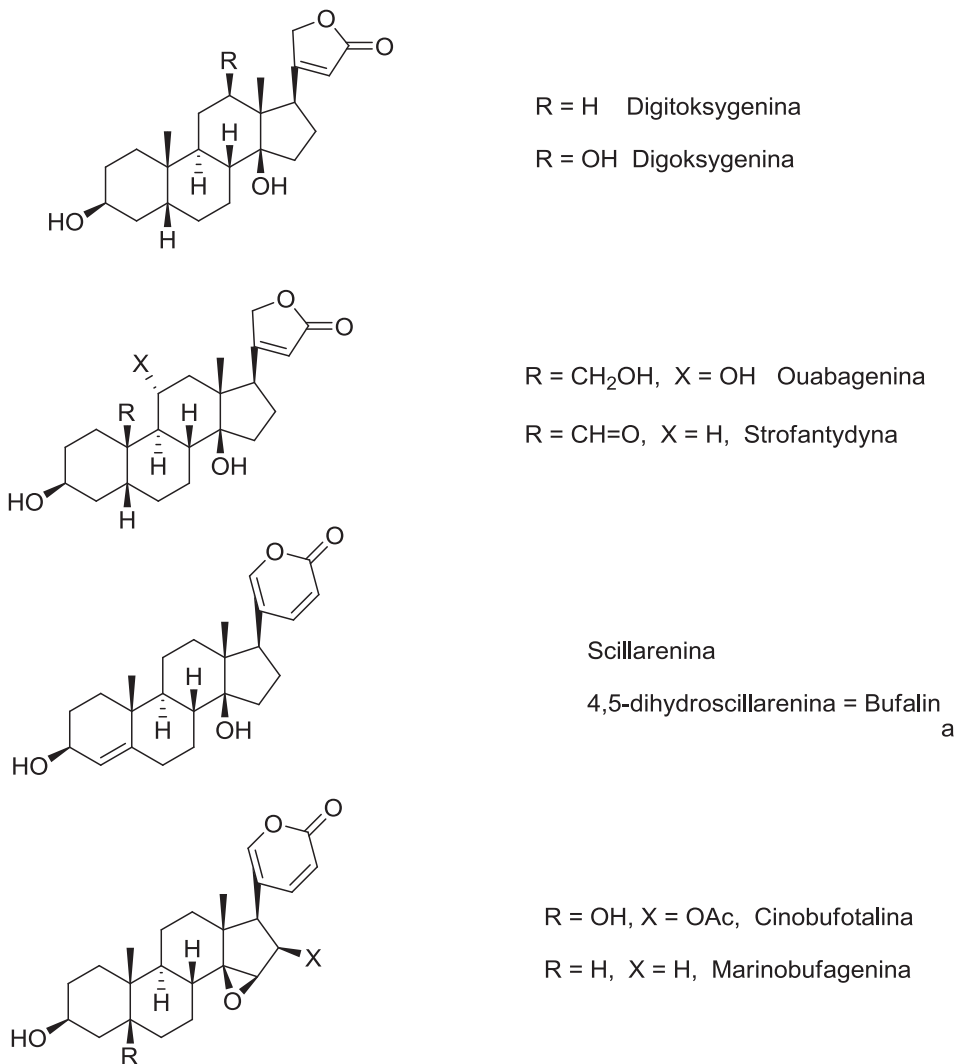
nowego, to również determinujące aktywność biologiczną – typ złącza pierścieni: A/B – *cis*; B/C – *trans* i C/D – *cis*, ($5\beta,14\beta$ -androstan) oraz *beta-* (β -) stereochemia wiązań glikozydowych [4, 5]. Związki tego typu znajdujemy oprócz naporstnicy w wielu innych roślinach, szczególnie w rodzinach *Apocyanaceae*; *Asclepiadaceae*; *Scrophulariaceae* (kardenolidy), oraz *Crassulaceae*; *Iridaceae*; *Liliaceae* i *Ranunculaceae* (bufadienolidy). Rozpoznanie ich działania inotropowego, które jest podstawą terapii różnych rodzajów niewydolności mięśnia sercowego, zawdzięczamy pracom C.-A. Nativelle i O. Schmiedebergera, którzy pracując niezależnie we Francji i Niemczech, najwcześniej dysponowali stosunkowo czystymi, krystalicznymi próbkami digitoksyny, wyizolowanej we własnych laboratoriach z liści naporstnicy [6–9]. Preparaty naporstnicy wpływają korzystnie na mechaniczne i elektryczne aspekty działania mięśnia sercowego, zwiększając jego wydolność. Wskazanie do ich stosowania stanowią: ostra i przewlekła niewydolność serca oraz migotanie przedsionków. Najczęściej stosowanym lekiem z tej grupy jest digoksyna, stosowana doustnie w postaci tabletek, w dawce dobowej od 0,250 do 0,375 mg. Niepożądaną cechą charakterystyczną CG jest jednak ich wysoka toksyczność – za granicę bezpieczeństwa uznaje się stężenie w surowicy na poziomie 2 ng/mL [8, 9].



Foto 1. Naporstnica purpurowa (*Digitalis purpurea*); Foto 2 – Naporstnica wełnista (*Digitalis lanata*)
Photo 1–2. Flowering foxglove plants – *Digitalis purpurea* (left) and *Digitalis lanata* (right)

Klasyczna farmakologia CG, oparta początkowo na obserwacji efektów ich działania na narządy i preparaty tkankowe, stopniowo wspomagana metodami pozwalającymi ocenić wiązalność i powinowactwo do hipotetycznych celów receptorowych, takie jak użycie znakowanych radioaktywnymi atomami glikozydów,

została szczegółowo opisana i podsumowana w obszernej dwutomowej monografii [6, 7]. Późniejsze badania, z przełomu XX i XXI wieku, można już określić, jako pochodzące z okresu nowoczesnej farmakologii molekularnej, posługującej się w swoich badaniach strukturalnych precyzyjnymi metodami obrazowania o wysokiej rozdzielczości, przede wszystkim wyznaczaniem parametrów makrocząsteczki wraz z jej ligandami, z rentgenowskich badań monokryształów odpowiednio przygotowanych preparatów białkowych. Potwierdzenie struktur poszczególnych ligandów z grupy CG odbywało się niejako po drodze do określania topologii miejsc wiążących białek receptorowych [10–13].



Rysunek 2. Przykładowe struktury aglikonów (genin) CG
 Figure 2. Exemplary structures of cardiac glycoside aglycons (genins)

2. POMPA SODOWA; LIGANDY I INHIBITORY

Ocenia się, że około 23% ATP jest zużywane przez organizm ludzki w stanie spoczynku przez jeden tylko enzym: Na^+ , K^+ -ATPazę (ASP; EC 3.6.1.37; popularnie określany jako pompa sodowa), integralny składnik błon komórkowych wyższych eukariotów odpowiedzialny za utrzymywanie transbłonowego gradientu jonów sodowych. Jest to białko o charakterze heterooligomeru, złożone z podjednostek, którym nadano symbole: α , β , oraz FXYD [14–16]. Fragment α stanowi jednostkę katalityczną hydrolizy ATP, której zewnątrzkomórkowe powierzchnie obszarów transbłonowych tworzą jednocześnie miejsce wiążące dla glikozydów nasercowych. Podjednostka β jest białkiem regulatorowym, również transbłonowym, zawierającym kilka miejsc glikozylacji. Poznano cztery izoformy α i trzy β występujące u ludzi i tworzące kombinacje ASP, które znacznie różnią się dystrybucją tkankową (także w różnych fazach rozwoju) oraz specyficznością substratową i aktywnością. Większość form ASP zawiera dodatkową podjednostkę transbłonową FXYD, która stanowi kolejny czynnik różnicujący na poziomie tkanek i organizmu, wnosząc do kombinatoryki molekularnej enzymu aż siedem izoform [17].

Odkrycie ATPazy zależnej od obecności i stężenia jonów sodowych i potasowych w neuronach skorupiaków w latach sześćdziesiątych przez J.C. Skou, zostało uhonorowane nagrodą Nobla w dziedzinie chemii w 1997 roku [18]. Obecnie wiadomo, że ekspresja enzymu jest szczególnie intensywna w komórkach nabłonkowych (epitelialnych) organów o szczególnie intensywnej wymianie jonowej, takich jak serce i nerki. W jednym cyklu katalitycznym, pompa ASP wymienia trzy wewnątrzkomórkowe jony sodu na dwa zewnątrzkomórkowe jony potasu, kosztem hydrolizy jednej cząsteczki ATP. Hamowanie aktywności enzymu pośrednio wpływa na zwiększenie stężenia jonów wapnia w cytosolu i jest przyczyną efektu inotropowego obserwowanego dla mięśnia sercowego w wyniku podania CG. Różnica powinowactwa miejsc aktywnych ATP-azy do jonów sodowych i potasowych jest konsekwencją dwu różnych stanów konformacyjnych enzymu, z których jeden dodatkowo ulega autofosforylacji przez hydrolizowaną cząsteczkę ATP. W jednej z konformacji miejsce wiążące enzymu jest zwrócone w stronę cytoplazmy i wykazuje powinowactwo do kationów sodowych (K_d *ca* 0,6 mM) a w drugiej jest skierowane na zewnątrz komórki a miejsce wiążące kationy wykazuje silne powinowactwo (K_d *ca* 0,2 mM) do jonów potasu [14–16]. Wydajność enzymu wynosi ok. 200 cykli na sekundę. Adenozynotrifosfataza zależna od jonów sodu i potasu (ASP) jest obecnie uznana za potencjalny cel molekularny dla różnorodnych interwencji terapeutycznych i jako taka stała się przedmiotem intensywnych badań strukturalnych. Początkowo dokładniejsze badania miejsc aktywnych enzymu prowadzono metodami autoradiografii z użyciem ligandów znakowanych izotopami radioaktywnymi, później metodą rezonansu magnetycznego, z użyciem ligandów zawierających jądra NMR-aktywne (^2H , ^{13}C , ^{19}F) [6, 14], natomiast najnowsze generacje wyników pochodzą już z nowoczesnych pomiarów rentgenowskich, które potwierdziły zasadnicze dedukcje wywiedzione wcześniej z eksperymentów biochemicznych

[18–20]. Wymagało to pokonania wielu trudności technicznych, poczynając od uzyskania izoform białka w stanie homogenym, wyindukowania i ustabilizowania pożądanej konformacji oraz uzyskania odpowiedniego do pomiaru monokryształu makrocząsteczki z odpowiednio rozmieszczonymi jonami i ligandami organicznymi. Dla ASP mamy dotychczas do dyspozycji zaledwie cztery wyniki rentgeno-strukturalne, podczas gdy dla lepiej poznanej pompy wapniowej SERCA dostępne są wyniki z ponad 20 pomiarów, różnych stanów konformacyjnych, co pozwala na znacznie bardziej precyzyjny opis działania enzymu. Ouabaina, stosunkowo trwałe chemicznie monoramnozyd kardenolidowy, była pierwszym i pozostaje najlepiej zbadanym ligandem ASP o powinowactwie na poziomie nanomolowym, także w postaci modyfikowanych chemicznie pochodnych. Klasyczna farmakologia CG postuluje zbliżone aktywności kardiotoniczne dla różnych glikozydów z tej grupy oraz uwzględnia znaczącą aktywność odpowiednich genin. Jednak dopiero dostępność poszczególnych izoform białek katalitycznych ASP umożliwiła precyzyjne pomiary w tym zakresie [20–23] i ujawniła różne profile powinowactwa i aktywności poszczególnych ligandów z grupy CG [24, 25].

3. ANTYPROLIFERACYJNY POTENCJAŁ CG I NOWE WSKAZANIA TERAPEUTYCZNE

Współczesny opis aktywności biologicznej popularnych leków nasercowych pochodzenia naturalnego (CG) musi uwzględniać również fakty nieoczekiwane z punktu widzenia podręczników farmakognozji z ubiegłego wieku. Po pierwsze, retrospektywne badania epidemiologiczne wykazały, że wśród pacjentów leczonych glikozydami naparstnicy, zgony z powodu chorób nowotworowych zdarzały się wyjątkowo rzadko [26]. Po drugie wykazano niezbitie, że organizmy ssaków wytwarzają substancje z grupy CG, które mają funkcje hormonalne [27–29]. W fizjologii człowieka taką rolę odgrywają ouabaina i marinobufagenina, uznane za endogenne steroidy kardiotoniczne, których zasadniczym miejscem wytwarzania jest kora nadnerczy. Związki te mają zdolność hamowania aktywności ASP, ale i w niższych stężeniach wpływają na liczne procesy fizjologiczne niezależnie od tej aktywności. Obecnie szczególne zainteresowanie wzbudza potencjał CG, jako związków wykazujących selektywną cytotoksyczność i hamujących proliferację, choć bezpośrednie zastosowanie leków kardiologicznych w onkologii może okazać się problematyczne ze względu na toksyczność systemową i związany z nią niski indeks terapeutyczny. Nie ulega jednak wątpliwości, że CG zasługują na uwagę, jako związki wiodące w badaniach nad nowymi terapiami, także w zastosowaniach do prewencji i terapii chorób nowotworowych [30–32]. Część badań farmakologicznych prowadzonych w tym kierunku zdołała już osiągnąć fazę weryfikacji klinicznej [33–35].

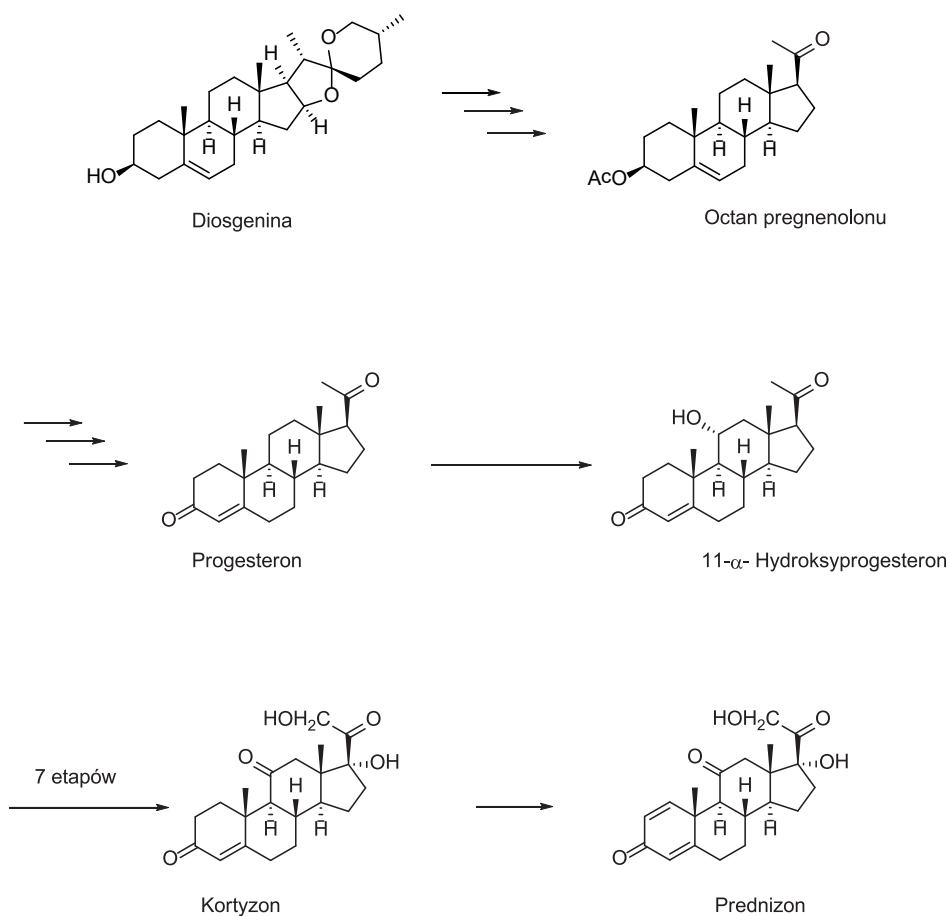
4. ŹRÓDŁA SUBSTANCJI AKTYWNYCH CG

Tradycja etnofarmakologiczna wyprzedziła zastosowanie CG w nowoczesnej medycynie o stulecia, więc źródła substancji aktywnych rozpoznawano długo i starannie. Obecnie znamy co najmniej 13 rodzin roślin zawierających glikozydy steroidowe a w samej tylko *Apocyanaceae* zidentyfikowano ponad 30 rodzajów roślin, w których stwierdzono obecność CG [36], a więc można uznać że występowanie tych metabolitów wtórnych rozciąga się na setki gatunków, spotykanych w większości rejonów globu. Stwierdzono również, że bufadienolidy występują w skórze wielu rodzajów żab z gatunku *Bufo* zamieszkujących różne kontynenty. Uznaje się, że w obu królestwach organizmów toksyny te pełnią funkcje obronne przed napastnikami a ich biosynteza jest odgałęzieniem biosyntezy steroli zapoczątkowanego cyklizacją skwalenu [37]. Obecnie, poza tradycyjnym źródłem CG, jakim jest naparstnica purpurowa, przemysłowe znaczenie dla produkcji preparatów leczniczych układu krążenia mają: cebula morska (*Scilla maritima* L), z której izoluje się scilareny i hodowlana naparstnica wełnista *Digitalis lanata* przy czym nie ustają próby pozyskiwania tych glikozydów w doświadczalnych hodowlach tkankowych oraz innymi metodami biotechnologicznymi. Podobnie jak w przypadku innych związków naturalnych, które przeszły pomyślnie weryfikację kliniczną i zostały zarejestrowane jako leki, kolejnym progiem staje się dostępność substancji aktywnej (API) w skali technicznej dyktowanej przez popyt rynkowy na preparaty ją zawierające. Chociaż potrzeby rynku leków krążeniowych na CG są dobrze znane i stabilne (światowy rynek poszczególnych leków z grupy CG-digoksyny, digitoksyny, proscylarydyny, oscyluje w ostatnich latach w zakresie pojedynczych ton), uruchomienie nowych wskazań terapeutycznych w obszarze onkologii może je zwielokrotnić. Przykłady takich nowoczesnych leków pochodzenia naturalnego jak taksol lub galantamina, których roślinne źródła były od początku ograniczone wskazują, że włączenie metod częściowej lub totalnej syntezy chemicznej w oczekiwaniu na optymalne ekonomicznie rozwiązania biotechnologiczne, staje się w pewnym momencie jedyną opcją. Historia rozwoju przemysłowej farmacji hormonów sterydowych doskonale ilustruje jak dostępność odpowiednich surowców przemysłowych determinuje rozwój całych działów medycyny. Badania prowadzone w latach 30. ubiegłego wieku w Niemczech (A. Butenandt i in.), Szwajcarii (L. Ruzicka i in.) i USA (W.M. Allen, P.S. Hench, E.C. Kendall), które zaowocowały poznaniem sterydów o czynności hormonalnej, wygenerowały potrzebę zastosowań medycznych tych niezwykle aktywnych biologicznie związków, podczas gdy ich pozyskiwanie z materiałów zwierzęcych związane było z ogromnymi problemami technicznymi. Dla przykładu, w latach 30. XX w. wyodrębnienie 10 miligramów testosteronu wymagało przeróbki 100 kg jąder byka, 15 mg androsteronu uzyskano z 15 tys. litrów moczu, do izolacji 1 mg progesteronu użyto jajniki 2 500 świń a pozyskanie 75 mg kortyzonu i 55 mg hydrokortyzonu pochłonęło nadnercza z 20 tysięcy krów [38]. Choć wiadano, że poszukiwane związki są strukturalnie spokrewnione ze stosunkowo łatwo dostępnym cholesterolem, ówczesne metody syntezy chemicznej nie rokowały szybkich

sukcesów w zastosowaniu go, jako materiału wyjściowego do syntez w skali przemysłowej. Do entuzjastów pomysłu wykorzystania saponin steroidowych a także CG jako surowców do syntezy najbardziej wówczas pożądaney substancji hormonalnej – kortyzonu, należał T. Reichstein, wówczas docent prywatny Politechniki Federalnej w Zurichu [39, 40], który nawet wytypował odpowiednie do tego celu źródło roślinne (skrętnik; *Strophantus kombe*) ale w Europie nie było dostępu do takich surowców w odpowiedniej skali. Rozwiązanie problemu niezależnych od produkcji zwierzęcej źródeł hormonów steroidowych zawdzięczamy R.E. Markerowi, który działając praktycznie bez wsparcia instytucjonalnego i bez pomocy ze strony przemysłu farmaceutycznego znalazł odpowiedni surowiec chemiczny do syntezy – diosgeninę, wskazał źródła botaniczne, z których związek ten może być pozyskiwany w skali wielotonowej, a wreszcie opracował w skali technicznej proces przemiany diosgeniny w uniwersalny półprodukt do syntezy steroidów, znany obecnie jako degradacja Markera [41, 42]. Obecnie, do szczególnie wydajnych źródeł diosgeniny, pozyskiwanej metodami tradycyjnymi, należą pataty meksykańskie (*Dioscorea mexicana*; *Dioscorea villosa*; *Dioscorea composita*) i agawa sizalowa (*Agawa sizalana*) a rośliną budzącą obecnie szczególne zainteresowanie jako obiekt eksperymentalnych procesów biotechnologicznych jest żółty imbir chiński (*Dioscorea zingiberensis*) [43]. Niezależnie od swej kluczowej roli surowcowej, diosgenina budzi poważne zainteresowanie także jako związek biologicznie aktywny, którego działania: antydrobnoustrojowe, antyoksydacyjne, przeciwzapalne i immunomodulujące, rodują zastosowania w medycynie prewencyjnej [44].

Zasadnicze etapy degradacji Markera polegają na acetolizie spiroketalu diosgeniny bezwodnikiem octowym w 200°C oraz następnie na utlenianiu utworzonego pierścienia dihydrofuranowego trójtlenkiem chromu. Otrzymany w tej sekwencji półprodukt stał się podstawą do przemysłowej syntezy kortykosteroidów, które uzyskały szerokie zastosowania medyczne, a także prekursorem syntetycznych środków antykoncepcyjnych (aktywnych przy podaniu doustnym w odróżnieniu od hormonów naturalnych), takich jak norethindrone, norgestrel, mestranol i 17 α -etynyloestradiol, które odegrały decydującą rolę w kształtowaniu współczesnej demografii i obyczajowości społeczeństw postindustrialnych [45, 46].

Potencjał diosgeniny, jako surowca przemysłowego dużej skali, jest jednak znacznie większy niżby to wynikało z powyższego schematu. W zasięgu współczesnych metod syntezy są także aglikony CG. Mimo, że istnieje klasyczna synteza totalna digitoksygeniny opracowana przez G. Storka [47] a temat ten nie przestaje być wyzwaniem dla chemików sfery akademickiej, którzy z powodzeniem demonstrują nowe rozwiązania metodyczne [48, 49] to przyszłe procesy technologiczne otrzymywania kardenolidów będą raczej wykorzystywać metody inżynierii genetycznej i biotechnologii, lub poznane już transformacje chemiczne, umożliwiające wykorzystanie zaawansowanych prekursorów wytwarzanych z łatwo dostępnej diosgeniny [38, 50, 51].

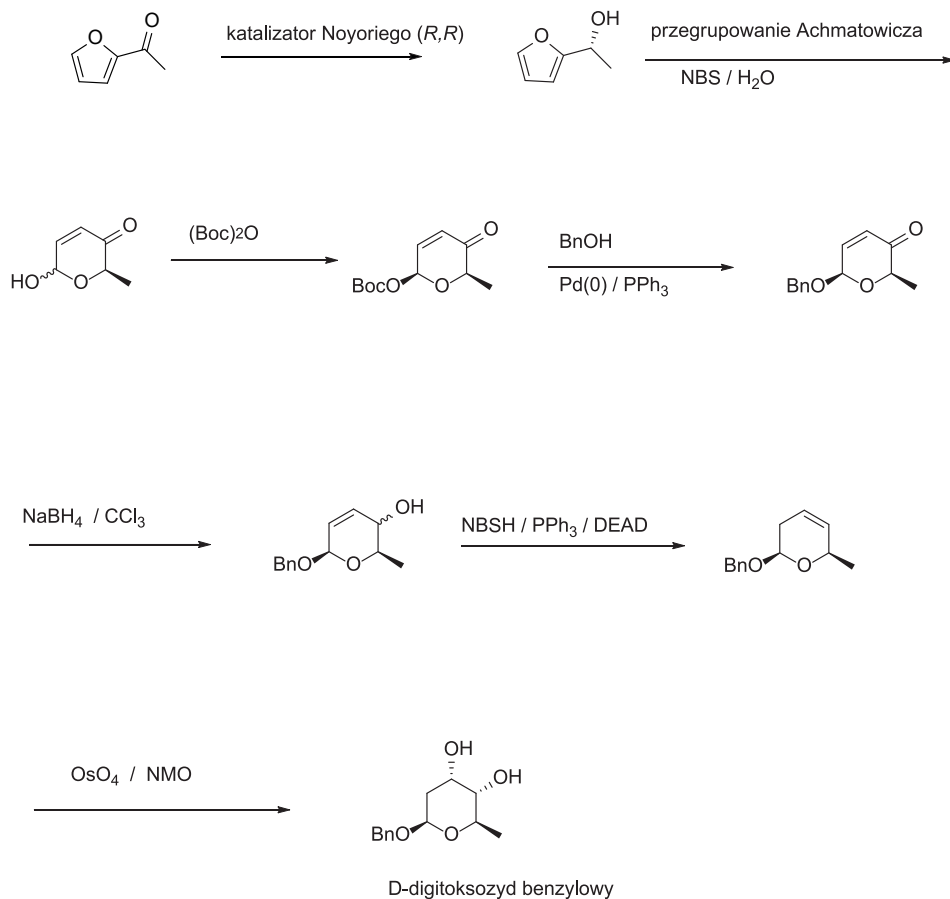


Schemat 1. Diosgenina jako źródło półsyntetycznych hormonów sterydowych

Scheme 1. Diosgenin as an industrial source of semi-synthetic steroidal hormones

Zupełnie inaczej przedstawia się sprawa ze składnikami cukrowymi CG, których dostępność dawno przestała być problemem ograniczającym techniczne zdolności wytwórcze glikozydów pochodzenia naturalnego, między innymi za sprawą postępów w enancjoselektywnej syntezie totalnej piranozydów. D-Glukoza jest jednym z najłatwiej dostępnych, odnawialnych, chiralnych syntonów wielofunkcyjnych. Podobnie L-ramnoza, choć kosztowniejsza jest łatwo dostępnym surowcem biotechnologicznym. Digitoksoza jest znacznie trudniej dostępna ze źródeł naturalnych, natomiast współczesnymi metodami totalnej, katalitycznej syntezy enancjoselektywnej można otrzymać oba jej enancjomery z prostych pochodnych furanu. Kluczowym etapem syntezy jest przegrupowanie Achmatowicza – oksydacyjna transformacja pierścienia furanowego w układ dihydropiranyowy – prekursor prostych i modyfikowanych monosacharydów. (Schemat 2) [52–55] Ilustracja przedstawia otrzymywanie prostego digitoksozydu benzylu ale warto dodać że poniższy

schemat został zrealizowany także dla mono glikozydu CG, przy użyciu digitoksygeniny zamiast alkoholu benzyłowego, w trzecim etapie zaprezentowanej sekwencji.



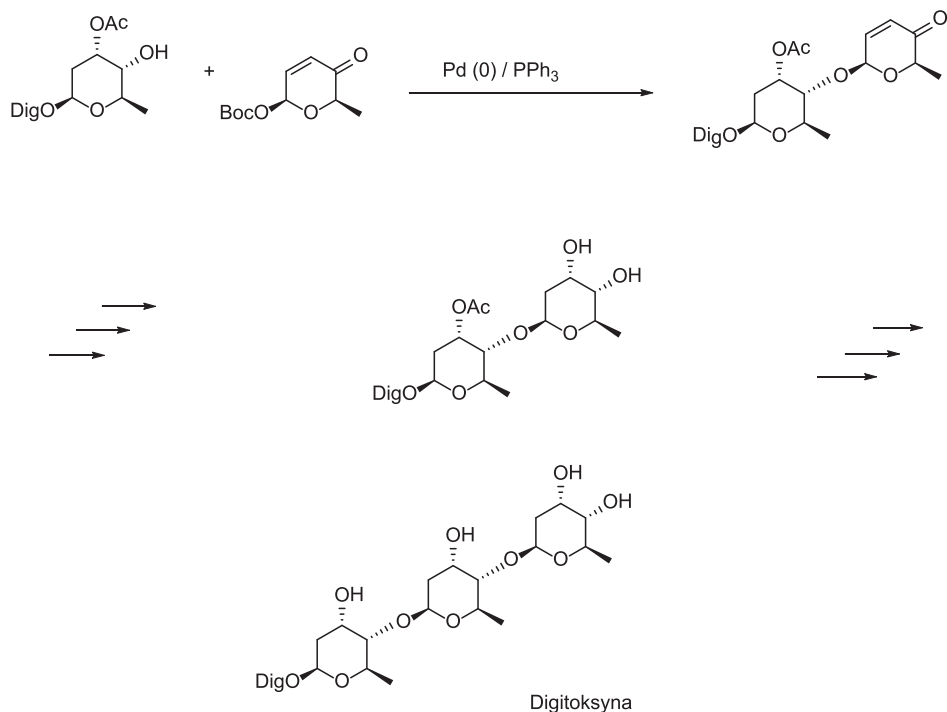
Schemat 2. Synteza glikozydów digitoksozy z acetylfuranu

Scheme 2. Synthesis of D-digitoxose glycoside from acetylfuran

5. PERSPEKTYWY RESYNTAZY I GLIKORANDOMIZACJI CG

Znany około 400 naturalnych glikozydów nasercowych, których odrębność od innych saponin roślinnych polega na charakterystycznym, laktonowym podstawniku. Mimo, że tylko niewielka część tego zbioru związków naturalnych została dotychczas szczegółowo scharakteryzowana pod względem farmakologicznym, zachodzi uzasadnione przypuszczenie, że zarówno dla wskazań kardiologicznych, jak i dla nowych zastosowań terapeutycznych, na przykład w onkologii, konieczne będą liczne modyfikacje budowy i funkcji struktur kanonicznych, w dążeniu do optymalizacji działań farmakodynamicznych a zwłaszcza właściwości farmakokinetycznych,

zgodnie z założeniami chemii i bioinformatyki medycznej. Podobnie jak w innych grupach metabolitów wtórnych o charakterze glikozydowym, takich jak antybiotyki, polifenole, flawonoidy czy lignany, pierwszy etap eksploracyjnych modyfikacji CG metodami chemicznymi powinien mieć charakter przemiany sekwencyjnej deglikozylacji – reglikozylacji, której celem jest zmiana właściwości fizykochemicznych i biologicznych natywnego metabolitu przez wymianę glikonu na jednostkę o zaplanowanych cechach. W odróżnieniu od glikozylacji biologicznych, które stanowią powszechną i podstawową funkcję biochemii komórki, realizowaną przez setki wyspecjalizowanych enzymów (np. glikozylotransferaz), realizacja koniugacji chemicznej cukrów z wielofunkcyjnymi akceptorami przy pomocy metod laboratoryjnych, mimo wielu dziesiątek lat doskonalenia metod aktywacji grupy anomerycznej, oraz regio i stereoselektywności jej sprzęgania, pozostaje w licznych przypadkach procesem o problematycznej skuteczności [56]. Na przykład w klasycznej chemii cukrów, dramatyczny przypadek trudności w kontrolowaniu stereoselektywności reakcji glikozydowania stanowiło użycie syntonów 2-deoksypiranozylowych, takich jak reszty digitoksozy, które są pozbawione elementów strukturalnych pełnych heksosów (np. podstawników estrowych w poz. 2 piranozy), które stabilizują określoną topologię stanu przejściowego reakcji glikozydowania [57, 58]. Ilustracją tego stanu rzeczy jest historia syntez digitoksyny, zapoczątkowana przez K. Wiesnera w latach 60. ubiegłego wieku. Oba podejścia: osobne przygotowanie syntonu trisacharydowego i kolejne glikozydowania odczynnikami monosacharydowym, przeprowadzane przy użyciu klasycznej procedury Koenigsa-Knorra były żmudne ze względu na konieczność zabezpieczeń, nieselektywne względem centrum anomerycznego i niewydajne [59]. Nowoczesne podejście do tego samego celu syntetycznego wykorzystuje z powodzeniem reagenty pochodzące z totalnej syntezy, zaprezentowane na poprzednim schemacie. Monodigitoksozyd digitoksygeniny, selektywnie zabezpieczony w pozycji C-3, poddaje się katalitycznej glikozylacji anomerycznym węglanem heks-2-en-4-ulozy, która w sekwencji znanych transformacji zostaje przekształcona w kolejną jednostkę D-digitoksozy. Kluczowe etapy otrzymywania docelowego trisacharydu digitoksygeniny, według O'Dohertego [60] przedstawiono poniżej. Jest oczywiste, że podejście to umożliwia także radykalne modyfikacje strukturalne glikonu, łącznie z krotnością reszt składających się na łańcuch oligosacharydowy.



Schemat 3. Synteza digitoksyny (Dig oznacza digitoksygeninę)

Scheme 3. Synthesis of digitoxin (Dig stands for digitoxigenin)

Rozwój beta-selektywnych metod glikozylacji w serii 2-deoksy piranoz, tak istotny dla chemii glikozyłowanych związków naturalnych, zasługuje na specjalną uwagę gdyż ilustruje zarówno szeroki rozwój chemii nienasyconych cukrów [61] jak i ogromne postępy katalizy związkami metali przejściowych [62]. Dobrze znana transformacja glikali do heks-2-enozydów, zwana przegrupowaniem Ferriera [63 R] jest na ogół alfa-selektywną glikozylacją ale już wymiana ligandów anomerycznych katalizowana kompleksami palladu ma najczęściej charakter beta-preferencyjny, co szczególnie przekonująco zademonstrowano na estrach anomerycznych heks-2-en-4-uloz. Także katalizowane palladem reakcje dekarboksylacji 4-O-węglanów przebiegające z migracją 4 ----> 1 reszty alkoksylowej, stanowią przykład wysoce stereo selektywnej glikozydacji beta [64].

Ciekawą formą przewycięzenia tradycyjnych trudności technicznych związanych z chemiczną glikozylacją jest metoda glikorandomizacji zaproponowana przez Thorsena. Pomysł polega na uzyskaniu pochodnych wybranych aglikonów, które zawierają w swej strukturze ugrupowanie alkoksyaminowe. Takie związki są zdolne do reakcji w łagodnych warunkach z hemiacetalami, włączając w to niezabezpieczone cukry redukujące, co stanowi prostą drogę do zróżnicowanych strukturalnie zbiorów pochodnych *N*-glikozyłowych, nadających się do bezpośredniego testowania aktywności biologicznej [65, 66]. Innym sposobem łączenia aglikonów

i glikonów CG, zapewniającym kombinatoryczne możliwości tworzenia bibliotek nowych związków jest popularna metoda ligacji chemicznej przez dipolarną cykloaddycję syntonów: acetylenowego i azydkowego, znana pod opisowym określeniem „click chemistry” [67]. Należy też przypomnieć, że aglikony CG od dawna znajdowały zastosowanie w inżynierii genetycznej do znakowania wybranych fragmentów kwasów nukleinowych, które mogą być po wykonaniu zamierzonych transformacji rozpoznane przez specyficzne przeciwciała, które w przypadku digoksygeniny i digitoksygeniny są dosyć łatwo dostępne [6].

UWAGI KOŃCOWE

Ewolucja wyposażyła szereg roślin, i niektóre gatunki płazów, w zdolność biosyntezy ochronnych metabolitów wtórnych z grupy steroidów – silnych toksyn o charakterystycznych cechach strukturalnych (CG), kompatybilnych z biosyntezą endogennych steroli i ich pochodnych saponinowych [5, 9]. Niezależnie od allelopatycznych relacji międzygatunkowych i środowiskowych (pomiędzy roślinami wytwarzającymi CG i roślinożercami), związki te odgrywają szczególną rolę w medycynie jako inhibitory aktywności powszechnie obecnego w komórkach enzymu transbłonowego – pompy sodowej, co ma zastosowanie w leczeniu niewydolności serca i innych niedomaganiach układu krążenia. Leki pochodzące od glikozydów naparstnicy, mające ponad 200-letnią tradycję zastosowań medycznych, są obecnie przedmiotem podwójnej transformacji: rozpoznano ich funkcje hormonalne i regulacyjne, co uzasadnia traktowanie ich jako związki wiodące dla nowych leków w innych obszarach terapeutycznych, szczególnie w onkologii. Taka zmiana wskazań terapeutycznych dla znanych leków (drug repositioning) jest jedną z wiodących strategii współczesnego przemysłu farmaceutycznego [68], co sygnalizuje nowe otwarcia w dziedzinie surowców dla tej grupy związków. Źródła naturalne CG są dość liczne, lecz mało wydajne a perspektywy pozyskiwania konkretnych kardenolidów lub bufadienolidów metodami biotechnologicznymi wydają się ciągle dość odległe. Natomiast współczesne metody syntezy chemicznej oferują liczne możliwości selektywnego pozyskiwania zarówno wybranych metabolitów z tej grupy jak i syntezy ich mimetyków zaprojektowanych de novo z wykorzystaniem uprzednio zgromadzonej wiedzy biochemoinformatycznej.

PODZIĘKOWANIE

Niniejszy artykuł przygotowano w znacznej części z wykorzystaniem środków pochodzących z Funduszu Działalności Statutowej Instytutu Farmaceutycznego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] W. Sneader, *Drug discovery. A history*, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 2005.
- [2] J.K. Aronson, *An account of the Foxglove and its medical uses 1785–1985*, Oxford Press, Oxford 1986 (książka ta zawiera reprint oryginalnego dzieła Williama Witheringa “An Account of the Foxglove and Some of its Medical Uses” z 1785 roku)
- [3] R.P. Walton, *The cardiac glycosides*, [w:] *Pharmacology in medicine*, V.A. Drill (Red.), McGraw-Hill Book Co., New York 1958.
- [4] H.-P. Albrecht, *Mittel bei Herzinsuffizienz: Herzglycoside*, [w:] *Ullmanns Encyclopadie der technischen Chemie*, Tom 12, Verlag Chemie, Weinheim 1976, str. 617.
- [5] D. Deepak, S. Srivastava, N.K. Kahare, A. Kahare, *Progr. Chem. Org. Nat. Prod.*, 1996, **69**, 71.
- [6] *Cardiac Glycosides: Part I: Experimental Pharmacology*, K. Greeff (Red.), Springer-Verlag, Berlin 1981.
- [7] *Cardiac Glycosides: Part II: Pharmacokinetics and Clinical Pharmacology*, K. Greeff (Red.), Springer-Verlag, Berlin 1981.
- [8] T. Akera, T.M. Brody, *The pharmacology of the cardiac glycosides*, [w:] *Physiology and pathophysiology of the heart*, N. Sperlakis (Red.), 2nd Ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht 1989.
- [9] P.J. Hauptman, R.A. Kelly, *Circulation*, 1999, **99**, 1265.
- [10] A. Messerschmidt, *Cryst. Struct. Commun.*, 1980, **9**, 1185.
- [11] K. Go, G. Kartha, J.P. Chen, *Acta Cryst. B*, 1980, **36**, 1811.
- [12] K. Go, G. Kartha, *Cryst. Struct. Commun.*, 1981, **10**, 1329.
- [13] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D*, 2010, **66**, 125.
- [14] *The sodium pump: structure, mechanism, hormonal control and the role in disease*, E. Bamberg, W. Schoner (Red.), Springer, New York 1994.
- [15] J.C. Skou, M. Esmann, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1992, **24**, 249.
- [16] M. Laursen, J.L. Gregersen, L. Yatime, P. Nissen, N.U. Fedosova, *PNAS*, 2015, **112**, 1755.
- [17] L. Yaime, M. Laursen, J. Preben Morth, M. Esmann, P. Nissen, N.U. Fedosova, *J. Struct. Biol.*, 2011, **174**, 296.
- [18] J.C. Skou, *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, **23**, 394.
- [19] H. Ogawa, T. Shinoda, F. Cornelius, C. Toyoshima, *PNAS (Proc Natl. Acad Sci. USA)*, 2009, **106**, 13742.
- [20] A. Katz, Y. Lifshitz, E. Bab-Dinitz, E. Kapri-Pardes, R. Goldshleger, D.M. Tal, S.D.J. Karlsh, *J. Biol. Chem.*, 2010, **285**, 19582.
- [21] C. Hauck, T. Potter, M. Bartz, T. Wittwer, T. Wahlers, U. Mehlhorn, G. Scheiner-Bobis, A.A. McDonough, W. Bloch, R.H.G. Schwinger, J. Müller-Ehmsen, *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, **662**, 7.
- [22] W. Schoner, G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2007, **7**, 173.
- [23] C. Toyoshima, R. Kanai, F. Cornelius, *Structure*, 2011, **19**, 1732.
- [24] K. Geering, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2008, **17**, 526.
- [25] W. Schoner, *Eur. J. Bioch.*, 2002, **269**, 2440.
- [26] B. Stenkvist, *Anti-Cancer Drugs*, 2001, **12**, 635.
- [27] W. Schoner, G. Scheiner-Bobis, *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2007, **7**, 173.
- [28] M. Nesher, U. Shpolansky, H. Rosen, D. Lichstein, *Life Sci.*, 2007, **80**, 2093.
- [29] A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, *Nature Rev. Nephrol.*, 2008, **4**, 378.
- [30] T. Mijatovic, E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, R. Kiss, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1776**, 32.
- [31] H.-Y.L. Wang, G.A. O’Doherty, *Expert Opinion Therap. Patents*, 2012, **22**, 587.
- [32] K. Bielawski, K. Winnicka, A. Bielawska, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, **29**, 1493.
- [33] M. López-Lázaro, *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2007, **11**, 1043.

- [34] H.A. Elbaz, T.A. Stueckle, W. Tse, Y. Rojanasakul, C. Dinu, *Experimental Hematology and Oncology*, 2012, **1**, 4.
- [35] M. Slingerland, C. Cerella, H.J. Guchelaar, M. Diederich, H. Gelderblom, *Investigational New Drugs*, 2013, **31**, 1087.
- [36] A.A. Agrawal, G. Petschenka, R.A. Bingham, M.G. Weber, S. Rasmann, *New Phytologist*, 2012, **194**, 28.
- [37] P.M. Dewick, *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*, J. Wiley & Sons Ltd., Chichester 2002.
- [38] Al. Jaseem, M. Khan, A. Taha, T. Tiemann, *Medit. J. Chem.*, 2014, **3**, 796.
- [39] S. Sterkowicz, *T. Reichstein, życie i działalność naukowa*, Włocławskie Towarzystwo Naukowe, Włocławek 1995.
- [40] G. Gryniewicz, B.A. Wolucka, *Przemysł Chem.*, 2009, **88**, 826.
- [41] R.E. Marker, E. Rohrmann, *JACS*, 1939, **61**, 3592.
- [42] R.E. Marker, D.L. Turner, Ulshafer, *JACS*, 1940, **62**, 2542.
- [43] Y.L. Zhu, W. Huang, J.R. Ni, H. Li, *Appl. Microbiol. Technol.*, 2010, **85**, 1409.
- [44] K. Patel, M. Gadewar, V. Tahilyani, D.K. Patel, *Nat. Prod. Bioprospect.*, 2012, **2**, 46.
- [45] C. Djerassi, *Steroids*, 1992, **57**, 631.
- [46] B. Asbell, *The pill: a biography of the drug that changed the World*, Random House, New York 1995.
- [47] G. Stork, F. West, Y.H. Lee, R.C.A. Isaacs, S. Manabe, *JACS*, 1996, **118**, 10660.
- [48] K. Mukai, D. Urabe, S. Kasuya, N. Aoki, M. Inoue, *Angew Chem. Int. Ed.*, 2013, **52**, 5300.
- [49] K. Mukai, S. Kasuya, Y. Nakagawa, D. Urabe, M. Inoue, *Chem Sci.*, 2015, **6**, 3383.
- [50] B. Harjo, C. Wibowo, N.M. Ng, *Chem Eng Res & Design*, 2004, **82**, 1010.
- [51] B. Heasley, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 3092.
- [52] O. Achmatowicz, P. Bukowski, B. Szechner, Z. Zwierzchowska, A. Zamojski, *Tetrahedron*, 1971, **27**, 1973.
- [53] A.Z. Aljahdali, P. Shi, Y. Zhong, G.A. O'Doherty, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 2013, **69**, 55.
- [54] A.M. Gomez, F. Lobo, S. Miranda, J. Cristobal Lopez, *Molecules*, 2015, **20**, 8357.
- [55] A. Borovika, P. Nagorny, *J. Carbohydr. Chem.*, 2012, **31**, 255.
- [56] V. Dembitsky, *Chem & Biodivers.*, 2004, **1**, 673.
- [57] C.H. Marzabadi, R.W. Frank, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 8385.
- [57] D. Hou, T.L. Lowary, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1911.
- [58] *The organic chemistry of sugars*, D.E. Levy, P. Fugedi (Red.), CRC Taylor & Francis, Boca Raton 2006.
- [59] K. Wiesner, T.Y.R. Tsai, H. Jin., *Helv. Chim. Acta*, 1985, **68**, 300.
- [60] M. Zhou, G.A. O'Doherty, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 2485.
- [61] W. Priebe, I. Fokt, G. Gryniewicz, [w:] *Glycoscience, Chemistry and Chemical Biology*, B.O. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem (Red.), Springer Verlag, Berlin 2008.
- [62] M.J. McKay, H.M. Nguyen, *ACS Catalysis*, 2012, **2**, 1563.
- [63] R.J. Ferrier, O.A. Zubkov, *Org React.*, 2003, **62**, 569.
- [64] S. Xiang, Z. Lu, J. He, K.L. MaiHoang, J. Zeng, X.-W. Liu, *Chem. Eur J.*, 2013, **19**, 14047.
- [65] J.M. Langenhan, N.R. Peters, I.A. Guzei, F.M. Hoffmann, J.S. Thorson, *PNAS* 2005, **102**, 12305.
- [66] J.M. Langenhan, J.S. Thorson, *Curr. Org. Synth.*, 2005, **2**, 59.
- [67] *Click chemistry in glycoscience: new developments and strategies*, Z.J. Witzczak, R. Bielski (Red.), J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ 2013.
- [68] J.S. Shim, J.O. Liu, *Int. J. Biol. Sci.*, 2014, **10**, 654.

**SELEN W PERSPEKTYWIE FORTYFIKACJI ROŚLIN
O ZNACZENIU GOSPODARCZYM DLA POLSKI**

**PERSPECTIVE OF SELENIUM FORTIFICATIONS
OF PLANTS WITH ECONOMIC IMPORTANCE
TO POLAND**

Aleksander Darecki, Agnieszka Saeid*, Henryk Górecki

Politechnika Wroclawska

Wydział Chemiczny, Zakład Zaawansowanych Technologii Materiałowych

ul. Smoluchowskiego 25, 50-372 Wrocław

**e-mail: agnieszka.saeid@pwr.wroc.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Znaczenie biologiczne selenu
2. Rosnący niedobór selenu w Polsce
3. Fortyfikacja agrotechniczna jako sposób uzupełniania niedoboru selenu w diecie zwierząt i człowieka
4. Strategie fortyfikacji agrotechnicznej roślin w selen

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Mgr inż. Aleksander Darecki urodzony w 1987 roku, absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na kierunku Biotechnologia. Dyplom mgr inż. uzyskał w 2011. W tym samym roku rozpoczął studia doktoranckie w Instytucie Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej.

Dr inż. Agnieszka Saeid urodzona w 1981 roku, absolwentka Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej na kierunku Biotechnologia. Dyplom mgr inż. uzyskała w roku 2006. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Instytucie Technologii Nieorganicznej i Nawozów Mineralnych na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej. Dyplom doktora nauk technicznych w dyscyplinie technologia chemiczna uzyskała w 2010 roku i w tym samym roku została zatrudniona na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej na stanowisku asystenta a od 2012 roku na stanowisku adiunkta.

Prof. dr hab. inż. Henryk Górecki urodził się w 1946 roku. Absolwent Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej. Dyplom mgr inż. uzyskał w roku 1970. Z Politechniką Wrocławską związany jest od ponad 40 lat, osiągając na tej uczelni kolejne szczeble kariery akademickiej. Opracował i wdrożył wiele nowych technologii i produktów w przemyśle nawozowym, nieorganicznym, chemii gospodarczej oraz w rolnictwie. Prof. Henryk Górecki jest autorem bądź współautorem ponad 250 prac naukowych, współtwórcą 52 patentów krajowych i 20 zagranicznych, ponad 200 opracowań dla przemysłu, w tym wielu projektów procesowych.

ABSTRACT

Selenium is an essential element for animals and human. Thus, its growing deficiency, observed since many years in many European countries leads to consider available strategies of rising selenium level in diet of local inhabitant and farm animals that may ensure safety and commonness of such solution. Agronomic fortification, as one of the way, has been successfully proven in other countries with similar problem like Finland, United Kingdom, Australia or New Zealand. While most of the food and feed consumed in Poland came from internal market, the implementation of this strategy in Poland may have beneficial effects on health of farm animals and local inhabitants. The most suitable plants for agronomic biofortification with selenium in Poland are crops, especially cereals and selected members of mustard plants. They have a great share in agriculture land in this country and what results from their metabolism, can assure biologically active, i.e. desired by final consumers, selenium compounds. Based on the current knowledge and experiences in biofortification of crops with selenium, a novel technology that increase selenium content in edible parts of plants of interest should be developed and implemented in Poland.

Keywords: selenium, agronomic biofortification, food, microelement deficiency

Słowa kluczowe: selen, biofortyfikacja agronomiczna, żywność, niedobór mikroelementów

WPROWADZENIE

Obserwowany od wielu lat niedobór selenu w diecie mieszkańców wielu krajów Europy jest wypadkową zmian zachodzących w środowisku naturalnym, w szczególności zmniejszenia jego emisji ze źródeł antropogenicznych oraz wyczerpywania glebowych zasobów tego pierwiastka w sposób naturalny. W tym samym czasie, mimo znaczącej roli tego mikroelementu dla prawidłowego rozwoju człowieka oraz organizmów zwierzęcych, nie podejmuje się prób związanych z rozwiązaniem tego problemu w skali kraju (np. poprzez regulowane prawnie zwiększenie zawartości tego pierwiastka w nawozach). Wynika to przede wszystkim z niewystarczającej wiedzy na ten temat wśród samych rolników i hodowców zwierząt gospodarskich, skomplikowanej biogeochemii selenu, ryzyka jakie niesie nadmiar tego pierwiastka w diecie zwierząt oraz człowieka oraz dodatkowych kosztów, ekonomicznych i środowiskowych które wiążą się z jego sztucznym wprowadzeniem do ekosystemu. Doświadczenia innych krajów w tym zakresie, między innymi Finlandii, Wielkiej Brytanii i Nowej Zelandii wykazały, że na skutek prostych zabiegów agrotechnicznych, tj. zastosowania nawozów mineralnych wzbogaconych w sole selenu znacząco zwiększono jego zawartość w roślinach uprawnych, jak również w diecie zwierząt oraz człowieka. Tym samym, zastosowanie selenu w rolnictwie, tj. biofortyfikacji roślin uprawnych w selen, wymaga kompleksowych badań bilansowych nad obiegiem tego pierwiastka w układzie gleba–rośliny uprawne–zwierzęta hodowlane–człowiek oraz odpowiedniego sposobu wprowadzania do niego selenu, gwarantującego jego efektywne wykorzystanie oraz bezpieczeństwo dla środowiska. Korzyści, jakie niesie takie podejście rzutują na status selenu w diecie zwierząt oraz człowieka w sposób zapewniający jego powszechność oraz ogólnodostępność nawet przy mało zróżnicowanej diecie. Jest to zarazem działanie wpisujące się w globalną walkę z „ukrytym głodem”, tj. niedoborem witamin czy składników mineralnych, które nie wywołują wyraźnych objawów, a które negatywnie wpływają na stan zdrowotny organizmu człowieka. Ponadto, zapewniona jest tym samym dodatkowa funkcjonalność żywności pochodzenia roślinnego, co w przypadku zwiększenia świadomości konsumenckiej będzie czynić takie produkty bardziej pożądanymi na rynku w przyszłości.

1. ZNACZENIE BIOLOGICZNE SELENU

Selen jest pierwiastkiem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmów zwierzęcych (kręgowce), w tym również człowieka [1, 2]. Selen wchodzi w skład miejsc aktywnych wielu ważnych enzymów [3], między innymi – peroksydaz glutationowych (GPxs), które odpowiadają za neutralizację reaktywnych form tlenu (np. nadtlenków lipidowych i innych nadtelnków), dejodaz jodotyroninowych (ID) odpowiedzialnych za utrzymanie w organizmie odpowiedniego poziomu hormonów tarczycy tyroksyny T4 oraz trijodotyroniny T3 oraz reduktaz tioredoksy-

nowych (TRs), enzymów uczestniczących między innymi w redukcji nukleotydów, które ponadto z tioredoksyną (układ TR-Trx) są zaangażowane w takie procesy komórkowe jak wzrost czy regeneracja białek uszkodzonych na skutek działania czynników utleniających i redukujących [4–6]. Selen bierze również udział w regulacji syntezy hemu i cytochromów mitochondrialnych [7, 8] oraz pełni ważne role w stymulacji układu odpornościowego [4, 9] i detoksykacji (tj. zniesienia toksycznego działania innego pierwiastka) metali ciężkich w organizmie (Hg, As, Cd, Pb, Tl) [10, 11]. Badania wykazały również, że prawidłowy status selenu w organizmie człowieka zmniejsza ryzyko występowania u ludzi chorób serca, białaczki oraz pozostałych chorób nowotworowych [4, 12, 13], w tym także nowotworów płuc, piersi, jajników i prostaty. Ponadto, długotrwały niedobór selenu w diecie charakteryzuje powiększenie i niewydolność serca, zwiększone ryzyko zachorowania na choroby serca i wątroby, objawy wola i niedoczynność tarczycy, pokarmową dystrofię mięśni, u kobiet w ciąży może powodować nieodwracalne zmiany płodu, w przypadku mężczyzn zmniejszona jest ruchliwość plemników [4, 14, 15]. W przypadku zwierząt niedobór tego pierwiastka przekłada się bezpośrednio na obniżoną produktywność i zdrowotność hodowli, jeśli nie jest rekompensowane zróżnicowaną dietą (zawierającą między innymi wit. E) [16]. Dotychczas poznane funkcje selenu w organizmach zwierzęcych, wiążą się przede wszystkim ze specyficznym lub niespecyficznym wbudowywaniem selenowych analogów aminokwasowych w strukturę białek [3, 16]. Okazuje się także, że wiele chorób wieku starczego u ludzi może być spowodowanych następstwami niedoboru tego pierwiastka [17–19].

Podobnie tłumaczy się negatywny wpływ występujący w przypadku długotrwałego nadmiaru selenu (zatrucie) na organizmy zwierzęce, który charakteryzuje różne nasilenie objawów określanych mianem selenozy [4, 14, 16, 20]. Charakterystyczne objawy selenozy obejmują łysienie, zmęczenie i mdłości, ślinotok, charakterystyczny „czosnkowy oddech”, atrofię mięśnia sercowego, ślepotę, próchnicę zębów, zeszywnienie kończyn oraz ból stawów czy też uszkodzenie wytworów naskórka (rogi, kopyta, pazury, paznokcie).

2. ROSNĄCY NIEDOBÓR SELENU W POLSCE

Na wstępie należy zaznaczyć, że problem niedoboru selenu rozpoznany i analizowany jest na świecie zaledwie od początku lat 50. ubiegłego stulecia, kiedy to poznano ogromne znaczenie selenu w organizmach zwierzęcych [21], jak również należy mieć na uwadze pełen bilans selenu w układzie gleba–roślina uprawne–zwierzęta gospodarskie–człowiek, który jest wypadkową zmian między innymi wielkości ładunków antropogenicznych, stosowanego asortymentu nawozowego, sytuacji rynkowej (różnorodności produktów dostępnych w sprzedaży), sposobów żywienia zwierząt i nawyków żywieniowych mieszkańców danego obszaru. Przy czym to właśnie, w normalnych warunkach, tj. z wykluczeniem obszarów skażonych selenem, pożywienie stanowi przeważające źródło (>98%) selenu u ludzi i zwierząt,

pozostałe czynniki narażenia na ten pierwiastek (np. pyły, powietrze, woda pitna) są znikome [11].

Jeszcze do niedawna (do późnych lat 90. XX w.), główne i znaczące źródła emisji selenu w Polsce, w postaci depozycji glebowych (m.in. pyły, kwaśne deszcze), obejmowały emisje z zakładów hutnictwa metali nieżelaznych, emisję ze spalania węgla w gospodarstwach domowych i zakładach przemysłowych, emisję z przemysłu koksowniczego oraz przeróbki ropy naftowej [22]. Na skutek przemian okresu transformacji ustrojowej i wdrożenia polityki środowiskowej w kraju (przede wszystkim spełnienie wymogów członkostwa Polski w Unii Europejskiej), obserwuje się spadek zużycia kopalni a kominy zaopatruje się w specjalne filtry i/lub katalizatory. Równoczesny szybki rozwój i intensyfikacja rolnictwa w Polsce powodują tym samym znaczący ubytek selenu z gleb. Zgodnie z danymi GUS, w 2012 r. całkowita emisja SO_2 w Polsce (503,4 tys. ton) była o ponad 86% mniejsza w porównaniu do danych z roku 1989 (3805 tys. ton) [23]. Szacowana globalna emisja selenu z tytułu działalności człowieka w latach 90. ubiegłego wieku wynosiła 4600 t/rocznie, podczas gdy emisja ze źródeł naturalnych wynosiła 9300 t/rok, przy czym to właśnie emisje ze spalania węgla i paliw kopalnych stanowiły podstawowe źródło emisji sztucznych tego pierwiastka [11]. Równoczesne zmniejszenie depozycji glebowej (kwaśne deszcze) związków siarki oraz selenu, jak również stosowanie prostych nawozów mineralnych (w szczególności superfosfatów potrójnych), o małej zawartości selenu tj. $\leq 4 \text{ mg Se kg}^{-1}$) w porównaniu chociażby do stosowanych wcześniej fosfatów pojedynczych ($\leq 55 \text{ mg Se kg}^{-1}$) [24], spowodowało że obecnie na wielu obszarach w kraju (z wykluczeniem obszarów przemysłowych, np. okolice Legnicy – działalność KGHM Polska Miedź S.A.), gleby wykazują stan w którym zawartość całkowita selenu w glebie nie przekracza $0,5 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m. co klasyfikuje je jako deficytowe w ten pierwiastek [22]. Najwyższe poziomy selenu ($2,3\text{--}4,2 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m.) występują w glebach w województwach: zachodniopomorskim, świętokrzyskim i śląskim, najniższe zaś ($0,06\text{--}0,4 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m.) w regionie województw: kujawsko-pomorskiego, lubelskiego, dolnośląskiego, warmińsko-mazurskiego oraz podlaskiego [25, 26]. Zawartość selenu w glebach na świecie zmienia się od $0,01$ do $2,0 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m., najczęstszy zakres to od $0,2$ do $0,4 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m. [22], przy czym w Polsce średnia zawartość selenu w glebach wynosi $0,27 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m. i jest mniejsza od średniej światowej wynoszącej $0,33 \text{ mg Se kg}^{-1}$ s.m. [2, 22].

Znaczącym źródłem emisji selenu w globalnym obiegu tego pierwiastka są także procesy wietrzenia skał oraz działalność człowieka na podłoże geologiczne, np. odwierty w skałach, zwłaszcza tych formowanych w okresie kredy i jury, jak również skał o znamionach aktywności wulkanicznej i zawierających kopaliny [16, 22].

Deficyt selenu w kraju, objawia się również w postaci obniżonej jego zawartości u zwierząt żywiących się w tych rejonach Polski, na którym stwierdza się niską zawartość selenu w glebie [27]. Na początku lat 90. XX w., w południowo-wschodnich regionach Polski odnotowano pierwsze oznaki dystrofii mięśniowej oraz zaburzenia w reprodukcji u koni, owiec i bydła [28], które mogły świadczyć o niedoborze tego pierwiastka. Przy czym faktem jest, że zawartość selenu w produktach spożyw-

czych pochodzenia roślinnego odzwierciedla zazwyczaj jego zawartość w glebie z rejonów, z których te rośliny pochodzą [2, 11, 16].

Potwierdzeniem tego stanu są również wyniki badań określających zawartość tego pierwiastka w próbkach biologicznych (osocze krwi, mocz) mieszkańców Polski przeprowadzane od lat 80. ubiegłego wieku, które powtarzane są średnio co 10 lat [29]. Na podstawie otrzymanych wyników, w latach 1981–1999 odnotowano znaczący, blisko dwukrotny spadek stężenia Se w surowicy krwi (wskaźnik pozwalający określić krótkoterminowe spożycie tego pierwiastka z uwagi na jego metabolizm w organizmach zwierzęcych) we wszystkich grupach wiekowych poddanych testom. W przypadku kobiet nie będących w ciąży odnotowano spadek zawartości Se w surowicy krwi z wartości $95 \pm 13 \mu\text{g Se L}^{-1}$ do wartości $54 \pm 12 \mu\text{g Se L}^{-1}$. Przy czym zakres prawidłowej zawartości selenu, tj. optymalnej dla aktywności osoczowej peroksydazy glutationowej (GPx3), dla osób dorosłych wynosi $75\text{--}140 \mu\text{g Se L}^{-1}$ [30]. Również ostatnie badania, przeprowadzone w rejonie Górnego Śląska, wykazują niskie wskaźniki Se we krwi mieszkańców tego obszaru [31].

Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia [2], szacowane dzienne spożycie selenu przez mieszkańców Polski w latach 1990–1999 wynosiło $11\text{--}24 \mu\text{g Se d}^{-1}$. Dla porównania, w Niemczech (Bawaria) wartość ta wynosiła $35 \mu\text{g Se d}^{-1}$, w Belgii $\sim 40 \mu\text{g Se d}^{-1}$, w Holandii $67 \mu\text{g Se d}^{-1}$, podczas gdy zalecana dzienna dawka spożycia (RDI) tego pierwiastka dla dorosłych osób obu płci, rekomendowana przez US Food and Nutrition Board wynosi $55 \mu\text{g Se d}^{-1}$, przy czym przyjmuje się, że maksymalna tolerowana dawka bezpiecznego spożycia w krajach Europy dla osób dorosłych wynosi $300 \mu\text{g Se d}^{-1}$ [32].

3. FORTYFIKACJA AGROTECHNICZNA JAKO SPOSÓB UZUPEŁNIANIA DEFICYTU SELENU W DIECIE ZWIERZĄT I CZŁOWIEKA

Wśród powszechnie dostępnych metod uzupełniania deficytu selenu w diecie wyróżnia się suplementację [33–35], fortyfikację pasz zwierząt hodowlanych [33, 36, 37] oraz roślin [11, 16, 24, 38] w ten pierwiastek, przy czym dla tych ostatnich, możliwa jest poprzez zastosowanie zabiegów agrotechnicznych lub metod inżynierii genetycznej. To właśnie metody fortyfikacji agrotechnicznej, w szczególności nawożenie roślin uprawnych, są najbardziej obiecujące w odniesieniu do selenu, gdyż pozwalają na rozwiązanie problemu jego niedoboru w sposób o wiele bardziej korzystny ekonomicznie, bezpieczniejszy i bardziej ogólnodostępny niż w przypadku pozostałych metod. Kluczowe w tym podejściu jest wykorzystanie odpowiedniego sposobu dostarczania selenu do rośliny przy równoczesnym zapewnieniu bezpieczeństwa jego stosowania i minimalizacji skażenia nim środowiska [2, 11, 32] a zwłaszcza gleb, wód powierzchniowych i niepożądanego (toksycznego) wpływu na organizmy żywe i rośliny zlokalizowane w tej strefie [11]. Ważne jest również zapewnienie wysokiej efektywności stosowanych agrochemikaliów selenowych, zwłaszcza że nierozsądne gospodarowanie ograniczonym w zasobach surow-

cem jakim jest selen może negatywnie wpłynąć na jego cenę na rynku oraz, w długoletniej perspektywie, wyczerpać jego łatwo dostępne, tj. opłacalne i nierozproszone źródła [11].

Niezwykle pomocne w kontekście fortyfikacji roślin o znaczeniu gospodarczym w selen są doświadczenia innych krajów, w szczególności Finlandii, gdzie w okresie kilku lat (1983–1990) 10-krotnie zwiększono zawartość selenu w zbożach [39], zwiększając tym samym dzienne spożycie tego pierwiastka u Finów z wartości $26 \mu\text{g Se d}^{-1}$ do $56 \mu\text{g Se d}^{-1}$ (w latach 1990–1999) [2]. Dokonano tego poprzez regulowane ustawą dodanie selenianu(VI) sodu do stosowanych ówczesznie nawozów mineralnych w ilości $16 \mu\text{g Se g}^{-1}$ nawozu. W roku 1990 zmniejszono tę dawkę do wartości $6 \mu\text{g Se g}^{-1}$. W tym samym czasie, z szacowanych 20 ton Se użytych w tym celu, 18 ton wytrąciło się w glebie, stając się tym samym materiałem trudno dostępnym dla roślin [63]. Nie zaobserwowano przy tym zwiększenia (wręcz spadek) zawartości Se w wodach, w tym powierzchniowych, czy wolno stojących (badania od 1990 r.) [41], co potwierdza tylko skomplikowaną biogeochemię tego pierwiastka i potrzebę racjonalnego i efektywnego wykorzystania selenu do celów nawozowych.

Zaobserwowane, w latach 70. XX w., w krajach Europy Północnej, Finlandii i Wielkiej Brytanii czy Szkocji zmniejszenie spożycia selenu było skutkiem rezygnacji ze zbóż importowanych z Kanady czy Stanów Zjednoczonych (obszary bogate w Se) na rzecz zbóż, zwłaszcza pszenicy pochodzenia krajowego [64]. W tym samym czasie, prawie o 1/3 zmniejszyło się spożycie produktów zbożowych (płatki zbożowe, pieczywo) w Wielkiej Brytanii. W efekcie, dzienne spożycie selenu w tym kraju zmalało z wartości $60 \mu\text{g Se d}^{-1}$ w roku 1974 do wartości $33 \mu\text{g Se d}^{-1}$ w 1995 r. [2]. Dlatego podjęto próby zwrócenia uwagi na potrzebę biofortyfikacji roślin uprawnych w ten pierwiastek [4, 24].

Polska jest krajem w którym przeważająca część spożywanych przez jej mieszkańców produktów spożywczych, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego pochodzi z produkcji krajowej. Ogólna powierzchnia zasiewów (w rozumieniu cytowanego dokumentu) stanowi w Polsce obszar o powierzchni 10,4 mln ha [42], na których dominują zboża (73,3% powierzchni), zasiewy przemysłowe (11,2% powierzchni), oraz tzw. zasiewy pastewne (8,3% powierzchni). Zróżnicowany charakter upraw w kraju pozwala na różnicowanie asortymentu dostaw biofortyfikowanych w selen produktów roślinnych, w zależności od potrzeb żywieniowych dalszych odbiorców, tj. zwierząt gospodarskich lub bezpośrednio człowieka. Na szczególną uwagę, w kontekście biofortyfikacji agrotechnicznej selenem roślin o znaczeniu gospodarczym i przeznaczonych dla zwierząt gospodarskich, zasługują uprawy rzepaku, których powierzchnia (łącznie z rzepikiem) wynosiła w 2010 r. 946,1 tys. ha i zwiększyła się do tego roku o 507,2 tys. ha, tj. o 115,5% w porównaniu do roku 2002 r. [42]. W Polsce obecnie uprawia się wyłącznie odmiany rzepaku „00”, z których po częściowym odolejeniu otrzymuje się wyłłoki, a po zastosowaniu dodatkowo ekstrakcji rozpuszczalnikami poekstrakcyjną śrutę rzepakową.

Rośliny wyższe znacząco różnią się tolerancją wobec selenu, niektóre z nich rosnące na glebach z dużą zawartością tego pierwiastka akceptują ten poziom, przez co określane są mianem akumulatorów selenu. Pozostałe, nieakumulujące selenu mogą być albo wrażliwe albo niewrażliwe na jego zwiększony poziom w glebie. Przykładem roślin akumulujących selen są niektóre gatunki z rodzaju *Astragalus* należące do bobowatych oraz *Brassicaceae* – kapustowate, przy czym przyjmuje się, że są one zdolne do akumulacji selenu w znacznych ilościach, nawet do 100 000 mg Se kg⁻¹ [43]. Dla tych roślin, pobieranie selenu nie jest koniecznie proporcjonalne do zawartości tego pierwiastka w glebie [43]. Dla porównania, rośliny zbożowe akumulują przeciętnie do 25 mg Se kg⁻¹ a trawy do 5 mg Se kg⁻¹ [43]. Przy czym w przypadku roślin rosnących w środowisku gleb ubogich w selen, wartości te nie przekraczają zazwyczaj 0,5 mg Se kg⁻¹ ze średnią wynoszącą ~0,2 mg Se kg⁻¹ [11].

O sposobie w jaki rośliny pobierają selen z gleby decyduje przede wszystkim forma w jakiej pierwiastek ten jest dostępny w jej otoczeniu [43, 44]. Z roztworu glebowego seleniany(VI) pobierane są w sposób aktywny (proces wymagający energii od roślin) z wykorzystaniem tych samych białek transporterów co siarczany(VI) (ang. *high affinity sulphate transporters*, HASTs), podczas gdy seleniany(IV) pobierane są biernie, w sposób podobny do fosforanów(V) [45]. Rozpuszczalne w roztworze glebowym związki selenu mogą zostać pobrane przez roślinę, ulec biotransformacji przez mikroorganizmy (np. metylacja), stracić mobilność na skutek warunków otoczenia albo zostać wymyte do wód gruntowych [44].

Szczególnie ważne w kontekście biofortyfikacji jest to, że rośliny pobierają selen w postaci nieorganicznej i przekształcają go (biotransformacja) do selenu w postaci organicznej, głównie do selenowych analogów aminokwasów i ich pochodnych/ [16, 43], który w przypadku organizmów zwierzęcych jest bardziej pożądanym, ze względu na mniejszą toksyczność i dłuższy biologiczny okres półtrwania, tj. okres po jakim nastąpi spadek zawartości tego pierwiastka do połowy wartości wchłoniętej do organizmu. W badaniach przeprowadzonych u ludzi, średni czas połowicznego zaniku Se w całym organizmie dla selenometioniny (L-SeMet) oraz soli selenowych(IV) wynosił odpowiednio 252 oraz 102 dni, wskazując na odmienny metabolizm obu związków w organizmie na korzyść tego pierwszego [47, 48]. Inne badania wskazują również, że selen jest lepiej przyswajalny z pożywienia w postaci związanej z materią organiczną, co również warunkuje jego dalszy metabolizm w organizmie [11, 16].

To, co dodatkowo wyróżnia rośliny określane mianem akumulatorów to fakt, że są w stanie pobierać selen z gleby w bardziej zróżnicowanej postaci niż rośliny pozbawione zdolności do jego akumulacji [11]. Ponadto, rośliny te są w stanie przekształcać selen do znacznie większej liczby związków, tzn. oprócz prostych aminokwasów jak selenometionina czy selenocysteina, które mogą zostać bezpośrednio wbudowane w strukturę białek, również do ich połączeń i modyfikacji (np. poprzez metylację), które zabezpieczają i chronią rośliny przed fitotoksycznością zbyt dużej

ilości selenu [43, 44]. Rośliny te znajdują zastosowanie w fitoremediacji obszarów skażonych selenem w sposób naturalny lub na skutek działalności człowieka [49].

4. STRATEGIE FORTYFIKACJI AGROTECHNICZNEJ ROŚLIN W SELEN

Fortyfikacja roślin wyższych selenem przy pomocy metod agrotechnicznych opiera się głównie na wykorzystaniu nawozów mineralnych zawierających ten mikroelement w postaci soli selenowych(VI) (z uwagi na wysoką przyswajalność przez korzenie roślin), przy czym należy podkreślić że pozostałe metody, w szczególności te dotyczące zwiększenia dostępności selenu obecnego już w glebie dla roślin, są obecnie skutecznie stosowane w przypadku innych mikroelementów (np. Fe) i są uzupełnieniem racjonalnego wykorzystania selenu w rolnictwie [46]. Znajdują one zastosowanie w przypadku, gdy selen jest zawarty w glebie, ale jest trudno dostępny albo nawet niedostępny dla roślin gdyż albo występuje w głębszych partiach gleby albo jest związany z materią organiczną lub substancjami ilastymi (tlenki glinu, tlenki żelaza). Dla gleb uznawanych za deficytowe w selen, w zależności od charakteru uprawy stosuje się nawozy doglebowe i/lub dolistne zawierające ten pierwiastek (doraźne zwiększenie zawartości selenu w glebie). Z kolei nawozy dolistne stosuje się przeważnie w przypadku roślin, dla których mikroelementy nie są bezpośrednio transportowane do części jadalnych (np. uprawy sadownicze).

Celem zwiększenia zawartości selenu w częściach jadalnych roślin, musi nastąpić kolejno po sobie pobranie przez korzeń lub liść, następnie jego efektywne przetransportowanie oraz akumulacja w tych częściach, w formie nietoksycznej dla dalszych ogniw łańcucha pokarmowego i samej rośliny [43].

Rośliny wyższe są zdolne do pobierania selenu z roztworu glebowego w postaci rozpuszczalnych w wodzie selenianów(VI) (SeO_4^{2-}) oraz mniej rozpuszczalnych selenianów(IV) (SeO_3^{2-}). Selen elementarny oraz związany w kompleksy /np. z metalami ciężkimi/ czy też z materią organiczną uważany jest za niedostępny dla roślin [43, 50]. Badania wykazały, że przyswajalność selenianu(VI) sodu jest nawet 10 krotnie większa niż selenianu(IV) sodu [51]. Na pobranie selenu przez roślinę wpływ ma również zawartość siarki, której zbyt wysoka zawartość w glebie ogranicza nagromadzenie selenu przez roślinę, poprzez tzw. antagonizm jonowy. Stosunkowo wysoki próg pojawienia się antagonizmu wykazują rośliny siarkolubne (rzepak, gorczyca, koniczyna, lucerna, kapusta, cebula, czosnek). W przypadku lucerny, stosunek zawartości ogólnych S:Se wynosił 841:1 [52]. Analogiczny stosunek dla jęczmienia wynosi 43:1 a dla ryżu 36:1 [53].

Forma, w jakiej selen występuje w glebie zależy przede wszystkim od typu gleby, jej tekstury, pH, zawartości substancji organicznej, zawartości gliny, zawartości siarczanów i fosforanów, potencjału redoks oraz aktywności mikroorganizmów [22, 44, 54]. Jednym ze skutecznych sposobów omińnięcia ograniczeń związanych z działalnością wyżej wymienionych czynników stanowi zastosowanie granulatów soli selenowych o zróżnicowanej rozpuszczalności (np. 10 g Se kg^{-1} 1:1 Na_2SeO_4

i BaSeO₄ – gama Selcote®) zapewniających długotrwałe uwalnianie selenu (nawet 2 lata). Skuteczność tego rozwiązania potwierdziły liczne badania polowe na wielu roślinach, w tym pastwiskowych w Australii i Nowej Zelandii [24].

Podjęto już skuteczne próby biofortyfikacji roślin kapustowatych w selen w środowisku naturalnym [55]. W przeprowadzonych próbach polowych (Finlandia) z wykorzystaniem wzbogaconych w selen zarówno tradycyjnych nawozów oraz nawozów dolistnych, w których obiektem badań były dwa najbardziej popularne wśród hodowców gatunki rzepaku (przeznaczone na pasze lub cele energetyczne): *Brassica napus* (Kapusta rzepak) oraz *Brassica rapa* (Kapusta właściwa), wykazano wysoką akumulację selenu (~2 μg Se g⁻¹) bez wpływu na wydajność plonu czy zawartość i jakość olejów [55]. Ponadto, badania specyjalne wykazały, że 85% całkowitego selenu, zawartego we wzbogaconym w selen rzepaku, stanowi selen w postaci pożądanej w perspektywie żywienia zwierząt oraz człowieka, tj. selenometioniny. W doświadczeniu wykorzystano selen w postaci selenianu(VI) sodu (Na₂SeO₄) jako dodatku do nawozów mineralnych N-P-K-Mg-S w dawce 0; 5,6 i 20 g Se ha⁻¹ oraz mieszaniny wodnych roztworów selenianu(IV) sodu /Na₂SeO₃/ oraz selenianu(VI) sodu (Na₂SeO₄) w dawce 0 i 30 g Se ha⁻¹ (nawożenie dolistne), przy czym te ostatnie poprzedzone były suplementacją gleby w dawce 6 g Se ha⁻¹. Badania przeprowadzone były na glebach o charakterze gliniastym o średnim pH 6,3 i całkowitej zawartości selenu < 0,01 mg L⁻¹. Odzysk selenu z gleby po przeprowadzonym eksperymencie wyniósł 5,5 - 6,0%. Ponadto, badacze zaproponowali, że docelowa zawartość selenu w paszy wytworzonej z badanych roślin może zostać ustalona na poziomie 1 μg Se g⁻¹ – wartość którą gwarantuje dawka nawozu dolistnego poprzedzona zaprawianiem gleby w selen w ilościach 6 g Se ha⁻¹.

Dotychczasowy stan wiedzy nie pozwala stwierdzić, aby selen był niezbędny dla rozwoju roślin wyższych, jednak według wielu badaczy jego ultraśladowe ilości /ng/, które i tak zapewniają jego rozproszenie w skorupie ziemskiej i współwystępowanie z siarką, mogą pełnić znaczącą rolę w ich rozwoju [56, 57]. O ile selen nie wpływa na wydajność plonu czy ilość i jakość olejów w kapustowatych, to ma jednak wpływ na morfologię plonów za sprawą selenocukrów, których obecność stwierdzono zarówno w badaniach polowych [55] jak i w warunkach laboratoryjnych, tj. w warunkach ściśle kontrolowanych [57]. Również badania na innych roślinach, w tym widma z analiz proteomicznych ryżu (*Oryza sativa*) fortifikowanego w Se w Chinach wykazały różnice w aktywności białek odpowiedzialnych za syntezę sacharozę w porównaniu do tych samych roślin bez fortyfikacji Se [40].

Na ogół warzywa i owoce zawierają małe ilości selenu [33], za wyjątkiem orzechów (w szczególności włoskich), szparagów, bakłażana, kalafiora, czosnku czy też bogatych w białka wybranych roślin strączkowych. Jednym z ciekawych pomysłów jest wykorzystanie pieczarek (*Agaricus bisporus*) [11], jako źródła organicznych form selenu w pożywieniu. Pieczarki cieszą się relatywnie wysokim współczynnikiem przyswajalności selenu z gleby w porównaniu do roślin wyższych, w szczególności odmiana brązowa (*Crimini*), która jest w stanie zapewnić nawet 20% RDA (zale-

cane codiennie spożycie ang. *Recommended Dietary Allowances*) w dzieci dorosłych akumulując nawet $2 \mu\text{g Se g}^{-1}$ s.m. przy zastosowaniu odpowiedniego podłoża [11]. Dla porównania, w mięsie zawartość selenu wynosi $0,588 \mu\text{g Se g}^{-1}$, w szparagach $0,862 \mu\text{g Se g}^{-1}$ oraz w bakłażanie $0,262 \mu\text{g Se g}^{-1}$ [11].

Selen może być również aplikowany dolistnie, co w przypadku niektórych rodzajów roślin okazuje się o wiele bardziej efektywne niż stosowanie nawozów doglebowych. Jest to jednak zależne od warunków pogodowych oraz ma ograniczone zastosowanie do obszarów rolniczych o dużych powierzchniach, z uwagi na bezpieczeństwo ludzi w strefach zamkniętych (np. uprawy szklarniowe) [39, 43].

Jednym z alternatywnych do wyżej wspomnianych sposobów dostarczania selenu do gleby jest zastosowanie materiału roślinnego (np. z fitoremediacji) wzbogaconego w ten pierwiastek [43].

Badania przeprowadzone w Finlandii [58, 39, 60], Nowej Zelandii [59], Wielkiej Brytanii [59], Stanach Zjednoczonych (Oregon) [38] oraz pozostałe [11] wykazały, że biofortyfikacja agrotechniczna jest skuteczną metodą uzupełniania deficytu selenowego u zwierząt oraz ludzi z terenów o niskiej zawartości selenu w glebach.

W dłuższej perspektywie, istnieje również możliwość zwiększenia zawartości selenu poprzez zastosowanie metod selekcji roślin lub uprawę odmian o zwiększonej przyswajalności selenu [46]. Przy czym zastosowanie roślin transgenicznych (np. o sztucznie zwiększonej akumulacji selenu) może wymagać większej kontroli i stałego monitoringu zawartości tego pierwiastka w roślinach [39, 46, 60].

Zgodnie z kanadyjskimi wytycznymi, zalecana zawartość selenu w glebach z przeznaczeniem rolniczym wynosi $125 \text{ mg Se kg}^{-1}$ [11], podobnie z wytycznymi amerykańskiej Agencji Środowiskowej (ang. *Environment Agency*, EA) dla obszarów rolniczych wartość ta wynosi $120 \text{ mg Se kg}^{-1}$ [61]. Warto tu zaznaczyć, że wartości te są obliczone na podstawie dostępnych danych literaturowych z przeprowadzonych badań laboratoryjnych i polowych dotyczących wpływu selenu na wybrane elementy środowiska i mogą ulec zmianie w przyszłości. O ile czynniki środowiskowe nie będą pozwalały na podjęcie działań w zakresie zmiany polityki rolnej w kraju, tj. zwrócenie uwagi na problemy niedoboru pierwiastków o dużym znaczeniu dla zdrowia człowieka, alternatywne lub dodatkowe nadzieje upatrywać można w metodach fortyfikacji żywności, zwłaszcza z wykorzystaniem organicznych nośników selenu (np. mikroorganizmy selenowane) [33].

W chwili obecnej, niedożywienie będące skutkiem przedłużonego niedoboru ważnych dla organizmu składników pokarmowych jest problemem i wyzwaniem zwłaszcza dla krajów rozwijających się [62]. Zgodnie z ustaleniami Konsensusu Kopenhaskiego (Copenhagen Consensus 2004), poszukiwanie rozwiązań dla tego problemu powinno stanowić wysoki priorytet w strategii rozwoju każdego kraju w zakresie zapewnienia dobrobytu społecznego jego mieszkańców.

Również analiza krajowego rynku nawozów czy dodatków paszowych pokazuje, że selen nie jest obiektem zainteresowań odbiorców. W przypadku nawozów, pierwiastek ten jest dostępny tylko w wybranych specjalistycznych dolistnych nawo-

zach mikroelementowych, przeznaczonych głównie pod uprawy roślin warzywnych i dla upraw sadowniczych w postaci soli selenowych (+4 i +6 st. utl). Nawozy z dodatkiem selenu można również zamówić na specjalne życzenie u niektórych polskich producentów (między innymi Intermag, Suplo, Ekoplón, Inco-Veritas). Przy czym należy podkreślić, że nawozy z dodatkiem selenu są droższe, ich cena może być nawet wyższa o 15% w porównaniu do ceny nawozów bez tego mikroelementu (dane własne).

PODSUMOWANIE

Rośliny uprawne zawierające podwyższoną zawartość selenu mogą stanowić efektywny i bezpieczny dla ludzi i zwierząt dodatek do żywności lub pasz. Mogą być również bardziej pożądane na rynku, podczas gdy koszt ich produkcji (tj. koszt nawozu selenowego i jego aplikacji) może zostać przerzucony na końcowego odbiorcę. W świetle zagrożeń, jakie może stwarzać zarówno niski, jak i wysoki poziom selenu w środowisku, konieczne jest opracowanie bezpiecznej technologii uzupełniającej deficyt selenu w diecie i uwzględniającej jednocześnie zmiany zawartości tego pierwiastka w układzie gleba – rośliny uprawne – zwierzęta hodowlane – człowiek z równoczesnym monitoringiem pozostałych elementów środowiska naturalnego i z zachowaniem zgodności zasad zrównoważonego rozwoju. Skomplikowana natura tego pierwiastka wskazuje również na potrzebę opracowania szczegółowego modelu obiegu selenu w środowisku, tj. dla konkretnego przypadku, uwzględniającego w odpowiednim stopniu poszczególne aspekty środowiska i pozwalającego ograniczyć koszty związane z jego monitoringiem w środowisku. Tym samym, wzbogacona w selen żywność pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego, jako żywność funkcjonalna może stanowić bardziej konkurencyjną formę żywności na rynku krajowym czy zagranicznym, co potwierdza przypadek Finlandii oraz pozostałych krajów, które tego typu działania już podjęły.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2015–2016 jako projekt badawczy statutowy MNiSzW realizowany na Wydziale Chemicznym Politechniki Wrocławskiej (nr zlec. S50150 / Z0517) pt.: „Opracowanie i wdrożenie akredytowanych procedur oznaczania makro- i mikroskładników nawozowych oraz produktów korozji stali”.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Bowen, *Environmental chemistry of the elements*, New York, Academic Press, 1979.
- [2] FAO/WHO, Expert consultation on human vitamin and mineral requirements, 2000, Chapter 15: Selenium.
- [3] A. Kyriakopoulos, D. Behne, *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2002, **145**, 37.
- [4] M. Rayman, *Lancet*, 2000, **356**, 233.
- [5] C. Reily, *Selenium in food and health*, 2nd edition, Blackie Academic and Professional, London 2006.
- [6] B. Lacey, R. Hondal, *Biochemistry*, 2008, **47**, 12810.
- [7] M. Maines, A. Kappas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1976, **3(12)**, 4428.
- [8] S. Ryter, R. Tyrrell, *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, **8**, 289.
- [9] P. Zagrodzki, *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2004, **58**, 140.
- [10] C. Wilber, *Clinical Toxicology*, 1980, **17**, 171.
- [11] CCME – Canadian Council of Ministers of the Environment, 2009, PN 1438, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.ccme.ca/assets/pdf/soqg_se_scd_1438.pdf.
- [12] C. Reily, *The nutritional trace elements*, Blackwell Publishing 2004.
- [13] M. Rayman, *Proc. Nutr. Soc.*, 2005, **62**, 527.
- [14] J. Nève, *Journal of Cardiovascular Risk*, 1996, **3(1)**, 42.
- [15] P. Chariot, O. Bignani, *Muscle Nerve*, 2003, **27(6)**, 662.
- [16] F. Fordyce, *Essentials of Medical Geology, Impacts of the Natural Environment on Public Health*, Elsevier Academic Press, Boston, San Diego, London, 2005.
- [17] M. Navarro-Alarcon, M. Lopez-Martinez, *Sci. Total. Environ.*, 2000, **249**, 347.
- [18] L. Savarino, *Experimental Gerontology*, 2001, **36**, 327.
- [19] S. Gao, *Am. J. Epidemiol.*, 2007, **165(8)**, 955.
- [20] J.K. MacFarquhar, *Archives of Internal Medicine*, 2010, **170(3)**, 256.
- [21] K. Schwarz, C. Foltz, *Journal of the American Chemical Society*, 1957, **79**, 3292.
- [22] A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.
- [23] Ochrona Środowiska, Główny Urząd Statystyczny, 2012, Warszawa, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.stat.gov.pl.
- [24] M. Broadley, M.C. Meacham, *Proceedings of the Nutrition Society*, 2006, **65**, 169.
- [25] K. Borowska K., Distribution of total and the DTPA-extractable selenium in soil profiles from Kujawy Upland (Poland), XVI Congress of the International Society of Soil Science, Symposium No: 6, 1998.
- [26] R. Markiewicz, A. Gutowska, *Fresen. Environ. Bull.*, 2010, **19**, 372.
- [27] B. Dębski, A. Kryński, K. Skrzymowska, *Proceeding of the International Congress on Animal Hygiene (ISAH)*, 2005, **2**, 442.
- [28] S. Grzebuła, *Studia nad pokarmową dystrofią mięśni u źrebiąt*, Rozprawa habilitacyjna. Akademia Rolnicza, Lublin, 1989.
- [29] W. Wasowicz, J. Tomczak, *Toxicology Letters*, 2003, **137**, 95.
- [30] M. Jarosz, B. Bułhak-Jachymczyk, *Normy żywienia człowieka*, PZWL, Warszawa, 2008.
- [31] B. Kłapcińska, S. Poprzęcki, A. Danch, 2006, *Polish J. of Environ. Stud.*, 2006, **15(5)**, 753.
- [32] SCF, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Selenium, SCF/CS/NUT/UPPLEV/25 Final, 1-18, 2000, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out80g_en.pdf.
- [33] C. Thiry, A. Ruttens, L. De Temmerman, Y. Schneider, *Food Chemistry*, 2012, **130**, 767.

- [34] Z. Pedrero, Y. Madrid, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **634**, 135.
- [35] DYREKTYWA NR 2002/46/WE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 10 czerwca 2002 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do suplementów żywnościowych.
- [36] ROZPORZĄDZENIE NR 1831/2003 PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY z dnia 22 sierpnia 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt.
- [37] W.G. Jaffe, *Plant Food Hum. Nutr.*, 1973, **23**, 191.
- [38] R. Hathaway, G. Pirelli, W. Mosher, J. Oldfield, Department of Animal Sciences, Oregon State University, 2004, 1-15.
- [39] M. Euroola, *Agrifood Research Reports No. 69*, 2005.
- [40] Y. Wang, X. Wang, S. Ngai, Y. Wong, *J. Proteome Res.*, 2013, **12(2)**, 808.
- [41] G. Alfthan, A. Aro, *Proceedings Twenty years of selenium fertilization*, Merja Euroola (Red.), Finland 2005.
- [42] Powszechny Spis Rolny 2010 – Uprawy rolne i wybrane elementy metod produkcji roślinnej, Główny Urząd Statystyczny, Warszawa, 2011, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.stat.gov.pl.
- [43] N. Terry, A. Zayed, M. De Souza, A. Tarun, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 2000, **51**, 401.
- [44] H. Mayland, L. Gough, K. Stewart, *Proc. of 1990 Billings Land Reclamation Symposium. USA-MT-Billings*, 1991.
- [45] H. Li, S. McGrath, F. Zhao, *New Phytologist*, 2008, **178**, 92.
- [46] P. White, M. Broadley, *New Phytol.*, 2009, **182(1)**, 49.
- [47] B. Patterson, P. Taylor, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1989, **257**, 556.
- [48] C. Swanson, K. Helzsouer, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991, **54**, 917.
- [49] G. Banuelos, G. Schrale, *California Agriculture*, 1989, 19.
- [50] T. Sors, D. Ellis, D. Salt, *Photosynthesis Research*, 2005, **86 (3)**, 373.
- [51] T. Ylaranta, *Ann. Agr. Finn.*, 1983, **22**, 166.
- [52] B. Patorczyk-Pytlik, A. Zimoch, E. Szumińska, *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*, 2009, 573.
- [53] R.L. Mikkelsen, H.F. Wan, *Plant and Soil*, 1990, **121**, 151.
- [54] M. Čuvarđić, *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska. Novi Sad*, 2003, **104**, 23.
- [55] M. Seppänen, J. Kontturi, I. Heras, Y. Madrid, C. Cámara, H. Hartikainen, *Plant and Soil*, 2010, **337 (1-2)**, 273.
- [56] H. Hartikainen, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2005, **18**, 309.
- [57] G. Lyons, Y. Genc, K. Soole, *Plant Soil*, 2009, **318**, 73.
- [58] P. Koivistoinen, J. Huttunen, *Ann Clin Res.*, 1986, **18(1)**, 7.
- [59] J. Watkinson, *N Z Vet J.*, 1983, **31(5)**, 78.
- [60] M. Euroola, V. Hietaniemi, M. Kontturi, H. Tuuri, A. Kangas, *Agricultural and Food Science*, 2004, **13**, 46.
- [61] Soil Guideline Values for selenium in soil, Science Report SC050021 / Selenium SGV, 2009, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/313881/scho0309bpqh-e-e.pdf.
- [62] R. Graham, R. Welsh, D. Saunders, *Advances in Agronomy*, 2007, **92**, 1.
- [63] D. Wang, G. Alfthan, *Applied Geochemistry*, 1993, **2**, 87.
- [64] UK National Food Survey, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, 1995, [dostęp: 2014-05-20]. Dostępny w Internecie: www.discover.ukdataservice.ac.uk/

INFORMACJE

INFORMACJE REDAKCJI „WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

CENY PRENUMERATY NA ROK 2016

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2016 r. będzie wynosiła **220 zł + 5% VAT** dla instytucji i niezrzeszonych prenumeratorów indywidualnych. Dla członków PTChem **20 zł**. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank PEKAO SA
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 50-950 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemiczne”
NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2016 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi **70 zł** (składka – 50 zł, prenumerata – 20 zł);
- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą **35 zł** (składka – 15 zł, prenumerata – 20 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą **40 zł** (składka – 20 zł, prenumerata – 20 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Bank BGŻ
54 2030 0045 1110 0000 0261 6290

WYRÓŻNIONE PRACE DOKTORSKIE LUB HABILITACYJNE

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” w porozumieniu z Radą Redakcyjną podjęła decyzję o utworzeniu nowego działu, zatytułowanego „Wyróżnione prace doktorskie i habilitacyjne”. Redakcja przyjmuje do publikacji artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy.

Objętość prac nie powinna przekraczać piętnastu stron maszynopisu. Artykuły powinny zawierać: przedstawienie doniosłości podjętej tematyki badawczej, cel rozprawy doktorskiej lub habilitacyjnej oraz w miarę zwięzły opis uzyskanych wyników przedstawiony w możliwie przystępny sposób a także wnioski końcowe.

W notce biograficznej autora poza standardowymi informacjami powinny zostać zamieszczone następujące dane: termin obrony pracy doktorskiej lub kolokwium habilitacyjnego, Rada Wydziału, przed którą toczył się przewód, nazwisko promotora (dotyczy rozpraw doktorskich) oraz nazwiska recenzentów.

Serdecznie zapraszamy doktorów habilitowanych oraz doktorów, których prace zostały wyróżnione w ciągu ostatniego roku do nadsyłania swoich prac.



Zdrowia oraz wszelkiej pomyślności

w Roku 2016

życzy

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

Podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie finansowe udzielone „wiadomością chemiczną” w roku 2015

W imieniu Komitetu Redakcyjnego „*Wiadomości Chemicznych*” składam serdeczne podziękowania za okazaną pomoc i wsparcie finansowe udzielone w roku 2015. Podziękowania kieruję do:

- prof. dra hab. inż. Andrzeja Trochimczuka, Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej,
- prof. dra hab. Adama Jezierskiego, Prorektora Uniwersytetu Wrocławskiego,
- prof. dra hab. Andrzeja Jeżowskiego, Dyrektora Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu,
- prof. dra hab. Pawła Kuleszy, Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego,
- prof. dra hab. Anny Trzeciak, Dziekan Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego.

Jednocześnie apeluję do Dziekanów wydziałów chemicznych wyższych uczelni oraz Kierowników innych jednostek chemicznych o wsparcie finansowe naszego czasopisma.

prof. dr hab. Zdzisław Latajka
Redaktor Naczelny

Lista recenzentów współpracujących W latach 2013–15

prof. dr hab. inż. Marek Adamczak

Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

prof. dr hab. inż. Ryszard Andruszkiewicz

Politechnika Gdańska, Wydział Chemii, Katedra Technologii Leków i Biochemii

prof. dr hab. inż. Barbara Becker

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Krzysztof Bielawski

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Zakład Syntezy i Technologii Środków Leczniczych

prof. dr hab. Aleksander Bilewicz

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

prof. dr hab. Renata Bilewicz

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Grzegorz Bujacz

Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Biochemii Technicznej

prof. zw. dr hab. inż. Stanisław Błażewicz

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biomateriałów

dr hab. inż. Katarzyna Borowska

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

dr Anna Bodzoń-Kułakowska

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

prof. dr hab. Stanisław Boryczka

Śląski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu, Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Jerzy Boryski

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

prof. dr hab. inż. Zbigniew Brzózka

Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska

prof. zw. dr hab. Wanda Brzyska

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej; Wydział Chemii; Zakład Chemii Ogólnej i Koordynacyjnej

prof. dr hab. Ewa Joanna Bulska

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. inż. Bogdan Burczyk

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Instytut Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych

prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski

Wydział Chemii UMK, Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki

dr Marek Cebrat

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

dr hab. Lech Celewicz

Uniwersytet A. Mickiewicza Wydział Chemii Pracownia Chemii Nukleozydów i Nukleotydów

prof. zw. dr hab. inż. Jerzy Feliks Choma

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii

prof. Dr hab. Jerzy Choma

Wydział Nowych Technologii i Chemii, Wojskowa Akademia Techniczna

dr Grażyna Chwatko

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Środowiska

prof. dr hab. Leszek Zbigniew Ciunik

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. inż. Stanisław Cudziło

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Nowych Technologii i Chemii; Instytut Chemii

prof. dr hab. Leszek Adam Czepirski

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Energetyki i Paliw, Katedra Chemii Węgla i Nauk o Środowisku

prof. dr hab. Michał Cyrański

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. Jerzy Datka

Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Chemii Nieorganicznej

prof. dr hab. Barbara Dębska

Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Zbigniew Dobrzański

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt; Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt

prof. dr hab. Jan Dobrowolski

Instytut Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie

dr hab. inż. Krystyna Jolanta Dzierzbicka

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Andrzej Dżugaj

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Biologicznych; Instytut Genetyki i Mikrobiologii

dr hab. Krzysztof Ejsmont

Uniwersytet Opolski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Michał Klemens Fedoryński

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Instytut Biotechnologii

prof. dr hab. Aleksander Filarowski

Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski

prof. dr hab. Jolanta Floryszak-Wieczorek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu; Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajo-
brazu; Katedra Fizjologii Roślin

prof. dr hab. Rafał Józef Frański

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Chemii
Supramolekularnej

prof. dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Wydział Chemii, Katedra Chemii
Środowiska i Bioanalitiky

prof. dr hab. Zbigniew Galus

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. Andrzej Gamian

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu; Wydział Lekarski; Kate-
dra i Zakład Biochemii Lekarskiej

prof. dr hab. Roman Gancarz

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Technologii
Organicznej i Farmaceutycznej

dr hab. Inż. Barbara Gawdzik

Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach; Wydział Matematyczno-Przyrodniczy; Instytut Chemii

prof. dr hab. Maria Gdaniec

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Krystalografii

prof. zw. dr hab. Jacek Gliński

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Jolanta Gromadzińska

Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera, Zakład Toksykologii i Kancerogenezy

prof. Karol Lesław Grela

Instytut Polskiej Akademii Nauk

Katarzyna Małgorzata Gobis

Gdański Uniwersytet Medyczny; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej; Katedra i Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Grzegorz Gryniewicz

Instytut Farmaceutyczny, ul. Rydygiera 8, 01-793 Warszawa

prof. dr hab. Maria Grzeszczyk

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Teresa Grzybek

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Energetyki i Paliw; Katedra Technologii Paliw

prof. dr hab. Hanna Maria Gulińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Dydaktyki Chemii

prof. dr hab. Jerzy Kazimierz Hanuza

Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu; Wydział Inżynieryjno-Ekonomiczny; Instytut Chemii i Technologii Żywności

dr hab. inż. Andrzej Huczko

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Stefan Jankowski

Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Organicznej

prof. dr hab. Bronisław Jańczuk

Katedra Chemii Fizycznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

dr hab. Inż. Janina Kabatc

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy; Wydział Technologii i Inżynierii

prof. dr hab. Piotr Kachlicki

Instytut Genetyki Roślin PAN

dr hab. Karol Michał Kacprzak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Pracownia Stereochemii Organicznej

prof. zw. dr hab. inż. Paweł Kazimierz Kafarski

Politechnika Wroclawska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Bioorganicznej

dr hab. Małgorzata Karolus

Uniwersytet Śląski, Wydział Informatyki i Nauki o Materiałach, Instytut Nauki o Materiałach

prof. dr hab. Franciszek Kasprzykowski

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

prof. dr hab. Aleksander Koll

Wydział Chemii, Uniwersytet Wroclawski

dr hab. inż. Aleksandra Kołodziejczyk

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Katedra Chemii Medycznej

prof. dr hab. inż. Aleksander Kołodziejczyk

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Marek Kojdecki

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Cybernetyki; Instytut Matematyki i Kryptologii

dr Edyta Kostrzewa-Susłow

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu; Wydział Nauk o Żywności; Katedra Chemii

prof. dr hab. inż. Małgorzata Kotulska

Politechnika Wrocławska, Instytut Inżynierii medycznej i Pomiarowej

prof. dr hab. Teresa Kowalik-Jankowska

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. Zygmunt Kowalski

Instytut Chemii i Technologii Nieorganicznej, Politechnika Krakowska

prof. dr hab. Anna Koziół

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej; Wydział Chemii; Zakład Krytalografii

prof. dr hab. czł. koresp. PAN Henryk Kozłowski

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Adam Kraszewski

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Stanisław Krompiec

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii

prof. dr hab. Bogusław Kryczka

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. zw. dr hab. Tadeusz M. Krygowski

Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

dr Małgorzata Krasodomska

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. czł. Koresp. PAN Włodzimierz Krzyżosiak

Polska Akademia Nauk; Wydział PAN; Wydział II Nauk Biologicznych i Rolniczych

prof. dr hab. Paweł Grzegorz Krysiński

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Andrzej Książczak

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysokoenergetycznych

dr hab. Maciej Kubicki

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Krystalografii

prof. dr hab. Aleksandra Kubicz

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Nauk Przyrodniczych; Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej

prof. dr hab. Przemysław Kubisa

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

prof. dr hab. Paweł Kulesza

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

prof. dr hab. Stanisław Lamparski

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Chemii Fizycznej

prof. zw. dr hab. Zdzisław Latajka

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Stanisław Leśniak

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii, Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. Zbigniew Leśnikowski

Instytutu Biologii Medycznej PAN

prof. dr hab. Jarosław Lewkowski

Uniwersytet Łódzki, Wydział Chemii

prof. dr hab. Beata Liberek

Uniwersytet Gdański; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej

prof. dr hab. Teodozja Lipińska

Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach, Instytut Chemii

prof. dr hab. Stefan Lis

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii

prof. dr hab. Jerzy Lisowski

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. Wiesław Łasocha

Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Krystalochemii i Krystalofizyki

prof. dr hab. Eugeniusz Antoni Łągiewka

Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Informatyki i Nauki o Materiałach

dr hab. Bogusława Maria Łęska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Zakład Chemii Supramolekularnej

prof. dr hab. inż. Maria Madej-Lachowska

Polska Akademia Nauk, Instytut Inżynierii Chemicznej

prof. dr hab. Wojciech Macyk

Zakład Chemii Nieorganicznej, Wydział Chemii UJ

prof. dr hab. inż. czł. koresp. PAN Bogusław Major

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN, Kraków

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Wiktor Maranda

Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego; Wydział Nowych Technologii i Chemii

dr hab. Katarzyna Małolepsza-Jarmołowska

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Katedra i Zakład Technologii Postaci Leku

dr Agata Markowska-Szczupak

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie; Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej; Instytut Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska

dr Agnieszka Masajada

Politechnika Wrocławska, Instytut Fizyki

dr hab. inż. Witold Zygmunt Mielcarek

Instytut Elektrotechniki

prof. dr hab. Roman Mieczysław Mierzecki

Polska Akademia Nauk; Wydział I Nauk Humanistycznych i Społecznych; Komitet Historii Nauki i Techniki

dr hab. Jan Milecki

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Chemii; Pracownia Spektrochemii Organicznej

dr hab. inż. Karol Mińkowski

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

prof. dr hab. Konrad Misiura

Wydział Farmaceutyczny, Collegium Medicum w Bydgoszczy, Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. Andrzej Molski

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii; Pracownia Dynamiki Procesów Fizykochemicznych

prof. dr hab. inż. Jan Mosio-Mosiewski

Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej

prof. dr hab. inż. Jacek Młochowski

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny

prof. dr hab. Jacek Młynarski

Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii

dr hab. Robert Musioł

Uniwersytet Śląski w Katowicach; Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii; Instytut Chemii

dr hab. inż. Janusz Nowicki

Instytut Ciężkiej Syntezy Organicznej "Blachownia"

prof. dr hab. Krystyna Nowińska

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii, Zakład Katalizy Heterogenicznej

prof. dr hab. Agnieszka Olejniczak

Instytutu Biologii Medycznej PAN

prof. dr hab. inż. Aleksandra Barbara Olma

Politechnika Łódzka; Wydział Chemiczny; Instytut Chemii Organicznej

dr Marcin Olszewski

Politechnika Gdańska, Katedra Mikrobiologii

dr inż. Joanna Ortyl

Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki; Wydział Inżynierii i Technologii Chemicznej; Katedra Biotechnologii i Chemii Fizycznej

prof. dr hab. Kazimierz Orzechowski

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Ryszard Józef Ostaszewski

Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk

prof. dr hab. Bogdan Pałosz

Instytut Wysokich Ciśnień PAN

prof. dr hab. Andrzej Parczewski

Polska Akademia Nauk; Wydziały PAN; Wydział III Nauk Ścisłych i Nauk o Ziemi; Komitet Chemii Analitycznej

prof. dr hab. czł. koresp. PAN Stanisław Penczek

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN

prof. dr hab. inż. Juliusz Pernak

Politechnika Poznańska; Wydział Technologii Chemicznej; Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

prof. dr hab. Anna Pielesz

Instytut Inżynierii Tekstyliów i Materiałów Polimerowych, Wydział Nauk o Materiałach i Środowisku, Akademia Techniczno-Humanistyczna, Bielsko-Biała

prof. dr hab. Marek Pietraszkiewicz

Polska Akademia Nauk w Warszawie, Instytut Chemii Fizycznej

prof. dr hab. Adam Andrzej Pietraszko

Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych im. Włodzimierza Trzebiatowskiego PAN

prof. dr hab. inż. Jacek Pięłowski

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Inżynierii i Technologii Polimerów

dr hab. Piotr Piszczek

Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Wioletta Anna Podgórska

Politechnika Warszawska; Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej

prof. dr hab. Florian Paweł Pruchnik

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Janusz Rachoń

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii Organicznej

dr hab. Michał Rachwalski

Uniwersytet Łódzki; Wydział Chemii; Katedra Chemii Organicznej i Stosowanej

prof. dr hab. inż. Gabriel Rokicki

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii i Technologii

prof. dr hab. Krzysztof Rolka

Uniwersytet Gdański; Wydział Chemii; Katedra Chemii Bioorganicznej

dr Grzegorz Rusek

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. inż. Wojciech Sas

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Grzegorz Schroeder

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza; Wydział Chemii; Zakład Chemii Supramolekularnej

prof. dr hab. Ignacy Zenon Siemion

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

dr hab. inż. Renata Siedlecka

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. Wiesława Sikora

Katedra Fizyki Materii Skondensowanej, Wydział Fizyki i Informatyki Stosowanej
AGH

prof. dr hab. Jerzy Silberring

Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie; Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki; Katedra Biochemii i Neurobiologii

prof. dr hab. inż. Jacek Mikołaj Skarżewski

Politechnika Wroclawska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Organicznej

prof. dr hab. inż. Wincenty Antoni Skupiński

Politechnika Warszawska; Wydział Chemiczny; Zakład Materiałów Wysokoenergetycznych

dr hab. Krzysztof Sobczak

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu; Wydział Biologii; Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

prof. dr hab. Jadwiga Sołoducho

Politechnika Wroclawska; Wydział Chemiczny; Wydziałowy Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii

prof. dr hab. Stanisław Kazimierz Sobiak

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Wydział Farmaceutyczny; Katedra i Zakład Technologii Chemicznej Środków Leczniczych

prof. dr hab. Mirosław Soszyński

Uniwersytet Łódzki; Wydział Biologii i Ochrony Środowiska; Katedra Biofizyki Molekularnej

dr hab. inż. Anna Sokół-Łętowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Technologii Owoców, Warzyw i Zbóż

prof. dr hab. Katarzyna Marta Stadnicka

Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Krystalochemii i Krystalofizyki

prof. dr hab. Janusz Wojciech Stafiej

Instytut Chemii Fizycznej PAN

prof. dr hab. Jacek Antoni Stawiński

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

dr hab. Piotr Tadeusz Stefanowicz

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Maciej Stobiecki

Instytut Chemii Bioorganicznej PAN

prof. dr hab. Wiesław Stanisław Stręk

Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

dr hab. Przemysław Marek Starynowicz

Uniwersytet Wrocławski, Wydział Chemii

prof. zw. dr hab. Zbigniew Szewczuk

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Maciej Szmitkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

prof. dr hab. Anna Szmyrka-Grzebyk

Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. dr hab. Artur Terzyk

Uniwersytet Mikołaja Kopernika; Wydział Chemii

prof. dr hab. Marek Tkacz

Instytut Chemii Fizycznej PAN, Zakład Fizykochemii Ciała Stałego

prof. dr hab. Vinh Hung Tran

Polska Akademia Nauk, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych

prof. zw. dr hab. inż. Janusz Tadeusz Trawczyński

Politechnika Wrocławska; Wydział Chemiczny; Zakład Chemii i Technologii Paliw

prof. zw. dr hab. inż. Andrzej Witold Trochimczuk

Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny, Wydziałowy Zakład Materiałów Polimerowych i Węglowych

dr hab. Lilianna Trynda-Lemiesz

Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii Analitycznej

prof. zw. dr hab. Anna Maria Trzeciak

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Tadeusz Trziszka

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wydział Nauk o Żywności

prof. dr hab. Iłona Turowska-Tyrk

Politechnika Wrocławska, Wydział Chemiczny

dr inż. Maria Tynek

Politechnika Gdańska; Wydział Chemiczny; Katedra Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności

dr Katarzyna Elżbieta Wajda-Hermanowicz

Uniwersytet Wrocławski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Monika Ewa Waksmundzka-Hajnos

Uniwersytet Medyczny w Lublinie; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Katedra Chemii

prof. dr hab. Maciej Wiśniewski

Politechnika Poznańska; Wydział Technologii Chemicznej; Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej

prof. dr hab. Ewa Witek

Uniwersytet Jagielloński; Wydział Chemii; Zakład Technologii Chemicznej

prof. dr hab. Krzysztof Wozniak

Uniwersytet Warszawski; Wydział Chemii

prof. dr hab. Zbigniew Krzysztof Wróbel

Polska Akademia Nauk, Instytut Chemii Organicznej

prof. dr hab. Monika Wujec

Uniwersytet Medyczny w Lublinie; Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej; Katedra i Zakład Chemii

dr hab. inż. Paweł Zagrodzki

Uniwersytet Jagielloński; Collegium Medicum; Wydział Farmaceutyczny; Zakład Bromatologii

prof. dr hab. inż. Jan Zawadiak

Politechnika Śląska, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywiduali chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł

Glosariusz nazw klas związków organicznych i reaktywnych produktów pośrednich oparty na strukturze (Zalecenia IUPAC 1994), red. i tłum. F. Kaźmierczak i J. Gawroński, cena 16 zł.

Od substacji prostych do życia. Świat RNA – początki życia na Ziemi, Zdzisław Chilmonczyk – NAKŁAD WYCZERPANY.

Profesor Bogusława Jeżowska-Trzebiatowska. 1908–1991 w setną rocznicę urodzin, cena 12,00 zł.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część I. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna.

Chemia koordynacyjna w Polsce. Część II. Nakład wyczerpany, dostępna wersja elektroniczna

Chemosensory optyczne oraz materiały rozpoznawcze dla jonów metali w roztworach, Krzysztof Kledzik, cena 22,00 zł.

Obliczenia teoretyczne stałej ekranowania magnetycznego i stałych strzężeń spinowo-spinowych. Teobald Kupka cena 20,00 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: Bank PEKAO SA O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 48 1240 6670 1111 0000 5649 8781.

REGULAMIN I INFORMACJE DLA AUTORÓW PUBLIKUJĄCYCH W CZASOPIŚMIE „WIADOMOŚCI CHEMICZNE”

1. Informacje ogólne

„Wiadomości Chemiczne” są recenzowanym czasopismem naukowym Polskiego Towarzystwa Chemicznego, które publikuje przede wszystkim artykuły przeglądowe. Ponadto publikowane są tutaj inne **wartościowe** materiały o charakterze edukacyjno-informacyjnym takie jak: artykuły oparte na pracach doktorskich lub habilitacyjnych, które zostały wyróżnione przez Rady Wydziałów, przed którymi toczyły się odpowiednie procesy; materiały informacyjne na temat uczonych oraz jednostek naukowych/firm chemicznych lub pokrewnych chemii; materiały o aktualnych osiągnięciach w szeroko pojętych naukach chemicznych.

Dodatkową ofertę Wydawnictwa stanowią dwie odrębne serie, „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz seria „Habilitacje”. W serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” publikowane są dłuższe artykuły przeglądowe lub monografie poświęcone ważnym i aktualnym problemom współczesnej chemii, w ramach serii wydawniczej pod nazwą „Habilitacje” mogą być publikowane prace habilitacyjne z obszaru chemii. Zważywszy, że zgodnie z ustawą, dopuszczalne jest przedstawianie rozpraw habilitacyjnych albo w formie monografii, albo w formie pliku powiązanych publikacji, poprzedzonych omówieniem w języku polskim (tzw. autoreferatem), Redakcja przewiduje drukowanie obydwu tych wariantów. Autorzy, którzy chcieliby takie prace napisać, powinni wcześniej skontaktować się z Redakcją, a następnie przesłać wstępnie przygotowaną publikację (redagowaną na wzór artykułów w czasopiśmie „Wiadomości Chemicznych”) lub informację na temat przygotowywanej pracy – tytuł przygotowywanej publikacji, przybliżoną liczbę stron, tabel, rysunków. W chwili obecnej Redakcja nie posiada środków na finansowanie prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz serii „Habilitacje”. W zależności od sytuacji finansowej Wydawnictwa, Redakcja zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

„Wiadomości Chemiczne” znajdują się na liście czasopism punktowanych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Zawartość czasopisma dostępna jest zarówno w formie drukowanej jak i elektronicznej. Elektroniczny dostęp do pełnych tekstów prac jest możliwy poprzez stronę Dolnośląskiej Biblioteki Cyfrowej, <http://www.dbc.wroc.pl/>.

Anglojęzyczne streszczenia wszystkich opublikowanych prac są dostępne na stronie internetowej „Wiadomościach Chemicznych”, <http://old.pages.wchuwr.pl/wiadchem.html>.

Czasopismo od wielu lat jest indeksowane/abstraktowane w dwóch bazach danych (Chemical Abstracts oraz AGRO), a od roku 2012 zostały umieszczone w bazie Polskiej Bibliografii Naukowej, <https://pbn.nauka.gov.pl/journals/24384>.

2. Informacje dla autorów na temat wymagań i zasad publikowania prac

- Prace nie były wcześniej publikowane, ani nie są złożone w redakcji innego czasopisma.
- Autorzy prac stosują się do wymagań praw autorskich tzn. w przypadku zamieszczania rysunków, tabel itp., pochodzących z opracowań opublikowanych w innych czasopismach lub publikacjach zwartych, posiadają pisemną zgodę na ich przedruk.
- Opublikowana raz praca bez zgody Redakcji, nie może być wydawana gdzie indziej.
- Autorzy przysyłający prace po raz pierwszy powinni podać swój numer telefonu oraz adresy poczty tradycyjnej i elektronicznej. Jest to niezbędny warunek sprawnego przebiegu opracowania redakcyjnego tekstu.
- Autorzy zobowiązani są do wykonania korekty tekstu. W pracach przyjętych do druku Redakcja ma prawo dokonywania niezbędnej korekty.
- Jeżeli autorzy nie zastrzegą inaczej w momencie zgłoszenia pracy, wydawca nabywa ogólnych praw autorskich do wydrukowanych prac (w tym prawo wydawania na nośnikach elektronicznych oraz w Internecie). Tytułem powyższego wykorzystania utworów autorom nie są wypłacane honoraria.
- Wszystkie nadsyłane prace są poddawane wstępnej ocenie, która określa czy odpowiadają randze i profilowi „Wiadomości Chemicznych” oraz czy zostały przygotowane zgodnie z formalnymi wymogami MNiSW oraz Redakcji.
- Po uzyskaniu pozytywnej wstępnej oceny wszystkie prace są recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, zgodnie ze wskazówkami zawartymi w broszurze informacyjnej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, http://www.nauka.gov.pl/fileadmin/user_upload/ministerstwo/Publikacje/201110216_MNISW_broszura_210x210.pdf.
- O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny.
- Prace, które Komitet Redakcyjny na podstawie uzyskanych recenzji stwierdził, że nie należy przyjąć do druku w czasopiśmie, po uwzględnieniu sugestii recenzentów mogą być powtórnie przesłane do czaso-

pisma. W takim przypadku praca traktowana jest jako nowy tekst i ponownie przechodzi pełną procedurę recenzowania.

- Ponadto Komitet Redakcyjny informuje, że tzw. „ghostwiting” (ktoś wniósł znaczący wkład w powstanie publikacji, a nie został przedstawiony jako współautor lub też nie został wymieniony w podziękowaniu zamieszczonym w publikacji) lub „guest authorship” (udział autora jest znikomy lub też w ogóle nie miał miejsca, a mimo to jest współautorem publikacji) są przejawem nierzetelności naukowej. Wszelkie przejawy nierzetelności naukowej, łamanie i naruszanie zasad etyki obowiązującej w nauce będą ujawniane, włącznie z powiadomieniem jednostek zatrudniających autorów.
- Autorzy mają prawo do zaproponowania co najmniej trzech niezależnych recenzentów, jednak ostateczny wybór anonimowych recenzentów dokonuje Redakcja.

3. Koszty

Autorzy czasami mogą ponosić częściowe koszty wydania swoich artykułów. Tak jest w przypadku tzw. **stron nadliczbowych** tj. powyżej 25 stron. Za każdą rozpoczętą nadliczbową stroną jest naliczana opłata w wysokości około 50 zł. Najczęściej kwota ta pokrywana jest z funduszy pozyskiwanych przez Autorów lub przez Wydziały które wspomagają wydawanie „Wiadomości Chemicznych”. Niezależnie od rodzaju pracy opłata pobierana jest również za **kolorowe rysunki i wykresy** (zgodnie z faktycznym kosztem druku).

Redakcja zastrzega sobie możliwość zmiany wysokości opłat, w zależności od wielkości dofinansowania z MNiSW oraz wypracowanych środków własnych. Faktura wystawiana jest po ukazaniu się pracy.

W przypadku prac w serii „Biblioteka Wiadomości Chemicznych” oraz „Habilitatione”, Redakcja nie posiada środków na finansowanie i zastrzega sobie prawo negocjacji kosztów druku z autorami lub Instytucjami zlecającymi druk.

4. Informacje szczegółowe dotyczące przygotowania maszynopisu do druku

4.1. Wymagania merytoryczne

Tekst należy napisać zwięźle, prostym stylem, według zasad pisowni polskiej, z zachowaniem poprawnego i obowiązującego nazewnictwa fachowego. Nie należy zamieszczać nadmiaru szczegółów odsyłając Czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego, które to powinno uwzględniać najnowsze informacje, dotyczące napisanej pracy. Literaturę należy cytować ze źródeł oryginalnych.

4.2. Wymagania techniczne składu tekstu

- W przypadku prac współfinansowanych przez autorów, liczba stron oraz forma kolorystyczna manuskryptu nie jest ograniczona (wymagane jest wcześniejsze uzgodnienie z Redakcją).
- Maszynopisy prac autorów którzy nie chcą ponosić dodatkowych kosztów, nie powinny przekraczać 25 stron całej pracy (po wydruku w czasopiśmie) oraz drukowane będą w wersji czarno białej.
- Główny tekst nadsyłanych prac powinien być napisany w edytorze Word, czcionką Times New Roman, 12p z zachowaniem interlinii 1,5 oraz z 5 cm marginesem z prawej strony. Przy podziale tekstu należy stosować numerację cyfrową wielorzędową. Numerujemy tylko tytuły rozdziałów, **nie numerujemy działów**: Abstract, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Uwagi końcowe, Podziękowanie, Piśmiennictwo cytowane. Jednolity sposób numeracji konsekwentnie stosuje się wewnątrz tekstu (w całym tekście tj. zarówno przy numerowaniu rozdziałów, przy przytaczaniu piśmiennictwa cytowanego oraz odwoływaniu się do tabel rysunków itp., **nie należy stosować odsyłaczy hipertekstowych**).
- Tekst powinien być napisany poprawnym językiem, wszystkie skróty muszą być wyjaśnione, oznaczenia i jednostki miar należy podawać według układu SI, pozycje cytowanej literatury należy oznaczać numerami umieszczonymi w nawiasach kwadratowych, w kolejności cytowania wg wzorów [1, 5, 7] (dla prac 1, 5 i 7) lub [1-5, 7] (dla prac od 1 do 5 oraz pracy 7).
- Jeśli w artykułach znajdują się przedruki rysunków, czy innych elementów prac cudzych, w opisach (polskich i angielskich) należy zamieścić stosowną informację.
- Zaleca się umieszczać w tekście pracy rysunki, tabele oraz podpisy (jeśli są przygotowane w edytorze Word), jednak w przypadku plików o bardzo dużych rozmiarach należy zaznaczyć miejsca na ich umieszczenie (zob. Pliki jakie należy przekazać do Redakcji).
- **Pierwsza strona pracy powinna zawierać kolejno:**
 - tytuł pracy w języku polskim (Times New Roman, 14 p, pogrubiony, WERSALIKI), i angielskim (Times New Roman, 14 p, WERSALIKI),
 - pełne imię i nazwisko autora (autorów) pracy (Times New Roman, 15p, pogrubione),
 - pełne nazwy ośrodków przypisane do autorów pracy (wraz z adresem ośrodka i adresem e-mail autora korespondującego (Times New Roman, 10,5, kursywa),
 - spis treści pracy z zastosowaniem następującego podziału:

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Tytuł rozdziału

1.1. Tytuł podrozdziału itp.

Uwagi końcowe

Podziękowanie

Piśmiennictwo cytowane

• **Kolejne strony pracy powinny zawierać:**

- **notki o autorach** pracy wraz z tytułami naukowymi (można dołączyć osobno pliki z fotografiami autorów (zob. **Pliki jakie należy przekazać do Redakcji**),
- **obszerne streszczenie pracy w języku angielskim** (od 1800 do 2700 znaków ze spacjami) z uwzględnieniem cytowanego piśmiennictwa oraz odsyłaczami do tabel, rysunków zamieszczonych w tekście (Rys. 1, Tab. 1-2, Schemat 1) oraz **słowa kluczowe** – nie więcej niż 6, uzyskane najlepiej z bazy hasel przedmiotowych podawane w języku angielskim i polskim,
- **wykaz stosowanych skrótów** – w przypadku niewielkiej liczby skrótów lub akronimów nie jest konieczne zamieszczanie tej pozycji, wówczas, skróty wyjaśniamy w tekście przy pierwszym użyciu. Angielskie skróty należy podać i wyjaśnić wg poniżej podanego wzoru lub w oparciu o inne prace zamieszczone w „Wiadomościach Chemicznych”. Przykład: dla skrótu SSRI – selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny (ang. *Selective Serotonin Reuptake Inhibitor*),
- **dalszy tekst pracy zgodny z podawanym wcześniej spisem treści.**

• **Tabele, rysunki, fotografie**

Jeżeli tabele i rysunki zostały wykonane w edytorze Word, zaleca się, aby były zamieszczone w tekście artykułu, w innym przypadku wymagane jest dołączenie oryginalnych plików.

Tabele i rysunki powinny być przejrzyste, zawierać informacje niezbędne do zrozumienia treści, bez konieczności poszukiwania objaśnień w tekście pracy, należy je numerować cyframi arabskimi oraz podać tytuł (polski/angielski, nad tabelą, pod rysunkiem, Times New Roman, 10 p).

Wszystkie fotografie – należy przesłać w postaci plików zapisanych w formacie tif, jpg lub podobnym, każdą zapisać w oddzielnym pliku o rozdzielczości co najmniej 300 dpi.

• **Piśmiennictwo cytowane**

Piśmiennictwo należy zestawić numerycznie według kolejności cytowania w tekście, należy cytować wyłącznie pozycje istotne dla treści pracy w sposób precyzyjny.

W przypadku **artykułów z czasopism tradycyjnych**, opis powinien zawierać kolejno następujące elementy: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, **numer wolumenu zaznaczony pogrubioną czcionką**, numer pierwszej strony cytowanej pracy, np.

[1] J. Kowalski, Wiad.Chem., 2007, **61**, 473.

[2] W. Kowalski, A. Nowak, Przem. Spoż. 2010, **51**, 3.

W przypadku **książek** najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł książki, nazwę wydawcy, miejsce wydania, rok wydania, np.

[1] J. Malinowski, Tytuł książki, PWN, Warszawa, 2004.

[2] W. Kowalski, Tytuł książki, Volumed, Wrocław, 1999

W przypadku zasobów Internetowych najprostszy opis powinien zawierać: inicjały imion i nazwisko autora (autorów), tytuł (artykułu) dokumentu online, [dostęp], wydawca, [data dostępu]. Warunki dostępu, np.

[7] J. Kowalski, Tytuł artykułu. [online], wydawca, [dostęp: 2010-05-20]. Dostępny w Internecie: <http://www.....>

4.3. Materiały jakie należy przygotować w celu przesłania pracy do Redakcji

Przed podjęciem decyzji o zakwalifikowaniu pracy do druku w celu oceny merytorycznej należy przesłać **jeden** plik kompletnej pracy zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji.

Po uzyskaniu pozytywnej recenzji i po ustosunkowaniu się do uwag Recenzenta oraz Redakcji należy przesłać ostateczną wersję pracy w następującej postaci:

- 1 plik tekstu zredagowany zgodnie z wymaganiami Redakcji;
- 1 plik zawierający krótkie notki biograficzne o autorach nadesłanej pracy (każda notka do 150 wyrazów powinna zawierać: tytuł naukowy, miejsce pracy oraz inne ważne informacje o autorze);

- pliki zawierające zdjęcia portretowe autorów, w nazwie powinny wskazywać autora, którego zdjęcie dotyczy (dobrowolne, przesłanie plików jest jednoznaczne ze zgodą na jego opublikowanie);
- 1 plik zawierający: stronę tytułową, streszczenie (abstrakt), słowa kluczowe, podpisy pod rysunki, tabele, schematy (wszystko w obu wersjach językowych); jeśli zachodzi potrzeba to również oddzielne pliki z rysunkami, schematami, tabelami (zob. Tabele, rysunki, fotografie).

Prace nie odpowiadające wyżej wymienionym wymaganiom nie będą przyjmowane do druku. Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania poprawek stylistycznych i skrótów. Autorzy są zobowiązani do wykonania korekty artykułu i jego zwrotu do Redakcji w ciągu kilku dni od otrzymania.

Na etapie przygotowania szczotki, w przypadku przesyłania prac z kolorowymi stronami prosimy o zaznaczenie, stron które w formie druku mają być czarno-białe. Brak tej czynności może **skutkować wystawieniem faktury za wydruk kolorowych stron**. W przypadku zmian kolorowych rysunków na czarno białe prosimy również o zasygnalizowanie, że w postaci elektronicznej, życzą sobie Państwo wersję w kolorze.

Autor wskazany w liście przewodnim jako osoba kontaktowa otrzymuje drogą elektroniczną plik opublikowanej pracy w formacie pdf.

Prace prosimy przysyłać pocztą elektroniczną na adres: *beata.swiatek-tran@chem.uni.wroc.pl* lub *wchem@chem.uni.wroc.pl*, zaś dokumenty wymagające podpisów autorów (np. list intencyjny, oświadczenia autorów, kopie zgody na przedruk potwierdzone za zgodność z oryginałem) pocztą tradycyjną na adres Redakcji.

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Ewa RADZIKOWSKA, Renata KACZMAREK, Janina BARANIAK: Synteza modyfikowanych oligonukleotydów zawierających stereozdefiniowane internukleotydowe wiązania tiofosforanowe	957
Beata TYLIŃSKA, Aleksandra REDZICKA: Syntezy oliwacyny	983
Małgorzata GRABARCZYK, Katarzyna WIŃSKA, Wanda MĄCZKA: Naturalne i syntetyczne analogi strukturalne jononów	997
Katarzyna SIDOROWICZ, Krzysztof KROPIWNICKI, Ryszard ŁAŻNY: Ostatnie postępy w syntezie alkaloidów tropanowych i pochodnych tropanu	1019
Grzegorz GRYNKIEWICZ, Wiesław SZEJA: Glikozydy nasercowe – nowe trendy w chemii medycznej saponin i sapogenin	1047
Aleksander DARECKI, Agnieszka SAEID, Henryk GÓRECKI: Selen w perspektywie fortyfikacji roślin o znaczeniu gospodarczym dla Polski	1067
Informacje	1083

W NASTĘPNYCH ZESZYTACH UKAŻĄ SIĘ:

- Agnieszka PIWOWAR, Stanisław RYNG, Paulina PŁOSZAJ: Najnowsze kierunki poszukiwań cząsteczek o aktywności przeciwprątkowej
- Beata BUSIAK, Greta UTECHT, Marcin JASIŃSKI: Anion alkoksyalenowy w syntezie związków naturalnych i ich analogów